

氏名	BODHIPAKSHA LALITH SANJAYA THILAKARATHNE
博士の専攻分野の名称	博士（工学）
学位記号番号	博理工乙第221号
学位授与年月日	平成26年9月19日
学位授与の条件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題目	Instantaneous nanometric growth dynamics of plants under the influence of environmental conditions using highly sensitive optical interferometry（超高感度光学干渉法を用いた環境影響下の植物の極短時間成長挙動）
論文審査委員	委員長 教授 門野 博史 委員 教授 川合 真紀 委員 連携准教授 三輪 誠 委員 准教授 吉川 宣一 委員 嘱託研究員 UMA MAHESWARI RAJAGOPALAN （理化学研究所脳統合機能研究チーム）

## 論文の内容の要旨

Tropospheric ozone ( $O_3$ ) is a major pollutant and is on a constant rise and is known for decreasing growth and yields in crops. In order to investigate effect of  $O_3$ , general techniques are (a) Visible foliar damage (b) Physiological analysis (c) Weight loss. However, all these techniques require fairly long periods ranging from a few days to months. Currently to our knowledge, there is no direct way to address the effect of  $O_3$  from instantaneous growth dynamics. For plant growth measurement, currently available techniques are based on (a) Computer analysis of sequentially obtained images; (b) dry weight. The basic resolution of such techniques is limited to a few micrometer obtainable within a few minutes. To overcome this sensitivity limit and to increase the accuracy of growth measurements, optical interferometric techniques have been developed. Earlier attempts to use optical interferometric approaches in the 1980's had failed to achieve an enough sensitivity to give any biologically novel information. In order to exceed the sensitivity limitations and eliminate the drawbacks of existing experimental techniques, in this study, a novel optical interference technique called statistical interferometry technique (SIT) was introduced. The intrinsic fluctuations, nano-meteric intrinsic fluctuation (NIF) of leaf's growth rate were discovered with the sub second temporal resolution, that NIF is environment sensitive and can play a role of a measure in fast assessment of plant vitality in relation to environmental changes.

The thesis consists of five chapters as summarized below.

- Chapter 1 : Introduction to this thesis including the main objectives and the outline of the thesis is provided. The importance of plant dynamics studies, evaluation of existing growth monitoring techniques, their limitations, and the need of developing more sensitive techniques, are discussed.
- Chapter 2 : Basic concepts of optical interferometry such as light interference and speckle phenomenon are briefly described. The main purpose of this chapter is to explain the features of SIT and way of data analysis principle for plant growth measurements.
- Chapter 3 : The impact of chronic O<sub>3</sub> exposure of two crop vegetables, radish and soybean, was evaluated by using SIT and well established conventional methods. A real-time, non-invasive, robust optical interferometer having an accuracy of 0.1 nm was used to measure the growth of a leaf. The growth was measured every 500 msec for an one hour in three different O<sub>3</sub> exposed plants. The potential of proposed SIT to obtain NIF changes of plant leaves is extensively demonstrated, and it was confirmed that reduction in NIF coincide well with well established conventional methods under the large dose of O<sub>3</sub> .
- Chapter 4 : Application of SIT to investigate the effects of short-term O<sub>3</sub> exposure on two rice cultivars. The growth was measured every 500 msec for a total of seven hours with three hours under O<sub>3</sub> concentrations of, 0 ppb, 120 ppb and 240 ppb. This experiment revealed that NIF could be used to assess the O<sub>3</sub> stress on plant within a short term of a few hours. Further NIF could differentiate the two cultivars according to the O<sub>3</sub> resistance. The fluctuations differentiated the cultivar's sensitivity with one showing drastic reduction.
- Chapter 5 : Origins of the NIF, conclusions and future research directions emerging from this study are discussed. NIF may be an intrinsic property of plants, possibly resulting from both the metabolic and the hydraulic control mechanisms and is environment-sensitive. Being environment-sensitive, makes the NIF valuable as a rapid assessment measure of plant vitality.

Statistical interferometry permits real-time observations of very short-period dynamic responses of biological objects, such as plants under various environmental conditions. It can be used to obtain sub-nanometer growth increments of biological objects in sub-seconds in non-contact and non-destructive manner, which was not possible with any other technique.

## 論文の審査結果の要旨

当学位論文審査委員会は、当該論文の発表会を平成26年8月8日に公開で開催し、約45分の発表の後、本論文に関する詳細な質疑を行い、論文内容を審査した。以下に、論文内容を示すとともに、学位論文審査の結果を要約する。

当学位論文では統計干渉法と名付けられた超高感度な光干渉法を用いて植物の極短時間の成長動態を調べた。特にオゾンストレス下の稲の反応について詳細に研究をおこなった。

第1章では、序論として研究の背景と目的について記述している。すなわち、大気汚染物質としてのオゾンの近年の傾向と植物への影響、特に、作物植物への影響について論述し、本研究の意義を明確にしている。

第2章では、本研究で用いる超高感度な光干渉法である統計干渉法の原理とその植物成長計測への応用について記述している。初めに、従来の干渉法について代表的な構成と干渉信号の理論的な表現をまとめている。統計干渉法の従来法と大きく異なる点はスペックル場の干渉を用いている点であるので、スペックル現象とスペックル場の基礎統計と統計干渉法の原理とその利点を記述している。本研究では植物試料から発生したスペックル間の干渉を利用しているが、この場合問題となるのはバイオスペックルと呼ばれる植物試料内部に入り込んだプローブ光により生成される時間的にランダムに変動する動的なスペックル成分である。この成分は本研究で測定しようとしている葉の伸縮計測に対して誤差となるので、この成分を低減させるための手法について検証している。植物に対して観測されるスペックルパターンのバイオスペックル成分による変動が十分に小さいことを実験により確認し、以下の研究において十分精度が得られることを論証している。

第3章では、作物植物であるハツカダイコンとダイズに対するオゾンストレスを統計干渉法による極短時間の成長計測と従来法による計測をおこない比較研究をおこなっている。試料植物であるハツカダイコンとダイズは通常の大気中のオゾン濃度の1.5倍に保った大気およびフィルターによりオゾン除去した大気の区画で30日間栽培された。本研究では5.5秒間での伸縮から極短時間の成長速度を計測した。その結果、新規な現象として極短時間の成長が激しく揺らいでいることを観測した。この現象は当該研究室の先行研究により発見されていたが、本研究ではより詳細にその特性を調べた。その結果、本現象は他の植物や葉や根など異なる部位においても普遍的に見られる現象であることを確認し、ナノメートル自発的成長揺らぎ(NIF: Nanometric Intrinsic Fluctuation)と命名した。もっとも興味深いことは、NIFがオゾンストレスに対して高感度に変化することを見出した点である。本研究ではNIFを定量的に評価するため極短時間成長揺らぎの標準偏差に注目した。この値は、通常大気および通常の1.5倍のオゾン濃度の大気いずれに対しても大きく変化した。一方従来の評価法である光合成速度や気孔開閉率と比較するといずれもオゾンストレスとともに低下したが有意な変化を示さない場合もあった。すなわち、NIFの標準偏差はオゾンストレスに対して高感度な指標となることが示された。

第4章では、同じく作物植物であるイネに対して3時間の短時間オゾン暴露をおこない本オゾンストレス評価法が有効であることを調べた。試料としてイネの品種であるコシヒカリとフサオトメを用いた。先行研究により前者は比較的オゾンに弱く後者は比較的オゾン耐性があることが報告されている。実験では

光化学オキシダント注意報と警報が発令されるオゾン濃度である 120ppb と 240ppb で 3 時間の短時間のオゾン暴露をおこなった。その結果、短時間の暴露にもかかわらず NIF は有意な変化を示すことが確認された。オゾン濃度の増加に対して NIF は低下することが示された。また、比較的オゾン耐性のあるフサオトメでは相対的に NIF の低下が少ないことも確かめられた。一方、従来法である光合成速度、気孔開口率では 120ppb に対しては有意な変化は認められなかった。また、およびクロロフィル蛍光法ではいずれの濃度に対しても有意な変化は認められなかった。以上により本研究で提案した NIF に基づくお損ストレス評価法は従来法見比べて高感度であり、極短時間のオゾン暴露に対しても十分感度があることが示された。加えて、品種間のオゾン耐性の差も評価可能であることが示された。

第 5 章では、本研究で提案した極短時間のナノメータ成長ゆらぎに注目した植物のオゾンストレス評価法の研究を総括するとともに今後の展望についてまとめている。

以上、本研究では超高感度な光干渉法を植物の成長計測に応用することにより、従来計測されることのなかった秒スケールでの植物の成長動態を明らかにした。その結果、ナノメートル自発的成長揺らぎ現象が植物に普遍的に存在することを明らかにし、さらに、この現象がオゾンストレスに対して高感度に応答することを初めて明らかにした。

以上に要約したように、提案された光学的手法は非常に強力な研究手法となるばかりか、例えば、植物を通した環境評価やオゾン耐性のある作物品種を効率よくスクリーニングを可能とするなどその応用・波及効果は極めて広範囲であると考えられる。このように、本論文では学術的価値の高い成果が示されており、博士（工学）の学位を授与するにふさわしい内容を備えていると判断し、当学位論文審査委員会は合格と判定した。