

非線形光学効果を利用した赤外超解像顕微鏡による 羽毛内ケラチタンパク質の分布・配向観察

岡山理大・理

高橋広奈, 三好優乃生, 藤本健史, ○酒井誠

Orientation-sensitive IR imaging of feather β -keratins by an IR super-resolution micro-spectroscopy based on non-linear optical process

Hirona Takahashi, Masanobu Miyoshi, Takeshi Fujimoto, ○Makoto Sakai

Faculty of Science, Okayama University of Science

【Abstract】 Vibrational sum-frequency generation (VSFG) detected IR super-resolution microscopy has the ability to measure the orientation-sensitive molecular image with sub-micrometer scale spatial resolution. In this study, we applied VSFG-detected IR super-resolution microscopy to feather β -keratins. 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. Then, 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

【序】 羽毛は物理的・化学的に頑丈で、軽量の性質を持ち、羽軸を中心に羽枝、小羽枝へと分岐した特殊な形状をしている。各部位では、 β -シート構造を有するケラチタンパク質 (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[1]。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[2,3]。我々は非線形光学過程の1つである振動和周波発生 (VSFG) 法を顕微鏡技術に応用した VSFG 検出赤外超解像顕微鏡を用いて、羽軸各部位の横断面 (Fig. 1 実線部分) 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。VSFG 検出赤外超解像顕微鏡では、 $1 \mu\text{m}$ の高い空間分解能で赤外イメージングが可能である。更に 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、分子配向によってもその応答が大きく変化すること[4]から、 β -ケラチンの分子配向も明らかにできる。昨年の分子科学討論会において、羽軸の大部分に β -ケラチンが分布していること、羽軸中心部においては β -ケラチンが特定の方向に一様に配向している一方、先端部では、配向度合いが大きく変化し、ランダム化されていることを既に報告した[5]。本研究では、一様に配向した中心部からランダム化した先端部へと 0.5 mm 毎に観察を行い、 β -ケラチンの分布・配向がどのように移り変わっていくかを精査した。

【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

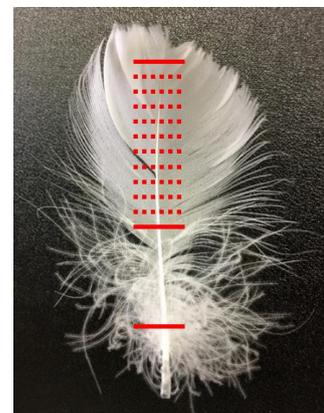


Fig. 1. The overall image of feather (lines: measurement position)

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 610 nm または 800 nm を使用した．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．偏光依存性測定では，可視光は 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．赤外光の偏光は試料の向きを変えることで変更した．試料は，ガチョウの胸部の羽毛をエポキシ樹脂で包埋して作成したサンプルチップをマイクロトームで 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 は羽軸の中心部から先端部における横断面の超解像イメージングであり，いくつかの部位を選んで表示した．なお，画像は下から順に中心部に近い方から並べてある．画像上で横方向が X，縦方向が Y とし，VSFG，可視，赤外光のそれぞれの偏光の組み合わせが YYX および XXY の場合で測定した．Fig. 2 の下段に示した中心部を見てみると，YYX 偏光の際に強度が大きく，大部分の領域で β -ケラチンが一様に配向している．また，試料右上の部分では，XXY 偏光で信号が観察されており，この領域では， β -ケラチンの配向が逆転していることが分かる．中心部から先端部にかけてみてみると，VSFG 信号の出る位置や偏光の組み合わせが部位によって異なっている．これは，部位によって β -ケラチンの配向やその分布が異なっていることを示している．VSFG 信号の強度を比べると，中心部に比べて先端部では弱くなっている．VSFG 信号はランダム配向の試料では強度が著しく減少するため，羽軸先端部においては β -ケラチンの配向がランダム化していることが考えられる．しかしながら，信号強度は配向した分子の濃度にも依存するため，羽軸先端部では中心部に比べて β -ケラチンの含有量が少ない可能性も無視できない．そこで我々は， β -ケラチン含有量を見積もることのできる，非線形光学効果を利用した新規の手法を開発した．発表では同一の試料に対して新規手法で測定した結果を併せて示し，信号強度の減少の原因について検討を行う．

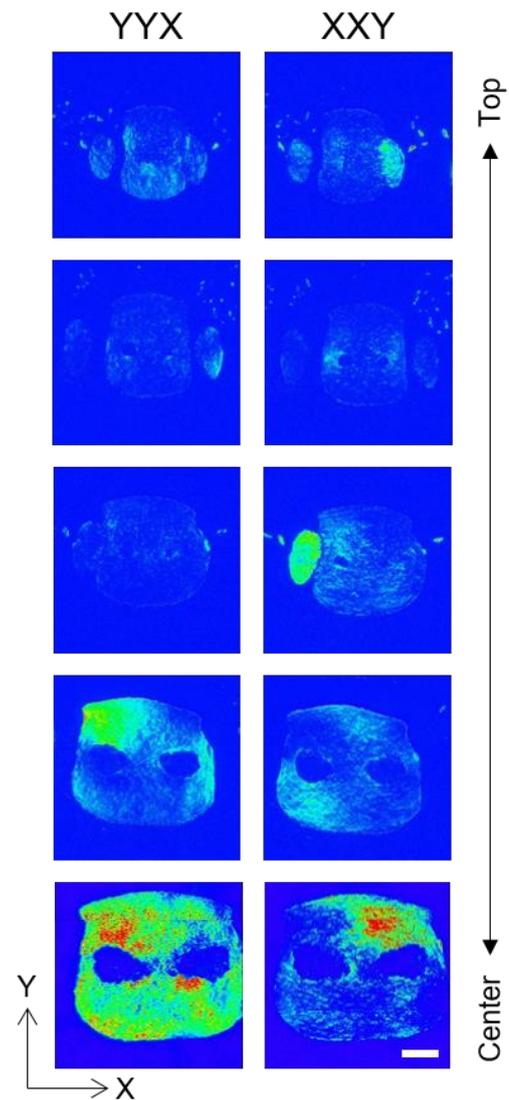


Fig. 2. VSFG images for Amide I (Scale bar: 50 μm)

【参考文献】

- [1] T. Lingham-Soliar et al., *Proc. R. Soc. B*, 1161-1168, 277 (2010). [2] R. D. B. Fraser and E. Suzuki, *Polymer*, 35-56, 12 (1971). [3] R. D. B. Fraser et al., *J. Struct. Biol.*, 1-13, 162 (2008). [4] Y. R. Shen and V. Ostroverkhov., *Chem. Rev.*, 106, 1140 (2006). [5] 高橋他, 第11回分子科学討論会, 2P074 (2017).