

# 論文審査の結果の要旨

氏名 小野木 智加朗

本論文は、生細胞の共鳴ラマン測定を行うための多波長励起顕微ラマン分光装置の開発、応用を中心に、生細胞の顕微ラマン分光について記述されており、全5章から構成される。

第1章では導入として、生細胞の分子レベルでの理解の重要性と、それに対する顕微ラマン分光法の有効性が示されている。顕微ラマン分光法による豊富な分子の情報や簡便性、非侵襲性について解説され、他の *in vivo* 測定法に対する利点が記述されている。一方で現状、感度の問題で検出できない微量分子種の存在にも言及している。それに対し、共鳴ラマン効果を応用することの意義が述べられている。

第2章では多波長励起顕微ラマン分光装置の開発と生細胞への応用の結果が示されている。励起波長として 457.9, 488, 514.5, 532, 568.1, 632.8, 647.1 nm の使用が可能であり、様々な波長で生細胞のラマン測定が可能となる。また、457.9, 532, 632.8 nm については高い位置再現性（面内方向: ~ 50 nm, 光軸方向: ~ 200 nm）で同一試料を励起可能となった。これにより空間分解能に対して十分な精度で、同じ空間点のラマンスペクトルを異なる励起波長により測定できることが示された。

生細胞への応用として、出芽酵母、動物細胞の測定例が示されている。457.9 nm 励起により Cytochrome c oxidase が、532 nm 励起により Cytochrome b, c が十分な S/N 比で検出された。また、457.9, 532, 632.8 nm で測定されたラマンイメージが示され、各励起波長に特徴的な分子種のイメージが得られた。同時に「生命のラマン分光指標」に関して、空間分解励起プロフィールが測定され、当該バンドの前期共鳴ラマン効果の存在が示唆された。上記のとおり多波長励起によるラマン測定が既存の測定に比べ、多くの有用な情報をもたらすことが示されている。

第3章では「生命のラマン分光指標」の光褪色現象について述べられている。「生命のラマン分光指標」は生細胞の代謝活性を反映すると考えられているがその帰属は明らかとなっていない。本章では野生株に対して、呼吸欠損株の「生命のラマン分光指標」が、励起レーザー光により、光褪色を起こすことが述べられている。また、励起レーザーの強度、波長による褪色速度の依存性も検証された。これより、その帰属分子が生細胞内の過渡種である可能性が議論されている。

高い時間分解能を用いた、光褪色現象の測定では特異値分解解析による詳細な解析結果が示されている。この中で光褪色により減少するスペクトル成分が複数存在することが示されている。本章では、「生命のラマン分光指標」の帰属や生細胞内でのダイナミクスに関する知見が得られると同時に、時空間分解ラマン分光法が生細胞研究に極めて重要な手法であることが強調されている。

第4章では生細胞の同位体置換効果について述べられている。炭素安定同位体を含むグルコースを用いた実験においては、脂質とともに「生命のラマン分光指標」に明瞭な同位体置換効果が観測され、その振動モードがC=C伸縮振動に帰属されることが示されている。加えて、水素安定同位体を含むグルコースによる実験から、水素が直接結合していないC=C結合の可能性に言及し、「生命のラマン分光指標」の帰属候補として、セミユビキノラジカルアニオンが提唱されている。

炭素安定同位体を炭素源とした出芽酵母の培養を時系列で追跡した実験では、細胞内の炭素が $^{12}\text{C}$ から $^{13}\text{C}$ に置換される様子が数時間の分解能のオーダーで測定された。細胞内での物質の新陳代謝の時間スケールについて議論されている。

第5章は以上の研究結果を総括している。

本研究により、多波長励起顕微ラマン分光装置が開発され、生細胞内の非共鳴分子種に加えて、共鳴効果を示す分子種の検出が可能となった。従来の測定結果に加えて、細胞の活性に関わるCytochrome種の振動スペクトル、空間分布が測定可能となったことは、生細胞の組成、動態の研究に極めて有用である。また、高い時間分解能での生細胞のラマン測定(第3章)、生細胞の同位体効果(第4章)についても生細胞のより詳細な分子レベル解析を可能とする。上記のような新規の装置、手法開発と、有効性を示す応用結果は、物理化学的手法を最大限に利用することで、生細胞の分子レベル解析に新しい方法論を開拓するという意欲のもとに展開されており、高く評価できる。

本論文第2章の一部はChemistry Letters誌に(濱口宏夫との共著)、第3章の主要部分はJournal of Physical Chemistry B誌に(濱口宏夫との共著)、第4章の主要部分はChemistry Letters誌に(鳥居肇、濱口宏夫との共著)公表済みであるが、論文提出者が主体となって実験および解析を行っており、その寄与が充分であるので、学位論文の一部とすることに何ら問題はないと判断する。

以上の理由から、論文提出者小野木智加朗に博士(理学)の学位を授与することが適当であると認める。