

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 遠藤 良輔

水質汚染や大気汚染等の環境ストレスは、微小藻類、及び高等植物に多大な影響を及ぼしている。このような環境ストレスに対する、早期の光合成障害検知手法は近年長足の進歩を遂げており、特に、画像計測技術の発達には目覚ましいものがある。本論文は、微小領域の立体構造を把握しながら光合成機能の不均一性を可視化できるクロロフィル蛍光顕微画像計測システムを開発し、ストレス下にある微小藻類、及び高等植物細胞の光合成機能障害について、蛍光パラメータを用いて解析を行うことを目的としており、6章で構成されている。

序論の1章に続く2章では、クロロフィル蛍光計測に焦点をあて、クロロフィル蛍光の由来とその計測手法について述べた。さらに、計測微小領域における Φ_{PSII} (光合成電子伝達収率と高い相関を持つ蛍光パラメータ)が算出可能な、クロロフィル蛍光顕微画像計測システムを作製した。

続く3章では、2章で作製した計測システムを用いて、代表的な土壌処理系除草剤の主成分 DCMU が、生育ステージの異なる微小藻類アオミドロ (*Spirogyra distenta*) の光合成機能に与える影響について、飽和パルス法により検討した。DCMU の滴下によって、アオミドロの Φ_{PSII} は低下した。また、 Φ_{PSII} の低下は、生育ステージの若いアオミドロ程顕著であった。アオミドロは、春・秋に大きな増殖期を持つなど、季節的な周期を持つ生活環を有している。本結果から、アオミドロに対する農薬障害は、季節により異なる可能性があることが示唆された。

4章では、組織の立体構造が発達した高等植物の解析を行うため、受動的な3次元(3D)計測手法である shape-from-focus 法を改良し、高さ方向の解析も可能な、クロロフィル蛍光顕微3D画像計測システムを開発した。この手法では、はじめに、同一間隔で複数の焦点面画像を取得した。次に、ピクセル毎の焦点測度を算出して、合焦距離を求めた。この際、各ピクセルにおける最適なマスクサイズが自動的に選択されるよう、従来の焦点測度フィルタを改良した。また、焦点測度の最大値をとる焦点面と、その前後の焦点面の3つから正規分布を近似し、その頂点に相当する値をもって合焦地点とした。この処理によって取得する焦点面画像の枚数を大幅に削減し、計測中にサンプルが移動してしまう従来の手法の問題点を改良した。さらに、ムラサキツユクサ (*Tradescantia ohimensis*) 葉の海綿状組織における葉肉細胞を対象に、合焦地点のz座標から3D画像を、またピクセル値から合焦蛍光画像を求めた。これらを統合して3Dクロロフィル蛍光顕微画像を算出した。

さらに5章では、本システムに飽和パルス法を適用し、中濃度オゾン(300ppb)を曝露して可視害が確認されたヒマワリ (*Helianthus annuus*) 葉海綿状組織の葉肉細胞に対して、3Dクロロフィル蛍光顕微画像計測を行った。そして、取得した焦点面クロロフィル蛍光画像

から、合焦蛍光画像と 3D 画像を算出した。さらに、明期定常状態の合焦蛍光画像と飽和パルス光照射時の合焦蛍光画像から合焦 Φ_{PSII} 画像を算出した。これらを用いて、蛍光強度、及び Φ_{PSII} と高さの関係について、ピクセル毎に解析した。オゾン曝露前のヒマワリ葉は、顕微鏡視野内にわたって、ほぼ均一な蛍光強度分布を示した。一方、オゾン曝露後のヒマワリ葉では不均一な蛍光強度の分布が見られた。また、表皮に近い領域ほど蛍光強度は顕著に低下した。可視画像との比較により、蛍光強度分布と気孔の位置には関係がみられなかった。次に、 Φ_{PSII} の分布、及び高さとの関係を調べた。オゾン曝露後の蛍光画像が不均一な強度分布を示した一方で、 Φ_{PSII} はオゾン前後で顕著な変化は見られず、顕微鏡視野全体にわたってほぼ均一な値で分布していた。この結果から、オゾン曝露によって蛍光強度の低下した、表皮に近い海綿状組織においても、オゾン曝露前とほぼ同様の電子伝達収率が維持されていることがわかった。このことは、オゾン曝露によって生じる光合成障害が、必ずしも光合成電子伝達収率の低下によってもたらされているわけではないことを示唆していた。続く 6 章では、本論文の総括がなされている。

以上、本論文では、3D 解析が可能なクロロフィル蛍光顕微画像計測システムを開発し、そのシステムを用いて環境ストレスが微小藻類及び高等植物細胞に与える影響について検討した結果、細胞レベルでの光合成機能障害について新たな知見を得ており、学術上貢献するところが少なくないと考えられる。よって審査委員一同は、本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。