

赤外顕微鏡による毛髪へのダメージとその補修効果のタンパク質二次構造解析
Secondary Structure Analysis of Proteins in Damaged and Improved Hair
Using Infrared Microspectroscopy

小林 和樹, 鈴田 和之, 木村 洋則, 安富 諒, 藤原 暢之, 伊藤 廉
Kazuki Kobayashi, Kazuyuki Suzuta, Hironori Kimura, Ryo Adomi, Nobuyuki Fujiwara, Len Ito

(株)ミルボン
Milbon Co. Ltd.

ヘアブリーチやヘアアイロンなどの髪を美しく整える美容施術によって美しさが損なわれているという実感を消費者は得ている。我々は、このような毛髪ダメージに伴って生じる毛髪内部の化学構造変化を明らかにし、このようなダメージ毛髪を補修することを目的として顕微 IR マッピング測定を行った。種々の解析を行った結果、ヘアブリーチ、ヘアアイロン処理で生じる毛髪ダメージによって毛髪内タンパク質の二次構造が変化することが確認された。また、これらのダメージ毛髪に対してトレハロース、PEG-1000 を作用させることによって二次構造が補修されることが示唆された。

キーワード： 毛髪、赤外分光法

背景と研究目的：

女性が美しい毛髪を保ちたいという願望は世界共通に存在している。そして、多くの女性がヘアドライヤーやヘアアイロンなどの日常の美容習慣や、パーマやヘアカラーなどの美容施術を行うことで、髪を美しく整えている。しかし、これらの施術が毛髪ダメージの発生要因となることも広く知られており、このような毛髪へのダメージを補修し、髪的美しさを保つ製品開発ニーズに応えるため、様々な科学的アプローチから毛髪研究が進められている。

ダメージ毛髪に生じる化学組成から組織構造に至るまでの様々な変化、およびそれに伴って生じる毛髪繊維の力学的性質の変化はこれまで広く研究されてきた[1,2]。例えば、毛髪繊維の延伸挙動から求められる初期弾性率は、健全毛髪に比べてダメージ毛髪ではより低くなる。初期弾性率は毛髪コルテックスにおける α -結晶の変形に基づくものであり、結晶安定性もしくは結晶を構成するタンパク質の α -ヘリックス構造の安定性を反映していると考えられている[1]。我々は、このような結晶安定性あるいはタンパク質構造の安定性を高めることにより、初期弾性率を向上させ、さらには髪の風合いの改善につながることを期待されることを考え、毛髪タンパク質の二次構造に着目したダメージ研究に取り組んでいる。このような毛髪タンパク質の α -ヘリックス構造に対して、我々はこれら構造の安定性を高める成分の探索を行ってきた。その結果、毛髪抽出ケラチン水溶液を用いた円二色性 (CD) 測定によって、 α -ヘリックス構造の安定性向上の効果が認められる成分としてトレハロース、PEG-1000 を見出し、これらの成分が毛髪の初期弾性率の向上にも寄与することを明らかにしてきた[3]。さらに、それらの成分であらかじめ毛髪を処理しておくことで、熱、高 pH、または摩擦やコーミングによる初期弾性率の低下を抑制する効果も認められた。このような結果から、トレハロース、PEG-1000 は崩れてしまった毛髪内タンパク質構造のリフォールディングを誘引することで初期弾性率向上効果を引き起こすことが想定される。一方、2022A1647 においてダメージ毛髪におけるタンパク質の二次構造が毛髪断面に対して不均一に変化する事例を検出していることから、タンパク質の二次構造変化に対する毛髪ダメージの影響は毛髪断面において不均一に与えられる可能性がある。

そこで本研究では、毛髪断面におけるタンパク質状態の不均一性を捉えるために、高い空間分解能を有する BL43IR における顕微赤外マッピング測定に着目した。我々はこれまで、IR スペクトルのピークフィッティングによってタンパク質の二次構造を精度よく分析する方法を確立してきた。また、BL43IR における毛髪の顕微 IR 測定にこの方法を適用することで、毛髪に対する加

熱処理やダメージの蓄積によってタンパク質の α -ヘリックス構造の崩れが引き起こされることを明らかにしてきた (2021B1758, 2022A1647)。このように、顕微 IR を用いた固体状態の毛髪タンパク質の二次構造を非侵襲的に調べる手法の確立に至っている。本研究では、 α -ヘリックス構造が崩れたダメージ毛髪に対してトレハロース、PEG-1000 を作用させた際の毛髪タンパク質の二次構造変化を顕微 IR によって明らかにすることを目的とした。

実験：

測定試料は、(A) 健常毛髪、(B) その髪に美容処理を行ったダメージ毛髪、(C) ダメージ毛髪にトレハロースおよび PEG-1000 を作用させた補修毛髪、この 3 種類に分けられる。より具体的には、(B) の美容処理として、高 pH によるアルカリ変性が想定される (B-1) ヘアブリーチ処理毛髪と、熱変性が想定される (B-2) ヘアアイロン処理毛髪の 2 種を準備し、またそれぞれの美容処理によるダメージ毛髪にトレハロースおよび PEG-1000 を作用させた補修毛髪を準備する (C-1, C-2)。まず各毛髪繊維をマイクロトームにより $3\ \mu\text{m}$ の厚さで切片化し、毛髪断面サンプルを調製した。このように調製した毛髪切片について、あらかじめ切片厚と平滑性を 3D 顕微鏡にて測定し、サンプルを選別した。その後、切片を赤外透過材料であるフッ化バリウム板にのせ、赤外顕微鏡 XY 試料ステージ上で透過測定を行った。赤外光は、必要な空間分解に応じて、アパーチャーにて領域を $5.0 \times 5.0\ \mu\text{m}^2$ に制限して照射した。MCT 検出器を用い、測定波数範囲は $4000\text{--}700\ \text{cm}^{-1}$ とし、積算回数は 128 とした。文献[4,5]に従い、 $1700\text{--}1600\ \text{cm}^{-1}$ に含まれる複数のアミド I 振動子をカーブフィッティング解析にてピーク分離することでタンパク質の二次構造情報を解析した。分離ピークの中で α -ヘリックス構造に由来するピークの面積をアミド I バンド ($1700\text{--}1600\ \text{cm}^{-1}$) の総面積に対する相対値として求め、タンパク質二次構造のマッピング図 (Fig.1) を作成した。

結果および考察：

Fig.1 の (A) および、(B-1) からヘアブリーチ処理を行った毛髪ではやや α -ヘリックス構造の減少が見られ、(A) および、(B-2) の比較からヘアアイロン処理を行った毛髪では顕著に α -ヘリックス構造の減少が確認された。(B-1) と (C-1) の比較結果および、(B-2) と (C-2) の比較結果からどちらにおいても α -ヘリックス構造の増加が見られた。これらの結果から、ヘアブリーチやヘアアイロン処理で生じる毛髪ダメージによって α -ヘリックス構造が崩れること、また、トレハロースおよび PEG-1000 は崩れてしまった毛髪内タンパク質構造のリフォールディングを誘引することが示唆された。

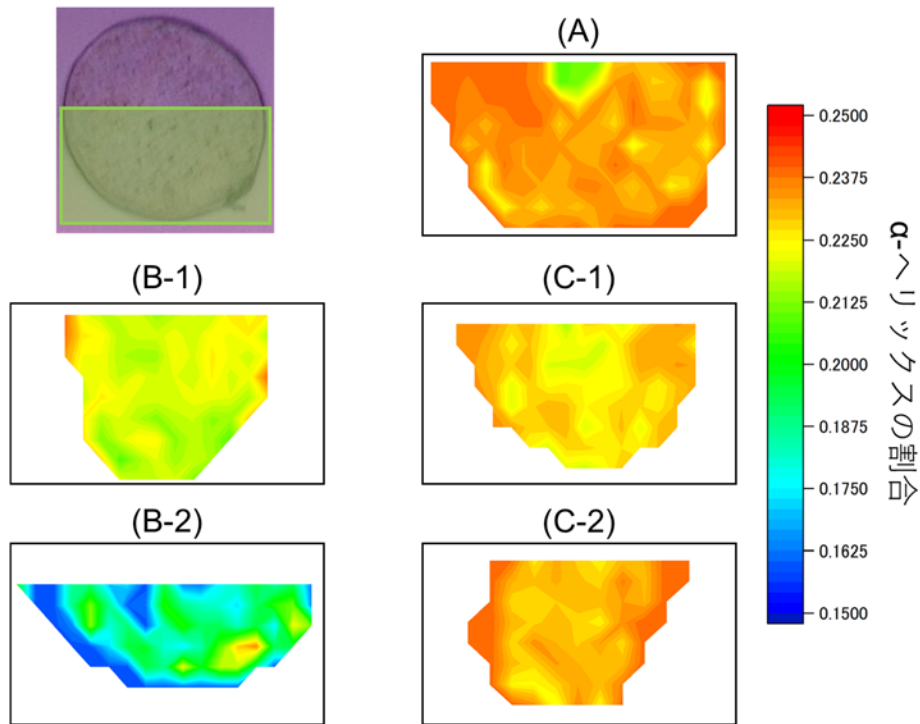


Fig.1. アミド I バンド ($1700\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$) の総面積に対する α -ヘリックス構造に由来する分離ピークの面積の相対値 (α -ヘリックスの割合) についてのマッピング図。

(A) 健全毛髪 (B-1) 健全毛髪にヘアブリーチ処理を行った毛髪 (B-2) 健全毛髪にヘアアイロン処理を行った毛髪 (C-1) ヘアブリーチ処理後、トレハロース、PEG-1000 を作用させた補修毛髪 (C-2) ヘアアイロン処理後、トレハロース、PEG-1000 を作用させた補修毛髪

今後の課題：

本研究ではヘアブリーチ、ヘアアイロン処理によるダメージが生じた毛髪にトレハロース、PEG-1000 を作用させた際のタンパク質二次構造の変化を調べた。その結果、トレハロース、PEG-1000 はダメージによって崩れた α -ヘリックス構造をリフォールディングさせる効果があることが示唆された。今後は、ダメージ毛髪の補修とタンパク質二次構造変化について、来期以降さらに検討を進めていく予定である。

参考文献：

- [1] C. R. Robbins, Chemical and physical behavior of human hair, 4th ed. (Springer-Verlag, New York, 2002).
- [2] K. Watanabe et al., *Advances in Life Sciences*, **5**(4), 85 (2015).
- [3] M. Furuta et al., *The 4th APCLSE Conference* (2017).
- [4] 古田ら, 第 19 回日本蛋白質科学会年会, 2P161 (2019).
- [5] H. Yang, et al., *Nat. Protoc.*, **10**, 382 (2015).