

(様式第 5 号)

ヒト毛髪ケラチンコインの X 線構造解析

X-ray structure analysis of tablet of human keratin films

川副 智行¹⁾、藤井 敏弘²⁾、猪股 良平³⁾

Tomoyuki Kawasoe¹⁾, Toshihiro Fujii²⁾, Ryohei Inomata³⁾

資生堂 リサーチセンター¹⁾、信州大学 繊維学部^{2,3)}

Shiseido Research Center¹⁾,

Faculty of Textile Science and Technology Shinshu University^{2,3)}

- ※ 1 先端創生利用（長期タイプ）課題は、実施課題名の末尾に期を表す（Ⅰ）、（Ⅱ）、（Ⅲ）を追記してください。
- ※ 2 利用情報の公開が必要な課題は、本利用報告書とは別に利用年度終了後 2 年以内に研究成果公開（論文（査読付）の発表又は研究センターの研究成果公報で公表）が必要です（トライアルユースを除く）。
- ※ 3 実験に参加された機関を全てご記載ください。
- ※ 4 共著者には実験参加者をご記載ください（各実験参加機関より 1 人以上）。

1. 概要（注：結論を含めて下さい）

ヒト毛髪ケラチンを自己凝集させてフィルム化したケラチンフィルムは、電子顕微鏡観察で繊維状構造が確認される。この繊維状構造は還元-酸化処理によって可逆的に変化する。フィルムを構成するケラチンタンパク質の二次構造は α ヘリックス構造が主体であることが FT-IR 解析で判明したが、還元-酸化処理による影響は少なかった。よってケラチンフィルムの繊維状構造は毛髪同様に、 α ヘリックス構造の中間径フィラメントが規則的に配列したマクロフィブリル構造を形成している可能性が示唆された。そこで本研究では、X線小角散乱法を用いて、ケラチンフィルムにおける中間径フィラメントの規則的配列と還元-酸化処理による変化の確認を行った。測定には、毛髪及びケラチンフィルムの微細粉末を錠剤化したサンプルと毛髪繊維を用いた。結果、毛髪繊維では明確な散乱ピークが観察された一方で、すべての錠剤化サンプルでは散乱ピークは観察されず、還元-酸化による散乱強度の変化も見られなかった。毛髪でも粉末化の過程で中間径フィラメントの規則的な配列が消失したことから、自己凝集で作製するケラチンフィルムでも規則的なマクロフィブリル構造が消失した可能性が高いことが示唆された。

(English)

Hair keratin film casted by self-assembly method is observed fibrous structure by scanning electronic microscope. The fibrous structure of keratin film is possible to change reversibly with reductive and oxidative treatment. In FT-IR analysis, it was confirmed that the protein secondary structure in keratin film contained α -helical structure and there were few changes of the quantity of α -helical structure after reduction and oxidation. Thus, it was surmised that the fibrous structure of keratin film was composed of macrofibril structure that intermediate filament with α -helical structure arranged regularly like a hair fiber. Therefore, in this study, we measured various keratin films and hair fibers using X-ray small angle scattering method. Tablet samples prepared with powderized hairs or keratin films and hair fiber sample were measured. The scattering peak of hair fiber was confirmed clearly, but all tablets were unclear. The change of scattering peak intensity after reduction and oxidation was not observed. Because the regular orientation of intermediate filament in hair fiber was disappeared by powderization, it was suggested that keratin film lost the regularity of macrofibril structure by self-assembly.

2. 背景と目的

信州大学繊維学部藤井敏弘教授によって開発された毛髪ケラチンフィルムは、高濃度で抽出された毛髪の主成分であるケラチンタンパク質に自己集合を誘導することで作製されるシート状バイオマテリアルである。毛髪繊維と同様にケラチンタンパク質とケラチン関連タンパク質から構成され、マイクロメートルオーダーの規則的な繊維状構造が走査型電子顕微鏡で確認される。ケラチンフィルムのタンパク質は、紫外線・熱などの環境からの影響やパーマ・ヘアカラーなどのケミカル施術に対して、毛髪同様な化学的かつ形態的応答性を示すとともに高感度で簡便に検出できることから、評価用の代替毛髪デバイスとして化粧品業界を中心に産業利用が進んでいる。ケラチンフィルムの微細繊維状構造は外部の環境に対する応答性を有しており、還元処理によって繊維状構造は消失するが、その後の酸化処理によって微細構造が再構成される。この可逆的な構造変化に伴って外観透明性も変化して透明性のあるフィルムから不透明なフィルムへと戻る。この可逆的な変化は、還元処理によるSS結合の開裂と、酸化処理による再結合に関連したタンパク質立体構造の変化に起因すると考えられるが、フィルムを構成するタンパク質の構造について詳細は不明であった。

我々は、ケラチンフィルムを構成するタンパク質の立体構造と還元-酸化に伴う構造変化のメカニズムを解明するために、FT-IR 解析及び X 線構造解析を用いた研究を推進している。毛髪や羊毛のタンパク質構造に関する報告は多く、X 線広角回折法によって毛髪繊維におけるケラチンタンパクの二次構造は α ヘリックス構造が確認されること、X 線小角散乱法によって、 α ヘリックス構造の中間径フィラメントは規則的な方位性を有してマクロフィブリルを構成していることが判明している[1, 2]。ケラチンフィルムの X 線広角回折法及び FT-IR 解析によって、ケラチンフィルムのタンパク二次構造における α ヘリックスの存在が確認されたが、還元-酸化による二次構造変化は確認されていない。本実験では、中間径フィラメントが規則的に配列したマクロフィブリル構造の有無と還元-酸化による規則性・方位性の変化の確認を行った。

3. 実験内容 (試料、実験方法、解析方法の説明)

少量の試料で十分な散乱強度を得るために、ケラチンフィルム及び毛髪繊維を微細粉末化した後に油圧プレス機で圧縮した膜厚約 500 μm の錠剤状サンプル(Fig. 1)、及びコントロールとして 30 本の毛髪束を測定に用いた。同様に還元処理サンプル及び、還元処理後の酸化処理サンプルは、それぞれの処理を施した後に錠剤化を行った。実験は BL11 を利用し、X 線小角散乱法で中間系フィラメントの規則的な配列を確認した。測定条件は出力 8 keV、波長 1.5 \AA 、カメラ長 1 m とし、検出器は Pilatus を使用した。35 mm \times 35 mm、X 線照射部直径 7 mm のアルミ板試料ホルダーで錠剤サンプル及び毛髪繊維を固定して測定した。解析は Image J で散乱像を確認した後、Fit2d を用いて散乱強度を一次元化した。



Fig. 1 Tablet of the keratin film.

4. 実験結果と考察

毛髪繊維の小角散乱像と一次元化したデータを示す(Fig. 2)。これまでの知見と同様に、未処理、還元処理、還元-酸化処理いずれにおいてもビーム中心の直近に強い散乱(ピーク①)、その外側にわず

かな散乱(ピーク②)を確認した。ピーク①は還元処理により散乱強度が減少し、続く酸化処理後も減少したままであった。一方、ピーク②は還元処理により強度が増加し、続く酸化処理で減少し、ピーク①とは異なる傾向を示した。一次元化データでは、小角散乱像では確認が難しかったピーク②を明確にでき、回折角 2θ に変換するとピーク①は $2\theta=1.1^\circ$ 、ピーク②は $2\theta=2.2^\circ$ となった。回折角を構造体のピッチ長に換算するとピーク①は約 7.8 nm、ピーク②は約 3.9 nm となり、それぞれ規則的な構造体の存在を示していた。Briki らの報告では 9.1 nm、4.5 nm にピークが確認されていることから[3]、①はケラチンを構成している中間径フィラメント(マイクロフィブリル)の直径、②はフィラメント間の距離を表していると考えられた。毛髪繊維のマクロフィブリルにおいては、中間径フィラメントが一定間隔に方向性をもって配列した構造を有することが確認された。還元、還元-酸化処理によるピーク強度の差異は方向性の変化を示唆していると考えられた。同様にケラチンフィルムを微細粉末として錠剤化したケラチンコインの小角散乱像と一次元化したデータを示す(Fig. 3)。毛髪繊維の結果と異なり、未処理、還元処理、還元-酸化処理のいずれのサンプルとも明確な散乱は確認されなかった。この結果よりケラチンフィルムで確認される繊維状構造体は、毛髪とは異なり中間系フィラメントは一方向に配列しておらず(無配向性)、さらに中間径フィラメントは一定間隔で存在していない可能性が高くなった。ケラチンフィルムを構成している繊維状構造では、中間径フィラメントが規則的に集合したマクロフィブリル様構造を有している可能性は低く、還元、還元-酸化処理によるフィルムの光透過性変化や、SEM 観察でみられたダイナミックな微細構造の形態変化は、中間径フィラメント間の規則性変化に由来しないと考えられた。今回の実験ではフィルム外観透明性とタンパク構造変化の関係性は確認できなかった。

さらに毛髪繊維を微細粉末として錠剤化した毛髪コインの小角散乱像と一次元化したデータを示す(Fig. 4)。毛髪繊維を用いた計測にも関わらず、ケラチンコインと同様に、未処理、還元処理、還元-酸化処理のいずれのサンプルとも明確な散乱は確認されなかった。このことにより粉末化のプロセスにおいて中間径フィラメントの配向性や規則性が失われ、マクロフィブリル構造を消失している可能性が示唆された。ケラチンフィルムにおいても自己凝集のプロセスにおいて、マクロフィブリル構造を再構成できていないと考えられる。

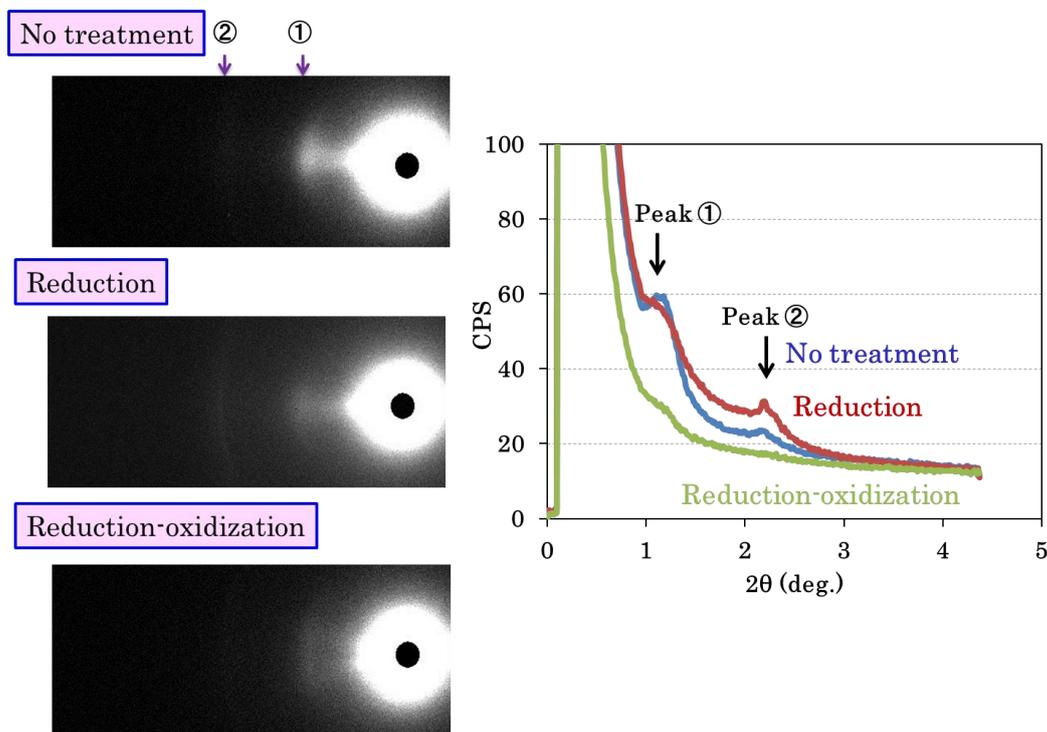


Fig. 2 Small angle X-ray scattering of human hair.

No treatment



Reduction



Reduction-oxidization

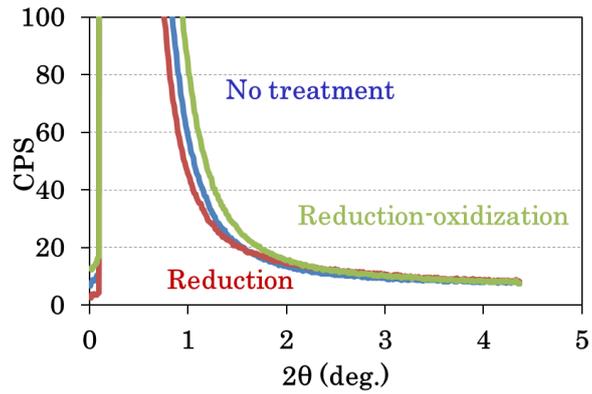
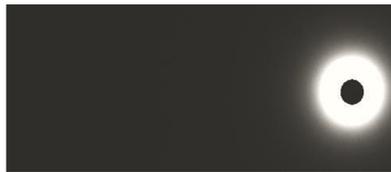


Fig. 3 Small angle X-ray scattering of tablets of keratin films .

No treatment



Reduction



Reduction-oxidization

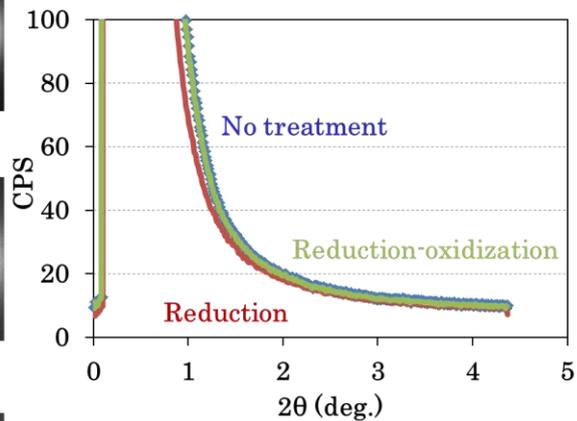


Fig. 4 Small angle X-ray scattering of tablets of human hair .

5. 今後の課題

本実験からケラチンフィルムは、一定間隔の方向性を有するマクロフィブリル様の構造体を持たないことが示唆された。毛髪ではそれらの存在が確認されたため、毛髪からタンパク質を抽出する際に規則性が失われる可能性が考えられた。従って、ケラチンが自己凝集してフィルムに成型する前のタンパク抽出液の構造を解析する必要性が生じた。今後、溶液サンプルの測定方法を検討する予定である。

6. 参考文献

- [1] N. Nishikawa, Structural change of keratin protein in human hair by permanent waving treatment, *Polymer*, 39(16), 3835-3840, (1998)
- [2] H. Sakabe, Structural changes in cast films of the low-sulfur proteins from wool on stretching and heating, *SEN'I GAKKAISHI*, 37(7), 63-68, (1981)
- [3] F. Briki, B. Busson, J. Doucet, Organization of microfibrils in keratin fibers studied by X-ray scattering Modelling using the paracrystal concept, 1429, 57-68, (1998)

7. 論文発表・特許 (注：本課題に関連するこれまでの代表的な成果)

- [1] T. Kawasoe, T. Watanabe, T. Fujii, A novel method using a keratin film for quantifying the photo-modification of hair proteins, *J. Soc. Cosmet. Chem. Jpn.*, 45(2), 100-107 (2011)
- [2] T. Kawasoe, S. Takayama, Y. Ito, T. Fujii, Effects of reductive and/or oxidative treatment during permanent wave procedure on human hair keratin films, *J. Jpn. Cosmet. Sci. Soc.*, 35(4), 306-311 (2011)

8. キーワード (注：試料及び実験方法を特定する用語を2～3)

ケラチンフィルム、中間径フィラメント、小角散乱

9. 研究成果公開について (注：※2に記載した研究成果の公開について①と②のうち該当しない方を消してください。また、論文(査読付)発表と研究センターへの報告、または研究成果公報への原稿提出時期を記入してください(2016年度実施課題は2018年度末が期限となります)。

長期タイプ課題は、ご利用の最終期の利用報告書にご記入ください。

② 研究成果公報の原稿提出

(提出時期： 2017年 8月)