

白石科学振興会

2022 年度、2023 年度

年報

Annual Report

( No.1 , No. 2 )

*Shiraishi Science Promotion Association*

Amagasaki , Hyogo 660-0085 Japan

# 白石科学振興会 2022年度・2023年度報告（No. 1, 2 合併号）

## 目 次

はじめに

理事長 白石恒裕 5

設立の趣意

白石グループ代表 白石恒裕 6

### I 事業概要と実施状況

1. 1 2022年度事業概要とその実施状況	8
1. 1. 1 2022年度事業概要	
1. 1. 1. 1 優れた研究に対する研究費の助成	
1. 1. 1. 2 若手の高度技術者・研究者の育成に対する助成	
1. 1. 2 研究助成・育成功業実施状況	
1. 1. 2. 1 研究助成事業	
1. 1. 2. 2, 助成採択選作業と選考結果	
1. 1. 2. 3, 研究助成採択者	
1. 1. 2. 4 育成功業	
1. 1. 2. 5 育成功業採択者	
1. 1. 3 贈呈式	
1. 1. 4 記念講演「カルシウムイメージングで解明かす植物の驚くべき能力」	
埼玉大学 豊田正嗣 教授	
1. 2 2023年度事業概要とその実施状況	17
1. 2. 1 2023年度事業概要	
1. 2. 1. 1 優れた研究に対する研究費の助成	
1. 2. 1. 2 若手の技術者・研究者の育成に対する助成	
1. 2. 2 研究助成・育成功業実施状況	
1. 2. 2. 1 研究助成事業と採択者	
1. 2. 2. 2 育成功業と採択者	
1. 2. 3 贈呈式	
1. 2. 4 記念講演「全固体フッ化物イオン電池に向けたカルシウム含有負極の創製」	
京都大学 高見剛 准教授	

- 1.2.5 広報活動
- 1.2.5.1 「白石科学振興会だより」の刊行
- 1.2.6 年報の発刊

## II 役員の状況

2.1 理事及び監事	33
2.2 選考委員	34

## III 2023年度助成成果報告

3.1 研究助成成果報告書（5件）	
○「炭酸カルシウムを活用した複合多糖類系粒子の高表面積化と耐水特性向上に関する研究」	広島大学教授 萩 崇先生 35
○「骨再生を促進する3Dバイオプリン用インクの開発」	大阪大学教授 境 慎司先生 40
○「カルシウムイオン架橋により自己修復機能を持つ注射可能なハイドロゲルの創製」	大阪大学准教授 徐 于懿先生 44
○「植物の長距離カルシウムシグナルの発生・伝播機構」	埼玉大学教授 豊田 正嗣先生 49
○「Ca <sup>2+</sup> シグナルが関与する寿命制御機構の解明」	広島大学教授 水沼 正樹先生 53
3.2 育成功果報告書（10件）	
○「カーボンニュートラルに社会実現に向けた汎用的な石灰石混合セメントの開発」	島根大学大学院 宇野 光稀 57
○「バテライト圧粉体によるLEDs光の可視光変換」	日本大学大学院 川島 さゆり 61
○「異なる相対湿度環境下でのセメント水和物の炭酸化メカニズムに関する基礎的研究」	東京大学大学院 佐伯 直彦 64
○「液相法 CaO-P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> -TiO <sub>2</sub> 生体活性ガラスの細胞挙動評価」	中部大学大学院 白木 翔大 67
○「植物の病害抵抗性カルシウムシグナルに関する研究」	埼玉大学大学院 中野 亜美 70
○「カルシウムとリンの代謝調節機構の相互作用研究」	立命館大学大学院 引原 恵理 73
○「高濃度スラリーにおけるシアシックニングのメカニズム解析」	東北大学大学院 蟋田 大稀 76

○ 「カルシウムイオンによる気孔の開閉制御にかかる機能未知 膜タンパク質の機能解析」	岡山大学大学院 堀川 昂暉	79
○ 「pH/Ca <sup>2+</sup> 濃度変化の同時可視化によるカルサイト溶解反応の解析」	北海道大学大学院 三木 康誠	82
○ 「カルサイト表面における水分子を含んだ脂肪酸膜の特性に関する分子動力学 シミュレーション」	岡山大学大学院 森 隼平	85
3.3 研究成果公表論文		88
○ Aratani Y, Uemura T, Hagiwara K, Toyota M(2023): “Green leaf volatile sensory calcium transduction in <i>Arabidopsis”</i> <i>Nature Communications</i> 14,6236		
○ Horikawa M, Fukuyama M, Antebi A, Mizunuma M(2024): “Regulatory mechanism of cold-inducible diapause in <i>Caenorhabditis elegans”</i> <i>Nature Communications</i> 15,573		
IV 白石科学振興会の立上げに寄せて		106
“研究助成事業の第一歩、そして進むべき道” ～追い風のカルシウム研究の流れに乗って～	名譽顧問 日高重助	
おわりに		122

## はじめに



理事長 白石恒裕

カルシウム研究の振興を目指す弊振興会は創設2年目を終え、主たる事業である研究助成事業が一巡し、素晴らしい研究成果報告を戴くことが出来ましたので、この度、年報（年次報告書、Annual Report）を刊行しました。年報の作成を通して、振興会活動をしつかり見直し、一層の発展を図るための方策を考える一助にしたいと思います。

広く、多くの皆様にご高覧いただき、多様なご意見を賜ることが出来れば、幸甚に存じます。

さて、最近の夏の暑さは異常で、国内で40°Cを超える気温を記録することなど、ほんの10年前には予想だに出来ないのことでした。この止まる事を知らない気候変動（異常気象）の動向には恐怖感すら抱く昨今です。

地球上に生命が誕生した頃の大気は、CO<sub>2</sub>、N<sub>2</sub>と水蒸気が大半を占め、酸素は無かったそうです。最初の生命が海底で誕生し、その生命（生物）はいろいろ進化を遂げ、太陽光による光合成を行うラン藻が海底に誕生すると、大気中のCO<sub>2</sub>濃度を減少させ、酸素濃度を増大させました<sup>1)</sup>。大気中の酸素濃度の増加に伴って、生物は陸上に上がり、現在では、地球上の生物の総重量は470Gtで、その生物のうち‘ヒトを含む動物、微生物’は4.5%で、残り約95.5%は‘植物’だそうです<sup>2)</sup>。この植物のおよそ27億年の長きにわたる光合成により、地球の周囲が酸素で覆われ、我々にとって住みよい環境が形成されました。さらには、人類に有害な紫外線を遮断するオゾン層をも形成したのです。

ところが、この50～60年の間に、人類は工業化社会、便利な社会、快適な生活を追い求めた結果、植物が光合成で消費するCO<sub>2</sub>の量を上回る量を排出し、大気中のCO<sub>2</sub>ガス濃度を上昇させて地球温暖化を招いた可能性があります。また、過度の快適な生活の追及はオゾン層の破壊をも引き起こしました。

このCO<sub>2</sub>の増大による温暖化の抑制が現代社会に抱えた最重要課題の一つです。我々もガス化合法による炭酸カルシウムの製造を生業としており、残念ながら炭酸ガスの排出を

避けることが出来ていません。その反省からも、弊振興会の研究助成では“CO<sub>2</sub>ガスの固定化とその利用”に関する研究の振興にも大きな力を注ぎ、大気中のCO<sub>2</sub>の削減を進めて参りたいと思います。幸いにも、我が国では、人工光合成の研究が非常に盛んであり、その一層の振興を図る所存です。

一方、最近注目される成果が、大気中のCO<sub>2</sub>ガスの固定化の大部分を担っている植物の光合成の研究で生まれたようす<sup>3)</sup>。植物の光合成は、水を分解して、水素イオンと酸素を取り出す反応と二酸化炭素と水素イオンを用いて、植物の栄養となるグルコースを作る反応から成っています。これまでの長い研究で未解明であった“水を分解して水素イオンと酸素を取り出す反応のメカニズム”が、解き明かされようとしています。この反応を司るマンガン・カルシウムコンプレックス触媒の中央にはカルシウム元素があり、大変重要な役割を演じているようです。現代の生物はカルシウムリッチな海底で誕生したためでしょうか？カルシウムを賢く利用することについては神秘とも言えるほどの知恵を持っており、その知恵が、今明らかにされようとしているのです。

植物の光合成の神秘的なメカニズムが明らかになると、その知恵を利用して人工光合成の効率も格段に向上することが期待され、明るい未来が開けることでしょう。

研究助成事業は、その第一歩を踏み出したばかりですが、カルシウム関連の研究成果が社会の進展を力強く推し進めることを確信することができました。今後一層、カルシウム関連研究の振興に精進してまいりますので、皆様のご指導とご鞭撻を何卒よろしくお願ひ申し上げます。

\*) この「はじめに」を執筆するに際し、下記の文献を参考にしました。記して謝意を表します。

- 1) (独) 環境再生保全機構ホームページ～大気環境の情報館～「探求ノート、地球の大気と水」
- 2) NHK YouTube, 「NHK スペシャル 植物が進化させた驚くべき能力! 「超・進化論」第1集  
植物からのメッセージ～地球を彩る驚異の世界～」
- 3) 読売新聞（2024年2月4日）、「光合成100年の謎、解明へ前進」

# 設立の趣意

## 白石科学振興会の設立にあたって

いつの時代においても、我々が住む社会は、日々急速に進展しています。この社会が進展する先は、人類が希求する社会像である「すべての人が経済的には勿論、精神的、文化的に豊かで、健康、安全で、便利な社会」です。1900 年代の初頭、白石グループの創業者白石恒二は、世界に先駆けて、天然石灰石を工業的に精製する「ガス化合法」を発明し、この社会の進展に大きな貢献を果たしました。この発明により、炭酸カルシウムの粒子の形と粒子径分布を制御した高機能炭酸カルシウムの大量生産が可能になり、歯磨き粉をはじめ、自動車のタイヤやゴム製品、プラスチック部品、インクや塗料、あるいは食品の添加物として世界の国々で用いられ、それぞれの国における“豊かで、便利な社会”の形成を推し進めました。進展をする社会には、いつの時代にも、行く手を阻む多くの困難な課題が生じます。現代社会も、少子高齢化、あるいは脱炭素社会の実現や SDG's の達成をはじめ、多くの課題の解決を迫られています。これらの課題の中には、我が国において豊かな資源の一つであるカルシウムあるいはカルシウム化合物により解決が期待できるものがあり、現在大変活発な研究が展開されております。

カルシウムは、人間をはじめとする動物、植物にとってナトリウム、カリウム、リン等と並んで、生体内の情報伝達や生理機能を司る大変重要な基本元素であり、カルシウムやカルシウム化合物によるヒトを含む動物の疾病予防や植物の生長促進など、人類の健康増進や食料問題の解決が期待されています。さらには、環境、エネルギー、生体材料あるいは先進工業材料の開発など、非常に広範な分野の問題を解決する可能性があり、一刻も早いカルシウムやカルシウム化合物の高度利用に関する研究の成果が待ち望まれています。

そこで、この度「白石科学振興会」を設立して、カルシウムおよびカルシウム化合物の高度利用とそれに関連する科学と工学に関する研究の振興を図りたいと思います。

お陰様で、白石工業株式会社は 2019 年に創立 100 周年、また株式会社白石中央研究所は今年に創立 50 周年を迎えることができました。これまで多くの方々からいただいたご協力、ご支援に対し、深甚なる感謝の意を込めて、白石科学振興会の活動を通じてカルシウムや炭酸カルシウムを含むカルシウム化合物により、新しい社会の扉が開けるように尽力してまいります。

本振興会の活動が、現代社会が抱える困難な課題を解決して、人類が願う「すべてに豊かで便利な社会」への歩みを加速させ、社会の発展のお役に立てることを切に願っております。

2022 年 4 月

白石グループ代表  
白石工業株式会社 代表取締役  
白石カルシウム株式会社 代表取締役  
株式会社白石中央研究所 取締役  
白石 恒裕

# I 事業概要と実施状況

## 1.1 2022年度事業概要とその実施状況

### 1.1.1 2022年度事業概要

弊振興会は、カルシウムの高度利用を進める科学と工学の振興を図り、カルシウムやカルシウム化合物の高度利用により現代社会が抱える諸課題を解決し、豊かで便利な社会の発展に寄与することを目的としてして、次の事業を実施することにしている。

- (1) 優れた研究に対する研究費の助成
- (2) 優れた研究業績を挙げた研究者あるいはグループに対する褒賞の授与
- (3) 若手の高度技術者・研究者の育成に対する助成
- (4) 講演会やシンポジウムなどの開催あるいは開催援助
- (5) その他、目的を達成するために必要な事業

本年度は、本振興会立ち上げの初年度であるために、上記事業の中から本振興会の事業の柱となる(1)と(3)の事業に絞って実施した。

#### 1.1.1.1 優れた研究に対する研究費の助成（予算：500万円、以下「研究助成」という）

- ・2023年度研究助成対象者の採択

助成金支払：2023年3月、助成対象研究期間：2023年4月～2024年3月

現代社会が抱えるエネルギー、環境、医療、食糧問題などの広範な分野における諸課題をカルシウムあるいはカルシウム化合物を利用して解決しようとする研究が活発に行われている。そこで、カルシウムあるいはカルシウム化合物の利用、材料開発や生産に関する科学と工学に関する優れた研究の中から5件に対して、1件当たりそれぞれ100万円の助成を行った。

カルシウム関連材料の開発や生産に関する有用な知見を与える優れた研究を広範な領域から選定するために、直接カルシウム化合物を材料として用いていない研究も助成対象とした。例えば、物質の結晶成長機構、粒子複合材料の開発、スラリーのレオロジー特性等に関する研究等、あるいは化学工学や粉体工学の単位操作研究、製剤研究なども助成対象とした。

#### 1.1.1.2 若手の高度技術者・研究者の育成に対する助成（予算：300万円、以下「育成助成」という）

- ・2023年度育成助成対象者の採択
  - ・助成金支払：2023年3月、助成対象研究期間：2023年4月～2024年3月
- 若手の技術者・研究者の育成は、主として各大学の大学院博士課程においてなされている。現在では、大学院博士課程後期課程の学生に対しては、種々の奨学金や助成制度が用意されており、比較的支援が行き届いている。

そこで、本振興会は技術者・研究者育成助成として大学院博士課程前期課程（修士課程）1年生の学生およびそれに相当すると認められた学生を対象として、一人当たり30万円の助成を10件実施することにした。

この技術者・研究者の育成に対する助成についても、直接カルシウム化合物を材料として用いていない研究であっても、カルシウム関連材料の開発や生産に有用な知見を与える研究に携わる学生は助成対象とした。

### 1.1.2 研究助成・育成助成事業実施状況

#### 1.1.2.1 研究助成事業

募集要項にしたがって、2022年5月1日に研究助成、育成助成の募集を開始し、7月31日に締め切った。

表1に示す通り、カルシウム関連研究は、現代社会が抱える多くの課題の解決に大きな貢献が期待されており、非常に広い分野で、活発な研究がなされている。

表1 カルシウム関連研究の現状

#### カルシウム関連研究は広い研究分野で行われている

◎生体	ヒト・動物に関する研究は非常に盛ん(全国の医学部、医生命工学系)
◎エネルギー	カルシウムイオン電池、高電気伝導性 $\text{Ca}_2\text{N}$ の開発、水電解用触媒、アンモニア合成触媒の開発
◎環境	建築材料(漆喰の特性)、炭酸化による $\text{CO}_2$ ガスの固定化、サンゴの生育と海水の性質、コンクリートの完全リサイクル(炭酸カルシウムコンクリートの開発)
◎植物(農業)	植物の情報伝達、低温ストレスの伝播、植物防御模倣剤、肥料の施し方、消石灰による土質改善、尻腐れ病などの対策
◎畜産、飼料	効率的家畜の生産による生理・生育不順、カルシウムの欠乏による疾病
◎食品	カルシウム欠乏症の改善、腸管での効果的吸収機構、目的部位への搬送方法
◎工業材料	カルシウム粒子複合材料、触媒開発、生体材料、医用材料の開発
◎生産技術開発	特性測定技術開発、粉体プロセス装置・操作技術、AI制御システムの開発

弊振興会にとっては、研究助成の初年度であるために、カルシウム関連研究を実施されている方々に種々の方法で申請のお願いをした。各種学会誌の会告への掲

載並びに当振興会からのダイレクトメールで募集要項を配布した。

さらに、カルシウム関連研究の中で、特に優れた研究をご申請いただくために、申請勧誘を行った。申請勧誘に当たっては、表 2 に示す勧誘方針のもとに実施した。

動物、植物など生物関連分野は、白石グループにとって比較的関係が希薄であり、独創性の高い研究の発掘を目指して申請勧誘を行った。材料、プロセシング技術の分野は、白石グループの得意分野でもあり、とくに申請勧誘をせずとも多くの申請を戴いた。以上の募集活動により、70 件の申請研究が応募された。

表 2 申請勧誘に当たっての方針

申請勧誘方針
◎広い研究分野からの申請を得たい。いろいろな分野に勧誘活動を実施
◎医学関連など、比較的研究費が潤っている分野は避けたい
◎すでに国家プロジェクト規模の推進体制で動いている研究は除外
◎カルシウム研究として夢のある、キラリと光る研究が欲しい (人体影響、植物への影響、食品、エネルギーなど)
◎若い研究者を中心に、研究支援が十分でない注目すべき研究に助成

### 1. 1. 2. 2 研究助成採択選作業と選考結果

選考にあたって、申請研究を次の 4 分野に分けて、申請研究の審査・評価を行った。

- A、人体の生理作用、食品添加物、機能性食品など
- B、植物・動物の生理作用、農業応用など
- C、カルシウム利用材料（工業材料、生体材料、歯科材料、触媒…）
- D、材料粒子特性の測定と制御、生産プロセシング

その結果、選考委員会で表 3 に示す 2023 年度研究助成採択者候補者が選定され、理事会で助成採択者と決まった。

今回、初めての選考作業を行い、次に示す課題が明らかになった。

- 1, 助成対象の研究分野が非常に広く、現在の選考委員だけでは十分な評価が難しい。

- 2, 申請件数が非常に多く、採択件数 5 件では少ない。

これらに対しては早速理事会で審議され、次年度は次の方針で研究助成事業を実施することになった。

- 1, 申請研究分野と評価に当たる評価委員の専門性を可能な限り一致させるために選考委員に加えて、新たに審査委員 15 人を選任し、合わせて 25 人の委員で申請研究の評価に当たる。

- 2, 次年度は、採択件数を 10 件に倍増する。(振興会立ち上げの時期であるために、

状況を熟慮しながら、徐々に採択件数を増加させる)

### 1. 1. 2. 3 研究助成採択者

2023 年度研究助成採択者は、次の 5 名の方々である。

表 3 2023 年度研究助成採択者

No.	氏名	所属	テーマ
1	荻 崇	広島大学大学院先進理工系科学研究科 先進理工系科学専攻	炭酸カルシウムを活用した複合多糖類系微粒子の 高比表面積化と耐水特性向上に関する研究
2	境 慎司	大阪大学大学院基礎工学研究科	骨再生を促進する3Dバイオプリント用インクの開発
3	徐 干懿	大阪大学大学院工学研究科 応用化学専攻	カルシウムイオン架橋により自己修復能を持つ 注射可能なハイドロゲルの創製
4	豊田 正嗣	埼玉大学大学院理工学研究科	植物の長距離カルシウムシグナルの発生・伝播機構
5	水沼 正樹	広島大学大学院統合生命科学研究科	Ca <sup>2+</sup> シグナルが関与する寿命制御機構の解明

### 1. 1. 2. 4 育成助成事業

育成事業も研究助成事業と同じく 2022 年 5 月 1 日に募集を開始し、7 月 31 日に締め切った。

育成助成の申請勧誘は、主として大学院指導教授宛のダイレクトメールで行った。その結果、38 件の申請を戴いた。

申請を選考委員全員で審査・評価にあたった。選考委員会で表 4 に示す研究助成採択者候補者が選定され、理事会で助成採択者と決まった。

### 1. 1. 2. 5 育成助成採択者

2023 年度育成助成採択者は、次の 10 名の方々である。

表4 2023年度育成助成採択者

No.	氏名	所属	テーマ
1	宇野 光稀	島根大学自然科学研究科 環境システム科学専攻	カーボンニュートラル社会実現に向けた汎用的な 石灰石 混合セメントの開発
2	川島 さゆり	日本大学大学院理工学研究科 物質応用化学専攻	微細バテライトによる構造色の発現に及ぼす諸条件 の影響
3	佐伯 直彦	東京大学工学系研究科建築学専攻 建築材料研究室	セメント水和物の炭酸化メカニズムに関する基礎的研究
4	白木 翔大	中部大学大学院工学研究科 応用化学専攻	液相法 CaO-P2O5-TiO2 生体活性ガラスの 細胞挙動評価
5	仲野 亜美	埼玉大学大学院理工学研究科 生命科学専攻	植物の病害抵抗性カルシウムシグナルに関する研究
6	引原 恵理	立命館大学大学院食マネジメント研究科	カルシウム・リン代謝調節を担うビタミンDおよび ENPP1作用の連携に関する研究
7	蛭田 大稀	東北大学大学院環境科学研究科	高濃度スラリーにおけるシアシックニングの メカニズム解析
8	堀川 昂暉	岡山大学大学院環境生命科学研究科	カルシウムイオンによる気孔の開閉制御にかかる 機能未知膜タンパク質の機能解析
9	三木 康誠	北海道大学大学院理学研究院 自然史科学専攻地球惑星システム科学講座 地球惑星物質学研究グループ	Ca <sup>2+</sup> およびMg <sup>2+</sup> 濃度の同時可視化による炭酸塩結晶の表面溶解過程の観察
10	森 隼平	岡山大学大学院自然科学研究科	水-酸化物ナノ界面における粘性挙動に関する 分子動力学シミュレーション

### 1.1.3 贈呈式

研究助成・育成功成の贈呈式は、2023年3月15日白石工業株式会社本社大會議室で開催された。理事長、振興会役員（理事・選考委員）さらに白石グループ各社の役員・社員出席のもと実施された。理事長挨拶の後、研究助成・育成功成それぞれの採択者に贈呈状が贈られた。

その後、記念講演として、研究助成受贈者の埼玉大学豊田正嗣先生のご講演をいただいた。

#### 1.1.3.1 研究助成と育成功成の贈呈



白石裕俊理事より育成功成の贈呈



受贈者荻崇先生より謝辞



受贈者・理事・選考委員の記念写真

### 1.1.4 記念講演

#### 2023年度贈呈式記念講演

2023年3月15日 14:00～15:15

演題 「カルシウムイメージングで解き明かす植物の驚くべき能力」

講演者 埼玉大学 豊田正嗣 教授

研究助成受贈者による第一回目の記念講演は、植物の情報伝達がカルシオウムシグナルで行われていることを実際に可視化して実証し、世界を驚かせた埼玉大学の豊田先生により行われた。

2022年の暮れから2023年1月にかけて、NHKは、夜のゴールデンアワーに「超進化論」なる科学番組を放映し、生物学の新しい夜明け、目を見張る新しい数々の発見を華々しく謳い上げ、一般社会に生物学の進歩を強く印象づけて新年を迎えた。豊田先生は、それらの番組の先陣を切って、大活躍をされた。



図1.4.1 NHKの番組、本のタイトルカバー (\*当日の講演資料より転載)

今回のご講演は、「公園や野原で、静かに風にそよいでいる植物は、我々をゆったりした気分にし、和ませてくれる。一方で、畑や家庭のプランターでは、虫に齧られた野菜や草花を見かける。植物は、虫に齧られても、何も感じないのだろう?」という問い合わせで始まった。そして、「実は植物も、我々と同じように外からの情報を瞬時に感じて、全身に高速でカルシウムの信号(カルシウムシグナル)を送り、驚くほど賢く対処している様子を、詳しく説明され、大変興味深いお話だった。

まず、植物が何かを感じると、全身にカルシウムシグナル(以降、Ca<sup>2+</sup>シグナルと略記する)が伝わるが、そのシグナルの観察方法の説明があった。実験前には、試料植物の“シロイヌナズナ”を用い、それに遺伝子操作を施してCa<sup>2+</sup>イオンが結合すると、緑色に発光する緑色蛍光タンパク質をシロイヌナズナの中に生成させた。これで、シロイヌナズナの中にCa<sup>2+</sup>シグナルが発生すると、生体内を流れるカルシウムシグナルの様子が生体外から蛍光顕

微鏡で観察することが出来る。

### 1, “シロイヌナズナ”が青虫の幼虫に齧られたことを全身に知らせる仕組み

図1.4.2は、シロイヌナズナの蛍光顕微鏡写真である。Ca<sup>2+</sup>イオンの濃度が高いほど明るく光っている。下部は、幼虫に齧られたシロイヌナズナの連続写真である。左側の写真が幼虫に齧られた瞬間で、右方の写真はCa<sup>2+</sup>シグナルが伝播する様子を示している。植物には神経は無いので、Ca<sup>2+</sup>シグナルは、水や栄養分が通る師管を流れていることが明らかにされた。この伝達速度は、1mm/s程度で植物の世界の事象の速さが感じられる。

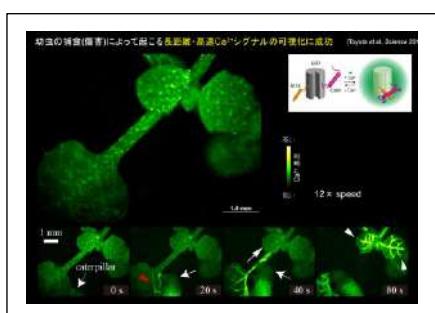


図1.4.2 カルシウムの伝播の様子<sup>1)</sup>

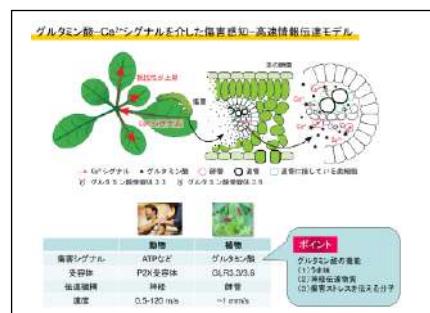


図1.4.3 カルシウムシグナル発生機構<sup>2)</sup>

図1.4.3はCa<sup>2+</sup>シグナルの発生機構を示す。植物の葉が齧られるとグルタミン酸が流れ出し、グルタミン酸受容体が植物の細胞内のカルシウムを増大させ師管を流れ、他の葉に伝達されるのである。また大変興味深いことに、このCa<sup>2+</sup>シグナルが到達した葉では、まだ虫に齧られていないのに、虫が忌避する植物ホルモン（ジャスモン酸）が合成されていることも明らかにされた。すなわち、植物は虫に齧られると、瞬時に全身に伝え、他の葉ではジャスモン酸を合成して、将来の虫の攻撃に備えるという、植物特有の防御システムが発見された。さらに、その植物の周りに共生している他の植物にも、虫の情報が伝えられているのではないか？と、大気中での情報伝達システムの解明が進んでいるようである。本年度の申請研究の目的は、この植物間のコミュニケーション機構の解明である。

一方、筋肉も持たず、動かす命令を送る神経を持たない動く植物は、どのようなメカニズムで動くのか？が、植物分野の長い間の疑問だった。“オジギソウ”や“ハエトリ草”に関するご自身の研究を基に、オジギソウは、どのようなメカニズムでお辞儀をするのか？、何故お辞儀をするのか？またハエトリ草が高速で閉じる仕組みについて詳しいお話を聞くことが出来た。

講演後の質疑応答では、「何故植物の情報伝達がカルシウムイオンで行われるのですか？カルシウムイオンの何が都合がいいのですか？」という難しい質問が出た。この質問は、誰もが疑問として持つのであるが、真正面から答えられる方に、まだお目に掛かることが出来ていない。この年報の中で、しばしば述べたが、「我々のような真核細胞の集まりからできている多細胞生物が発生した頃の海底は、Ca<sup>2+</sup>イオンがリッチで、誕生した生命の周囲はCa<sup>2+</sup>イオンに取り囲まれていた。したがってCa<sup>2+</sup>イオンを上手に使える生物が進化したから」と

いうのも答えの一つであろうと思われる。とにかく、知的好奇心をそそられる素晴らしい講演だった。

「参考文献」

- 1) 豊田正嗣 ; 当日の講演資料から転載
- 2) 豊田正嗣ら ; 生物物理、**62**, 56–57 (2022)、

(日高重助記)

## 1.2 2023 年度事業の概要

### 1.2.1 2023 年度事業概要

前述の通り、本振興会は、目的を達成するために次の事業を実施することとしている。

- (1) 優れた研究に対する研究費の助成
- (2) 優れた研究業績を挙げた研究者あるいはグループに対する褒賞の授与
- (3) 若手の高度技術者・研究者の育成に対する助成
- (4) 講演会やシンポジウムなどの開催あるいは開催援助
- (5) その他、目的を達成するために必要な事業

本振興会の初年度である昨年度、上記(1)と(3)の事業に絞って実施したところ、助成事業における採択件数や採択研究の選考体制をはじめ、いくつかの課題が明らかになった。これらの課題の解決を図るために、本年度も事業を(1)と(3)に絞って実施した。加えて、本年度はカルシウム研究の大切さと面白さを社会に広報するための活動を行った。

#### 1.2.1.1 優れた研究に対する研究費の助成（予算：1,000 万円）：

- ・2024 年度研究助成対象者の採択
- ・助成金支払：2024 年 3 月、助成対象研究期間：2024 年 4 月～2025 年 3 月

医療、エネルギー、環境、食糧問題など現代社会が抱える深刻な課題をカルシウムあるいはカルシウム化合物を利用して解決しようとする研究が、ますます活発になっている。そのために昨年度は、大変多くの申請があり、採択率が約 7 % と大変低くなった。そこで、本年度はカルシウムあるいはカルシウム化合物のヒトを含む動植物に対する生理作用あるいは材料開発や生産に関する科学と工学に関する優れた研究の中から採択件数を 10 件に増大し、1 件当たりそれぞれ 100 万円の助成を実施した。

カルシウム関連研究は非常に広範な分野で実施されているために、研究助成の申請も大変広い分野から申請されるために、申請研究と選考委員の専門分野を一致させることが難しい。そこで、本年度は、申請研究の分野を勘案して審査委員を選定し、専門分野の不一致を解消することにした。（予算 15 万円）。

#### 1.2.1.2 若手の技術者・研究者の育成に対する助成（予算：300 万円）：

- ・2024 年度育成対象者の採択
- ・助成金支払：2024 年 3 月、助成対象研究期間：2024 年 4 月～2025 年 3 月

若手技術者・研究者の育成は、主として大学院博士課程においてなされている。現在では、大学院博士課程後期課程の学生に対しては、種々の奨学金や助成制度が比較的充実している。そこで、本振興会は技術者・研究者育成助成として大学院博士課程前期課程 1 年生の学

生およびそれに相当すると認められた学生を対象として、一人当たり 30 万円の助成を 10 件実施する。

なお、上記(1)と(3)において、カルシウム関連材料の開発や生産に関する研究では、直接カルシウム化合物を試料として用いていない研究であっても、カルシウム関連材料の開発や生産に有用な知見を与える研究に携わる研究や学生は助成対象とした。

### 1.2.2 研究助成・育成功業実施状況

#### 1.2.2.1 研究助成事業と採択者

研究助成は、5月1日に公募を開始し、募集を7月31日に締め切った。募集方法は、

- (1) ホームページに募集要項を掲載、
- (2) 大学および研究機関の研究者宛の電子メール（約50件）、
- (3) 大学・研究機関研究者宛にダイレクトメール(郵送)で送付（約100件）、
- (4) 学会誌への掲載（日本セラミックス協会、無機マテリアル学会）

により行った。応募された申請研究は71件であった。

本年度の振興会の運営は、昨年度の運営で経験を積んだ振興会担当のメンバーのみで行い、アドバイザー無しでの運営を試みた。その運営では、優れた研究の申請勧誘やZoomシステムを利用した勧誘活動もしない方針としたために、生物（動物と植物）関連の申請が極端に減少したが、申請総件数は昨年並みであった。

また、選考に当たってでは、審査委員15名を選任する予定だったが、実際に選任された審査委員は3人であり、昨年課題として指摘された申請研究と評価委員の専門を十分に一致させることができなかった。

また、昨年経験したとはいえ、まだまだ選考作業に不慣れで、選考にあたっての基本的判断力に課題も見受けられた。今後改善する。

2024年度研究助成採択者は、表5のとおりである。

#### 1.2.2.2 育成功業と採択者

育成功業の公募も5月1日に開始し、7月31日に締め切った。

応募件数は、勧誘活動が行われなかつたので、19件と半減した。まだ振興会の立ち上げの期間であり、十分周知されている振興会では無いので、しっかりした勧誘活動が必要である。

本年度の育成功業採択者は、表6の方々である。

表5 2024年度研究助成採択者

No.	氏名	所属	テーマ
1	石垣 隆正	法政大学 生命科学部 環境応用化学科	水溶液中のレーザーアブレーション法による炭酸カルシウムナノサイズ微粒子の合成
2	小幡 亜希子	名古屋工業大学大学院工学研究科	カルシウム含有可食性ポリマーを用いた培養肉作製用細胞足場材料の開発
3	木須 一彰	東北大学 金属材料研究所 (IMR)	カルシウム金属を負極に用いた高エネルギー密度型蓄電池の開発
4	高見 剛	京都大学大学院人間・環境学研究科	全固体フッ化物イオン電池に向けたカルシウム含有負極の創製
5	武田 博明	埼玉大学大学院理工学研究科	カルシウムを主成分とする高温用圧電結晶の開発
6	中島 一紀	北海道大学大学院工学研究院環境循環システム部門	セルロースナノファイバーと機能性タンパク質により強化した環境調和型バイオセメント技術の開発
7	比良 徹	北海道大学大学院農学研究院基盤研究部門生物機能化学分野	消化管ホルモンGLP-1の分泌増強因子としてのカルシウムの可能性
8	福井 国博	広島大学大学院先進理工系科学研究科	バグフィルタ集塵装置における水酸化カルシウム粉体によるCO <sub>2</sub> 除去法の開発
9	堀田 耕司	慶應義塾大学理工学部生命情報学科	カルシウムシグナルを利用した付着生物の人工変態誘導による変態制御と開始機構解明
10	松永 克志	名古屋大学大学院工学研究科物質科学専攻	第一原理水溶液熱力学による炭酸カルシウムにおける異種イオン固溶状態解明

表6 2024年度育成助成採択者

No.	氏名	所属	テーマ
1	雨宮 佑馬	大阪大学大学院工学研究科マテリアル生産科学専攻	ソルボサーマル合成法を駆使したハイドロキシアパタイトの高機能水浄化材料の開発
2	小嶋 華	東京理科大学大学院創域理工学研究科生命生物科学専攻	植物細胞の極性先端成長の方向と速度の制御における細胞内カルシウムイオン濃度の動態の解析
3	高橋 実紀	名古屋工業大学大学院工学研究科	生体用リン酸カルシウム系ガラスの繊維形状化
4	成澤 瑛紀	日本大学大学院理工学研究科物質応用化学専攻	減圧下におけるCaCO <sub>3</sub> の脱炭酸に及ぼす鉄系添加剤の影響
5	名和 史織	大阪大学大学院工学研究科マテリアル生産科学専攻	化学反応を援用した低温プロセスによる新規リン酸カルシウム系セラミックスバルク体の創製
6	西田 佳祐	長岡技術科学大学大学院機械創造工学専攻	ナノ秒パルス電場アシストによるアパタイトの焼結性改善に関する研究
7	莫 佩文	大阪医科大学薬学研究科	生体適合性金属有機構造体を利用した薬物含有DDSキャリアの設計
8	長谷川 晋一	北海道大学大学院研究院自然史科学専攻 地球惑星システム科学講座地球惑星物質学研究グループ	pH及びCa <sup>2+</sup> 濃度の同時可視化による準安定リン酸カルシウムの表面溶解過程の観察
9	林 利有樹	筑波大学生物資源科学学位プログラム	糸状藻類の繊維内腔への炭酸カルシウム充填による透明性制御技術の開発
10	森田 千歩	東京大学大学院理学系研究科化学専攻	高湿度下での非晶質炭酸カルシウムの結晶化における多形制御

### 1.2.3 贈呈式

2023年3月15日13時15分から、白石工業（株）本社大会議室において多くの受贈者のご出席を得て、贈呈式が盛大に開催された。



研究助成の贈呈



受贈者と役員の記念写真



高見先生の記念講演

## 2024 年度贈呈式記念講演

2024 年 3 月 15 日 14:00～15:15

演題 「全固体フッ化物イオン電池に向けたカルシウム含有負極の創製」

講演者 京都大学 高見剛 准教授

研究助成受贈者の高見先生による記念講演は、「全固体フッ化物イオン電池に向けたカルシウム含有負極の創製」という題目で、バッテリー(二次電池)の研究開発について説明頂きました。リチウマイオン電池は高い電気容量が特徴で、電気自動車、パソコン、スマートフォンなどに幅広く使用されます。そして本ご講演はリチウマイオン電池よりもさらに高い電気容量が得られる将来技術を基盤としたもので、Li:リチウムの代わりにF:フッ素を用いる全固体フッ化物イオン電池の研究開発です。

特に電気自動車は走行距離に課題がありますが、高電気容量化に成功すると、走行距離が伸び、また、全固体フッ化物イオン電池は発火リスクもないで、安全性が高くなります。

高見先生のチームは、もともとリチウマイオン電池を研究していましたが、さらに性能が高い全固体フッ化物イオン電池の研開発に舵取りをされました。その理由はフッ化物イオン材料の優位性があるからです。

それは、イオン電池は電荷移動としてどのイオンを用いるのか、またその場合のそれぞれ正極、電解質、負極の材料設計をどうするのかが鍵となります。本研究開発では、リチウムイオンよりも一度に多くの電荷を移動させることができるフッ化物イオンに注目しております。しかし、それには従来のリチウマイオン電池の材料は使用できず、新しい正極、電解質、負極の材料開発が必要となりました。

最初に正極は移動する電荷を蓄える役割で、電気容量が高ければ高いほど良い材料と言えます。まず  $\text{Ca}_{0.8}\text{Sr}_{0.2}\text{FeO}_2$  のという高電気容量の材料を見つけ、それにフッ化物イオンを電気の力で入れる方法(高見先生のチームが発見)を用いて、フッ化物イオンを本材料に入れ込み、レドックス機構という新素材である  $\text{Ca}_{0.8}\text{Sr}_{0.2}\text{FeO}_2\text{F}_x$  を作成されております。その結果、リチウマイオン電池よりも圧倒的に高い電気容量の正極材料を開発することに成功しております。

次に電解質として、フッ化物イオンを通す固体電解質の高電導度率化に注目しております。実用化できる多結晶状態において、室温で高いフッ化物イオンの高伝導率を示す材料が必要でしたが、現在開発されている高伝導率を示す固体電解質材料の動作温度は 140°C 以上でした。高見先生のチームは、2 次元層状物質の六方晶窒化ホウ素をフッ素化した単結晶状態のフッ化物イオン電導体材料を作成されました。それは室温で世界最高レベルのフッ化物イオン伝導率を達成しました。さらに研究は続き、超イオン伝導体の  $\alpha\text{-CuBr}$  を模倣した

材料から超フッ化物イオン伝導体材料のTIF（フッ化タリウム）を開発されました。

最後に負極は電気陰性度が低い材料を用いて、起電力の改善を検討されました。従来の毒性のある Pb:鉛ではなく、Ca:カルシウムを利用した  $[Ca_2N]^{+} \cdot e^{-}$  を材料に注目して展開しています。

まとめると、本研究開発は電気容量を高くするためにリチウムイオンの代わりにフッ化物イオンを用いて、それぞれの正極、電解質、負極材料を新規にデザインしております。その正極材料は新しい材料設計の手法であるレドックス機構を用いて、高電気容量化を目指し、電解質は固体電解質材料に拘り、安全性の高い材料設計を念頭に置き、負極材料は環境負荷を考えて、Pb:鉛から Ca:カルシウムへの転換を進めています。

今回のご講演を通じて、今までの殻を破って自由な創造で材料設計を進めております。このことはとても難しいですが、新規な手法で解決し、そのチャレンジング精神の大切さを気づかせて頂きました。また、リチウム資源の枯渇問題に対してフッ素での電池設計が可能になれば、それは自然界に多く存在する元素なので、生産者も消費者も安心して使用することができます。今回、ご講演して頂きました高見先生の今後のご研究のご成功をお祈り申し上げるとともにお礼の言葉に代えさせて頂きます。（萱野善貞記）

## 1.2.5 広報活動

### 1.2.5.1 「白石科学振興会だより」の刊行

カルシウム研究の振興を図るために、研究資金を助成・支援するだけで不十分で、振興目的を十分に達成することはできない。

社会が抱えている重要な課題をカルシウム関連の研究成果が解決することが良く理解され、カルシウム研究の大切さが十分理解され、研究成果を期待し、待ちわびられている社会の醸成が必要である。この社会こそが、カルシウム研究を加速度的に進めるエンジンとなる。

そこで、助成研究内容を易しく伝える「振興会だより」をの刊行をお紹介した。一般社会人の方を対象として、研究の意義と目的を伝えるとともに、研究の面白さ、ロマンなどが伝わるものとなることを目指している。

記事に関するご感想とご意見をどしどしお寄せください。

尚、発行は、年3回程度、英文・和文版でホームページに掲載するとともに、紙媒体でも発行する予定です。

# 白石科学振興会だより

No. 23001

## [2023年度助成研究の紹介]

2023年9月1日発行

埼玉大学理学研究科 教授 豊田正嗣先生

**研究テーマ「植物の長距離・高速カルシウムシグナルの伝播機構」**

**“植物、実は賢い！ 害虫から自分で身を守っている”**

朝ドラの影響で、最近、植物への関心が非常に高まっていますが、本年度の助成研究に、植物の「驚くべき賢い能力」の発見に関連して世界の注目を集めている研究が採択されました。この研究を紹介します。カルシウムが関係する素晴らしい植物のヒミツを知り、新たな思いで草花を楽しんでください。

### 1. 植物の秘密を発見！

森や野原で、風にそよぐ木々や草花は、何事にも動じることなく、ゆったりとしており、我々を清々しい気分にし、和ませてくれる。

その一方で、家庭菜園や公園では、虫に齧（かじ）られた野菜や樹木を目にすることがあります、痛々しい。植物は、虫に齧られても、何も感じないのでしょうか？

最近、豊田教授のグループは、植物が虫に齧られると、“齧られた傷口からカルシウムシグナルを発し、そのカルシウムシグナルが植物の体内を高速で駆け巡り、虫に齧られたことを全身に知らせていることを発見した。とくに、全身を高速で駆け巡るカルシウムシグナルを世界で初めてリアルタイムで撮影し、世界中を驚かせた<sup>1)</sup>。これにより、植物は、人間や他の動物と同じく、体内の情報伝達のためにカルシウムシグナルを用い、しかも、そのカルシウムシグナルが伝わった、まだ齧られていない健康な葉では、害虫が嫌がるジャスモン酸などの物質を合成し、葉に蓄え、将来の害虫からの攻撃に備えて、自分の身を守る準備をしていることも分かった。

この素晴らしい発見は、農薬（殺虫剤）を用いない安全な食料生産技術の開発、あるいは動物・植物に共通の進化理論の展開など、学問の世界にも渡って壮大な素晴らしい貢献が期待されている<sup>2)</sup>。本年度の助成研究では、「植物の中を高速で駆け巡るカルシウムシグナルの発生と伝播機構」について、さらに基礎的で、詳しい解説がなされる。この「だより」では、助成研究のキッカケとなった「植物の生体内を流れるカルシウムシグナルと植物の賢い能力の発見の様子」を豊田先生の解説<sup>2,3)</sup>をもとに、易しく紹介する。



(秋の花、コスモス)

### 2. 植物の中を流れるカルシウムシグナルの観察

カルシウムシグナル（以下、Caシグナルと略記する）は、我々の体の中でも重要な情報伝達を担っている。よく知られているのは、筋肉の収縮である。脳から「腕を動かせ！」という命令が出ると、運動神経からの信号を受けて、腕の筋肉細胞の中のカルシウムが情報を伝えて、筋肉全体筋を伸び、縮みさせ

る。長年に渡って、人や植物のCaシグナルを研究され、Caシグナルのイメージングに深い経験を持っておられた豊田先生は、独自に開発されたイメージングシステムにより植物の中を流れるCaシグナルの撮影に成功された。これにより、植物の中でも、人間などの動物と同じく、Caシグナルで情報が伝達されていることが明らかになった。はじめに、植物の中を駆け巡るCaシグナルの観察方法を簡紹介しよう。

**「カルシウムシグナルの観察」** 植物の生体内を流れるCaシグナルの検出には、カルシウムイオン( $\text{Ca}^{2+}$ )が結合すると、緑色の蛍光を発するGCaMPと呼ばれるタンパク質が使われた。実験に使われた植物は、植物の実験では一般的な、キャベツと同じアブラナ科の「シロイヌナズナ」である。実験前に、このシロイヌナズナの体内に、遺伝子組換え技術を用いて蛍光を発するタンパク質GCaMPを作らせた。これにより、もし、シロイヌナズナの細胞の中のカルシウムイオンが増大すると、そのカルシウムイオンがGCaMPと結合し、生体内で蛍光を発する。その蛍光の様子を、外部から蛍光顕微鏡で観察すると、植物体内のカルシウムイオンの動きを知ることができる。次に実例で説明しよう。



(シロイヌナズナ)

**「観察実験の例」** 図1は、健康なシロイヌナズナ(図a)の右側の一枚の葉(図b)の破線部分をピンセットで挟んだ時、シロイヌナズナの全身にCaシグナルが伝わる様子を示している。葉がピンセットで挟まれて傷つけられると、すぐ傷口のカルシウムイオン濃度が高くなり、強い蛍光を発する。その蛍光が葉脈を流れ(白矢印)、遠くの傷つけられていない葉に次々と伝播して(赤矢印)、「葉が傷つけられた」ことを全身に知らせている。このカルシウムイオンの濃度変化による情報伝達をカルシウム(Ca)シグナルと呼んでいる。

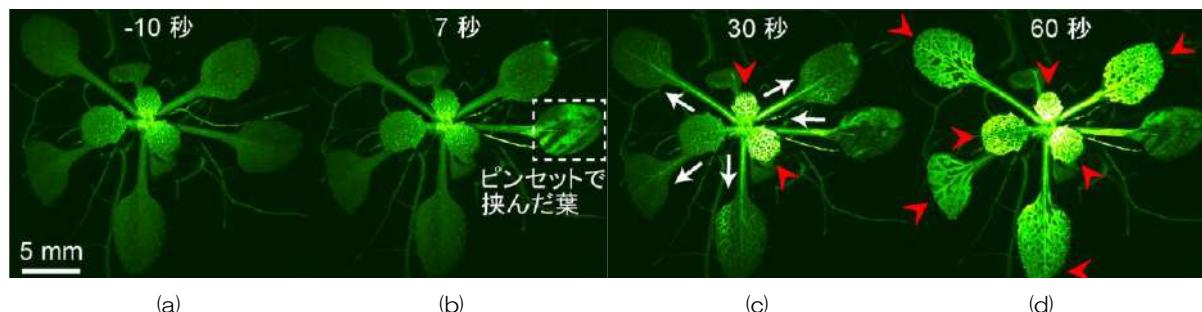


図1 シロイヌナズナの葉をピンセットで挟んだ時、傷口からカルシウムシグナルが伝わる様子<sup>2)</sup>  
(図中の時間は、葉をピンセットで挟んだ瞬間からの経過時間を示す)

**「カルシウムシグナルの観察から分かったこと」** この実験と同様の実験観察を繰り返して行い、次のことが明らかになった。

- ◎ シロイヌナズナの葉を、モンシロチョウの幼虫に齧らせた実験でもCaシグナルが発生した。すなわち、シロイヌナズナは、虫に齧られたことをCaシグナルにより全身に知らせている。
- ◎ 葉を幼虫が齧っても、ピンセットで挟んで機械的に傷つけても、Caシグナルが伝播した。虫でも機械的な原因でも、とにかく、葉が傷つくとCaシグナルが発生するのである。
- ◎ さらに驚くべき事は、Caシグナルが到達した葉では、まだ傷つけられていないにも関わらず、虫が嫌うジャスモン酸を瞬時に合成し、葉に蓄えていた。
- ◎ すなわち、植物は害虫にかじられたことをCaシグナルにより全身に知らせ、まだ齧られていない葉では、将来の害虫の攻撃に備えて害虫が嫌う物質を蓄積し、自分の身を守っている。

◎ 人間のように神経を持たない植物では、Ca シグナルは植物が水や養分を運ぶ師管（しかん、末尾の用語説明参照）の中を伝搬していることも分かった。

### 3. 植物の葉に含まれるグルタミン酸がカルシウムシグナルを発生させる

グルタミン酸は、食物の旨味成分として知られているが、人間の脳における神経伝達物質でもあり、神経にあるグルタミン酸受容体（用語説明参照）と呼ぶタンパク質を活性化して、カルシウムイオンを神経細胞に流入させ、神経での情報伝達を行っている。

シロイヌナズナにも、20種類のグルタミン酸受容体があり、葉が虫に齧られたり、傷つけられると、葉からグルタミン酸が流れ出て、細胞膜にあるグルタミン酸受容体を活性化し、シロイヌナズナの細胞内にカルシウムイオンを流入させることにより、Ca シグナルが発生するものと類推される。

ということは、葉が傷つけられなくとも、グルタミン酸受容体を活性化するグルタミン酸をシロイヌナズナの細胞外から与えても、Ca シグナルが発生するはずである。そこで、図2に示すように、シロイヌナズナの1枚の葉（赤矢印の場所）にグルタミン酸溶液が塗布された。すると、推測通り、白矢印で示す

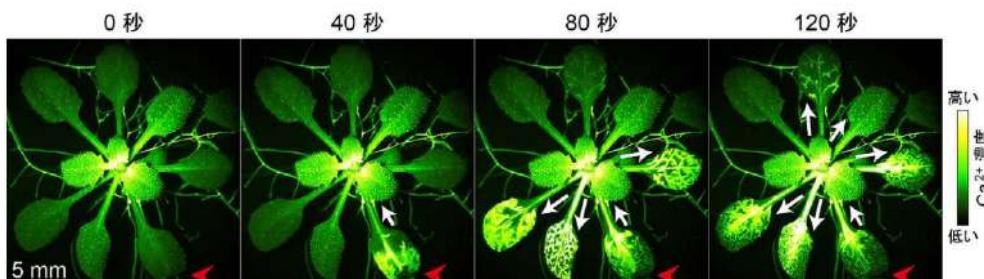


図2 1枚の葉（赤矢印の場所）にグルタミン酸溶液を塗布した時のカルシウムシグナルの発生<sup>3)</sup>

通り、Ca シグナルが全身に伝播した。しかも、Ca シグナルが到達した葉では、害虫が嫌がるジャスモン酸を合成し、蓄積していた。この知見は、植物のグルタミン酸受容体を活性化する農薬が開発されれば、殺虫剤を使わないで、安全な、高品質の食料生産が可能であることを示唆している<sup>2)</sup>。

### 4. カルシウムシグナルが発生する仕組み

そこで、植物の Ca シグナルシステムを利用するため、その仕組みが詳細に検討された<sup>2)</sup>。

すなわち、植物が害虫に齧られると、①傷ついた葉の細胞や組織からグルタミン酸が細胞外に流出する。②このグルタミン酸が師管や柔細胞にあるグルタミン酸受容体を活性化させ、③細胞内に  $\text{Ca}^{2+}$  イオンが流入する。④この Ca シグナルが師管などを通って遠方の葉に高速で伝播し、⑤遠方の葉では、将来の害虫の攻撃から自身を守るために、ジャスモン酸を合成し、葉の中に蓄積する。

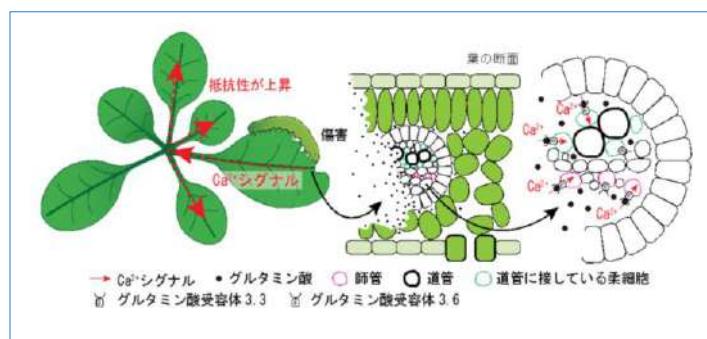


図3 カルシウムシグナルの発生機構<sup>2)</sup>

### 5. 本研究の応用への期待

静かに風にそよいでいる植物は、一見何も感じていないように見えるが、実際には、虫に齧られていることをCaシグナルにより、全身に伝えていた。しかも、そのCaシグナルにより、ジャスモン酸の合成と蓄積を行って害虫に抵抗する「植物特有の賢いシステム」を持っていた。

また、虫に齧られ、傷つけられなくとも、グルタミン酸を葉に塗布すると、害虫に抵抗する植物特有のシステムが作動することも分かった。このことは、植物のグルタミン酸受容体を活性化するアミノ酸型農薬が開発されれば、大量の殺虫剤を散布することなく、人間を含む動物に、無害で安全な高品質の食料生産が可能であることを示唆している。

近年、アフリカの砂漠では、バッタが大量発生して穀物が失われ、大飢饉が発生している<sup>4)</sup>。地球温暖化とともに、バッタは徐々に北へ移動しており、大飢饉はインドの砂漠に拡大している。このような地球規模の困難な課題が、大量の殺虫剤を散布することなく解決される日も近いと思われる。

「引用文献」 1) Toyota,M. et al.: Science,361,1112(2018)、2) 豊田正嗣：生物物理、62,56-57(2022)、3)

豊田正嗣：化学と生物、58,(2)70-72(2020),4) 前野ウルド浩太郎：「バッタを倒しにアフリカへ」光文社新書(2017),



バッタの被害を伝える書籍<sup>4)</sup>

### 「研究者紹介」

#### 豊田正嗣（とよた まさつぐ）先生

埼玉大学大学院理学研究科教授, Honorary Fellow, University of Wisconsin-Madison  
サントリー生命科学財団フェロー

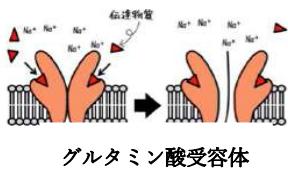


### 「用語説明」

「師管（しかん）」植物の葉で、光合成により作られた栄養分を運ぶ植物の器管、右の説明図①に赤線で示した管

### 「グルタミン酸受容体」

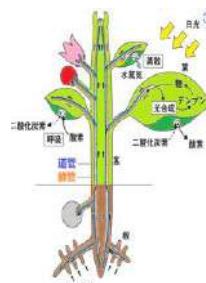
グルタミン酸受容体には、いろいろな種類があるが、イオンチャネル型グルタミン酸受容体を例にして説明する。細胞膜に存在するグルタミン酸受容体にグルタミン酸（説明図②中赤色三角印）が結合すると、チャンネルが開き、陽イオンの  $\text{Ca}^{2+}$ のみを（この図では、陽イオンの  $\text{Na}^{2+}$ であるが）、細胞内に選択的に取り込み、細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$ イオン濃度が高くなる。



グルタミン酸受容体の説明図②

(Youtube TEKIBO 高校勉強動画

「生物第7講」～情報伝達と受容体～)より



師管の説明図①

<https://kagakuhannou.net/>

vascular-bundle より

### おわりに～予告～

今、植物の世界では、多くの植物との共生に必要な、植物間でのコミュニケーション方法の発見をはじめ、植物が持つ賢い能力が次々と明らかにされており、目が離せません。

一方、人間を含む動物の世界でも、驚くべき秘密が明らかにされています。次の「だより」では、本年度採択研究の中から、「 $\text{Ca}^{2+}$ シグナルが関与する寿命制御機構」を紹介します。ご期待ください。

# Newsletter

No. 2301

## [Presentation of 2023 Grant-funded research]

Published: October 30, 2023

[2023 Grant-funded research]

Professor Dr. Masatsugu TOYOTA

### **“Long-range, Rapid Ca<sup>2+</sup> Signal Transduction in Plants”**

Recently, a spate of discoveries highlighting the amazing capabilities of plants has attracted a great deal of attention. A study that has attracted worldwide attention regarding the discovery of the "astonishing cleverness" of plants has also been selected from this fiscal year's grant-funded researches promoted by our foundation. We decided to present the study in this "newsletter". Learn the secrets on the role of calcium in these wonderful plants, and enjoy the observation of the plant kingdom.

#### **1. Discover the secrets of plants!**

In forests and fields, trees and flowers rustle in the wind, gently and unperturbed giving us a sense of refreshment and peace.

On the other hand, it is painful to see vegetables and trees in kitchen gardens and public parks attacked by insects. But, don't plants feel anything when they are attacked?

Recently, the group led by Prof. Toyota discovered that, when plants are bitten by an insect, "calcium signals, triggered from the wound site, propagate at high-speed throughout the plants' body to allow them to sense attacks from insects". In particular, Prof. Toyota was the first to capture real time images of calcium signals traveling at high-speed through the plant's body; a major accomplishment that took the world by storm<sup>1)</sup>. His study demonstrated that, similarly to what happens in humans and other animals, transmission of biological information in plants also occurs via calcium signaling. Still more surprisingly, the study showed that calcium signals propagating in undamaged leaves promote the synthesis and storage of insect repellent substances, such as jasmonate, which allow plants to mount a preemptive defense against future attacks.

This wonderful discovery may lay the foundation for substantial contributions from across the academic world, such as the development of safe food production technology without the use of agrochemicals (e.g., pesticides), or the development of evolutionary theories focusing on the similarities between animals and plants<sup>2)</sup>. This fiscal year's grant-funded research will provide more basic and detailed information about the "generation and high-speed propagation mechanisms of calcium signals in plants". In this "newsletter", we will introduce, in an accessible manner, and based on a Prof. Toyota's commentary<sup>2,3)</sup>, which prompted this research, "how calcium signals propagate through plants' body and the discovery of plants' cleverness".



(Cosmos, flower in autumn)

#### **2. Observation of calcium signals propagation in plants**

Calcium signaling (hereinafter abbreviated as Ca signaling) plays an important role in transmitting biological information inside our bodies. A well-known example of this is its role in muscle contraction. When your brain sends the command "move your arm!", calcium in muscle cells of your arm transmits this information via a neural signal generated by motor neurons, causing the whole muscle to stretch and contract. Prof. Toyota, who has studied Ca signaling in humans and plants for many years and has a broad experience in Ca signaling imaging, successfully captured images of Ca signals propagating through plants with a novel real-time imaging



(Arabidopsis thaliana)

system. His study demonstrated that, similarly to what happens in humans and other animals, biological information in plants is transmitted via Ca signaling. For starters, we will briefly introduce a method for observing propagation of Ca signals in plants.

**[Observation of calcium signaling]** An engineered protein called GCaMP, which fluoresces green upon binding to calcium ions ( $\text{Ca}^{2+}$ ), was used to detect Ca signals traveling through the plant's body. The plant used in the experiment was an *Arabidopsis thaliana*, a member of the mustard (Brassicaceae) family, which also includes cultivated species such as cabbage. Before starting the experiment, the *arabidopsis* was genetically modified to stimulate internal production of the fluorescent protein GCaMP using recombinant DNA technology. Because of this, calcium ions in the plant cells increased and, upon binding to GCaMP, produced fluorescence *in vivo* (i.e., emitted directly from the plant's body). The fluorescence images can be examined using a fluorescence microscope to determine the movement of calcium ions within the plant's body. Then we will demonstrate this with an example.

**[An example of experimental observation]** Figure 1 shows how Ca signals propagate throughout the whole body of a healthy *Arabidopsis thaliana* (Fig. 1a), when the right leaf (indicated by a dashed line in Fig. 1b) is pinched with tweezers. When a leaf is injured with tweezers, the calcium ion concentration at the wound site immediately increases, producing a bright fluorescence. These fluorescence signals pass through leaf veins (indicated by white arrows) and propagate gradually to distal undamaged leaves (indicated by red arrows) to inform the plant's body that a "leaf has been injured". This transmission of biological information determined by changes in calcium ion concentration is called calcium (Ca) signaling.

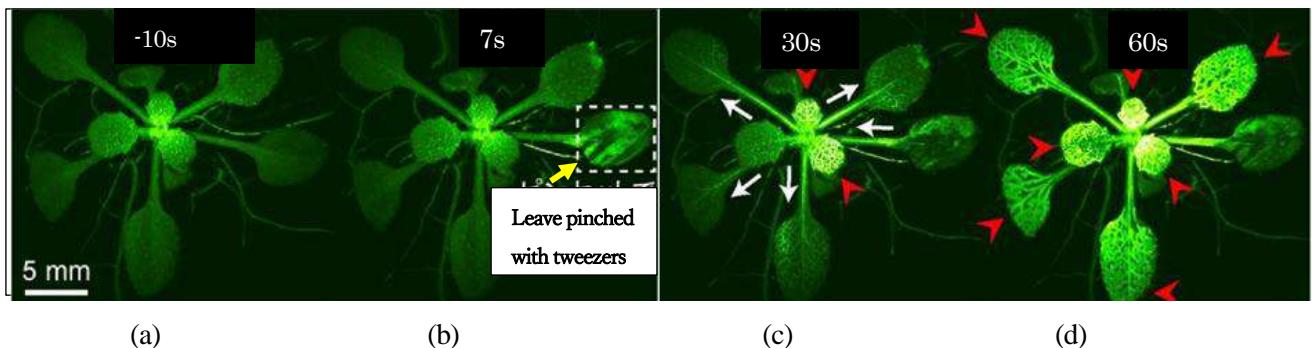


Fig.1 Calcium signals emitted from the wound site when an *arabidopsis* leaf is pinched with tweezers  
(The times shown in the figure indicate the time elapsed from the moment the leaf was pinched with tweezers)

**[Facts learned from the observation of calcium signaling]** The following points were made clear from this and other similar experimental observations.

- ◎ Ca signaling was also observed in an experiment with *arabidopsis* leaves damaged by larvae of the cabbage white. In other words, *arabidopsis* can sense damage by insects throughout its whole body via Ca signaling.
- ◎ Propagation of Ca signals in plants can be observed regardless of whether leaf injury is caused by organisms, such as larvae, or is mechanically induced by pinching with tweezers. In short, leaf injury activates Ca signaling in plants.
- ◎ Even more surprising is the fact that Ca signals propagating to undamaged leaves induce instant biosynthesis and storage of insect repellent substances such as jasmonate.
- ◎ In other words, the plant's ability to sense damage by insects throughout its whole body via Ca signaling allows undamaged leaves to protect themselves from future attacks by storing substances which repel insects.
- ◎ Since, unlike humans, plants do not possess nerves, Ca signals propagate through the sieve tube (see glossary at the end), whose main function is to provide water and nutrients to the plant.

Although commonly known as a flavor enhancer in food products, glutamate is also the principal excitatory neurotransmitter in the human brain. Glutamate receptors (see glossary at the end) are proteins found in the nervous system, which, upon activation by glutamate, allow calcium ions to flow into neuronal cells to convey information to nerves.

In *Arabidopsis*, which contains 20 glutamate receptors, the glutamate released from the wound site of insect-damaged leaves is thought to trigger Ca signaling via the activation of glutamate receptors on cells membrane which allow calcium ions to flow into the plant's cells.

This means that glutamate, via activation of glutamate receptors, should trigger Ca signaling even when applied exogenously to undamaged leaves. Therefore, as shown in Fig.2, when a glutamate solution was applied to one leaf of the *arabidopsis* (indicated by the red arrow), our assumption was confirmed and propagation of Ca signals was observed

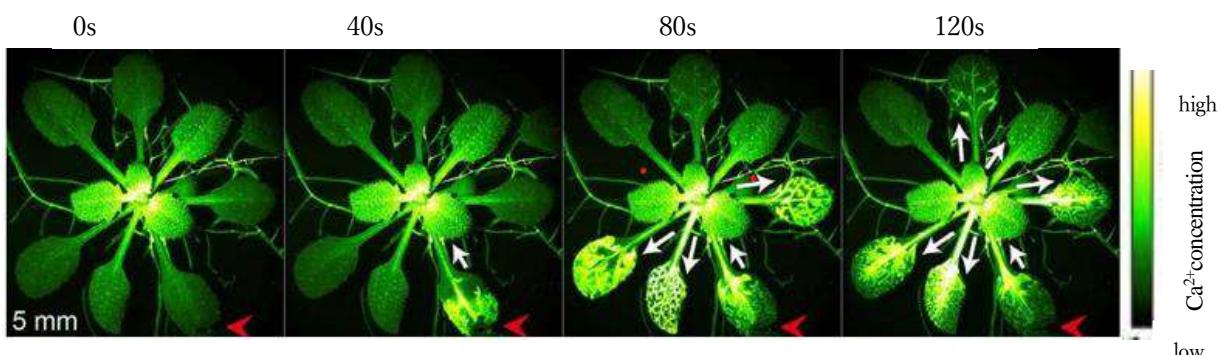


Fig.2 Triggering of calcium signaling when one leaf is fed with a glutamate solution (indicated by a red arrow)<sup>3</sup>

throughout the whole plant's body, as shown by the white arrows. Moreover, Ca signals propagating to leaves induce biosynthesis and storage of insect repellent substances such as jasmonate. This suggests that safe and high-quality food production without the use of pesticides may be possible if agrochemicals that trigger glutamate receptors activity are developed<sup>2).</sup>

#### 4. Activation mechanisms of calcium signaling

In order to exploit the benefits of Ca signaling in plants, its mechanisms have been investigated in detail.

In plain words, when a plant is damaged by an insect:

- ① glutamate is released from the cells and tissues of the damaged leaves.
- ② This glutamate triggers activation of glutamate receptors in the sieve tube and parenchyma cells, and
- ③  $\text{Ca}^{2+}$  ions flow into the plant's cells.
- ④ The Ca signals generated by the damaged leaves propagate rapidly, through plant's parts such as the sieve tube, to distal leaves which
- ⑤ synthesize and store jasmonate to protect

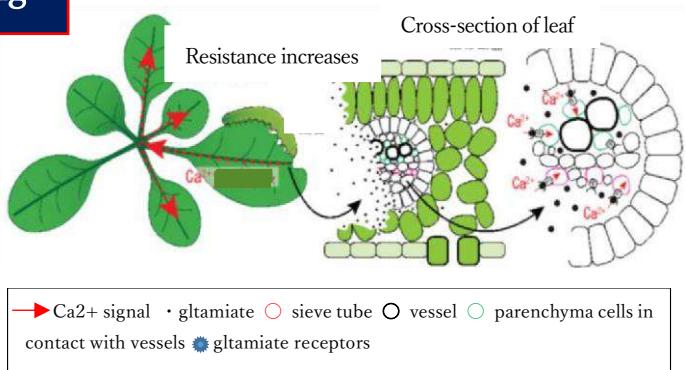


Fig.3 Generation mechanism of  $\text{Ca}^{2+}$  signal

themselves from future attacks by insects.

## 5. Potential applications of the research findings

Plants do not seem to sense anything while rustling quietly in the wind, but in fact, they can sense attacks from insects all over their body via Ca signaling. In some respect, the biosynthesis and storage of jasmonate triggered by Ca signals can be likened to a "plant-specific intelligent defense system" which repels insect attacks.

Moreover, it also became clear that, even when plants were not attacked or damaged by insects, external application of glutamate to leaves is enough to activate this plant-specific system. This suggests that, if amino acid-based agrochemicals capable of triggering glutamate receptors activity in plants can be developed, it would be possible to produce safe and high-quality food without harming both animals and humans and avoid the use of massive amounts of pesticides.

In recent years, a massive outbreak of locusts in the African desert led to grain losses and severe famine. With global warming, locusts migrated to the north, and the great famine has spread to the deserts of India. Maybe the day is not far off when these global challenges will be resolved without the massive use of pesticides.

[References] 1) Toyota,M. et al.; Science,361,1112(2018)、2)Toyota M. ; Seibutsu-butsuri , 62,56-57(2022)、3)Toyota M. : Kagaku to Seibutsu、 58,(2)70-72(2020)

### Introduction of Researcher

#### Professor Dr. Masatsugu TOYOTA

Graduate school of science, Saitama University, Saitama Japan  
Honorary Fellow, University of Wisconsin-Madison



### [Glossary]

**[Sieve tube]** A plant organ responsible for the transport of nutrients made during photosynthesis to leaves

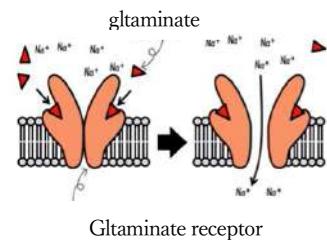
**[Glutamate receptors]** There are various types of glutamate receptors, but here we will focus on ionotropic glutamate receptors (i.e., receptors that function by directly opening ion channels).

The binding of glutamate to glutamate receptors located in the cell membrane (indicated by red

triangles in illustration ) triggers the opening of selective channels which allow only  $\text{Ca}^{2+}$  cations

(in the illustration,  $\text{Na}^{+}$ cations are shown) to flow into the cells, resulting in a high intracellular  $\text{Ca}^{2+}$

ion concentrate (This illustration of glutamate receptors is from TEKIBO youtube channel's high school study video "Biology Lesson 7" - signal transduction and receptors-)



## Closing remarks / Notice

If we want to live in harmony with nature, we cannot turn our gaze away from the array of discoveries that shed light on the astonishing capabilities of plants, including those that clarified the mechanisms by which they communicate with other plants.

Meanwhile, amazing secrets are revealed in the animal kingdom which also includes humans. In the next "newsletter" we will present a study titled "Involvement of  $\text{Ca}^{2+}$  signaling in the mechanisms of lifespan regulation" from this fiscal year's selected researches. Don't miss it.

## 1. 2. 6 年報の発行

振興会の 1 年間の活動実績を総覧し、当該年度の評価と今後の問題点などを抽出できるものとしたい。一般に、年報は活動実績を記載し、保管しておくものと理解され、編集後は読まれることも無く、書棚に収まっているのが普通である。

弊振興会は、現在広誌を持っていないので、カルシウム関連研究の情報や注目すべきニュースをお知らせすることが出来ない。そこで、弊振興会で発刊する年報は、通常の年報よりも広報誌の内容も加味して、読者に役立ち、カルシウム関連研究の近未来における夢も語れるような年報を心掛けた。これについても、ご意見とご感想をどしどしお寄せください。

## II 役員の状況

### 2. 1 理事および監事（所属は 2022 年 3 月現在）

	氏名（敬称略）	所属
理事長	白石 恒裕	白石工業株式会社 代表取締役 白石カルシウム株式会社 代表取締役
副理事長	鈴木 洋	神戸大学 大学院工学研究科教授
常務理事	南里 泰徳	株式会社白石中央研究所 代表取締役
選考担当理事	中平 敦	大阪公立大学 大学院工学研究科教授
理事	市川 秀喜	神戸学院大学 薬学部 教授
理事	宇山 浩	大阪大学 大学院工学研究科教授
理事	松坂 修二	京都大学 大学院工学研究科教授
理事	三宅 真実	大阪公立大学 大学院獣医学研究科教授
理事	白石 裕俊	白石工業株式会社 取締役 株式会社白石中央研究所 代表取締役
理事	西場 俊之介	白石カルシウム株式会社 取締役
監事	高梨 博武	白石工業株式会社 取締役 白石カルシウム株式会社 取締役

## 2.2 選考委員（所属は 2022 年 3 月現在）

	氏名（敬称略）	所属
委員長	中平 敦	大阪公立大学 大学院工学研究科教授
委員	白川 善幸	同志社大学 理工学部教授
委員	戸塚 裕一	大阪医科大学 薬学部教授
委員	原田 美由紀	関西大学 化学生命工学部教授
委員	松本 卓也	岡山大学 学術研究院 医歯薬学域教授
委員	山地 亮一	大阪公立大学 大学院農学研究科教授
委員	江口 健一郎	株式会社白石中央研究所主幹研究員
委員	萱野 善貞	白石工業株式会社執行役員
委員	正明 耕一	白石カルシウム株式会社執行役員
委員	松原 桂	白石工業株式会社 技術開発・品質保証本部ゼネラルマネージャー

## III 2023 年度助成成果報告

### 3.1 研究助成成果報告

下記 5 件の成果報告を次ページ以降に掲載する。

- 「炭酸カルシウムを活用した複合多糖類系粒子の高表面積化と耐水特性向上に関する研究」 広島大学教授 荻 崇先生
- 「骨再生を促進する 3D バイオプリン用インクの開発」 大阪大学教授 境 慎司先生
- 「カルシウムイオン架橋により自己修復機能を持つ注射可能なハイドロゲルの創製」 大阪大学准教授 徐 于懿先生
- 「植物の長距離カルシウムシグナルの発生・伝播機構」 埼玉大学教授 豊田正嗣先生
- 「Ca<sup>2+</sup>シグナルが関与する寿命制御機構の解明」 広島大学教授 水沼正樹先生

### 3.2 育成助成成果報告書（10 件）

育成助成の成果報告 10 件を研究助成成果報告の後に続けて掲載する。

## 白石科学振興会 研究成果報告書（研究助成）

2024年 5月 31日

白石科学振興会

理事長 白石 恒裕 殿

研究者 氏名：(和文) 萩 祥

(英文) Takashi Ogi

所属・職名：(和文) 広島大学大学院先進理工系科学研究科・教授

(英文) Graduate School of Advanced Science and Engineering,  
Hiroshima University · Professor



### 1. 研究テーマ

(和文) 炭酸カルシウムを活用した複合多糖類系微粒子の高比表面積化と耐水特性向上に関する研究

(英文) Research on Increasing Specific Surface Area and Improving Water Resistance Properties of Polysaccharide Composite Particles Utilizing Calcium Carbonate

### 2. 研究の要約

(和文)

本研究では、当研究室で開発された炭酸カルシウムナノ粒子を用いた噴霧乾燥法による多孔質ペクチン微粒子において、i)多孔質構造の詳細解析と粒子形成機構の解明、ii)耐水溶性向上の原理解明、iii)液相たんぱく質吸脱着性能の評価を実施した。i)については、プラズマ FIB-SEM を用いた多孔質ペクチン微粒子の断面観察より、粒子内部まで、炭酸カルシウムナノ粒子由来の細孔が空いていること、そして、それが連通細孔を有していることを明らかとした。ii)については、多孔質ペクチン微粒子の耐水性の向上の原因がカルシウムイオンとカルボキシ陰イオンとの結合による架橋構造（エッグボックスモデル）であった。iii)は、開発した多孔質ポーラスペクチンは負に帯電 (-30 mV) しており、液相中 (pH 7) で正帯電しているリソチームを電気的相互作用で吸着出来ることが実証され、その飽和吸着量は炭酸カルシウム濃度の増加に伴い増加することを明らかにした。

(英文)

In this study, our laboratory used a spray-drying method with calcium carbonate nanoparticles to create porous pectin particles. This research focused on: i) a detailed analysis of the porous structure and elucidation of the particle formation mechanism, ii) understanding the principles behind improved water resistance, and iii) evaluating the liquid-phase protein adsorption/desorption performance. For i), through cross-sectional observations of the porous pectin particles using plasma FIB-SEM, we discovered that the particles contained pores originating from the calcium carbonate nanoparticles, which were open to the inside of the particles and interconnected. For ii), the improvement in water resistance of the porous pectin particles was found to be due to cross-linking between calcium ions and carboxylate anions of pectin (known as the egg-box effect). For iii), the developed porous pectin particles, which carries a negative charge (-30 mV), demonstrated the capability to adsorb positively charged lysozyme (at pH 7) through electrostatic interactions. The result revealed that the saturated adsorption capacity increases with the increasing of calcium carbonate concentration.

### 3. 研究内容

本研究の目的は、当研究室で開発された炭酸カルシウムナノ粒子を用いた噴霧乾燥法による多孔質ペクチン微粒子において、i)多孔質構造の詳細解析と粒子形成機構の解明、ii)耐水溶性向上の原理解明、iii)液相たんぱく質吸着性能の評価である。

多孔質ペクチン粒子の製造は、図1に示すように、テンプレート支援噴霧乾燥法と化学的除去プロセスにより実施した。テンプレートとは、造孔材のことであり、本研究では、炭酸カルシウム（ $\text{CaCO}_3$ ナノ粒子：公称径 80 nm）を用いた。溶液中のペクチン濃度は重量比で 1.0% に保ち、 $\text{CaCO}_3$ ナノ粒子の重量比率はペクチンの重量に対して 4、8、12 の比率で変化させた。噴霧乾燥装置（BÜCHI B-290 ミニスプレードライヤー）における二流体ノズルは、液体供給管（0.7 mm）とその外側のガス供給管（1.5 mm）で構成されている。原料ペクチン、 $\text{CaCO}_3$ ナノ粒子、およびイオン交換水からなる原料溶液を、毎分 3 mL の割合で噴霧乾燥機に供給した。入口空気の温度は 150 °C に設定し、噴霧用ガスの流量と吸引ガス速度はそれぞれ 357 L/h および 37,000 L/h に設定した。比較のため、純粋なペクチンも同様のプロセスを用いて製造した（PPT-0としてラベル）。噴霧乾燥後、複合粒子はクエン酸水溶液と混合、攪拌（15 分間）し、 $\text{CaCO}_3$ ナノ粒子を除去した。その後、得られた粒子をエタノールで遠心分離洗浄し、最終的に 80 °C のオーブンで 1 時間乾燥することにより多孔質ペクチン微粒子を得た。本報告書では、得られた多孔質ペクチン粒子サンプル名を PPT-X と表記する。ここで、X はペクチンに対する  $\text{CaCO}_3$  の重量比（X=0、4、8、12）を表す。

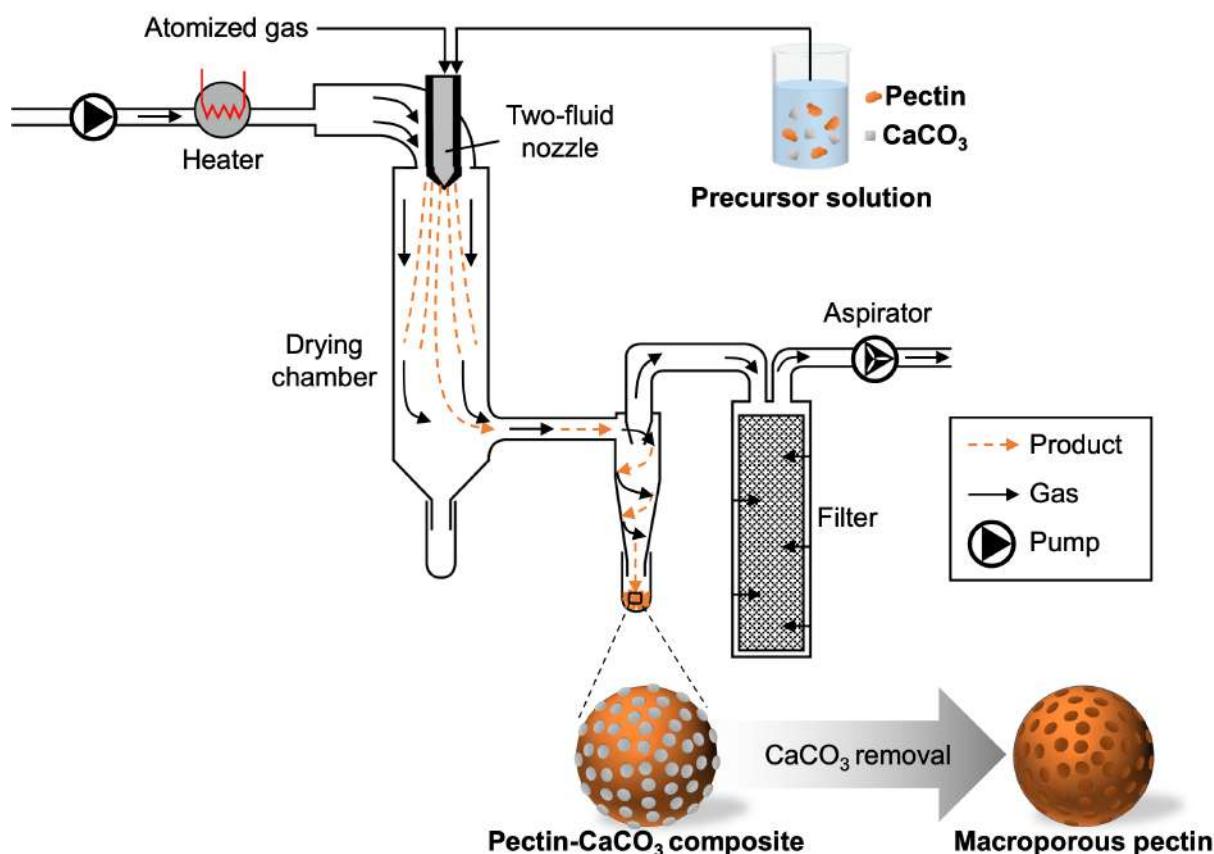


図1. 多孔質ペクチン粒子の製造方法

### 4. 研究成果

様々な  $\text{CaCO}_3$  の重量比で製造された多孔質ペクチン微粒子の走査電子顕微鏡写真を図2に示す。まず、ペクチンのみの溶液を噴霧乾燥して得られた粒子は、滑らかな表面を持つ球状のペクチン粒子（PPT-0）であることが分かる（図2a）。次に、 $\text{CaCO}_3$ ナノ粒子を添加して得られた粒子（PPT-4、PPT-8、PPT-12）は、粒子の表面に多くの穴が開いていることが分かる。（図2b-d）。これらの穴は、造孔材として利用した  $\text{CaCO}_3$ ナノ粒子由来の細孔であると考えられる。異なる  $\text{CaCO}_3$ ナノ粒子濃度を持つ多孔質ペクチン微粒子を比較すると、 $\text{CaCO}_3$ の濃度が増加するにつれて細孔数も増加していることが確認された。これ

により、 $\text{CaCO}_3$  ナノ粒子の濃度を変化させることで微粒子の空隙率を変化させることが可能であると言える。また、単一微粒子の断面の走査電子顕微鏡写真より、多孔質ペクチン微粒子の内部は、連結した細孔（ネットワーク細孔）を有していることがわかる。これは、液相中での吸着質の物質の移動に有利に働くことが期待できる。

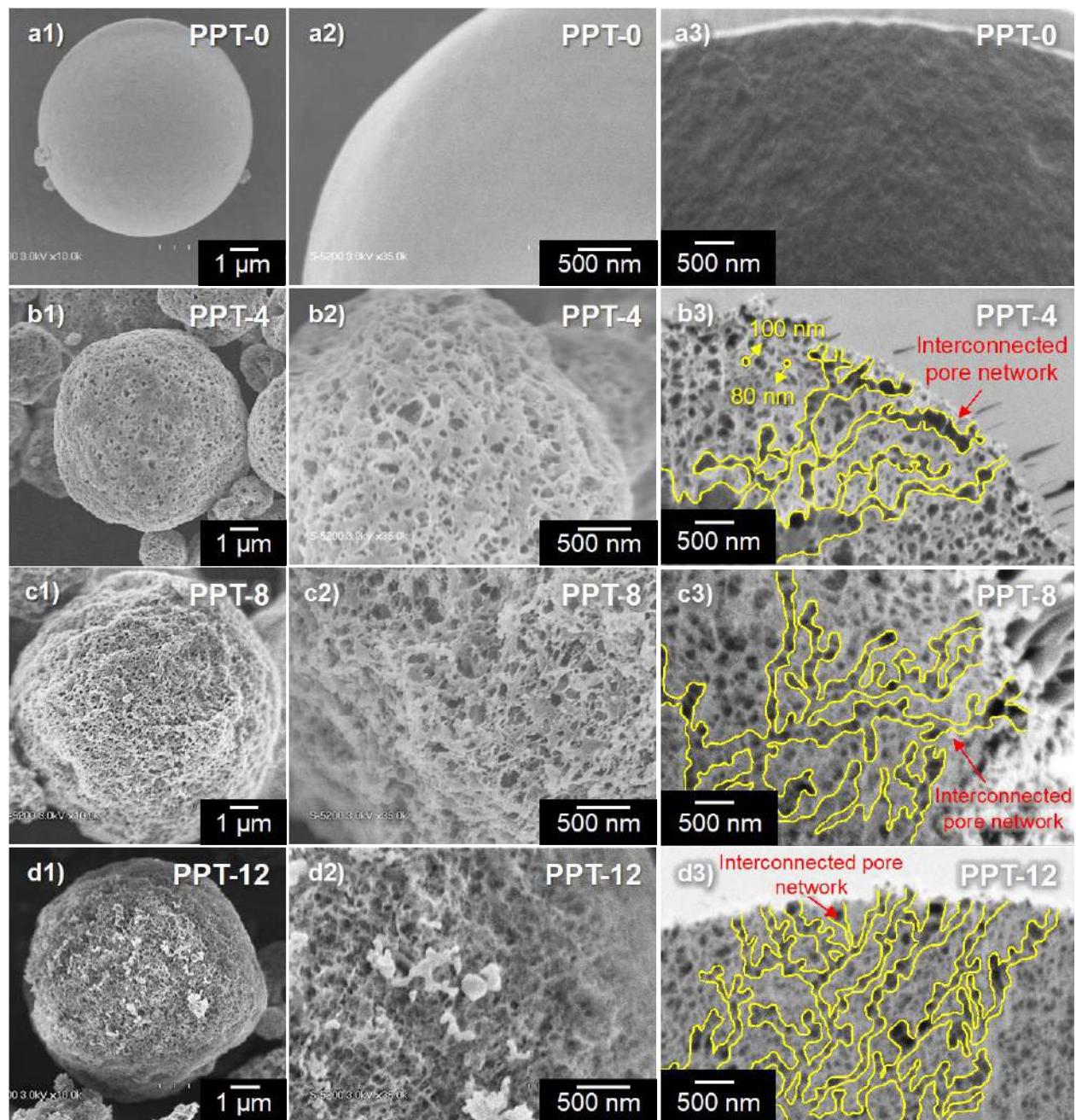


図 2.  $\text{CaCO}_3$  とペクチンの重量比が(a1)-(a3) 0、(b1)-(b3) 4、(c1)-(c3) 8、および(d1)-(d3) 12 の多孔質ペクチン粒子の SEM 写真。: (1) 倍率×10.0k での 1 粒子の画像、(2) 倍率×35.0k での粒子表面の画像、(3) 倍率×25.0k での粒子の断面 SEM 画像

次に、得られたペクチン微粒子に対して、窒素吸脱着分析を実施し、多孔質ペクチン微粒子の細孔特性と比表面積を評価した。表 1 に示されるように、PPT-4、PPT-8、および PPT-12 の比表面積はそれぞれ 177.0、193.2、および  $222.3 \text{ m}^2/\text{g}$  となり、 $\text{CaCO}_3$  ナノ粒子濃度の増加に伴い、マイクロ細孔容積、メソ細孔容積、マクロ細孔容積が増加し、比表面積のいずれもが顕著に増大するという結果が得られた。特に、

サンプル PPT-12 の多孔質ペクチン微粒子の比表面積は、 $\text{CaCO}_3$  ナノ粒子を添加していないペクチン微粒子（無孔）と比較して、150 倍も増加することが明らかになった。

表 1. 多孔質ペクチン微粒子の細孔特性と比表面積

サンプル	比表面積 ( $\text{m}^2/\text{g}$ )	マイクロ 細孔容積 $V_{\text{micropore}}$ ( $\text{cm}^3/\text{g}$ )	メソ 細孔容積 $V_{\text{mesopore}}$ ( $\text{cm}^3/\text{g}$ )	マクロ 細孔容積 $V_{\text{macropore}}$ ( $\text{cm}^3/\text{g}$ )	総細孔容積 $V_{\text{total}}$ ( $\text{cm}^3/\text{g}$ )
PPT-0	1.5	0.00055	0.0047	0.0023	0.0075
PPT-4	177.0	0.065	0.39	0.78	1.2
PPT-8	193.2	0.072	0.56	1.6	2.2
PPT-12	222.3	0.082	0.59	1.9	2.5

次に生成されたペクチン微粒子の水中安定性を評価した結果を図 3 に示す。無孔のサンプルである PPT-0 については、水と混合後、すぐに溶解が始まり 97.0% が容易に溶解する結果となった。一方、多孔質ペクチン微粒子（PPT-4）の場合、水への溶解率は 6.6% となり、耐水性があることがわかった。これは、クエン酸水溶液による  $\text{CaCO}_3$  ナノ粒子除去後に残存しているカルシウムイオンがペクチンのカルボキシ陰イオン ( $\text{COO}^-$ ) と電気的に結合し、架橋構造を形成（エッグボックスモデル）しているためだと考えられる。すなわち、 $\text{CaCO}_3$  ナノ粒子は、ペクチン微粒子のポーラス化と耐水性の向上の両方に寄与していることが明らかとなった。

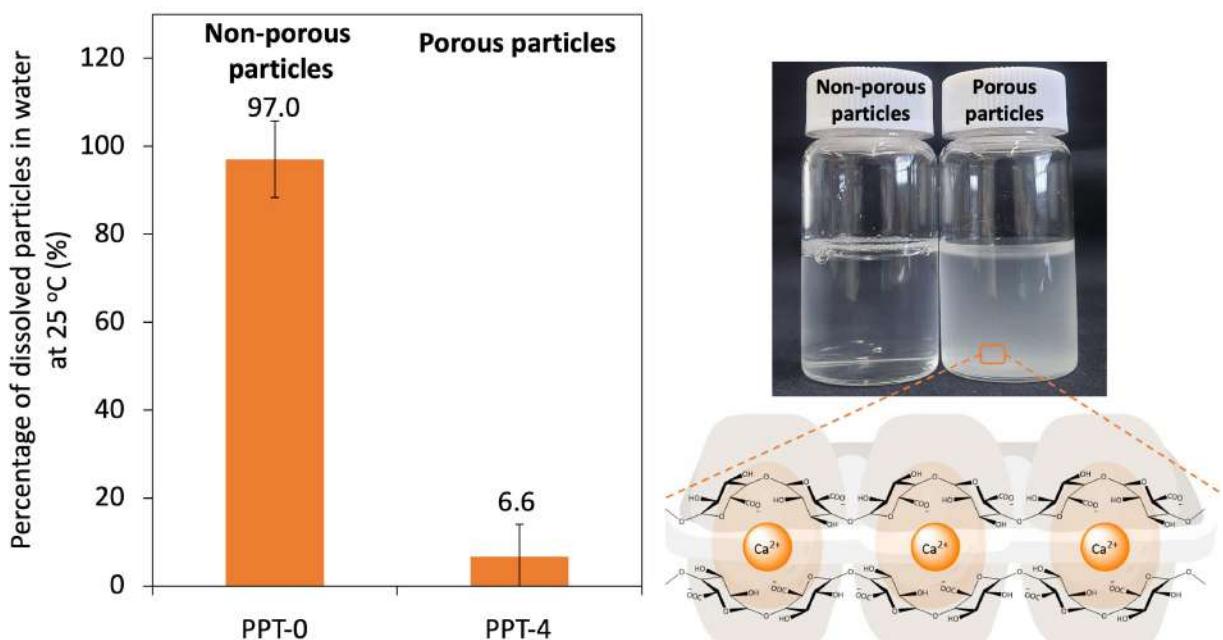


図 3. 無孔ペクチン微粒子 PPT-0 および多孔質ペクチン微粒子 PPT-4 サンプルの水中での溶解率  
写真は、PPT-0 と PPT-4 の水と混合して 1 時後の様子

次に、多孔質ペクチン微粒子（PPT-4、PPT-8、PPT-12）の液相中でのたんぱく質吸着能力を評価した。多孔質ペクチン微粒子のゼータ電位を測定した結果、いずれも微粒子サンプルも負に帯電（約  $-35\text{mV}$ ）し、サンプル間の差は生じていなかった。図 4 は、たんぱく質であるリゾチームの吸着量を分析した結果である。この結果より、いずれのサンプルも液相中のリゾチームを吸着できることを示しており、さらに、

その飽和吸着量は、 $\text{CaCO}_3$ ナノ粒子濃度の増加に伴い、増加していることがわかる。特にPPT-12の多孔質ペクチン微粒子はサンプル間で最大の吸着性能を示した。これは、ペクチン微粒子の比表面積の増大と粒子内部の連通孔に起因していると考えられる。

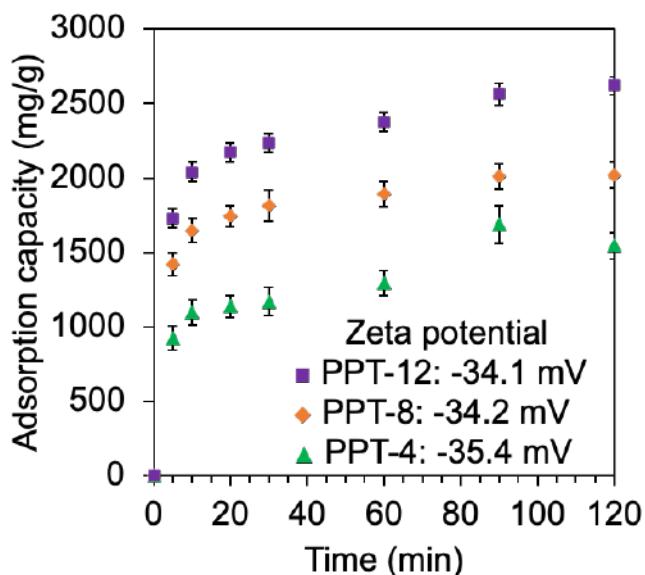


図4. 多孔質ペクチン微粒子のリゾチーム吸着能力：  
初期リゾチーム濃度 0.8 mg/mL、吸着剤の投与量 0.2 mg/mL、pH 7、  
エラーバーは、3回の実験の平均値に対応する標準偏差を表す

以上、 $\text{CaCO}_3$ ナノ粒子を造孔材に用いて、ペクチン水溶液を噴霧乾燥することで、多孔質構造を持ち、高い比表面積のペクチン微粒子を製造できることが明らかとなった。さらに、製造された多孔質ペクチン微粒子は、水への安定性もあるため、液相中でたんぱく質（リゾチーム）を吸着できることも実験的に示された。この結果は、多孔質ペクチン微粒子が、たんぱく質の精製、ウイルス捕捉、およびマイクロ・ナノプラスチックの回収において潜在的な可能性があることを示しており、今後の応用展開が期待される。

## 5. 外部成果発表（学会・論文発表など）

- 1) 荻 崇: 噴霧乾燥法によるバイオマス素材の微粒子構造化と機能, 第 18 回スプレードライセミナー (2024/4/17, オンライン開催)

# 白石科学振興会 研究成果報告書（研究助成）

2024年 5月 14日

白石科学振興会

理事長 白石 恒裕 殿

研究者氏名：(和文) 境 慎司

(英文) Shinji SAKAI



所属・職名：(和文) 大阪大学大学院基礎工学研究科

(英文) Graduate School of Engineering Science, Osaka University

## 1. 研究テーマ

(和文) 骨再生を促進する 3D バイオプリント用インクの開発

(英文) Development of 3D bioprinting inks to promote bone regeneration

## 2. 研究の要約

(和文)

骨欠損は、骨腫瘍、骨粗鬆症などの疾患や外傷などさまざまな要因により生じ、多くの場合、患者の生活の質 (QOL) を大きく低下させる。このため、より有効な治療法の開発が求められ続けている。本研究は、3D バイオプリントにより骨再生を促進する構造物をプリントし、それを骨欠損部に移植することで有用性を実証することを最終目的とし、そのためのインク材料の開発を行った。具体的には、コラーゲンとアパタイトナノ粒子を含むバイオインクに関して、その有用性を示した。また、西洋わさび由来ペルオキシダーゼの酵素反応によりゲル化するキトサン誘導体インクについて検討を行い、細胞適合性、生体適合性を含め、アパタイトナノ粒子を分散させて使用する当該目的用インク材料としての可能性を示した。

(英文)

Bone defects are caused by a variety of factors, including bone tumors, diseases such as osteoporosis, and trauma, and in many cases significantly reduce a patient's quality of life. For this reason, the development of more effective treatments continues to be sought. The ultimate goal of this study was to demonstrate the usefulness of 3D bioprinted structures that promote bone regeneration by printing and implanting them into bone defects, and to develop ink materials for this purpose. Specifically, the usefulness of a bioink containing collagen and apatite nanoparticles was demonstrated. In addition, a chitosan derivative ink gelatinized by the enzymatic reaction of horseradish peroxidase was investigated and its potential as an ink material for this purpose, including its cytocompatibility and biocompatibility, was demonstrated.

## 3. 研究内容

### 【目的】

骨欠損は、骨腫瘍、骨粗鬆症などの疾患や外傷などさまざまな要因により生じ、多くの場合、患者の生活の質 (QOL) を大きく低下させる。このため、骨欠損の修復は患者の QOL の点から極めて重要であり、さまざまな方法が実施・検討されている。本研究では、骨欠損部位の修復を促進する構造物を、欠損部位に合致する形状で作製可能とする 3D バイオプリント用インクの開発を目的とした。

ここで、3D バイオプリントとは、細胞を含むインクからデジタルデータにもとづいて 3 次元構造物をプリントする技術であり、患者や欠損部位毎に形状の異なる組織や臓器の修復・置換を目指す再生医療分野では、その発展に大きな期待がされている。生体内への埋入を目指して組織や臓器の修復・代替物をこの 3D バイオプリントにより作製する場合、使用するインクには、生体に対して安全であることが求められる。また、良好な造形性を実現するために、適切な粘度特性の溶液が迅速に固化（ゲル化）することに加え、構造体内部で細胞が増殖・機能化することも求められる。これら全てを満足するイン

クの開発には、諸知見・技術の融合が不可欠である。

本研究では、骨欠損部位の修復を促進する機能を有する構造物を得るためにインクとして、「間葉系幹細胞」と「炭酸・リン酸カルシウムのナノ/マイクロ粒子」を含み、骨欠損部位にあわせた構造体の作製を可能とする造形性に優れるインクおよびそれを用いるバイオプリント技術の開発を目的として検討を行った。

特に、コラーゲンとヒドロキシアパタイト（HAP）ナノ粒子を混合したインクについて、造形性、ヒト間葉系幹細胞に関する検討を実施した。また、キトサン/HAP 複合体が骨再生に有効であるとの報告（例えば *Carbohydr Polym* 93:256(2013)）にもとづいて、植物由来の酵素である西洋わさび由来ペルオキシダーゼの触媒する反応によりゲル化するインク材料としてキトサン誘導体インクの開発を行った。

#### 4. 研究成果

##### 【コラーゲンをベースとするインクの検討】

コラーゲンは、生体由来の成分であり、組織工学・再生医療において多くの検討が行われている。また、HAP と複合化させて骨再生用のスキャホールドとして利用する検討も多く行われている（例えば *Biomed Mater* 18:032002(2023)）。本研究では、バイオインクに分散させる HAP として直径 200 nm 以下の粒子（Sigma-Aldrich 製）を選定し、これを分散させるための高分子材料としては、医療用コラーゲン（ニッピ製）を選定した。

バイオプリンティングにおいて良好な造形を行うためには、インクの粘度特性を把握し、それにもとづいた条件設定を行う必要がある。そこで、コラーゲンを 2 w/v% となるように溶解した後 HAP を添加し、剪断速度-粘度特性を調べた。その結果、HAP の添加により粘度が低下することがわかった。また、HAP の添加量を 2.0 w/v% から 4.0 w/v% に増加させると、僅かであるが、粘度が低下した（図 1）。これらの結果より、コラーゲン溶液の有する剪断減粘性は、HAP を添加しても失われることがないこともわかった。これらの結果にもとづいて、HAP の添加量および、バイオインク時のインク吐出速度を決定した。

次いで、バイオプリンティング時にコラーゲン/HAP インクをゲル化させるための方法の開発に取り組んだ。コラーゲンは酸性にて溶解し、この溶液を中性にするとゲル化させることができる。バイオプリンティングにおいては、インクに動物細胞が含まれる。したがって、バイオプリンティング時に細胞が死滅するような条件を適用することはできない。そこで、バイオインクを吐出後に、pH を変化させて細胞に穏和にコラーゲン/HAP インクを固めることを試みた。その結果、図 2 に示すような立体構造物を得ることができた。

さらに、将来、骨細胞への分化に関する検討を実施するためにヒト間葉系幹細胞を含むインクから造形を行い、細胞の挙動を観察した。その結果、図 3 に示すように、プリント 1 日後において死細胞はほとんど存在せず、ほぼすべての細胞が生存していた。また、プリント 3 日後には細胞は伸展しており、5 日後にはさらに伸展した。

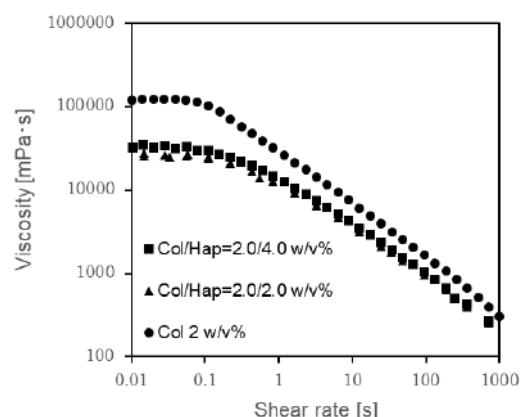


図 1. HAP 分散コラーゲン溶液の粘度特性.

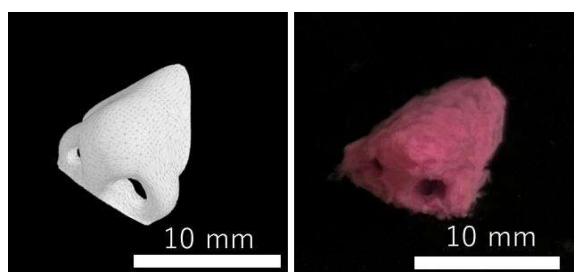


図 2. コラーゲン/HAP インクから作製したヒトの鼻形の構造体 (左) と印刷用 (右)

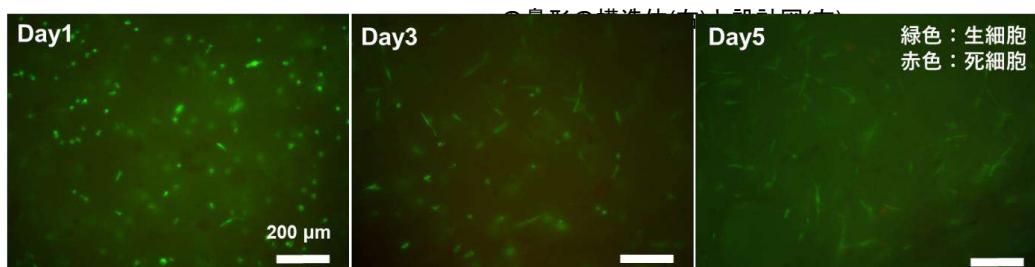


図 3. コラーゲン/HAP インクから作製した構造体中のヒト間葉系幹細胞の作製 1, 3, 5 日後の蛍光顕微鏡写真.

以上の結果に示されるように、コラーゲンと HAP を含むバイオインクから、ヒト間葉系幹細胞の生存を損なうことなくバイオプリンティングより 3 次元構造物を造形することができる方法・条件を見いだすことができた。今後、骨細胞の分化や、得られた構造物を生体に対して埋入して骨形成を促進させることができるかどうかに関する検討を実施していく。

### 【キトサンをベースとするインクの検討】

キトサンは、甲殻類の殻やキノコの菌糸などから抽出される多糖類の一種であり、生体適合性が高く、生分解可能な材料である。医療分野では創傷被覆材として利用されている。また、骨再生においても注目されている材料である。そこで、キトサンに対してフェノール製水酸基を導入したキトサン誘導体 (Chitosan-Ph) に対して、HAP を複合化させる前段階の検討として、3D プリント用インク材料として用いるにあたっての物性把握や誘導体の生体適合性の評価も目的し、創傷被覆材としての評価を行った。

まず、フェノール性水酸基導入キトサン (Chitosan-Ph) を合成し、インクの粘度特性に関して検討を行った。その結果、図 1 に示したコラーゲン溶液の場合と異なり、合成したキトサン誘導体溶液粘度は、高分子量濃度を 1 w/v% から 4 w/v% に増加させてもそれほど高くならず、そのままではバイオプリント用インクとして利用が難しいことがわかった。実際に、4 w/v% にて西洋わさび由来ペルオキシダーゼ (HRP) を添加して 3D プリントを行ったところ、設計図とはほど遠い構造物しか得ることはできなかった (図 5)。そこで、キトサンの長所を生かすために、キトサンフレークを機械的に微細化して得られるキトサンナノファイバー (NF) を添加した。その結果、1.0 % の添加により 20 倍以上 (Shear rate 0.1 s<sup>-1</sup>) も粘度が上昇した。また、キトサンナノファイバーの添加は、過酸化水素の存在下で進行する HRP の酵素反応によるインクのゲル化速度を低下させることはなかった。3D プリントにおける造形性を評価するために、約 10 ppm の過酸化水素を含有させた空気中で、注射針から基板上に連続的に吐出することで 3D プリントを実施したところ、図 5 に示すように NF の添加により造形性も大きく向上した。

次いで、細胞適合性および生体適合性に関する評価を行った。図 5 に示す検討において良好な造形が可能であった条件 (2% Chitosan-Ph + 1% NF) で HRP の酵素反応を経てゲル平板を作製し、マウス線維

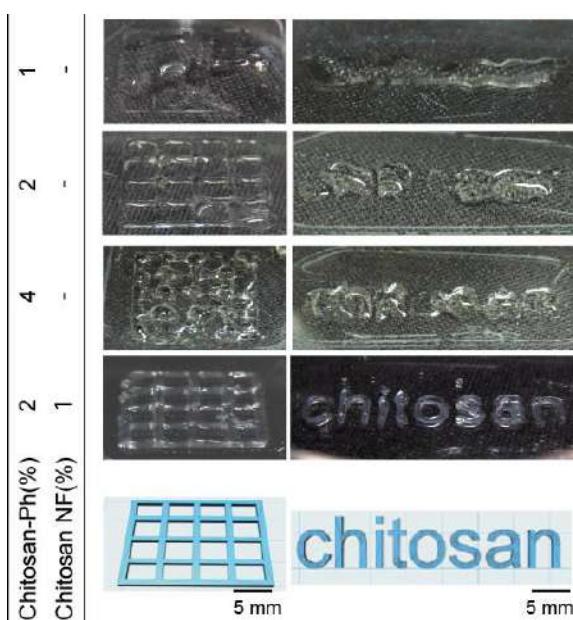


図 5. Chitosan-Ph と NF 濃度が 3D プリント時の造形性に与える効果。

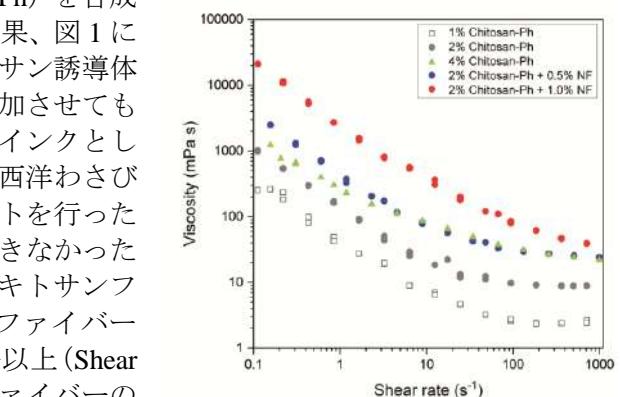


図 4. キトサンナノファイバー分散キトサン誘導体溶液の粘度特性。

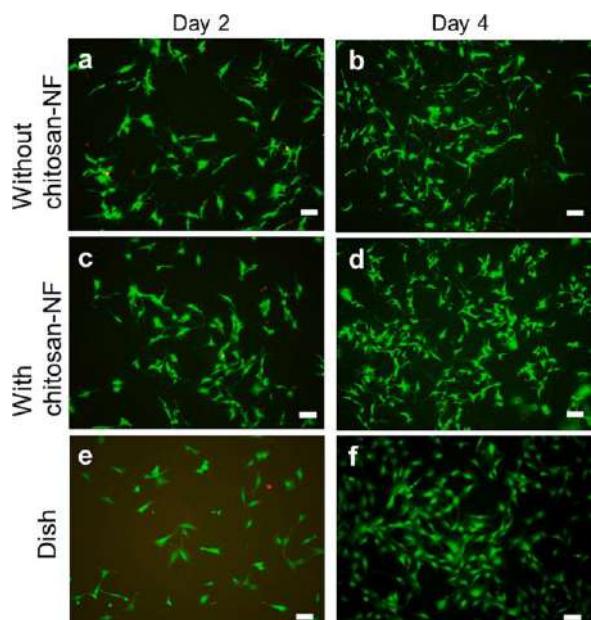


図 6. Chitosan-Ph と NF 添加ゲル上に播種して 2, 4 日後の線維芽細胞の蛍光顕微鏡写真。

芽細胞を播種した。その結果、図6に示すように、NFの有無に関わらず細胞はゲル表面に接着し、増殖した。この結果は、Chitosan-PhとNFを含むインクから得られるゲルに優れた細胞適合性があることを示している。さらに、この結果にもとづいて、3Dプリントにより造形したChitosan-PhとNF含有ゲルをマウスの背中に作製した全層欠損部に適用し、傷口面積の減少と適用部での生体反応に関する評価を行った。その結果、市販の創傷被覆材よりも早く傷口面積が減少した（図7）。また、適用部においては皮膚の再生が確認されるとともに、著しい炎症反応は認められなかった。これらは、未修飾のキトサンを適用した場合に報告されている結果と一致する。さらに、未修飾キトサンのよく知られる性質として、抗菌性があることから、このゲルに接触させた大腸菌の増殖評価を行ったところ、その増殖は有意に抑制された。すなわち、これらの結果は、本研究で検討を行ったキトサン誘導体とNFより得られるゲルが高い生体適合性を有することおよび、未修飾のキトサンと同様の特性を有することを示している。

今後、本研究で開発したキトサン誘導体とNFのインクに対して、HAPを添加してのバイオプリンティングおよび、バイオプリンティングにより得られる構造体中の間葉系幹細胞の増殖・分化を調べる。さらに、生体適合性についても確認されていることから、コラーゲン/HAPインクと同様に、骨欠損部に適用することにより、その有用性の実証に取り組む。

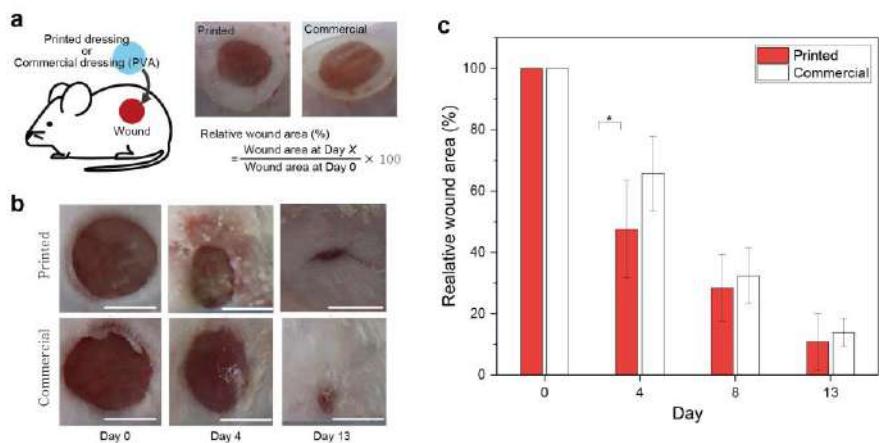


図7. Chitosan-PhとNFインクから3Dプリントした構造物を創傷治癒材として評価する評価法模式図(a). 創傷部位の写真(b)および傷口の面積変化(c).

## 5. 外部成果発表（学会・論文発表など）

### 【論文発表】

Shinji Sakai, Shota Yamamoto, Ryo Hirami, Mitsuyuki Hidaka, Kelum Chamara Manoj Lakmal Elvitigala, Enzymatically Gellable Chitosan Inks with Enhanced Printability by Chitosan Nanofibers for 3D Printing of Wound Dressings, *European Polymer Journal*, 210, 112960.(2024)

# 白石科学振興会 研究成果報告書（研究助成）

2024年6月28日

白石科学振興会

理事長 白石 恒裕 殿

研究者氏名 : (和文) 徐 于懿

(英文) Yu-I HSU

所属・職名 : (和文) 大阪大学大学院工学研究科応用化学専攻・准教授

(英文) Department of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering,  
Osaka University • Associate Professor



## 1. 研究テーマ

(和文) カルシウムイオン架橋により自己修復能を持つ注射可能なハイドロゲルの創製

(英文) Creation of injectable hydrogels with self-repairing properties via calcium ion cross-linking

## 2. 研究の要約

(和文) ヒドラジド修飾ポリグルタミン酸および酸化反応によりアルデヒド基を導入したコンドロイチン硫酸やヒアルロン酸を合成して混合することでインジェクタブルハイドロゲルを創製した。ヒドラジド基とアルデヒド基との間でのアシルヒドラゾン結合と、カルシウムイオンの添加によりカルボキシル基や硫酸基との間でのイオン結合によりダブル架橋が形成されている。作製したハイドロゲルは形成されたダブル架橋によりゲル化に要する時間が短く、ゲルの機械的強度が増大していることを示した。また、アシルヒドラゾン結合とイオン結合の可逆性に由来した自己修復性を示し、疑似体液中におけるアパタイト形成速度はカルシウムイオン添加量を増大することで促進されることを明らかにした。作製したハイドロゲルは優れたバイオミネラリゼーションまたは骨組織に対する生体接着性を示していることから、骨組織工学における骨細胞足場材料や骨充填剤への応用が期待される。

(英文) Injectable hydrogels were developed by synthesizing and mixing hydrazide-modified polyglutamic acid and aldehyde groups introduced to chondroitin sulfate or hyaluronic acid by oxidation. Double crosslinks were formed by acylhydrazone bonds between the hydrazide and aldehyde groups, and ionic bonds between the carboxyl or sulfate groups by the addition of calcium ions. The hydrogel showed a short gelation time and increased mechanical strength due to the double crosslinks formed. It was also shown that the hydrogel exhibited self-repairing properties due to the reversibility of acylhydrazone bonds and ionic bonds and that the rate of apatite formation in a simulated body fluid was accelerated by increasing the number of calcium ions added. The hydrogel showed excellent biomineralization and bioadhesiveness to bone tissue and is therefore expected to be used as a bone cell scaffold or bone filler in bone tissue engineering.

## 3. 研究内容

破損した骨を修復するための方法として、従来では、チタン合金などのインプラント埋入法、あるいは患者の骨細胞を採取して移植する自家骨移植法などが利用されている。しかし、骨細胞の供給量が限られることや、外科手術による患者への負担が大きく、感染症のリスクなどの問題点がある。そのため、ヒドロキシアパタイト (HAp) とポリマーを組み合わせて人工骨を移植する方法が注目されている。HAp は水酸化リン酸カルシウムからなる骨や歯の主成分であり、温度や pH に対して安定し、生体親和性が高いためバイオマテリアルとして注目を集めているが、単独の HAp は機械的強度が乏しいため移植材料への応用が難しいという問題があり、補強材料が必要となる。

本研究では、骨の主成分である HAp を導入したポリグルタミン酸と細胞外マトリックスの構成成分であり、生体適合性と生分解性を持つコンドロイチン硫酸やヒアルロン酸などを用いたハイドロゲルを創製した。ハイドロゲル系内にカルシウムイオンを導入することにより、注射可能性、自己修復性とバイオミネラリゼーションを与えて骨組織再生足場材料に応用することができる。アジピン酸ジヒドラジド(ADH)で修飾したポリグルタミン酸(PADH)と、酸化したコンドロイチン硫酸(OCS)あるいは酸化したヒアルロン酸(OHA)にカルシウムイオンとリン酸イオンを加えることで HAp を含むハイドロゲルを作製した。具体的に、1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジimid を縮合剤として、N-ヒドロキシスクシンimid をカルボン酸活性剤として用いることで、PGA のカルボキシル基をアジピン酸ジヒドラジドと反応させることで側鎖にアミノ基を持つアジピン酸を有する水溶性 PADH を合成した。また、NaIO<sub>4</sub> を酸化剤として用いてコンドロイチン硫酸やヒアルロン酸の糖鎖を酸化してアルデヒド基を持つ OCS と OHA を合成した。

PADH/OCS/Ca ハイドロゲルの作製では、PADH を脱イオン水に溶解して異なる濃度の塩化カルシウム溶液の添加により PADH 前駆体溶液を作製し、OCS を脱イオン水に溶解して 4-アミノ-L-フェニルアラニンを添加して OCS 前駆体溶液しました。2 つの前駆体溶液を pH 値 7.0 に調整して混合すると、室温で PADH/OCS/Ca ハイドロゲルが形成された (Scheme 1)。4-アミノ-L-フェニルアラニンは触媒として使用し、作製した PADH/OCS/Ca ハイドロゲルは穏やかな条件下でアシルヒドラゾン結合の交換を促進し自己修復性を持つ。豊富な硫酸基を含む OCS はカルシウムイオンに結合して HAp の核形成を促進するため、HAp 形成を誘導する能力がある。

PADH/OHA/CaP ハイドロゲルの作製では、OHA をリン酸イオン水溶液に、PADH をカルシウムイオン水溶液にそれぞれ溶解し、塩基性にするために少量のアンモニア水を加えた後、溶液を混合することで HAp を含む白色のハイドロゲルを作製した (Scheme 2)。PADH/OHA/CaP ハイドロゲルは前駆体溶液を調整する際に、カルシウムイオンとリン酸イオンを添加することにより、アシルヒドラゾン結合で短時間ゲル化できることに加え、系中で HAp 生成ができる。

作製した PADH/OCS/Ca と PADH/OHA/CaP ハイドロゲルはカルシウムイオン濃度を調整することにより、ハイドロゲルの機械的特性と自己修復能力を制御でき、さらに、OCS や OHA の側鎖に残ったアルデヒド基により骨との接着性を示す。従って、本研究で創製したハイドロゲルは破損した骨の修復材料としての応用が期待される。

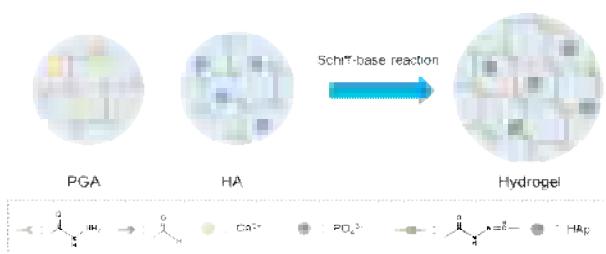
#### 4 . 研究成果

##### PADH/OCS ハイドロゲル

核磁気共鳴により PADH の ADH 置換度は 25.5% であることが分かり、ヒドロキシルアミン塩酸塩を用いた滴定測定により OCS の酸化度は 40.0% であることを確認した。カルシウムイオン添加量が 0.05 から 0.35 まで増大すると、ハイドロゲルのゲル強度が 4000 Pa まで向上した (Figure 1)。しかしながら、カルシウムイオン添加量が 0.5 mol/L になると、ゲル強度が低下した。カルシウムイオンの添加により形成したイオン結合はハイドロゲルの架橋密度を増加させてゲル強度を制御できることが分かった。一方、過剰なカルシウムイオンによりイオン結合とアシルヒドラゾン結合と阻害効果が起こり、ハイドロゲルの機械的特性の低下を引き起こすことを示唆している。結果として、最適のカルシウムイオン濃度は 0.35 mol/L 以下となることを明らかにした。



Scheme 1. Schematic diagram of the formation of PADH/OCS/Ca hydrogels.



Scheme 2. Schematic diagram of the formation of PADH/OHA/CaP hydrogels.

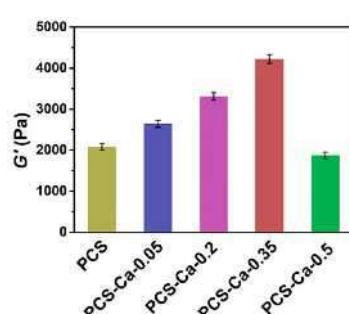


Figure 1. Storage modulus of hydrogels under different concentrations of calcium chloride.

2つのPGA/OCS/Ca-0.35ハイドロゲル(カルシウムイオン濃度0.35 mol/L)を青と赤に染色して真ん中から切断し、異なる色のハイドロゲルを切断線に沿って密着させて自己修復効果を評価した。10時間後、Figure 2に示すように、一体化したハイドロゲルが観察され、アシルヒドラゾン結合とイオン結合の組み合わせによりハイドロゲルは自己修復性を持つことを確認した。さらに、自己修復したハイドロゲルのゲル強度は切断前のゲル強度の90%以上回復できた。従来アシルヒドラゾン結合のみで作製した自己修復ハイドロゲルは24時間以上修復することに対して、本研究で作製したPGA/OCS/Ca-0.35ハイドロゲルはアシルヒドラゾン結合とイオン結合により、自己修復時間が短縮でき、自己修復効率を改善できることを示唆された。

異なるカルシウムイオン濃度を添加したPGA/OCSハイドロゲルを模擬体液に4日間浸した後、ハイドロゲルのバイオミネラリゼーションを評価した。ミネラル化ハイドロゲルのXRD分析により、26度付近と32度付近にHApの結晶ピークが見られ、HApが存在していることを確認した(Figure 3a)。また、SEM画像では、ハイドロゲルにHApが生成していることが見られた(Figure 3b)。カルシウムイオン濃度の増大とともに、PGA/OCSハイドロゲルでは生成したHApの密度がより高いことが確認できた。さらに、鶏の骨と軟骨組織を用いてハイドロゲルの生体接着特性を評価した。酸化されていないCSをPADHとカルシウムイオン溶液と混合して作製したハイドロゲル(Control hydrogel)をコントロールとして使用した。ハイドロゲルをピンセットで持ち上げると、Control hydrogelは骨組織に接着できなかったことに対して、PGA/OCS/Ca-0.35ハイドロゲルは骨に対して良好な生体接着を示した。

以上の結果から、PADHとOCSを合成して作製したハイドロゲルにカルシウムイオンを導入することにより、アシルヒドラゾン結合とイオン結合の形成で優れた自己修復能力を示し、カルシウムイオンの存在により、模擬体液に浸漬した後、ハイドロゲル内部までHAp形成が促進した。したがって、HAp形成能力を持つ自己修復性PGA/OCS/Caハイドロゲルは、骨再生への応用に有望な候補です。

### PADH/OHAハイドロゲル

フーリエ変換型赤外分光スペクトルからOHAは1730 cm<sup>-1</sup>付近にアルデヒド基由来のピークが確認でき、ヒドロキシルアミン塩酸塩滴定からアルデヒド基含有量は0.043 mol/gであることを確認した。PADHは核磁気共鳴により構造を確認し、置換度は27%であることを確認した。作製したPADH/OHA/CaPハイドロゲルのゲル化時間は5分以内と短い値を示したことに対して、カルシウムイオンとリン酸イオンを含まないPADH/OHAハイドロゲルでは約1時間であった。シップ塩基反応によるアシルヒドラゾン結合の生成はpH=6程度の穏やかな酸性で有利であり、カルシウムイオン溶液とリン酸イオン溶液の濃度が大きくなることでHApの生成が速くなり、ヒドロキシ基が速く消費されてゲル化時間が短くなることを示唆された。

HApの生成はXRDにより確認し、PADH/OHA/CaPハイドロゲルにおいて26度付近と32度付近にHApの結晶ピークが見られ、HApが生成していることが確認できた(Figure 4)。また、カルシウムイオン溶液とリン酸イオン溶液の濃度が増加するにつれてピーク強度が大きくなっていることから、生成するHApの量が増加していることが示唆されている。作製したハイドロゲルについて圧縮試験を行ったところ、カルシウムイオン溶液とリン酸イオン溶液の濃度の増加とともに生成するHAp

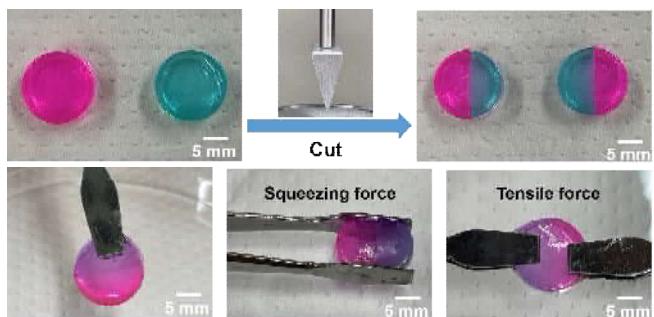


Figure 2. Photographs of the self-healing process of PGA/OCS/Ca-0.35.

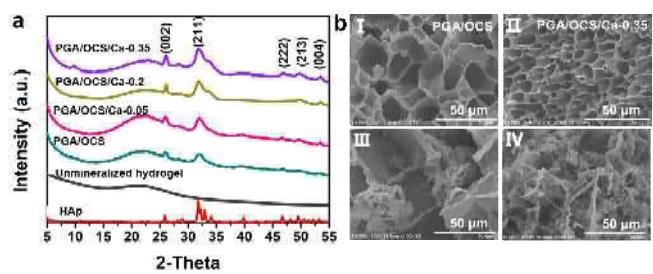


Figure 3. (a) XRD analysis of hydrogels, (b) SEM images of hydrogels before (I and III) and after (II and IV) mineralization.

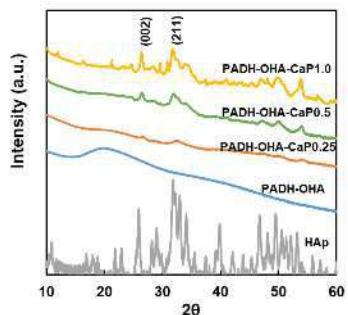


Figure 4. XRD analysis of hydrogels.

の量が増加し、ハイドロゲルの機械的強度が向上した (Figure 5)。 HA<sub>p</sub> を含まない PADH/OHA ハイドロゲルに比べて 3 つの異なる CaP 濃度の PADH/OHA/CaP ハイドロゲルは優れた機械的特性を示し、カルシウムイオン溶液とリン酸イオン溶液の濃度が大きくなるにつれて最大応力が向上することが分かった。さらに、SEM によりゲル内部の構造を観察したところ、PADH/OHA/CaP ハイドロゲルでは粒子が生成していることが確認でき、使用するイオン溶液の濃度が大きいと生成する HA<sub>p</sub> の量が増加することが分かった (Figure 6)。

作製したゲルを 2 つに切断して破断面を合わせて 37 度で一晩放置し、自己修復性についても確認した。PADH/OHA、PADH/OHA/CaP0.25 (カルシウムイオン溶液とリン酸イオン溶液の濃度 0.25 mol/L) では 100 % 近い自己修復性を示したことに対して、カルシウムイオン溶液とリン酸イオン溶液の濃度が 0.5 以上の PADH/OHA/CaP ハイドロゲルは可逆的なアシルヒドラゾン結合により自己修復性を示したが、HA<sub>p</sub> を多く含むハイドロゲルでは自己修復性効率は低下した (Figure 7)。それは、HA<sub>p</sub> を含むゲルではアシルヒドラゾン結合が阻害され、自己修復性効率が低下したことを示唆された。

骨への接着性について、酸化していないヒアルロン酸 (HA) で作製した PADH/HA/CaP ハイドロゲルと PADH/OHA/CaP ハイドロゲルを用いて比較した。Figure 8 に示したように、HA を用いた場合には、ゲルを引っ張ると骨とゲルが分離してしまい、接着面を高倍率スコープにより観察したところゲルと骨が明確に分かれていた。一方、OHA を用いた場合にはゲルと骨が分離することなく、ゲルと骨の境界が不明瞭であることが確認できた。これは、OHA に含まれているアルデヒド基と骨に含まれているアミノ基がシッフ塩基反応しているためと考えられる。よって作製した PADH/OHA/CaP ゲルは骨に対して接着性を持つことが分かった。

以上の結果から、ヒドロジド修飾したポリ (-グルタミン酸) と酸化ヒアルロン酸をカルシウムイオン溶液とリン酸イオン溶液を加えて混合することで、ヒドロキシアパタイトを導入したハイドロゲルを作製した。作製したハイドロゲルはゲル化時間が短く注射性を有しており、膨潤率が低いことから骨の修復材料としての応用に適していると考えられる。HA<sub>p</sub> を含むハイドロゲルでは HA<sub>p</sub> を含まないハイドロゲルに比べて機械的特性が大きく向上していることが分かった。また、カルシウムイオン溶液とリン酸イオン溶液の濃度の増加に伴って生成する HA<sub>p</sub> の量が増加し、機械的強度が増加する傾向を示した。さらに、HA<sub>p</sub> を導入したハイドロゲルにおいても自己修復性が確認できた。作製したハイドロゲルはアルデヒド基を持つため骨との接着性を示した。従って、作製したハイドロゲルは破損した骨の修復材料としての応用が期待される。

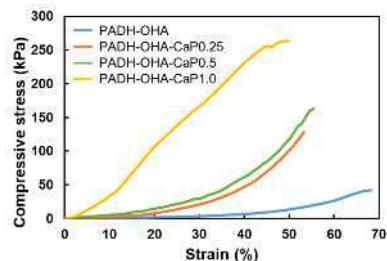


Figure 5. Compressive stress of hydrogels.

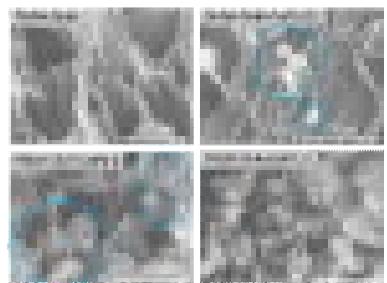


Figure 6. SEM images of hydrogels.

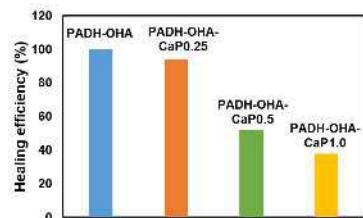


Figure 7. Self-healing efficiency of hydrogels.

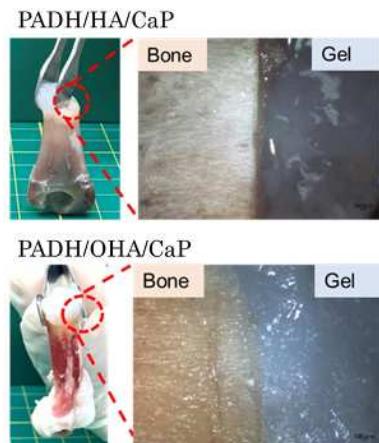


Figure 8. Bone adhesion of hydrogels.

## 5 . 外部成果発表（学会・論文発表など）

### 学会発表

- 徐于懿、高分子鎖の精密架橋設計による生分解性機能材料の開発、第 69 回高分子研究発表会(神戸) 2023 年 7 月 14 日
- 徐于懿、魏夢、宇山 浩、pH 応答性ポリ (-グルタミン酸) ハイドロゲルの作製とドラッグデリバリ－評価、第 45 回日本バイオマテリアル学会大会、2023 年 11 月 6 日
- 釤宮里奈、魏夢、徐于懿、菅原章秀、宇山 浩、ポリ (-グルタミン酸)/ヒアルロン酸を用いたハイドロゲルの作製と自己修復性評価、第 45 回日本バイオマテリアル学会大会、2023 年 11 月 6 日
- HSU Yu-I, pH-Responsive Poly( $\gamma$ -glutamic acid) Hydrogels by Enzymatic Cross-Linking for Drug

Delivery Application, Japan-Thai Biomaterial Workshop, 2023 年 11 月 14 日

5. HSU Yu-I, WEI Meng, and UYAMA Hiroshi, pH-Responsive Poly( $\gamma$ -glutamic acid) Hydrogels by Enzymatic Cross-Linking for Drug Delivery Application, 9<sup>th</sup> Asian Biomaterials Congress 2023, 2023 年 11 月 20 日
6. KUGIMIYA Rina, WEI Meng, HSU Yu-I, SUGAWARA Akihide and UYAMA Hiroshi, Preparation of poly(g-glutamic acid)/ hyaluronic acid/hydroxyapatite hydrogels with self-healing ability, 9<sup>th</sup> Asian Biomaterials Congress 2023, 2023 年 11 月 21 日

#### 学术論文

1. KUGIMIYA Rina, HSU Yu-I, UYAMA Hiroshi, Preparation of poly(g-glutamic acid)/ hyaluronic acid/hydroxyapatite hydrogels with self-healing ability, In preparation.
2. HSU Yu-I, KUGIMIYA Rina, UYAMA Hiroshi, Development of self-healing hydrogels using poly(g-glutamic acid)/starch/hydroxyapatite, In preparation.

# 白石科学振興会 研究成果報告書 (研究助成)

2024年 6月 23日

白石科学振興会

理事長 白石 恒裕 殿

研究者氏名 : (和文) 豊田 正嗣

(英文) Masatsugu Toyota



所属・職名 : (和文) 埼玉大学大学院理工学研究科

(英文) Department of Biochemistry and Molecular Biology  
Saitama University

## 1. 研究テーマ

(和文) 植物の長距離カルシウムシグナルの発生・伝播機構

(英文) Molecular mechanisms of long-distance calcium signal in plants.

## 2. 研究の要約

(和文)

植物に嗅覚は無い。しかし、揮発性物質（匂い物質）を用いて、お互いに情報のやりとり（植物間コミュニケーション）をしていることが知られている。例えば、植物が昆虫による食害を受けた時、緑の香り（Green Leaf Volatile; GLV）と呼ばれる匂い物質が空気中に放出され、このGLVを受容した近くの植物は、直接攻撃されていないにもかかわらず昆虫に対する抵抗性を上昇させる。しかし、植物がGLVを感じる瞬間、すなわち植物間コミュニケーションをリアルタイムで可視化した報告はない。

本研究では、広視野・高感度イメージング/電気生理学的技術に、虫に捕食された植物から放出される匂い物質を回収し、吹きかけるポンプシステムを組み合わせることで、アブラナ科の植物であるシロイヌナズナがGLVを感じし、細胞内の $\text{Ca}^{2+}$ 濃度 ( $[\text{Ca}^{2+}]_c$ ) 変化 ( $\text{Ca}^{2+}$ シグナル) を発生・伝播させる瞬間を可視化した。シロイヌナズナは、食害を受けた植物から放出される2種類のGLV [(Z)-3-ヘキセナール, (E)-2-ヘキセナール]を感じし、 $\text{Ca}^{2+}$ シグナルおよび膜電位変化を引き起こし、 $\text{Ca}^{2+}$ /電気シグナル依存的に虫害防御応答を誘導することを明らかにした。さらに、共焦点レーザー顕微鏡を用いた細胞レベルでのイメージングを行った結果、植物は気孔と呼ばれるガス交換を行う孔からGLVを葉の内部に取り込むことが明らかになった。

(英文)

Plants lack an olfactory sensation; nevertheless, they utilize volatile substances (odorants) for interplant communication. For example, when plants are attacked by insects, they emit an odorant called green leaf volatiles (GLVs) into the atmosphere, prompting neighboring plants to enhance their herbivory resistance, despite not being directly targeted. However, there are no reports that visualized the moment when plants sense GLVs, i.e., interplant communication, in real-time.

In this study, we visualized the moment when the mustard plant, *Arabidopsis thaliana*, senses GLVs, inducing and transmitting changes in cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  concentration ( $\text{Ca}^{2+}$  signals) by combining wide-field and high-sensitivity imaging/electrophysiological techniques with a pump system that collects and sprays odorants released from insect-damaged plants. We found that *Arabidopsis* senses two types of GLVs [(Z)-3-Hexenal, (E)-2-Hexenal] released from insect-damaged plants, causing  $\text{Ca}^{2+}$  signals and membrane potential changes that induce  $\text{Ca}^{2+}$ /electrical signal-dependent insect defense responses. Furthermore, cellular-level imaging using confocal laser scanning fluorescence microscopy revealed that plants take up GLVs into the leaf interior through gas-exchange pores, known as stomata.

### 3. 研究内容

植物は光合成によって取り込んだ炭素源の約30%を揮発性物質として体外に放出しており、その放散量は地球規模で年間24億トンにも上ると試算されている。植物から放出される匂い物質の役割として、花や果実の香りが花粉媒介者や種子散布者を誘引することは有名であるが、害虫からの防御応答としても使われている。植物が昆虫の食害を受けた時や、草刈りのように物理的に傷つけられた時、緑葉香や青臭さの主成分である緑の香り(Green Leaf Volatile: GLV, 炭素数6のアルコールやアルデヒド)などが空気中に放出され、このGLVは、害虫を忌避したり、害虫の天敵を誘引したりすることで被害植物を守る(Scala et al., *Int. J. Mol. Sci.* 2013)。非常に興味深いことに、GLVは被害植物のみならず集団としての防御応答においても重要な役割を果たしており、近隣の植物がGLVを受容すると、直接被害を受けていないにもかかわらず、将来の害虫の攻撃に備えて防御応答が誘導される(Arimura et al., *Nature* 2000; Takabayashi, *Plant Cell Physiol.* 2022; Matsui and Engelberth, *Plant Cell Physiol.* 2022)。この匂い物質を介した植物間の情報伝達は植物間コミュニケーションと呼ばれ、1983年に科学的な論文が発表されて以降(Baldwin and Schultz, *Science* 1983)、多くの研究者によって研究してきた。

細胞内の $\text{Ca}^{2+}$ 濃度( $[\text{Ca}^{2+}]_c$ )変化( $\text{Ca}^{2+}$ シグナル)は、多くの生物で情報伝達を担うセカンドメッセンジャーとして働いており、植物の匂い応答にも関与することが示唆されてきた(Zebelo et al., *Plant Sci.* 2012)。しかし、植物がGLVを感じする瞬間、すなわち植物間コミュニケーションをリアルタイムで可視化した報告はない。

GCaMPは、 $\text{Ca}^{2+}$ を結合すると緑色の蛍光を明るく発する融合タンパク質であり、動物や植物などの様々な研究分野で $[\text{Ca}^{2+}]_c$ を可視化するためのツールとして使われている。このGCaMPを、遺伝子組換え技術を用いてアブラナ科の植物であるシロイヌナズナに作らせることで、植物の $[\text{Ca}^{2+}]_c$ 変化を蛍光の強度変化として捉えることができる。

本研究は、独自の広視野・高感度イメージング/電気生理学的技術に(Toyota et al., *Science* 2018; Hagihara et al., *Nat. Commun.* 2022)、虫に捕食された植物から放出される匂い物質を回収し、吹きかけるポンプシステムを組み合わせることで(図1)、シロイヌナズナが匂い物質を感じし、 $\text{Ca}^{2+}$ および電気シグナルを発生・伝播させるのか、否かを検証した。さらに、動物の鼻のような特殊な感覚器をもたない植物が、どのような仕組みや経路を用いて、匂い物質を感じているのかについても調べた。

### 4. 研究成果

密閉された容器の中に植物の葉と蛾の幼虫を入れ、葉が幼虫に食べられた時に放出される匂い物質を、蛍光顕微鏡の対物レンズの直下に置いてあるシロイヌナズナに吹きかけた。すると、シロイヌナズナは、幼虫に直接攻撃されていないにもかかわらず、別の植物から放出される匂い物質を感じて、 $[\text{Ca}^{2+}]_c$ 上昇( $\text{Ca}^{2+}$ シグナル)および電気シグナルを発生・伝播させることができた(Aratani et al., *Nat. Commun.* 2023)。

$\text{Ca}^{2+}$ シグナルを発生させる匂い物質を特定するために、傷つけられた植物から放出される可能性があるGLVやテルペン類、ジャスモン酸類などの9種類の匂い物質を調べた。その結果、GLVに属する青葉アルデヒドである(Z)-3-ヘキセナールと(E)-2-ヘキセナールが $\text{Ca}^{2+}$ シグナルを発生させることができた(図2、矢尻)。さらに、これらのGLVを感じし $\text{Ca}^{2+}$ シグナルを発生させた葉では、ストレス応答性の防御遺伝子の発現が起こっていることがわかった。

嗅覚をもたない植物が、どの細胞や組織で緑の香りを感じているのかを特定するために、細胞レベルでの $\text{Ca}^{2+}$ イメージングが可能となる共焦点レーザー顕微鏡を用いて $\text{Ca}^{2+}$ シグナルを発生させている細胞を可視化した。(Z)-3-ヘキセナールが空气中に拡散し始めて1分程度で気孔を構成する孔辺細胞で $\text{Ca}^{2+}$ シグナルが発生し、次に葉の内部

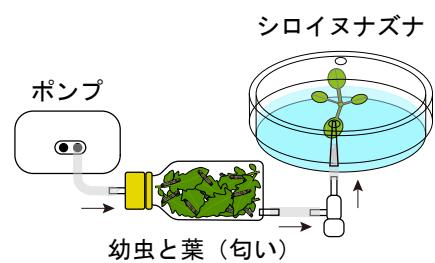


図1 食害を受けた植物から放出される匂いを吹きかけるポンプシステム

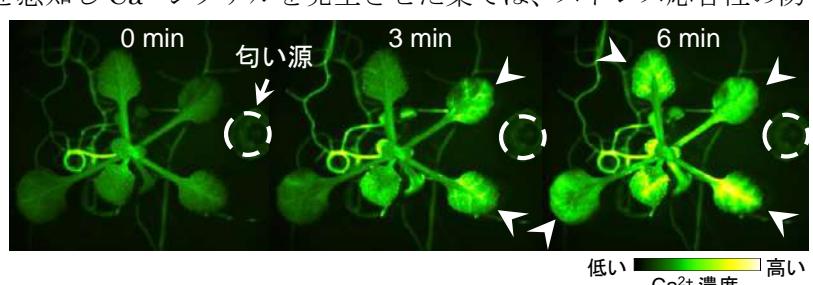


図2 シロイヌナズナが空气中を拡散する(Z)-3-ヘキセナール(匂い源)を感じて、 $\text{Ca}^{2+}$ シグナルを発生させた瞬間(矢尻)を捉えた映像。

に存在する葉肉細胞や維管束細胞、そして 5 分くらい経過してから表皮細胞で  $\text{Ca}^{2+}$  シグナルが観察された (Aratani et al., *Nat. Commun.* 2023)。気孔は葉の表面に位置し、水を蒸散させる機能や、光合成に必要な二酸化炭素を取り込み、光合成により産出される酸素を放出するというガス交換の機能がある。シロイヌナズナは、ガスの出入り口である気孔を使って GLV を取り込み、葉の内部の細胞で感知していることが示唆された。一方で、同じく葉の表面に位置する表皮細胞は、ワックスなどで構成されるクチクラと呼ばれる膜層構造および厚い細胞壁で覆われているため、GLV は表皮細胞まで透過しにくい可能性が考えられる。

以上の結果から、植物の匂い感知・情報伝播モデルを提唱した。昆虫に食べられた時や物理的に傷つけられた時に植物から放出される(Z)-3-ヘキセナールと(E)-2-ヘキセナールのような緑の香りは、近くの植物の気孔から葉の内部に取り込まれ、葉肉細胞などで  $\text{Ca}^{2+}$  シグナルを発生させることで、将来の更なる傷害ストレスに対する防御反応を引き起こしていると考えられる (Aratani et al., *Nat. Commun.* 2023)。

## 5. 外部成果発表（学会・論文発表など）

### 【論文発表】

- Aratani Y, Uemura T, Hagiwara T, Matsui K, Toyota M (2023) Green leaf volatile sensory calcium transduction in *Arabidopsis*. *Nature Communications* 14: 6236.

### 【学会発表や講演など】

- Toyota M (2023) Calcium-based rapid defense responses in plants. International Workshop -Advanced imaging and chemical physiology-: June 3, Yugawara, Japan.
- Toyota M (2023) Mechanosensory signal transduction in plants. Plant Cell Dynamics X: May 24, Madison, USA.
- 豊田正嗣 (2024) 植物の機械刺激受容シグナル伝達機構の研究. 第 65 回日本植物生理学会年会 神戸, 3 月 18 日.
- 豊田正嗣 (2023) Real-time visualization of intra- and inter-plant communication. 第 61 回日本生物物理学年会 名古屋, 11 月 13 日.
- 豊田正嗣 (2023) 植物間コミュニケーションを可視化する. 第 11 回 植物イメージングの会 2023 沖縄, 10 月 29 日.
- 豊田正嗣 (2023) 植物の情報伝達. 令和 5 年度 一般社団法人 日本樹木医会 埼玉県支部 第 3 回 研修会 埼玉, 10 月 1 日.
- 豊田正嗣 (2023) バイオイメージングで見る植物の情報伝達. 令和 5 年度埼玉大学研究機構戦略研究センター 第 1 回公開シンポジウム 埼玉, 9 月 26 日.
- 豊田正嗣 (2023) 2 光子顕微鏡で見る植物のメカノレスポンス. NIKON ウェビナー「植物分野のイメージング最前線」 オンライン, 9 月 14 日.
- 豊田正嗣 (2023) 生物の不思議を知る ～多様な植物の驚きの機能～. 埼玉県環境検査研究協会 埼玉県生物多様性センター 第 21 回・環境問題の現況と将来を展望するセミナー ～生物の不思議を知り 生物の保全を再考する～ 埼玉, 9 月 1 日.
- 豊田正嗣 (2023) 植物の全身を駆け巡る高速シグナルを可視化する. 155 回 サイエンステクノフロンティアフォーラム オンライン, 5 月 13 日.
- 豊田正嗣 (2023) 物理学から神経科学そして植物学へ 一異分野融合から見えてきた新しい生命観一. 千葉大学 先進科学センター オムニバスセミナー 千葉, 4 月 28 日.

### 【新聞・メディア情報】

- 【NHK 総合】「チコちゃんに叱られる!」(2024/5/3)
- Business Insider (2024/2/1)

Plants can talk to each other and scientists say it should make us rethink how we treat them

- 【NHK BS・BSP4K】「ヒューマニエンス 40 億年のたくらみ」(2023/12/11)
- 日刊工業新聞 (2023/11/22)  
「経営ひと言／埼玉大学・豊田正嗣教授「まれな存在」」
- 科学新聞 (2023/11/3)

植物間コミュニケーション解説へ 埼玉大

- 日本経済新聞 (2023/10/29)  
植物も匂いを「嗅ぐ」 食害の伝達を細胞光らせて可視化
- 大学ジャーナルオンライン (2023/10/22)  
植物が「匂い」を感じる瞬間の可視化に成功、埼玉大学と山口大学
- 日刊工業新聞 (2023/10/20)  
「埼玉大学、植物の情報伝達を見える化「沈黙の警告」発信」
- 時事通信 (2023/10/17)  
植物が「におい」感じる瞬間=可視化で仕組み解明—埼玉大など
- 文教デジタル (2023/10/17)  
植物が匂いを感じる瞬間 埼玉大研究チームが可視化に初成功
- The Washington Post (2023/10/21)  
How plants communicate with each other when in danger
- Newsweek (2023/10/17)  
Plants Revealed 'Talking' to Each Other About Insects in Video
- SciTechDaily (2023/10/17)  
Nature's Secret Code: How Plants "Talk" Through the Air
- Science X (2023/10/17)  
Real-time visualization of plant-plant communications through airborne volatiles

#### 【受賞】

2024 年度 第 31 回 日本植物生理学会 奨励賞

# 白石科学振興会 研究成果報告書（研究助成）

2024年6月26日

白石科学振興会

理事長 白石 恒裕 殿

研究者氏名：(和文) 水沼 正樹

(英文) Masaki Mizunuma



所属・職名：(和文) 広島大学大学院統合生命科学研究科・教授

(英文) Graduate School of Integrated Sciences for Life,  
Hiroshima University • Professor

## 1. 研究テーマ

(和文)  $\text{Ca}^{2+}$ シグナルが関与する寿命制御機構の解明

(英文) Elucidation of the lifespan mechanism involving  $\text{Ca}^{2+}$  signaling

## 2. 研究の要約

(和文)

老化・寿命制御機構の解明は、がんや代謝疾患など加齢性疾患の発症メカニズムの解明のみならず、それら疾患の予防・遅延を介した健康寿命の延伸に貢献することが期待される。寿命制御に関する研究は、線虫を用いた寿命遺伝子の発見を端緒として、続いて酵母サーチュインがカロリー制限による寿命延長に関与することが発見され、生物に普遍的な寿命制御メカニズムの理解が大きく進展してきた。これまでに、本研究者は、カルシウムイオン依存性の脱リン酸化酵素である“カルシニューリン”(以後、CN)の酵母破壊株の細胞寿命が延長することを見出したことから、このメカニズムに着目した。CN破壊株の寿命延長にはオートファジーの関与はなかったが、ミトコンドリアとの機能関連が示唆された。さらに、多細胞モデル・線虫 *C. elegans* をモデルとして解析した。線虫の CN 欠損株も寿命が延長し、酸化ストレス応答転写因子・SKN-1 が機能していた。

(英文)

The elucidation of aging and lifespan regulation mechanisms is expected to contribute not only to the understanding of the pathogenic mechanisms of age-related diseases such as cancer and metabolic diseases, but also to the extension of healthy lifespan through the prevention and delay of such diseases. Research on lifespan regulation began with the discovery of lifespan genes in *Caenorhabditis elegans*, followed by the discovery that yeast sirtuins are involved in lifespan extension by calorie restriction, which has greatly advanced our understanding of the universal mechanisms of lifespan regulation in organisms. I focused on the mechanism of lifespan extension because the cellular lifespan of a yeast strain in which calcium-dependent phosphatase "calcineurin" (CN) was disrupted was significantly prolonged. Although autophagy was not involved in the extended lifespan of the CN-disruptant strain, a functional link to mitochondria was suggested. I further analyzed the multicellular model, *Caenorhabditis elegans*, as a model. The CN-deficient *C. elegans* strain also showed lifespan extension, and the oxidative stress response transcription factor SKN-1 played an important role.

### 3 . 研究内容

カルシウムイオン( $\text{Ca}^{2+}$ )は真核生物細胞の普遍的なシグナル媒体として受精から成長、細胞死に至るまで広範な細胞機能の調節に関わっている。 $\text{Ca}^{2+}$ シグナル伝達においては、“カルシニューリン”(以後、CN)の働きが重要である。CNは $\text{Ca}^{2+}$ 依存性プロテインホスファターゼで、ヒトでは脳・神経系、免疫応答などに関与し、免疫抑制剤 FK506 の作用標的としても知られ、注目されている。酵母 CN は、イオンホメオスタシス維持、ストレス応答など環境応答/適応に重要な役割を果たしている。

これまでに本研究者は、酵母の  $\text{Ca}^{2+}/\text{CN}$  による細胞周期制御機構を発見した。この独自の成果を出発点として、 $\text{Ca}^{2+}$ シグナル伝達による細胞周期制御機構の全体像を解明すべく、本機構に欠陥を有する変異株を多数分離し(変異を *scz* と命名)、遺伝学的手法で解析した結果、この機構には少なくとも 14 個の遺伝子が関わる大掛かりなものであることが分かった。その研究過程で、 $\text{Ca}^{2+}$ が寿命制御にも関与することが分かった。さらに、最近、酵母 CN 破壊株の細胞寿命が顕著に延長することを見出しつたが、そのメカニズムは明らかではない。そこで、本研究では、単細胞モデル・出芽酵母とヒト寿命研究の最も優れたモデルと言われている線虫 *C. elegans* を用いて CN 破壊株の寿命延長の分子メカニズムの謎の解明に挑戦した。

寿命制御メカニズムは酵母から哺乳類まで広く保存され、本成果は老化の抑制・遅延によるがん・糖尿病などの生活習慣病予防や、ひいては健康寿命の延長に貢献する可能性もある。酵母の寿命制御は発酵工程の安定化や高効率化など多くの利点があるため、本研究成果は発酵・醸造科学にも貢献する。以上の観点から、酵母を用いた寿命延長メカニズム解明が基礎(ストレス応答、老化・寿命制御)と応用(エタノールをはじめとした発酵生産における長生き酵母の利用、高付加価値化食品、創薬)の両面にわたる波及効果を及ぼすことが期待される。また、線虫を用いることで、単細胞酵母での結果について普遍性の検証も実施した。

本研究の目的達成のため、(1) 酵母の CN 破壊株の寿命延長メカニズムの解明、(2) 線虫の CN 破壊株の寿命延長メカニズムの解明、の 2 つのテーマを掲げ、遂行した。

### 4 . 研究成果

#### (1) 酵母のCN破壊株の寿命延長メカニズムの解明

##### 明

まず、CN 欠損株が示す寿命延長メカニズムに既知のメカニズムが関与するかどうか調べた。具体的には AMP 依存性キナーゼ経路(AMPK)と mammalian Target of Rapamycin (mTORC1)経路が関与するか検討した。これまでに、AMPK は活性化、mTORC1 経路は不活性化することで寿命延長することが報告されている。まず、酵母の AMPK である Snf1 に着目した。CN 破壊として調節サブユニットをコードする *cnb1* 破壊株を用いて Snf1 活性を測定した結果、野生株と比較して Snf1 のリン酸化レベルつまりその活性レベルに有意な差は確認されなかった(図 1)。このことから、CN 破壊株の寿命延長に Snf1 は関与していないことが示唆された。次に、mTORC1 の活性に着目した。mTORC1 は細胞外の栄養条件に応答してタンパク質の翻訳レベルを制御している。酵母では mTORC1 は Sch9 のリン酸化を介して、リボソームタンパク質 Rps6 をリン酸化している(図 2 A)。これら翻訳に関

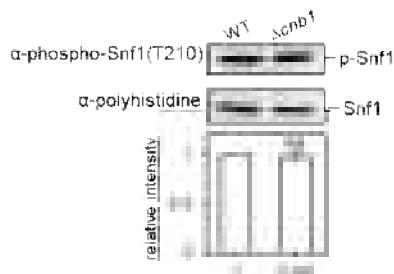


図1. CN破壊株の寿命延長にSnf1は関与しない  
野生株(WT)およびCN破壊株( $\Delta cnb1$ )を培養し、タンパク質を抽出後、リン酸化Snf1に対する抗体を用いて Western blottingを行った。全体の Snf1 量に対するリン酸化された Snf1 量(リン酸化部位)を定量化し、同条件で行った3回の実験の比活性の平均値をグラフ化した。ここではWT株の値を1とした。ns: not significant (two-sided unpaired t-test with Welch's correction)

から、CN 破壊株の寿命延長に Snf1 は関与していないことが示唆された。次に、mTORC1 の活性に着目した。mTORC1 は細胞外の栄養条件に応答してタンパク質の翻訳レベルを制御している。酵母では mTORC1 は Sch9 のリン酸化を介して、リボソームタンパク質 Rps6 をリン酸化している(図 2 A)。これら翻訳に関

とする遺伝子の機能を低下させると寿命が延長することが報告されている。そこで、CN 破壊株では mTORC1 活性の低下が寿命延長に繋がっていると予想し、Rps6 のリン酸化レベルについて解析を行った。その結果、予想に反して CN 破壊株では Rps6 のリン酸化レベルは増加していた(図 2 B)。従って、CN 破壊株の寿命延長には翻訳は関与しておらず、むしろ CN は翻訳を抑制している可能性が示唆された。以上の結果から、CN 破壊株の長寿命に AMPK や mTORC1 経路は関与しないことが示唆された。

これまでに、長寿の株は種々のストレス(ヒートショック、酸化ストレスなど)に対して、ストレス耐性を示すことが知られている。そこで、CN 破壊株を用いてストレスに対する応答を調べたところ、予想に反して、酸化ストレスに対して感受性を示した。これらの結果から、CN 破壊株の寿命延長は、既知の寿命延長経路を介したものではないことが予想された。

そこで、新規寿命制御機構を明らかにするため、CN 破壊株を用いて遺伝子発現の網羅的解析を行い、その原因を追究した。野生株と比較して 1.5 倍以上、または 0.5 倍以下の発現量となった遺伝子を有意に高発現、および低発現した遺伝子として解析を行った。その結果、マイクロアレイで解析された 5,522 遺伝子のうち、高発現した遺伝子は 77 遺伝子、低発現した遺伝子は 18 遺伝子であった。高発現していた遺伝子について着目すると、呼吸代謝やオートファジー、アミノ酸代謝、ヒストンアセチル化に関する遺伝子が増加していた(図 3)。また、低発現した遺伝子について着目すると、ストレス耐性や細胞壁合成に関する遺伝子が含まれていた。

CN 破壊株において、選択的オートファジーの 1 つであるヌクレオファジーへの関与が知られている ATG39 遺伝子の発現が 1.52 倍に増加していたことから、ヌクレオファジーに着目した。ヌクレオファジーと寿命との直接的な関わりは報告されていないが、老化細胞において、核膜や核の形態異常が顕著となることが報告されている。そこで、ヌクレオファジー関連遺伝子である Atg39 の分解レベルを測定することで CN 破壊株のヌクレオファジー活性を測定した。その結果、CN 破壊株ではヌクレオファジーは誘導されていなかったことから、CN 破壊株の寿命延長にヌクレオファジーは関係ないことが示唆された。

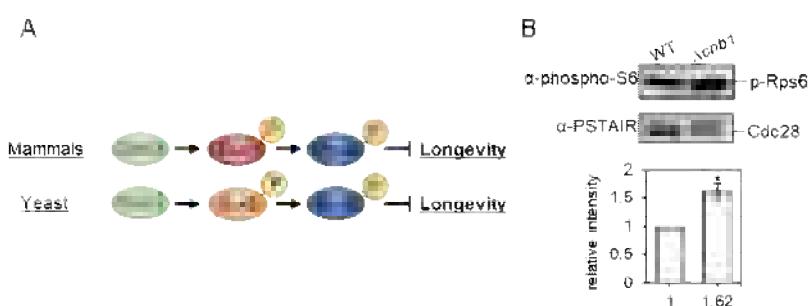


図2. CN破壊株のタンパク質翻訳レベルは低下しない  
(A) mTORC1による翻訳を介した寿命制御モデル図。(B) 野生株(WT)およびCN破壊株( $\Delta cnb1$ )を培養し、タンパク質を抽出後、リン酸化Rps6に対する抗体を用いてWestern blottingを行った。Cdc28量に対する、リン酸化Rps6量を定量化し、同条件で行った3回の実験の比活性の平均値をグラフ化した。<sup>\*</sup>  $p<0.05$  (two-sided unpaired *t*-test with Welch's correction)

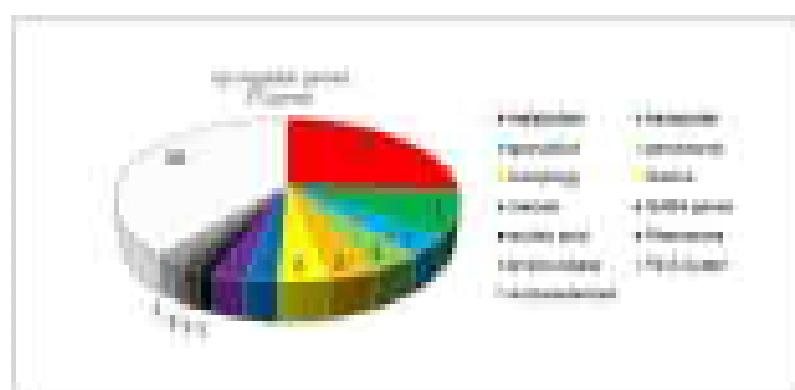


図3. CN破壊株の遺伝子発現の機能的分類  
野生株(WT)およびCN破壊株( $\Delta cnb1$ )を培養し、ホットフェノール法を用いてRNAを抽出し、QIAGEN RNeasy mini kitによってRNAを精製した。Affymetrix® Yeast Genome 2.0 Arrayを用いて遺伝子マイクロアレイ解析を行った。独立した2回の実験を行い、1.5倍以上もしくは0.5倍以下の遺伝子発現を有意な差として解析を行った。  
 $p < 0.1$

## (2) 線虫のCN破壊株の寿命延長メカニズムの解明

次に、個体レベルでも CN 破壊株の寿命が延長するか興味が持たれたため、線虫 *C. elegans* を用いて解析を行った。線虫では、TAX-6 が CN の触媒サブユニットをコードしているため、*tax-6* 変異体を用いた。使用した株は *tax-6(p675)* および *tax-6(db60)* の 2 種類である。この 2 つはどちらも塩基置換による機能欠損変異体である。これまでに、*tax-6* 変異体は体のサイズの小型化、産卵と成長の遅延、化学および熱走性の欠損などの表現型が知られている。まず、*tax-6* 変異体においても酵母と同様、寿命延長が観察されるか確認を行った。寿命測定を行った結果、*tax-6(p675)* と *tax-6(db60)* 両変異体において同程度の寿命延長が確認された(図 4)。

次に、線虫の CN 欠損株について酵母と同様に酸化ストレスに対して感受性を示すかどうか検証した。その結果、*tax-6(p675)* と *tax-6(db60)* 両変異体ともに酸化ストレスに対して感受性を示した。線虫における酸化ストレス応答では、転写因子 SKN-1/Nrf2 が主要な役割を果たしている。そこで、CN 欠損株における SKN-1 の局在を調べたところ、その核局在の割合が増加したことから、TAX-6 は SKN-1 を負に制御していることが示唆された。さらに、*skn-1* 変異体では TAX-6 ノックダウンによる寿命延長は消失した。以上のことから、TAX-6 は SKN-1 を介して寿命を負に制御していることが示唆された。

## (3) 考察

本研究では、酵母と線虫を用いて CN が関与する寿命延長メカニズムの解析を行った。酵母の CN 調節サブユニットである *CNB1* 遺伝子を破壊した株では、寿命が延長することが明らかとなった。線虫 CN の TAX-6 の機能欠損変異体も酵母と同様、寿命が延長した。このことから、CN の寿命における機能は生物間で保存されていることが予想された。酵母で CN が関与する寿命延長機構を調べたが、既知のメカニズムは関与しなかった。しかし、興味深いことに、予想に反して mTORC1 経路が活性化している可能性が示唆されたため、この原因や寿命との関連を解析していく必要がある。また、CN 欠損株は酵母、線虫とともに酸化ストレスに対して感受性を示したが、これも予想とは逆の結果となったが、この要因についても慎重に解析する予定である。今後、CN 欠損株では、呼吸代謝関連遺伝子が増加していたことから、ミトコンドリア呼吸との関連についても解析する予定である。また、線虫の解析から、TAX-6 は SKN-1 を介して寿命を負に制御していることが示唆された。今後、TAX-6 と SKN-1 が直接相互作用しているか、また、TAX-6 が SKN-1 を制御している組織はどこなのか詳細に解析する必要がある。酸化ストレスは老化の原因とされており、健康寿命と密接な関係があるため、寿命と酸化ストレス耐性の制御に関わっていると考えられる CN の制御システムの解明は、私たちの健康寿命延長のための手掛かりになり得るだろう。

## 5 . 外部成果発表（学会・論文発表など）

- 出芽酵母と線虫の寿命を延長するメチオニン代謝物、水沼正樹、日本農芸化学会 2024 年度大会  
(東京大会), 東京農業大学世田谷キャンパス(東京都), 2024 年 3 月 26 日, 口頭発表
- 酵母に学ぶ健康長寿、水沼正樹、第 121 回醸酵学懇話会、白鶴酒造株式会社(神戸市), 2024 年 2 月 6 日,  
口頭発表

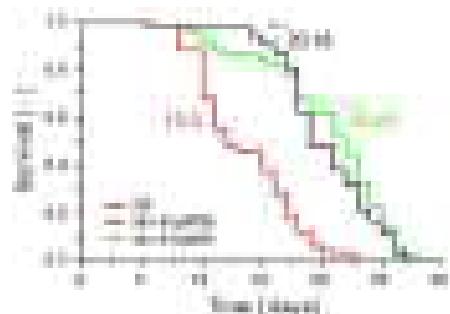


図4. 線虫のCN変異体は寿命延長する  
線虫の野生株(N2)およびCN破壊株(*tax-6(p675)*と*tax-6(db60)*)を培養し、20 °C でadult線虫に産卵させた。卵が孵化してyoung adultに成長した線虫を、FUdR を散布した寿命測定用ブレートへ30匹ずつのせ、生死判別を行い、生存率を算出した。グラフ内の数値は平均寿命を示す。  
P values: log-rank test, \*\*\*p<0.001

## 白石科学振興会 研究成果報告書（育成助成）

2024年 2月 19日

白石科学振興会

理事長 白石 恒裕 殿

研究者氏名 : (和文) 宇野 光稀

(英文) Koki Uno



所属・学年 : (和文) 島根大学大学院 自然科学研究科 修士2年

(英文) Shimane University, Graduate School of Natural science,  
Second-year master's students

指導教官氏名 : (和文) 新 大軌

(英文) Daiki Atarashi

所属・職名 : (和文) 島根大学学術研究院 環境システム科学系 准教授

(英文) Shimane University, Science of Environmental Systems,  
Graduate School of Natural Science and Technology,  
Associate Professor

### 1. 研究テーマ

(和文) カーボンニュートラル社会実現に向けた汎用的な石灰石混合セメントの開発

(英文) Development of versatile limestone-mixed cement for a carbon-neutral society

### 2. 研究の要約

(和文)

国内のセメント需要のおよそ7割を占める普通ポルトランドセメント(OPC)への石灰石微粉末(LSP)の置換割合は現行のJISで5%までと定められている。セメント産業からのCO<sub>2</sub>排出を削減しカーボンニュートラルを実現するには、LSPの置換割合を増大させることは必要不可欠である。しかしLSPの置換割合を増大させることでセメント量が低減するためコンクリートの圧縮強さが低下することが問題となる。一方、著者らはセメントの反応を促進させる添加剤について系統的に検討を加えており、アミン系添加剤はセメントの反応を促進させることで強度改善効果が期待できることを指摘している。そこで、本研究ではLSPを置換したOPCの圧縮強さおよび水和反応にTIPA添加が及ぼす影響を検討した。結果、LSPを置換したOPCにTIPAを添加することで材齢初期からセメントの反応だけではなくLSPの反応も促進し、水和生成物量が増加することでOPCのみの系と同等以上の圧縮強さになることが明らかとなった。

(英文)

In this study, the effect of triisopropanolamine (TIPA) on the development of initial strength, the stability of long-term strength and the behavior of hydration products of ordinary Portland cement (OPC) containing limestone powder (LSP) were investigated. The addition of TIPA to OPC containing LSP increased the amount of hydrate at 7 days and improved compressive strength as the hydration

products filled voids. In addition, the reaction of ferrite ( $C_4AF$ ) and  $CaCO_3$  at early stage were significantly accelerated by adding of TIPA. And the formation of hemicarbonate and monocarbonate in OPC-LSP system was promoted by addition of TIPA.

### 3. 研究内容

#### 【研究背景】

現在、地球温暖化の問題への対策として世界全体でカーボンニュートラル実現に向けた動きが急加速している。一方、セメント産業では2020年度に約4000万tの $CO_2$ を排出しており、セメント産業は全世界の $CO_2$ 排出量の約5%を占めている。そのためカーボンニュートラル実現に向けたセメント産業の $CO_2$ 排出削減・抑制は急務の課題である。セメント産業における $CO_2$ 排出の主な要因の一つは、セメントの原料である炭酸カルシウムを高温で焼成する過程の脱炭酸である。そのため、国内のセメント需要のおよそ7割を占める普通ポルトランドセメント(OPC)への石灰石微粉末(LSP)の置換割合をJISで定められている5mass%から増加させることでセメントの割合が減少するためセメント産業からの $CO_2$ 排出を削減することが可能となる。一方で、LSPの置換割合を増大させることでセメント量が低減するためコンクリート・モルタルの圧縮強さが低下することが問題となる。これに対し、著者らはセメントの反応を促進させる添加剤について系統的に検討を加えており、アミン系添加剤はセメントの反応を促進させることで強度改善効果が期待できることを指摘している。そこで本研究ではアミン系添加剤が、LSPを置換したセメントの圧縮強さに及ぼす影響を検討した。また、LSPを混合したセメントを汎用的に利用するためにはセメント鉱物およびLSPの反応に及ぼすアミン系添加剤の影響およびその反応促進メカニズムを明確にする必要があるためLSPを混合したOPCの水和反応にTIPA添加が及ぼす影響についても検討を行った。

#### 【研究手法】

##### <使用材料と水準>

本研究ではOPC、粉末度5040cm<sup>2</sup>/gのLSP、TIPA、標準砂を使用した。OPCは一般社団法人セメント協会から入手した研究用セメントである。添加剤として用いたTIPAは関東化学社鹿特級試薬を使用した。配合を表1に示す。水はモルタル試験では水道水、ペースト試験では蒸留水を使用した。なおTIPAを添加した系では、粉体に対してTIPAが0.03mass%になるように溶解させた練り混ぜ水を使用した。

表1. 各水準の配合

wt%	Cement	LSP	TIPA
OPC	100	—	—
OPC-LSP	90	10	—
OPC-LSP-TIPA	90	10	0.03

##### <実験方法>

###### 1) 圧縮強さ試験

JIS R 5201に準拠しモルタルを練り混ぜ、圧縮強さ試験を行った。

###### 2) 空隙率の測定

1)と同じ方法で作製したモルタルについて水銀圧入法を使用して空隙率の評価を行った。測定には株式会社島津製作所 オートポアIV9520を使用し、水銀圧入の圧力範囲は3.5 kPaから $4.1 \times 10^5$  kPaとした。

###### 3) 水和生成物の解析およびセメント鉱物の反応率の算出

表1に記した水準で、練り混ぜを行い所定の日数、20°Cの恒温室で封緘養生を行った。ペーストを所定の日数養生後、粉碎しアセトンを用いて自由水を除去し水和停止を行った。その後、アスピレーター(0.02MPa)による減圧乾燥を1日行った。減圧乾燥を行った試料に対して粉末X線回折(Bluker、D2、PHASER管球Cu、線源: CuK $\alpha$ 、管電圧30kV、電流10mA)を用いて、内部標準法(標準物質:(MgO)を内割で10mass%添加)により水和生成物の解析およびセメント鉱物の反応率の算出を行った。

###### 4) 結合水量

結合水量は強熱減量(1000°C)から求めた。この際、強熱減量はLSPの脱炭酸による減量や石こうの結晶水の脱水による減量を含むため、これらを補正して算出した。なお、LSPおよび石こうによる減量は、未水和セメントの強熱減量(1000°C)から求めた。また、本研究において、強熱減量は無水物を分母として計算した。

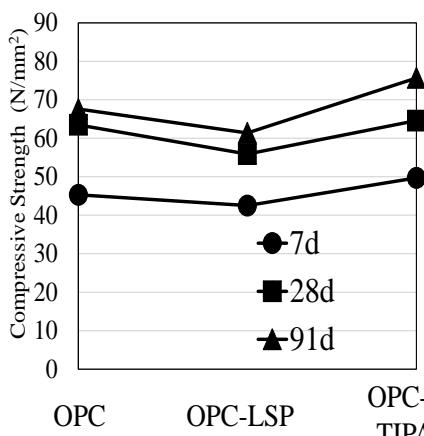


図 1. OPC の圧縮強さに及ぼす LSP および TIPA の影響

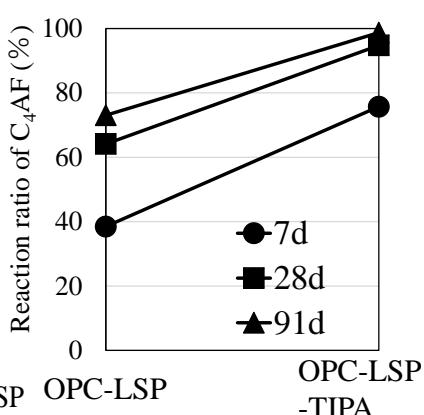


図 2. OPC-LSP の C<sub>4</sub>AF の反応に TIPA 添加が及ぼす影響

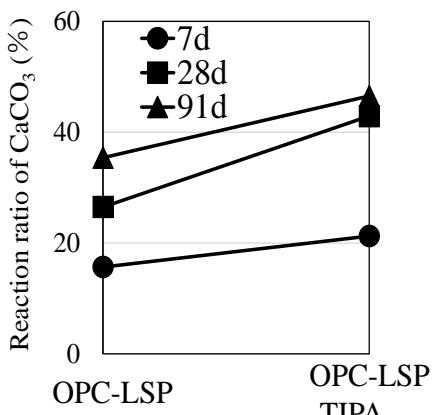


図 3. OPC-LSP 中の CaCO<sub>3</sub> の反応に TIPA 添加が及ぼす影響

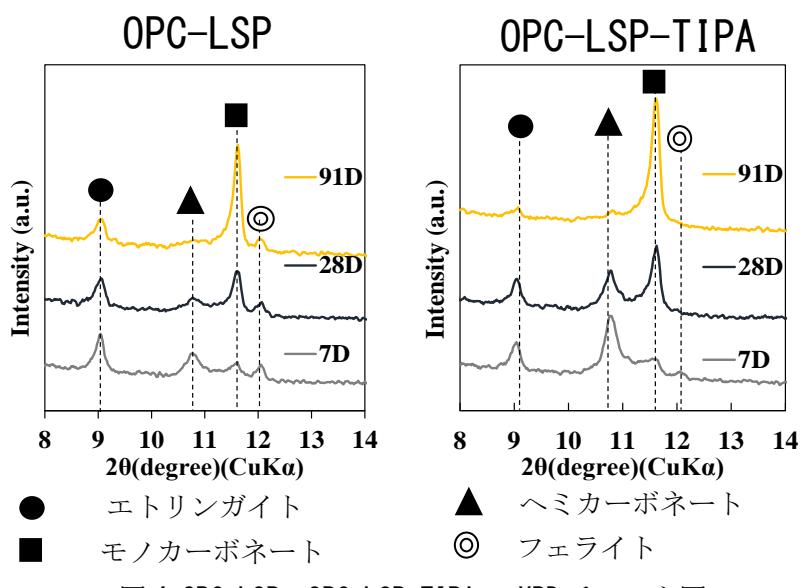


図 4. OPC-LSP、OPC-LSP-TIPA の XRD チャート図

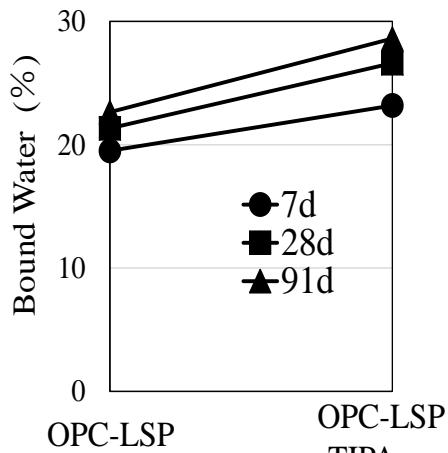


図 5. OPC-LSP 中の結合水量に TIPA 添加が及ぼす影響

### 【研究結果と考察】

#### <OPC の圧縮強さに LSP および TIPA が及ぼす影響>

図 1 に OPC のみ、OPC-LSP、OPC-LSP-TIPA の材齢 7、28、91 日の圧縮強さを示す。材齢によらず OPC-LSP の圧縮強さは OPC のみの圧縮強さと比較して低い値を示した。一方で、材齢によらず OPC-LSP-TIPA の圧縮強さは OPC のみの圧縮強さより高い値となった。以上より、OPC に LSP を置換することで圧縮強さは低下するが、TIPA を添加することによって材齢 7 日から圧縮強さが増加し OPC のみ以上の圧縮強さとなることが明らかとなった。

#### <LSP を置換した OPC の水和反応に TIPA が及ぼす影響>

図 2 に OPC-LSP 中のフェライト( $4\text{CaO} \cdot \text{Al}_2\text{O}_3 \cdot \text{Fe}_2\text{O}_3$ )の反応に TIPA 添加が及ぼす影響を示す。材齢 7 日において、OPC-LSP-TIPA の  $\text{C}_4\text{AF}$  の反応率は OPC-LSP の  $\text{C}_4\text{AF}$  の反応率と比較して高くなかった。この TIPA 添加による  $\text{C}_4\text{AF}$  の反応促進は  $\text{C}_4\text{AF}$  の水和過程で生成し  $\text{C}_4\text{AF}$  の水和を阻害する水酸化鉄の溶解度が、TIPA の添加によって高められたためであると考えられた。また、材齢 28、91 日でも TIPA 添加の有無で LSP を混合した OPC 中の  $\text{C}_4\text{AF}$  の反応率に大きな差が認められた。なお、これ以外のセメント鉱物の反応に対しては TIPA 添加の影響はほとんど見られなかった。

図 3 に OPC-LSP 中の  $\text{CaCO}_3$  の反応率および OPC-LSP-TIPA 中の  $\text{CaCO}_3$  の反応率を示す。材齢 7、28、91 日において、OPC-LSP-TIPA の  $\text{CaCO}_3$  の反応率は OPC-LSP の  $\text{CaCO}_3$  の反応率と比較して高くなかった。TIPA の添加により  $\text{C}_4\text{AF}$  の水和反応が促進し、液相中に  $\text{Al}^{3+}$ 、 $\text{Fe}^{3+}$  が多く存在するためヘミカーボネート( $3\text{CaO} \cdot \text{Al}_2\text{O}_3 \cdot 1/2\text{CaCO}_3 \cdot 1/2\text{Ca(OH)}_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ )およびモノカーボネート( $3\text{CaO} \cdot \text{Al}_2\text{O}_3 \cdot \text{CaCO}_3 \cdot 11\text{H}_2\text{O}$ )の生成によってより多くの  $\text{CO}_3^{2-}$  が消費される。その結果、 $\text{CaCO}_3$  の反応が促進されたと考えられた。

図 4 に材齢 7、28、91 日まで水和させた OPC-LSP、OPC-LSP-TIPA の X 線回折パターンを示す。材齢 7、28、91 日のヘミカーボネート( $3\text{CaO}\cdot\text{Al}_2\text{O}_3\cdot1/2\text{CaCO}_3\cdot1/2\text{Ca}(\text{OH})_2\cdot12\text{H}_2\text{O}$ )およびモノカーボネート( $3\text{CaO}\cdot\text{Al}_2\text{O}_3\cdot\text{CaCO}_3\cdot11\text{H}_2\text{O}$ )のピーク面積は OPC-LSP と比較して OPC-LSP-TIPA の方が大きくなつた。この理由として、TIPA を添加することにより  $\text{C}_4\text{AF}$  および  $\text{CaCO}_3$  の反応が促進されたためであると考えられた。一方、OPC-LSP-TIPA では OPC-LSP と比較して材齢 7、28、91 日のエトリンガイト( $3\text{CaO}\cdot\text{Al}_2\text{O}_3\cdot3\text{CaSO}_4\cdot32\text{H}_2\text{O}$ )のピーク面積は小さくなつた。これは TIPA を添加することにより  $\text{C}_4\text{AF}$  の反応が促進され  $\text{SO}_3/\text{Al}_2\text{O}_3$  比が著しく小さくなつたためであると考えられる。

図 5 に OPC-LSP および OPC-LSP-TIPA の材齢 7、28、91 日の結合水量を示す。いずれの材齢でも OPC-LSP-TIPA の方が OPC-LSP と比較して結合水量が高くなつた。また、本検討において結合水量と空隙率の関係には高い相関があつたことから、OPC-LSP-TIPA は OPC-LSP と比較して材齢 7、28、91 日の水和生成物量が増加し空隙を充填することで圧縮強さが増加したと考えられる。

#### 4. 研究成果

普通ポルトランドセメント(OPC)に石灰石微粉末(LSP)を 10mass%置換することで、OPC のみと比較して材齢に関わらず圧縮強さが大きく低下することが確認された。一方で、LSP を 10mass%置換した OPC にアルカノールアミンの一種であるトリイソプロパノールアミン(TIPA)を添加することで材齢初期から圧縮強さが著しく高くなり、OPC のみの圧縮強さより高くなることが明らかとなつた。これは、TIPA の添加によってセメント鉱物の一種であるフェライト( $4\text{CaO}\cdot\text{Al}_2\text{O}_3\cdot\text{Fe}_2\text{O}_3$ )および LSP の反応が促進することで水和生成物量が増加し空隙を充填したためであると考えられる。

よつて、TIPA を添加することで LSP の置換割合が高い OPC を OPC のみと同等に使用することができるため、国内自給率 100%の天然資源である LSP のさらなる有効利用が期待できるものと考えられる。

#### 5. 外部成果発表（学会・論文発表など）

第 29 回ヤングセラミスト・ミーティング in 中四国 (2023/11/25)において「少量成分を增量したセメントの反応にアミン系添加剤が及ぼす影響」という題目で発表しました。

#### 6. 研究を通して楽しかったこと、会得したことなど

研究を進めていく上で、国外の学会にも参加させていただき、海外の研究者・技術者の方と意見交換をしたことが楽しかつたです。また、国内の学会では進めてきた研究の成果を報告し達成感を味わうことができました。これらの経験を通して研究活動をする上でのコミュニケーション能力を会得することができました。さらに、様々な方の考え方につれることで物事を多角的に考えることができるようになりました。

# 白石科学振興会 研究成果報告書 (育成助成)

2024 年 2 月 21 日

白石科学振興会

理事長 白石 恒裕 殿

研究者氏名 : (和文) 川島 さゆり

(英文) Sayuri Kawashima



所属・学年 : (和文) 日本大学大学院理工学研究科物質応用化学専攻博士前期

課程 2 年

(英文) Department of Materials and applied Chemistry,  
College of Science and Technology, Nihon University

指導教官氏名 : (和文) 小嶋芳行

(英文) Yoshiyuki Kojima

所属・職名 : (和文) 日本大学理工学部物質応用化学科

(英文) Department of Materials and applied Chemistry,  
College of Science and Technology, Nihon University

## 1. 研究テーマ

(和文) バテライト圧粉体による LEDs 光の可視光変換

(英文) Visible Light Conversion of LEDs Light by Vaterite Compacts

## 2. 研究の要約

炭酸カルシウムにはカルサイト、アラゴナイトおよびバテライトの 3 つの結晶形態が存在し、異なる粒子形態を有している。中でもバテライトは球状および板状の結晶を有しており、このバテライトの特徴の 1 つに構造色がある。しかし、合成したバテライトが構造色を示した例は報告されていない。そこで、バテライトの粒径制御を行い、これをディップコートすることにより構造色発現させることができた。さらに、バテライトの粒径や厚さ、粒子の並び方および距離で構造色の色が異なることを明らかにした。ここで、バテライトを建材や農業用シートなどに利用するなどの用途拡大のため、一軸加圧をすることによりバテライトの圧粉体を作製した。この圧粉体に透過光を当て色が変化した例は報告されていない。そこで、本研究では、バテライト圧粉体の透光性の解明を目的とし、バテライトの粒径や形状、圧粉体の厚さおよび光源の光の種類と透光性の関係について検討した。

Calcium carbonate has three crystal forms: calcite, aragonite, and vaterite, which have different particle morphologies. Vaterite has spherical and plate-like crystals, and one of the characteristics of vaterite is its structural color. One of the characteristics of vaterite is its structural color. However, there have been no reports of synthesized vaterite showing structural color. Therefore, we controlled the vaterite particle size and dip-coated the vaterite to produce structural color. Furthermore, it was clarified that the color of the structural color differs depending on the vaterite particle size, thickness, particle alignment, and distance. In order to expand the use of vaterite for building materials and

agricultural sheets, a vaterite compact was produced by uniaxial pressing. There have been no reports of color changes in this pressed vaterite by exposure to transmitted light. In this study, we investigated the relationship between the vaterite particle size and shape, the thickness of the pressed vaterite, the type of light source, and the translucency of the vaterite pellets.

### 3. 研究内容

微細バテライトの合成を行った。モノエタノールアミンを用いた方法、ポリスチレンスルホン酸を用いた方法により合成を行った。バテライトのさらなる用途拡大のために、合成した微細バテライトを一軸加圧することでバテライト圧粉体を作製し、この圧粉体にLEDライトを透過し、透過光の色を観察した。バテライトの粒径が透過光の色に与える影響や、圧粉体の厚みが透過光の色に与える影響について検討を行った。試料のキャラクタリゼーションは、走査型電子顕微鏡(SEM)、色の評価は、分光蛍光光度計、輝度計にて行った。

### 4. 研究成果

粒径が異なるバテライトのSEM写真をFig.1に示す。

SEM写真より、結晶の形状はすべて球状であった。バテライトの平均粒径は、 $0.3\text{ }\mu\text{m}$ ,  $0.5\text{ }\mu\text{m}$ ,  $1.0\text{ }\mu\text{m}$ および $2.0\text{ }\mu\text{m}$ であった。したがって、非常に微細なバテライトが得られた。上記試料をそれぞれ $10\text{ MPa}$ で1分間圧縮成形し、圧粉体の厚み $1.0\text{ mm}$ の圧粉体を作製した。これらの圧粉体に異なる色のLEDライトを照射した時の圧粉体の透過光の写真をFig.2に示す。LED照射した際、透過光の色が光源の色から変化がみられることを可視光変換とよぶ。緑色LEDライトでは、バテライトの平均粒径 $0.3\text{ }\mu\text{m}$ の圧粉体でのみ橙色に可視光変換を示した。青色LEDライトのとき、バテライトの平均粒径 $0.3\text{--}1.0\text{ }\mu\text{m}$ の圧粉体では $b^*$ が正に高かったことより赤から橙色に可視光変換を示した。白色LEDライトでは、バテライトの平均粒径 $0.3$ ,  $0.5\text{ }\mu\text{m}$ の圧粉体では赤色を示し、バテライトの平均粒径 $1.0\text{ }\mu\text{m}$ の圧粉体では橙色、 $2.0\text{ }\mu\text{m}$ の圧粉体では可視光変換が起きなかった。したがって、バテライトの平均粒径が可視光波長領域内であると可視光変換が起き、粒径が微細になるに伴い高波長へ可視光変換が起きた。したがって、このバテライト圧粉体がフィルターとなり可視光をカットする役目をしていると考えられる。さらに、粒子径により散乱パターンが異なるため粒径により光を吸収する波長が異なった。

つぎに、粒径 $0.3\text{ }\mu\text{m}$ のバテライトを用いて、圧粉体の厚みを変化させたときの圧粉体の透過光の写真と輝度測定結果をFig.3に示す。赤色LEDライトではすべての圧粉体で可視光変換が起きず、緑色LEDライトでは、 $1.0\text{ mm}$ のみ橙色へ可視光変換を起こした。青色LEDライトでは、すべての圧粉体で橙色へ可視光変換を起こし、白色のLEDライトでは $0.6$ ,  $0.8\text{ mm}$ の圧粉体では橙色、 $1.0\text{ mm}$ の圧粉体では赤色を示した。したがって、圧粉体の厚みが薄くなるに伴い低波長の色へ可視光変換を起こすと考えられる。したがって、厚みが薄いと光の散乱が起こりにくいため低波長の黄色を示し、一方厚みを増加させると光の散乱が起こりやすいため高波長の光が通りやすくなり赤色を示すと考えられる。

また応用として、LEDライトではなく太陽光を光源とした際も透過光の色がLEDライト同様高波長へ可視光変換を起こした。したがって、今後農業用シートなどへの活用が期待できるのではないかと考えられる。

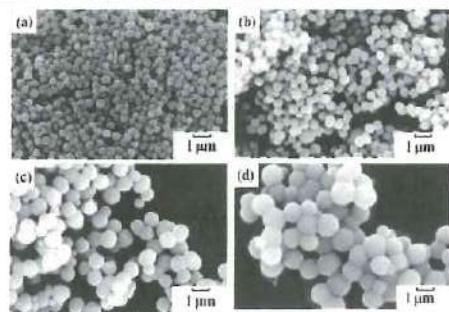


Fig.1 SEM photos of vaterite with different particle size.  
Particle size /  $\mu\text{m}$ , (a) :  $0.3$ , (b) :  $0.5$ , (c) :  $1.0$ , (d) :  $2.0$

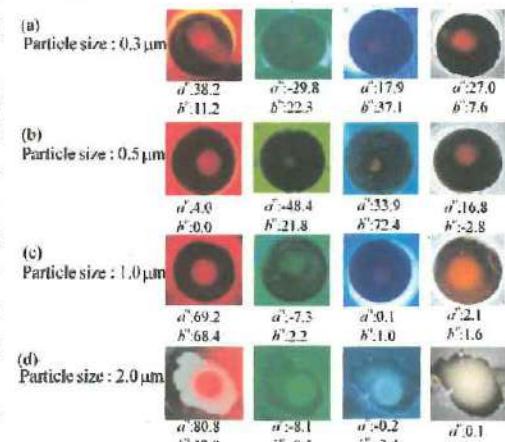


Fig. 2 Transmitted light depending on vaterite particle size.  
Pressure :  $10\text{ MPa}$ , Time : 1 min  
Thickness of compacts :  $1.0\text{ mm}$

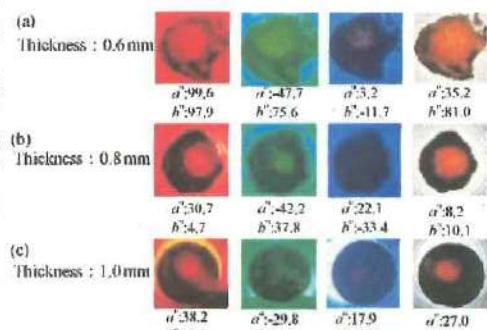


Fig. 3 Transmitted light of compacts at each thickness.  
Pressure :  $10\text{ MPa}$ , Time : 1 min  
Vaterite particle size :  $0.3\text{ }\mu\text{m}$

## 5. 外部成果発表（学会・論文発表など）

- 1) 第38回日本セラミックス協会関東支部研究発表会, 2022年9月7-8日, 埼玉, 1C11.
- 2) The 95th JSCM Anniversary Conference "Sustainable Technology in Colour Materials", 2022年10月25-26日, 東京, J-P-31.
- 3) 第145回無機マテリアル学会学術講演会, 2022年11月10-11日, 熊本, 37.
- 4) 2022年度材料技術研究討論会, 2022年12月1-2日, 東京, P-16, ゴールドポスター賞受賞.
- 5) International Symposium on Inorganic and Environmental Materials 2023 (ISIEM 2023), 2023年6月19-23日, フランス, P2-5.
- 6) 第67回日本大学理工学部学術講演会, 2023年11月30日, 東京, N-1.

## 6. 研究を通して楽しかったこと、会得したことなど

研究を通して、MEAやPSSを用いてバテライトの粒径制御をすることは非常に興味深く、微細なバテライトを合成できたときはやりがいを感じました。また、色の研究を行っていたため、目で直接変化を観察できることなどが非常に面白かったです。また、まだあまり行われていない研究であるためわからないことが多く難しく感じたことも多々ありましたが、一方で、新たな発見が非常に多く、大変やりがいを感じました。透過光の色の測定などでは、通常の測定方法では測定できないことなどがあり、自身で考え、工夫をすることで、以前よりも良い測定方法を得ることができました。今後実用化近づいたらより面白くなると感じています。

# 白石科学振興会 研究成果報告書（育成助成）

2023年2月8日

白石科学振興会

理事長 白石 恒裕 殿

研究者 氏名 : (和文) 佐伯 直彦

(英文) Saeki Naohiko



所属・学年 : (和文) 東京大学工学系研究科建築学専攻 修士2年

(英文) Department of architecture, School of Engineering, the University of Tokyo. 2<sup>nd</sup> year of master course.

指導教官氏名 : (和文) 丸山 一平

(英文) Maruyama Ippei

所属・職名 : (和文) 東京大学工学系研究科建築学専攻 教授

(英文) Department of architecture, School of Engineering, the University of Tokyo. Professor.

## 1. 研究テーマ

(和文) 異なる相対湿度環境下でのセメント水和物の炭酸化メカニズムに関する基礎的研究

(英文) Natural carbonation process mechanism of cement paste in differernt relative humidities

## 2. 研究の要約

(和文) 建築・土木に欠かせない材料であるセメント構造物では、その内部に含まれるカルシウム水和物によって気中のCO<sub>2</sub>を固定する炭酸化現象が生じることが知られ、供用中のセメント構造物のCO<sub>2</sub>固定能力の把握がセメント分野の課題となっている。本研究では、カルシウム水和物が異なる相対湿度(RH)環境下で炭酸化する際の反応速度、反応によって生じる炭酸カルシウム析出多形、および炭酸化中のC-S-H ゲルの構造変化を分析したものである。得られた知見としては以下の4つである；(i) RHが高い環境で反応速度の増加が見られ、反応速度は試料の含水量とバイリニアに相關していた。(ii) 所定RH以下の水酸化カルシウムの溶解速度が急速に低下する現象が観察された。(iii) 炭酸カルシウムの多形は高RHでCalciteが、低RHではAragonite、Vateriteの析出と非晶質炭酸カルシウムの析出が見られた(iv) C-S-H ゲルの炭酸化は主に45 %RH以上の湿度でのみ生じ、カルシウムの溶解に伴うシリケートの重合が観察された。

(英文) Cementitious structures in thier service-life fix CO<sub>2</sub> in the air, which has long been known as carbonation. This is due to the calcium hydrates contained within the structure. Understanding the CO<sub>2</sub> uptake of cementitious structures is a challenge in the cement field, and thus, understanding of carbonation mechanism is necessary. This study analyzes the reaction rate of carbonation of calcium hydrate, the calcium carbonate polymorphs produced by the reaction, and the structural changes in

the C-S-H gel under different relative humidity (RH) carbonation. The following four findings were obtained: (i) An increase in the reaction rate was observed at higher RH, and the reaction rate was bilinearly correlated with the water content of the sample. (ii) A rapid decrease in the dissolution rate of calcium hydroxide below a given RH was observed. (iii) Polymorphism of calcium carbonate was observed with calcite at high RH, and aragonite & vaterite and amorphous calcium carbonate precipitation at low RH. (iv) Carbonation of C-S-H gel occurred only at 45% RH or above, where calcium decalcification in C-S-H and silicate polymerization were observed.

### 3. 研究内容

炭酸化反応は、セメント硬化体内のケイ酸カルシウム水和物（C-S-H ゲル）や水酸化カルシウム等のカルシウム水和物が  $\text{CO}_2$  と反応して炭酸カルシウムを生成することに起因する。まず文献調査によってそれぞれのカルシウム水和物と  $\text{CO}_2$  との反応メカニズムを整理したところ、異なる RH 環境下での反応速度について、また析出する炭酸カルシウムの多形についてコンセンサスが取れていないことが分かった。加えて、C-S-H に関しては層間のカルシウムの溶解 (decalcification) の後に主構造のカルシウムレイヤーが溶解(decomposition)し、それとともにシリケートが重合していくという多段階の炭酸化ステップを踏むが、RH が反応に及ぼす影響についての先行研究が少ないことをレビューした。以上から、RH が炭酸化反応に与える影響に関して、要約で述べた 3 つの観点から実験することを研究のメインテーマとした。

粉末状のセメント硬化体を、23 %から 95% RH 環境で大気  $\text{CO}_2$  濃度において炭酸化させて、反応の経時変化を取得した。方法としては、熱重量分析を行うことで二酸化炭素の固定量（つまり全体の炭酸化速度）を評価し、試料内の含水量との相関を比較した。また、炭酸化反応によって生成した炭酸カルシウム多形の分析として、X 線回折(XRD)による相組成変化の分析を行った。C-S-H の構造変化に関しては、フーリエ変換赤外分光法および  $^{29}\text{Si}$  MAS NMR を用いて内部の分子結合状態の炭酸化による変化を測定した。

### 4. 研究成果

得られた知見としては以下の 4 つである。

- (i) RH が高い環境で反応速度の増加が見られ、反応速度は試料の含水量とバイリニアに相関していた。RH と全体の反応速度の間には正の相関があることは既往研究で報告されていたが、複数のカルシウム水和物相が共存する系においてもその相関が成立することを本研究で示した。
- (ii) 所定 RH 以下の水酸化カルシウムの溶解速度が急速に低下する現象が観察された。これは、炭酸化によって析出した炭酸カルシウムが水酸化カルシウムの周りに保護膜を形成することに起因する。結果として細孔溶液の水酸化カルシウムへの供給が滞り、溶解が停滞したと考えられる。
- (iii) 炭酸カルシウムの多形は高 RH で Calcite が、低 RH では Aragonite、Vaterite の析出と非晶質炭酸カルシウムの析出が見られた。また、低 RH では非晶質の炭酸カルシウムの析出も推察された。熱力学的に不安定な多形（非晶質炭酸カルシウムや Vaterite）が高 RH 環境下では溶解と再析出を繰り返すことで安定な相に転ずることが示唆された。
- (iv) C-S-H ゲルの炭酸化は主に 45 %RH 以上の湿度でのみ生じ、C-S-H 中のカルシウムの脱灰に伴うシリケートの重合が観察された。C-S-H ゲルの炭酸化の指標とされる Ca/Si モル比は炭酸カルシウムの増加に伴って線形に減少することが確認された。

以上の成果は、セメント硬化体による  $\text{CO}_2$  の固定メカニズムの理解にあたり、反応速度と最終の炭酸化度が相対湿度に依存するという知見を提供している。また、炭酸化した後のカルシウム水和物の二次利用に関して、析出する炭酸カルシウム多形についての知見を得られたことも成果と考えられる。

### 5. 外部成果発表（学会・論文発表など）

特になし

### 6. 研究を通して楽しかったこと、会得したことなど

学部の時に取り組んでいた卒業論文とは全く違うテーマとして、セメント硬化体の炭酸化というテーマに修士課程で取り組んでいく中で、自分の知見を大きく広げることができてよかったです。炭酸化に関しては従来からコンクリート内の鉄筋腐食防止という観点で膨大な既往研究がありますが、今回のように炭酸化の化学反応自体に注目している研究は近年になって注目されるようになったテーマであり、その意味で、自分の研究が新しい分野を切り開いているのかなと日々感じながら研究することはとても刺激的でした。

研究を通して会得したことは多岐にわたりますが、まずは装置の使い方や分析の方法、データの整理の仕方などの基本的な研究スキルを研究室の先輩方から教わりました。私は今後同じ研究室で博士過程に進

学する予定なので、これらの能力を鍛えて頂いたことはとても糧になりました。また、日々の研究をしていく中で、研究のモチベーションをどう維持していくか、上手くいかなかった実験結果をどう次に生かすかといった精神的な部分も大きく成長できたと感じています。

白石化学振興会からの研究助成金は、研究に伴って必要になる学術書の購入、およびPC関連機器の購入に充てさせていただきました。これらは自分のアイデアを深化させるにあたり、また日々の業務効率向上にあたり私の研究を前に進めるのに役立ちました。この場を借りて深く御礼申し上げます。

# 白石科学振興会 研究成果報告書

2024年 2月 28日

白石科学振興会

理事長 白石 恒裕 殿

研究者氏名 : (和文) 白木 翔大



(英文) Shiraki Shota

所属・学年 : (和文) 中部大学大学院 工学研究科 応用化学専攻・修士 2年

(英文) Chubu University, Graduate School of Engineering, Department of Applied Chemistry, Second year of a Master's course

指導教官氏名 : (和文) 櫻井 誠

(英文) Sakurai Makoto

所属・職名 : (和文) 中部大学大学院 工学研究科 応用化学専攻・教授

(英文) Chubu University, Graduate School of Engineering,  
Department of Applied Chemistry, Professor

## 1. 研究テーマ

(和文) 液相法 CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-TiO<sub>2</sub> 生体活性ガラスの細胞挙動評価

(英文) Evaluation of cell behavior of CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-TiO<sub>2</sub> bioactive glasses prepared by liquid phase method

## 2. 研究の要約

(和文) 従来のガラス合成法である溶融急冷法と比較し、簡便かつ省エネルギーなプロセスである液相法を用いて、生体活性ガラスの作製を行った。これまでの研究にて、TiO<sub>2</sub> を活用することでガラス網目構造を制御し、その溶解挙動も調整可能であることを明らかにしている。加えて今回行った実験結果から、細胞毒性は見られず生体材料として安全であることを明らかにした。そこでチタン含有リン酸塩カルシウム系ガラスに関する知見を活かし、生体活性ガラスの高機能化を目指してマグネシウムに注目した。本研究では液相法にて CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-MgO 系ガラスを作製し、細胞増殖能と骨形成関連遺伝子の発現量を調査した。Mg の導入によって細胞増殖能が向上する傾向が見られた一方、過剰なイオン溶出は細胞増殖を阻害していた。遺伝子発現量を測定した結果、ガラスから溶出した無機イオンは骨形成関連遺伝子の発現を促進することを明らかにした。

(英文) Bioactive glass was prepared by the liquid phase method. This method is a simple and low energy process compared to the melt quenching method. In our previous work, the glass network structure can be controlled by utilizing TiO<sub>2</sub> amount, and its dissolution behavior can also be

adjusted. In addition, titanium-containing glasses showed no cytotoxicity, which indicates that the glass is safely used as a biomaterial. Hence, we focused on magnesium ion to improve bioactivity of liquid phase prepared calcium phosphate glasses. In this work, CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-MgO glasses were prepared by the liquid phase method and their cell proliferation ability was investigated, as well as the expression levels of osteogenesis related genes. The Mg<sup>2+</sup> ions released from glasses were enhanced the cell proliferation ability. However, excessive ions from the glasses may inhibit cell proliferation. The results of the gene expression study showed that inorganic ions released from the glass promoted the expression of osteogenesis related genes.

### 3. 研究内容

次世代バイオ材料として、生体機能を材料から能動的に制御するバイオアダプティブ材料の創出が提唱されている。本研究では、無機イオンの細胞活性化機能に注目し、イオン溶出挙動の厳密な制御に向け、液相法にて合成したリン酸塩ガラスに関する研究を行った。従来の溶融急冷法と比較し、液相法は常温・常圧にてガラスの合成が可能であることから、簡便かつ省エネルギーなプロセスである。これまで液相法にてインバート組成の CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-TiO<sub>2</sub>系ガラスの作製に成功しており、TiO<sub>2</sub>の導入量の増加に伴い、リン酸塩とチタンから鎖状構造が形成され、ガラスの化学的耐久性が向上することを明らかにした。加えて作製したガラスは、生体機能を強化する Mg<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>イオン(新生骨の形成促進、抗菌性の付与)などのカチオンを容易に導入可能であり、生体活性ガラスの更なる高機能化が期待できる。

まず始めに、ガラスの生体材料としての安全性を確認するため、細胞親和性評価を行った。CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-TiO<sub>2</sub>系ガラス (Ti / P 比が大きいほど、TiO<sub>2</sub>の含有量が多い) を用いて作製した抽出培地を使用し、ヒト骨肉腫細胞 Saos-2 を 1~9 日間培養した。control はガラスを加えていない培地を用いた。各タイムポイントにおける細胞数をカウントし、培養 1 日目の control での細胞数を基準とし、各ガラスの細胞数の割合を算出した。

次にガラス材料の高機能化を狙い、液相法にて CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-MgO 系ガラスを作製した。上述した細胞親和性評価と同様の方法にて、細胞増殖能試験 (Mg / Mg+Ca 比が大きいほど、MgO の含有量が多い) を実施した。加えて 4 週間培養後、real-time PCR を用いて骨形成関連遺伝子である ALP (アルカリフオスファターゼ), OCN (オステオカルシン) の発現量を測定し、CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-MgO 系ガラス (サンプル名 : xMg, x の値が大きいほど、MgO の含有量が多い) の骨形成促進能を評価した。分化誘導因子を加えた培地で培養した細胞 (control+) を基準とし、各ガラスの遺伝子発現量を算出した。

### 4. 研究成果

Fig. 1 に細胞親和性評価の結果を示す。白抜き記号は control を表している。Ti / P = 0 ~ 0.78 では、いずれのタイムポイントにおいても control と同程度の細胞数を示していた。Ti / P = 0.84 ではその他のガラスと比較し、3 日目から細胞数が少なくなっていた。これは TiO<sub>2</sub> 含有量の増加によりガラスの化学的耐久性が増加し、溶出する無機イオンが減少したことによると考えられる。一方、いずれのガラスにおいても時間経過に伴い、細胞数が増加し続いていることから、細胞毒性は発現しておらず、細胞親和性を有することを明らかにした。よって CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-TiO<sub>2</sub>系ガラスは生体材料として安全であり、様々な無機イオンを含有する母材として有望であると考えられる。

Fig. 2 に細胞増殖能試験の結果を示す。白抜き記号は control を表している。培養 9 日目時点の Mg / Mg+Ca = 0.18 ~ 0.62 では、control よりも細胞数が有意に多くなっていた。ガラスの網目構造に注目すると、MgO 含有量の増加に伴い P-O-Mg 結合の量も増加しており、P-O-Mg 結合はリン酸鎖の加水分解を誘導し化学的耐久性を低下させる報告がある。そのため 25Mg ~ 75Mg での高い細胞増殖能は、ガラスの化学的耐久性の低下により Mg<sup>2+</sup>などの無機イオンが多く溶出し、細胞の活性化を促進したことによると考えられる。よってガラス構造内への Mg<sup>2+</sup>の導入は、ガラスの高機能化を目指す上で重要な戦略となることを明らかにした。一方、Mg / Mg+Ca = 1.0 では他のガラスと比較し、細胞数が大きく減少していた。ガラスから溶出される無機イオン量には至適範囲が存在

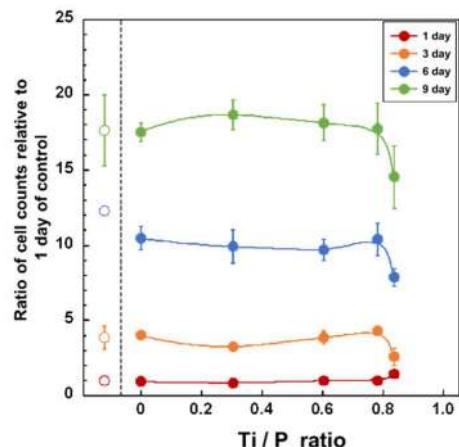


Fig. 1 細胞親和性評価試験

するという報告があることから、 $Mg / Mg+Ca = 1.0$  では過剰なイオンの溶出によって細胞増殖が阻害されていると考えられる。

Fig. 3 に control+に対する骨形成関連遺伝子の発現量比を示す。ALP は骨形成の初期、OCN は中期および後期段階に発現する遺伝子であり、サンプル間の有意差は見られなかったことから、いずれのガラスにおいても分化誘導因子を加えた control+と同程度の遺伝子発現量を示していた。これは  $Mg^{2+}$  による骨形成を促進する効果に加え、 $Ca^{2+}$  は細胞の分化・石灰化の促進、リン酸イオンは骨形成に関連する制御因子の発現を向上することが報告されていることから、ガラスから溶出した無機イオンにより骨形成関連遺伝子の発現量が増加していると考えられる。

以上の結果から、本研究にて作製した液相法  $CaO-P_2O_5$  系ガラスは、生体に対して安全な材料であることに加え、導入する無機イオンの選択によって骨形成などの様々な生体機能を強化可能であることから、高機能生体活性ガラスの母材として有望であることが示唆された。

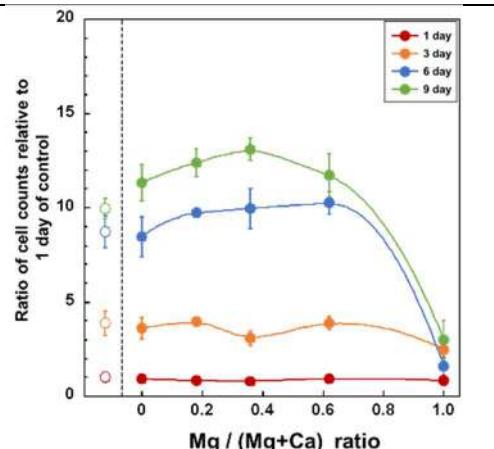


Fig. 2 細胞増殖能試験

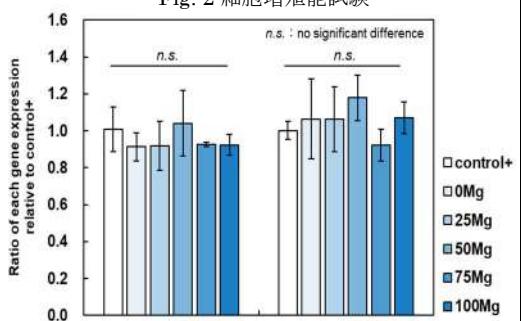


Fig. 3 培養 4 週目における遺伝子発現量比

## 5. 外部成果発表（学会・論文発表など）

- ・日本セラミックス協会 2023 年年会（口頭発表、神奈川大学）
- ・第 64 回東海若手セラミスト懇話会 夏期セミナー（ポスター発表、ホテル＆リゾーツ 伊勢志摩）
- ・日本セラミックス協会 第 36 回秋季シンポジウム（口頭発表、京都工芸繊維大学）
- ・11<sup>th</sup> International Symposium on Inorganic Phosphate Materials International Workshop on Forward-Looking Materials（口頭発表、イタリア）
- ・2023 年度 日本セラミックス協会 東海支部学術研究会（口頭発表、名古屋工業大学）

## 6. 研究を通して楽しかったこと、会得したことなど

貴社からのご支援により、現地開催での学会にて複数回、発表を行うことができた。他大学の先生方や学生とディスカッションをする機会が多くあり、自身の研究分野外の事柄も含め、様々な知見を得る機会となった。またイタリアにて開催された国際学会において、口頭発表を行った。英語を用いた海外の方とのディスカッションは非常に新鮮であり、多くの貴重な経験ができたことに加え、より一層、語学学習に注力したいと感じた。また海外にて行われている最先端の研究について学ぶことができ、有意義となった。

# 白石科学振興会 研究成果報告書（育成助成）

2024年 2月 26日

白石科学振興会

理事長 白石 恒裕 殿

研究者氏名 ふりがな : (和文) 仲野亜美

(英文) Ami Nakano



所属・学年 : (和文) 埼玉大学大学院理工学研究科生命科学系専攻・修士2年

(英文) Department of Biochemistry and Molecular Biology, Saitama University · second year master's student

指導教官氏名 : (和文) 豊田正嗣

(英文) Masatsugu Toyota

所属・職名 : (和文) 埼玉大学大学院理工学研究科・教授

(英文) Department of Biochemistry and Molecular Biology, Saitama University · Professor

## 1. 研究テーマ

(和文) 植物の病害抵抗性カルシウムシグナルに関する研究

(英文) Studies on calcium signaling for disease resistance in plants

## 2. 研究の要約

(和文)

近年、特定のアミノ酸(X)と金属イオン(Y)を共処理された植物では病害耐性が向上することが報告されている。本研究では  $\text{Ca}^{2+}$ 透過性イオンチャネル型グルタミン酸受容体(GLR)が当応答を制御しているのではないかと仮説を立て、その分子機構の解明を試みる。アミノ酸X・金属イオンYの共処理によって発現が誘導される2種類のGLR遺伝子を、CRISPR-Cas9システムによって欠損させた二重変異の植物体を作出した。GFP型  $\text{Ca}^{2+}$ バイオセンサーを発現させた組み換えシロイヌナズナの葉にXおよびYを同時に添加した時に発生する  $\text{Ca}^{2+}$ シグナルをリアルタイムに可視化し、その表現型を解析する。 $\text{Ca}^{2+}/\text{GLR}$ の関与が証明されれば、 $\text{Ca}^{2+}$ を利活用し、植物本来の免疫機能を向上させるような有機的な新規農業システムの開発につながるだろう。本研究を通して、人体にも環境にも優しい無農薬型作物生産体制の確立を目指している。

(英文)

Recently, it has been reported that disease resistance is improved in plants co-treated with amino acid (X) and metal ion (Y). Here, we hypothesized that the  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable ionotropic glutamate receptors “GLRs” regulate this response; and we are trying to elucidate its molecular mechanism. We successfully deleted two GLR genes which is upregulated by co-treated; and produced double mutant plantlets using CRISPR-Cas9 system. We plan to analyze its phenotype by visualizing  $\text{Ca}^{2+}$  signaling generated when amino acid X and metal ion Y are added simultaneously on leaves of *Arabidopsis*.

*thaliana* expressing a GFP-based Ca<sup>2+</sup> biosensor in real time. If the involvement of Ca<sup>2+</sup>/GLR is proven, it will lead to the development of novel organic agricultural systems that utilize Ca<sup>2+</sup> and improve the inherent immune function of plants. Through this research, we aim to establish a pesticide-free crop production system that is friendly to both the human body and the environment.

### 3. 研究内容

GLR (Glutamate receptor-like) はコケ植物やシダ植物、種子植物などの高等植物に存在するイオンチャネルで、アミノ末端ドメイン (ATD)、リガンド結合ドメイン (LBD)、膜貫通ドメイン (TMD)、カルボキシ末端ドメイン (CTD) の 4 つのドメインを保持している。その構造から、古細菌を除く細菌や真核生物ドメインの生物が持つグルタミン酸依存性イオンチャネル (iGluR) のホモログと考えられている。iGluR には  $\alpha$ -アミノ-3-ヒドロキシ-5-メチル-4-イソキサゾールプロピオニ酸 (AMPA) 型、カイニン酸型、N-メチル-D-アスパラギン酸 (NMDA) 型の 3 種類があり、これらは同様の構造をしている。その中で、GLR は哺乳動物の iGluR の遺伝子と相同であり、Ca<sup>2+</sup>を透過する点で特に NMDA 型の受容体に近いとされている。

シロイスナズナには 20 種類の GLR 遺伝子が存在しており、そのうちの 11 種類は植物体の様々な器官で発現することで、花粉管成長や種子の発芽などの多種多様の生理的機能に役割を持つことが分かっている。本研究ではその中でも未だに生理的機能が不明な点が多い GLR2.8 (At2G29110) と GLR2.9 (At2G29100) に注目した。先行研究において、この 2 種類の GLR 遺伝子の单一変異体 *glr2.8* や *glr2.9* では、アミノ酸(X)と金属イオン(Y)を結合させたときに Col-0 と比較して両者ともに耐病性がわずかに減少した。GLR2.8 と GLR2.9 はシロイスナズナの二番染色体に位置し、遺伝子座が隣り合っている。そのため、その機能や役割も似ているのではないかと推測し、各々の单一変異体では互いに機能を補い合うことで病害抵抗性がわずかにのみ減少したのではないかと考えた。そこで、本研究では *glr2.8/glr2.9* の二重変異体を作出することを目的とし、*glr2.8/glr2.9* の二重変異体では X および Y の共処理することで、Ca<sup>2+</sup>の誘導が低下し、顕著に耐病性が減少すると仮説を立てた。

X と Y の共処理によって発現が誘導される 2 種類の GLR 遺伝子を欠損したシロイスナズナの二重変異体をゲノム編集技術「CRISPR-Cas9 システム」を用いて作出了。私たちは *glr2.8* 単一変異体には GLR2.9 の位置に変異を入れ（以下 *glr2.8/GLR2.9* とする）、*glr2.9* 単一変異体には GLR2.8 の位置に変異を入れる（以下 *glr2.9/GLR2.8* とする）ことで、2 パターンの戦略のもと *glr2.8/glr2.9* の二重変異体を作出することができると考えた。

CRISPR-Cas9 システムで作出了 *glr2.8/glr2.9* のホモ二重変異植物体に対して X および Y を共処理したほかに、ハサミで傷つけて傷害抵抗性を観察した。

### 4. 研究成果

本研究では *glr2.8/glr2.9* の二重変異体を作出するべく、CRISPR-Cas9 システムのベクターDNA 「*pKI1.1R*」を使用した。それぞれの遺伝子の 2 番目のエキソンに、Cas9 認識サイトの PAM 配列を含む g (ガイド) RNA を 2 つずつ作製した。このとき、PAM 配列 (NGG) から 3 塩基前の位置に変異が入るため、その位置に適当な制限酵素サイトを含めることで、「制限酵素で DNA が切断不可=変異が入った」と判断することが可能になる。

こうして電気泳動結果から獲得したホモラインのシークエンスを解析したところ、1 塩基欠損、2 塩基欠損、10 塩基欠損の *glr2.8/GLR2.9* と 1 塩基挿入、2 塩基欠損の *glr2.9/GLR2.8* が得られた。これらはフレームシフトを起こして終止コドンが作られるため、遺伝子を潰すことに成功したと考えられる。その後、アグロバクテリウム (GV3101) にエレクトロポレーション法を用いて形質転換し、Floral dip 法により *glr2.8* または *glr2.9* の単一変異体に感染させた。

作出した *glr2.8/glr2.9* の二重変異体を MS (ムラシゲ・スクーレ) 培地に播種し、14 日後の植物体を蛍光実体顕微鏡によりイメージングを行った。シロイヌナズナの第一葉の葉柄をハサミで切る方法と第一葉の葉と葉柄が繋がる位置に X および Y を共処理する方法を用いた。

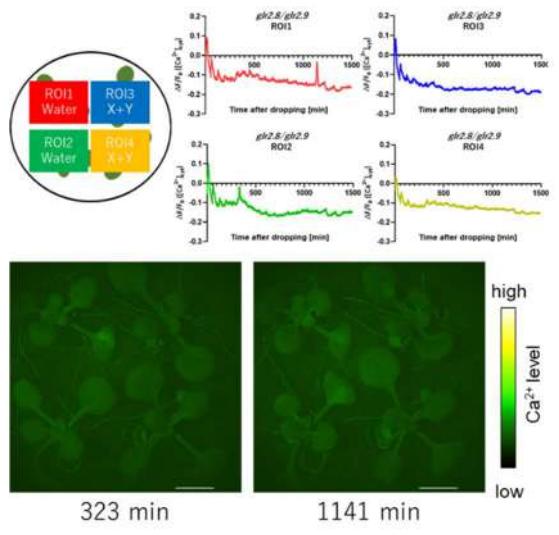
その結果、予測していた蛍光強度すなわち  $\text{Ca}^{2+}$  シグナルの減衰がわずかに確認できた。今後は、再現性の確認を急ぎ、その後プロモーターを変えることでサイレンシングを防いだり、他の GLR 遺伝子を含む 3 三重変異体を作出したりすることで、相互作用の関係性の解明に繋げたい。

## 5. 外部成果発表（学会・論文発表など）

助成金を頂いたおかげで、アメリカのウィスコンシン州マディソンにて国際学会発表を経験することができた。（Ami Nakano, Hiroki Asakawa, Mahu Watanabe, Masatsugu Toyota, (2023), Plant Cell Dynamics X, Madison）

## 6. 研究を通して楽しかったこと、会得したことなど

本研究を通して初めて CRISPR-Cas9 システムを扱ったため、その原理・手法や、イメージングにおける実際の植物体の蛍光強度の測定方法など多くのことを学んだ。また、国際学会の経験を通して、他分野の方と英語で議論を深めるなど様々な学びを得た。



# 白石科学振興会 研究成果報告書（育成助成）

2024年 2月 27日

白石科学振興会

理事長 白石 恒裕 殿



研究者氏名 : (和文) 引原 恋理  
(英文) Reiri Hikihara

所属・学年 : (和文) 立命館大学大学院 食マネジメント研究科・博士前期課程 2回生  
(英文) Ritsumeikan University Graduate School of Gastronomy Management  
Second year of a Master's program

指導教官氏名 : (和文) 増山 律子

(英文) Ritsuko Masuyama

所属・職名 : (和文) 立命館大学大学院 食マネジメント研究科・教授

(英文) Ritsumeikan University Graduate School of Gastronomy Management  
Professor

## 1. 研究テーマ

(和文) カルシウムとリンの代謝調節機構の相互作用研究

(英文) Study of interaction mechanism between regulation of calcium metabolism and phosphorus metabolism

## 2. 研究の要約

我が国は、加工食品などの利用増加に伴い食品栄養学上の課題として、リン摂取の過剰傾向が問題視されている。リンの過剰摂取は、生体内のカルシウム利用に影響するため、生体内の機能維持には食事中のカルシウムとリンの摂取バランスが重要になる。本研究では、生体内における適正なカルシウムとリンの恒常性調節のしくみを調べるために、まず、リン代謝が変化する遺伝子組換えマウスを用いてカルシウムとリンの恒常性や骨量の変化を調べた。血中リン濃度低下時には、リン恒常性はカルシウム恒常性と独立した仕組みで FGF23 が調節していることが確認された。つぎに血中リン濃度低下時にはリン恒常性はどういうに調節されるかを調べるために、食事リン制限を行い、カルシウム・リン恒常性並びに骨形態の変化を観察した。血中リン濃度低下時には、骨量を減少し、骨からの動員によりカルシウム・リン恒常性が調節されることがわかった。

As the usage situation of dietary additives has grown, overdose of phosphorus intake is thereby becoming a major concern in current food environment. The quantity of phosphorus intake influences the bioavailability of calcium in the body, therefore, the balance between calcium and phosphorus in the diet is a critical issue to maintain calcium and bone homeostasis appropriately. In the present study, calcium and phosphorus homeostasis were assessed in mice under the condition that plasma phosphorus was declined. As a results, phosphorus homeostasis was controlled by FGF23 on a priority bases in mice exhibits hypophosphatemia. In addition, whether dietary phosphate restriction affects phosphorus homeostasis under the situation of the impaired phosphorus metabolism, calcium, phosphorus, and bone homeostasis were revealed in mice hypophosphatemia. In this study, it was suggested that phosphorus homeostasis was maintained by bone resorption when dietary intake of phosphorus was restricted in mice exhibiting the impaired phosphorus metabolism.

## 3. 研究内容

我が国は、加工食品・調理食品の利用頻度が増加している。加工食品は、食品製造の過程や食品の保存・目的とした様々な食品添加物が使用されており、その代表的なものにリン酸塩化合物が挙げられる。そのため、リン摂取は過剰傾向になりやすいと考えられる。無機リン酸（以下、リン）は、栄養素としてはミネラルに分類され、生体の機能を維持する上で必要不可欠な栄養素である。リンの過剰摂取は、生体内のカルシウム利用に影響するため、生体内機能を適正に維持するには食事から摂取するカルシウムとリンの

バランスが重要になる。「令和元年 国民健康・栄養調査」の結果では、食事摂取基準値に対し、カルシウムは不足し、リンは充足していた。一方、カルシウム・リン恒常性維持のための適正な摂取比率はカルシウム：リンが1:1～2:1を推奨しており、リンの摂取量はカルシウム摂取量より上回っていることから、リン摂取量は過剰傾向といえる。そのため、適正なカルシウム・リン恒常性の維持には、リン代謝の仕組みをさらに理解することが必要になってくる。さらに、カルシウムとリンの摂取比率を設定するにあたって、リンが適正に利用できる健康な人だけでなく、リンの利用効率が低下した可能性のある状態にも配慮して食事リンの制限の安全性や効果を示すことが求められている。

食事から摂取したカルシウムとリンは、小腸から吸収され血中を通して骨に貯蔵される。骨では骨芽細胞の機能により骨を造り上げる「骨形成」と、破骨細胞により骨を壊す「骨吸収」が骨量の均衡を維持するのと同時に、骨から血中へのカルシウム・リン動員によって血中濃度が調節される。さらに、腎臓では糸球体でろ過された原尿から必要に応じて尿細管にて再吸収がなされ、血中濃度が調節される。カルシウムやリン代謝は骨や腎臓が連携し、バランスよく営むことでカルシウム・リンの恒常性は適切に維持される。これらの仕組みを統制するのは、小腸でのカルシウムやリン吸収を促進するビタミンD、腎臓でのカルシウム再吸収を促進しリン再吸収を抑制する副甲状腺ホルモン(PTH)、また腎臓でのリン再吸収を抑制する線維芽細胞成長因子23(FGF23)などの内分泌的な調節機構である。これらの仕組みに加えて、リン代謝では細胞膜上に局在するENPP1がFGF23の調節に関与している。カルシウム・リン恒常性は、複雑な仕組みによって維持されている。本研究では、生体内における適正なカルシウムとリンの利用条件を「食事」「栄養」「生体内機能」の観点から調べた。まずリン代謝変化する状態でのカルシウムとリンの生体内利用を捉えるため、血中リン濃度低下時にカルシウム代謝の変化とリン代謝調節因子のうちリン恒常性維持に必要な要素について調べた。つぎに、血中リン濃度低下時のリン代謝を把握するため、食事リン制限時のリン恒常性が維持される仕組みと食事リン制限時のカルシウム代謝への影響を調べた。

#### 4. 研究成果

実験①では、生体内のビタミンD作用低下とリン代謝変化がカルシウム・リン恒常性に及ぼす影響を調べるために、動物実験を行った。被験動物は、小腸でのカルシウム・リン吸収の低下によって低カルシウム血症と低リン血症が引き起こすビタミンD作用を欠くマウス(VDRKO)と腎臓でのリン排泄を増加し低リン血症を引き起こすENPP1作用が低下したマウス(ENPP1asj)、さらに両者の作用を同時に失したマウス(DKO)を作出し、それぞれの表現型との比較を行った。野生型マウス(WT)に対して、VDRKOとDKOではビタミンD作用低下による低カルシウム血症(図1A)、低リン血症(図1B)、副甲状腺亢進状態(図1C)を観察した。ENPP1asjでは、血中カルシウム濃度の低下は認められなかった(図1A)。一方、血中リン濃度では血中FGF23濃度の増加により血中リン濃度の低下を観察した(図1B,D)。つまり、カルシウム恒常性において、ビタミンD作用依存的な小腸カルシウム吸収の影響が強く表れており、ENPP1作用低下は、カルシウム代謝に影響しないと考えられた。リン恒常性において、VDRKOとDKOでは、ビタミンD作用低下による小腸でのリン吸収の低下と血中PTH濃度の上昇による腎臓でのリン排泄が増加によって血中リン濃度が低下した。ENPP1asjでは、血中FGF23濃度が上昇し、血中リン濃度は低下した。カルシウムとリンは運動しているもののENPP1はリン恒常性のみ作用していると考えられた。そこで、血中リン濃度低下時にカルシウム恒常性がどのように維持されたのか調べるために、骨から血中のカルシウムとリンの動員に着目し、骨組織中の破

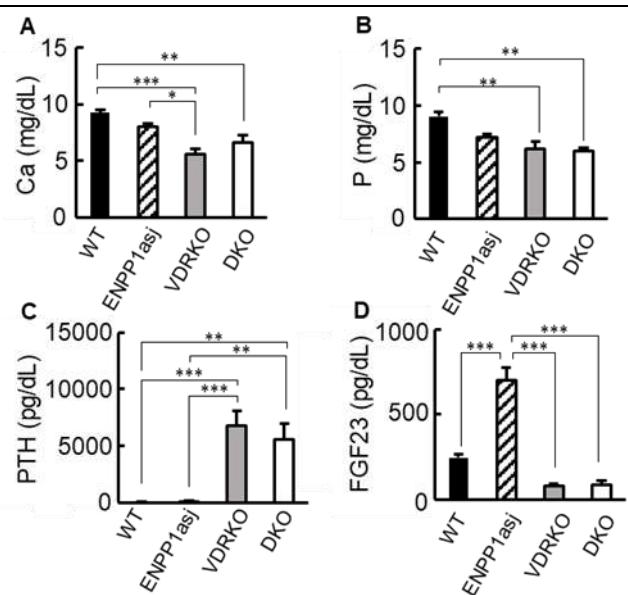


図1 実験① 血清生化学の評価  
平均値±標準誤差、\*\*\* $p < 0.001$ 、\*\* $p < 0.01$ 、\* $p < 0.05$

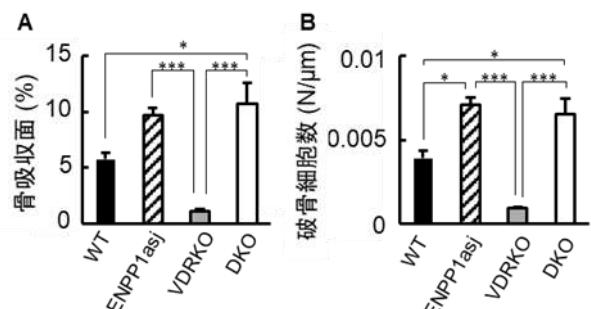


図2 実験① 骨吸収面の割合及び破骨細胞数  
平均値±標準誤差、\*\*\* $p < 0.001$ 、\*\* $p < 0.01$ 、\* $p < 0.05$

骨細胞を形態学的に評価した。ENPP1asj と DKO では、骨組織中の破骨細胞の数が増加した（図 2）。したがって、破骨細胞数の増加は、FGF23 分泌の上昇による血中カルシウム濃度と血中リン濃度の低下を補う仕組みと考えられた。つまり、血中リン濃度低下時のカルシウム恒常性は、骨からのカルシウム・リン動員の仕組みによって維持された。

実験②では、血中リン濃度が低下する低リン血症モデルマウスを用いて、血中リン濃度低下時の食事中リン量の制限によるカルシウム・リン恒常性の影響を捉えるため、ENPP1asj に正常食（0.5% リン）と低リン食（0.25% リン）を投与した。低リン食を投与した ENPP1asj の血中カルシウム濃度と血中リン濃度は正常食投与群と同程度だった（図 3A, B）。さらに、低リン食を投与した ENPP1asj の血中 FGF23 濃度は、過度な上昇は観察されたが、正常食投与群よりも低下傾向を示した（図 3D）。つまり、低リン食を投与した ENPP1asj は、腎臓でのリン排泄が緩徐になり、血中リン濃度の低下は抑制されたと考えられる。また、低リン食を投与した ENPP1asj の破骨細胞数は正常食投与群よりもさらに増加した（図 4A）。破骨細胞数増加の結果に加え、低リン食を投与した ENPP1asj の骨量は、正常食投与群と同程度だった（図 4B）。したがって、低リン食を投与した ENPP1asj は、食事中リン量の制限により骨から血中へのカルシウムとリンの動員がさらに促進し、血中カルシウム濃度と血中リン濃度の低下が抑制されたと考えられた。

これまでの結果から、カルシウム恒常性はビタミン D 作用による小腸でのカルシウム吸収の調節により血中カルシウム濃度が維持されたと考えられる。一方、リン恒常性では ENPP1 の作用低下により、血中 FGF23 濃度は顕著に上昇したが、ENPP1 作用が低下した状態での食事中リン制限時は血中 FGF23 濃度の上昇が緩やかになった。つまり、FGF23 は食事リン制限の刺激により腎臓でのリン排泄を抑制し、リンの利用効率が低下しても FGF23 が血中リン濃度の維持に働いたと推察される。さらに、血中リン濃度が低下した状態でのカルシウム恒常性は、骨量を減少し、骨から血中へのカルシウムとリン動員によって血中カルシウム濃度が維持されたと考えられる。本研究で得られた成果は、生体内のカルシウム・リン恒常性を維持する仕組みの理解を深め、毎日の生活を健康に過ごすための食の提案の応用に繋がる。

## 5. 外部成果発表（学会・論文発表など）

- 第 77 回 日本栄養・食糧学会大会（北海道）、2023 年 5 月 13 日  
「リン代謝調節における Enpp1 ならびにビタミン D 作用の関連性の検討」
- 第 14 回 アジア栄養学会議（中国）、2023 年 9 月 15 日  
「The role of cross-talk axis between vitamin D and phosphorus metabolism in mice」
- 第 62 回 日本栄養・食糧学会 近畿支部大会（奈良県）、2023 年 11 月 11 日  
「細胞膜 ATP-ピロリン酸代謝系に対する食事リン摂取制限の影響」

## 6. 研究を通して楽しかったこと、会得したことなど

研究を通して楽しく思う瞬間は、新規実験が始まる場面である。私は、動物実験に携わっている。最初に行った実験では、被験動物の血中カルシウム濃度と血中リン濃度などの生化学解析を行った。ここで得た結果が、例えば濃度の変化が認められなかった場合、なぜ変化が認められなかつたのかを追求するため、つぎは標的臓器の変化を見る新規実験を行う。その新たな実験の結果は、もしかしたら仮説通りの働きかもしれない、あるいは予期せぬ働きかもしれない、そのように生体内での働きを観察する新しい実験は客観的な判断材料を得ることができるためいつもワクワクする。また、新規実験の結果とこれまで行った実験の結果のつながりを見出すことができたとき、研究を通して楽しい時間である。

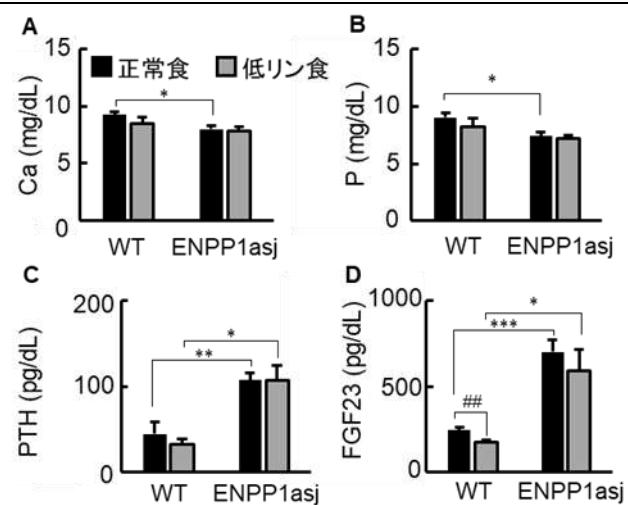


図3 実験② 血清生化学の評価

平均値±標準誤差

\*\*\* p < 0.001, \*\* p < 0.01, \* p < 0.05 WT vs ENPP1asj

## p < 0.01 正常食 vs 低リン食

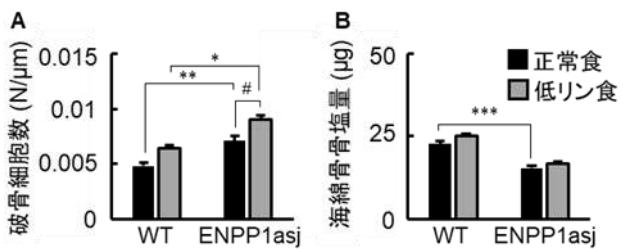


図4 実験② 破骨細胞数及び骨塩量

平均値±標準誤差

\*\*\* p < 0.001, \*\* p < 0.01, \* p < 0.05 WT vs ENPP1asj

# p < 0.05 正常食 vs 低リン食

# 白石科学振興会 研究成果報告書（育成助成）

2024年2月20日

白石科学振興会

理事長 白石 恒裕 殿



研究者氏名 : (和文) 蛭田 大稀

(英文) Daiki HIRUTA

所属・学年 : (和文) 東北大学大学院 環境科学研究科・修士2年

(英文) 2nd year Master's student, Graduate School of Environmental Studies,  
Tohoku University

指導教官氏名 : (和文) 加納 純也

(英文) Junya KANO

所属・職名 : (和文) 東北大学 多元物質科学研究所 金属資源プロセス研究センター

機能性粉体プロセス研究分野・教授

(英文) Professor, Institute of Multidisciplinary Research for Advanced Materials  
Division of Process and System Engineering, Tohoku University

## 1. 研究テーマ

(和文) 高濃度スラリーにおけるシアシックニングのメカニズム解析

(英文) Mechanism analysis of shear thickening in concentrated slurries

## 2. 研究の要約

(和文)

Discrete Element Method (DEM)を用いて、スラリー内部の粒子挙動に関するデータからシアシックニングのメカニズムを明らかにした。シアシックニング発生時に粒子は、流体粘性に比べ粒子慣性の影響が大きくなり、弱い接触力の作用する接触から強い接触力の作用する衝突へと接触状態が遷移することがわかった。また、接触状態が衝突へと遷移することで、粒子が流れに抗うように運動することによりスラリーの粘度が上昇すると考えられる。シアシックニングに影響を与える粒子特性は、粒子径や粒子形状など多く存在するが、シアシックニング発現時の接触状態の遷移は、粒子特性が変化しても大きく変化しないと考えられる。そのため、今回の粒子の運動挙動に関する知見は非常に有用である。また、シアシックニングによる粘度の上昇は、平均体積径を変数とした Stokes 数を用いることが有効であることを示した。これは、スラリーを扱うプロセスの制御条件を決定する際の重要な指針となり得る。

(英文)

The mechanism of shear thickening was clarified from data on particle behavior and internal structure in concentrated slurries using Discrete Element Method (DEM). When shear thickening occurs, the contact state of the particles transitions from a contact with a weak contact force to a collision with a strong contact force, because

the effect of particle inertia is larger than that of the fluid viscosity. The increase in slurry viscosity is considered to be due to the contact state shifting to a collision with a strong contact force, and particles moving against the flow of the fluid. Many particle properties affect shear thickening, such as particle diameter and particle shape. The transition of the contact state at the onset of shear thickening is not considered to change significantly with changes in particle properties. Therefore, the findings of the particle behavior obtained in this study are very useful. In addition, the viscosity increase of shear thickening was found to follow Stokes number with the mean volume diameter as a variable. These results can provide important directions for determining control conditions for processing that use slurries.

### 3. 研究内容

粒子と液体の混合物であるスラリーは、二次電池や燃料電池、セラミックスなどの様々な製品の製造プロセスで扱われており、プロセスの操作性やエネルギーコストはスラリーの粘度の影響を受けることで知られる。そのため、スラリーの粘度を制御可能にすることが重要である。スラリーを扱うプロセスの中でも問題となるのが、せん断速度の上昇に伴い粘度が上昇するシアシックニングである。それにも関わらず、シアシックニングは、粒子・分散媒特性の影響もあり、プロセスの制御を十分に行うまでのメカニズムの普遍化には至っていない。特に 1954 年に Bagnold により報告された非ブラウン粒子高濃度スラリーにおけるシアシックニングは、研究事例が少なく、メカニズムに関して不明な点が多い。そこで、本研究では、スラリー内部粒子の挙動の可視化が容易な Discrete Element Method (DEM) を用いて、非ブラウン高濃度スラリーにおけるシアシックニングのメカニズムを粒子挙動に着目し解析した。

### 4. 研究成果

DEM による解析の結果、シアシックニング発生時、スラリー内の粒子は、流体粘性に対して粒子慣性の影響が大きくなり、”弱い接触力の作用する接触”から”強い接触力の作用する衝突”へと接触状態が遷移することがわかった。また、この粒子の接触状態の遷移により粒子が流れに抗うように運動することで粘度が上昇していると考えられる。更に、シアシックニングによる粘度の上昇は、流体粘性と粒子慣性の影響の比を表す無次元数である Stokes 数に従うことが明らかになった。

粒子の接触状態は、スラリー中の小粒子の存在により変化し得る。そこで、小粒子の存在がシアシックニングに及ぼす影響を調査した。その結果、小粒子が存在する場合でも、Stokes 数を計算する際に用いる粒子径を平均体積径とすることで、シアシックニングによる粘度の上昇が Stokes 数に従うことがわかった。これは、スラリー中の粒子が単分散でなく粒子径分布を持つ場合でも、平均体積径を用いた Stokes 数を使用することで、シアシックニングによる比粘度の上昇が開始する条件を予測できることを意味する。また、小粒子が存在する場合でも単分散の場合と同様に Stokes 数により比粘度が整理できたことから、小粒子の有無により接触状態の遷移というシアシックニングのメカニズムは変化しないことが明らかとなり得る。

### 5. 外部成果発表（学会・論文発表など）

#### 【学会発表】

- 1) ○蛭田大稀, 久志本築, 石原真吾, 加納純也: “DEM を用いた高濃度スラリーのシアシックニングにおける粒子径分布の影響”, 2023 年度粉体工学会春期研究発表会, 2023.5.15 ~ 2023.5.16 (東京都新宿区)
- 2) ○蛭田大稀, 久志本築, 石原真吾, 加納純也: “高濃度スラリーのシアシックニングに粒子径分布が与える影響の DEM 解析”, 化学工学会山形大会 2023 (3 支部合同大会), 2023.8.8 ~ 2023.8.9 (山形県山形市)
- 3) ○Daiki Hiruta, Kizuku Kushimoto, Shingo Ishihara, Junya Kano: “Analysis for the effect of the mixing of particles with different sizes on shear thickening in concentrated slurries”, 9th International Conference on Discrete Element Methods (DEM9), 2023.9.17 ~ 2023.9.21 (Erlangen, Germany)
- 4) ○Daiki Hiruta, Kizuku Kushimoto, Junya Kano: “Effect of particle size distribution on shear thickening in dense non-Brownian slurries”, Tohoku-Melbourne Joint Workshop, 2023.11.1 (Sendai city, Miyagi prefecture)
- 5) ○蛭田大稀, 久志本築, 加納純也: “DEM による非ブラウン高濃度スラリーにおけるシアシックニングのメカニズム解析”, 化学工学会第 89 年会, 2024.3.18 ~ 2024.3.20 (大阪府堺市)

**【受賞】**

- 1) 粉体工学会ベストプレゼンテーション賞, 粉体工学会, 2023.5
- 2) 化学工学会粉体プロセス分科会 最優秀発表賞, 化学工学会粒子・粉体プロセス部会, 2023.8

**6. 研究を通して楽しかったこと、会得したことなど**

研究を通して数値シミュレーションや粉体に関する専門知識だけでなく、主体性を身に付けることができたと感じる。私の研究室は、コアタイムが無い。研究のテーマについても、先生方の意見を参考にしながら、自分の興味関心に応じて決定することができる。このように非常に自由度の高い環境であったため、自分自身で考えることも多く自然と主体性が身に付いたように感じる。また、強制されることなく自主的に研究に取り組めたため、楽しみながら研究に取り組むことができた。

# 白石科学振興会 研究成果報告書（育成助成）

2024年 2月 28日

白石科学振興会

理事長 白石 恒裕 殿

研究者氏名 : (和文) 堀川 昂暉

(英文) Koki Horikawa



所属・学年 : (和文) 岡山大学大学院環境生命科学研究科

(英文) Graduate School of Environmental and Life Science, Okayama University

指導教官氏名 : (和文) 宗正 晋太郎

(英文) Shintaro Munemasa

所属・職名 : (和文) 岡山大学学術研究院環境生命自然科学学域

(英文) Faculty of Environmental, Life, Natural Science and Technology, Okayama University

## 1. 研究テーマ

(和文) カルシウムイオンによる気孔の開閉制御にかかる機能未知膜タンパク質の機能解析

(英文) Functional analysis of a novel class of membrane proteins involved in calcium-dependent regulation of stomatal movement

## 2. 研究の要約

(和文)

植物の葉の表皮に存在する気孔は、一对の孔辺細胞からなる通気口である。植物は乾燥や光など様々な環境刺激に応答して気孔の開度を最適化し、周囲の環境変化に適応している。気孔の開閉運動を制御する孔辺細胞シグナル伝達において、細胞質  $\text{Ca}^{2+}$  がシグナル伝達因子として機能することが報告されているが、その詳細なメカニズムは不明である。本研究では、当研究室でシロイヌナズナを用いた研究により単離した  $\text{Ca}^{2+}$  輸送体候補因子の一つである機能未知膜タンパク質 GCM についての解析結果を報告する。

組織発現パターンの調査を行った結果から GCM は孔辺細胞に高発現していることが明らかとなった。また、遺伝子欠損変異体の気孔表現型解析の結果から、GCM は過度な気孔開口の抑制に関与していることが示唆された。しかし、 $\text{Ca}^{2+}$  イメージング実験やパッチクランプ実験では、GCM が孔辺細胞において細胞質  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の調節に関与することを支持するデータは得られなかった。

(英文)

Stomata on the epidermis of plant leaves are openings composed of a pair of guard cells, which optimize

stomatal opening in response to various environmental stimuli such as drought stress and light, thereby allowing plants to adapt to changes in the surrounding environment. It has been reported that cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  functions as an important signaling factor in guard cell signaling that controls stomatal movement, but the detailed signaling mechanism is unknown. In this study, we report the results of our analysis on GCM, a membrane protein of unknown function, which is one of the candidate factors for  $\text{Ca}^{2+}$  transporters isolated by our laboratory using a model plant *Arabidopsis thaliana*.

Analysis of the tissue expression patterns revealed that *GCM* is preferentially expressed in guard cells. Stomatal phenotype analysis of *GCM*-gene deletion mutants suggests that *GCM* is involved in an unknown signal transduction that limits excessive stomatal opening. However,  $\text{Ca}^{2+}$  imaging and patch clamp analysis did not provide the direct evidence supporting that *GCM* is involved in regulation of cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  concentration in guard cells.

### 3. 研究内容

#### 【組織発現パターン調査】

*GCM*の組織発現パターンを調査するためにレポーター遺伝子アッセイのひとつであるGUS(β-グルクロンидーゼ)分析を行った。*GCM*のプロモーターの下流にGUS遺伝子を結合させたコンストラクトを野生株シロイヌナズナに導入した組み換え植物体を作成し、組織発現パターンの解析を行った。

#### 【気孔表現型解析】

*GCM*がシロイヌナズナの気孔の表現型に与える影響を調査するために、*GCM*遺伝子を欠損させたシロイヌナズナ変異体を作成し、気孔表現型解析を行った。表現型の解析は、光学顕微鏡を用いた気孔開度測定と、赤外線カメラを用いた葉面温度測定により行った。

#### 【 $\text{Ca}^{2+}$ イメージング】

*GCM*がシロイヌナズナの孔辺細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の変化に及ぼす影響を調査するために、 $\text{Ca}^{2+}$ 蛍光指示タンパク質であるYC3.6(yellow cameleon 3.6)を発現するシロイヌナズナ植物体を作成し、 $\text{Ca}^{2+}$ イメージングを行った。

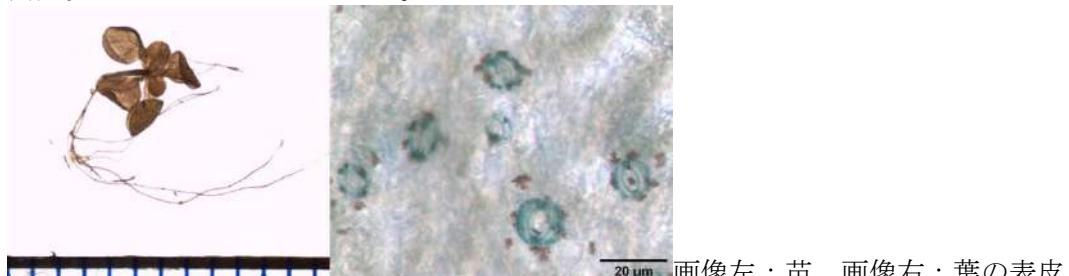
#### 【パッチクランプ】

ヒト培養細胞 HEK293T に *GCM*を異種発現させ、*GCM*のイオン輸送活性を評価した。

### 4. 研究成果

#### 【組織発現パターン調査】

GUS分析の結果、変異体の孔辺細胞が染色されていた(下画像右)。このことから*GCM*は孔辺細胞に高発現していることがわかった。



#### 【気孔表現型解析】

*GCM*遺伝子欠損植物体は、野生株と比較して、気孔開口応答が強まっていることがわかった。

#### 【 $\text{Ca}^{2+}$ イメージング】

野生株と*GCM*遺伝子欠損変異株との間で細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の変化に大きな差は見られなかった。

#### 【パッチクランプ】

*GCM*の $\text{Ca}^{2+}$ 輸送活性は検出できなかった。

#### 【まとめ】

- 孔辺細胞に高発現している *GCM*は過度な気孔開口を抑制する未知のシグナル伝達に関与していることが示唆された。
- GCM*による孔辺細胞細胞質  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の調節への直接的な関与を支持する結果は得られなかった。

### 5. 外部成果発表(学会・論文発表など)

#### 学会発表 1 件

日本農芸化学会中四国支部第 67 回講演会(例会)(2024 年 1 月 27 日、米子コンベンションセンター)

## 6. 研究を通して楽しかったこと、会得したことなど

研究室を通して楽しかったことは、様々な実験系に挑戦することができたことである。変異体植物作成のためのクローニングや顕微鏡を用いた気孔の表現型の解析、蛍光タンパク質を発現させた植物を用いたカルシウムイメージングなどこれまでに見てきた教科書や論文で興味を持った様々な実験について取り組むことができた。また、長期間成功しなかった実験に粘り強く取り組んだ結果良い成果が得られたときには非常に大きな達成感を感じた。

研究を通して会得したことは論理的思考力とコミュニケーション力である。実験から得られたデータと仮説を照らし合わせて考察を行うことや、学会等での発表のための準備を行う上で研究の細部まで考え、その結果をわかりやすく伝える表現を作り上げていくことで論理的思考力が養われた。また、研究室のメンバーと研究についてのディスカッションを行うなかで、情報を正しく受け取り、正しく内容を伝えることを日々心がけ、コミュニケーション力が養われた。

# 白石科学振興会 研究成果報告書（育成助成）

2024年 2月 28日

白石科学振興会

理事長 白石 恒裕 殿

研究者氏名 : (和文) 三木 康誠

(英文) Miki Kosei

所属・学年 : (和文) 北海道大学大学院 理学院 自然史科学専攻



地球惑星システム科学分野 地球惑星物質科学専攻 2年

(英文) Department of Natural History Sciences,

Graduate School of science, Hokkaido University

指導教官氏名 : (和文) 川野 潤

(英文) Kawano Jun

所属・職名 : (和文) 北海道大学大学院 理学研究院 地球惑星科学部門

地球惑星システム科学分野 地球惑星物質学グループ

(英文) Department of Earth and Planetary Sciences, Faculty of Science,

Hokkaido University

## 1. 研究テーマ

(和文) pH/Ca<sup>2+</sup>濃度変化の同時可視化によるカルサイト溶解反応の解析

(英文) Analysis of the dissolution reaction of calcite by simultaneous visualization of local pH and calcium ion concentration.

## 2. 研究の要約

(和文)

カルサイト ( $\text{CaCO}_3$ ) の溶解は、地球上の  $\text{CO}_2$  循環を考える上で重要である。近年の研究により、この現象は従来考えられていたよりも複雑で、 $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{CO}_3^{2-}$  の着脱だけでは説明できないことが報告されるようになつたが、その詳細を明らかにするには、表面近傍の pH/Ca<sup>2+</sup>濃度変化を観察する必要がある。我々の研究グループは近年、蛍光試薬を用いた顕微鏡観察により、水溶液中の pH と  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を同時に分離して 2 次元可視化することに成功した。この手法を用いてカルサイトの溶解を観察したところ、得られた  $\text{Ca}^{2+}$  濃度分布の時間変化は、従来報告されているものと同等の溶解速度、拡散係数を用いた拡散方程式で記述できることが示された。表面直上の pH と  $\text{Ca}^{2+}$  濃度時間変化から、 $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{CO}_3^{2-}$  が 1:1 で溶解するのではなく、一部  $\text{HCO}_3^-$  で溶解していると考えられる。

(英文)

Recent studies have revealed that calcite ( $\text{CaCO}_3$ ) dissolution cannot be explained solely by  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{CO}_3^{2-}$  adsorption and desorption. To investigate this, it is necessary to observe changes in pH/ $\text{Ca}^{2+}$  concentration in the vicinity of the surface. Our research succeeded in simultaneously separating pH and  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations and visualizing them in two dimensions by microscopic observation using fluorescent reagents. The actual observation of calcite dissolution using this technique showed that the obtained temporal variation of the  $\text{Ca}^{2+}$  concentration distribution can be described by a diffusion equation using dissolution rates and diffusion coefficients equivalent to those reported previously. The pH and  $\text{Ca}^{2+}$  concentration just above the surface change with time, suggesting that  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{CO}_3^{2-}$  do not dissolve at a ratio of 1:1, but rather that some of the  $\text{CO}_3^{2-}$  dissolves as  $\text{HCO}_3^-$ .

### 3. 研究内容

#### 初めに

炭酸塩鉱物は  $\text{CO}_2$  のリザーバーであるため、地球上の  $\text{CO}_2$  循環を調べるうえでその形成、溶解メカニズムを解明することは重要である。カルサイト( $\text{CaCO}_3$ )は主要な炭酸塩鉱物の 1 つであり、その溶解についてよく研究されてきた。しかし、最近の研究により、カルサイトの溶解は単純なイオンの着脱だけでは説明できないことが報告されるなど、そのメカニズムが十分に理解されているとは言い難い。我々の研究室では、特定の波長の光を照射したときに、イオン濃度に応じて異なる蛍光を発する蛍光試薬を用いることで pH と  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を同時に 2 次元可視化することに成功した。本研究ではこの手法を用いてカルサイトの溶解を観察することで、溶解メカニズムの解析を行った。

#### 実験手法

蛍光試薬は、それを溶解させた溶液に特定の波長の光を照射すると、pH や  $\text{Ca}^{2+}$  濃度に応じて蛍光強度が変化する試薬である。本研究においては、pH を示す蛍光試薬として HPTS(8-hydroxypyrene-1,3,6-trisulfonic acid)を、 $\text{Ca}^{2+}$  濃度を示す蛍光試薬として Rhod-5N ( $\text{C}_{39}\text{H}_{36}\text{N}_5\text{O}_{13} \cdot 3\text{K}$ )を使用した。HPTS は 405 nm および 460 nm の 2 種類の波長の光で励起した 510 nm の蛍光の強度が pH によって変化し、Rhod-5N は 560 nm の光で励起した 600 nm の蛍光強度が  $\text{Ca}^{2+}$  濃度によって変化する。お互いの励起、蛍光波長が離れており、互いに干渉しないため同時使用が可能であると期待できる。蛍光強度の測定には蛍光顕微鏡を用い、それぞれの励起光を照射して蛍光強度を計測した。測定した蛍光強度を pH/ $\text{Ca}^{2+}$  濃度に変換するためには既知の pH/ $\text{Ca}^{2+}$  濃度の溶液の蛍光強度を測定し、キャリブレーションカーブを作成する必要がある。本研究では pH/ $\text{Ca}^{2+}$  濃度が異なる 59 種類の溶液を作成した。ディッシュに作成した溶液を入れカバーガラスで蓋をすることで厚みを 0.7 mm に固定した。蛍光顕微鏡で蛍光強度を計測することでキャリブレーションカーブを作成した。

カルサイトはへき開面である(104)を観察面とした。HPTS および Rhod-5N を蛍光試薬として用い、 $\text{NaCl}$  でイオン強度 0.1 に調整した溶液を使用した。ディッシュに溶液を入れ、結晶を浸漬させることで溶解させた。溶解開始後すぐに蛍光顕微鏡で蛍光強度の計測を開始し、pH 及び  $\text{Ca}^{2+}$  の蛍光を 30 秒ごとに 30 分間計測した。

### 4. 研究成果

#### 1. キャリブレーションカーブ作成

HPTS の蛍光強度は  $\text{Ca}^{2+}$  濃度に依る傾向がないことが確認できた。Rhod-5N の蛍光強度は pH が高い方が強くなる結果が得られた。これは Rhod-5N が  $\text{H}^+$  と結合した形としても存在するためである(Paredes et al., 2008)。 $\text{Ca}^{2+}$  濃度が 0 及び 7000  $\mu\text{M}$  時の Rhod-5N の蛍光強度を測定して得られた pH 依存性を基に Rhod-5N の蛍光強度を補正することで、pH の効果を考慮した  $\text{Ca}^{2+}$  濃度のキャリブレーションが作成できた。

#### 2. カルサイトの溶解観察

上記で作成したキャリブレーションカーブを用いることにより、カルサイトの溶解時における pH と  $\text{Ca}^{2+}$  濃度分布の変化を、定量化して同時に可視化した。通常の溶液中における溶解において、それぞれの分布変化を比較したところ、pH は結晶中心から同心円状に溶解・拡散するのに対し、 $\text{Ca}^{2+}$  濃度は表面の一部で多量に溶けていることが観察できた。このことは  $\text{Ca}^{2+}$  は表面から溶解したイオンを直接観察しているのに対し、pH 分布は溶解した  $\text{CO}_3^{2-}$  の反応による結果であるためだと考えられる(図 1)。

表面直上の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度は、200 秒で 200  $\mu\text{M}$  まで上昇した後、一定となるのが観察された。溶出した  $\text{Ca}^{2+}$  の総量の時間変化から計算すると、溶解速度は  $1.9 \times 10^{-11}$  ( $\text{mol}/\text{cm}^2/\text{sec}$ ) となる。これは Arvidson et al. (2001) と整合的な値である。さらに、境界条件を溶解速度と表面から  $\infty$  の距離の濃度を 0  $\mu\text{M}$  で定義した拡散方程式を用いてシミュレーションすると、拡散速度定数  $D = 1 \times 10^{-5}$  ( $\text{cm}^2/\text{sec}$ ) のとき実験をうまく再現できた

(図2)。この拡散定数は Wang et al. (2019)と一致する。

表面直上の pH 変化は溶解開始直後から 30 分間上昇し、最大で 9.0 になった。今、 $\text{CO}_3^{2-}$  と  $\text{HCO}_3^-$  の平衡に達する時間が十分早く、 $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{CO}_3^{2-}$  が同量溶出したと仮定する。このとき、ここで観察された pH 変化から予想される表面付近の OH 量は、上記の仮定に基づいて  $\text{Ca}^{2+}$  濃度変化から計算されるものよりも、はるかに小さい。このことから、カルサイトの溶解においては、 $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{CO}_3^{2-}$  が同量溶出するのではなく、一部  $\text{HCO}_3^-$  も溶出していることが示唆される。

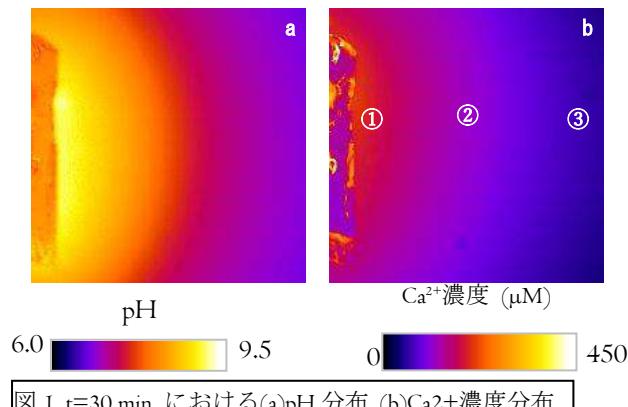


図 1.  $t=30 \text{ min}$  における(a)pH 分布, (b) $\text{Ca}^{2+}$  濃度分布

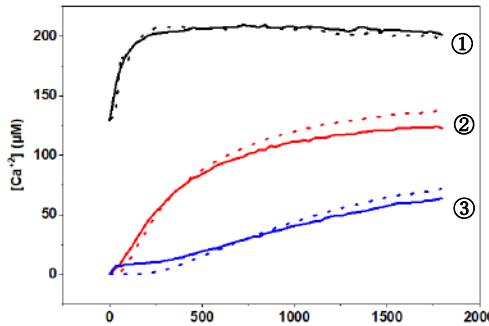


図 2. 図 I の①~③の場所における  $\text{Ca}^{2+}$  濃度時間変化  
(実線)実験値、(破線)計算値

## 5. 外部成果発表（学会・論文発表など）

### ● 三木康誠

「pH/Ca2+濃度変化の同時可視化による炭酸塩鉱物溶解反応の解析」北海道大学大学院理学院・自然史科学部門地球惑星システム科学講座修士論文発表会

2024年2月5日、優秀発表賞を受賞

### ● 川野 潤・松本信二・長谷川晋一・三木康誠・杉浦悠紀・丸山美帆子・豊福高志・永井隆哉

「蛍光イメージング法で見る成長/溶解するカルシウム系化合物のイオン濃度分布変化」結晶成長国内会議、2023年12月4日

### ● 松本 信二・川野 潤・三木 康誠・豊福 高志・長井 裕季子・永井 隆哉

「ゲル中で形成する炭酸カルシウム多形の形成過程：形成場の pH 可視化による解析」日本鉱物科学会、2023年9月15日

### ● Kawano, J., Matsumoto, S., Miki, K., Toyofuku, T., Nagai, Y., and Nagai, T

「Direct observation of pH distribution during the formation of calcium carbonate polymorphs in gel media」 Goldschmidt2023、2023年7月9-14日

### ● 松本 信二・川野 潤・三木 康誠・豊福 高志・長井 裕季子・永井 隆哉

「pH 可視化によるゲルマトリックス中での炭酸カルシウム形成過程の解析」

日本地球惑星科学連合、2023年5月21-26日

### ● 三木 康誠、川野 潤、矢崎 誠、豊福 高志、長井 裕季子、永井 隆哉

「pH およびカルシウムイオン濃度分布の同時可視化による炭酸カルシウム溶解反応の解析」

日本地球惑星科学連合、2024年（発表予定）

## 6. 研究を通して楽しかったこと、会得したことなど

修士2年間を通して、基礎研究の最先端の一つを垣間見る貴重な経験が得られました。また白石科学振興会様のおかげで、特殊な試薬や温度調節器を購入、使用することができ、研究を大いに発展させることができました。

# 白石科学振興会 研究成果報告書（育成助成）

2024年 2月 28日

白石科学振興会

理事長 白石 恒裕 殿



研究者氏名 ふりがな : (和文) 森 隼平

(英文) Shumpei Mori

所属・学年 : (和文) 岡山大学大学院自然科学研究科電子情報システム工学専攻修士2年

(英文) Second-year master's student in the Department of Electronic Information Systems Engineering, Graduate School of Natural Science and Technology, Okayama University

指導教官氏名 : (和文) 鶴田 健二

(英文) Kenji Tsuruta

所属・職名 : (和文) 学術研究院 環境生命自然科学学域・教授

(英文) Faculty of Environmental, Life, Natural Science and Technology.

Professor

## 1. 研究テーマ

(和文) カルサイト表面における水分子を含んだ脂肪酸膜の特性に関する分子動力学シミュレーション

(英文) Molecular dynamics simulation of the properties of fatty acid films containing water molecules on calcite surfaces

## 2. 研究の要約

(和文)

本研究では、ステアリン酸で表面処理を施したカルサイト表面におけるステアリン酸の存在状態や安定状態をナノレベルで明らかにするために、古典分子動力学シミュレーションを用い長時間シミュレーションを行うことで、数種類の膜構造についてのエネルギーなどの物性パラメータ、ならびに汁音における構造変化の比較を行った。また、表面処理を施した炭酸カルシウムと液体を組み合わせた構造でシミュレーションを行うことで、炭酸カルシウムを産業用途に応用する際に重要な要素である周囲の水分子の存在状態や粘性などの比較も行った。その結果、カルサイト表面上のステアリン酸膜の構造安定状態や存在状態、水分子の粘性挙動を評価し、その根拠を示した。

(英文)

In this study, on calcite surfaces treated with stearic acid, we performed longer simulations than ab initio calculations using classical molecular dynamics simulations for relatively long period to

elucidate at the nano-level the presence and stability of stearic acid on calcite surfaces treated with stearic acid. Physical parameters such as energy and structural stability as well as their structural changes at room temperature for several types of film structures were examined. Simulations were also performed on the structures combining surface-treated calcium carbonate and liquid to compare the effects of the presence of surrounding water molecules on the stability of the film and the viscosity, which are important factors in the application of calcium carbonate for industrial applications. As a result, we evaluated the structural stability and state of the stearic acid film on the calcite surface as well as the viscous behavior of water molecules, and demonstrated the rationale for these results.

### 3. 研究内容

本研究ではステアリン酸で表面処理を施したカルサイト表面におけるステアリン酸の存在状態や安定状態をナノレベルで明らかにするために、古典的分子動力学ソフトウェア LAMMPS (Large Scale Atomic/Molecular Massively Parallel Simulator) を用いてシミュレーションを行った。水、ステアリン酸、カルサイトから構成される構造を作成し、シミュレーションに用いた。さらに、予測した2つのモデルを作成し、水の配置による比較も行った。モデルに関して、ステアリン酸膜の内部および外部に水分子を配置したもの有水膜モデル、ステアリン酸膜外部にのみ水分子を配置したもの無水膜モデルと定義した。構造図は図1に示す。界面にはへき開面を使用し、境界は周期的境界条件を適用、粒子数と圧力(1~10bars)と温度(300K)が一定に保たれるNPTアンサンブルを用い、100000ステップ(0.5フェムト秒/ステップ)の時間発展を追跡、カルサイト表面におけるステアリン酸や水分子の動的挙動を検討した。また、表面上の水分子の拡散挙動に関する検討を行った。シミュレーションにより平均2乗変位(MSD: Mean Square Displacement)を算出、MSDと拡散係数は(1)式に示すような関係式で表されるので、MSDグラフの傾きから拡散係数 D を算出した。

$$\langle x \rangle^2 = 2dDt = 6Dt \quad \cdots (1)$$

ここで、dは次元、tは時間、 $\langle x \rangle^2$ はMSDである。この拡散係数 D からAINシュタイン・ストークスの関係を用いて、各構造における水分子の粘性も比較・評価した。

### 4. 研究成果

図1にシミュレーションのスナップショットを示す。図1中の左が有水膜モデル、右が無水膜モデルである。図1より、有水膜モデルでは時間経過に伴いステアリン酸膜内部の水分子が排出される様子が観察された。また、無水膜モデルではステアリン酸が傾斜した構造をとり、ステアリン酸結晶に近い構造を形成する様子が観察できた。さらに、この結晶構造の形状にはステアリン酸被覆密度依存性があることも確認した。図2のように被覆密度が高ければ高いほどステアリン酸の膜厚が大きくなり、傾斜角度が小さいという結果が得られた。さらに、ステアリン酸単分子あたりのポテンシャルエネルギーをモデルにより比較した。ポテンシャルエネルギーは低い程、膜構造が安定であるといえるが、解析の結果、初期状態において有水膜モデルのポテンシャルエネルギーが無水膜モデルと比べて 1eV 以上高く不安定であった。その後、時間経過とともにその差は小さくなった。よって、ステアリン酸内部に水分子がない構造が安定であることが考えられる。その際に前述したようなステアリン酸膜内部からの水分子の排出や結晶構造形成が起きていることも新たに発見した。また、表面上の水分子の拡散挙動に関する比較した。その結果、有水膜モデルと無水膜モデルで比較した場合は無水膜モデルの方が、被覆密度で比較した場合は被覆密度が高い方が水分子の拡散係数は高くなる傾向が見られた。また、すべてのモデルにおいて無処理カルサイト上の水分子よりも拡散係数が高い結果が得られた。この原因としてステアリン酸の疎水基によって水分子を反発している影響が考えられる。より高い被覆密度であれば水分子と疎水基部分との接触面積は大きくなり拡散特性付与の効果は大きくなる。さらに、ステアリン酸が水分子とカルサイトの間に膜を形成することでカルサイトと水分子の相互作用を抑制し、周囲の水分子にさらに高い拡散特性を与えることが考えられる。

以上のように本研究では、カルサイト表面におけるステアリン酸と水分子の挙動を古典分子動力学シミュレーションを用いてナノレベルで解析した。複数種類のモデルでのポテンシャルエネルギー比較などにより、カルサイト表面上のステアリン酸、水分子の安定状態、拡散挙動を明らかにした。本研究での解析はナノスケールの非常に小さい構造での解析結果であり、マクロスケールでは違った挙動が観察される可能性もあり、また、実験観察との直接比較も必要である。よって、さらに大規模な構造を用いた分子動力学シミュレーションでの解析や、同じ構造・分子配置の電子顕微鏡観察との比較などが今後の課題である。

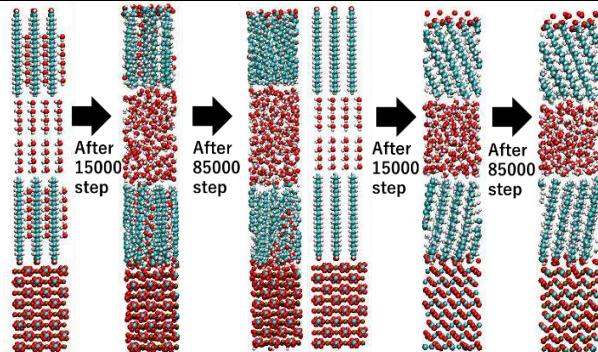


図1 シミュレーションのスナップショット

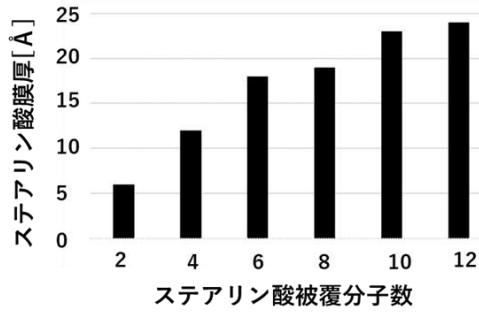


図2 被覆密度によるステアリン酸膜厚

## 5. 外部成果発表（学会・論文発表など）

2022年度 中四国応用物理学会 口頭発表

2022年度 分子シミュレーション討論会 口頭発表

2023年度 PRICM11 (The 11<sup>th</sup> Pacific Rim International Conference on Advanced Materials and Processing) ポスター発表

## 6. 研究を通して楽しかったこと、会得したことなど

PRICM11（韓国での国際学会）でのポスター発表では他大学の教授との議論から新たな視点を多く頂く機会があり、非常に刺激を受け、素晴らしい経験となりました。

また、普段の研究によって解析やデータ整理を行う力がついたとともに、鶴田先生との多岐にわたる議論から課題解決能力が身についたと感じています。

### 3.3 研究成果公表論文

本年度著名なジャーナルに掲載された研究助成成果公表論文は下記のとおりである。

#### ○ 埼玉大学豊田正嗣先生研究成果公表論文

Aratani Y, Uemura T, Hagiwara K, Toyota M(2023): “Green leaf volatile sensory calcium transduction in *Arabidopsis”* **Nature Communications** 14.6236

本論文は、オープンアクセス<sup>\*)</sup>論文として投稿されており、著者のご意向もお聞きしたうえで全文を次ページ以降に掲載する。

\*) オープンアクセスとは、「学術論文に対して誰もがインターネットを介して無料でアクセスして利用できるようにすること（京都大学図書館機構 HP より）」である。

#### ○ 広島大学水沼正樹先生研究成果公表論文

Horikawa M, Fukuyama M, Antebi A, Mizunuma M(2024): “Regulatory mechanism of cold-inducible diapause in *Caenorhabditis elegans”* **Nature Communications** 15,573

本論文は、文献検索画面(<https://www.nature.com/articles/s41467-024-5011-8>)のみを紹介する。（ご興味をお持ちの方は各自で入手してください。）



# Green leaf volatile sensory calcium transduction in *Arabidopsis*

Received: 16 January 2023

Accepted: 11 September 2023

Published online: 17 October 2023

 Check for updates

**Yuri Aratani<sup>1,5</sup>, Takuya Uemura<sup>1,5</sup>, Takuma Hagihara<sup>①</sup>, Kenji Matsui<sup>②</sup> & Masatsugu Toyota<sup>③,4</sup>** 

Plants perceive volatile organic compounds (VOCs) released by mechanically or herbivore-damaged neighboring plants and induce various defense responses. Such interplant communication protects plants from environmental threats. However, the spatiotemporal dynamics of VOC sensory transduction in plants remain largely unknown. Using a wide-field real-time imaging method, we visualize an increase in cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  concentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ ) in *Arabidopsis* leaves following exposure to VOCs emitted by injured plants. We identify two green leaf volatiles (GLVs), (*Z*)-3-hexenal (*Z*-3-HAL) and (*E*)-2-hexenal (*E*-2-HAL), which increase  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  in *Arabidopsis*. These volatiles trigger the expression of biotic and abiotic stress-responsive genes in a  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent manner. Tissue-specific high-resolution  $\text{Ca}^{2+}$  imaging and stomatal mutant analysis reveal that  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  increases instantly in guard cells and subsequently in mesophyll cells upon *Z*-3-HAL exposure. These results suggest that GLVs in the atmosphere are rapidly taken up by the inner tissues via stomata, leading to  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  increases and subsequent defense responses in *Arabidopsis* leaves.

Plants emit an array of volatile organic compounds (VOCs), including green leaf volatiles (GLVs), terpenoids, and amino acid derivatives, in response to wounding and herbivore attack<sup>12</sup>. These VOCs exert multiple protective effects, such as directly repelling herbivores and attracting natural enemies of the herbivores<sup>3-5</sup>. Neighboring intact plants perceive these VOCs as danger cues to trigger defense responses<sup>6</sup> or prime themselves to respond to upcoming stresses in a timely manner<sup>7</sup>. Therefore, these VOCs serve as interplant airborne signals. Such interplant interaction mediated by volatile cues is known as plant–plant communication or plant eavesdropping<sup>1</sup>. VOC perception in plants was first reported in the early 1980s. Two individual groups demonstrated that Sitka willow (*Salix sitchensis*) and poplar (*Populus x euramericana*) trees exhibited increased antiherbivore properties when grown near damaged plants<sup>8,9</sup>. Such VOC-mediated interplant signaling has been reported in more than 30 plant species, including lima bean<sup>6</sup>, tobacco<sup>10</sup>, tomato<sup>11</sup>, sagebrush<sup>12</sup>, and *Arabidopsis*<sup>13</sup>.

GLVs, comprising six-carbon (C6) compounds, including alcohols, aldehydes, and esters, are among the most rapidly and abundantly produced VOCs in the plant kingdom, being generated within seconds after wounding<sup>14</sup>. Upon mechanical damage, GLV biosynthesis is immediately initiated by a lipoxygenase (LOX)-mediated dioxygenase reaction on fatty acids to yield fatty acid/lipid hydroperoxides. These derivatives are cleaved to form (*Z*)-3-hexenal (*Z*-3-HAL), a C6 volatile aldehyde, by hydroperoxide lyase (HPL), a key enzyme for GLV formation<sup>14</sup>. *Arabidopsis* accession Col-0 exhibits low GLV production because of a 10-bp deletion in *HPL*<sup>15</sup>. *Z*-3-HAL can be isomerized to (*E*)-2-hexenal (*E*-2-HAL) by an isomerase<sup>16,17</sup>. Alternatively, *Z*-3-HAL is quickly reduced to the C6 alcohol (*Z*)-3-hexenol (*Z*-3-HOL), which can be further converted to (*Z*)-3-hexenyl acetate (*Z*-3-HAC) by an acetyl transferase. GLVs elicit a wide range of defense signals in plants. GLV exposure in plants induces the accumulation of the stress-related phytohormone jasmonic acid (JA)<sup>7</sup> and expression of JA-dependent

<sup>1</sup>Department of Biochemistry and Molecular Biology, Saitama University, Saitama 338-8570, Japan. <sup>2</sup>Graduate School of Sciences and Technology for Innovation, Yamaguchi University, Yamaguchi 753-8515, Japan. <sup>3</sup>Suntory Rising Stars Encouragement Program in Life Sciences (SunRISE), Suntory Foundation for Life Sciences, Kyoto 619-0284, Japan. <sup>4</sup>Department of Botany, University of Wisconsin, Madison, WI 53706, USA. <sup>5</sup>These authors contributed equally: Yuri Aratani, Takuya Uemura. E-mail: [mtoyota@mail.saitama-u.ac.jp](mailto:mtoyota@mail.saitama-u.ac.jp)

defense genes<sup>18</sup> or plants prime themselves for rapid response to subsequent herbivory damage<sup>19</sup>. GLVs also trigger the induction of abiotic stress-related defense genes, including heat- and oxidative stress-responsive genes<sup>20</sup>. Indeed, treating *Arabidopsis* with GLVs induces enhanced heat stress tolerance<sup>21</sup>.

Plant VOC-dependent defense responses are initiated following VOC entry into inner tissues<sup>22</sup>. Exogenous VOC uptake by plants is facilitated during the light period, in which stomata are opened and CO<sub>2</sub> exchange is enhanced<sup>23</sup>. Furthermore, changes in the uptake rate of aldehydes and ketones can be coupled with those of stomatal conductance<sup>24</sup>, suggesting that stomata play a critical role in VOC perception. In tobacco, TOPLESS-like protein, a transcriptional corepressor for JA signaling, was revealed to interact with the sesquiterpene β-caryophyllene<sup>25</sup>. Upon binding to β-caryophyllene, the TOPLESS-like protein-mediated transcriptional suppression of defense-related genes is inhibited, thereby accelerating defense gene expression<sup>25</sup>. However, the molecular mechanisms underlying the perception of VOCs, especially GLVs, are poorly understood.

Cytosolic Ca<sup>2+</sup> plays crucial roles in a wide array of plant stress responses<sup>26,27</sup>. Downstream signaling activation systems via cytosolic calcium ion concentration ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>cyt</sub>) increases have been extensively studied, including the identification of critical components linking stress perception to the formation of Ca<sup>2+</sup> signals, as well as the mechanism of Ca<sup>2+</sup> signal implementation<sup>28</sup>. Using an electrophysiological technique and a Ca<sup>2+</sup>-sensitive fluorescent dye, membrane potential depolarization and [Ca<sup>2+</sup>]<sub>cyt</sub> increases after exposure to several GLVs were observed in tomato leaves<sup>29</sup>. In addition, [Ca<sup>2+</sup>]<sub>cyt</sub> increases were detected in detached *Arabidopsis* leaves upon VOC exposure using a Ca<sup>2+</sup>-sensitive luminescent protein<sup>30</sup>. These findings suggest that Ca<sup>2+</sup> signaling is involved in an early process leading to downstream defense responses. However, little is known about the spatiotemporal dynamics of GLV sensory transduction because of technical limitations in real-time monitoring of GLV-induced Ca<sup>2+</sup> signals in intact living plants.

In this study, we observed that a plant-wide Ca<sup>2+</sup> signature rapidly occurs in response to exposure to VOCs released by damaged plants using transgenic *Arabidopsis* expressing a green fluorescent protein-based Ca<sup>2+</sup> biosensor and a wide-field real-time fluorescence microscope. We found that Z-3-HAL and E-2-HAL elicited rapid increases in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>cyt</sub> in *Arabidopsis* leaves, in which defense responses were activated. Tissue-specific high-resolution Ca<sup>2+</sup> imaging and stomatal mutant analysis also clarified the spatiotemporal dynamics of VOC sensing and signal transduction networks in plants.

## Results

### VOCs released from plants trigger [Ca<sup>2+</sup>]<sub>cyt</sub> increases in *Arabidopsis*

Using transgenic *Arabidopsis* expressing the Ca<sup>2+</sup> biosensor GCaMP3<sup>31</sup>, we observed [Ca<sup>2+</sup>]<sub>cyt</sub> changes in intact plants following exposure to VOCs emitted by damaged plants in real time. We used *Arabidopsis* accession No-0 and tomato as emitter plants because they emit various VOCs, including GLVs, in response to wounding<sup>29,32,33</sup>. First, we monitored [Ca<sup>2+</sup>]<sub>cyt</sub> increases in *Arabidopsis* (receiver) following exposure to VOCs emitted from *Arabidopsis* plants (source of VOCs) fed on by the common cutworm (*Spodoptera litura*; Fig. 1a, b and Supplementary Movie 1). This Ca<sup>2+</sup> signal was rapidly transmitted to all parts of the plant within 20 min (Fig. 1b, c). Similar results were obtained when receiver *Arabidopsis* was exposed to VOCs released by tomato leaves (source of VOCs) consumed by *S. litura* (Fig. 1b, c and Supplementary Movie 2). Further, upon placing either homogenized *Arabidopsis* or tomato leaves (Source of VOCs) near receiver *Arabidopsis* (Fig. 2a), [Ca<sup>2+</sup>]<sub>cyt</sub> increases were observed in several leaves (Fig. 2b, Supplementary Movies 3 and 4). In a time-course analysis of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>cyt</sub> changes in leaf 1 (L1), we found that VOCs emitted by homogenized tomato leaves caused larger signal changes than those emitted by *Arabidopsis*

(Fig. 2c, d). These results suggest that VOCs emitted by damaged *Arabidopsis* and tomato plants caused [Ca<sup>2+</sup>]<sub>cyt</sub> changes in neighboring intact *Arabidopsis* plants.

### Z-3-HAL and E-2-HAL induce [Ca<sup>2+</sup>]<sub>cyt</sub> increases in *Arabidopsis*

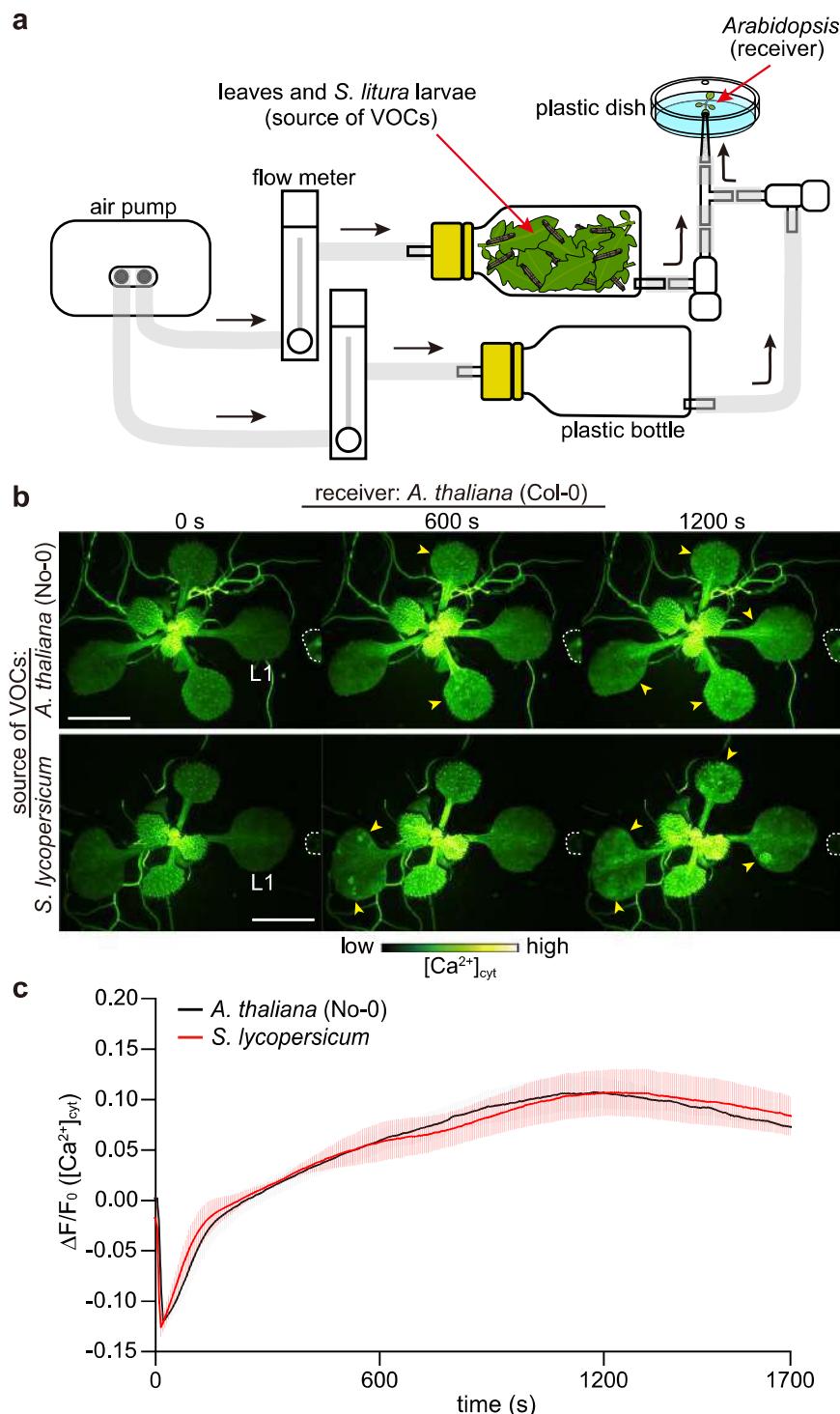
To identify the VOCs responsible for triggering [Ca<sup>2+</sup>]<sub>cyt</sub> changes in *Arabidopsis*, we examined five GLVs [Z-3-HAL, E-2-HAL, n-hexanal (n-HAL), Z-3-HOL, and Z-3-HAC], three terpenes (α-pinene, β-pinene, and β-caryophyllene), and methyl jasmonate (MeJA) because they have been reported to induce defense responses in receiver plants<sup>2,11,29</sup>. We measured time-course changes in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>cyt</sub> in three regions, i.e., “tip,” “base,” and the midpoint between them (“mid”), in L1 of *Arabidopsis* after each VOC solution was placed in close proximity (Fig. 3a). Of these, Z-3-HAL immediately increased [Ca<sup>2+</sup>]<sub>cyt</sub> at the tip within 30 s (Fig. 3b, c and Supplementary Movie 5). Subsequently, the signal was propagated to the mid and base regions within 1 and 2 min, respectively, and it persisted for over 15 min. Although exposing *Arabidopsis* to E-2-HAL also caused a [Ca<sup>2+</sup>]<sub>cyt</sub> increase, the increase was weaker and slower than that induced by Z-3-HAL (Fig. 3b-d and Supplementary Movie 6). By measuring the velocities of Z-3-HAL- and E-2-HAL-induced Ca<sup>2+</sup> transmission, we revealed that the signal transmission induced by Z-3-HAL (0.24–0.30 mm/s; N=10) was faster than that induced by E-2-HAL (0.01–0.02 mm/s; N=10; Fig. 3e). In contrast, no [Ca<sup>2+</sup>]<sub>cyt</sub> increases were observed in leaves exposed to other VOCs (Fig. 3f). These results indicate that Z-3-HAL and E-2-HAL are key triggers of rapid [Ca<sup>2+</sup>]<sub>cyt</sub> increases in *Arabidopsis*. Based on these observations, we focused on Z-3-HAL and E-2-HAL in subsequent analyses.

To confirm that GLVs induce [Ca<sup>2+</sup>]<sub>cyt</sub> increases upon exposure to VOCs emitted by homogenized leaves (Fig. 2), we monitored [Ca<sup>2+</sup>]<sub>cyt</sub> changes in leaves following exposure to VOCs emitted by homogenized *Arabidopsis* that harbors inactive HPL and emits little GLVs<sup>34</sup>. VOCs emitted by homogenized *Arabidopsis* carrying Col-0-derived HPL (*hpl* mutant) did not induce Ca<sup>2+</sup> signals in receiver leaves (Supplementary Fig. 1). Using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and MonoTrap RGPS TD, which is a high-quality adsorbent, we further analyzed the VOC components rapidly produced by homogenized tomato and *Arabidopsis* leaves. Tomato leaves emitted significantly higher amounts of Z-3-HAL and E-2-HAL than wild-type (WT) *Arabidopsis* leaves upon homogenization (Supplementary Fig. 2). Moreover, the levels of these compounds emitted by homogenized *hpl* leaves were remarkably low (<25% of that emitted by WT leaves; Supplementary Fig. 2), consistent with the results of Ca<sup>2+</sup> signature levels. Altogether, these results suggest that interplant airborne signaling that induces [Ca<sup>2+</sup>]<sub>cyt</sub> changes is dependent on HPL-mediated GLV formation in *Arabidopsis*.

### Z-3-HAL and E-2-HAL elicit electrical signals and defense gene expression

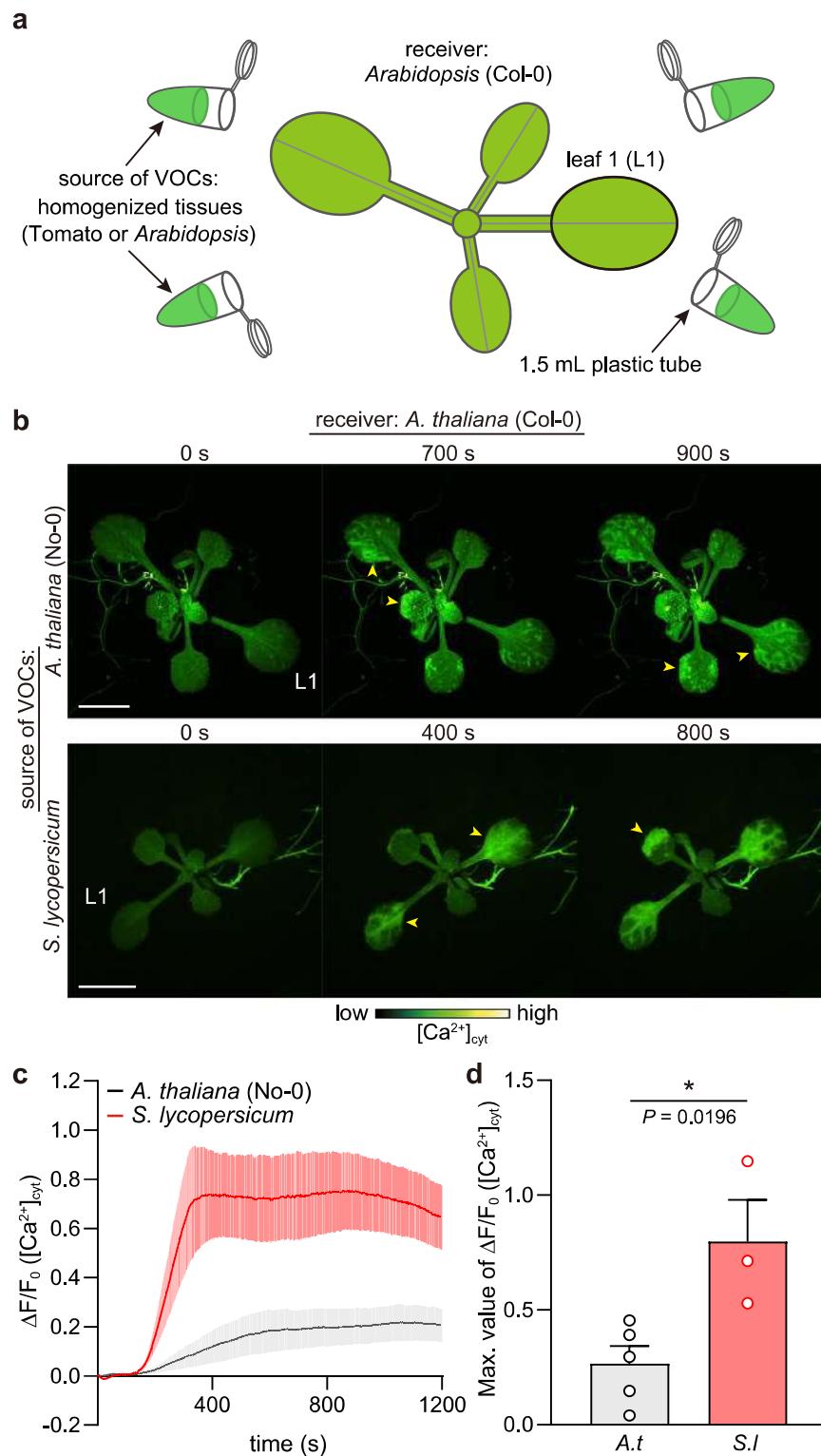
Because changes in the membrane potential upon GLV exposure were observed in tomato leaves<sup>29</sup>, we simultaneously recorded the changes in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>cyt</sub> and the leaf surface potential upon C6 aldehyde exposure in *Arabidopsis*. Z-3-HAL and E-2-HAL exposure in *Arabidopsis* leaves resulted in rapid changes in the leaf surface potential, which is spatiotemporally coupled with changes in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>cyt</sub> (Fig. 4a-d). Interestingly, detailed analysis of the timing of the initial detectable signal changes revealed that the surface potential change significantly preceded the onset of the Ca<sup>2+</sup> signal in the plant GLV sensory transduction system (Fig. 4e).

We next examined the accumulation of defense-related gene transcripts after Z-3-HAL and E-2-HAL exposure. Expression of the heat and oxidative stress response marker genes *HSP90.1* and *ZAT12* increased in leaves after 30 and 60 min of Z-3-HAL or E-2-HAL exposure (Fig. 4f). Similarly, JA-related genes, such as *OPR3* and *JAZ7*, were upregulated by these C6 aldehydes (Fig. 4f). Furthermore, we used a pharmacological approach to assess the role of GLV-induced [Ca<sup>2+</sup>]<sub>cyt</sub>



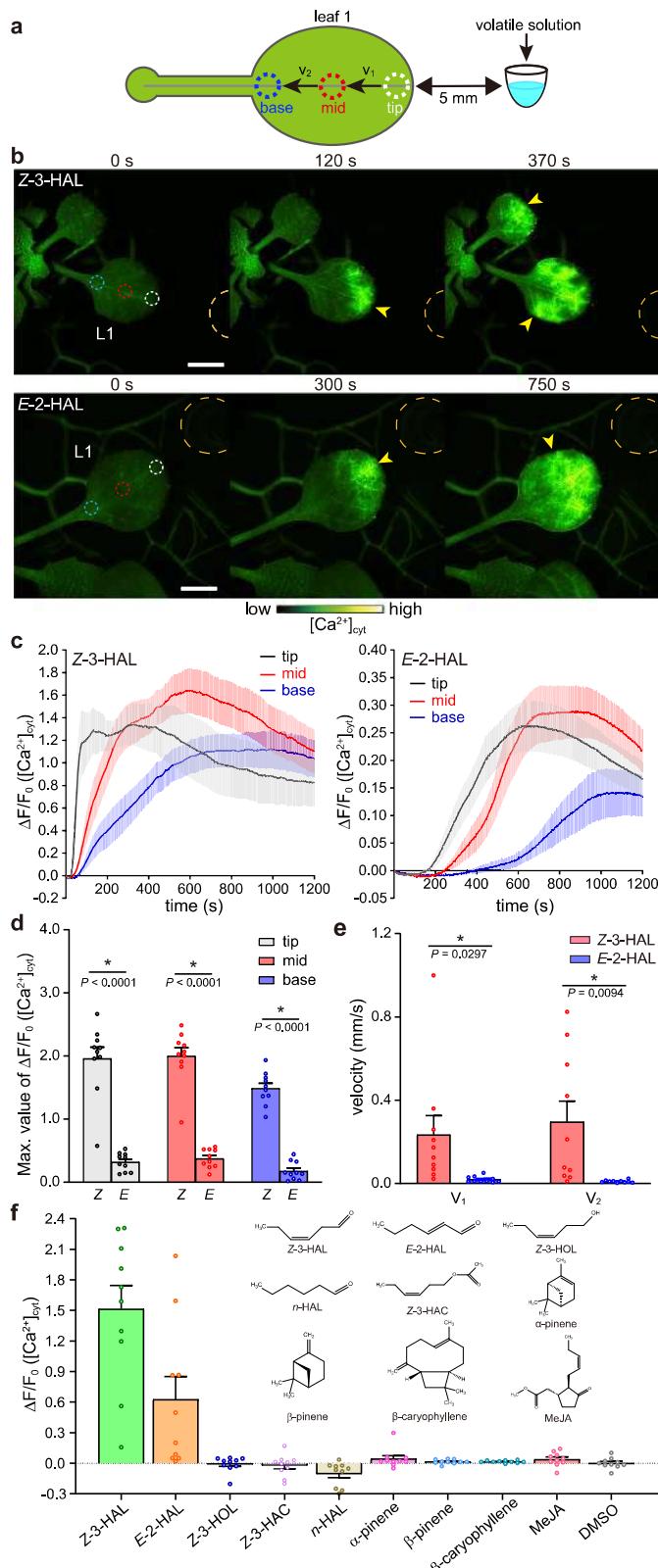
**Fig. 1 | Exposure to VOCs emitted by leaves consumed by the herbivore *S. litura* induces  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  increases in receiver *Arabidopsis* leaves.** **a** The experimental setup for  $Ca^{2+}$  imaging in *Arabidopsis* (receiver) upon exposure to VOCs emitted by leaves consumed by *S. litura* larvae is schematically illustrated. Prior to the experiment, the receiver *Arabidopsis* in a plastic dish was acclimated by directing airflow from an empty plastic bottle for 10 min, allowing its adaptation to the experimental conditions. Subsequently, receiver *Arabidopsis* was exposed to VOCs emitted from a plastic bottle containing *S. litura* larvae and either *Arabidopsis* or tomato leaves (source of VOCs) by

connecting the bottle and manipulating the valve. The black arrows indicate the direction of airflow. **b** Changes in  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  (yellow arrowheads) in *Arabidopsis* expressing GCAMP3 in response to VOCs released from *Arabidopsis* (upper) and tomato (*Solanum lycopersicum* cv. Minicarol) leaves (below) consumed by *S. litura* larvae. White dashed lines indicate the position of the tip of the tube from where the airflow emerges. Scale bar, 5 mm. **c** Quantification of  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  signatures in leaf 1 (L1). Error bars, mean  $\pm$  standard error (SE).  $N = 4$  and 5 biologically independent samples for *A. thaliana* and *S. lycopersicum*, respectively.



**Fig. 2 | Exposure to VOCs emitted by homogenized leaves induces  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  increases in receiver *Arabidopsis* leaves.** **a** The experimental setup for  $Ca^{2+}$  imaging in *Arabidopsis* (receiver) upon exposure to VOCs from homogenized *Arabidopsis* or tomato leaves (source of VOCs) is schematically illustrated. In total, 10 g of *Arabidopsis* leaves or 5 g of tomato leaves was homogenized with liquid nitrogen using a mortar and pestle. The resulting homogenized tissues were immediately transferred to 1.5-mL plastic tubes. Subsequently,  $Ca^{2+}$  imaging was initiated by placing the tubes in close proximity to receiver *Arabidopsis*. **b** Changes in  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  (yellow arrowheads) in *Arabidopsis* expressing GCaMP3 after exposure to VOCs

emitted by homogenized *Arabidopsis* (upper) and tomato (*Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom) leaves (lower). Scale bar, 5 mm. **c** Quantification of  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  signatures in L1. Error bars, mean  $\pm$  SE.  $N=5$  and 3 biologically independent samples for *A. thaliana* and *S. lycopersicum*, respectively. **d** Comparison of the maximal  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  changes detected in receiver *Arabidopsis* upon exposure to VOCs emitted by homogenized *Arabidopsis* (*A.t*) or tomato (*S.l*). An asterisk denotes statistically significant differences based on two-tailed Student's *t*-test (\*,  $P < 0.05$ ). Error bars, mean  $\pm$  SE.  $N=5$  and 3 biologically independent samples for *A. thaliana* and *S. lycopersicum*, respectively.



**Fig. 3 | Z-3-HAL and E-2-HAL trigger  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  increases in *Arabidopsis*.** **a** Diagram presenting an *Arabidopsis* leaf and the regions of interest (ROIs) used to analyze  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  changes and velocities ( $V_1$  and  $V_2$ ). Ten microliters of each chemical solution were applied to a plastic tube placed 5 mm from the tip region of *Arabidopsis* leaf 1 (L1).  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  changes at each point (tip, mid, and base) were analyzed over time. **b** Time-course changes in  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  (yellow arrowheads) in the L1 of *Arabidopsis* after applying Z-3-HAL (upper) and E-2-HAL (lower) at a distance of 5 mm from the tip of L1. The chemical solution was applied into a plastic tube, indicated by an orange dashed line (0 s). Dashed white, red, and blue circles indicate the position of the tip, mid, and base regions, respectively. Scale bar, 2.5 mm. **c** Quantification of the  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  signature in the tip, mid, and base regions induced by Z-3-HAL (left) and E-2-HAL (right). Error bars, mean  $\pm$  SE.  $N=10$  biologically independent samples. **d** Comparison of the maximal  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  changes detected in each ROI upon exposure to Z-3-HAL and E-2-HAL. Error bars, mean  $\pm$  SE.  $N=10$  biologically independent samples. An asterisk denotes statistically significant differences based on two-tailed Student's *t* test (\*,  $P < 0.05$ ). **e** Velocities ( $mm/s$ ) of the  $Ca^{2+}$  signals transmitted between the tip and mid regions ( $V_1$ ) and between the mid and base regions ( $V_2$ ) induced by Z-3-HAL and E-2-HAL were analyzed. Error bars, mean  $\pm$  SE.  $N=10$  biologically independent samples. An asterisk denotes statistically significant differences based on two-tailed Student's *t* test (\*,  $P < 0.05$ ). **f** Screening of VOCs that elicit  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  increases in *Arabidopsis*.  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  signatures in the tip region of L1 after 400 s of volatile solution treatment were analyzed. Error bars, mean  $\pm$  SE.  $N=10$  biologically independent samples.

period of 24 h with a liquid medium lacking  $LaCl_3$  and EGTA, we observed approximately 65–95% recovery of the  $Ca^{2+}$  signal at 500 s compared with that in Mock-pretreated *Arabidopsis* (Supplementary Fig. 3a, c). Therefore, the GLV response in plants pretreated with the reagents is reversible, pharmacologically suggesting that these chemicals can block  $Ca^{2+}$  signals without drastically affecting the plant cells themselves. Altogether, these results indicate that  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  increases are required for the induction of transcriptional changes related to defense responses in plants.

#### Z-3-HAL induces local $Ca^{2+}$ signals in a concentration-dependent manner

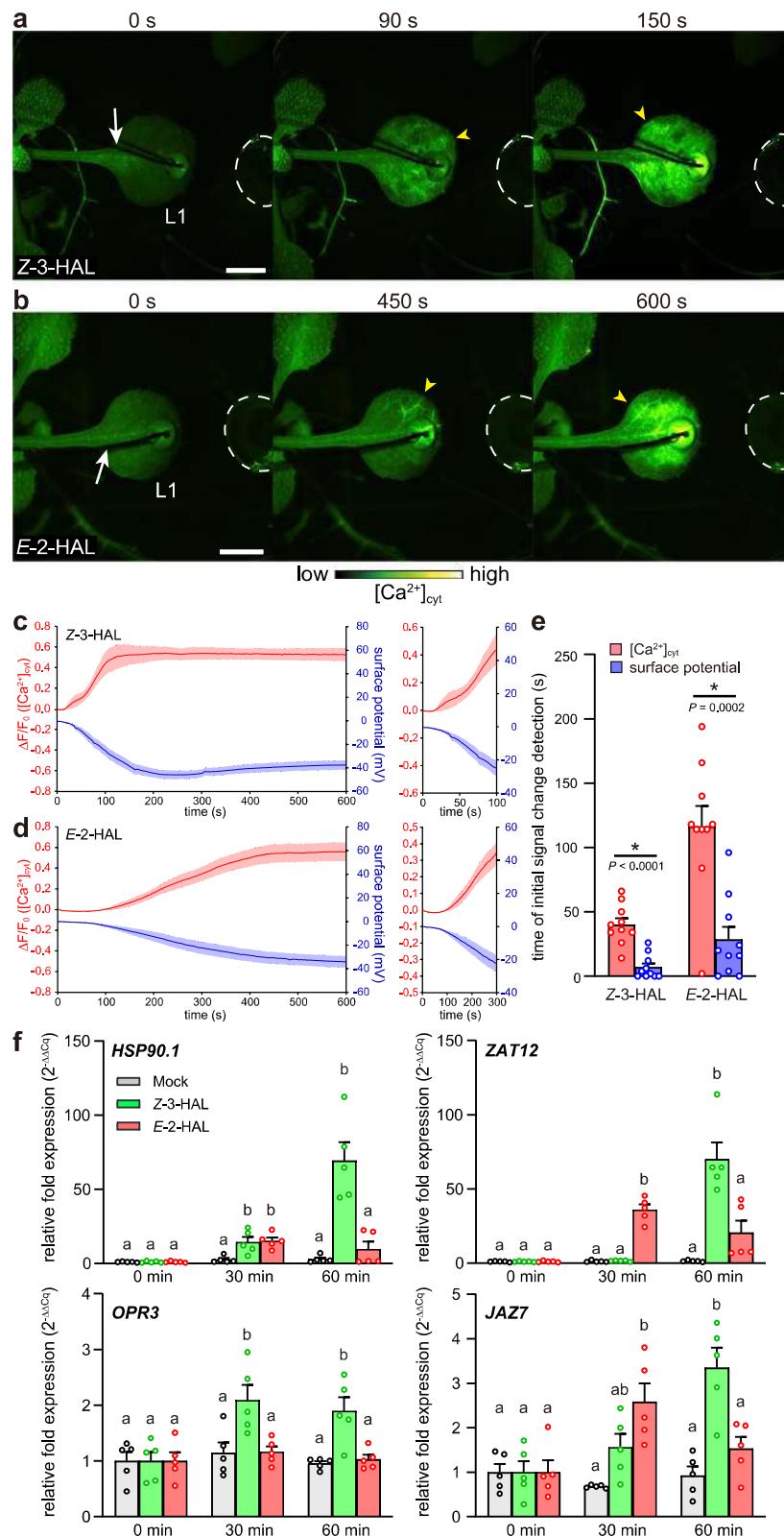
To gain further insights into the physiological properties of C6 aldehydes as signaling molecules, we examined the concentration dependency of  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  increases induced by Z-3-HAL. Upon exposure to lower Z-3-HAL concentrations, concentration-dependent decreases of  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  responses were observed (Fig. 5a, b, and Supplementary Fig. 4). We quantified the amount of Z-3-HAL released from Z-3-HAL solution under this experimental condition. Z-3-HAL was adsorbed by adsorbents placed at a distance of 5 mm from the 0.03 M solution. Z-3-HAL adsorption reached saturation within 1 min (Supplementary Fig. 5), and 3.85 nmol Z-3-HAL was adsorbed over 30 s. Considering the volume of the adsorbents (58  $\mu$ L), it can be estimated that the local concentration of Z-3-HAL at a distance of 5 mm from the 0.03 M solution was 0.07 mM. Based on this finding, L1 in receiver *Arabidopsis* was exposed to approximately 6.42–385 nmol (0.1–6.7 mM) Z-3-HAL over 30 s following exposure to 0.05–3.0 M Z-3-HAL solutions (Fig. 5a).

As  $Ca^{2+}$  has been proposed to act as a long-distance signal traveling to systemic undamaged parts to activate defense responses at a whole-plant level in other stress responses<sup>31,35</sup>, we investigated whether Z-3-HAL triggers long-distance intracellular  $Ca^{2+}$  signal propagation. L1 was spatially isolated from other parts of the plant (Fig. 5c), ensuring that only L1 was exposed to Z-3-HAL. Exposure of L1 to Z-3-HAL caused a local  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  increase; however,  $Ca^{2+}$  signal propagation to distal unstimulated parts (L3) was not observed (Fig. 5d–f and Supplementary Movie 7). These results indicate that Z-3-HAL elicits  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  increases locally following direct exposure but not long-distance  $Ca^{2+}$  signals traveling toward systemic leaves.

#### GLVs are rapidly perceived by guard and mesophyll cells

We generated *Arabidopsis* expressing GCAMP3 driven by tissue-specific promoters, such as *GC1*, *RBCS1A*, *SULTR2;2*, and *ATML1*, to selectively

increases in triggering transcript accumulation. Pretreating *Arabidopsis* seedlings with a  $Ca^{2+}$  channel blocker ( $LaCl_3$ ) or calcium chelator (EGTA) prevented both  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  increases and marker gene expression (Supplementary Fig. 3). Furthermore, we conducted the washout assay to evaluate the reversibility of the  $Ca^{2+}$  signals in *Arabidopsis*, allowing the assessment of any potential negative effects of these pharmacological reagents on plant cell viability. After an additional incubation



express GCaMP3 in guard<sup>36</sup>, mesophyll<sup>37</sup>, vasculature<sup>38</sup>, and epidermal cells<sup>39</sup>, respectively. These transgenic lines enable the visualization of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>cyt</sub> changes specifically occurring in each tissue, thereby aiding in the understanding of the spatiotemporal patterns of GLV-induced responses. Upon Z-3-HAL exposure, [Ca<sup>2+</sup>]<sub>cyt</sub> increased rapidly in the tip region of *pGCI::GCaMP3* and *pRBCS1A::GCaMP3* leaves within 40 s, whereas it increased gradually in *pSULTR2;2::GCaMP3* and

*pATML1::GCaMP3* leaves (Fig. 6 and Supplementary Movies 8–11). Quantitative analysis of the timing of signal increases revealed that [Ca<sup>2+</sup>]<sub>cyt</sub> first increased in *pGCI::GCaMP3* and *pRBCS1A::GCaMP3* within 1 min (Fig. 6f, g). Interestingly, *pSULTR2;2::GCaMP3* and *pATML1::GCaMP3* responded slowly to Z-3-HAL (Fig. 6f, g).

To better understand GLV propagation pathways, we observed [Ca<sup>2+</sup>]<sub>cyt</sub> changes at the cellular level using an upright confocal laser

**Fig. 4 | Z-3-HAL and E-2-HAL trigger the leaf surface potential changes and defense-related gene expression in *Arabidopsis*.** **a, b** Simultaneous recording of changes in the leaf surface potential and  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  (yellow arrowheads) in the tip region of L1 after the application of Z-3-HAL (**a**) and E-2-HAL (**b**) solutions 5 mm from the tip of L1. The chemical solution was applied in a plastic tube indicated by a white dashed line (0 s). The white arrow indicates the recording electrode. Scale bar, 2.5 mm. **c, d** Quantification of the leaf surface potential and  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  signatures induced by Z-3-HAL (**c**) and E-2-HAL (**d**). An enlarged graph is presented on the right. Error bars, mean  $\pm$  SE. N = 10 biologically independent samples.

**e** Comparison of the time points at which the change in the leaf surface potential

and  $Ca^{2+}$  signal was detected. The change in signal used to measure velocity was defined as an increase or a decrease to above 2 standard deviation (SD) of the pre-stimulation levels. An asterisk denotes a significant difference based on two-tailed Student's t-test (\*,  $P < 0.05$ ). Error bars, mean  $\pm$  SE. N = 10 replicates per line.

**f** Transcript levels of *HSP90.1*, *ZAT12*, *OPR3*, and *JAZ7* in L1 of *Arabidopsis* at 30 and 60 min after treatment with Z-3-HAL, E-2-HAL, or DMSO (Mock). *ACT8* was used as an internal reference for standardization. Error bars, mean  $\pm$  SE. N = 5. Different letters denote significant differences based on one-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test ( $P < 0.05$ ).

scanning microscope (Fig. 7a–c). A rapid  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  increase was first observed in guard cells (*pGC1::GCaMP3*) within 1 min of Z-3-HAL exposure (Fig. 7d, g, h, and Supplementary Movie 12). An increase in  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  was detected earlier in mesophyll cells (*pRBCS1A::GCaMP3*) than in epidermal cells (*pATML1::GCaMP3*) (Fig. 7e–h and Supplementary Movies 13–14). These observations were consistent with the results obtained using *Arabidopsis* expressing GCaMP3 driven by the 3SS promoter (Supplementary Fig. 6 and Movie 15). Based on these findings, we hypothesized that plant GLV sensory transduction could be initiated by GLV flux into inner tissues via stomata, resulting in subsequent defense signaling activation.

### Stomata play a critical role in rapid Z-3-HAL perception

To examine the function of stomata in rapid GLV sensory transduction, we used the phytohormone abscisic acid (ABA) to induce stomatal closure<sup>40</sup>, as well as stomatal mutants exhibiting abnormal stomatal movement phenotypes<sup>41–43</sup>. Pretreatment of *Arabidopsis* WT leaves with ABA resulted in stomatal closure (Supplementary Fig. 7), and the Z-3-HAL-induced increase in  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  was delayed compared with that in leaves pretreated with a stomatal opening buffer solution (Mock, Fig. 8). Loss-of-function mutants of *SLOW ANION CHANNEL-ASSOCIATED 1* (*slac1*) and *OPEN STOMATA 1* (*ost1*) exhibit impaired stomatal closure in the presence of ABA<sup>41,42</sup> (Supplementary Fig. 7). Z-3-HAL-induced  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  signatures in ABA-treated *slac1-2* and *ost1-3* mutants expressing GCaMP3 driven by the 3SS promoter were similar to those in Mock-treated leaves (Fig. 8). Moreover, a critical role of stomata in rapid Z-3-HAL-induced electrical signaling was confirmed via the time-course analysis of leaf surface potential changes using ABA-pretreated leaves (Supplementary Fig. 8). These results support our hypothesis that GLV uptake from the atmosphere into tissues via stomata is the main pathway of rapid GLV sensory transduction in plants, which in turn activates plant defense responses.

## Discussion

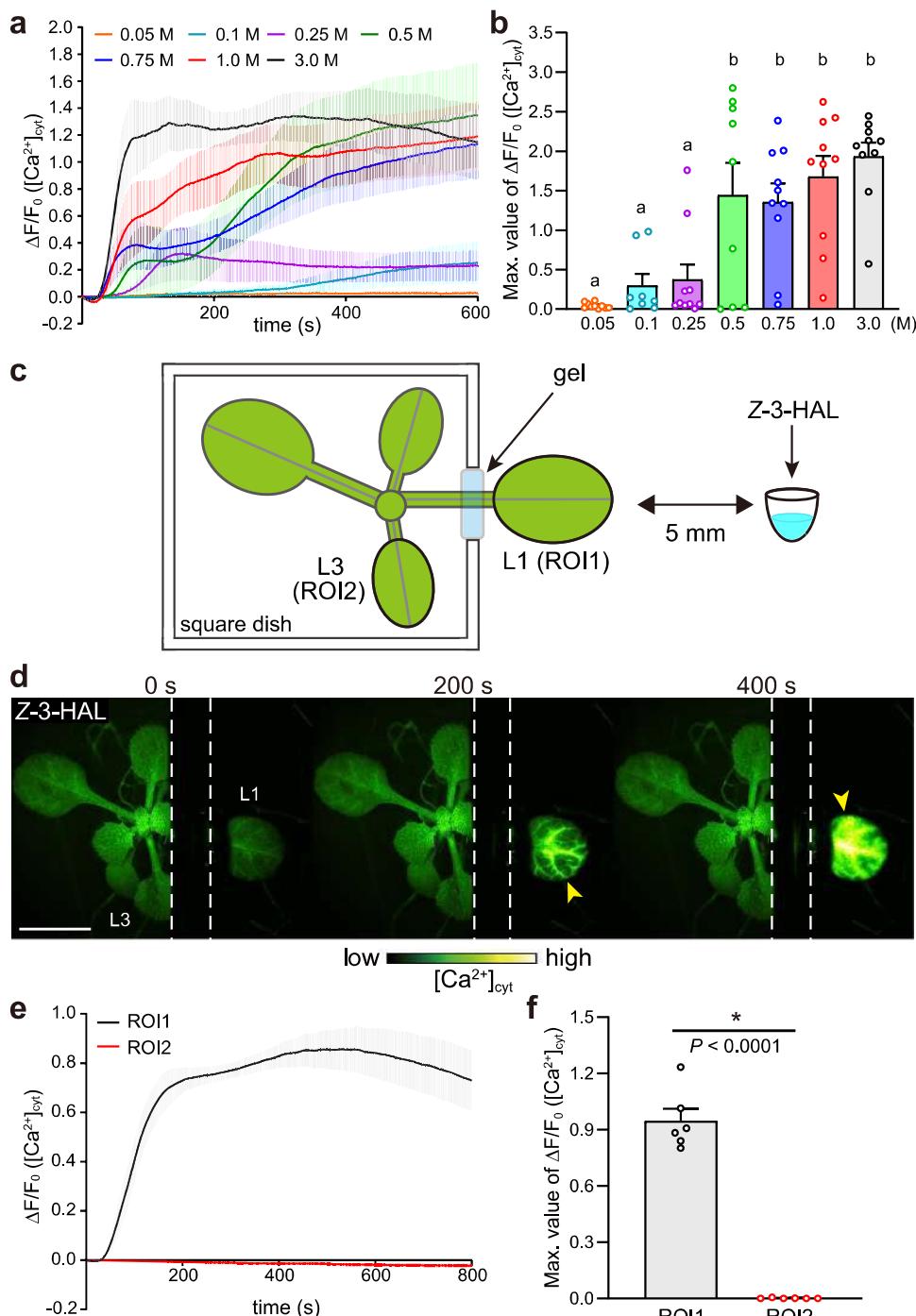
We visualized  $Ca^{2+}$  signal transduction in intact *Arabidopsis* plants exposed to VOCs emitted by mechanically- and herbivore-damaged plants (Figs. 1 and 2) and found that Z-3-HAL and E-2-HAL function as airborne signaling molecules triggering  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  increases, electrical signals, and transcriptional changes in *Arabidopsis* leaves (Figs. 3, 4). Since VOC components other than these two C6 aldehydes were unable to elicit  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  changes in *Arabidopsis* (Fig. 3f), the aldehyde moiety in their structures appeared necessary for activating  $[Ca^{2+}]_{cyt}$ -based defense signaling. E-2-HAL containing an  $\alpha,\beta$ -unsaturated carbonyl moiety is a reactive electrophile species that causes cell damage because of its ability to form adducts with nucleophiles<sup>44</sup>. Z-3-HAL, which has a  $\beta,\gamma$ -unsaturated carbonyl group, exerts physiological effects on various organisms<sup>14,20</sup>. Surprisingly, n-HAL and Z-3-HAC failed to trigger  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  increases (Fig. 3f), whereas  $Ca^{2+}$  response to Z-3-HAC exposure was previously reported in tomatoes<sup>29</sup>. These findings suggest that plants possess species-specific sophisticated VOC recognition systems in addition to a mechanism capable of recognizing structural differences among GLV components (such as specialized receptor proteins)<sup>12,45</sup>. Indeed, some volatile-specific receptors in plants have been isolated, including those for ethylene<sup>46</sup> and  $\beta$ -caryophyllene<sup>25</sup>.

In addition to the volatile-specific perception system, VOC uptake pathways involving metabolic processes have been proposed to act as other primary pathways for downstream VOC signaling activation<sup>22</sup>. Z-3-HOL accumulated in tomato cells is glycosylated, leading to enhanced resistance against *S. litura* via the insecticidal effects<sup>47</sup>. However, considering that neither Z-3-HOL nor  $\beta$ -caryophyllene triggered  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  changes (Fig. 3f), plants might be equipped with specialized VOC perception systems that activate downstream signaling independently at different levels (for example,  $Ca^{2+}$  signals, transcriptional changes, and metabolism).

The C6 aldehyde group can prime/induce plant defense responses to abiotic stresses<sup>20</sup>. For example, heat and photooxidative stresses elicit enhanced E-2-HAL production in *Arabidopsis*, tomatoes<sup>21,48</sup>, and tobacco<sup>49</sup>. GLV-exposed *Arabidopsis* seedlings exhibit enhanced heat tolerance<sup>21</sup>. In this study, oxidative stress- and heat-responsive genes were upregulated upon GLV exposure in a  $Ca^{2+}$ -dependent manner (Fig. 4f and Supplementary Fig. 3b). Although the detailed molecular mechanism underlying stress-related signaling activation upon GLV exposure remains unclear,  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  increases could mediate both stress-responsive gene expression<sup>31,50</sup> and immediate GLV formation via  $Ca^{2+}$  binding to the PLAT domain in LOX, a key enzyme for GLV biosynthesis<sup>51</sup>. Different experimental approaches, such as transcriptome analysis, could provide new insights into the mechanism underlying enhanced stress tolerance through GLV-induced  $Ca^{2+}$  signals.

The local concentration of Z-3-HAL at a distance of 5 mm from the 3.0 M solution, which consistently induced stable  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  increases, was estimated at 6.7 mM (Supplementary Fig. 5). Similarly, 381 nmol Z-3-HAL was detected within 10 min of exposure to 0.5 g homogenized *Arabidopsis* leaf tissues (Supplementary Fig. 2), indicating that receiver *Arabidopsis* is exposed to approximately 6.6 mM Z-3-HAL in 30 s. Although the homogenization of *Arabidopsis* leaf tissues might be unrealistic in nature, these estimations indicate that the concentration of Z-3-HAL solution corresponds to that emitted by plants and that the experimental conditions used in this study are relevant to the potential exposure or emission of Z-3-HAL in a natural context.

Plants possess the ability to efficiently absorb a wide range of surrounding atmospheric VOCs and accumulate them into their tissues. For example, tomato can absorb a significant amount of atmospheric methacrolein, with estimates ranging from 33% to 41% of the total methacrolein content present in the air<sup>52</sup>. The minimum amount of Z-3-HAL required to induce detectable  $Ca^{2+}$  signals was 0.1 M (Fig. 5a). Considering that approximately 12.8 nmol Z-3-HAL was adsorbed by the adsorbents within 30 s of exposure to 0.1 M Z-3-HAL, *Arabidopsis* accumulates approximately 4.2 nmol Z-3-HAL at 33% of the VOC-adsorbing capacity of the adsorbent. Based on the previous calculation<sup>34</sup>, a single injury (7.5  $\mu$ g, 0.05 mm<sup>2</sup>) produces 12.9 and 2.9 pmol Z-3-HAL in tomatoes and *Arabidopsis*, respectively (for detail, see Supplementary Fig. 2 and Methods). If these estimations are accurate, the Z-3-HAL emitted following a single injury is unlikely to induce detectable  $Ca^{2+}$  signals. To induce the release of 12.8 nmol Z-3-HAL (the accumulation of 4.2 nmol Z-3-HAL in *Arabidopsis* leaves) and  $Ca^{2+}$  signals under our experimental conditions, approximately 148.8 (992.3 mm<sup>2</sup>) and 662.1 (4409.0 mm<sup>2</sup>) mg of leaves need to be injured in



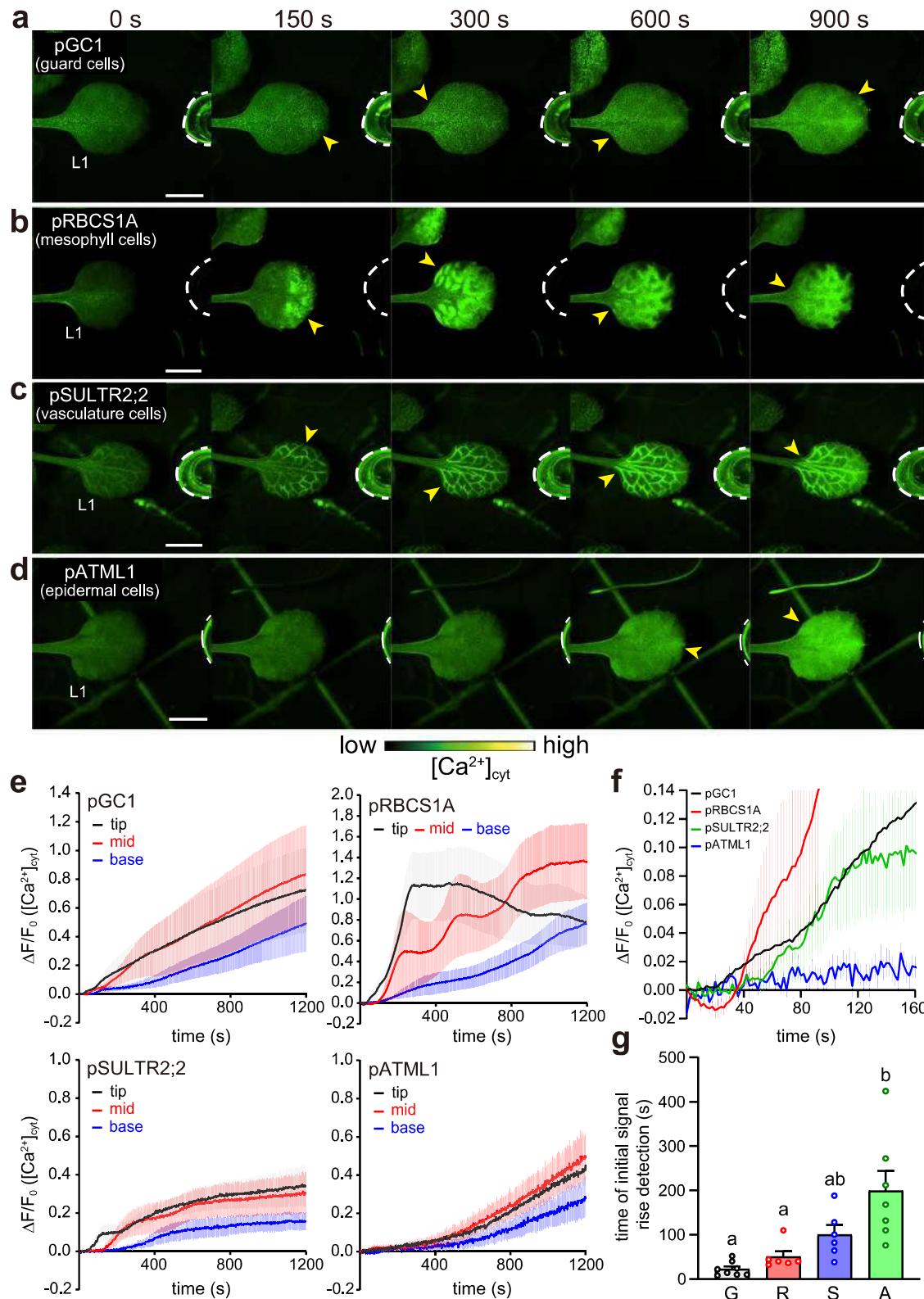
**Fig. 5 | Z-3-HAL-induced  $\text{Ca}^{2+}$  signature occurs locally and in a concentration-dependent manner.** **a** Concentration dependency of the effects of Z-3-HAL activity on the  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  signature after exposure. Error bars, mean  $\pm$  SE.  $N=10$  biologically independent samples, except for 0.1 M ( $N=8$ ) and 0.5 M ( $N=9$ ). **b** Comparison of the maximal  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  changes detected in receiver *Arabidopsis* upon exposure to each concentration of Z-3-HAL. Error bars, mean  $\pm$  SE.  $N=10$  biologically independent samples, except for 0.1 M ( $N=8$ ) and 0.5 M ( $N=9$ ). Different letters denote significant differences based on one-way ANOVA followed by Tukey's honestly significant difference post hoc test ( $P<0.05$ ). **c** Diagram presenting *Arabidopsis* and the ROIs used to analyze  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  changes.

L1 was spatially segregated using a square dish. ROI1 and ROI2 were set at local (L1) and systemic (L3) regions, respectively. **d** The time-course changes in  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  (yellow arrowheads) in L1 and L3 leaves after exposing L1 to Z-3-HAL. The dashed outline indicates the position of the square dish. Scale bar, 5 mm. **e** Quantification of  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  signatures in L1 (ROI1) and L3 (ROI2). Error bars, mean  $\pm$  SE.  $N=6$  biologically independent samples. **f** Comparison of the maximal  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  changes detected in L1 (ROI1) and L3 (ROI2) of receiver *Arabidopsis* upon exposure to 3.0 M Z-3-HAL. Error bars, mean  $\pm$  SE.  $N=6$  biologically independent samples. An asterisk denotes statistically significant differences based on two-tailed Student's *t* test (\*,  $P<0.05$ ).

tomatoes and *Arabidopsis*, respectively. This size of agricultural damage might be realistic in nature<sup>53</sup>.

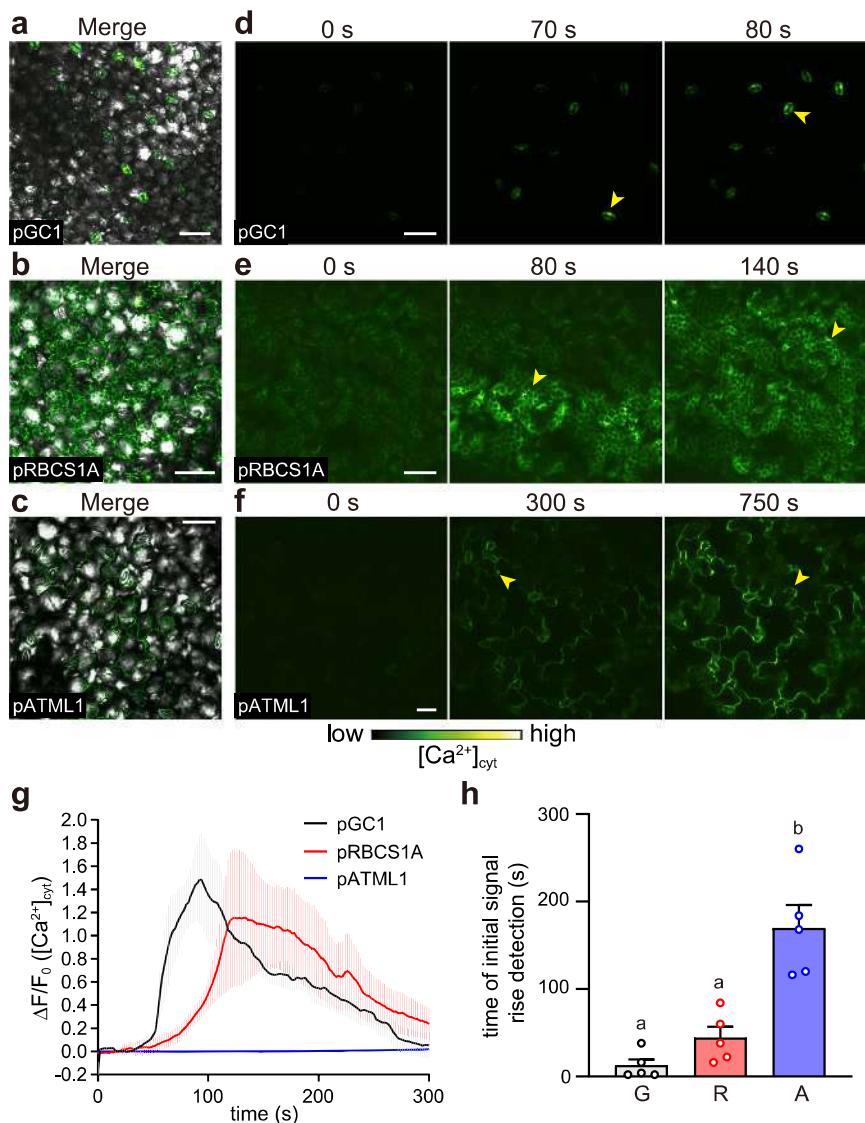
Although it is unlikely that plants are continuously exposed to high GLV concentrations (e.g., 3.0 M Z-3-HAL) under natural

conditions, it should be noted that GLVs do not easily diffuse because of their high molecular weight, which may lead to high local GLV concentrations around damaged plants<sup>54,55</sup>. Considering these findings, the possibility that plant cells and tissues are temporarily exposed



**Fig. 6 |**  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  increases in guard, mesophyll, and vasculature cells, and subsequently in epidermal cells upon Z-3-HAL exposure. **a-d** Snapshots of  $\text{Ca}^{2+}$  changes (yellow arrowheads) in L1 of *Arabidopsis* expressing GCaMP3 driven by the tissue-specific promoters G1 (a), RBCS1A (b), SULTR2;2 (c), and ATML1 (d) after Z-3-HAL exposure. Scale bar, 2.5 mm. **e** Quantification of  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  signatures in the tip, mid, and base regions. Error bars, mean  $\pm$  SE.  $N=6$  biologically independent samples for pRBCS1A and pSULTR2;2;  $N=8$  for pGC1 and  $N=7$  for pATML1. **f** Enlarged graph displaying the onset of  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  increases within 160 s in the tip region of each

transgenic line. **g** Comparison of the time points at which the increase in initial  $\text{Ca}^{2+}$  signal was detected in the tip region of L1 of *pGC1:GCaMP3* (G), *pRBCS1A:GCaMP3* (R), *pSULTR2;2:GCaMP3* (S), and *pATML1:GCaMP3* (A), following Z-3-HAL exposure. The increase in signal used to calculate velocity was defined as an increase to above 2 SD of the pre-stimulation levels. Error bars, mean  $\pm$  SE.  $N=6$  biologically independent samples for pRBCS1A and pSULTR2;2;  $N=8$  for pGC1 and  $N=7$  for pATML1. Different letters denote statistically significant differences based on one-way ANOVA followed by Tukey's honestly significant difference post hoc test ( $P < 0.05$ ).



**Fig. 7 | Upright confocal laser scanning microscopy reveals instant Z-3-HAL-induced  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  increases in guard cells, followed by mesophyll cells.**

**a–c** Localization of the GCaMP3 signal for *pGC1::GCaMP3* in guard cells (**a**), for *pRBCS1A::GCaMP3* in mesophyll cells (**b**), and for *pATML1::GCaMP3* in epidermal cells (**c**). The merged GFP signal and bright field images were presented as an overlay. **d–f** Snapshots of  $Ca^{2+}$  changes (yellow arrowheads) of  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  levels in L1 of *pGC1::GCaMP3* (**d**), *pRBCS1A::GCaMP3* (**e**), and *pATML1::GCaMP3* (**f**) after exposure to Z-3-HAL. Scale bar, 50  $\mu$ m. **g** Quantification of the  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  levels in the L1 of

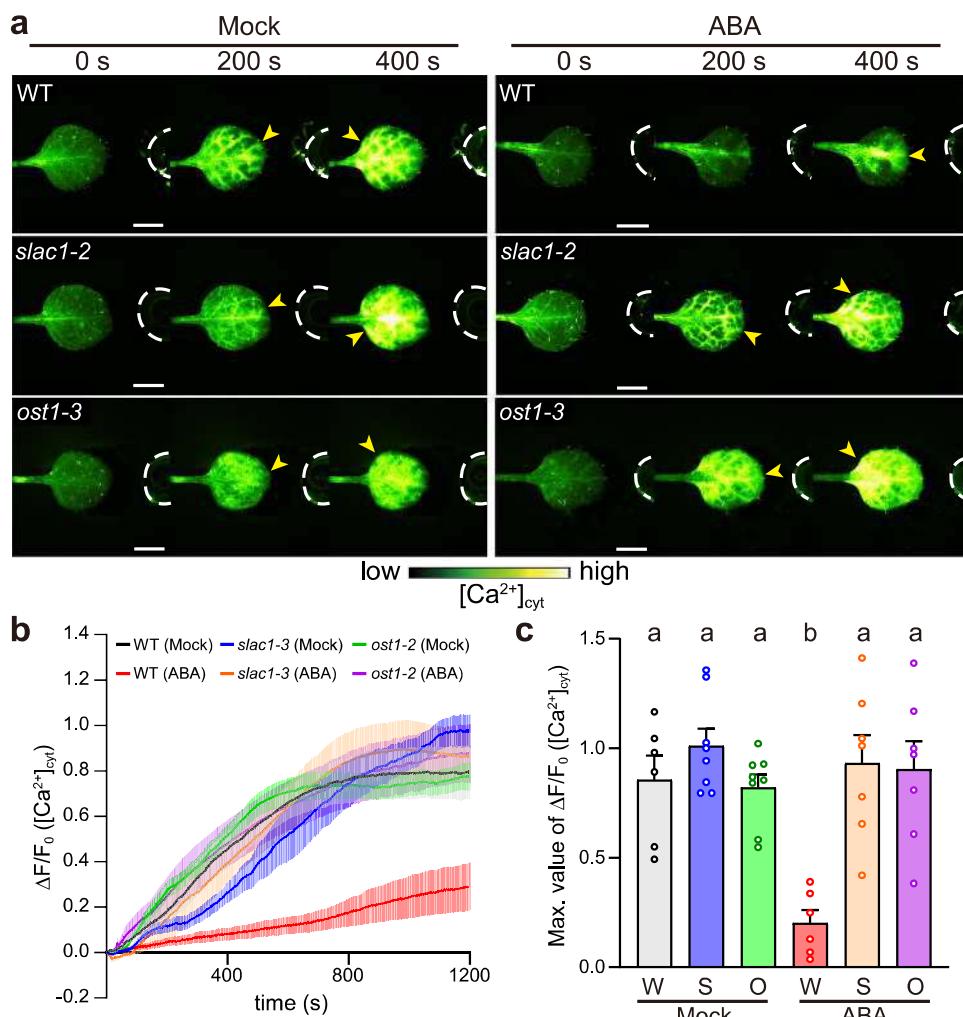
each transgenic line. Error bars, mean  $\pm$  SE.  $N = 5$  biologically independent samples. **h** Comparison of the time points at which the increase in the  $Ca^{2+}$  signal was detected in *pGC1::GCaMP3* (G), *pRBCS1A::GCaMP3* (R), and *pATML1::GCaMP3* (A) following Z-3-HAL exposure. The increase in signal used to calculate velocity was defined as an increase to above 2 SD of the pre-stimulation levels. Error bars, mean  $\pm$  SE.  $N = 5$  biologically independent samples. Different letters denote statistically significant differences based on one-way ANOVA followed by Tukey's honestly significant difference post hoc test ( $P < 0.05$ ).

to high GLV concentrations under specific circumstances (e.g., when receiver plants are in close proximity to disrupted plants capable of emitting numerous GLVs, including *Vigna radiata* and *Momordica charantia*<sup>56</sup>, in response to herbivory in nature) cannot be dismissed. In fact, we detected  $Ca^{2+}$  signals in response to VOCs released from plants consumed by herbivores (Fig. 1). To further clarify this phenomenon, it would be beneficial to employ advanced technologies, such as the real-time detection of atmospheric VOC concentrations, and precisely determine the VOC adsorption capacity and efficiency of plants<sup>57</sup>.

Using real-time  $Ca^{2+}$  imaging combined with pharmacological and genetic approaches, we proposed a model for the spatiotemporal propagation pathways of VOCs in plants (Fig. 9) where stomata play a critical role in perceiving VOC cues. Some studies support our idea of the importance of stomata for VOC uptake, especially for the absorption of atmospheric gases such as  $CO_2$ , and air pollutants<sup>23,58</sup>.

For example, VOC uptake by plant tissues is efficiently facilitated when stomata are opened<sup>23</sup>. Aldehyde compounds can also be absorbed into the leaf interior via stomata<sup>58</sup>. Conversely, the delayed  $Ca^{2+}$  signals in epidermal cells could be explained by the presence of the cuticle, which functions as a permeability barrier. This idea is supported by a previous finding that  $O_3$  deposition in cuticles was negligibly small<sup>59</sup>. Taken together, it is possible that stomata serve as a plant gateway mediating rapid VOC entry into interspaces in tissues.

Two glutamate receptor-like genes (GLRs) that are localized in phloem and xylem contact cells in the vasculature are activated in response to wounds, resulting in the propagation of  $Ca^{2+}$  and electrical signals from the wound site to distant organs<sup>31,60</sup>. Although Z-3-HAL-induced  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  increases were detected in the vasculature tissue (Fig. 6c, e), no  $Ca^{2+}$  signal propagation toward systemic leaves was observed (Fig. 5d). Given that the amplitude and propagation rate of



**Fig. 8 | Stomatal opening plays a crucial role in  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  increases upon Z-3-HAL exposure.** **a** Pretreatment with ABA (20  $\mu M$ ) delayed  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  increases (yellow arrowheads) induced by exposure to Z-3-HAL in WT leaves but not the leaves of the *slac1-2* and *ost1-3* mutants expressing GCaMP3 driven by the 35S promoter. Scale bar, 2.5 mm. **b** Quantification of Z-3-HAL-induced  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  signatures in the whole region of the detached leaf. Error bars, mean  $\pm$  SE.  $N = 6$  biologically independent samples for WT (Mock) and WT (ABA),  $N = 7$  for *slac1-2* (Mock), *slac1-2* (ABA) and *ost1-3* (ABA), and  $N = 8$  for *ost1-3* (Mock). **c** Comparison of the maximal  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  changes detected in the detached leaves of WT (W), *slac1-2* (S), and *ost1-3* (O). Error bars, mean  $\pm$  SE.  $N = 6$  biologically independent samples for WT (Mock) and WT (ABA),  $N = 7$  for *slac1-2* (Mock), *slac1-2* (ABA) and *ost1-3* (ABA), and  $N = 8$  for *ost1-3* (Mock). Different letters denote statistically significant differences based on one-way ANOVA followed by Tukey's honestly significant difference post hoc test ( $P < 0.05$ ).

*ost1-3* (ABA), and  $N = 8$  for *ost1-3* (Mock). **c** Comparison of the maximal  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  changes detected in the detached leaves of WT (W), *slac1-2* (S), and *ost1-3* (O). Error bars, mean  $\pm$  SE.  $N = 6$  biologically independent samples for WT (Mock) and WT (ABA),  $N = 7$  for *slac1-2* (Mock), *slac1-2* (ABA) and *ost1-3* (ABA), and  $N = 8$  for *ost1-3* (Mock). Different letters denote statistically significant differences based on one-way ANOVA followed by Tukey's honestly significant difference post hoc test ( $P < 0.05$ ).

the wound-triggered systemic signals depend on the type and intensity of the stimuli<sup>61</sup>, and the necessity of damaging the main vein of the leaf<sup>62</sup>, GLVs might not activate the key elements required for long-distance signal transmission, such as GLRs, or the local response might not reach the threshold required to allow the  $Ca^{2+}$ /electrical signals to move out of the local leaf. Interestingly, changes in the leaf surface potential preceded changes in  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  upon GLV exposure (Fig. 4e), as systemic electrical signals preceded  $Ca^{2+}$  signals upon wounding<sup>63,64</sup>. Membrane depolarization could be induced by the activation of ion channels, such as  $Cl^-$ -permeable, ROS-sensitive, or ligand-gated channels, followed by  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  increases via  $Ca^{2+}$  influx and efflux through plasma- and endo-membranes, respectively<sup>63,64</sup>.

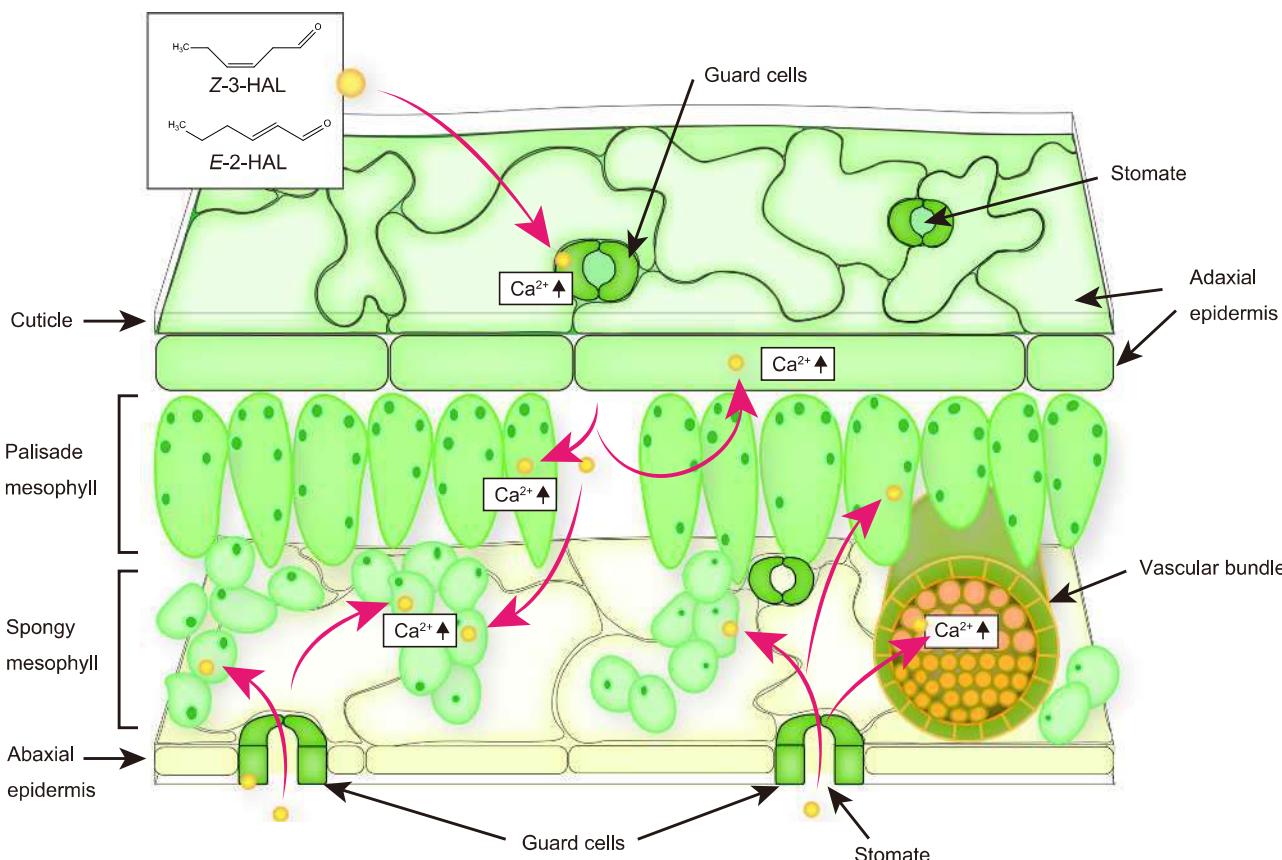
The wide-field real-time imaging approach used in this study provided physiological insights with significantly higher resolution using intact *Arabidopsis*, revealing the details of  $Ca^{2+}$  signals in response to GLVs in a more comprehensive manner. This methodology allowed the assessment of spatial and temporal aspects of GLV perception pathways at the cellular level. Additionally, by integrating real-time imaging with other techniques, we achieved a deeper understanding of the comprehensive orchestration of GLV responses,

including  $Ca^{2+}$  signals and other signaling mechanisms such as electrical signals. This approach can be further extended to investigate VOC signaling networks across plant taxa using mutants that are defective in the putative elements of VOC responses. Furthermore, this  $Ca^{2+}$  imaging method can serve as a robust tool for investigating the molecular basis of airborne plant signaling, both within (e.g., *Arabidopsis* to *Arabidopsis*) and between species (e.g., tomato to *Arabidopsis*) (Figs. 1 and 2).

## Methods

### Plant material and growth condition

The seeds of *Arabidopsis thaliana* (accessions Col-0, No-0 and *hpl1* mutant in the Ler-0 background<sup>34</sup>) were surface-sterilized and sown on sterile Murashige and Skoog (MS) agar medium [1× MS salts, 1% (w/v) sucrose, 0.01% (w/v) myoinositol, 0.05% (w/v) MES, and 0.5% (w/v) gellan gum; pH 5.7 adjusted with 1 N KOH]. After incubation in the dark at 4 °C for 2 days, the plates were placed horizontally at 22 °C in a growth chamber under continuous light (90–100  $\mu mol/m^2/s$ ) for approximately 2 weeks before use. After 2 weeks, *Arabidopsis* leaves were numbered from oldest to youngest<sup>62</sup>. Two-week-old *Arabidopsis*



**Fig. 9 | Volatile C6 aldehyde sensory transduction system in *Arabidopsis*.**

Volatile C6 aldehydes, such as Z-3-HAL and E-2-HAL, in the atmosphere are initially perceived by guard cells, which leads to  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  increases. C6 aldehydes can enter the interspace of leaf tissues via stomata, leading to the subsequent activation of

defense responses in mesophyll and vasculature cells.  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  increases are delayed in epidermal cells because of the presence of physical barriers, such as cuticles.

(accession No-0 and Ler-0) plants were transferred to soil and grown at 22 °C in a growth chamber under short-day conditions (8-h light/16-h dark photoperiod, 90–100  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ) for approximately 2 months before use. Two-week-old (accession Col-0) plants were used for  $\text{Ca}^{2+}$  imaging. Two-month-old plants (accession No-0 and Ler-0) were used for preparation of homogenized leaf tissues and leaves that were subjected to feeding by *S. litura*. Surface-sterilized tomato (*Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom) seeds were incubated overnight at 4 °C and sown on MS agar medium. Two-week-old plants were transferred to soil and grown at 25 °C in a growth chamber under long-day conditions (14-h light/10-h dark photoperiod, 90–100  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ) for approximately 2 months before use. Tomato (*Solanum lycopersicum* cv. Minicarol) seedlings potted in soil were purchased from a home improvement store located in Saitama, Japan. These seedlings were cultivated in a temperature-controlled room under long-day conditions (14-h light/10-h dark photoperiod, 90–180  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ) at 25–29 °C for more than 12 days and then used to prepare leaves that were consumed by *S. litura*.

### Insects

Eggs of *S. litura* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae) were purchased from Sumika Technoservice Co. Ltd. (<https://www.chemtex.co.jp>). The insects were reared on a homemade artificial diet in the laboratory at 25 °C. Fifth-instar *S. litura* larvae were used for  $\text{Ca}^{2+}$  imaging.

### DNA cloning and transformation

For the GCaMP3 constructs used for tissue-specific expression, genomic sequences of the 5' end of the open-reading frames of *GC1* (1716 bp, At1g22690), *RBCS1A* (1976 bp, At1g67090), *SULTR2;2* (2001 bp,

At1g77990), and *ATML1* (3378 bp, At4g21750) were amplified via polymerase chain reaction (PCR) targeting restriction enzyme sites from *Arabidopsis* genomic DNA and used as the promoter sequences. These fragments were digested and inserted into the corresponding sites of the pANI9 vector containing the GCaMP3 and nopaline synthase terminator (NOST) sequence, resulting in construction of the vectors *pGC1::GCaMP3 NOST*, *pRBCS1A::GCaMP3 NOST*, *pSULTR2;2::G-CaMP3 NOST*, and *pATML1::GCaMP3 NOST*. The entire cassettes of GCaMP3 sequences driven by tissue-specific promoters were isolated via *NotI* digestion and cloned into the *NotI* site of the plant binary vector pBIN42. All binary vectors were transformed into the *Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101 via electroporation. *Arabidopsis* plants were transformed using the floral dip method<sup>65</sup>. To establish *Arabidopsis* mutants expressing GCaMP3, the entire cassette of *p35s::GCaMP3 NOST*<sup>31</sup> was transformed into the *slac1-2* and *ost1-3* mutants. The primers used for cloning are detailed in Supplementary Table 1.

### Real-time $[Ca^{2+}]_{cyt}$ imaging

Real-time  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  imaging of the entire plants was performed as described previously<sup>31</sup>. For  $\text{Ca}^{2+}$  imaging at the cellular level, GCaMP3 signals were acquired using an upright confocal laser scanning microscope (A1R, Nikon). GCaMP3 was excited using a 488-nm laser/488-nm dichroic mirror, and fluorescent signals were detected at 510–560 nm using the GaAsP detector of the microscope. NIS-Elements imaging software was used to analyze GCaMP3 signals over time at several regions of interest (ROI). To calculate fractional fluorescence changes ( $\Delta F/F$ ), the following equation was used:  $\Delta F/F = (F - F_0)/F_0$ , where  $F_0$  denotes the average baseline fluorescence determined by

the average of  $F$  over the first 10 frames of the recording before treatment.

### Volatile treatment

$\beta$ -Pinene and  $n$ -HAL were purchased from Wako Pure Chemical Industries, Ltd.  $\alpha$ -pinene and  $\beta$ -caryophyllene were obtained from Tokyo Chemical Industry Co., Ltd. MeJA, E-2-HAL, Z-3-HOL, and Z-3-HAC were purchased from Sigma-Aldrich Co. LLC. Z-3-HAL was obtained from Nihon Zeon Co., Ltd. Each chemical was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) to make a stock solution of 3.0 M. To examine the concentration dependency of the responses, Z-3-HAL was dissolved in DMSO at concentrations of 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, and 1.0 M. A 0.2-ml plastic tube cut with a scissor at a height of 5 mm was placed 5 mm from the tip region of L1, and then 10  $\mu$ l of each volatile solution was applied.

To selectively treat L1 with Z-3-HAL, a hole was created on the side of a square plastic dish with a cutter, and L1 was spatially segregated from other parts of the plant by inserting it into the hole, as described in Fig. 5c. Then, the hole was filled with 0.2% agarose gel, and  $\text{Ca}^{2+}$  imaging was performed.

For treatment with VOCs emitted by homogenized plants, approximately 10 and 5 g of the aboveground parts of 2-month-old *Arabidopsis* and tomato, respectively, were excised with a scissor and homogenized with a pestle in a mortar. Disrupted leaf tissues were immediately transferred to 1.5-mL plastic tubes and placed in close proximity to receiver *Arabidopsis* expressing GCaMP3. Subsequently, the MS agar plate was closed with a clear plastic cover to increase the volatile concentration, and then  $\text{Ca}^{2+}$  imaging was performed.

To facilitate exposure to VOCs emitted from leaves consumed by *S. litura*, we established an experimental setup consisting of two plastic bottles, flow meters (NFM-V-P-A-1, TEKHNE Corp.), and air pump (HD-603, FEDOUR), as shown in Fig. 1a. Briefly, approximately 7 g of the aboveground parts of 2-month-old *Arabidopsis* and tomato plants was excised with scissors. The severed leaves and 50–75 fifth instar *S. litura* larvae were placed inside a plastic bottle (approximately 215 cm<sup>3</sup>). The bottle was sealed with parafilm to prevent VOC leakage and incubated for 30 min. Prior to the experiment, air was pumped into an empty plastic bottle at a rate of approximately 450 mL/min and was directed toward receiver *Arabidopsis* for 10 min through a cotton-filled tip. This step was crucial for facilitating the adaptation of plants to the experimental conditions. Following adaptation, exposure to VOCs emitted by leaves consumed by *S. litura* as well as  $\text{Ca}^{2+}$  imaging was initiated by connecting the bottle and switching the valve. The air was pumped into the bottle at a rate of approximately 200 mL/min.

### Recording of surface potential

Surface potential changes were measured as described previously with minor modifications<sup>66</sup>. Ag/AgCl recording electrodes with a diameter of 0.2 mm were prepared via chloridation with hypochlorous acid and fixed to electrode holders. The recording electrodes were fixed to the tip region of L1 of *Arabidopsis* plants with the application of 5- $\mu$ L droplets of 10 mM KCl. The handmade Ag/AgCl wire with a diameter of 0.5 mm was used as a reference electrode and inserted into the agar growth medium. For measuring surface potential changes, an operational amplifier (Axopatch 200A, Axon Instruments), headstage amplifier (CV-201A headstage, Axon Instruments), digitizer (Digidata 1322A, Axon Instruments), and electrophysiology data acquisition software (Clampex 9.2, Axon Instruments) were used. Simultaneous measurements were performed using the SMZ25 microscope in a Faraday cage. Surface potential changes were sampled at 5 kHz. To compare the timing of the initial signal change with  $\text{Ca}^{2+}$  increases, each data point was subsequently extracted at a reduced frequency of 0.5 Hz. For calculating the surface potential changes ( $\Delta V$ ), the following equation was used:  $\Delta V = V - V_0$ , where  $V$  denotes the potential difference (PD) between the recording and the reference electrodes at a

certain time and  $V_0$  denotes the averaged baseline PD determined by the mean of  $V$  over the first 10 frames of the recording before treatment.

### ABA treatment

L1 of *Arabidopsis* plants was harvested from 2-week-old plants, floated in stomatal opening buffer solution (5 mM MES and 50 mM KCl; pH 6.1 adjusted with 1 N KOH) abaxial side down, and incubated under light (90–100  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ) for 2 h to open the stomata. Subsequently, ABA (20  $\mu$ M) (Sigma-Aldrich) was added to the solution to induce stomatal closure. After 2 h of treatment, leaves were used for the subsequent experiments. For  $\text{Ca}^{2+}$  imaging and surface potential recording, detached leaves were transferred to MS agar medium and treated with 3.0 M Z-3-HAL as previously described. For stomatal aperture measurement, epidermal strips were prepared by peeling away the epidermal cell layer using a clear Scotch tape as described previously<sup>67</sup>. The adaxial leaf surface was fixed with cover glass, and stomata were observed under an upright confocal laser scanning microscope (AIR, Nikon). The stomatal aperture was measured using NIS-Elements imaging software (Nikon).

### Pharmacological treatment

$\text{LaCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Wako) and EGTA (Dojindo Laboratories) were dissolved in liquid MS medium at a final concentration of 50 mM. Eight-day-old *Arabidopsis* seedlings were transferred into a Petri dish filled with liquid MS medium containing either 50 mM  $\text{LaCl}_3$  or EGTA and incubated for 16 h prior to experiments. For the washout assay, *Arabidopsis* seedlings that had been treated with 50 mM  $\text{LaCl}_3$  or EGTA were uprooted from MS medium and washed 5 times with liquid MS medium devoid of these inhibitors to remove any residual inhibitors. Subsequently, the seedlings were transferred to an inhibitor-free MS agar plate and incubated for 24 h before conducting  $\text{Ca}^{2+}$  imaging.

### Total RNA isolation, cDNA synthesis, and quantitative PCR

To extract total RNA, L1 and aboveground parts were harvested from 2-week-old *Arabidopsis* plants and 8-day-old *Arabidopsis* seedlings, respectively (Fig. 4f and Supplementary Fig. 3b). The harvested tissues were immediately frozen using liquid nitrogen. Total RNA was extracted from flash-frozen leaf tissue using the Plant Total RNA Mini Kit (FAVORGEN) following the manufacturer's instructions. The samples were further treated with RNase-free DNase I to remove any residual genomic DNA using the RNase-Free DNase Set (QIAGEN) according to the manufacturer's instructions. First-strand cDNA was then synthesized from the total RNA (500 ng) in a 10- $\mu$ L reaction (50 ng of total RNA/ $\mu$ L) with PrimeScript<sup>TM</sup> RT Master Mix (Perfect Real-Time) for RT-PCR (Takara). In a 96-well optical PCR plate (ABgene), cDNA proportional to 10 ng of starting total RNA was combined with 100 nM of each primer (Supplementary Table 1) and 7.5  $\mu$ L of 2 $\times$  Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green QPCR Master Mix (Agilent Technologies) to a final volume of 15  $\mu$ L. Using *Arabidopsis ACT8* as an internal reference for standardization, qPCR was performed using the CFX96 Touch Deep Well Real-Time PCR System as well as CFX Maestro Software (Bio-Rad) with the following cycling parameters: 95 °C for 3 min; 40 cycles of 95 °C for 5 s and 60 °C for 10 s; and 1 cycle of dissociation from 65 °C to 95 °C with 0.5 °C increments. The expression of the marker genes was quantified using the quantification cycle [Cq].

### Volatile analysis

VOCs emitted from homogenized leaves were identified and quantified as described previously with some modifications<sup>68</sup>. Briefly, the aboveground parts of *Arabidopsis* (No-0 and Ler-0 accession) and tomato (*Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom) plants were excised with a razor blade and weighed. Five hundred milligrams of tissues were immediately placed into a mortar and homogenized using a pestle and liquid nitrogen. Then, these tissues were transferred to a

grass vial (22 ml, Perkin Elmer). A MonoTrap cartridge (silica monolith matrix coated with octadecyl silyl group and activated carbon, RGPS TD, GL Sciences) was suspended in the headspace of the glass vial, allowing it to adsorb VOCs for 10 min. To quantify the volatilization of Z-3-HAL from DMSO solution, the MonoTrap cartridge was placed 5 mm from a 0.2-mL plastic tube containing 10 µL of 0.03 M Z-3-HAL solution in DMSO, and VOC adsorption was performed for 0.5, 1, 2 and 5 min (Supplementary Fig. 5). Volatiles collected by the cartridge were analyzed by a GC-MS system (GCMS QP2030, Shimadzu) equipped with a thermal desorption system (TQ8040-NX, Shimadzu). Volatiles were desorbed at 250 °C for 10 min with He gas flow (70 mL/min) and concentrated onto a trap set at -25 °C. Volatiles were desorbed again at 250 °C for 2 min and fractionated with a DB-WAX capillary column (30 m × 0.25 mm, 0.25 µm film thickness, Agilent). The GC oven program was maintained at an initial temperature of 40 °C (held for 5 min), followed by a ramp of 5.0 °C/min to a final temperature of 200 °C (held for 2 min). The electron ionization mode with an ionization voltage of 70 eV was used, and the *m/z* was recorded from 40 to 400. To identify each compound, we used the retention indices and MS profiles of the corresponding authentic specimens. To construct calibration curves for Z-3-HAL and E-2-HAL, a given amount of authentic compounds (generous gift from Zeon Co., and purchased from Fujifilm Wako Pure Chemicals, respectively) was directly injected onto the MonoTrap cartridge and analyzed as previously described.

To estimate Z-3-HAL production from a single injury, we followed a previously described method<sup>34</sup>. This estimation was based on the detection of Z-3-HAL that elicits [Ca<sup>2+</sup>]<sub>cyt</sub> increases in *Arabidopsis* following leaf homogenization as described in Supplementary Fig. 2. The total amounts of Z-3-HAL produced by homogenized *Arabidopsis* and tomato leaves were quantified as 380.9 and 1718.7 nmol/gFW, respectively. These values represent the maximum capacity of Z-3-HAL synthesis by the leaves. Based on previous research<sup>34</sup>, the average weight of a leaf was defined as 150 µg/mm<sup>2</sup>. Considering the estimated area of a single injury to be 0.05 mm<sup>2</sup> as previously described<sup>34</sup>, we calculated that a single wound would result in the production of approximately 2.9 and 12.9 pmol of Z-3-HAL for *Arabidopsis* and tomatoes, respectively.

## Statistical analysis

We performed Student's *t* test for pairwise analysis and one-way analysis of variance followed by Bonferroni's or Tukey's post hoc tests using GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc.) to compare multiple samples. Statistical significance was indicated by *P* < 0.05. All data are presented as the mean ± SE.

## Reporting summary

Further information on research design is available in the Nature Portfolio Reporting Summary linked to this article.

## Data availability

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request. Source data are provided with this paper.

## References

- Heil, M. & Karban, R. Explaining evolution of plant communication by airborne signals. *Trends Ecol. Evol.* **25**, 137–144 (2010).
- Dudareva, N., Negre, F., Nagegowda, D. A. & Orlova, I. Plant volatiles: recent advances and future perspectives. *Crit. Rev. Plant Sci.* **25**, 417–440 (2006).
- Kessler, A. & Baldwin, I. T. Defensive function of herbivore-induced plant volatile emissions in nature. *Science* **291**, 2141–2144 (2001).
- De Moraes, C. M., Mescher, M. C. & Tumlinson, J. H. Caterpillar-induced nocturnal plant volatiles repel conspecific females. *Nature* **410**, 577–580 (2001).
- Arimura, G.-i, Kost, C. & Boland, W. Herbivore-induced, indirect plant defences. *Biochim. Biophys. Acta* **1734**, 91–111 (2005).
- Arimura, G.-i et al. Herbivory-induced volatiles elicit defence genes in lima bean leaves. *Nature* **406**, 512–515 (2000).
- Engelberth, J., Alborn, H. T., Schmelz, E. A. & Tumlinson, J. H. Airborne signals prime plants against insect herbivore attack. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **101**, 1781–1785 (2004).
- Rhoades, D. F. In *Plant Resistance to Insects* (ed. Hedin, P. A.) Vol. 208, 55–68 (American Chemical Society, 1983).
- Baldwin, I. T. & Schultz, J. C. Rapid changes in tree leaf chemistry induced by damage: evidence for communication between plants. *Science* **221**, 277–279 (1983).
- Shulaev, V., Silverman, P. & Raskin, I. Airborne signalling by methyl salicylate in plant pathogen resistance. *Nature* **385**, 718–721 (1997).
- Farmer, E. E. & Ryan, C. A. Interplant communication: airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **87**, 7713–7716 (1990).
- Karban, R., Huntzinger, M. & McCall, A. C. The specificity of eavesdropping on sagebrush by other plants. *Ecology* **85**, 1846–1852 (2004).
- Godard, K.-A., White, R. & Bohlmann, J. Monoterpene-induced molecular responses in *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry* **69**, 1838–1849 (2008).
- Matsui, K. Green leaf volatiles: hydroperoxide lyase pathway of oxylipin metabolism. *Curr. Opin. Plant Biol.* **9**, 274–280 (2006).
- Duan, H., Huang, M.-Y., Palacio, K. & Schuler, M. A. Variations in CYP74B2 (Hydroperoxide Lyase) gene expression differentially affect hexenal signaling in the Columbia and Landsberg erecta ecotypes of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **139**, 1529–1544 (2005).
- Kunishima, M. et al. Identification of (Z)-3:(E)-2-hexenal isomerasers essential to the production of the leaf aldehyde in plants. *J. Biol. Chem.* **291**, 14023–14033 (2016).
- Spyropoulou, E. A. et al. Identification and characterization of (3Z):(2E)-hexenal isomerasers from cucumber. *Front. Plant Sci.* **8**, 1342 (2017).
- Engelberth, J., Seidl-Adams, I., Schultz, J. C. & Tumlinson, J. H. Insect elicitors and exposure to green leafy volatiles differentially upregulate major octadecanoids and transcripts of 12-oxo phytodienoic acid reductases in *Zea mays*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **20**, 707–716 (2007).
- Kost, C. & Heil, M. Herbivore-induced plant volatiles induce an indirect defence in neighbouring plants. *J. Ecol.* **94**, 619–628 (2006).
- Yamauchi, Y., Matsuda, A., Matsuura, N., Mizutani, M. & Sugimoto, Y. Transcriptome analysis of *Arabidopsis thaliana* treated with green leaf volatiles: possible role of green leaf volatiles as self-made damage-associated molecular patterns. *J. Pestic. Sci.* **43**, 207–213 (2018).
- Yamauchi, Y., Kunishima, M., Mizutani, M. & Sugimoto, Y. Reactive short-chain leaf volatiles act as powerful inducers of abiotic stress-related gene expression. *Sci. Rep.* **5**, 8030 (2015).
- Matsui, K. A portion of plant airborne communication is endorsed by uptake and metabolism of volatile organic compounds. *Curr. Opin. Plant Biol.* **32**, 24–30 (2016).
- Tani, A., Tobe, S. & Shimizu, S. Leaf uptake of methyl ethyl ketone and croton aldehyde by *Castanopsis sieboldii* and *Viburnum odoratissimum* saplings. *Atmos. Environ.* **70**, 300–306 (2013).
- Tani, A., Tobe, S. & Shimizu, S. Uptake of methacrolein and methyl vinyl ketone by tree saplings and implications for forest atmosphere. *Environ. Sci. Technol.* **44**, 7096–7101 (2010).
- Nagashima, A. et al. Transcriptional regulators involved in responses to volatile organic compounds in plants. *J. Biol. Chem.* **294**, 2256–2266 (2019).
- Aldon, D., Mbengue, M., Mazars, C. & Galaud, J.-P. Calcium signalling in plant biotic interactions. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 665 (2018).

27. Dong, Q., Wallrad, L., Almutairi, B. O. & Kudla, J. Ca<sup>2+</sup> signaling in plant responses to abiotic stresses. *J. Integr. Plant Biol.* **64**, 287–300 (2022).
28. Kudla, J. et al. Advances and current challenges in calcium signaling. *N. Phytol.* **218**, 414–431 (2018).
29. Zebelo, S. A., Matsui, K., Ozawa, R. & Maffei, M. E. Plasma membrane potential depolarization and cytosolic calcium flux are early events involved in tomato (*Solanum lycopersicum*) plant-to-plant communication. *Plant Sci.* **196**, 93–100 (2012).
30. Asai, N., Nishioka, T., Takabayashi, J. & Furuichi, T. Plant volatiles regulate the activities of Ca<sup>2+</sup>-permeable channels and promote cytoplasmic calcium transients in *Arabidopsis* leaf cells. *Plant Signal. Behav.* **4**, 294–300 (2009).
31. Toyota, M. et al. Glutamate triggers long-distance, calcium-based plant defense signaling. *Science* **361**, 1112–1115 (2018).
32. Tanaka, T. et al. Identification of a hexenal reductase that modulates the composition of green leaf volatiles. *Plant Physiol.* **178**, 552–564 (2018).
33. Fäldt, J., Arimura, G.-I., Gershenson, J., Takabayashi, J. & Bohlmann, J. Functional identification of *AtTPS03* as (E)-β-ocimene synthase: a monoterpene synthase catalyzing jasmonate- and wound-induced volatile formation in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **216**, 745–751 (2003).
34. Shiojiri, K., Ozawa, R., Matsui, K., Sabelis, M. W. & Takabayashi, J. Intermittent exposure to traces of green leaf volatiles triggers a plant response. *Sci. Rep.* **2**, 378 (2012).
35. Choi, W.-G., Toyota, M., Kim, S.-H., Hilleary, R. & Gilroy, S. Salt stress-induced Ca<sup>2+</sup> waves are associated with rapid, long-distance root-to-shoot signaling in plants. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **111**, 6497–6502 (2014).
36. Yang, Y., Costa, A., Leonhardt, N., Siegel, R. S. & Schroeder, J. I. Isolation of a strong *Arabidopsis* guard cell promoter and its potential as a research tool. *Plant Methods* **4**, 6 (2008).
37. Sawchuk, M. G., Donner, T. J., Head, P. & Scarpella, E. Unique and overlapping expression patterns among members of photosynthesis-associated nuclear gene families in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **148**, 1908–1924 (2008).
38. Kirschner, S. et al. Expression of *SULTR2;2*, encoding a low-affinity sulphur transporter, in the *Arabidopsis* bundle sheath and vein cells is mediated by a positive regulator. *J. Exp. Bot.* **69**, 4897–4906 (2018).
39. Takada, S., Takada, N. & Yoshida, A. *ATML1* promotes epidermal cell differentiation in *Arabidopsis* shoots. *Development* **140**, 1919–1923 (2013).
40. Lievens, L., Pollier, J., Goossens, A., Beyaert, R. & Staal, J. Abscisic acid as pathogen effector and immune regulator. *Front. Plant Sci.* **8**, 587 (2017).
41. Vahisalu, T. et al. SLAC1 is required for plant guard cell S-type anion channel function in stomatal signalling. *Nature* **452**, 487–491 (2008).
42. Mustilli, A. C., Merlot, S., Vavasseur, A., Fenzi, F. & Giraudat, J. R. M. *Arabidopsis OST1* protein kinase mediates the regulation of stomatal aperture by abscisic acid and acts upstream of reactive oxygen species. *Plant Cell* **14**, 3089–3099 (2002).
43. Laanemets, K. et al. Mutations in the SLAC1 anion channel slow stomatal opening and severely reduce K<sup>+</sup> uptake channel activity via enhanced cytosolic [Ca<sup>2+</sup>] and increased Ca<sup>2+</sup> sensitivity of K<sup>+</sup> uptake channels. *N. Phytol.* **197**, 88–98 (2013).
44. Alméras, E. et al. Reactive electrophile species activate defense gene expression in *Arabidopsis*. *Plant J.* **34**, 205–216 (2003).
45. Kikuta, Y. et al. Specific regulation of pyrethrin biosynthesis in *Chrysanthemum cinerariaefolium* by a blend of volatiles emitted from artificially damaged conspecific plants. *Plant Cell Physiol.* **52**, 588–596 (2011).
46. Rodríguez, F. I. et al. A copper cofactor for the ethylene receptor ETR1 from *Arabidopsis*. *Science* **283**, 996–998 (1999).
47. Sugimoto, K. et al. Intake and transformation to a glycoside of (Z)-3-hexenol from infested neighbors reveals a mode of plant odor reception and defense. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **111**, 7144–7149 (2014).
48. Copolovici, L., Kännaste, A., Pazouki, L. & Niinemets, Ü. Emissions of green leaf volatiles and terpenoids from *Solanum lycopersicum* are quantitatively related to the severity of cold and heat shock treatments. *J. Plant Physiol.* **169**, 664–672 (2012).
49. Mano, J. I., Tokushige, K., Mizoguchi, H., Fujii, H. & Khorobrykh, S. Accumulation of lipid peroxide-derived, toxic α,β-unsaturated aldehydes (E)-2-pentenal, acrolein and (E)-2-hexenal in leaves under photoinhibitory illumination. *Plant Biotechnol.* **27**, 193–197 (2010).
50. Liu, H. T., Sun, D. Y. & Zhou, R. G. Ca<sup>2+</sup> and AtCaM3 are involved in the expression of heat shock protein gene in *Arabidopsis*. *Plant Cell Environ.* **28**, 1276–1284 (2005).
51. Mochizuki, S. & Matsui, K. Green leaf volatile-burst in *Arabidopsis* is governed by galactolipid oxygenation by a lipoxygenase that is under control of calcium ion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **505**, 939–944 (2018).
52. Muramoto, S. et al. Glutathionylation and reduction of methacrolein in tomato plants account for its absorption from the vapor phase. *Plant Physiol.* **169**, 1744–1754 (2015).
53. Vengateswari, G., Arunthirumeni, M., Shivaswamy, M. S. & Shiva-kumar, M. S. Effect of host plants nutrients, antioxidants, and phytochemicals on growth, development, and fecundity of *Spodoptera litura* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae). *Int. J. Trop. Insect Sci.* **42**, 3161–3173 (2022).
54. Matsui, K. & Engelberth, J. Green leaf volatiles—the forefront of plant responses against biotic attack. *Plant Cell Physiol.* **63**, 1378–1390 (2022).
55. Beyaert, I. & Hilker, M. Plant odour plumes as mediators of plant-insect interactions. *Biol. Rev.* **89**, 68–81 (2014).
56. Engelberth, J. & Engelberth, M. Variability in the capacity to produce damage-induced aldehyde green leaf volatiles among different plant species provides novel insights into biosynthetic diversity. *Plants* **9**, 213 (2020).
57. Widhalm, J. R., Shih, M. L., Morgan, J. A. & Dudareva, N. Two-way communication: Volatile emission and uptake occur through the same barriers. *Mol. Plant* **16**, 1–3 (2023).
58. Kondo, T., Hasegawa, K., Uchida, R. & Onishi, M. Absorption of atmospheric C2–C5 aldehydes by various tree species and their tolerance to C2–C5 aldehydes. *Sci. Total Environ.* **224**, 121–132 (1998).
59. Omasa, K., Tobe, K. & Kondo, T. in *Air Pollution and Plant Biotechnology: Prospects for Phytomonitoring and Phytoremediation* 155–178 (Springer Japan, 2002).
60. Mousavi, S. A. R., Chauvin, A., Pascaud, F., Kellenberger, S. & Farmer, E. E. GLUTAMATE RECEPTOR-LIKE genes mediate leaf-to-leaf wound signalling. *Nature* **500**, 422–426 (2013).
61. Sukhov, V., Sukhova, E. & Vodeneev, V. Long-distance electrical signals as a link between the local action of stressors and the systemic physiological responses in higher plants. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **146**, 63–84 (2019).
62. Uemura, T., Wang, J., Aratani, Y., Gilroy, S. & Toyota, M. Wide-field, real-time imaging of local and systemic wound signals in *Arabidopsis*. *J. Vis. Exp.* **172**, e62114 (2021).
63. Moe-Lange, J. et al. Interdependence of a mechanosensitive anion channel and glutamate receptors in distal wound signaling. *Sci. Adv.* **7**, eabg4298 (2021).
64. Suda, H. & Toyota, M. Integration of long-range signals in plants: A model for wound-induced Ca<sup>2+</sup>, electrical, ROS, and glutamate waves. *Curr. Opin. Plant Biol.* **69**, 102270 (2022).

65. Clough, S. J. & Bent, A. F. Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **16**, 735–743 (1998).
66. Hagihara, T., Mano, H., Miura, T., Hasebe, M. & Toyota, M. Calcium-mediated rapid movements defend against herbivorous insects in *Mimosa pudica*. *Nat. Commun.* **13**, 6412 (2022).
67. Zheng, X. et al. Danger-associated peptides close stomata by OST1-independent activation of anion channels in guard cells. *Plant Cell* **30**, 1132–1146 (2018).
68. Matsui, K., Sugimoto, K., Mano, J. I., Ozawa, R. & Takabayashi, J. Differential metabolisms of green leaf volatiles in injured and intact parts of a wounded leaf meet distinct ecophysiological requirements. *PLoS ONE* **7**, e36433 (2012).

## Acknowledgements

The authors thank Juntaro Negi (Kyushu University) for providing *slac1-2* and *ost1-3* mutant seeds. This research was supported by grants from KAKENHI (18H05491) to M.T., (22KJ0451) to T.U., and by grants from A-STEP and Shiraishi Foundation of Science Development to M.T.

## Author contributions

Y.A., T.U., T.H., and M.T. designed the study. Y.A., T.U., and T.H. performed Ca<sup>2+</sup> imaging, electrophysiological measurements, qPCR analysis. K.M. performed volatile analysis. Y.A., T.U., T.H., and K.M. performed data analysis. Y.A., T.U., and M.T. wrote the manuscript. All authors discussed the results and contributed to the manuscript.

## Competing interests

The authors declare no competing interests.

## Additional information

**Supplementary information** The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41467-023-41589-9>.

**Correspondence** and requests for materials should be addressed to Masatsugu Toyota.

**Peer review information** *Nature Communications* thanks Alex Costa and the other anonymous reviewer(s) for their contribution to the peer review of this work. A peer review file is available.

**Reprints and permissions information** is available at <http://www.nature.com/reprints>

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2023

### 3.3.2 水沼正樹先生公表論文

本論文を検索(<https://www.nature.com/articles/s41467-024-50111-8>)した画面を次に示す。

---

> *Nat Commun.* 2024 Jul 10;15(1):5793. doi: 10.1038/s41467-024-50111-8.

## Regulatory mechanism of cold-inducible diapause in *Caenorhabditis elegans*

Makoto Horikawa <sup>1</sup>, Masamitsu Fukuyama <sup>2</sup>, Adam Antebi <sup>3</sup> <sup>4</sup>, Masaki Mizunuma <sup>5</sup> <sup>6</sup>

Affiliations + expand

PMID: 38987256 PMCID: [PMC11237089](#) DOI: [10.1038/s41467-024-50111-8](https://doi.org/10.1038/s41467-024-50111-8)

### Abstract

Temperature is a critical environmental cue that controls the development and lifespan of many animal species; however, mechanisms underlying low-temperature adaptation are poorly understood. Here, we describe cold-inducible diapause (CID), another type of diapause induced by low temperatures in *Caenorhabditis elegans*. A premature stop codon in heat shock factor 1 (hsf-1) triggers entry into CID at 9 °C, whereas wild-type animals enter CID at 4 °C. Furthermore, both wild-type and hsf-1(sy441) mutant animals undergoing CID can survive for weeks, and resume growth at 20 °C. Using epistasis analysis, we demonstrate that neural signalling pathways, namely tyraminergic and neuromedin U signalling, regulate entry into CID of the hsf-1 mutant. Overexpression of anti-ageing genes, such as hsf-1, XBP1/xbp-1, FOXO/daf-16, Nrf2/skn-1, and TFEB/hlh-30, also inhibits CID entry of the hsf-1 mutant. Based on these findings, we hypothesise that regulators of the hsf-1 mutant CID may impact longevity, and successfully isolate 16 long-lived mutants among 49 non-CID mutants via genetic screening. Furthermore, we demonstrate that the nonsense mutation of MED23/sur-2 prevents CID entry of the hsf-1(sy441) mutant and extends lifespan. Thus, CID is a powerful model to investigate neural networks involving cold acclimation and to explore new ageing mechanisms.

© 2024. The Author(s).

## IV 白石科学振興会の立上げに寄せて

### “研究助成事業の第一歩、そして進むべき道”

～追い風のカルシウム研究の流れに乗って～



名誉顧問　日高重助

(年報編集責任者)

生物、とくに植物、小動物や海獣に関するカルシウム関連の研究分野では、豊富な学術的情見の蓄積、放射光をはじめ観測・測定機器の高度化あるいはコンピュータ科学の進歩など多くの要因が相乗効果を引き起こし、現今、多くの優れた研究成果が堰を切ったかのように発表されている。加えて、カルシウムは生体のあらゆる部分で重要な機能を担っており、生命の基本に深く関わっているために、ヒトを含む生物に関するカルシウム関連研究は、まさに今、大変な追い風の中にある。この勢いのある順風に乗って、カルシウム関連研究の振興を大いに進めたい。

#### 4.1 研究助成事業の立ち上げ

弊振興会が主要事業としてカルシウム関連研究の振興を目指した2021年初秋の頃は、まだカルシウム関連研究に現在のような追い風を実感することは無かったが、すでに、表1に示す広い学問分野で、カルシウム関連の地道な研究が展開されていた。弊振興会は、このような広範な分野で展開されているカルシウム関連の研究を俯瞰し、カルシウム関連の研究が進展すると、現代社会が抱えている重要な多くの課題が解決される可能性を痛感した。そこで、「カルシウムの高度利用を可能にする科学と工学の振興を図り、カルシウムやカルシウム化合物の応用により現代社会が抱える諸課題を解決し、すべてに豊かな社会の発展に寄与する」ことを願って、カルシウム関連研究の振興を目的とする助成事業を実施することとなった。

ただ、限られた資源で、この広い分野で行われているカルシウム関連研究の振興を一気に図ることは難しく、計画的、段階的に進めが必要である。そこで、まず表1を基にして振興対象分野を次の5分野に絞った。すなわち、①ヒトを含む動物の生理作用、食品添加物、畜産応用、②植物の生理作用、農林水産応用、③環境、エネルギー開発、CO<sub>2</sub>の固定化・

再資源化関連、④工業材料、医用・生体材料応用、⑤材料プロセシング、プロセスシステム開発の分野である。

また、前述の振興会の目的を達成するには、「カルシウムに関する「優れた研究」が選考され、選考された研究の素晴らしい成果が速やかに社会に還元される」ことが大切である。

助成に当たっての「優れた研究」とは、①新規性・独創性が高い、挑戦的な研究、②学術的レベルが高い先進的研究、③実現性、将来性の高い研究、④社会へのインパクトが高い研究、⑤世界的に活躍が期待できる研究者の質の高い研究、など種々の研究が該当する。

そこで、本振興会では、限られた資源を効果的に使用して、目的を達成するために、当面の選考方針として、i) それぞれの研究分野で、我が国の優れた（トップクラスの）レベルにあるカルシウム関連研究、ii) 比較的若い研究者の挑戦的研究を選考して助成することにした。

表1 カルシウム関連研究の現状

カルシウム関連研究は広い研究分野で行われている	
◎生 体	；ヒト・動物に関する研究は非常に盛ん（全国の医学部、医生命工学系）
◎エネルギー	：カルシウムイオン電池、高電気伝導性物質 $\text{Ca}_2\text{N}$ の開発、水電解用触媒、アンモニア合成触媒の開発
◎ 環 境	：建築材料（漆喰の特性）、炭酸化による $\text{CO}_2$ ガスの固定化、サンゴの生育と海水の性質、コンクリートの完全リサイクル（炭酸カルシウムコンクリートの開発）
◎ 植 物 （農業）	：植物の情報伝達、低温ストレスの伝播、植物防御模倣剤 肥料の施し方、消石灰による土壌改善、尻腐れ病などの対策
◎ 畜産、飼料	：効率的家畜の生産による生理・生育不順、カルシウムの欠乏による疾病
◎ 食 品	：カルシウム欠乏症の改善、腸管での効果的吸収機構、目的部位への搬送方法
◎ 工業材料	：カルシウム粒子複合材料、触媒開発、生体材料、医用材料の開発
◎生産技術開発	：特性測定技術開発、粉体プロセス装置・操作技術、AI制御システムの開発

これらの「優れた研究」の申請を得るために、国内に、広く一般公募を行うことに加えて、「優れた研究」の発掘を目指して積極的に申請勧誘活動を実施することが必要である。すなわち、新設で無名の振興会が、一般公募により高い研究レベルの申請を集めることは難しい。それぞれの分野で、質の高い、優れた研究を活発に進められている大学の研究室に申請をお願いし、申請を勧誘するのが効果的である。そこで、次の申請勧誘方針を定め、勧誘を行った。

表2 助成方針・申請勧誘方針

- 申請勧誘により優れた(ピカッと光る、社会的インパクトの高い)カルシウム関連研究を積極的に発掘し、助成する。
- 世界的に通用する高いレベルの研究を助成する。
- 新規性が高く、若手研究者の挑戦的研究を助成する。
- 現在は、比較的少額の助成であるために若手研究者を優先する。
- 当該研究分野に配分された申請件数内であっても、助成レベルに達した申請研究がない場合は「該当者なし」とする。(社会的に有為な成果が期待できる高いレベルの研究を助成する。)

#### 4.2 初年度（2022年度）の応募状況と採択結果

初めての助成研究の募集は、2022年5月1日に開始した。募集要項を各種学会誌に掲載し、一般公募するとともに、有力大学のカルシウム関連研究者約170名に募集要項を送付した。6月に入ると、申請勧誘を本格化させ、大学の研究室への訪問に加えて、Zoomシステムによるオンライン面談もを利用して申請をお願いした。

カルシウム関連研究を振興する団体は世界で初めてであるために、面談した研究者の方々には大変喜んでいただくことができ、快く申請にご協力をいただいた。申請募集を7月31日に締め切った結果、表3に示すように70件の応募申請があり、初年度にしては好結果であった。ただ、研究分野[Ⅲ]の「環境、エネルギー開発関連分野」は非常に広範な分野で、勧誘の焦点を絞ることが出来ず、申請に漕ぎつけることができなかった。

各研究分野の詳しい申請状況は、次の通りである。

表3 初年度申請件数

研究分野	分野内容	申請件数
[Ⅰ]	ヒトを含む動物の生理作用、食品添加物、畜産応用	10
[Ⅱ]	植物の生理作用、農林水産応用	7
[Ⅳ]	工業材料、生体材料、医用材料	30
[V]	材料プロセシング、プロセスシステム	23

##### 4.2.1 ヒトを含む動物の生理作用とカルシウムシグナル～研究分野[Ⅰ]の状況～

我々が手や足を動かしたり、心臓が一定のリズムで収縮・弛緩運動を繰り返すには、筋肉の収縮と弛緩の繰り返し運動が必要である。この収縮弛・緩運動は、運動を指令する信号が脳から神経を通して送られ、その信号が筋肉細胞に伝達される。多くの筋肉細胞間は、細胞内のカルシウム濃度が僅かに増減するカルシウムシグナルにより情報伝達が行われ、筋

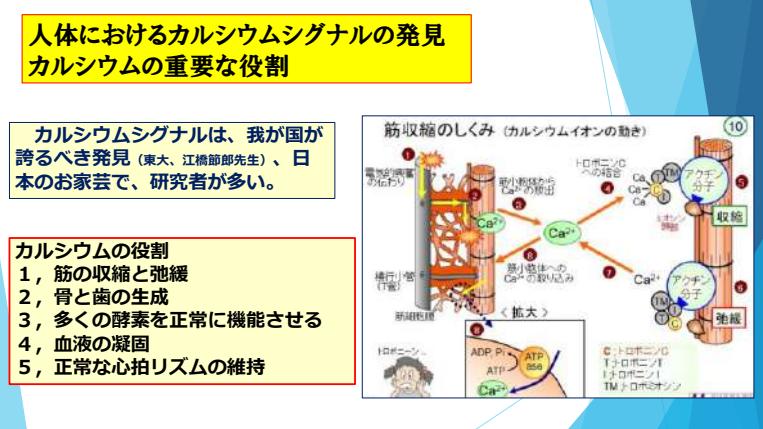


図1、カルシウムシグナルと人体におけるカルシウムの役割

(画像は <https://hirokawatpc0.jp/movie-01/movie.php?id=226> (筋収縮の仕組み) より転載)

肉の収縮・弛緩運動が繰り返される。このカルシウムシグナルを世界で初めて発見されたのは、江橋節郎東京大学名誉教授である。したがって、我が国の医学の分野において、カルシウムシグナルに関する研究は、非常に盛んで、我が国のお家芸とも言うべき分野となっている。

脳からの命令が神経を伝わり、その信号を受けて、筋細胞間の情報伝達を  $\text{Ca}^{2+}$  イオンの流れが担当するので、カルシウムシグナルはセカンドメッセンジャーとも呼ばれる。

初年度、研究分野 [I] で採択された研究は、広島大学水沼正樹教授の「 $\text{Ca}^{2+}$  が関与する酵母の寿命制御機構」である。

水沼先生は、今から 20 年前に、 $\text{Ca}^{2+}$  シグナルが単細胞生物である酵母の寿命を長くすることを世界で初めて発見し、その成果を大学院学生時代に「Nature」に発表されており<sup>1)</sup>、その後一貫して寿命延長機構の解明を続け、とくに健康寿命の延長に焦点をあてた研究を展開されている。

我が国における男女平均寿命は約 84 歳であるのに対して、男女平均の健康寿命は約 74 歳である。この差は実に 10 年にもなり、この 10 年間にわたって、我が国の 74 歳以上の半数の国民は、自分の意志で行動ができない寝たきり、あるいは認知症などを患っていることになる。この健康寿の延長は、老後の生活の質 (QOL) が改善されることであり、世界中が注目している現代社会の大きな課題である。

本申請は、カルシウム ( $\text{Ca}^{2+}$ ) シグナルが関与する寿命制御機構を酵母と線虫をモデル生物として解明することが目的である。寿命研究では、寿命が長い生物を使用すると、実験が進まないために、寿命が約 1 日程度の単細胞生物の酵母やヒトと同じ多細胞生物であり、細胞数が少なく、短寿命である線虫がモデル生物として用いられる。

$\text{Ca}^{2+}$ シグナルによる寿命制御機構が明らかになれば、生活習慣病など老化に伴って生じる疾病的予防・発症の理解など、ヒトの健康寿命の延伸に大きな貢献が期待される。

#### 4.2.2 植物の生理作用とカルシウムシグナル～研究分野[II]の状況～

2022年6月、植物のカルシウムシグナルによる情報伝達を研究されている埼玉大学の豊田先生からご申請いただくために、埼玉大学にお伺いした。「白石科学振興会の研究助成は材料関連が対象で生物の生理現象は関係ないものと思っていた」と思っていました。分かりました。申請します。折角ですから、実験をして行かれませんか？」。研究者に余計な会話は無い。“実験を見てもらい、議論をしたい”という科学者の好ましい雰囲気を強く感じ、早速実験室に案内していただいた。

暗室の中に置かれた蛍光顕微鏡の観察ステージに置かれたシロイヌナズナの葉に小さなハサミで切り込みを入れた瞬間、顕微鏡下のシロイヌナズナの茎の中をカルシウムイオンが蛍光を発しながら流れ周囲の葉につぎつぎと伝播するのが観察できた。この実験こそが、植物でも人体と同じように情報伝達にカルシウムイオンの流れが用いられていることを初めて実証し、世界を驚かせることになった‘その実験’だ<sup>2)</sup>。加えて、カルシウムシグナルが到達した葉では、害虫が嫌がる植物ホルモンである‘ジャスモン酸’が合成されていることも明らかにされている。カルシウムシグナル(信号)と呼ばれる意味は、そのシグナルが到達した場所で、何かの現象のスイッチオンあるいはオフがなされることを指している。

カルシウムシグナルが伝わった葉では、まだ害虫に襲われていないが、将来、襲われないようにジャスモン酸を合成し、葉に備蓄して自分の身を守っているのである。植物特有の自



図2 シロイヌナズナの全身にカルシウムシグナルが伝播した状態<sup>3)</sup>

己防御システムの発見である。

2022年12月の当会の理事会で、生物の分野の2023年度助成研究として、研究分野[II]から豊田先生の「高速カルシウムシグナルの伝播機構」の採択が決定した。

植物が害虫に齧られると、高速のカルシウムシグナルを発生して、将来の食害を防止する機構が明らかになったが、植物は自己の防御だけでなく周囲の仲間の防御も行っている。植物間のコミュニケーションとして知られていたがその詳しいメカニズムは明らかでなかった。植物は、光合成で吸収した炭素源を利用して揮発成分を合成し、花の香りなどとして周囲に放散している。植物が虫に齧られると、その揮発成分の一つである“緑の香り”と呼ばれる物質を放散して、食害を受けたことを周囲の植物に知らせていると言われていた。申請研究では、この“緑の香り”を分離精製して、空気中に蒸散させ、植物の葉が吸収する機構、その吸収によって植物内にカルシウムシグナルが生成され、食害を実際に他の植物に伝達する機構をリアルタイムでの観察を駆使して解明される予定である。その興味深い成果は、2023年度成果報告あるいは後掲の成果公表論文に詳しく紹介されている。

#### 4.2.3 “超進化論”～植物はおしゃべりができる～

2023年は、生物の驚くべき能力に関する話題で新年を迎えた感があった。お正月の日曜日の夜のゴールデンタイムに、植物や昆虫などの驚くべき能力の発見とメカニズムの解明を詳しく報じる番組「超・進化論」が放映された<sup>4)</sup>。この番組は、前年の11月から放映されていたものであるが、筆者が見たのは、お正月の夜の再放送だった。

第1話は、「地球上の生物の総重量は470Gt、そのうち人間と動物、生物の重量は4.5%、あとの約95.5%は全て植物、まさに植物は陸の王者なのです」という言葉で始まり、植物の賢い能力が次々と明らかにされる。前述の埼玉大学の豊田先生は、最初に登場される。第2話は昆虫、第3話は微生物である。

すでに述べたように、人体の情報伝達に使われるカルシウムシグナルは、我が国の発見である。発見者の江橋先生か(?)、同じくカルシウムシグナルの研究者として著名な飯野正光先生か(?)あるいは他の何方か(?)定かではないが、“何故カルシウムイオンが情報伝達に使われたのか?”という問い合わせに対して、“生命が誕生した頃、その周りにカルシウムイオンが沢山あったからじゃないでしょうか”と、答えられるのを読んだことがある。



図3 植物の「驚くべき能力」を報じる番組<sup>5,6)</sup>

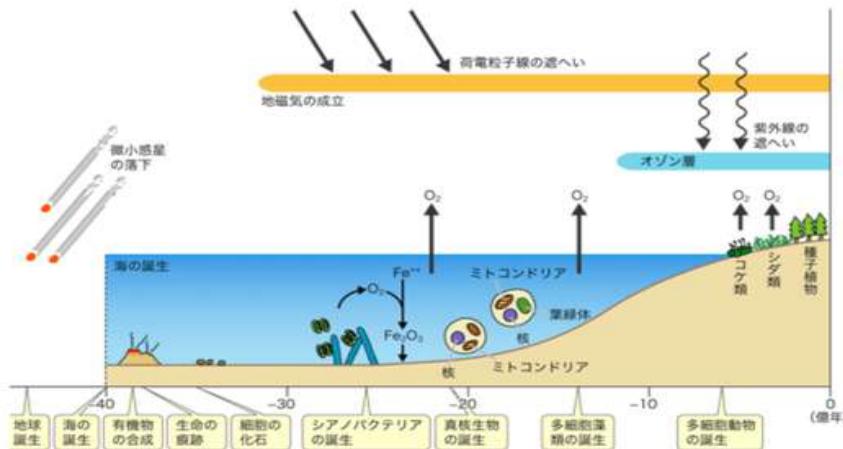


図4 生命の誕生と多細胞高等生物の発生<sup>7)</sup>

もっと高度で、深淵なカルシウムシグナルの研究者に相応しい回答を期待していた筆者には、極めて単純なお答えで、一種拍子抜けの感があったが、その発言の真意が理解できたのは、最近になってからである。

図4に見るように、生命の誕生は、約40億年前であるが、その後、絶滅と発生を繰り返しながら進化を遂げ、多くの真核細胞が集った現在の高等動物が出現したのは、およそ7億年前である。カンブリア紀と呼ばれるその時代の地球を取り巻く大気は、 $\text{CO}_2$ 、 $\text{N}_2$ と水蒸気が主成分であった<sup>8)</sup>。生物は海で発生したと考えられているが、海があるということは、水の蒸発と降雨がある。

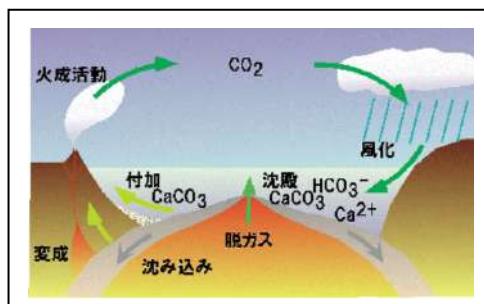


図 5 海底に  $\text{CaCO}_3$  が堆積した仕組み<sup>9)</sup>

$\text{CO}_2$ を溶解した雨が大地に降り注ぎ、陸地の構成成分であった $\text{Ca}^{2+}$ や $\text{Mg}^{2+}$ イオンを溶解して、海循環を繰り返す間に、海で濃縮された $\text{CaCO}_3$ が海 $\text{CaCO}_3$ の上の $\text{Ca}^{2+}$ イオン濃度が高い環境で発生しオンを上手に利用して進化したと考えられる。またシウムイオンが沢山あったために、それを利用しる。換言すると、現在の地球上の生物は、「カルが進化した」と考へてもいいのではなかろうか？

それを示すように、神経における情報伝達、細胞内の機能調節や酵素の活性化など、生体内のあらゆる部分でカルシウムが重要な機能を担っていることが明らかになってきており、カルシウムは、生命の基本に深く関わっている物質なのである<sup>10)</sup>。現在いろいろな知見の

蓄積とそれに基づく観察手法の発達により、多くの新しい発見が続き、生物におけるカルシウム研究は興味深い、驚くような成果が溢れ出ている。これにより、世の中の関心も高く、まさにカルシウム関連研究は、大変な追い風の中にある。そのお蔭で、弊振興会の研究助成にも、大変素晴らしい研究が申請されている。

#### 4.2.4 カルシウム関連材とそのプロセシング

研究分野[IV]と研究分野[V]の「カルシウム関連材料研究」と「材料プロセシングに関する研究」は、生物関連分野の華々しさに比較すると、いつでも地味な性格を持っている。そうした中で、炭酸カルシウムやリン酸カルシウムの生体親和性・安全性により、生体材料開発研究が盛んである。

初年度は生体材料に関する2件の研究が採択された。一件目は、大阪大学境 慎司先生の「骨再生を促進する3Dバイオプリント用インクの開発」である。骨の欠損は、骨腫瘍、骨粗鬆症などの疾病あるいは外傷などにより起こり、生活に大きな支障を起こす。本研究は、骨欠損部位の修復を促進する構造物を、欠損部位の形状にピッタリ合致するように製作することが可能な3Dバイオプリント用インクの開発が目的である。

とくに、骨欠損部位の修復を促進する構造物を作るために、炭酸カルシウム・リン酸カルシウム微粒子に「間葉系幹細胞」を複合した3Dバイオプリンタ用インクの開発を目指している。

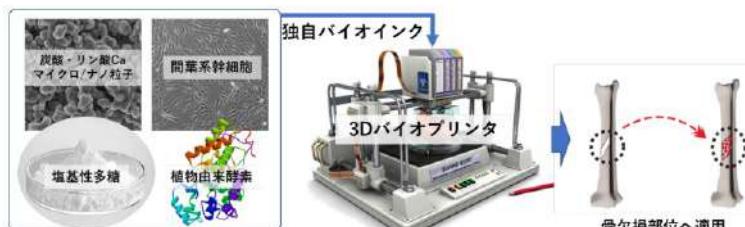


図6 3Dバイオプリント利用する骨欠損部修復材料の作成<sup>11)</sup>

2件目も骨の修復材料の開発で、大阪大学の徐先生による「カルシウムイオン架橋により自己修復能を持つ注射可能なハイドロゲルの創製」である。ヒドラジド修復ポリグルタミン酸と酸化コンドロイチン硫酸にカルシウムイオンの添加により、カルボン酸基または硫酸基とのイオン結合とアシルヒドラゾン結合の組み合わせによって注射可能なハイドロゲルの創製を目指している。骨の欠損部分に修復剤を注射で注入して、人体への負担が低い治療法の開発を目指している。

研究分野[V]の「材料生産技術やプロセスシステム関連研究」度採択されたのは、広島大学の荻 崇先生の「炭酸カルシウムを活用した複合多糖類系微粒子の高比表面積と耐水性向上に関する研究」である。

これまでに成功している炭酸カルシウムナノ粒子を鋳型として用いたペクチン微粒子の多孔質化と高比表面積の機構を解明し、炭酸カルシウムによる種々の複合多糖の微粒子の高機能化を図り、機能性食品、薬物の伝送キャリアに持ちることが出来る機能性微粒子材料の開発を目指している。

材料開発では、新規化合物により新しい機能の発現を期待する場合が多いが、粒子材料は、粒子の大きさ、形、表面の性状、多孔性など、粒子の形態を変えることにより同じ物質であっても新しい機能が発現することが大きな特徴である。したがって、粒子の大きさや形態制御法の開発は、大切な材料創製技術である。

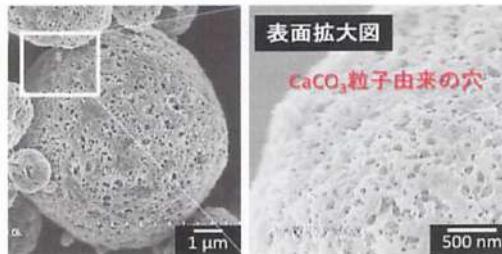


図7 多孔性粒子<sup>12)</sup>

初めての助成研究の募集で、とくに力を入れたのが、勧誘目的に掲げた「ピカッと光る研究」の申請を一つでも多く得ることだった。

生物分野で得たいと思い、その分野の方々に無作法なお願いをさせて戴いたが、多くの方々のご協力により非常に多くの優れたご応募をいただいた。本年年度の申請勧誘は「ヒトを含む動物と植物の分野」を対象としたが、この二つの分野には、採択すべき、多くの素晴らしいご研究が多く、結果的に選考漏れになつたご申請も多くなつたことが大変心残りであった。申請勧誘を効果的なシステムにするには、勧誘した素晴らしい研究を優先的に採択するシステムが必要であることを痛感した。

#### 4.3 2023年度研究助成の募集と採択

初年度は、5件の採択に対して70件の応募があったことに加えて、多くの優れた研究が採択漏れになつたこともあり、2023年度は採択件数を10件にすることになった。また、この年度は、弊振興会の各委員会やスタッフも初年度の業務を経て、理解が進んだこともあって、アドバイザー無しで、将来に向けて独り立ちして貰うこととした。

その結果、優れた研究のご応募を戴くための申請勧誘をしないで、振興会からのダイレクトメールと各種学会誌上での公募のみで助成研究の募集を行う、という新スタッフの方針のもとに申請の公募が行われた。応募件数は、71件で昨年並みであったが、優れた「ピカッと光る研究」の申請が頂けるのか?を心配したが、結果的には杞憂に終わった。

##### 4.3.1 研究分野[I][II][IV] 生物関連分野と生体材料関連分野

審査に必要な基礎的学識が異なる「ヒトを含む動物」、「植物」と「生体材料」の3分野を一つのグループにして採択審査が行われたことなどをはじめ、選考にあたって、将来十分注意しなければならない問題はあったが、成継としては非常に興味深い、注目すべき研究が採択された。

まず、注目すべきは、慶應大学堀田耕司先生から申請された「カルシウムシグナルを利用した付着生物の人工変態誘導による変態制御と開始機構の解明」である<sup>13)</sup>。

海獣“ホヤ”は無脊椎動物であるが、ヒトと同じ祖先を持つ動物である。ホヤの幼生時代は、約1.7mmの長さで、オタマジャクシによく似ており（図8(b)）、プランクトンのように海に浮いている。ところが、付着器から、なんらかの機械的刺激が入ると、カルシウムシグナルを発して変態を起こし、図8(a)のように岩に付着して成長する。



このホヤは、食用になる“マボヤ”、養殖ホタテに付着して損害を与える害獣“ザラボヤ”、“岸壁や船底に付着するカタユウレイボヤを食い荒らすホヤの3種類が存在する<sup>9)</sup>。変態の開始機構を明らかにして、食用になるホヤを選択的に変態させ、海産物の増産あるいは海洋汚染を防ぐことを目的とする研究である。ヒト、植物、そして海獣らの生物が全てカルシウムシグナルを利用していることになり、この地球上ではカルシウムを利用できる生物が進化を遂げてきたことが分かる。

数億年前に脊椎動物は、ヒトと無脊椎動物のホヤに分化した。ヒトは60兆個の細胞からできているが、前述のホヤの幼生は、たった1500個の細胞からできており、このホヤの幼生は脊椎動物の研究における大切な試料である。堀田先生は、このホヤの幼生を使って、脊椎動物がリズム運動をするのに用いる細胞を発見されている。研究機関が短い振興会の助成研究は、上述の目的でなされるが、一方で、ホヤを使って脊椎動物の“仕組み”を明らかにする壮大な計画が進んでいる<sup>14)</sup>。

カルシウム関連研究として非常に大切である食品関連の申請研究が2件採択された。一つは、北海道大学比良 徹先生の「消化管ホルモンGLP-1の分泌増強因子としてのカルシウムの可能性」である。

GLP-1は、抗肥満・抗糖尿病作用が知られる消化管ホルモンで、GLP-1の分泌は、食物から摂取したカルシウムが消化管で、GLP-1を生産する細胞のカルシウム受容体を活性化することにより行われる。本研究は、種々の食品成分とカルシウムとの併用により、効果的にカルシウムを摂取し、GLP-1分泌の促進を目指している。

食物から摂取したカルシウムは、細胞内で情報伝達をするカルシウムシグナルとしてではなく、細胞外の食シグナルとも言うべきものである。食品成分の効果的な組み合わせが分かれば、肥満や糖尿病予防のための機能性食品の開発への貢献が目的である。

2件目は、名古屋工業大学の小幡亜希子先生の「カルシウム含有可食性ポリマーを用いた培養肉作成用細胞足場材料の開発」である。最近、急速に実用化が進んでいる培養肉の製造に必要な、安全・低コスト・細胞機能促進・優れた操作性などの特徴を持ち、肉の元となる筋細胞の増殖や細胞外マトリクスの産生を促進するカルシウムを含有した培養肉の細胞足場材料の開発を目指している。

カルシウムが人体に大切な基礎的成分であるために、カルシウムを利用する機能性食品や食品材料の開発が活発になっている。



図9 カルシウム含有ポリマー足場材料とする  
培養肉の生産<sup>15)</sup>

#### 4.3.2 エネルギー、材料分野

次世代2次イオン電池として期待されるカルシウムイオン2次電池とその材料の開発研究が採択された。

現代社会で、急増する小型携帯電子機器用電池、あるいは高容量、高エネルギー密度が要求されるEV用電池の開発競争は熾烈を極めている。さらには、将来の本格的なカーボンニュートラル社会の実現には自然エネルギーの利用が必要不可欠であるが、発電量が天候に左右されることの対策として、高性能の蓄電池の開発が必要である。

現在、リチウムイオン電池が用いられているが、電池性能はほぼ理論限界に達しているうえに、発火などの安全性の問題を抱えている。さらに、大きな問題はリチウム金属やコバルトなどの原材料の調達の難しさが予想されている。

そこで、リチウムイオン電池の性能を凌駕する次世代イオン電池の開発が急務となっている。候補として、ナトリウムイオン電池、フッ化物イオン電池などの開発が進んでいるが、カルシウムイオン電池への期待も大きい。

リチウムやナトリウムイオンに代わって多価イオンであるカルシウムを用いると、高容量、高エネルギー密度の電池が期待できる。さらに、なによりも資源的に豊かで、安価なカルシウムは大変有望である。

2023年度の研究助成には、2件のカルシウムイオン電池関連の研究が申請された。1件目は、東北大学の木須一彰先生の「カルシウム金属を負極に用いた高エネルギー密度型蓄電池の開発」である。木須先生らのグループは、コベライト（硫化銅）と炭素複合体を用いてカルシウムイオンを大量に貯蔵可能な正極材量を開発し、さらに、水素クラスターを含む電解液を用いてカルシウム金属の負極を組み合わせた電池を試作している。

この電池により、実用の目安となる 500 回以上の繰り返し充放電に成功している<sup>12)</sup>。

カルシウム蓄電池の開発におけるボトルネックは、大きな伝導性と化学的安定性を持つ電解質の開発であった。申請者らは、水素クラスター電解質の開発に成功し、本格的な電池試験が可能となった。電池試作機を用いて、さらに充放電回数が大きくなる負極の開発を目指している。

カルシウム蓄電池の開発におけるボトルネックは、大きな伝導性と化学的安定性を持つ電解質の開発であった。

申請者らは、水素クラスター電解質の開発に成功し、ようやく本格的な電池試験が可能となった。電池試作機を用いて、さらに充放電回数が大きくなる負極の開発を目指している。

2 件目は、京都大学の高見 剛先生の「全固体フッ化物イオン電池の開発に向けたカルシウム含有負極の開発」である。全固体フッ化物イオン電池は、我が国で強力に進められている有望な次世代イオン電池であり、現在負極に用いられている Pb 化合物に代わり毒性が低く、資源的にも豊かな Ca 化合物を用いた負極の開発を目指している。

多価イオンであるカルシウムイオン電池や電池材料は、資源的に豊富で、高容量、高エネルギー密度の電池として有望であり、一層活発な研究が望まれる。

#### 4.4 今後の助成事業の展開

カルシウムが関与する生物関係の研究は、今、まさに多くの新しい発見や研究成果が次々と生まれている時期で、研究分野 [I] ヒトを含む動物の生理と食物、資料関連」、研究分野 [II] 植物の整理と農林業応用関連」については、大変多くの優れた研究を申請していただいている。生物はその発生からカルシウムと深い関係を持っており、まだまだカルシウムと生物の関係について、驚くほどの興味深い成果が出てくるものと思われる。今後ともますます活発に生物関連分野の申請勧誘をさせて戴いて、優れた研究のご申請が頂けるよう努力したい。

とくに、研究分野 [I] では、食品栄養学の観点からの食物研究、ヒトを対象とする機能性食品や畜産用の飼料開発などに関する研究、研究分野 [II] では、農林業への応用研究の振興に注力したい。

研究分野 [III] 「環境・エネルギー、CO<sub>2</sub> の固定化と利用関連分野」では、「地球温暖化の抑制」が現代社会における深刻な最重要課題として人類に突き付けられている。国連の事務総長は、争いに明け暮れている地球上の国々に対して「地球沸騰化」と呼び、全世界の人々に危機に対する真剣な対処を熱望している。

弊振興会の理事長も、「炭酸カルシウム事業が CO<sub>2</sub> ガスを排出する事業」である事を踏ま



図 10 カルシウム金属を負極に用いた高エネルギー密度型蓄電池<sup>16)</sup>

え、研究助成においては「CO<sub>2</sub>ガスの固定化とその利用」に関する研究の振興に強い意欲を示し、植物の光合成と人工光合成に関する研究振興に大きな期待を抱いている。

地球上の生物は、ヒトを含む動物と植物で、その総重量は 470Gt あるが、前述の通り、その 95%以上が植物であり、CO<sub>2</sub> の固定化の大部分は植物の光合成が担っている。光合成は、水と CO<sub>2</sub> から酸素と植物の栄養分を作る反応であり、光のエネルギーを用いて “水を分解して酸素を作る反応” と “水素イオンと CO<sub>2</sub> から植物の栄養を作る反応” から成っている。これまでの 100 年の間、植物の光合成に関する研究は大変活発に行われてきたが、水を分解する反応のメカニズムが未解明であった。

新聞報道<sup>17)</sup>によると、最近、水を分解して酸素を作る反応のメカニズムの解明の糸口が見えたようである。この水を分解する反応を触媒するカルシウム・マンガンコンプレックスの中心には、カルシウム元素があり、この反応で神秘とも思える重要な働きをしているようである。植物の光合成反応のメカニズムが解明されると、人工光合成の研究が進展し、「CO<sub>2</sub>の固定化と利用」が大きく前進するものと思われる。カルシウムイオン電池と光合成研究の一層の振興を図りたい。

研究分野[IV]カルシウム関連材料（工業材料、生体材料）」の分野には、皆様のご協力により、大変多くのご申請を戴いている。そのために、この分野では、まだ申請勧誘を行っていないが、材料研究分野でも社会的インパクトの高いカルシウム関連材料の開発研究は非常に盛んである。国内トップレベルのご研究の申請を戴くためには、申請勧誘活動が必要であり、我が国が誇る材料研究を発掘してご申請をお願いしたい。

一つの例は、カルシウム化合物触媒の開発である。自然の知恵である植物の光合成反応の触媒に見るようすに、Ca 含有化合物の触媒開発は、まだまだ発展が期待できる分野であるように思う。

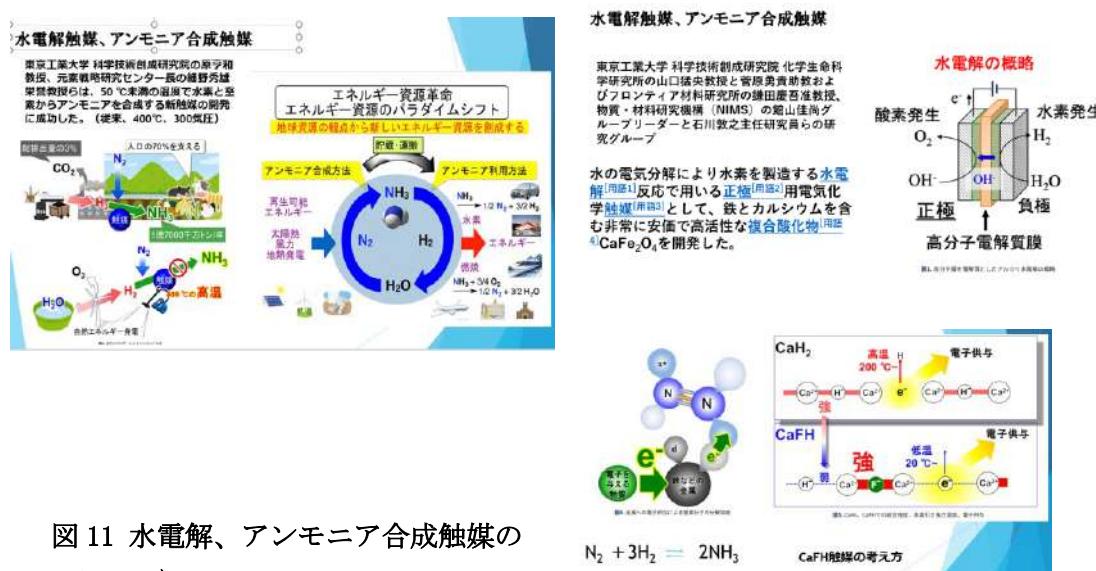


図 11 水電解、アンモニア合成触媒の開発<sup>18)</sup>

例えば、「水電解触媒とアンモニア合成」に用いる東京工業大学（現東京科学大学）のグループが開発した触媒の例がある。NH<sub>3</sub>の合成は、食糧生産やエネルギー開発で注目され、大量に生産されている化学物質である。NH<sub>3</sub>の合成法としては、高校の化学の教科書でなじみ深いHarber-Bosch法が有名であるが、現在でも、鉄触媒を用い、400°C、300気圧程度の反応条件で生産され、大量のエネルギーを要している。東京工大のグループは、カルシウム化合物を触媒として用い、常温、常圧化での合成法を提案している。また、原料である水素も水電解で得るためのカルシウム化合物触媒を開発している<sup>18)</sup>。

一方、カルシウムが活躍するバイオミネラリゼーション、あるいは生物の基礎的物質であり生体親和性が高いカルシウムを用いる生体材料、医用材料の分野の優れた研究の振興を図りたい。とくに、生体材料は、高い生体親和性を利用した代替材料のみではなく、細胞工学、分子生物学や遺伝子工学と融合した次世代生体材料の研究振興を目指したい。

こうした目標を達成するためには、申請勧誘を円滑にする人脈や各分野の詳しい情報が獲得できるシステムの整備が必要であり、人脈作りを検討したい。

#### 4.5 振興会の向かうべき道

現代社会が抱える深刻、かつ重要な課題は、地球上で共通である。例えば、現在、全ての国々が温暖化に伴う気候変動に苦しんでいる。そこで、1992年「国連気候変動枠組条約締約国会議（COP）の開催が合意され、国際的にCO<sub>2</sub>の排出削減に取り組んでいるが、あろうことか？ 大量のCO<sub>2</sub>排出国で、国連常任理事国であるアメリカがCOPからの脱退騒ぎを起こすなど、参加国の中で利害が対立し、なかなか成果が得られていない。

世界の国々との交流・友好なども同様であるが、国と国とが交渉すると難しい問題も個人と個人、あるいは民間代団体同士で協力して問題解決に当たると、規模は小さくても有効である場合が多い。

「白石科学振興会設立の趣意」にも述べられているが、すべての国々において、より良き社会が形成されるために立ちはだかっているカルシウム関連の課題も、世界共通で、夫々の国々が直面する深刻な課題の解決に励んでいく。

したがって、国内でのカルシウム関連の優れた研究の振興が一段落すると、幣振興会の事業を全世界に展開することが必要である。白石グループは、この展開に必要な世界的拠点を、ヨーロッパはオーストリア、北米はアメリカ、東南アジアはマレーシアあるいはシンガポール、アジアは中国に持っている。これらの拠点に、担当者を置き、最初は褒賞制度から初めて、徐々に助成研究制度へと拡大・発展させるのが望ましい。

この時、いきなり研究助成を世界中で実施するのはいろいろな面で困難がある。そこで、まずは国内の研究助成を通じて十分な経験を積んだ数年後、全世界を対象とするカルシウム研究に関する褒賞制度を創設するのが得策であると思う。カルシウム関連研究に高い業績をお持ちの大学の先生または研究機関の研究者1～3人の方々に、褒賞として賞牌と副賞を贈呈するのはいかがだろうか。

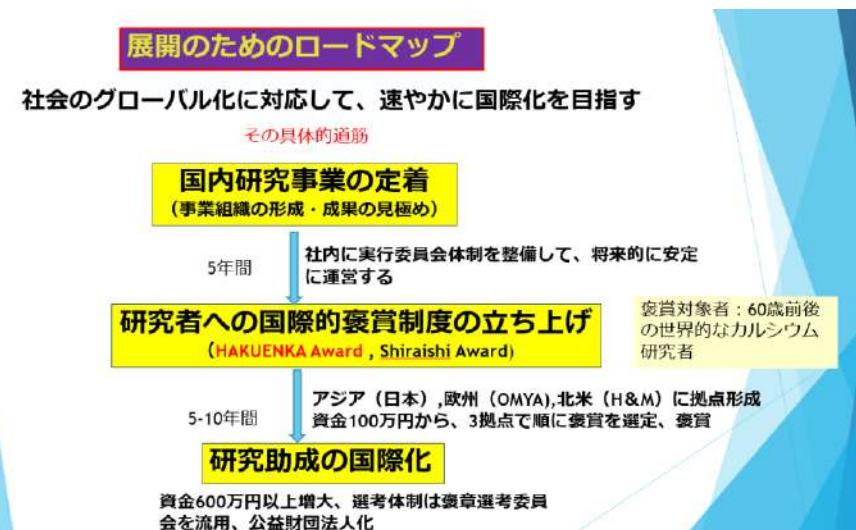


図 12 「白石科学振興会」展開のためのロードマップ

数年間、褒賞制度を実施することにより、世界的なレベルで、カルシウム関連研究の振興を行う団体として「白石科学振興会」が認知されとともに、信頼を得ることができ、世界の事業実施拠点の体制の整備が進むだろう。その後、研究助成制度の導入に移行するのが円滑な発展の道だろうと思われる。

褒賞も研究助成も受賞候補者を選考する委員会が必要であり、海外の各拠点に当該地域のカルシウム研究の専門家を中心とする選考委員会を設置するのが適当である。各地域の選考委員会から受賞候補者の提案をもとに、本部（中之島本社）選考委員会で受賞者を決定するなどの方法が考えられる。いろいろなオンライン会議システムが発達しているので、グローバルな会議も容易になった。

いずれにしても、国内でそうであったように、世界の多くの方々が、世界初めてのカルシウム関連の研究振興会の出現を大いに喜んでくださることと思う。

#### 引用文献

- 1) Mizunuma M., Hirata D., Miyahara K., Tsuchiya E., Miyakawa T, : Nature, 392:303-306, 1998
- 2) Toyota,M. et al.; Science,361,1112(2018)
- 3) Youtube 、NHK スペシャル「超・進化論」, 第1集 植物からのメッセージ～地球を彩る驚異の世界～」、NHK, 2022
- 4) NHK スペシャル「超・進化論」
  - (1) 「植物からのメッセージ～地球を彩る驚異の世界～」、2022年11月6日(日)放送、NHK
  - (2) 「愛しき昆虫たち～最強の適応力～」2022年11月13日(日) 放送、NHK

- (3) すべては微生物から始まった～見えないスーパーワールド～」2023年11月8日  
(日) 放送、NHK
- 5) Youtube 、5分で伝える NHK スペシャル「超・進化論」, 第1集 植物からのメッセージ～地球を彩る驚異の世界～」NHK, 2022
  - 6) Youtube 、5分で伝える NHK スペシャル「超・進化論」, 植物たちにはおしゃべりする能力が！、NHK, 2022
  - 7) 井手利憲、分子生物講義中継番外編「生物の多様性と進化の驚異」、羊土社、2010
  - 8) (独法) 環境再生保全機構、大気環境の情報館～私たちのくらし：大気
  - 9) 門屋辰太郎、地球惑星環境進化論（第1回）、日本惑星科学会誌、24巻、3号、294頁  
(2012)
  - 10) 江橋節郎、JT 生命誌研究館、「カルシウムと私」
  - 11) 境 慎二、2022年度白石科学振興会研究助成申請書
  - 12) 萩 崇、2022年度白石科学振興会研究助成申請書
  - 13) 堀田耕司；2023年度白石科学振興会研究助成申請書
  - 14) 堀田耕司、NHK「サイエンスゼロ～常識を超える驚異の生き物！ホヤが明かすヒトの謎～」, 2023年4月16日放送
  - 15) 小幡亜希子；2023年度白石科学振興会研究助成申請書
  - 16) 木須一彰、東北大学プレリリース「カルシウム蓄電池の長期充放電に成功」、東北大学、  
(2023年5月23日)
  - 17) 読売新聞、「光合成100年の謎、解明へ前進」(2024年2月4日朝刊)
  - 18) 東工大(現 Institute of Science Tokyo)ニュース、「100°Cの低温でアンモニアを合成する鉄触媒の開発に成功」、(2023年4月18日公開)

## 「おわりに」

研究助成ならびに育成助成受贈者の多大なご協力を得て、初めての年報を無事に発行することが出来ました。

「はじめに」でも述べられている通り、年報の刊行目的は、事業の成果を確認し、その結果を次年度以降の振興会の発展に役立てることです。

この年報では、初年度に助成をさせて戴いた先生方と学生さんからの成果報告を掲載することが出来ました、全ての方々が提出締め切り日までに大変優れた内容の成果報告書をご提出いただき誠に有難うございました。とくに、研究助成成果報告のいくつかは、世界的にレベルが高い事で定評のあるジャーナルにご公表いただくななど、初年度としては充実した成果が挙がったものと存じます。

本年報に掲載した記事は大変多方面に渡っており、その記載には十分注意して編集したつもりですが、表現や引用などが不十分な個所などが多くあるものと存じます。広範な研究分野で、不慣れであることに免じてご容赦のほどお願い申し上げます。いろいろなお立場から、ご高見、ご提言などお寄せ頂ければ幸甚に存じます。何卒、よろしくお願い申し上げます。（編集人、日高重助）

# 白石科学振興会 2022 年度・2023 年度年次報告

(No. 1・N0. 2 合併号) 2024 年 3 月 31 日発行

**Shiraishi Science Promotion Association , ANNUAL REPORT  
2023(No.1 & No.2)**

発 行	白石科学振興会
事務局担当者	國井、織田
住所	〒660-0085, 兵庫県尼崎市元浜町 4 丁目 78 番地
TEL	(06) 6417-3130
<a href="http://wwwshiraishi.co.jp/about/shiraishi-fsd/">tps://wwwshiraishi.co.jp/about/shiraishi-fsd/</a>	

# 白石科学振興会

〒660-0085

兵庫県尼崎市元浜町 4 丁目 78

TEL (06)6417-3130