

Title	光和周波顕微鏡を用いた生物試料の非線形顕微分光による研究
Author(s)	興山, 渉
Citation	
Issue Date	2016-03
Type	Thesis or Dissertation
Text version	ETD
URL	http://hdl.handle.net/10119/13525
Rights	
Description	Supervisor:水谷 五郎, マテリアルサイエンス研究科, 博士

氏 名	興 山 渉		
学 位 の 種 類	博士(マテリアルサイエンス)		
学 位 記 番 号	博材第 399 号		
学 位 授 与 年 月 日	平成 28 年 3 月 24 日		
論 文 題 目	光和周波顕微鏡を用いた生物試料の非線形顕微分光による研究		
論 文 審 査 委 員	主査 水谷 五郎	北陸先端科学技術大学院大学	教授
	高村 禅	同	教授
	小矢野 幹夫	同	准教授
	筒井 秀和	同	准教授
	山口 祥一	埼玉大学	教授

論文の内容の要旨

The sum frequency generation (SFG) microscopy uses the second order nonlinear effect excited by two laser beams with visible and infrared wavelength. This effect is sensitive to the symmetry of material's structure because it occurs only at non-centrosymmetric parts in the sample. Hence this microscope is expected to be useful in the observation of biomaterials because most biomolecules have chiral or non-centrosymmetric structure. However, until now SFG microcopies have not been completely successful in observation of several samples so far. Therefore, it is necessary to try to observe on as many different samples.

In this study, I used the two type biological samples, fish scale and cracked rice. These samples contain biomolecules such as collagen and starch. The collagen is included in fish scales, and the starch is included in cracked rice. The collagen and starch can generate relatively strong SFG signals.

The first discuss is about the fish scales. In this study, a scale of *Pagrus major* was used as the samples. Fish scales contain collagen. The collagen is a protein based on glycine, prolin, and hydroxyproline, and their chains are combine to form a triple-helical structure. Collagen is the main ingredient in the animal skin, bones, tendons, cartilage, and teeth. Because of such characteristics, the collagen is studied in the fields of anti-aging, food, cosmetics, healthy supplement, living body or medical materials such as an artificial cornea and vascular grafts. SFG spectra and SFG images have been observed on the fish scales. Compering to the collagen of Achilles tendon of a cow(*Bos Taurus*). The peak near 2950 cm^{-1} in the fish scale SFG spectrum was assigned to the fish collagen. The two collagen spectra showed different line shapes and widths owing to a difference in the background nonlinearity. In the SFG image of the fish scale cross section, stronger signal was observed from the sea side than from the body side.

The second discussion is about the cracked rice. I observed SFG images of the rice kernels and the correlation between the cracking of rice and the molecular structure of amylopectin in them. The

samples were the normal and the cracked japonica nonglutinous rice Koshihikari and Nipponbare, which were cultivated at Shiga Prefecture Agricultural Technology Promotion Center. I attempted SFG spectroscopy in the C-H stretching vibration region for normal and cracked rice kernels. The rice kernels are including so much starch. The starch is composed of two components of homopolymers: amylose, a linear polymer of 1000 links glucose molecules, and amylopectin, a high branching polymer of 10,000-100,000 linked glucose molecules. The amylopectin molecule has complicated branch linkages and its molecular weight is much larger than that of amylose. Thus, the molecule allows for a lot of functional properties according to the variety of its structure. In Nipponbare, the width of the SFG spectrum C-H vibration peak at 2915cm^{-1} of the cracked rice kernels was broader than that of the normal ones, while for Koshihikari there was no clear difference. The width of the 2015cm^{-1} peak is suggested to originate from the variety of the higher-order structure of saccharide chains in amylopectin.

Key Words

nonlinear optics, sum frequency generation spectroscopy and microscopy, cracked rice, fish scale, starch, amylopectin collagen

論文審査の結果の要旨

本論文では光和周波(SFG)顕微鏡の生物試料への応用を開拓するために、2つの試料をとりあげ、その観察解析を行った。とりあげた試料はマダイのウロコと胴割れコメ種子の胚乳である。SFG 顕微像を観察するとともに、定点における SFG 分光観察も行った。両試料はどちらも天然のものをそのままの状態に測定し、特に胴割れ米の測定においては農業試験場で育成条件を精密に記録した試料を用いた。

マダイのウロコの測定では、カッターを用いてウロコを切断しその断面を測定した。魚のウロコはコラーゲンを主成分とした繊維状の組織から形成され、それが数 μm おきに 90° 回転し層状に重なった構造をとっている。SFG 顕微鏡による画像測定においては、それらの層ごとに SFG 発生の頻度が異なっていることがわかった。また、SFG スペクトルの測定においては牛のアキレス腱由来のコラーゲンとウロコの断面から得られたスペクトルの結果との比較から、ウロコ断面からの SFG 光がほぼコラーゲンに由来するものであると考えられた。魚のウロコから直接 SFG スペクトルと画像の取得を行った研究は本論文が初めてである。ウロコにはコラーゲン以外の多くの生体物質が共存していると考えられるが、SFG 顕微観察の方法では、それらからコラーゲンを選択的に観察できることが示された。

胴割れ米の測定では、ウロコの場合と同様にカッターでコメを切断しその縦断面において SFG スペクトルの取得を行った。コメの断面は、大きく分けてデンプンを多く含む胚乳組織と将来の芽や根の元となる胚組織からなり、胚乳と胚の境界は広義には胚乳組織の一部であるが破碎領域と呼ばれる特別な名前を与えられた領域が広がっている。本論文の測定ではこの領域のス

ペクトル測定を行った。コメ胚乳からの SFG 発生はほぼデンプンの一種であるアミロペクチンに由来するものである。アミロペクチン自体はその巨大で複雑な構造から、多様な物性を持つことのできると考えられている。本論文では胴割れ米と正常米のスペクトルを測定し、その比較を行った。その結果、日本晴のスペクトルにおいて、胴割れ米の結果が正常米のものと比べて、 2910cm^{-1} 付近のピークの幅がより太くなっている傾向が見出された。アミロペクチンを含めた糖類は基本的にグルコースが重合したものであるが、それぞれの分子構造の違いから各々異なる SFG スペクトル形状を示すことが知られている。そのことから、本論文の結果は胴割れ米のアミロペクチンにおいてその分子構造が正常米とは異なっている可能性を示唆するものと解釈された。本論文におけるスペクトル解析は、限られた試料の結果にとどまっているが、本研究は、より系統的なコメ種子の中の糖鎖の制御とそのモニターの実験に用いることができることを実地に示していると言える。

以上本論文におけるこれらの成果は光和周波顕微分光法の生物分野への適用例を示すだけでなく、生体試料中の特定分子の計測および解析において新しい知見を得られる可能性を示している。よって博士(マテリアルサイエンス)の学位論文として十分価値あるものと認めた。