

氏名	MAHJABIN KABIR
博士の専攻分野の名称	博士（工学）
学位記号番号	博理工甲第 1158 号
学位授与年月日	令和2年3月23日
学位授与の条件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Evaluation of short-term growth dynamics of plant under the influence of growth hormones using optical interferometry (干渉法を用いた植物成長ホルモン影響下の植物の極短時間成長動態の評価)
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 教授 藤野 毅 委員 教授 王 青躍 委員 学 外 ラジャゴパラン・ウママヘスワリ

論文の内容の要旨

Statistical interferometric technique (SIT) is a unique optical interferometric technique based on statistics of fully developed speckle field which is developed to measure nanometric intrinsic fluctuation of biological object. By using SIT, instantaneous growth fluctuations of plant at cellular level at sub-nanometric scale can easily investigated with high accuracy. Such fluctuations are named as nanometric intrinsic fluctuation (NIF). Bio-speckle optical coherence tomography (bOCT) was used to observe the internal structural activity of plant. Bio- speckles form living organelles activity can be observed to investigate the variation of such internal structures. In this experiment plant hormones are used to monitor growth behaviour of plant. GA_3 and auxin, two basic growth promoting phytohormone was applied at plant root system and leaf surface as foliar spray with different concentrations. With the action of growth promotion and inhibition of plant hormones NIF plant was monitored by using SIT. Internal structural changes were also be investigated with different concentration of GA_3 with bio speckle OCT system.

Chapter 1: Introduction

This chapter describe the introductory discussion with background study of NIF behavior of plant by using SIT, and potential of OCT in monitoring internal structural changes of plants in relation to environmental variations. Also describes the reasons of choosing plant hormone for NIF study by SIT along with visualization of internal activity of plant by OCT together with the objective of this study.

Chapter 2: Statistics of speckle field

In this chapter the principle of SIT has been described. When the laser light is illuminated on an optically rough surface, a fully developed speckle pattern is generated due to the random interference of scattered light. A he-ne laser

light illuminated at leaf surface and in-plane elongation or shrinkage of plant leaf was measured between two probing point in order of nano-metric scale.

Chapter 3: Bio-speckle optical coherence tomography (OCT)

In this chapter the principle of Bio-speckle OCT has been described. SD-OCT used a super luminescent diode as light source. The interference light from object and reference mirror is passed through a spectrometer to obtain the spectral interference. Depending on the depth from where the light is reflected, spectral properties would differ. By analyzing the spectral interference, it is possible to get a depth profile of the reflected light for each point along the sample. By having a scanning system to move the optical beam across the sample, we could obtain a 3D distribution of the optical reflective of the sample.

Chapter 4: Nanometer accuracy statistical interferometric technique in monitoring the short-term effects of exogenous plant hormones, auxin, and gibberellic acid on rice plants

In this chapter, measurement with SIT was conducted under different plant hormones namely, auxin (2,4-dichlorophenoxyacetic acid- 2,4-D), an auxin transport inhibitor, 2,3,5-triiodobenzoic acid-TIBA, and gibberellic acid (GA_3) to investigate the changes in the intrinsic fluctuations. The hormones were either applied directly through foliar spraying, or through immersion of the root system. Rice plants root were exposed to auxin, of 0, 1, 2, and 4 μM for 24 hours including two hours under control to monitor normalized standard deviation (NSD), and average normalized standard deviation (ANSD), of NIF respectively. Under all the cases, it could be seen that the change in ANSD either increases or decreases happening within the first one hour of the exposure to auxin. Under the concentrations of 1 and 2 μM , there is increase in ANSD with respect to control. The increment for 2 μM was lower than that for 1 μM compared to control. In contrast, at 4 μM of 2,4-D, ANSD decreased with exposure time over 22 hours was also observed.

Further, introducing antagonist of auxin was found to reduce the fluctuations and the variation of ANSD of NIF, under 10, and 20 μM of TIBA were also showed decreases with respect to the control. Under GA_3 , of different concentrations of 0, 10, 40, and 100 μM for 6 hours NIF was also measured. ANSD of NIF, under low concentrations of 10, and 40 μM , GA_3 , there was an increase in NIF with respect to control. Under a high concentration of 100 μM , there was a decrease with decrement being less than that of control was monitored.

Leaf lengths of rice seedlings with their root systems of four days old exposed under different agents, 0,1, 2, and 4 μM 2,4-D, and 10, and 20 μM of TIBA, and 0, 10, 40, and 100 μM GA_3 were measured. The measurements were done at interval of two days for 2,4-D, and TIBA from 14th day to 29th day. In case of GA_3 exposure, measurements were done from 4th to 22nd day with an interval of two days. Significant increment in leaf lengths under 1, and 2 μM of 2,4-D with respect to that of the control. On the other hand, 4 μM shows decreases in leaf length after 23rd days of exposure. Leaf lengths under 0, 10, and 20 μM TIBA were also measured and seen decrease in length with increasing TIBA concentrations. The increase in leaf lengths seemed to be gradual with increasing concentrations under 10, and 40 μM of GA_3 and showed significant increment with respect to that of the control.

Chapter 5: Biospeckle optical coherence tomography in visualizing effects of foliar application of plant growth hormone to Chinese chives leaves

This chapter is about visualization of internal structure changes by bio-speckle optical coherence tomography to visualize internal structures of leaf with GA_3 exposure as foliar spray. Concentration used for this experiment 40 μM ,

100 μM , and 1.2mM. The higher concentration shows loss in laminar structure of leaf from both the structural and speckle contrast image. After 60 min of spraying 40, and 100 μM GA_3 clear reduction in contrast was observed from speckle contrast image which was difficult to distinguish from the structural images.

Chapter 6: Conclusions and future perspective

SIT and biospeckle OCT both has vast scope to study environmental aspects related to plant and to observe plant conditions. Obtaining result with in a very short period is one of the most important advantages of using these systems. SIT, applied to plant elongation revealed NIF and the reason behind these fluctuations is still unknown and our future aim is to investigate the mechanism for the presence of these intrinsic fluctuations.

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2020年2月28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。

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。種々の環境下での植物の成長状態のモニタリングの必要性および従来の手法を概観し、迅速かつ高感度、非破壊な計測手法として光干渉法の適用の有効性を指摘した。本研究では、具体的な光干渉法（SIT）として統計干渉法による植物の葉の表面に対する計測およびバイオスペckル光断層画像法（bOCT）による内部状態の計測を新たに提案している。SITにより当研究室で発見された新規な現象である極短時間自発的成長のナノメートルゆらぎ（NIF）の重要性を概観した。すなわちNIFは植物の環境ストレスや活性状態の指標となり得る現象であるが、そのメカニズムについては不明な点がある。本研究では植物生理においてより基本的な物質である植物成長ホルモンに対する影響を非破壊・高感度な光学的手法を用いてNIF挙動および内部状態の評価法の確立を目的とし、その意義を明確にしている。

第2章では、本研究で用いる高感度な光干渉法の一つである統計干渉法の原理について概説している。一般に光干渉法はミラーやレンズなどのなめらかな表面を持つ物体に対して用いられてきた。生体組織のような散乱性の物体に対してはレーザースペckルと呼ばれるランダムなパターンが生じるからである。初めにレーザースペckル場の基礎統計に関して説明し、その特性実基づいた統計干渉法に関してその原理をまとめ、生物試料への適応の有効性について述べている。さらに、実際の植物の成長計測をおこなう際のデータ処理について述べた。

第3章では、本研究で用いるもう一つの高感度な光干渉法の一つである光断層画像法（OCT）について概説し、新たにバイオスペckル光断層画像法（bOCT）を提案している。初めに、これまでに提案されたOCTのいくつかの方式、すなわち時間領域OCT、スペckルドメイン（SD-OCT）についてその特性をまとめている。次に、OCT信号で得られるスペckル信号すなわちバイオスペckルについて解説し、新たにバイオスペckルOCT(bOCT)の本研究への適応を提案している。bOCTにおける信号処理について述べ、本研究で用いるOCTシステムについて述べている。

第4章では、植物成長ホルモンに対する実験的研究をおこなった。はじめに、成長ホルモンの一つであるオーキシシン（2,4-D）とその輸送阻害物質（TIBA）に関して調べた。植物として重要な農作物の一つであるイネ（コシヒカリ）を用いて2,4-Dの濃度0（control）、1, 2, 4 μM を発芽後14 - 16日のイネの根系に暴露し、短時間の観測（24時間）をSITを用いてNIFを計測した。NIFはそのゆらぎの標準偏差SDおよびその値を暴露前の値で規格化した後に平均化した平均規格化標準偏差（ANSD）で評価することとした。その結果、2,4-D濃度1, 2 μM に対してANSDは増加し1 μM では76%の増加を示した。一方4 μM に対してANSDは27%の低下を示した。これは低濃度の2,4-Dに対しては活性が増加し、高濃度になるにしたがって阻害作用が現れることを示唆している。

この結果を従来法の観測法であるイネの葉の成長長さと比較することにより検証を試み、NIFによる計測

結果と高い相関を確認した。

2,4-D の作用であることをさらに検証するため、本章ではオーキシンの輸送阻害物質 (TIBA) の暴露実験を合わせておこなった。濃度は 0, 10, 20 mM である。同様に、ANSD の観測は 24 時間に渡っておこない従来法の葉の成長長さ計測は 29 日間に渡っておこない比較した。その結果、ANSD は 24 時間後に 10, 20 mM に対してそれぞれ 16%、41% の自発的ナノメータ成長ゆらぎの低下が生じた。一方、葉の成長長さは 29 日後に 20 μ M に対して%の低下があり TIBA に対しても両者は有意な相関を示した。本実験によりオーキシンの NIF への影響を確認した。特筆すべきは、NIF の観測では比較的成長の初期段階において数時間程度の非常に短時間のモニタによりその影響を確認できることである。一方、葉の成長長さではその影響の確認には約 29 日の観測を要した。

本章では、もう一つの植物成長ホルモンであるジベレリン (GA3) に対する NIF の影響も調べた。植物サンプルはオーキシンと同様にイネ (コシヒカリ) を用いて、GA3 (濃度 0 (control), 10, 40, 100 μ M) の根系への暴露実験をおこなった。NIF に対して短時間 (6 時間) と長時間 (19 日) の観測をおこなった。一方葉の成長長さ計測は 19 日間に渡って計測した。長期間の観測において ANSD は全ての濃度に対して増加を示し、40 μ M で最大の作用を確認した。19 日後では ANSD は Control に比べて約 25 倍となった。一方、葉の成長長さに関しても同様の傾向が観測された。このように GA3 においてもマクロな成長挙動と NIF に関して有意な相関を確認した。2,4-D と同様に短時間のモニタによりその影響を確認することができた。

第 5 章では、植物内部状態の観測手段として光断層画像法 (OCT) を用いて、ジベレリン暴露に対する影響のモニタの有効性を調べた。一般におこなわれている OCT では解剖学的な断層情報しか得られないが、本手法では OCT 信号に含まれるバイオスペックル信号を抽出することにより内部の活性状態のモニタを試みていることに特色がある。実験では、GA3 (濃度 40, 100 μ M, 1.2 mM) を葉に直接噴霧することにより暴露した。非常に高濃度 (1.2 mM) に対しては通常の断層画像、バイオスペックル画像共に層構造が消失するなどの影響を確認することができた。一方、に対しては通常の断層画像ではその影響は確認できないが本研究で提案するバイオスペックル画像ではコントラストの低下が見られ高感度のその影響がモニタ可能であることが示された。

第 6 章では、本研究で提案した光干渉法に基づいた植物ホルモンの成長挙動のモニタリング手法を総括している。SIT 法においては植物成長ホルモンおよび阻害剤 (2,4-D, GA3, TIBA) の影響を数 2 時間程度の短時間で高感度に検出可能であることを実証した。これらのホルモンは細胞レベルで細胞壁の伸張や膨圧に関係していることから極短時間自発的成長のナノメータゆらぎの起源を示唆しているものである。bOCT においてもこれらの植物ホルモンの植物内部への影響の迅速な観測手法としての有効性が示された。

以上総括すると、本研究では非破壊・高感度な 2 つの光学的干渉法に基づいて植物成長ホルモンの影響のモニタリングについて研究した。従来の破壊的な計測法に対して短時間にその影響が可能であることを実証している。得られた知見は環境科学、農業、植物科学の分野において有益な評価・研究手段となり得ることが期待される。これらの成果は 3 編 (2 編掲載許可、1 編投稿中) にまとめられており、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。