

加水分解した S-カルボキシメチル-3-アラニルジスルフィド  
ケラチンタンパク質によるダメージ毛髪の内修復機構  
**Mechanism of Internal Repair of Damaged Hair Using Hydrolyzed  
S-Carboxymethyl-3-Alanyl Disulfide Keratin Protein**

吉田 正人<sup>a</sup>, 上門 潤一郎<sup>a</sup>, 鈴木 和之<sup>a</sup>  
Masato Yoshida<sup>a</sup>, Junichirou Kamikado<sup>a</sup>, Kazuyuki Suzuta<sup>a</sup>

<sup>a</sup>株式会社ミルボン  
<sup>a</sup>Milbon Co.,LTD

S-カルボキシメチル-3-アラニルジスルフィド誘導タンパク質(CMADK)の毛髪コルテックスへの拡散および沈着による影響を、マイクロビーム X 線小角散乱(SAXS)測定を行い評価した。低分子量の CMADK で処理した毛髪の間径フィラメント(IF)の間の距離がパーマ処理した毛髪に比べ増加していることが確認された。加水分解タンパク質処理ではこの現象は観察されなかったことから、CMADK が IF-IF 間のマトリックスに浸透し、容易に除去されない状態で沈着していることが示唆された。

**キーワード：** 毛髪繊維、コルテックス構造、混合ジスルフィド

**背景と研究目的：**

美容業界ではパーマメントおよびトリートメント時に、日常の美容習慣で蓄積された毛髪ダメージを軽減緩和する修復剤が従来より利用されている。これまで試薬としての扱い易さから、ケラチンを加水分解したもの(ポリペプチド, PPT)、あるいはジスルフィド(SS)基を水溶性に変換したものが利用されてきた。しかし、パーマメント処理によるダメージの修復に主眼を置くと、開裂した架橋構造を再生し修復する事が必要不可欠である。

合目的な修復剤として羊毛の SS 基を還元後、還元剤存在下に酸化して S-カルボキシメチル-3-アラニルジスルフィド基に置換して得られる CMADK タンパク質に我々は注目した。[1, 2] この新規な SS 基を有するタンパク質を修復剤として利用するための化学処理とキャラクターゼーションを行い、次の結果を得ている。(1)このタンパク質は分子量約 50,000 の水に可溶性部分約 60%と不溶性部分約 40%からなり、高収率で得られる。(2)不溶性部分は酵素で加水分解することにより、1,000 から 3,000 の範囲に分子量分布を持つ可溶性で低分子量の CMADK タンパク質に変換できる事がわかった。さらに、(3)これら可溶性タンパク質は還元後酸化することにより SS 結合を持つ元のケラチンタンパク質に容易に再生されることが見出された。

本研究では、CMADK タンパク質の毛髪コルテックスへの拡散およびコルテックス内部構造に及ぼすタンパク質沈着の影響を明らかにすべく、マイクロビーム X 線を用いて各種コルテックス内部の繊維構造の解析を行い、CMADK 処理の影響を研究した。

**実験：**

実験に用いた CMADK タンパク質は Yoneyama らによって報告された方法によって調整した。[3] 得られた平均分子量約 50000 の CMADK タンパク質の 5%水溶液に 3%のプロテアーゼ水溶液を 100:1 となるように混合し、50°C、2 時間加温した後、さらに 80°C で 1 時間処理して CMADK タンパク質 (分子量=2,000~3,000)を含む溶液試料を調整した。この溶液を 5%CMADK 溶液とした。

未処理毛髪として美容履歴の無い健康な 20 代女性の毛髪を使用した。

未処理毛髪を 3%のチオグリコール酸を含む水溶液にモノエタノールアミンを加え pH9.3 に調整した還元剤溶液を用いて 45°C、10 分間処理した。その後、温水で 1 分間濯ぎ、表面の水分を除去した。この試料を還元処理毛髪とした。続いてリン酸緩衝溶液を用いて pH7.2 に調製した 7%の臭

素酸ナトリウム水溶液に還元毛髪を浴比 1:20 で浸漬し 10 分間静置することで酸化処理を行った。その後、毛髪試料を、精製水を用いて十分に水洗してから表面の水分を除去した。この試料を 3TG とした。

還元処理毛髪を 0.1%のカチオン性ポリマー(ジメチルジアリルアンモニウムクロライドとアクリルアミドの共重合体型カチオン性ポリマー、マーコート 550、Merquat)水溶液に浸漬した後、表面の過剰溶液を除去した。これを 5%CMADK 溶液に浴比 1:20 で 10 分間浸漬した後、表面の過剰溶液を除去した。続いて 7%の臭素酸ナトリウム水溶液を用いて浴比 1:20 で 10 分間処理を行い、その後精製水を用いて十分に水洗した。このように得られた試料を 3TGCH とした。

還元処理毛髪をケラチン由来の PPT(分子量 3000、プロモイス WK-L、成和化成)の 5%溶液に 10 分間浸漬し、3TGCH と同様な方法で処理を行った。得られた試料を TGPH とした。

処理毛髪試料の水中での強伸度曲線を得るため、引張試験機(TENSILON UTM-II-20, エーアンドディ社製)を用いて延伸を行った。延伸は 25°Cに保った水中で行い、20mm の試料を 2mm/min のスピードで延伸し、毛髪が破断するまで続けた。

マイクロビーム X 線測定は、大型放射光施設 SPring-8 の BL40XU にて行った。測定条件として、X 線波長:0.083nm(E=15keV)、カメラ長:約 2000mm、ビームサイズ:約 5 $\mu$ m(1st ピンホール:5 $\mu$ m、2nd ピンホール:200 $\mu$ m)、ビームストップ:  $\phi$  8mm、検出器としてイメージングインテンシファイア(6inch)と CCD カメラ(ORCA-II)を用いた。

処理した毛髪試料の繊維軸に垂直にマイクロビーム X 線を照射し、繊維外周部から半径方向に 5 $\mu$ m の間隔でステップさせ、約 9nm 付近の赤道線反射強度を測定した。得られたデータの解析方法は Itou らの方法に従い、IF-IF 間距離を得た。[4]

#### 結果および考察：

図 1 に各試料の水中強伸度曲線を示す。未処理毛髪 (a)に比べ、還元酸化処理した 3TG (b)では曲線のフック弾性領域と呼ばれる最初の傾き、および破断に至る直前の後降伏領域の傾きが減少していることがわかる。これらの傾きは IF とマトリックスの間に存在する親水性部分の僅かな橋かけ結合の切断によって大きく減少することが報告されており、還元によって切断した SS 結合は酸化処理によって容易に元に戻らない事を示している。[5]

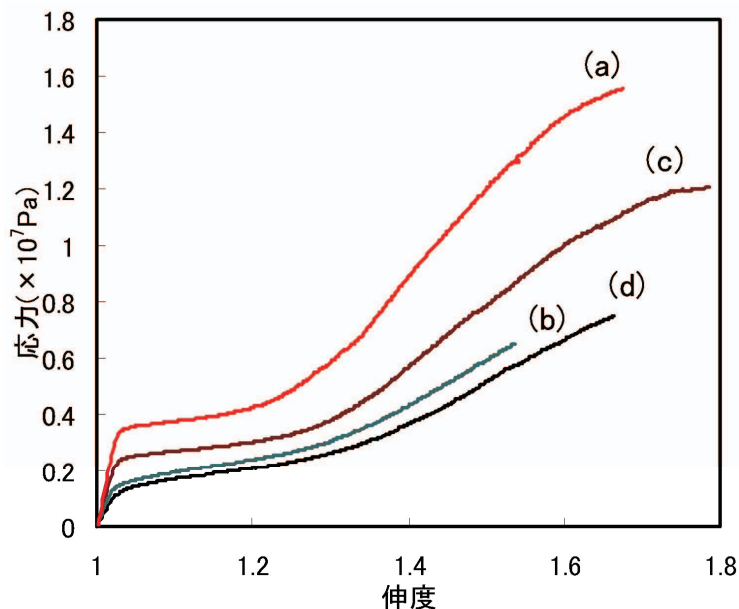


図 1. 各試料の伸度と応力の関係。  
a: 未処理毛髪、b: 3TG、c: 3TGCH、d: 3TGPH.

還元処理毛髪に CMADK で処理した 3TGCH (c)では、還元酸化処理した 3TG(b)に比べ後降伏領域の傾き、および試料の破断に至るまでの伸度が増加している事がわかる。毛髪の破断強度は毛

髪内部に存在する中間径フィラメント(IF)とマトリックス部分に含まれるジスルフィド(SS)結合に寄与することが報告されている。[6] 曲線 c で得られた結果はマトリックスと IF の間の結合が増加したことを示しており、SS 基の再結合以外の相互作用が存在する事を示唆している。

ケラチン PPT 処理した 3TGPH (d) では伸度の増加は観察されるが、3TGCH のような傾きの変化は観察されない。

図 2 に試料の測定位置  $P$  における IF-IF 間距離を示す。 $P$  は毛髪繊維の直径で規格化されており、 $P=0$  が毛髪の表面、 $P=1$  が反対側の表面を示している。未処理毛髪では各ポイントの IF-IF 間距離は一定の値を示しており、平均値は  $9.81\text{nm}$  であった。

還元酸化処理した 3TG では毛髪の表面から中心にかけて IF-IF 間距離が減少し、いずれのポイントでも未処理毛髪より低い値を示していることがわかる。この原因については更なる解析を必要とするが、還元処理に伴うマトリックス親水性部分の膨潤が繊維中心部分のマトリックスを圧迫するためではないかと考えている。[7]

CMADK 処理した 3TGCH では 3TG より IF-IF 間距離が増加していることがわかる。各ポイントにおける増加量は約  $0.15\text{nm}$  であった。CMADK の側鎖部分に存在する SS 結合は毛髪中の SH 基と交換反応を起こす事が期待される。[8] この交換反応によって CMADK が毛髪内部から容易に除去されない形で沈着していると考えられる。同じ試料の強伸度測定からもマトリックス部分の変化が示唆されており、還元処理によって膨潤した毛髪のマトリックス部分に CMADK が拡散、沈着し、マトリックスの厚みを増加させたと考えられる。

ケラチン PPT で処理した 3TGPH の IF-IF 間距離は未処理毛髪より減少し、3TG とほとんど変わらないことがわかる。ケラチン PPT には SS 結合が存在しないことから、CMADK の沈着が発生しなかったのではないかと考えられる。

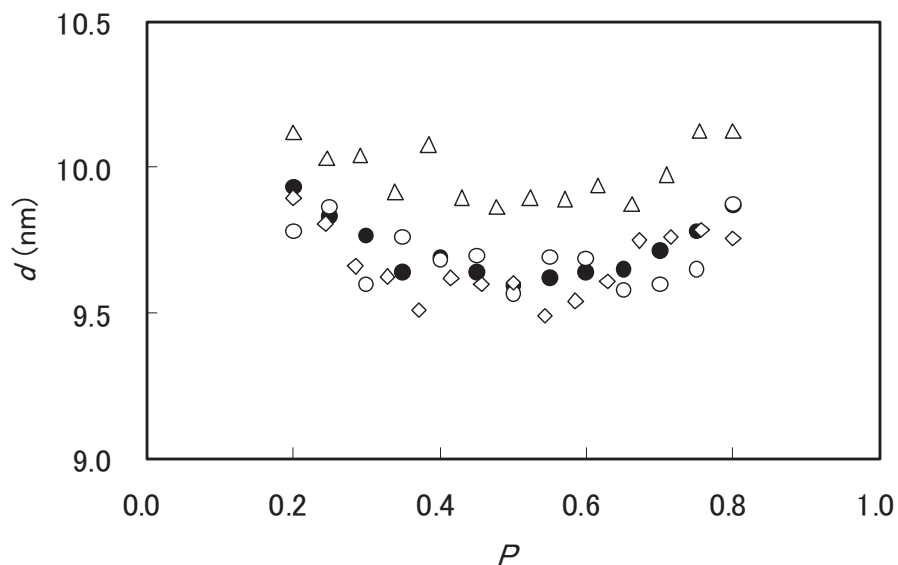


図 2. 測定位置( $P$ )と IF-IF 間距離( $d$ )の関係.

● : 未処理毛髪, ○ : 3TG, △ : 3TGCH, ◇ : 3TGPH.

本研究の結果より、CMADK 処理した還元毛髪では IF-IF 間距離が増加する事が見出された。これは IF-IF 間に拡散、沈着した CMADK の影響と考えられる。沈着した CMADK は IF-マトリックス間の結合を増加させ、強伸度測定で見られた後降伏領域の傾斜の増加の原因であると推測される。還元酸化処理した毛髪やケラチン PPT で処理した毛髪では IF-IF 間距離が減少する。これは還元時の膨潤に伴うマトリックス部分の圧縮のためであると考察したが、今後更なる研究が必要である。

#### 今後の課題 :

本研究から、CMADK は毛髪内部に拡散し内部に沈着していると推測された。CMADK は側鎖部分に交換反応し得るジスルフィド結合を有しているため、毛髪内部に存在するチオール基と結

合すると考えられる。この結合が浸透過程においてどのようなメカニズムで生じ、毛髪に影響を及ぼすのかについて詳細に検討する必要がある。

**参考文献：**

- [1] G. Sakaguchi, S. Takigami, K. Arai, *Trans. Mater. Res. Soc. Jpn*, 32, 1083-1086 (2007).
- [2] 特開 2009-23924(平成 21 年 2 月 5 日).
- [3] M. Yoneyama, T. Kawada, K. Yoneda, K. Arai, S. Naito, H. Nojiri, *Proc. 9<sup>th</sup> Int. Wool Text. Res. Conf., Biella*, Vol. III, 450(1995).
- [4] Y. Kajiura, S. Watanabe, T. Itou, K. Inoue, N. Yagi, Y. Shinohara, Y. Amemiya, *J. Struct. Biol.*, 155, 3, 438-444(2006).
- [5] H. D. Weigmann, L. Rebenfeld, C. Dansizer, *Text. Res. J.*, 36, 535-542(1966).
- [6] F. -J. Wortmann, H. Zahn, *Text. Res. J.*, 64, 737-743(1994).
- [7] D. S. Fudge, J. M. Gosline, *Proc. R. Soc. Lond. B*, 271, 291-299(2004).
- [8] 篠塚雅子, 茨城県工業技術センター研究報告, 22, 40(1996).