

**VSFG検出赤外超解像顕微鏡法による羽毛 β -ケラチンの
赤外分光イメージング
-偏光依存性測定による分子配向、キラリティーの観測-**

¹岡山理大・理, ²東工大・化生研

○高橋広奈¹, 山本幸汰¹, 木村裕也¹, 渡瀬五常², 藤井正明², 酒井誠¹

**Orientation-sensitive IR imaging of feather β -keratins by a VSFG-detected
IR super-resolution micro-spectroscopy -Polarization dependency
measurements-**

○Hirona Takahashi¹, Kota Yamamoto¹, Yuya Kimura¹, Yukihiwa Watase²,
Masaaki Fujii², Makoto Sakai¹

¹ Faculty of Science, Okayama University of Science, Japan

² Laboratory for Chemistry and Life Science, Tokyo Institute of Technology, Japan

【Abstract】 Feather is generally known to consist of rachis, barb and barbule regions from the root to the tip, and it has been reported that main components of feather are β -keratins with β -sheet structures. On the other hand, the spatial inhomogeneity of β -keratins could not be disclosed because of a lack of the spatial resolution of previous analytical methods. In this study, we aim to elucidate the spatial distribution and orientation of β -keratins at each region of feather in the amide I band and verify those differences at each region by a vibrational sum-frequency generation (VSFG) detected IR super-resolution microscopy that has the ability to measure the orientation-sensitive molecular image with sub-micrometer scale spatial resolution. In addition, we will discuss the results of the cutting angle dependence on VSFG-detected IR super-resolution imaging.

【序】 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いる。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、 β -シート構造を有するケラチンタンパク質 (β -ケラチン) が階層的に集束し、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]。我々は、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 β -ケラチンの内部分布・配向の解明を試みた。VSFG 信号強度は VSFG、可視光そして赤外光の偏光に依存し、かつ、分子配向によってその応答が大きく変化すること[5]から、 β -ケラチンの分子配向観察が可能である。我々は既に、羽軸中心部の横断面 (Fig. 1) における β -ケラチンのアミド I バンド ($\text{CO str.}, 1630 \text{ cm}^{-1}$) の偏光依存性測定を行った結果を今年の分子科学討論会で報告した[6]。その結果から、羽軸の大部分に β -ケラチンが分布していることに加えて、偏光の組み合わせによって VSFG 信号強度が明瞭に変化したことから、

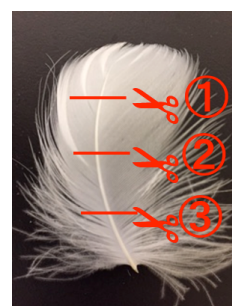


Fig. 1. 羽毛全体像
(①先端部、②中心部、③根元部、破線は切断箇所)

β -ケラチンが規則的に一方向に整列している可能性を示した。本研究では、羽軸の根元部から先端部にかけて偏向依存性測定を行い、 β -ケラチンの分布・配向の部位依存性について調べた。また、分子配向を精査するために、羽軸中心部について切断角度を変化させて作成した試料についても同様の測定を行った。

【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 VSGF 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。偏光依存性測定では、可視光と赤外光は 1/2 波長板、VSGF 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。試料は、ガチョウの胸部の羽毛をエポキシ樹脂で包埋し、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、マイクロトームで Fig. 1 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 に薄切りにした。切り出した羽軸横断面は、カバーガラス上に半固定し測定に用いた。

【結果・考察】 Fig. 2 は羽軸先端部、中心部および根元部における β -ケラチンのアミド I バンドの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、VSGF、可視光、赤外光のそれぞれの偏光の組合せが YYX と XXY の場合で測定した。透過像を比較すると、先端部と中心部が断面の形状がよく似ているのに対し、根本部は空洞の大きさが大きく、形状が異なることがわかった。赤外超解像イメージング測定の結果を比較すると、先端部では偏光が XXY の際に強度が強くなっているのに対し、中心部では YYX 偏光の際に強度

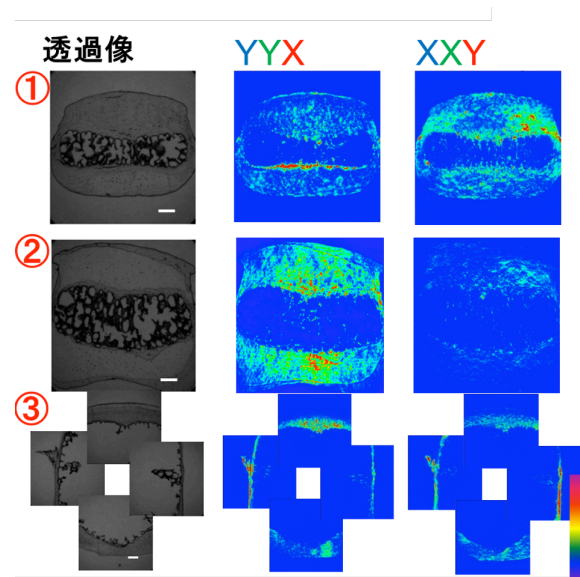


Fig. 2. 羽軸の透過像およびアミド I に対する VSGF 像 (①先端、②中心、③根元部、Scale bar : 50 μm) .

が強く、配向が逆転していることがわかる。また、根本部では YYX、XXY どちらでも同じ強度の信号が観測されており、 β -ケラチンが X 配向、Y 配向のものが混在していることがわかった。このように羽軸内での β -ケラチンの配向が部位によって異なることが示唆された。発表では、羽軸中心部について切断角度を変化させて測定した結果をもとに、キラリティーの観測についても議論する。

【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). [6] 渡瀬, 藤井, 酒井, 第10回分子科学討論会, 2F13 (2016).