

FFC セラミック水™による植物アピラーゼの活性化作用

豊田 和弘・松岡 祥子・目黒あかね^{b)}・長谷川幸子^{b)}
西村 富生^{b)}・久能 均^{a), b)}・白石 友紀

(応用植物科学コース)

FFC Ceramic Water™ Enhances Plant Apyrase Activity

Kazuhiro Toyoda, Sachiko Matsuoka, Akane Meguro^{b)}, Sachiko Hasegawa^{b)},
Tomio Nishimura^{b)}, Hitoshi Kunoh^{a), b)} and Tomonori Shiraiishi

(Course of Applied Plant Science)

The FFC ceramics™ from FFC Japan Co., Ltd. are now widely used in the fields of agriculture, fishery and food industry in Japan. Recently the FFC ceramic beads-based technology has been also applied to meet several environmental problems including pollution in sea, lakes and rivers. In this study the FFC ceramic water was tested for effect on plant enzyme, potato apyrase (EC 3.6.1.5; ATP-diphosphohydrolase), which hydrolyses nucleoside triphosphate (NTP) and -diphosphate (NDP) to produce corresponding nucleoside monophosphate (NMP) and inorganic phosphate (Pi). Addition of the FFC ceramic water to the enzyme reaction mixture markedly enhanced ATP-hydrolyzing activity, when used as ATP as substrate. However, the concomitant presence of Ca²⁺ chelator, EGTA (*O,O'*-bis(2-aminoethyl)ethyleneglycol-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid) with the FFC ceramic water, completely abolished the enzyme activation. In fact, exogenous calcium ion such as CaSO₄ mimicked the FFC ceramic water. These results indicate that apyrase activation by the FFC ceramic water largely depends on calcium ions. On the other hand, when the FFC ceramic water prepared from “used” ceramics was tested for the apyrase activity, the enhanced effect on apyrase was decreased compared to the FFC ceramic water from “new” ones. This result, consistent with our present data covering concentration of calcium ions and conductivity, indicates that long and/or successive usage of the ceramic beads results in decrease of contents of released minerals, especially calcium ions. The apyrase-based enzyme assay presented here is probably applicable to estimate and quantify the effect of FFC ceramic water.

Key words : apyrase, ATP-diphosphohydrolase, calcium ion, FFC ceramic™, FFC ceramic water™

緒 言

FFC セラミック水™ (三重県津市, (株)エフエフシー ジャパン) は, 動植物や微生物を取り巻く自然環境によい水を生むとされ, 最近では, 海水や河川などの浄化や土壌の改質, 作物の生育促進作用など広範な場面での利用が期待されている^{8-10, 11, 15}). Nakano and Kuboki¹¹)によれば, 湖底から採取した底質土壌に FFC セラミック水を添加すると, 底質中の酸化還元状態に影響し, セラミック表面から遊離する Fe²⁺ が硫化水素と反応して底質中の硫化水素濃度を減少させる作用があるとされている. 環境浄化に関する事例については, ハーバード大学公衆衛生学研究領域・シャイン教授ら¹⁵)も言及しており, FFC セラミック水の水圏環境への直接投与によって, 汚水や汚泥中の重金属を除去することができる可能性が述べられている. 一方, 農業分野では, 酪農, 養豚, 採卵鶏などの畜産経営や納豆・豆腐製造などの食品産業

ですでに利用されており, その導入を契機に経営努力との相乗効果によって技術面・経営面での新しい展開を踏み出した先進事例がいくつか報告されている¹⁹).

このような中, (株)赤塚植物園・生物機能開発研究所では, FFC セラミック水 (定量の FFC セラミック水を一定量の水に一定時間浸漬して調製した水, FFC 水と表記) の植物に対する作用に関する研究が進められ, FFC 水に浮かべたオオムギ (*Hordeum vulgare* L.) の子葉鞘

Received October 1, 2009

a) 岡山大学大学院自然科学研究科 FFC テクノロジー寄付講座

(Laboratory for FFC technology, The Graduate School of Natural Science and Technology, Okayama University)

b) 赤塚植物園生物機能開発研究所

(Institute for Biological Process Research, Akatsuka Garden Co. Ltd.)

組織にオオムギうどんこ病菌 (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*) の分生胞子を接種すると、被侵入細胞で起こる細胞質凝集が長時間持続し、侵入部に形成されるパピラ (防御機構の1つ) が水道水に浮かべた場合のそれと比べて顕著に大きくなって感染率の有意な低下を伴うことが示された⁸⁾。この結果から、Meguro⁸⁾は、オオムギ細胞の防御機構を担う代謝系がFFC水の処理によって亢進し、パピラ形成を含む動的な防御機構が促進され、結果として侵入抵抗性 (耐病性) が向上するとしている。

これまでに、FFC水は、「抗菌性がある」あるいは「FFC水で処理した食品は腐敗しにくい」などとする抗菌作用を示唆する事例がよく知られている。実際、蒸留水を対照水とした我々の実験でも、FFC水そのものに病原糸状菌の発芽や発芽管伸長を抑える静菌作用があることが確認されている¹⁶⁾。しかし、植物に対する作用の実態はこれまでほとんど明らかにされておらず、またその効果が広範な植物種にあてはまるのかについても定かでない。そこで、本研究では、植物に対する作用を明らかにする目的で、植物の細胞内外で働く基本酵素アピラーゼ (EC 3.6.1.5; ATP-diphosphohydrolase) に着目し、精製酵素の活性に及ぼすFFC水の直接的な影響について検討することにした。アピラーゼは、植物細胞の細胞壁、細胞膜、細胞質や核などの細胞小器官に存在し、根、茎、葉などの様々な器官において、以下に示すように、ヌクレオシド三リン酸 (NTP) や二リン酸 (NDP) の加水分解を通して直接的あるいは間接的に細胞機能を調節する酵素である^{5,6,13,14)}。動物細胞では、神経末端のシナプス領域において、情報伝達物質となるATPを加水分解する働きがあり、細胞の基本的機能を担うことが知られている^{7,12)}。



本研究で使用した酵素はジャガイモ塊茎組織から精製されたものであるが、根圏あるいは地上部からの養水分の吸収の際に本酵素と水の接触は必至であると考えられた。本報では、本酵素をモデルとして、FFC水が生体酵素に及ぼす直接的な作用を明らかにするとともに、植物への施用によって効果が現れる耐病性獲得作用との関連についても併せて考察する。

材料と方法

FFCセラミック水の調製

(株)赤塚植物園・生物機能開発研究所より分譲された FFC セラミック (径約1.6 cm; Lot.No. 16.05.08.05) 20 g を秤量し、1 L の蒸留水 (Direct-Q UV, Millipore) に一晚浸漬し、この浸漬水を FFC セラミッ

ク水 (以下、FFC 水と表記する) として用いた。このように調製した FFC 水の酸化還元電位 (ORP)、導電率ならびに pH を測定したところ、Table 1 に示すように、ORP には大きな違いはないが、蒸留水と比べて若干の pH の低下と導電率の顕著な上昇が認められた。また、FFC 水に含まれる (FFC セラミックから遊離する) 無機元素類について、エネルギー分散型 X 線分析装置 (EMAX-5770W, Horiba) で事前に調べた結果、FFC 水に含まれる主要元素は Ca ならびに S であった¹⁶⁾。これらの結果は、FFC 水にはセラミックから遊離した電解質 (塩類) が含まれているものと考えられた。そこで、FFC 水に含まれる塩類などの酵素活性に対する直接的な作用を除くため、Ca²⁺キレート剤である EGTA (グリコールエーテルジアミン四酢酸; 同仁化学) の添加、あるいは市販の脱塩カラム (Bio-Gel P-10gel, Bio-Rad) で処理した FFC 水を以下の実験に使用した。

アピラーゼ酵素標品の調製

アピラーゼは、市販のジャガイモ塊茎組織より精製された可溶性標品 (A6410, Sigma-Aldrich) を使用した。すなわち、乾燥標品が含まれるバイアル瓶に適量の超純水を加えて溶解し、少量に分注して使用前まで -30℃ で保存した。

アピラーゼ活性の測定

アピラーゼは NTP ならびに NDP を基質とし加水分解によって無機リン酸 (Pi) を生成する。本酵素の塩基に対する厳密な基質特異性はないとされている⁶⁾。本実験では、ATP (A2383, Sigma-Aldrich) を基質として用い、Kiba *et al.*⁴⁾の方法に従って、以下の反応液中で生成する Pi を定量することで酵素活性を測定した。すなわち、1.5 mL 容のエッペンドルフチューブ内の底部に ATP ならびに定量の FFC 水 (または蒸留水) を予め加え、チューブ蓋の裏に付着させた酵素液 5 μL (0.02 μg) を遠心で落下させて酵素反応を開始した。なお、反応液の全量は 50 μL とし、ATP の終濃度は 3 mM、反応液の pH は 30 mM Tris/MES で pH 6.5 となるように調整した。酵素反応は、37℃ に調整したウォーターバスで 20 分間行い、終

Table 1 Oxidation-reduction-potential (ORP), conductivity and pH of FFC ceramic water™ prepared from distilled water

Water tested	ORP (mV) at 23.4°C ^{a)}	Conductivity (mS/m) at 23.4°C ^{b)}	pH at 23.4°C ^{c)}
Distilled water	330	0.199	6.5
FFC ceramic water ^{d)}	311	9.78	4.9

a) ORP value was measured with a Horiba pH/Conductivity D-54 meter (9300-10D).

b) Conductivity was measured with a Horiba pH/Conductivity D-54 meter (3352-10D).

c) pH was measured with a Horiba pH/Ion D-53 meter (9669-10D).

d) FFC ceramic water was prepared from laboratory grade distilled water, according to the Akatsuka's protocol.

了後直ちに氷上に移して、随時調製した10% (w/v) アスコルビン酸水溶液と0.42% (w/v) モリブデン酸アンモニウム (1 N H₂SO₄に溶解) の1 : 5混液100 μ lを速やかに加えた。その後、反応液をよく混和後、25℃に調整したウォーターバスに20分間移し、ATP から生成した Pi とモリブデン塩との錯体形成で呈した青色を吸光度 820nmで測定した (Shimadzu UV-VIS mini 1240)。なお、酵素の非添加区を実験毎に設け、基質の自然分解で生じた Pi を測定し、酵素を添加した各処理区の数から差し引いて酵素活性を求めた。

カルシウム濃度ならびに導電率の測定

カルシウム濃度は、(株)堀場製作所のカルシウムイオン電極 (6583-10C) を使用し、同社の D-53型 pH・イオン計で測定した。同様に、導電率についても(株)堀場製作所の導電率セル (3552-10D) を用いて D-54型 pH・導電率計で測定した。

結果と考察

前述のように、アピラーゼは NTP または NDP を加水分解し、NMP と Pi を生成する酵素である^{5,6)}。著者らの研究によれば、本酵素は病原菌が分泌する病原体分子パターン (抵抗性誘導因子; エリシター) に直接反応して ATP 加水分解活性が促進されること、また、重金属や一部の植物ホルモン (サリチル酸, ジヤスモン酸) にも応答することが明らかとなっている^{3,4,17)}。事実、本酵素の活性化 (亢進) と生体組織における防御応答の開始は関連し、病原糸状菌が生産する病原性エフェクター (抵抗性抑制因子; サプレッサー) は、逆にアピラーゼを標的として活性を著しく低下させる^{3,4)}。本研究では、ジャガイモ塊茎由来の精製アピラーゼをモデルとして、本酵素がもつ ATP 加水分解活性に及ぼす FFC 水の影響に調べた結果、Table 2 に示すように、FFC 水の調製に用いた蒸留水 (対照区) と比べて、FFC 水を添加した反応液では、ATP の加水分解で生成する Pi は約 2 倍に増加した。このことは、FFC 水を加えた反応液では、アピラーゼがもつ加水分解活性が著しく促進されたことを示している。事実、添加した FFC 水の反応液中に占める割合を変化させて同様に酵素活性を調べたところ、アピラーゼ活性は添加量に応じて増加することが示された (データには示さず)。

一般に、酵素活性を左右する要因には、反応温度、pH、定量の反応液に含まれる基質濃度や酵素量、あるいは共存イオンの有無などが挙げられる。先に、FFC 水に含まれる無機元素類について、エネルギー分散型 X 線分析装置で調べられた結果、主要な元素は Ca ならびに S であった¹⁶⁾。そこで、FFC 水に含まれるカルシウムの酵素活性に及ぼす直接的な影響を調べる目的で、遊離の Ca²⁺ を捕捉する EGTA を反応液に加え、その効果について検討した。この結果、Table 3 に示したように、EGTA

非存在下には、FFC 水の添加によってアピラーゼ活性が約 2 倍に増加したのに対し、EGTA 存在下には活性化作用は完全に消失した。この結果は、FFC 水によるアピラーゼの活性化作用が Ca²⁺ に依存していることを示す。次に、FFC 水の主要塩類と推定された硫酸カルシウム (CaSO₄) の添加がアピラーゼ活性に及ぼす影響について調べた。結果、反応液への 10 μ M の添加で活性化が促進され、その作用は濃度依存的に認められた (Table 4)。同様の作用は、塩化物塩 (CaCl₂) ならびに硝酸塩 (Ca(NO₃)₂) でも認められ、カルシウム塩に含まれる陰イオンの種類によって明確な違いは認められなかった (データには示さず)。これらの結果と、EGTA による阻害効果 (Table 3) を考え合わせると、活性化作用の一部は FFC 水に含まれる Ca²⁺ が担っているものと推定された。事実、FFC 水を市販の脱塩カラムで処理する

Table 2 Activation of apyrase activity by FFC ceramic water

Water tested	Apyrase activity (Abs. at 820nm) ^{a)}	% of control ^{b)}
Distilled water (control)	0.579 \pm 0.047	100
FFC ceramic water ^{a)}	1.120 \pm 0.145*	193.4

a) Data were means with S.D. from triplicate experiments.

b) Data were expressed relatively as % of control.

* Significant difference from control (P<0.01)

Table 3 EGTA, Ca²⁺ chelator abolishes apyrase activation by FFC ceramic water

Water tested	Apyrase activity (Abs. at 820nm) ^{a)}	% of control ^{b)}
Distilled water (control)	0.579 \pm 0.047	100
FFC ceramic water	1.120 \pm 0.145*	193.4
+ 5 mM EGTA	0.406 \pm 0.012**	70.1

a) Data were means with S.D. from triplicate experiments.

b) Data were expressed relatively as % of control.

Different asterisks indicate Significant difference from control (P<0.01)

Table 4 Enhancement of potato apyrase activity by exogenous calcium sulfate

CaSO ₄ (μ M)	Apyrase activity (Abs. at 820nm) ^{a)}	% of control ^{b)}
0 (control)	0.558 \pm 0.012	100
1	0.660 \pm 0.018	118.2
10	0.848 \pm 0.033*	151.9
100	1.536 \pm 0.062*	275.1
1000	2.099 \pm 0.053*	375.9

a) Data were means with S.D. from triplicate experiments.

b) Data were expressed relatively as % of control.

* Significant difference from control (P<0.001)

Table 5 Reduction of apyrase activation by desalted FFC ceramic water

Water tested	Apyrase activity (Abs. at 820 nm) ^{a)}	% of control ^{b)}
Distilled water (control)	0.452 ± 0.041	100
FFC ceramic water	1.429 ± 0.102*	316.2
Desalted FFC ceramic water ^{c)}	0.725 ± 0.016**	160.5

a) Data were means with S.D. from triplicate experiments.

b) Data were expressed relatively as % of control.

c) Fresh FFC ceramic water was desalted with a Bio-Gel P-10gel (Bio-Rad). Different asterisks indicate significant difference from control ($P < 0.01$).

と、活性化作用が約70%低下することからも支持された (Table 5)。しかし、脱塩後の FFC 水にも弱いながらも活性化作用が認められることから、FFC 水によるアピラーゼの活性化作用には Ca^{2+} 以外の要因も否定できず、今後の課題として残される。

現在、FFC セラミックスに関連した農業資材として、FFC エースTMが(株)エフエフシー・ジャパンから販売されている。2006年秋から3年間実施された、本資材を混入した土壌におけるオオムギの生育ならびに収量調査の結果によると、オオムギの光合成速度は非導入区と比べて高い値で推移するだけでなく、収量が最大で約1.7倍にまで増加することが示されている¹⁾。また、室内試験ではあるが、FFC セラミック水を灌水し生育させたコマツナは水道水の場合と比べて生重量が約1.4倍高くなるという結果も得られている¹⁸⁾。同様の結果は、アブラナ科植物であるシロナを実験材料とした Mitchell *et al.*¹⁰⁾も示しており、FFC 水あるいは関連資材の農業分野での活用が期待できる。白石ら¹⁶⁾は、エンドウ褐紋病の原因となる *Mycosphaerella pinodes* を用いて、FFC 水そのものに本病原菌の柄胞子の発芽やそれに続く侵入に対して直接的な静菌作用 (抗感染作用) があることを示している。しかし、前述の Meguro⁸⁾ のオオムギ細胞での観察結果、ならびに本研究で明らかとなったように、FFC 水そのものが植物酵素に直接作用して活性を亢進させる作用をもつことを考えると、FFC 水は病原菌に直接作用して侵入を妨げるだけでなく、同時に植物側の代謝系に作用し、双方への相加的もしくは相乗的な効果によって病原菌による侵入を防いでいると考えるのが適切であろう。事実、著者ら²⁾が以前に行った実験結果によれば、アピラーゼの加水分解で生成する Pi を与えたエンドウ組織では、一時的な活性酸素の生成を伴ってある一群の防御関連遺伝子が速やかに活性化し、病原菌に対する抵抗性が誘導される。FFC 水の植物に対する作用については、現在、シロイヌナズナのマイクロアレーによる解析を進めており、今後さらに詳細なメカニズムの解明のもとに、生産者 (栽培者) にとってより経済的で効果的な施用法の開発が望まれるところである。

(株)エフエフシー・ジャパンが販売する一般家庭用の

FFC セラミックスは、着脱式の金属製カートリッジ内に詰められており、内部のセラミックスが交換可能な仕様となっている。そこで、FFC 水によるアピラーゼの活性化作用と、セラミックスの使用頻度との関連性について調査した。すなわち、2000年以降に回収された使用済のセラミックス (使用セラミックスと表記する) を秤量して適量の蒸留水に浸漬し、この浸漬水の活性化作用とカルシウム濃度を測定した。それらの結果を Table 6 にまとめた。なお、未使用のセラミックスを蒸留水に浸漬して作製した FFC 水を対照とし、使用場所や使用年数が異なる計10種類 (A, C, D, 1, 2, 4, 5, 6, 8, 9と表記) のサンプルから調製した浸漬水と比較することとした。この結果、未使用のセラミックスから調製した FFC 水はアピラーゼの活性を約2.7倍に増加させたが、使用セラミックスからの浸漬水の活性化作用はいずれも低下しており、特にサンプルCおよびDの作用はほぼ蒸留水レベルとなった (Table 6)。同様に、それぞれの Ca^{2+} 濃度を測定した結果、未使用セラミックスから調製した FFC 水の濃度は 27.3 mg/ml であったのに対して、使用セラミックスからのそれらは 0.569~1.18 mg/ml となり、この濃度の序列はアピラーゼに対する活性化作用と逆相関していた (Table 6)。同様の結果は、それぞれの電気伝導度値にも認められ、継続的な使用によってセラミックスから遊離する塩類の溶出量が大きく低下するものと推察された。今後、アピラーゼに対する活性化作用が FFC セラミックスの品質やその効果を定量的に確かめることのできる指標の一つとして利用されることを期待したい。

要 約

本報は、FFC セラミックスTM (株)エフエフシー・ジャパン) で調製した FFC セラミック水 (FFC 水) の植物アピラーゼ (EC 3.6.1.5) の活性に及ぼす直接的な作用について調べたものである。FFC 水はアピラーゼがもつ ATP 加水分解活性を促進し、その作用は反応液への添加量に依存した。先の無機元素分析結果から、FFC 水に含まれる主要な塩類は Ca^{2+} であることが判明している。そこで、 Ca^{2+} キレート剤 EGTA を反応液へ加え、その影響について調べたところ、FFC 水による活性化作用は消失することが明らかとなった。また、FFC 水と類似の作用は、硫酸カルシウム、塩化カルシウムまたは硝酸カルシウムの添加で認められ、陰イオンの種類によって明確な違いはなかった。これらの結果から、FFC 水が植物アピラーゼに及ぼす活性化作用の一因は、セラミックスから遊離する Ca^{2+} に依存しているものと推察された。一方、アピラーゼ活性を指標として、使用済のセラミックスから調製した FFC 水の効果について検討したところ、未

Table 6 Reduction of apyrase activation, concentration of Ca²⁺ and conductivity for FFC ceramic water prepared from “used” ceramics

Water tested	Apyrase activity (Abs. at 820nm) ^{a)}	% of control ^{b)}	Concentration of Ca ²⁺ (mg/mL) ^{c)}	Conductivity (ms/m) ^{d)}
Distilled water (control)	0.367±0.021	100	0.599	0.465
Fresh FFC ceramic water ^{e)}	0.983±0.101 ^{g)}	267.6	27.3	8.69
FFC ceramic water from used ceramics ^{f)}				
A	0.585 ± 0.038*	159.2	0.584	0.589
C	0.401 ± 0.047*	109.3	0.596	0.582
D	0.399 ± 0.024*	108.6	0.569	0.593
1	0.642 ± 0.037*	174.7	1.05	0.707
2	0.601 ± 0.090*	163.6	1.18	0.877
4	0.554 ± 0.035*	150.7	0.97	0.657
5	0.659 ± 0.005*	179.3	0.881	0.667
6	0.518 ± 0.040*	140.9	0.808	0.648
8	0.539 ± 0.004*	146.8	0.989	0.765
9	0.595 ± 0.013*	161.9	0.756	0.795

a) Data were means with S.D. from triplicate experiments.

b) Data were expressed relatively as % of control.

c) Ca²⁺ were measured with a Horiba pH/Ion D-53 meter (6583-10D).

d) Conductivity was measured with a Horiba pH/Conductivity D-54 meter (3352-10D).

e) Fresh FFC ceramic water were prepared from new beads

f) FFC ceramic water were prepared from used ceramics, according to the Akatsuka's protocol.

g) Significant difference from distilled water (P<0.001)

* Significant difference from the fresh FFC ceramic water (P<0.001)

使用からの水と比べて、カルシウム濃度ならびに活性化作用の顕著な低下が認められた。このことは、継続的な使用によってセラミックスから遊離する塩類、特にカルシウムの溶出量が大きく変わることを意味し、アピラーゼを用いた本検定が、FFC水の効果を定量的に確かめる方法の一つとして利用できると考えられた。以上、これらの結果を総合して、FFC水の植物酵素への直接的な作用、ならびに植物への施用によって効果が現れる耐病性獲得作用との関連について考察した。

謝 辞

本論文は、2006年8月、本学大学院自然科学研究科に設置されたFFC寄付講座において行われた研究の一部をまとめたものである。御援助を頂いた株式会社赤塚植物園に深く感謝する。

文 献

- 1) Fujita, K., T. Suzuki, S. Hasegawa, A. Meguro, H. Sugiura, K. Toyoda, T. Shiraishi, E. Sakaguchi, T. Nishimura and H. Kunoh: Enhancement of growth and yield of barley by the soil conditioner FFC-ace. (Scientific Reports of the Faculty of Agriculture, Okayama University., **99**, 13-20 (2010))
- 2) Kawahara, T., H. Namba, K. Toyoda, T. Kasai, M. Sugimoto, Y. Inagaki, Y. Ichinose and T. Shiraishi: Induction of defense responses in pea tissues by inorganic phosphate. J. Gen. Plant Pathol., **72**, 129-136 (2006)
- 3) Kawahara, T., K. Toyoda, A. Kiba, A. Miura, T.

Ohgawara, M. Yamamoto, Y. Inagaki, Y. Ichinose and T. Shiraishi: Cloning and characterization of pea apyrase: involvement of *PsAPY1* in response to signal molecules from pea pathogen *Mycosphaerella pinodes*. J. Gen. Plant Pathol., **69**, 33-38 (2003)

- 4) Kiba, A., K. Toyoda, T. Yamada, Y. Ichinose and T. Shiraishi: Specific inhibition of cell wall-bound ATPases by fungal suppressor from *Mycosphaerella pinodes*. Plant Cell Physiol., **36**, 809-817 (1995)
- 5) Hanada, M. and G. Guidotti: Purification and cloning of a soluble ATP-diphosphohydrolase (apyrase) from potato tubers (*Solanum tuberosum*). Biochem. Biophys. Res. Commun., **218**, 916-923 (1996)
- 6) Hsieh, H. L., C. G. Tong, C. Thomas and S. J. Roux: Light modulated abundance of an mRNA encoding a calmodulin-regulated, chromatin-associated NTPase in pea. Plant Mol. Biol., **30**, 135-147 (1996)
- 7) Komoszynski, M. and A. Wojtczak: Apyrases (ATP diphosphohydrolases, EC 3.6.1.5): function and relationship to ATPases. Biochim. Biophys. Acta, **1310**, 233-241 (1996)
- 8) Meguro, A.: One aspects of disease resistance in plants treated with FFC products. In Proceeding of 1st FFC Technology Researcher Meeting (14-16 June, 2008, FFC Hall, Akatsuka Group Headquarter, Tsu, Japan), pp.18 (2008)
- 9) Mills, J. D.: FFC, Pirogen, and the global water supply. In Proceeding of the 2009 International Forum on FFC Technology (24-25 August, 2009, Tokyo International Forum, Tokyo), pp.6-8 (2009)
- 10) Mitchell, R., N. Konkol and C. McNamara: FFC enhances plant growth. In Proceeding of the 2009 International Forum

- on FFC Technology (24-25 August, 2009, Tokyo International Forum, Tokyo), pp. 31 (2009)
- 11) Nakano, Y. and S. Kuboki : Decontamination of lake bottom sludge by FFC Ace/ceramics. *In* Proceeding of the 2009 International Forum on FFC Technology (24-25 August, 2009, Tokyo International Forum, Tokyo), pp. 9-11 (2009)
 - 12) Plesner, L. : Ecto-ATPase : identities and functions. *Int. Rev. Cytol.*, **158**, 141-214.
 - 13) Roberts, N. J., J. Brigham, B. Wu, J. B. Murphy, H. Volpin, D. A. Phillips and M. E. Etzler : A Nod factor-binding lectin is a member of a distinct class of apyrases that may be unique to the legumes. *Mol. Gen. Genet.* **262**, 261-267 (1999)
 - 14) Shibata, K., Y. Morita, S. Abe, B. Stankovic and E. Davis : Apyrase from pea stems : isolation, purification, characterization and identification of a NTPase from cytoskeleton fraction of pea stem tissue. *Plant Physiol. Biochem.*, **37**, 881-888 (1999)
 - 15) Shine, J., J. Horowitz, S. Ivey, K. McCarthy, D. Senn and C. Trapp : The effects of Akatsuka FFC ceramics on the health of water environments. *In* Proceeding of the 2009 International Forum on FFC Technology (24-25 August, 2009, Tokyo International Forum, Tokyo), pp. 34-35 (2009)
 - 16) 白石友紀・豊田和弘・鈴木智子・目黒あかね・長谷川幸子・西村富生・久能 均 : 病原菌の感染行動に対する FFC セラミック水の効果について. *岡山大学農学部学術報告*, **99**, 27-34 (2010)
 - 17) Takahashi, H., K. Toyoda, Y. Hirakawa, K. Morishita, T. Kato, Y. Inagaki, Y. Ichinose and T. Shiraishi : Localization and responsiveness of a cowpea apyrase VsNTPase1 to phytopathogenic microorganism. *J. Gen. Plant Pathol.*, **72**, 143-151 (2006)
 - 18) Toyoda, K. and T. Shiraishi : Plants and FFC water : physiological view on plant responses. *In* Proceeding of 1st FFC Technology Researcher Meeting (14-16 June, 2008, FFC Hall, Akatsuka Group Headquarter, Tsu, Japan), pp. 14 (2008)
 - 19) Yokomizo, I. : The economic effects and efficiencies of FFC in livestock farms and food industries. *In* Proceeding of the 2009 International Forum on FFC Technology (24-25 August, 2009, Tokyo International Forum, Tokyo), pp. 25-28 (2009)