

赤外超解像顕微鏡法による羽毛 $\beta$ -ケラチンの分子配向イメージング

(東京工業大学 資源化学研究所) ○渡瀬五常、牛尾公平、藤井正明、酒井誠

Orientation-sensitive imaging of feather  $\beta$ -keratins by VSFG-detected IR super-resolution microscopy

(Tokyo Institute of Technology, Chemical Resources Laboratory)

○Yukihisa Watase, Kohei Ushio, Masaaki Fujii, Makoto Sakai

**【序】** 羽毛は、羽軸を中心に羽枝そして小羽枝へと分岐した形状を持ち(図1)、それぞれの直径は $\sim 200 \mu\text{m}$ 、 $\sim 100 \mu\text{m}$  及び $\sim 5 \mu\text{m}$  と明瞭な違いがある[1]。各部位では、共通の主成分である $\beta$ -シート構造を有するケラチンタンパク質 ( $\beta$ -ケラチン) が階層的に収束し、繊維状構造を形成している。図2に羽軸の赤外吸収スペクトルを示す[2]。主成分の $\beta$ -ケラチンの Amide I バンド (CO 伸縮振動) に対応する吸収が  $1630 \text{ cm}^{-1}$  付近で非常に強く見られ、さらにその  $1650 \text{ cm}^{-1}$  付近にショルダーが観測されている。この吸収は振動数から $\alpha$ -ヘリックス構造を有するタンパク質の Amide I によるものだと考えるのが妥当だが、X線回折の結果から、ねじれている $\beta$ -シート構造をもつケラチンタンパク質 (Twisted  $\beta$ -ケラチン) の Amide I に由来すると現在考えられている。つまり、羽毛は主に $\beta$ -ケラチンと Twisted  $\beta$ -ケラチンの二つの成分で構成されていると言われている。

さらに、 $\beta$ -ケラチンと Twisted  $\beta$ -ケラチンが羽軸、羽枝また小羽枝では異なった比で存在していると報告されている[3]。しかし、 $\beta$ -ケラチンの組成が異なるこれらの二成分が、各部位でどのように分布し、配向しているかは、一般的な赤外顕微鏡の空間分解能が低い ( $\sim 10 \mu\text{m}$ ) ために分光学的に解明されていない。

そこで、赤外光と可視光による二次的非線形光学過程である振動和周波発生 (VSFG) 法を顕微鏡技術に応用し、空間分解能を $\sim 1.0 \mu\text{m}$  まで向上した VSFG 検出赤外超解像顕微鏡を用いて、羽毛  $\beta$ -ケラチンの分布の解明を試みた。また VSFG 信号強度は VSFG、可視光そして赤外光の偏光に影響し、分子配向によってその応答が変化することから、 $\beta$ -ケラチンの分子配向の観察が期待される。本研究では、まず比較的観察しやすいサイズの羽軸における $\beta$ -ケラチンの分布に加え分子配向を解明することを目的としている。

**【実験】** 励起光源の可視光と赤外光を発生するために、ピコ秒レーザーシステム (パルス幅: 2 ps) を採用した。赤外光は  $5500 \sim 9000 \text{ nm}$  まで波長を可変できるようにし、可視光は  $613 \text{ nm}$  に固定し

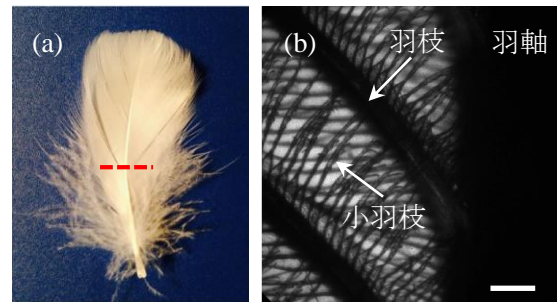


図1: (a) 羽毛の全体像 (破線: 切断方向)、(b) 拡大像 (スケールバー:  $100 \mu\text{m}$ )

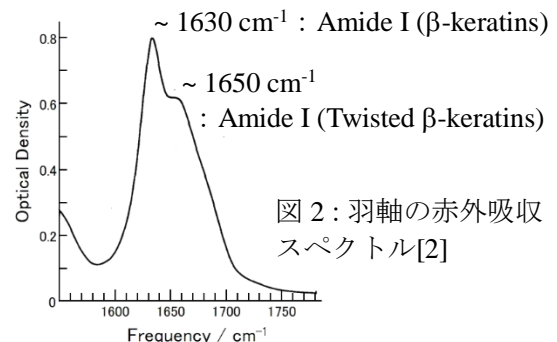


図2: 羽軸の赤外吸収スペクトル[2]

て使用した。同軸に合わせた赤外光と可視光は、羽毛試料に対して下から垂直に照射し、発生した VSFG のみを照射方向の反対側の対物レンズで集光し、ICCD カメラに結像した。

羽毛試料の調製には、生体試料を薄片化する技術として一般的なマイクロトーム法を採用した。ガチョウの胸部の羽毛をエポキシ樹脂で包埋し、 $\beta$ -ケラチンの熱変性が起きないように  $65^\circ\text{C}$  で約 18 時間熱重合させてサンプルチップを作製した。マイクロトームを用いて、このチップを切断方向が図 1 - a 上に示した破線の通り羽軸の長軸方向に対して垂直に厚さ  $3\ \mu\text{m}$  に薄切した。切り出した羽軸横断面はカバーガラス上に吸着させ、半固定したものを測定に用いた。

**【結果・考察】**図 3-a 中の羽毛横断面の実線で囲った羽軸の領域を拡大して、 $\beta$ -ケラチンの Amide I バンド ( $\text{CO str.}, 1630\ \text{cm}^{-1}$ ) と Twisted  $\beta$ -ケラチンの Amide I ( $1650\ \text{cm}^{-1}$ ) に対して VSFG イメージングを行った (図 3-c, d)。図 3-c より羽軸の大部分に  $\beta$ -ケラチンが分布していることの可視化に成功した。一方、図 3-d (Twisted  $\beta$ -ケラチン) では、 $\beta$ -ケラチンより強度が明瞭に落ちているものの分布に差がある様には見られない。羽軸の内側 (画面上の上部) と外側 (画面上の下部) で代表点を取り、強度比で比較したところ、内側の方が外側より  $\beta$ -ケラチンが Twisted  $\beta$ -ケラチンより約 10% 多く存在している結果が得られた。この差が分布の差を示唆する有意な値であるのか精査するために、分子配向の違いつまり VSFG 信号強度の偏光依存性を測定した。

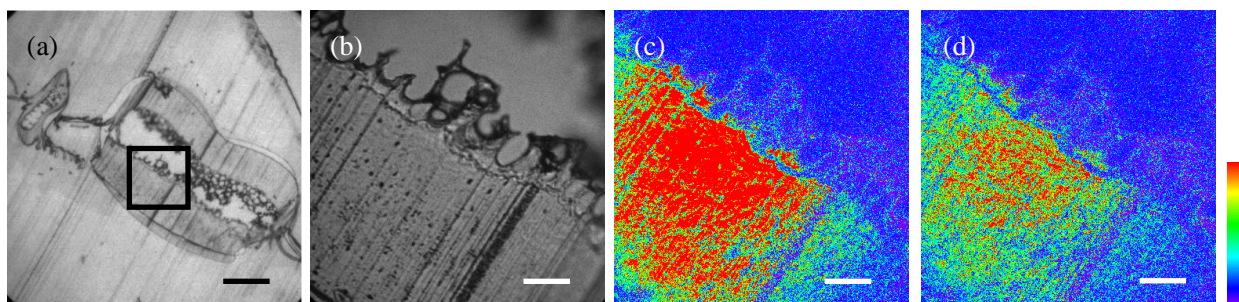


図 3 : (a) 羽毛横断面の透過像 (スケールバー :  $100\ \mu\text{m}$ )、(b) 羽軸横断面の透過像 (スケールバー :  $20\ \mu\text{m}$ )、(c)  $\beta$ -ケラチン ( $1630\ \text{cm}^{-1}$ ) に対する VSFG 像、(d) Twisted  $\beta$ -ケラチン ( $1650\ \text{cm}^{-1}$ ) に対する VSFG 像

VSFG、可視光及び赤外光を電場がそれぞれ画面上で縦方向と横方向になるように偏光させ、全 8 通りの偏光の組合せで  $\beta$ -ケラチンと Twisted  $\beta$ -ケラチンの Amide I に対する VSFG イメージングを行った。二成分の結果を比較したところ、Twisted  $\beta$ -ケラチンの Amide I 振動によるイメージングでは信号強度が著しく低下しただけで、 $\beta$ -ケラチンと同じ偏光依存性を示した。従って、我々は  $\beta$ -ケラチンを選択的に観測していると考え、図 3-c, d では二成分の分布ではなく  $\beta$ -ケラチンが羽軸の大部分を占めていると結論付けた。さらに偏光の組合せを変えると、 $\beta$ -ケラチンの分布に偏りが見られた。発表では、この偏光依存性に対するより詳細な議論をする予定である。

#### 【参考文献】

- [1] Dincer Yildiz *et al.*, *Journal of Animal and Veterinary Advances*, **12**, 8 (2009).
- [2] R. D. B. Fraser and E. Suzuki, *Spectrochimica Acta*, **423-426**, 26A (1969).
- [3] K. Takahashi *et al.*, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, **1875-1881**, 68 (9), (2004).