

[ 別紙 2 ]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 小西 充洋

植物の生体画像計測技術の一つであるクロロフィル蛍光画像計測は、主に、個葉の光合成反応の不均一性を捉える手法として用いられている。しかし、植物個体や細胞は、本来、立体的な構造をもつ。さらに、その構造の変化は、植物の成長や環境ストレスの影響を反映するため、三次元形状も植物の生体情報として重要である。本論文は、クロロフィル蛍光画像計測を植物個体および葉緑体レベルに適用し、三次元計測が可能なシステムの開発と、それを用いた光合成電子伝達反応の解析を行ったものであり、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おけるインダクション法および飽和パルス法の原理とその特徴、さらにそこから得られる情報についてまとめた。続く3章では、三次元クロロフィル蛍光画像計測システムの開発に先立ち、個葉の二次元クロロフィル蛍光画像計測システムと、通常の光学顕微鏡を用いたクロロフィル蛍光顕微画像計測システムの作製を行い、作用機作に不明な点の多い植物のオゾン曝露障害の画像解析を行った。その結果、オゾン曝露によって色素量が減少した細胞においても、PSII量子収率の低下は必ずしも生じないことが示された。さらに、モザイク状に色素量が減少した植物葉から、斑点状に現れる熱放散活性の増大によるPSII量子収率低下部を抽出することができた。

4章では、3章で作製し、有効性を確認した二次元クロロフィル蛍光画像計測システムを、より広範囲の計測が可能なシステムに改良し、さらにイメージングライダーを導入し、三次元計測を行った。このシステムによって、クロロフィル蛍光画像と、各葉の上下関係や傾き、葉面の凹凸等が同時に把握できるようになった。また、このシステムが形状の異なる植物個体（メロンおよびヒマワリ）のクロロフィル蛍光解析に適用可能であることを示した。そして、植物個体内における除草剤による光合成電子伝達障害の拡大の様子の可視化を行った。メロン個体に処理された土壌処理型除草剤（ネコソギエース）の光合成電子伝達障害は、インダクション法で得られる定常蛍光強度  $T$  によって検知が可能であり、蒸散が不活発と考えられる最下位葉および最上位葉へはあまり拡大せず、蒸散が最も活発と考えられる成熟葉に拡大することが示された。また、ヒマワリ葉に塗布された茎葉処理型除草剤（バスタ）の光合成電子伝達障害は、インダクション法で得られる最大蛍光強度  $P$  によって検知が可能であり、処理領域周辺と処理葉の上位葉に移動することが示された。

5章では、共焦点レーザースキャン顕微鏡を用いた三次元クロロフィル蛍光顕微画像計測システムの開発を行った。ここでは、微小領域の計測に適した飽和パルス法を適用するため、計測対象にほぼ均一な光照射のできるニポウディスク式のレーザースキャン顕微鏡に、減光フィルタを装着したシャッターを組み込むことによって、植物にダメー

ジを与えない照射光強度でレーザー光を調節できるようにした。さらに、比較的弱い光照射時にも高速で動画像が計測できる高感度の EM-CCD カメラを用いた。実験材料としてはタマシダを用い、飽和パルス光照射から 0.2 秒以降、2 秒間程度、初期電子受容体である  $Q_A$  の飽和状態が持続することを確かめた。そして、ピエゾ Z スキャン装置を用いることによって、約 2 秒間で 64 枚の焦点面画像を取得できるようになった。この結果、一回の飽和パルス光照射につき、一つの三次元画像構築が可能となり、計測時間が飛躍的に短縮された。このシステムを用いることによって、深さ方向に存在位置の異なる葉緑体のクロロフィル蛍光画像計測が可能となり、立体的な構造とともに、PSII 量子収率の葉内分布を示すことができた。このことから、葉肉細胞内の葉緑体に比べ、孔辺細胞内の葉緑体の  $CO_2$  固定能力が小さい可能性が示唆され、また、表皮細胞内の葉緑体の光合成電子伝達系は、初期電子受容体である  $Q_A$  以降で阻害を受けている可能性が示された。これらの器官ごとの光合成電子伝達反応の相違は、本システムを用いて初めて得られた知見である。続く 6 章で総括がなされている。

以上、本論文では、植物個体および葉緑体レベルにおいて、三次元情報を得ることができるクロロフィル蛍光画像計測システムを開発し、それを用いて、従来法では得られない知見を得ており、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。