

Title	共焦点光和周波顕微鏡によるコメ種子断面の観察
Author(s)	水谷, 五郎; Khuat, Thi Thu Hien
Citation	光アライアンス, 28(11): 19-24
Issue Date	2016-11-01
Type	Journal Article
Text version	author
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10119/14068">http://hdl.handle.net/10119/14068</a>
Rights	本著作物は日本工業出版の許可のもとに掲載するものです。 Copyright (C) 2016 日本工業出版. 水谷五郎, Khuat Thi Thu Hien, 光アライアンス, 28(11), 2016, pp.19-24.
Description	

共焦点光和周波顕微鏡によるコメ種子断面の観察  
北陸先端科学技術大学院大学・マテリアルサイエンス系  
水谷五郎、Khuat Thi Thu Hien

<100字アブスト>

私たちが開発した共焦点光和周波(SFG)顕微鏡についての基礎技術を解説し、この装置の応用例として、コメ粒の中のデンプンの分布、および猛暑下のコメ粒の胴割れ現象の際のデンプンの変化を計測した例を示す。

<はじめに>

新しい原理に基づく顕微鏡が開発されると、いろいろな分野において、現象の新規な観察への期待が高まる。本稿では最近私たちのグループが開発した共焦点光和周波顕微鏡についての基礎技術[1][2][3]を解説し、あわせて装置の応用例として、稲の種子(コメ粒)の断面のデンプンの分布を計測した例を示す[4]。また猛暑の夏の気候によって生じたコメの胴割れといった現象と相関するような、糖鎖構造の変化を示すと思われるシグナルについても報告する[5]。われわれが日々口にするコメと言えば、すべての事柄が知り尽くされていると思いがちであるが、新しい方法で観察すると、知られざる一面が如実に見えてくる。

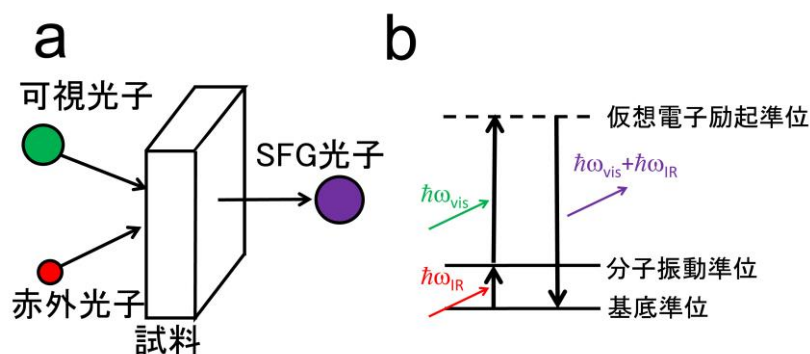


図1 光和周波発生現象の光子描像(a)と電子状態遷移図(b)

<光和周波発生現象の原理>

光和周波発生現象(SFG: optical sum frequency generation [3])とは、レーザーのようなコヒーレントな光源が発する2つの異なる光子エネルギー( $\hbar\omega_{IR}$ ,  $\hbar\omega_{vis}$ )をもつ光子が図1のように1つに融合して和の光子エネルギー( $\hbar\omega_{IR} + \hbar\omega_{vis}$ )を持つ光子になる現象で、図1bのような3光子過程として表すことができる。通例光学媒質の中の電荷の片寄り、すなわち電気分極Pの大きさは、入射電場Eに比例するが、入射電場が強いときPはEには単純

には比例せず、 $E$  の関数となって、

$$P = P(E) = \varepsilon_0(\chi^{(1)}E + \chi^{(2)}E^2 + \chi^{(3)}E^3 + \dots) \quad (1)$$

と展開できる。ここで、 $P$  や  $E$  は一般にはベクトルであり、 $\chi^{(n)}$  は  $n$  次の非線形感受率と呼び一般には  $n+1$  階のテンソルである[6]。(1)式の右辺カッコ内第二項の電場に2つの周波数成分をもつ入射電場  $E_1 \exp[-i\omega_{IR}t] + E_2 \exp[-i\omega_{vis}t]$  を代入すると、クロスタームとして

$$P^{(2)} \propto \chi^{(2)}E_1E_2 \exp[-i(\omega_{IR} + \omega_{vis})t] \quad (2)$$

という項が発生し、この非線形分極を波源として電磁波が発生する。これが光和周波発生(SFG)である。図1 bを見ると、 $\omega_{IR}$  が赤外領域で媒質の振動準位と一致すると遷移が共鳴し信号強度が増大するので、SFG を振動分光法の一つとしても使用できることがわかり、このことがこの方法の1つの特徴である。

光和周波発生(SFG)法のもう1つの特徴は、この二次の非線形光学過程の対称性の選択則である。すなわち、構造に反転対称性のある物質ではこの過程は禁制である。いいかえれば、この過程は反転対称性のない媒質でのみ許容である [6]。この選択則により、2つの特徴的な SFG の計測が可能になる。1つめは表面敏感な計測で、バルクに反転対称性がある固体においてはバルクでは SFG は禁制で表面のみで応答があるので、感度が表面の1%分子層程度までに及ぶ振動分光が可能となる。この1原子または分子層からの SFG 信号強度は非常に弱く、筆者の実験環境では1秒に数~数十光子程度であるが、背景信号がゼロなので、積算時間を長くすれば観測可能である。またもう1つの特徴として、生体分子のように、キラル(光学活性)な分子の一方の異性体の集合体についても SFG が許容になるので、選択的な観察が可能となる。キラル分子の SFG は試料表面に限らずその試料物質の全体から発生する。なお、表面の場合もキラル分子の場合も、一般に SFG が許容であっても、許容な SFG が観測にかかる程度に強いかどうかということは別個の問題であり、SFG が対称性の観点からは許容でもその絶対強度が弱くて観測できないこともある。

SFG を記述する分子1個の非線形分極率テンソル  $\alpha_{q,\xi\eta\zeta}^{(2)}$  は、

$$\alpha_{q,\xi\eta\zeta}^{(2)} = \frac{1}{2\omega_q} \frac{\partial \alpha_{\xi\eta}}{\partial Q_q} \frac{\partial \mu_\zeta}{\partial Q_q} \frac{1}{\omega_{IR} - \omega_q + i\gamma_q} \quad (3)$$

である[7]。ここで、 $\xi, \eta, \zeta$  は分子座標、 $\frac{\partial \alpha_{\xi\eta}}{\partial Q_q}$  はラマンテンソル、 $\frac{\partial \mu_\zeta}{\partial Q_q}$  は分

子座標  $\zeta$  方向の赤外吸収の双極子、 $Q_q$  は振動モード  $q$  の分子振動の振幅、 $\omega_q$  はそのモー

ドの固有周波数、 $\gamma_q$ は準位幅である。(3)式を単位体積当たりの振動子の数量にわたり積算すると、(2)式中で見た巨視的な非線形感受率 $\chi^{(2)}$ テンソルが得られる。すなわち式(3)によれば SFG 現象は赤外吸収と（アンチストークス）ラマン散乱が連続的に起こった現象であることが言え、これは図 1 b を見てもわかる。このように、1つの材料の SFG スペクトル、赤外吸収スペクトル、ラマン散乱スペクトルは、理論の上では式(3)の表す関係にあるが、実際の試料についてのこれらのスペクトルの関係の理解はまだ進んでいない。私のグループの経験によれば、 $\text{CH}_n$  ( $n=1,2,3$ )伸縮振動領域( $3000\text{cm}^{-1}$ 付近)において、SFG のスペクトルはラマン散乱や赤外振動のスペクトルに比して微細構造が鋭く、ラマン散乱や赤外分光よりくわしい分子種識別の情報を与えうると考えている。一般的には、これら 3つの方法を併用し、補い合って情報を得るのが理想である。

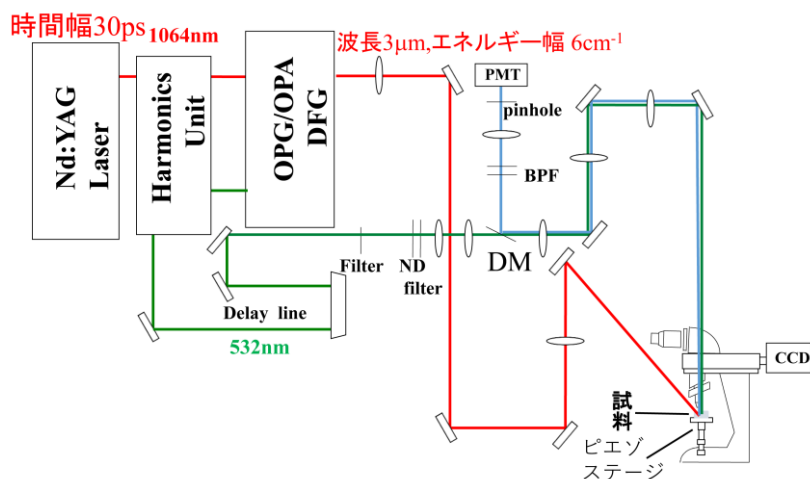


図2 共焦点光和周波顕微鏡の配置。DFG:差周波発生器、DM: ダイクロイックミラー、BPF:バンドパスフィルター、PMT:光電子増倍管。[1][2]

### <共焦点光和周波(SFG)顕微鏡>

図2は私たちが開発した、共焦点光和周波(SFG)顕微鏡のブロックダイアグラムである。Nd:YAG レーザーより発する波長 532nm、時間幅 30ps、くりかえし周波数 10Hz の光パルス(式(2)の $\omega_{\text{vis}}$ の光)と光パラメトリック発生器(OPG)[8]より発する赤外光(式(2)の $\omega_{\text{IR}}$ の光)が試料を照射し、発生した SFG 光が 532nm の光のパスを逆戻りして、ダイクロイックミラー(DM)に反射されて、集光されてピンホールを通り、光電子増倍管(フォトマル:PMT)で検出される。SFG 光が試料箇所と光電子増倍管前のピンホールで計二回集光されることで、共焦点光学系が構成されている。試料像はピンホールの位置で 20 倍に拡大されている。

像を計測するときには、試料の下のピエゾステージをスキャンし、求めた各点でのシグナル値より像を構成する。試料の1点でのSFGスペクトルを求める時には、ピエゾステージを固定し、赤外OPGの波長を掃引しながら、SFG光子数を計測する。

図3が私たちのグループで試作した共焦点光和周波顕微鏡システムの写真である。実際の製作はナノフoton株式会社が行った。われわれの知る限りでは、現在世界で共焦点機能と光和周波顕微鏡機能を併せ持つ顕微鏡はこの装置だけである。

共焦点光和周波顕微鏡の空間分解能は、SFG波長における共焦点顕微鏡の分解能の式を用いて、

$$r = \frac{0.61\lambda}{\sqrt{2}NA} \quad (4)$$

と表わせる[9]。ここで $\lambda$ はSFG光の波長で、本研究の場合 $0.46\mu\text{m}$ であり、NA(開口数)は、使用している倍率20倍の対物レンズのNA(=0.45)である。また $\sqrt{2}$ は、共焦点配置のときに現れる係数である[9]。この式を用いて、本装置の空間分解能を計算すると、 $0.44\mu\text{m}$ となる。ZnS単結晶を試料とし $10\mu\text{m}$ φのピンホールを用いて実測した空間分解能は $0.45 \pm 0.06\mu\text{m}$ であり、設計通りに動作していると考えられる[2]。シグナルの弱い生物試料などを観察するときは、光量を集める必要があるので、ピンホールとして $1\text{mm}$ φのものを用いて空間分解能 $2\mu\text{m}$ で観察することが多い。



図3 北陸先端大学における共焦点光和周波顕微鏡システム  
[1][2]

われわれの共焦点光和周波(SFG)顕微鏡光学系(図2)は、また別の利点を持っている。図2の光学系は、赤外光の光路を無視すれば、 $532\text{nm}$ のNd:YAGレーザーを光源として用いた通常の共焦点顕微鏡である。したがって、このシステムは通例のレーザー共焦点顕微鏡としても使用できる。また共焦点SFG顕微鏡としてのこの光学系の調整は、まず通例の共焦点顕微鏡として行い、次に緑色の光パルスとタイミングが合うように赤外パルスを試料に照射させればよい。この時発生するSFG光は実は波長 $532\text{nm}$ の入射光の試料による散乱光とは多少違った方向に出るが、対物レンズの集光立体角が十分大きい( $NA=0.45$ )ので、

問題なく集光できる。

#### <共焦点光和周波(SFG)顕微鏡によるコメ種子の断面の観察>

コメと言えばほぼすべての日本人が毎日口にする食べ物であるが、その小さな構造の中には複雑なしくみが広がっており、かつまだわかっていないことが多くある[10]。たとえば、本著者と共同研究を行っている秋田県立大学の中村保典名誉教授は、コメ種子の中の糖鎖を合成する酵素の働きを、DNAをコントロールすることにより変化させ、いろいろなグルカンを含むコメを育成し解析している[11]。その際に、稲の花が受精してその種子であるコメが生育する数日間の初期過程において、糖鎖がどのように成長していくのかはまだわかっていない課題である。著者らはこの課題にも、共焦点 SFG 顕微鏡を用いて取り組み始めている。しかし、本稿ではもっと基本的な普通のコメ種子の SFG 応答像と、気候変動による異常米の SFG 応答について述べ、その不思議さについて報告したい。コメのデンプン中のアミロペクチンは、キラルな構造を持つ $\alpha$ -D-グルコースを単位とする糖鎖であり、SFG 許容である。

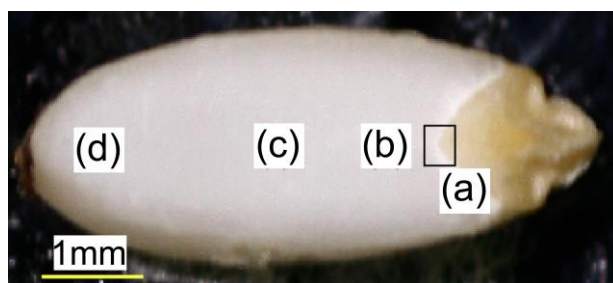


図4 新大正もちのコメ種子の断面の可視像。図中黒い4角形は、図5の計測の範囲を、(a)-(d)は図6でSFGスペクトルを計測する箇所を示す[4]。

#### <コメ種子断面の構造と SFG 像[4]>

図4に示すのは新大正もちというコメの種子の断面の拡大写真である。左側4分の3くらいの領域で広がる白い領域は胚乳とよばれるエネルギーの貯蔵庫で、デンプン粒が高密度で含まれている。右側の褐色の部分は胚と呼ばれ、将来稲の株に成長していく部分で、幼根や幼芽などが含まれる。胚乳と胚の間に、より白く見えるCの形をした幅0.1mmの帯

状の領域があるが、この領域は破碎領域と呼ばれ、胚乳の一部である。この領域は細胞やそれが含むデンプン粒の大きさが小さく、コメ種子が水分に接したときに毛細管現象で水が素早く入り込んでいきわたり、加水分解で栄養分のデンプンがグルコースに分解して、胚に供給されることがわかっている[10]。

図4の破碎領域の黒枠で囲った部分を拡大した可視像が図5aである。色合いが図4と異なるのは使用している照明とカメラの違いが理由である。赤外光の波数を CH 振動領域の  $2924\text{cm}^{-1}$  とし、この部分の SFG 像を計測したのが図5bである。ただし、図5aではシグナルが強い部分を明るい色で、図5bでは SFG 光子を黒い点で表している。図5ではあま

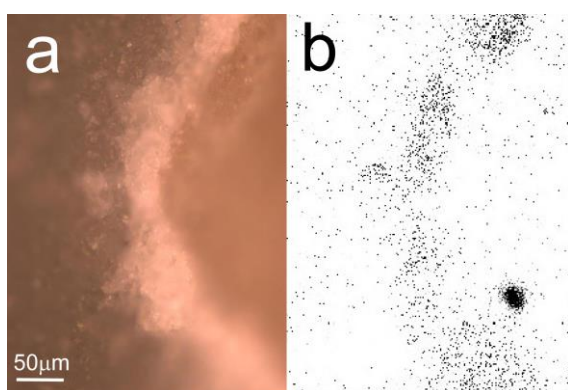


図5 新大正もちコメ種子断面の可視像(a)および SFG 像(b)。

図では左側に胚乳、真ん中に破碎領域、右側に胚が見えている。計測の範囲は、図4中の黒い四角の枠でしめした。可視像(a)の表示は明るいほどシグナルが大であり、SFG 像(b)の表示は、黒点が光子像である。(b)中右下の  $20\mu\text{m}$  程度のサイズの黒い斑点は外来物のシグナルである。

り定量的なことはわからないが、SFG 光強度のプロファイルを求めてみると、SFG 光強度は胚乳全体で強く、胚では弱い。さらに図5bからはこの破碎領域の SFG 強度が、胚乳の他の領域の平均値よりもずっと強いことが見て取れる。

SFG 光強度が、この破碎領域で強い原因の1つとしては、ここの部分でデンプンの濃度が高い可能性があげられるかもしれない。しかし、透過電顕写真やヨウドデンプン反応などを見ると、ここの部分で特にデンプンの濃度が高いわけではない[10]。そこで図4の(a)から(d)までの箇所では  $2\mu\text{m}$  の空間分解能で SFG スペクトルを計測した(図6)。本 SFG 顕微鏡の利点はこのように比較的高い分解能で SFG スペクトルが得られ、生物試料の部分ごとの振動分光解析ができるところにある。



図6を見ると SFG スペクトルが各箇所異なることがわかる。a の破碎領域では  $2905\text{ cm}^{-1}$  と  $2370\text{ cm}^{-1}$  の2つのピークがはっきりしており、これは典型的なアミロペクチンのス

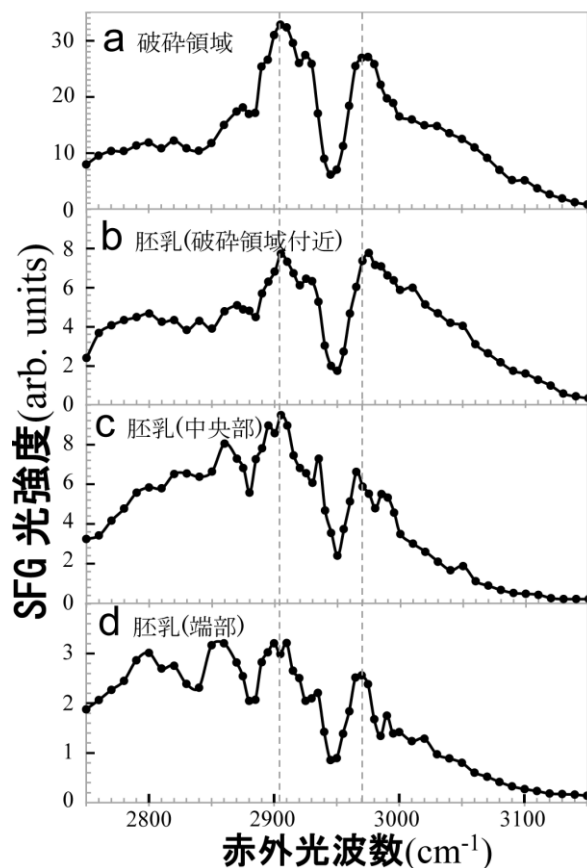


図6 新大正もち種子断面の各場所における SFG スペクトル。(a)-(d)の測定箇所は図4で定義した。

ペクトル[12]と一致する。b,c,d の箇所ではそれらのピークは控えめになり、 $2945\text{ cm}^{-1}$  のディップのみがはっきりしていることがわかる。これらのことより、破碎領域とそれ以外ではデンプンの種類が異なっていることが想像される。具体的にはアミロペクチンの分子鎖構造の枝分かれ(図7b)のしかたが、破碎領域以外の場所では乱れていることが考えられる。いろいろな糖鎖の SFG スペクトル[12][13]を見ると、 $2900\text{ cm}^{-1}$  付近のピークは鎖の枝分かれ方に敏感であることがわかり、この推測を支持しているようである。しかし詳しい描像は将来の研究を待たねばわからない。また別の解析によれば、破碎領域の内部において、胚から胚乳へと至る直線上において、SFG スペクトルが連続的に変化し、胚に近い箇所ほどグルコース成分が増加していることが示唆された[4]。



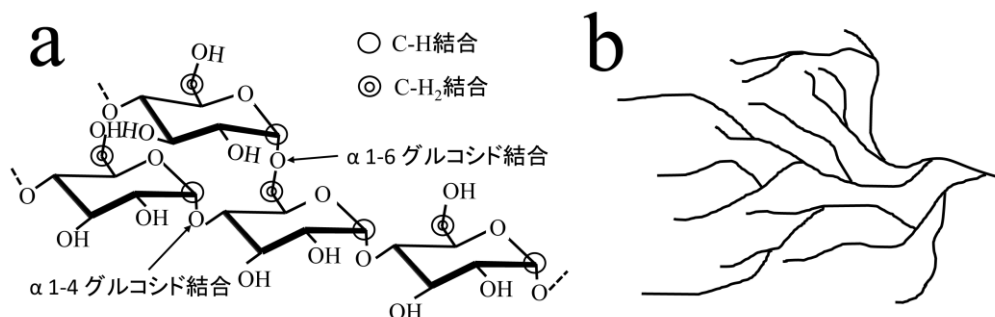


図7 アミロペクチンのミクロな構造(a)とマクロな構造の概念図(b)。(a)において、各ピラノース環の○印のついていない4つのC-H結合は、ダイポールを互いに打ち消し合い、SFGに寄与しない。

#### < 胴割れコメ種子の SFG スペクトル[5] >

地球温暖化のためであるのか、暑い夏が多くなった昨今であるが、夏が暑いと人間だけでなく、農作物にも大きな影響がでる。コメについては、暑さで発育が速すぎてコメ種子の胚乳にひび割れが入る胴割れという現象がある。図8bの挿入図として、われわれの今回の試料である、2011年夏に滋賀県の農業試験場で収穫された胴割れ米の写真を示す。図8bではコメ種子の長軸と直角方向に白いヒビ(黄色い矢印で示す)が入っており、照明の関係でそれより左側が暗く見えている。なぜ胴割れという現象が起こるのかは、完全には理解されていないが、この現象があらわれたコメ種子の糖鎖は、通例のものよりも長いという研究結果が報告されている[14]。そこでこのような結果を補足あるいは検証するようなことがSFG顕微鏡でできないかどうか挑戦した[5]。なおこの研究は滋賀県立大学の長谷川博名誉教授と共同で行った。

試した試料はコシヒカリと日本晴で、それぞれ2011年夏に滋賀県の農業試験場で十分完熟したのちに収穫されたものである。2011年夏は稲が実るころの気温が平年より2°C高く、コメの胴割れが観測された。登熟開始から10日後には10.8%、完熟期には80%程度の種子が胴割れを起こしていた。胴割れが起こっている株の中から、手作業で胴割れしている種子としていない種子を分類しSFGの観測をした。二種類のコメのうち日本晴でSFGスペクトルにある程度の違いが認められたので図8に示す。図8の上段が胴割れしていないコメ種子のSFGスペクトル、下段が胴割れしているものについてのものである。種子内の観測したポイントは破碎領域とした。2910cm<sup>-1</sup>のピークの幅が胴割れしているものの方が太い傾向があった。SFGスペクトルを2つのロレンツ曲線でフィットした結果によ

れば、胴割れしていないものでは  $2910\text{cm}^{-1}$  のピークの減衰係数  $\gamma$  は  $20.7 \pm 3.0\text{cm}^{-1}$  であったのに対し、胴割れしているものでは  $26.5 \pm 3.3\text{cm}^{-1}$  であった。図8のスペクトルでも、左側のピークの半値幅はそれに対応して  $36\text{cm}^{-1}$  と  $45\text{cm}^{-1}$  となっている。この相関関係については生体試料特有の個体差のゆらぎを含むので、さらに確認する必要がある。

この相関関係が有意であるとすれば、この結果はアミロペクチンの鎖の中の CH 結合と  $\text{CH}_2$  結合、とりわけ前者の種類のみならず、すなわち図7aの  $\alpha$ 1-6 グルコシド結合の密度のみならずから来ているものと思われ、これがコメ種子内の力学的歪みと関連し、最終的には胴割れを引き起こしたことと関連している可能性がある。たとえば、夏の気温が高く胴割れの心配がある時は、コメ種子を採取し SFG スペクトルをチェックすれば、あらかじめ胴割れが予想できる可能性がある。

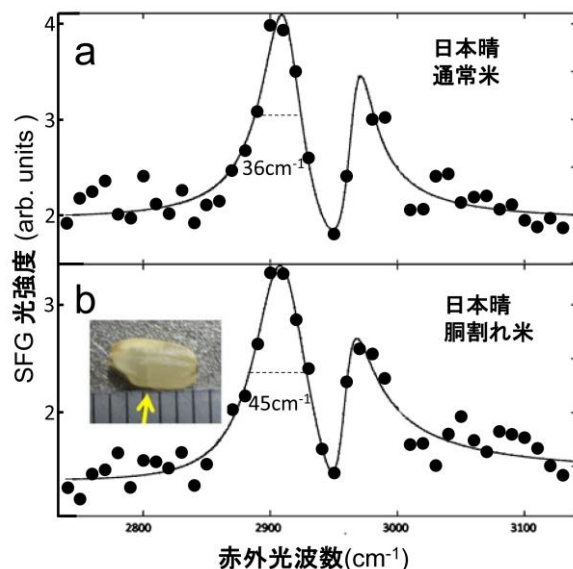


図8 日本晴のコメ種子の正常米(a)と胴割米(b)の SFG スペクトル。

このように共焦点 SFG 顕微鏡およびそれを用いた SFG 分光法は、コメの成分であるデンプンの分析に有効で、これを用いたコメ種子の解析と、最先端の遺伝子操作技術と組み合わせた、コメの新たな用途の可能性の開拓に有用であることが期待される。

本研究の実験を担当してくれた研究員の李紅燕氏、興山渉博士、共同研究者で、滋賀県立大学の長谷川博名誉教授、秋田県立大学の中村保典名誉教授に、深く感謝する。

参考文献

- [1] K. Locharoenrat, H. Sano, and G. Mizutani, *physica status solidi (c)* 6, 304 (2009); Erratum *ibid.* 6, 1345 (2009)
- [2] N. A. Tuan, Y. Miyauchi, and G. Mizutani, *Japanese Journal of Applied Physics* 51, 122402 (2012)
- [3] 水谷五郎, in “マイクロビームアナリシス・ハンドブック” 日本学術振興会マイクロビームアナリシス第141委員会編(オーム社、2015) p. 299
- [4] H. Li, Y. Miyauchi, N. A. Tuan, G. Mizutani, M. Koyano, *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology* 3, 286 (2012)
- [5] W. Kouyama, T. Nishida, K. T. T. Hien, G. Mizutani, H. Hasegawa, H. Miyamura, *Journal of Biomaterials and nanobiotechnology* 7, 13-18 (2016).
- [6] Y. R. Shen “The Principles of Nonlinear Optics” (Wiley, New York, 1984) p.86.
- [7] J. A. Belkin et al. *Phys. Rev. Lett.* 85, 4474 (2000).
- [8] 水谷五郎, in “マイクロビームアナリシス・ハンドブック” 日本学術振興会マイクロビームアナリシス第141委員会編(オーム社、2015) p. 12
- [9] G. Cox and C. J. R. Sheppard, *Microscopy Res. Tech.* 63, 18 (2004).
- [10] 松尾孝嶺ほか編“稲学大成”(農山漁村文化協会、東京、1990年)第1巻形態編
- [11] Y. Nakamura, *Plant Cell Physiol.* 43, 718 (2002).
- [12] Y. Miyauchi, H. Sano, and G. Mizutani, *Journal of the Optical Society of America A* 23, 1687 (2006).
- [13] G. Mizutani, T. Koyama, S. Tomizawa, and H. Sano, *Spectrochimica Acta Part A* 62, 845 (2005)
- [14] M. Asaoka, *Starch/Staerke* 36, 189 (1984).