

VSFG 検出赤外超解像顕微鏡法による 羽毛 β -ケラチンの分子配向イメージング

(東工大・化生研¹、東工大・生命理工²、岡理大・理³)

○渡瀬五常¹、藤井正明¹、酒井誠^{2,3}

Orientation-sensitive imaging of feather β -keratins by VSFG-detected IR super-resolution microscopy

(Laboratory for Chemistry and Life Science, Tokyo Institute of Technology¹,
Graduate School of Bioscience and Biotechnology, Tokyo Institute of Technology²,
Faculty of Science, Okayama University of Science³)

○Yukihisa Watase¹, Masaaki Fujii¹, Makoto Sakai^{2,3}

【序】 生体繊維の中でも物理的・化学的に頑丈で軽量の羽毛は、羽軸を中心に羽枝、小羽枝へと分岐した特殊な形状を持っており（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 β -シート構造を有するケラチンタンパク質（ β -ケラチン）が階層的に収束し、繊維状構造を形成している[2]。特に、羽軸では、平行に配列した一対の β -ケラチンが互い違いに重なった β -ケラチンフィラメント（図2）が、羽軸の伸長方向に沿って並んでいるといわれている[3,4]。しかし、この β -ケラチンの配向は透過型電子顕微鏡を用いた測定から推測されているため、実際の分子配向に関する情報は得られていない。また、羽軸内における β -ケラチンの空間分布についても、一般的な赤外顕微鏡の空間分解能が低い（ $\sim 10\ \mu\text{m}$ ）ために解明されていないことから、 β -ケラチンの分布および配向の分光学的な測定が求められている。

そこで、私たちは、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 β -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[5]から、 β -ケラチンの分子配向の観察が期待される。本研究では、羽軸における β -ケラチンの分布に加え、VSFG 信号の偏光依存性を測定して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、再生増幅器によって増幅させた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 5500~9000 nm まで波長を可変できるようにし、可視光は 613 nm に固定して使用した。赤外光と可視光はビームコンバイナーで同軸に合わせ、羽毛試料に対して垂直に照射し、発生した VSFG を反対側から対物レンズで集光した後、赤外カットフィルターおよびバンドパスフィルターを介して ICCD カメラに結像した。偏光依存

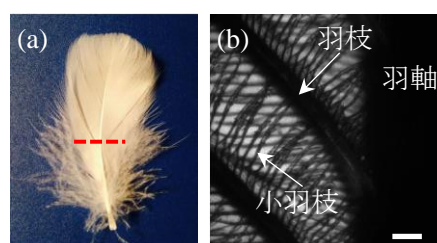


図1：(a) 羽毛の全体像（破線：切断方向）、(b) 拡大像（スケールバー：100 μm ）

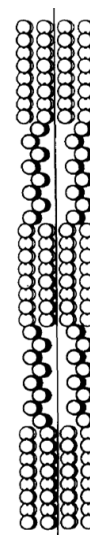


図2： β -ケラチンフィラメント[3]

性測定では、可視光と赤外光は 1/2 波長板、VSFG は偏光フィルターを用いて、偏光を縦偏光および横偏光に制御して測定した。

羽毛試料の調製では、ガチョウの胸部の羽毛をエポキシ樹脂で包埋し、 β -ケラチンの熱変性を防ぐために 65 °C で約 18 時間熱重合させてサンプルチップを作製した後、マイクロームで図 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 μm に薄切した。切り出した羽軸横断面は、カバーガラス上に半固定したものを測定に用いた。

【結果・考察】図 3 は、羽軸横断面に対して行った β -ケラチンのアミド I バンド ($\text{CO str.}, 1630 \text{ cm}^{-1}$) における偏光依存性測定の結果である。画像上で横方向が X 偏光、縦方向が Y 偏光とし、VSFG、可視光、赤外光のそれぞれの偏光の組合せが、YYX (図 3-b) と XXY (図 3-c) の場合で測定した。まず、図 3-b (YYX) により羽軸全体から強い VSFG 信号が観測されたことより、羽軸の大部分に β -ケラチンが分布していることの可視化に成功した。加えて、信号強度に濃淡が見えることから β -ケラチンが不均一に存在していることが分かった。一方、偏光の組合せを変えた図 3-c (XXY) では、VSFG 信号強度や分布が明瞭に変化した結果が得られた。この図 3-b, c の信号分布の差異の原因を考察する。測定された異方性をストレートに解釈すると画面上でアミド I が横方向に振動するように β -ケラチンが配向していると考えられる。もし図 2 の β -ケラチンフィラメント構造が正しいとすると、アミド I は同じ領域で横、縦方向に振動しているため、YYX と XXY では信号分布に差が生じないはずである。したがって、 β -ケラチンフィラメントは報告されている構造 (図 2) ではなく、アミド I が横方向に振動して β -ケラチンが一律に整列してはいなくてはならない。一方、この分光法は β -ケラチンフィラメントが成す層と層の間に存在する界面に選択的に応答する。最近、 β -ケラチンフィラメントの集合体がレイヤー状の構造を取り、羽毛を形成しているという報告がされた[2]。この構造を考慮すると、レイヤー間の界面は異方的であるため、その界面の偏光依存性が顕著に現れた可能性も考えられる。すなわち、羽軸内部の β -ケラチンは図 2 のような構造で構成されているが、界面に関しては β -ケラチンが規則的に一方方向に整列している可能性が考えられる。発表では、切断角度を変えて調製した羽軸縦断面に対する偏光依存性測定の結果を交えて、 β -ケラチンの配向の考察を報告する予定である。

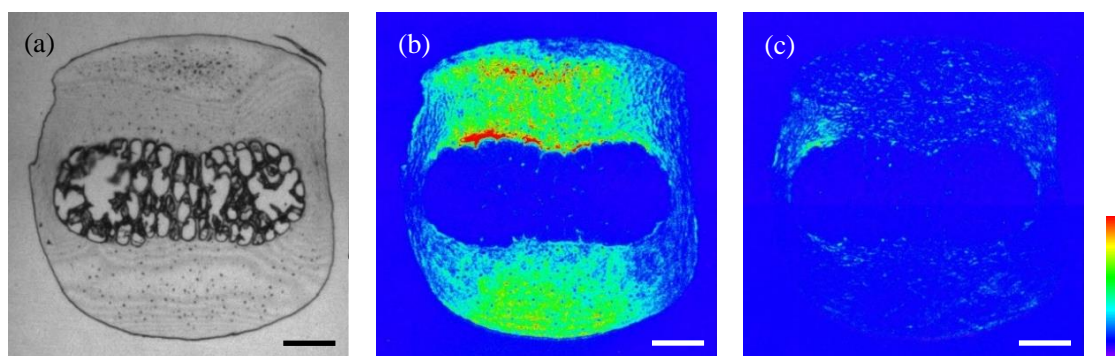


図 3 : (a) 羽毛横断面の透過像 (スケールバー : 40 μm)、(b)アミド I バンド (1630 cm^{-1}) に対する VSFG 像 (YYX)、(c) アミド I バンド (1630 cm^{-1}) に対する VSFG 像 (XXY)

【参考文献】

- [1] D. Yildiz *et al.*, *J. Anim. Vet. Adv.*, **12**, 8, (2009). [2] T. Lingham-Soliar *et al.*, *Proc. R. Soc. B*, **1161-1168**, 277, (2010). [3] R. D. B. Fraser and E. Suzuki, *Polymer*, **35-56**, 12, (1971). [4] R. D. B. Fraser *et al.*, *J. Struct. Biol.*, **1-13**, 162, (2008). [5] Y. R. Shen and V. Ostroverkhov., *Chem. Rev.*, **106**, 1140, (2006).