

ケラチン付随タンパク質(KAPs)を欠いたヒト毛髪ケラチンフィルムの作製とその性質

藤井 敏弘^{*1, #}・伊藤 弓子^{*1}

Preparation and Properties of Human Hair Keratin Film Lacking Keratin-Associated Proteins

*Toshihiro Fujii^{*1, #} and Yumiko Ito^{*1}*

^{*1}Faculty of Textile Science and Technology, Shinshu University,
3-15-1, Tokida, Ueda, Nagano 386-8567, Japan

Abstract : Human hair keratin film has been used as an alternative to hair samples to evaluate various damages. This film consisted of keratin and keratin-associated proteins (KAPs). The function of KAPs on the molecular constitution of hair and keratin film remains unclear. Recently, we have developed a selective isolation method for keratin and KAPs from human hair. In this study, we proposed a novel keratin film lacking KAPs using the Pre-cast method. The concentration of acetic acid in the casting solution of hair protein solution was higher than that in hair protein solution lacking KAPs. The morphology and chemical properties of the KAPs free keratin film were compared with those of conventional and high acetic acid keratin films containing KAPs. The KAPs free and high acetic acid films were beige and semitransparent in appearance, whereas the conventional film was white and opaque appearance. SEM observation indicated the KAPs free film was made up reticular structure and the surface was covered by small particles around 1 μm in diameter. When these films were stained with oxidative hair color reagents, color deposits of the KAPs free and high acetic acid films were higher than that of the conventional film. Compared with hair sample, the formation of cysteic acid was significantly prompt in these keratin films. The amount of the KAPs free film was slightly lower than those of the conventional and high acetic acid keratin films. When reductive permanent reagent containing thioglycolic acid was added to these keratin films, the optical transmittance was decreased. And the decrease was recovered by oxidative permanent processing.

The film formation technology will be useful to evaluate various functions under which keratin and KAPs were classified.

Keywords : keratin film, hair substitute, keratin-associated protein, coloring reaction, reduction-oxidation sensitivity, cysteic acid

(Received 16 February, 2015 ; Accepted 2 April, 2015)

1. 緒 言

毛髪の約 80% を占めるコルテックスは、繊維状の構造タンパク質により作られている。この繊維タンパク質は自己組織化できる性質を利用して形成したマイクロフィブリルが髪の毛の長軸上に並ぶように集合し、これが細胞膜複合体に囲まれてマクロフィブリルを構築する。さらに、マクロフィブリルが集合してコルテックスが作られる。一連のフィラメント/ファイバーの階層構造が髪の毛の力学的な特性である強度としなやかさを生み出しているものと考えられている[1,2]。

コルテックスの繊維タンパク質は中間径フィラメント

に属するケラチンと低分子量のケラチン付随タンパク質(KAPs)を主な成分としている。ケラチンの単量体としての分子量は、40~60kDa で、さらに、酸性等電点(pI=4.8~6.0)をもつタイプ I と中性~塩基性の等電点(pI=5.9~7.8)をもつタイプ II の成分に分けられており、各々 6~7 個の遺伝子多型が知られている[2-5]。一方、10~30kDa の分子量をもつ KAPs は、アミノ酸組成の違いから、高イオウ、超高イオウ、高グリシン/チロシンに分類され、100 種類もの KAPs が同定されている[6,7]。KAPs の役割はケラチンフィラメント同士の隙間を埋めて規則正しく並べる膠物質として考えられているが、この機能研究は進んでいない。その理由としては、マイナー成分であることに加え、システイン含量が 24% と高く凝集しやすい性質をもつため、取り扱いが難しいタンパク質といえる[8]。

corresponding author

私たちは毛髪から短時間に高効率でタンパク質を可溶化することができる信大法と、得られたタンパク質溶液からケラチンの自己集合能を誘発してフィルムを形成する方法を報告している[9-11]。この中のプレキャスト法で得られたフィルムをケラチンフィルムと名付け、代替毛髪としてヘアダメージの分析などに利用している[12,13]。最近、毛髪からKAPsを選択的に分離できる方法を開発しており、この方法で処理した毛髪試料のKAPs含有量はかなり減少しているため、KAPsをほとんど含まないケラチン溶液を得ることができる[14]。そこで、従来までのケラチンとKAPsから成るケラチンフィルムとは異なるKAPsフリー型のケラチンフィルムの作製と形成したフィルムの性質を調べたので報告する。

2. 実験

2.1 KAPsフリー毛髪試料の調製と毛髪タンパク質フィルムの作製

毛髪試料はブリーチやパーマなどの施術がしていない複数のボランティアから採取して用いた。裁断した毛髪をKAPs/信大法溶液(8M 尿素, 200 mM ジチオスレイトール(DTT), 25% エタノール, 25 mM Tris-HCl, pH 8.5)に浸し、50℃ 下で3日間抽出を行った。ろ過により抽出液を除いた残渣を水洗後に乾燥して、KAPsフリー毛髪試料とした[9,14]。

通常とKAPsフリー毛髪を60-70mg/mlになるように信大法溶液(5M 尿素, 2.6M チオ尿素, 200mM DTT, 25mM Tris-HCl, pH 8.5)に浸し、50℃ 下で1日間抽出を行った。ろ過と遠心操作により毛髪残渣を取り除き、タンパク質溶液(40~45mg/ml)を得た[14]。フィルムは、タンパク質溶液に酢酸を混合後に蒸留水を満たしたシャーレに静かにキャストイングをして形成した。フィルムは24時間以上洗浄した後、自然乾燥して回収した。

2.2 フィルムの分析

毛髪タンパク質溶液のフィルムへの変換を示す回収率は、質量測定により調べた。タンパク質量は、Bradford法と質量法で測定した[15]。フィルムの構成タンパク質は、SDS-ポリアクリルアミド(SDS-PAGE)ゲル電気泳動を用いて調べた。フィルムから再抽出した溶液は、sample bufferで処理した後に泳動した。ゲルは、0.1% クマシーブリリアントブルー R-250, 10% 酢酸, 40% エタノールで2時間染色後、10% 酢酸で脱色処理を行った[16]。

2.3 酸化染料の染着性

染色溶液として、p-フェニレンジアミン、p-アミノフェノール、2,4-ジアミノフェノキシエタノール、m-アミノフェノール、5-アミノオルトクレゾール、レゾルシンなどを含む2種類の1剤と6% 過酸化水素を含む2剤を1:1の割合で混合して調製した。ケラチンフィルムと毛髪(白色、ビューラックス社)はこれら混合液と37℃、60分間インキュベートして反応させた後、蒸留水でよく洗浄し

室温で乾燥させてライトブラウン、ダークブラウン染色を行った[17]。

2.4 SEM 観察

ケラチンフィルムの一部を切り取り、カーボン両面テープで試料台に固定した。金蒸着を施し、導電性を与えた後に微細構造を観察した(JSL-6010LA; 日本電子)[18,19]。

2.5 還元-酸化応答性

還元剤としてチオグリコール酸ナトリウム、酸化剤として臭素酸ナトリウムが主剤として配合されている市販パーマ剤を用いて、ケラチンフィルムの還元処理、酸化処理、還元処理後酸化処理を実施した。1mlのパーマ1剤(還元処理)、パーマ2剤(酸化処理)、コントロールとして蒸留水をケラチンフィルムに加え、25℃で10分間インキュベートした。また、別途1mlのパーマ1剤処理を10分間実施した後に、パーマ1剤を除去し、パーマ2剤処理を25℃で10分間実施した。各処理後のフィルムは蒸留水で洗浄後に自然乾燥し、フィルムの質量を測定した後に使用した[18]。

光透過性は未処理と処理後のフィルムを乾燥後、分光光度計(U-2001 型分光光度計; 日立)を用いて660nmにて測定した。

2.6 フーリエ変換型赤外分光(FTIR)/ATR 測定

赤外線吸収スペクトルはフーリエ変換赤外分光光度計(IR Prestige-21; 島津製作所)のATR法を使用して行った。ケラチンフィルムは掻き取った後、乳鉢で粉体とした。一方、毛髪試料は細断した後、マルチビーズショッカー(MB755U(S); 安井器械)で粉体にし測定用の試料とした。スキャン回数は50回、分解能は4cm⁻¹、測定の波数範囲は4000~600cm⁻¹、解析には吸収スペクトル1076cm⁻¹での規格化を行った[18,19]。

3. 結果と考察

3.1 KAPsフリー型ケラチンフィルムの作製

信大法で溶出したケラチンを含むタンパク質溶液は酢酸、トリクロル酢酸、過塩素酸と混ぜた後に水で満たされたシャーレにキャストイングすると、ケラチンは自己集合してフィルムを形成する[10,11]。私たちは通常の毛髪とKAPsをほとんど含まない毛髪から溶出したタンパク質に酢酸濃度を変化させたキャストイング溶液を調製して、フィルム形成を試みた。未処理毛髪からのタンパク質溶液は、キャストイング溶液に含まれる酢酸濃度が25~125mMにおいて、フィルムが形成した。溶液からフィルムへと変換する回収率は25mM濃度の場合が最も高く、高濃度になるに従い低下した(Table 1)。一方、KAPsをほとんど含まない毛髪からのタンパク質溶液は、25mM酢酸においてフィルム形成は見られなかった。しかしながら、酢酸濃度を50mM以上にすると、フィルムが形成した。未処理毛髪からの変換率が40~70%であるのに対して、KAPsをほとんど含まない毛髪からは70~80%と高

Table 1 Effect of acetic acid on the formation of the keratin films

Human hair keratin films were prepared by the combination of acetic acid and Pre-cast method. The quantities of protein recovered as the films were calculated by weighting.

Sample	Acetic acid (mM)	Weight of film (%)
Normal hair proteins	25	67.0
	50	56.7
	75	56.3
	100	45.7
	125	39.9
KAPs free hair proteins	25	N.D.
	50	78.2
	75	75.4
	100	73.5
	125	69.1

い変換率でのフィルム形成であった。

各フィルムのタンパク質を信大法溶液で抽出して、電気泳動でその構成成分を調べた(Fig. 1)。この結果、未処理毛髪からの抽出液とフィルムは40~60 kDaのケラチンと6~30 kDaのKAPsから成っているが、KAPsをほとんど含まない毛髪からのフィルムはケラチンを主成分としており、KAPs含量は有意に低下していることを確認できた。KAPs含量が低下しているケラチンのタンパク質溶液からのフィルム形成には高濃度の酢酸を必要としたことは、ケラチンのKAPs間との相互作用が自己集合能にも関わり、フィルム凝集体の成分となっていることを示唆した。回収率の変化は、キャスト溶液における25, 50, 75, 100, 125mM酢酸を添加したときのpHは8.8, 6.5, 5.6, 5.2, 5.0であることから、ケラチン分子の等電点

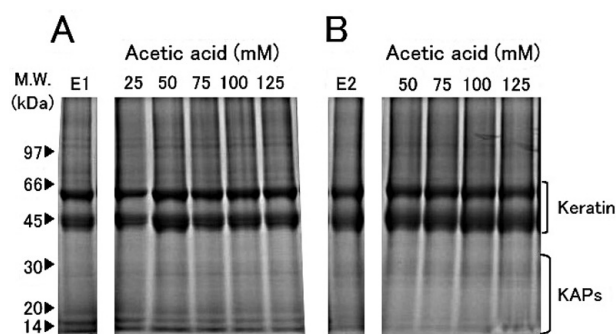


Fig. 1 SDS-PAGE of the extracted protein from the keratin films.

Hair protein and keratin films were prepared from normal (A) and KAPs free hair samples (B). The concentrations of acetic acid in the casting solution were 25, 50, 75, 100, and 125 mM. The films were incubated with the Shindai solution containing 250 mM DTT at 50°C for 1 h and extracted proteins were analyzed by 5-20% SDS-PAGE. E1 and E2 were original hair proteins.

(pI=4.8~7.8)との関連が考えられる。

通常の毛髪からの25mM酢酸で形成するフィルムを従来型ケラチンフィルム、75mM酢酸で形成するフィルムを通常/高酢酸型ケラチンフィルム、また、KAPs含量が低下した毛髪から75mM酢酸の条件で作製したフィルムをKAPsフリー型ケラチンフィルムと名付け、以下の実験に使用した。

3.2 ケラチンフィルムの外観と微細構造

代替毛髪として使用されてきている従来型ケラチンフィルムは淡ベージュ色を帯びた白色で不透明なフィルムである[11-13,18]。一方、75mM酢酸で形成した通常/高酢酸型およびKAPsフリー型ケラチンフィルムを文字が書かれている紙の上に置いたとき、下の文字が判読できる程度の半透明なフィルムであった(Fig. 2)。

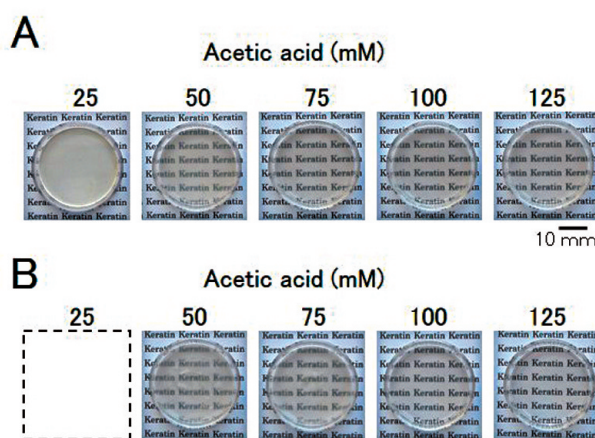


Fig. 2 External view of the keratin films from normal (A) and KAPs free hair samples (B).

従来型ケラチンフィルム微細構造をSEMで観察したところ、直径1 μm以下の粒子とフィラメントがネットワーク状の構造を構築していた[13,17,21,25]。一方、通常/高酢酸型ケラチンフィルムは従来型で見られるような明確なネットワーク構造はなく、平滑な表面構造をしていた。

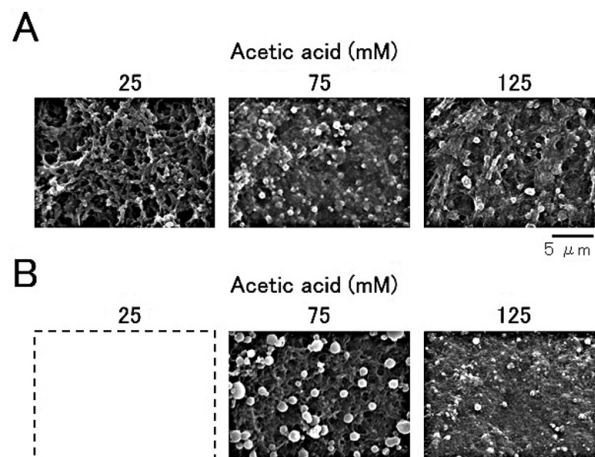


Fig. 3 SEM observation of the keratin films from normal (A) and KAPs free hair samples (B).

KAPs フリー型ケラチンフィルムにおいては多孔質的な表面に直径1~3 μm の粒子状の構造体が付着している構造が観察された(Fig. 3). これは、自己集合したケラチン粒子がフィルム状の凝集体へと変化していくための中間体と考えられる。

3.3 ケラチンフィルムのヘアカラー剤による染色性

一般的に使用頻度が高い白髪染め用の酸化染毛剤(ライトブラウンとダークブラウン)による染色を3種のケラチンフィルムに対して行った(Fig. 4A). 同様の手順で毛髪の実験系に対し、キューティクル層や細胞膜複合体をもたないケラチンフィルムにおいても染色されることは、毛髪および羊毛由来の繊維タンパク質への結合性と発色の解明などの研究へ利用できる。さらに、KAPs を含まないケラチン単独から成るフィルム作製も可能であるため、ケラチン分子をターゲットとしたヘアカラー剤の開発への展開が考えられる。

意に高い値であった(Fig. 4B). これらのことは、染色性にはKAPs 含有の有無よりもフィルムの微細形態が関係することが示唆された。

酸化染毛剤の毛髪と羊毛への染色部位として、外側のキューティクル[18]と内側のコルテクスの細胞膜複合体[19]、やメラニン色素[20]などが知られてきている。毛髪を使用していた従来の実験系に対し、キューティクル層や細胞膜複合体をもたないケラチンフィルムにおいても染色されることは、毛髪および羊毛由来の繊維タンパク質への結合性と発色の解明などの研究へ利用できる。さらに、KAPs を含まないケラチン単独から成るフィルム作製も可能であるため、ケラチン分子をターゲットとしたヘアカラー剤の開発への展開が考えられる。

3.4 ライトブラウン染色によるシステイン酸の形成

過酸化水素などの酸化剤で毛髪を処理した場合、システインの-S-S-結合が酸化を受けてシステイン酸などが形成される[1,20]. この反応は不可逆的で、還元しても元のシステイン結合には戻らないため機械的強度の低下などが生じることから、パーマやブリーチ施術が引き起こすダメージ分子と考えられている。この分析にはアミノ酸分析やFTIR が使用されている[8,21-23].

ライトブラウン染色剤で60分間染色した3種のフィルムと毛髪試料の微粉末を使い、FTIR/ATR法でシステイン酸を分析した。ケラチンフィルムのスペクトルは600~4000nmの範囲で毛髪と類似していた。1076 cm^{-1} で規格化

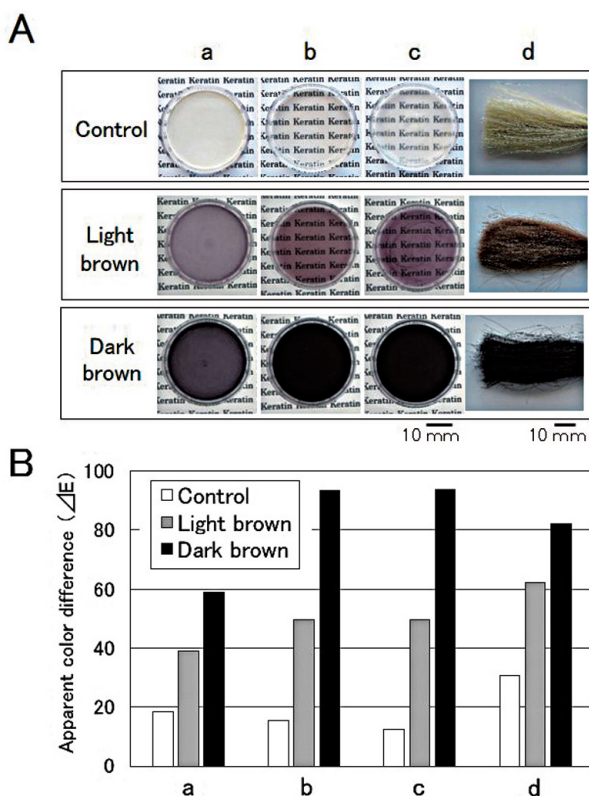


Fig. 4 External view (A) and color deposit (B) of the keratin films and normal hair after dyeing of oxidative hair color reagents. The keratin films of conventional type (a, 25 mM acetic acid/normal hair), high acetic acid type (b, 75 mM acetic acid/normal hair), and KAPs free type (c, 75 mM acetic acid/KAPs free hair) and normal white hair (d) were treated with commercial hair color reagents (light brown and dark brown).

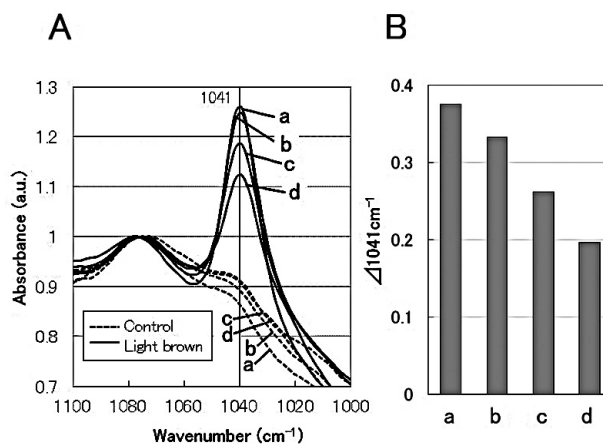


Fig. 5 FT-IR spectra of the keratin films and normal hair after light brown dyeing. A, Spectra were normalized as 1 at the peak of 1076 cm^{-1} . B, Relative amount of cysteine acid. Symbols of a, b, c, and d were same as in Fig. 4.

した1000~1100nmのスペクトルをFig. 5Aに示す。いずれの試料においてもライトブラウン染色により、システイン酸に由来する1041 cm^{-1} 付近にピークが現れた(Fig. 5B). このピークにおける変化量は、従来型ケラチンフィルム~通常/高酢酸型ケラチンフィルム>KAPsフリー型ケラチンフィルム>毛髪順であった。以前報告した論文で示したように[12,13,22], 過酸化水素処理により形成され

るシステイン酸量は毛髪と比べてケラチンフィルムにおいて有意に高いことが、パーマ処理においても同様に検出することができた。KAPs 含有ケラチンフィルムが KAPs フリー型と比べて高い値を示すのは、KAPs のシステイン含量がケラチンよりも約 2.5 倍高いことによるものと考えられる[8,14]。

3.5 還元-酸化感受性

従来型のケラチンフィルムおよび毛髪はパーマ 1 剤あるいはチオグリコール酸などの還元剤で処理すると KAPs が遊離することが知られている[12,13,21,24]。毛髪の代わりに従来型ケラチンフィルムを使用した場合、ケラチンの遊離は見られず、毛髪と同様に KAPs の特異的な遊離が約 1/2,000 の短時間で生じた[21,25]。従来型ケラチンフィルムを使用した場合の特徴として、パーマ 1 剤などで還元処理をすると不透明なフィルムは半透明なフィルムへと変わり、この半透明フィルムはパーマ 2 剤などで酸化処理すると不透明なフィルムへと戻る。パーマ 2 剤の単独処理では見かけ上の変化は見られない[21,25]。

このため、3 種のフィルムを市販のパーマ剤を用いて還元、還元と酸化の連続処理を行った。還元処理をした場合、従来型、通常/高酢酸型および KAPs フリー型ケラチンフィルムからの質量の減少は 9.9、6.1、1.4%であった (Table 2)。還元処理に引き続いて酸化処理をした場合も同様な値で、KAPs フリー型ケラチンフィルムからの質量減少はほとんど見られなかった。一方、KAPs を含有している従来型と通常/高酢酸型ケラチンフィルムからの有意

Table 2 Effects of permanent wave agents on the weight and optical transparency of the keratin films. Symbols of a, b, and c were same as in Fig. 4

	Transmittance (%)			Change of weight (%)	
	Control	I	I + II	I	I + II
a	0.3	36.2	0.3	-9.9	-9.7
b	44.3	75.5	50.5	-6.1	-5.0
c	31.2	67.5	38.2	-1.4	-0.8

な減少が生じた。減少率は従来型フィルムの方が通常/高酢酸型よりも高いのはフィルムの微細構造との関係が想定できるため、検討していく予定である。

還元と酸化処理による最も特徴的な透明性への KAPs の影響を調べたところ、従来型フィルムは 1 剤と 2 剤による還元と酸化処理に応答して、光透過性が顕著に変化した。半透明性の通常/高酢酸型および KAPs フリー型ケラチンフィルムは 1 剤による還元処理により透明度が増し、酸化処理により戻る傾向が見られた (Fig. 6)。分光光度計を用い 660nm の光透過性で数値化したところ、3 種のフィルムにおいて還元処理により約 35% 透過率が上昇し、酸化処理により減少した (Table 2)。これらの結果、還元と酸化処理に応答したケラチンフィルムの光透過性の変化には KAPs の直接的な関与はほとんどないことが示された。

4. 結 論

毛髪コルテックス部位におけるケラチンフィラメント間を埋めて階層的なファイバー構造を築いている KAPs のケラチンフィルムの形成とその諸性質に与える影響を調べた。KAPs をほとんど含まない毛髪タンパク質からもケラチンを主成分としたフィルム形成は見られた。酢酸/プレキャスト法を用いた場合、フィルム形成に必要な酢酸は高濃度を必要とするが、フィルムへの変換率は KAPs 含有の毛髪タンパク質溶液からよりも高かった。高濃度酢酸条件で形成するフィルムは KAPs の有無にかかわらず半透明で、その微細構造も類似していた。このため、不透明で微細な粒子/フィラメントから構成される網目構造をもつ従来型ケラチンフィルムは、むしろ特殊なフィルムであることが示された。

従来型、通常/高酢酸型、KAPs フリー型の 3 種のケラチンフィルムを用いて酸化染毛剤による染色性を調べたところ、通常/高酢酸型と KAPs フリー型フィルムは同程度の染色を受け、従来型フィルムと比べて有意に高かった。このことは KAPs の有無よりも微細形態の方がフィルムの染色性に影響を与えることを示した。また、システイン酸形成量は KAPs フリー型フィルムにおいて有意に低かった。次に、還元-酸化処理が引き起こす光透過率

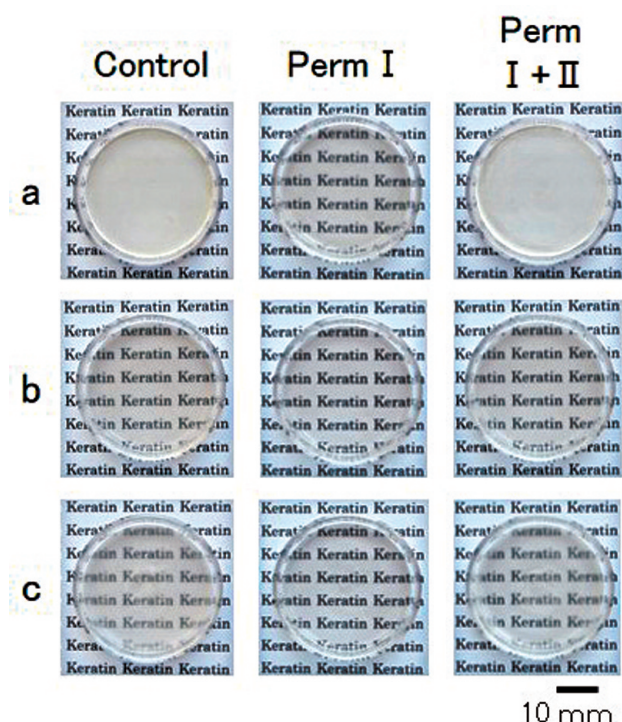


Fig. 6 Effect of permanent wave agents on external view of the keratin films. The keratin films were treated with commercial Perm I and Perm I + II. Symbols of a, b, and c were same as in Fig. 4.

を調べたところ、3種のフィルムは同程度の割合で変化した。このため、還元-酸化に応答した透明性の変化は、KAPsよりもケラチンに依っていることが考えられる。

今後、KAPs高含量型のケラチンフィルムを作製して、KAPsフリー型フィルムなどとの比較を行い、KAPs-ケラチン間の相互作用を通じた毛髪組織とケラチンフィルムの諸性質の解明に役立てていきたい。

本研究の一部は、基盤研究(B)(24360375)の助成を受けたものである。

文 献

1. C. R. Robbins, "Chemical and physical behavior of human hair" 4th ed., Springer-Verlag, New York, p.1 (2002).
2. H. Zahn, *Int.J.Cosmet.Sci.*, **24**,163 (2002).
3. H. W. Heid, E. Werner, and W. W. Franke, *Differentiation*, **32**, 101 (1986).
4. L. Langbein, M. A. Rogers, H. Winter, S. Praetzel, U. Beckhaus, H. R. Rackwitz, and J. Schweizer, *J. Biol. Chem.*, **274**, 19874 (1999).
5. L. Langbein, M. A. Rogers, H. Winter, S. Praetzel, and J. Schweizer, *J. Biol. Chem.*, **276**, 35123 (2001).
6. A. M. Rogers, L. Langbein, S. Praetzel-Wunder, H. Winter, and J. Schweizer, *Int. Rev. Cytol.*, **251**, 209 (2006).
7. Y. Shimomura, *J. Jpn. Cosmet. Sci. Soc.*, **36**, 203 (2012).
8. R. Kon, A. Nakamura, N. Hirabayashi, and K. Takeuchi, *J. Cosmet. Sci.*, **49**, 13 (1998).
9. A. Nakamura, M. Arimoto, K. Takeuch, and T. Fujii, *Biol. Pharm. Bull.*, **25**, 569 (2002).
10. T. Fujii, D. Ogiwara, and M. Arimoto, *Biol. Pharm. Bull.*, **27**, 89 (2004).
11. T. Fujii and S. Kobayashi, *J. Jpn. Cosmet. Sci. Soc.*, **30**, 5 (2006).
12. T. Fujii, *J. Biol. Macromol.*, **12**, 3 (2012).
13. T. Fujii, *Cosmetic Stage*, **8**, 20 (2013).
14. T. Fujii, S. Takayama, and Y. Ito, *J. Biol. Macromol.*, **13**, 92 (2013).
15. M. M. Bradford, *Anal. Biochem.*, **72**, 248 (1976).
16. U. K. Laemmli, *Nature*, **227**, 680 (1970).
17. T. Fujii, *Fragrance J.*, **42**, 48 (2014).
18. T. Imai, M. Niwa, H. Kawamura, M. Kimura, and T. Nakano, *J. Jpn. Cosmet. Sci. Soc.*, **33**, 74 (2009).
19. K. Joko, Y. Yoshikatsu, and K. Sakata, *Sen'i Gakkaishi*, **62**, 280 (2006).
20. T. Kojima, *Fragrance J.*, **42**, 12 (2014).
21. T. Kawasoe, S. Takayama, Y. Ito, and T. Fujii, *J. Jpn. Cosmet. Sci. Soc.*, **35**, 306 (2011).
22. T. Fujii, Y. Ito, T. Watanabe, and T. Kawasoe, *J. Cosmet. Sci.*, **63**, 15 (2012).
23. V. Signori and D. M. Lewis, *Int. J. Cosmet. Sci.*, **19**, 1 (1997).
24. T. Inoue, M. Ito, and K. Kizawa, *J. Cosmet. Sci.*, **53**, 337 (2002).
25. T. Fujii, *Fragrance J.*, **39**, 46 (2011).