

学 位 審 査 報 告 書

(ふ り が な) 氏 名	はせがわ まこと 長谷川 慎
学位 (専攻分野)	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	理 博 第 号
学位授与の日付	平成 年 月 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研 究 科 ・ 専 攻	理学研究科 化学専攻
(学位論文題目) Micro-spectroscopy and anti-Stokes fluorescence for photosynthesis research (光合成研究手法としての顕微分光法とアンチストークス蛍光)	
論 文 調 査 委 員	(主査) 熊崎 茂一 准教授 寺嶋 正秀 教授 松本 吉泰 教授

理 学 研 究 科

(続紙 1)

京都大学	博 士 (理 学)	氏名	長谷川 慎
論文題目	Micro-spectroscopy and anti-Stokes fluorescence for photosynthesis research (光合成研究手法としての顕微分光法とアンチストークス蛍光)		
(論文内容の要旨) 葉緑体やシアノバクテリアの光合成膜（チラコイド膜）の構造と構成要素は環境に応じて柔軟に変化する。固定された光合成膜の形態は電子顕微鏡によって大方の様相は知られているが、それら微視的膜形態と性質が環境、生育段階、細胞分化、老化で変化していく様相の理解は未だ不十分である。申請者はチラコイド膜の形態・性質の変化を生理的条件下で調べるための顕微分光による研究方法論の開発を行った。光学顕微鏡、とりわけレーザー共焦点蛍光顕微鏡は広範な生物学において必須の研究手段となっている。チラコイド膜自家蛍光のクロロフィル蛍光を共焦点顕微鏡で調べる試みはあった。ただし、常温でクロロフィル蛍光を与えるのは光化学系 II（系 II）とそのアンテナ色素タンパク質複合体であるという認識が広まっている上に、光損傷を避けて観察をすべきという配慮から、単色蛍光観察に限定されてきた。申請者は、葉緑体の蛍光スペクトルを高い解像力と低い侵襲性で得るための 2 光子励起型ライン走査蛍光スペクトル顕微鏡の開発と応用研究に貢献した。それはほぼ回折限界の解像力を保ちつつ、3 次元全面素の蛍光スペクトルを高速に得る優れたシステムである。そのシステムに更なる改良を加えて、以下のような成果を得たことが報告された。 クロロフィルは主に光化学系 I（系 I）系 II（およびそれらの光捕集色素タンパク質複合体。常温では光化学系と光捕集系の蛍光波長の区別は困難）に結合している。植物の系 I 発光は 77K で 735nm 付近であるが、常温では非常に弱い。系 II 蛍光は 685nm 付近の極大に加え、735nm 付近に振電バンドを示し、常温でも強い。申請者は近赤外パルスレーザー (0.2 ps, 800 - 820 nm) と連続発振レーザー (785 または 800-820 nm) によりトウモロコシ葉緑体の蛍光スペクトルを取得し、それぞれ 2 光子励起および 1 光子励起に由来する蛍光スペクトルを見出した。2 光子励起では可視レーザー励起と同様に系 II 蛍光が支配的だが、1 光子励起では系 I が高選択的に観測されることを発見した。幾つかの検証により、励起波長よりも大幅に短波長シフトした蛍光が観測されるアンチストークス蛍光の一種と結論された。トウモロコシは C₄ 植物であり、維管束鞘細胞葉緑体は葉肉細胞葉緑体に比べ、系 II : 系 I の濃度比が異なるが、アンチストークス蛍光でもそれと整合的な結果を得た。さらに、トウモロコシ葉緑体と緑藻クロレラ葉緑体について二光子励起スペクトルとアンチストークススペクトルを比べ、差スペクトルと比スペクトルから、常温における系 I 特有成分スペクトル (クロレラで 709 nm, トウモロコシで 730nm) を得た。これは 77K 等の極低温での系 I 蛍光極大波長とほぼ一致し、常温でも系 I 特有の長波長クロロフィルの蛍光が得られることが示された。さらに、クロレラ細胞に有機溶媒処理を施して、クロロフィル会合体の形成を誘導し、その形成過程の顕微蛍光スペクトルと顕微吸収スペクトルの変化を同一細胞について追跡した。その結果、近赤外連続発振レーザーの励起は 690 - 740 nm 近辺に吸収を示すと思われるクロロフィル会合体を高い確率で励起し、蛍光寿命が短いと言われるクロロフィル会合体でも容易にその存在を確認できることがわかった。			

(論文審査の結果の要旨)

口頭発表では、博士論文の全体に関する詳細な説明に加え、アンチストークス蛍光の応用例の一つとして、申請者自らが最近行った老化しつつある植物細胞中の葉緑体外に放出されたクロロフィル蛍光についても報告され、これまでの顕微分光法で未解明であったクロロフィル代謝の研究に有効な手段となることが示された。また申請者が自ら開発に参加し、さらに改良を積み重ねた顕微分光法の基礎となる二つの原理、二光子励起顕微鏡、共焦点顕微鏡の原理についても報告された。審査員からの質問の中で、特にアンチストークス蛍光発生の余分なエネルギーはいかに供給されているか質問があり、それは本論文の核心部分でもあるが、質疑応答と論文本文を総合して、次のような説明がなされた。類似の現象に自発アンチストークスラマン散乱があり、 1000 nm^{-1} 程度のアンチストークスシフトの観測は十分可能であると知られている。常温でも僅かに存在する高い振動励起分子によるホットバンドを励起すれば 730 nm 近辺で吸収する長波長吸収クロロフィルの裾野を励起することは可能であり、特に系Iの長波長吸収クロロフィルではスペクトル幅が広いことがフォトンエコーなどの方法でも知られている。いったん $720\text{--}730\text{ nm}$ 付近に吸収を持つ少数の長波長吸収クロロフィルが励起されると、多数存在する短波長吸収クロロフィルへエネルギー移動は容易であると知られている。他研究チームの報告でも、常温では長波長吸収クロロフィルの励起から光合成電荷分離にいたる量子収率は短波長吸収クロロフィルの励起に比べて遜色が無いとの報告が多い。このいわゆるアップヒルエネルギー移動にも長波長吸収クロロフィルの広いスペクトル幅が寄与する可能性がある。結局僅かな励起確率でも、高開口数の顕微分光(開口数 1.4)では蛍光検出効率が非常に高いので検出し易い。この問題点の他にも、顕微光学技術、時間・空間3次元・スペクトルにわたる5次元のデータ処理の詳細、光化学系Iー光捕集系I(LHCI)における長波長吸収クロロフィルの分子の所在、顕微分光以外の方法に基づくチラコイド膜研究の歴史的背景など、幾つかの問題点について、質疑応答がなされたが、全て適切な応答がなされた。

申請者が実証した光化学系 I の蛍光スペクトルを常温で見るための近赤外レーザーによる顕微蛍光スペクトル測定は、植物生理の研究にこれまで無かった新しい手法として、植物生理の専門国際誌に掲載され、2010 年夏の国際光合成学会等でも注目を集めたばかりではなく、凝縮相の分子物理化学としても新しい問題点と手法を提起している。クロロフィル会合体のような消光が強く働く系でも蛍光スペクトルを観察できるという点で応用の可能性が高い上に、吸収スペクトルの裾野の広がりを定量化する重要性も示した。光化学系 I が示す近赤外領域の吸収断面積の評価などは今後の課題として残るが、定性的にはアンチストークス顕微蛍光法の有用性を疑う余地無く示した本論文は博士(理学)の学位論文として十分価値あるものと調査委員会全員一致で認めた。平成23年1月19日に、論文内容とそれに関連した試問を行い、申請者の十分な見識と能力を確認し、調査委員会の全会一致で合格と認めた。

要旨公開可能日：2011 年 6 月 1 日以降