

## 赤外顕微鏡による脱色処理毛髪タンパク質二次構造解析 Secondary Structure Analysis of Proteins in Bleached Hair using Infrared Microspectroscopy

木村 洋則, 鈴木 和之, 小林 和樹, 藤原 暢之, 山本 晃大,  
岸本 愛加, 小松 寛武, 細井 菜海 伊藤 廉

Hironori Kimura, Kazuyuki Suzuta, Kazuki Kobayashi, Nobuyuki Fujiwara, Kota Yamamoto,  
Aika Kishimoto, Hiromu Komatsu, Nami Hosoi, Len Ito

(株)ミルボン  
Milbon Co. Ltd.

ヘアカラーは、毛髪の色味を変化させ美しいヘアデザインを叶える一方で、その脱色作用に伴い毛髪ダメージも同時に発生させる。このようなダメージによる毛髪タンパク質の構造変化を明らかにし効果的なダメージ補修技術を構築することを目的として、顕微 IR マッピング測定により脱色処理によるタンパク質二次構造のダメージ挙動を分析した。その結果、脱色処理により  $\alpha$ -ヘリックス構造を豊富に含有する IF の周辺構造が変化し、IF の結晶構造の安定性が低下した後に  $\alpha$ -ヘリックス構造の崩壊が進行す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：

ヘアカラーによって毛髪の色味を本来の色から変えることは、髪を美しく見せるヘアデザインの 1 つとして広く認知されている。しかし、ヘアカラー剤の多くは塩基性条件下で過酸化水素などの酸化剤を用いるため、本来の目的である毛髪内のメラニンを酸化分解し脱色効果を得るだけでなく、毛髪内部構造に望ましくない変化をきたすことで毛髪強度低下などのダメージを引き起こすことも知られている。このようなダメージを補修し、髪的美しさを保つ製品開発ニーズに応えるべく、ダメージ機構解明のための研究が多く進められている。

ヘアカラーにおける脱色作用に伴う毛髪ダメージについての研究の多くは、毛髪の 85%以上を構成するタンパク質の構造に着目して行われてきた。毛髪内部のコルテックス領域におけるタンパク質構造として、 $\alpha$ -ヘリックス構造を有する中間径フィラメント (IF) が中間径フィラメント結合タンパク質 (IFAP) に取り囲まれた IF/IFAP 凝集体により構成されている。IF/IFAP 凝集体は毛髪の力学特性に寄与する重要な構造体であり、脱色処理により IF-IFAP 間 SS 結合の酸化開裂や IFAP の酸化分解が引き起こされることが過去に報告されている[1,2]。また、脱色処理を行った毛髪から流出するタンパク質を SDS-PAGE にて分析した結果、1 回の脱色処理では IF を構成する Type I および Type II ケラチンが流出するのに対し、脱色処理回数を 3 回繰り返すと IF 由来のバンドは消失し、さらに小さいタンパク質の流出が確認された[3]。このことから、脱色処理の繰り返しにより、IF-IFAP 間 SS 結合の酸化開裂や IFAP の酸化分解だけでなく、IF の結晶化度の低下や IF タンパク質の酸化分解が進行すると考えられる。IF タンパク質から成る結晶構造から生じる結晶弾性は、毛髪の 2%程度の延伸に対する抵抗力を意味する初期弾性率に寄与すると考えられていることから、脱色処理による IF タンパク質の構造への影響を理解することは、毛髪力学物性変化へのより詳細な理解へとつながり、毛髪ダメージに対するクリティカルな補修技術の構築において重要である。そこで本研究では、 $\alpha$ -ヘリックス構造を有する IF タンパク質の脱色処理による構造変化を解明することを目的とし、脱色処理を行った際の毛髪コルテックスにおけるタンパク質の二次構造変化を顕微赤外分光法によって解析した。

### 実験：

化学処理を受けていない毛髪に対し、アンモニアで pH を 10.4 に調整した 3%過酸化水素水溶液に 30 分間浸漬し後水洗するという脱色処理を 0、1、3、および 5 回施し、その後各毛髪をマイクロ

トームで  $3\ \mu\text{m}$  の厚さで切片化することで毛髪断面サンプルを調整した。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、アパーチャーにて領域を  $5.0\ \mu\text{m} \times 5.0\ \mu\text{m}$  に制限して照射した。MCT 検出器を用い、測定波数範囲は  $4000\text{-}700\ \text{cm}^{-1}$ 、積算回数は 64 として、赤外吸収スペクトルを取得した。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  $\alpha$ -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イメージマッピング図 (Fig. 1) を作成した。さらに、毛髪断面における  $\alpha$ -ヘリックス構造の割合の平均値を算出した (Fig. 2)。

### 結果および考察：

3 回以下の脱色処理では、 $\alpha$ -ヘリックス構造の割合に大きな違いは見られなかったが、5 回処理にかけて  $\alpha$ -ヘリックス構造が減少する挙動を示した (Fig. 1 および 2)。 $\alpha$ -ヘリックス構造を豊富に含有する IF の結晶構造は IFAP に囲まれて存在し、脱色処理により IF や IFAP の酸化分解が進行し、結晶化度の低下が生じると報告されている。このことから、脱色処理 3 回以下では IF 周辺の構造変化は結晶構造の安定性低下を促進するが、 $\alpha$ -ヘリックス構造の量はほとんど影響せず、脱色処理 5 回にかけて結晶構造の崩壊進行に伴い、タンパク質二次構造の急激な変化が生じることが示唆された。

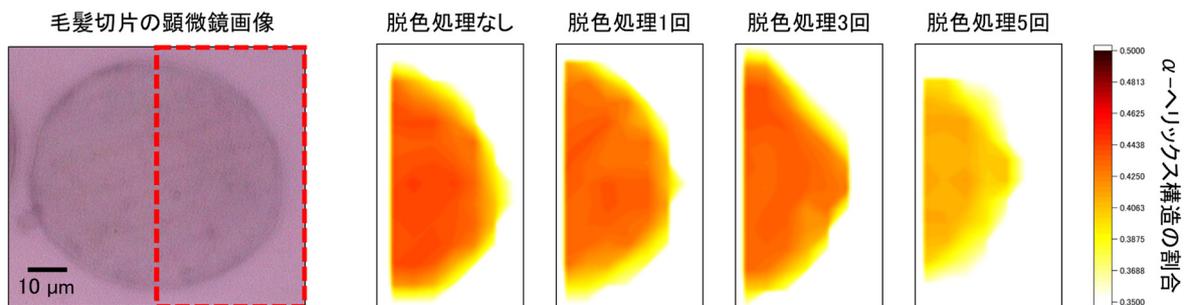


Fig. 1 毛髪切片における  $\alpha$ -ヘリックス構造のイメージマッピング図。  
毛髪切片の顕微鏡画像上の赤枠は IR 測定領域を示す。

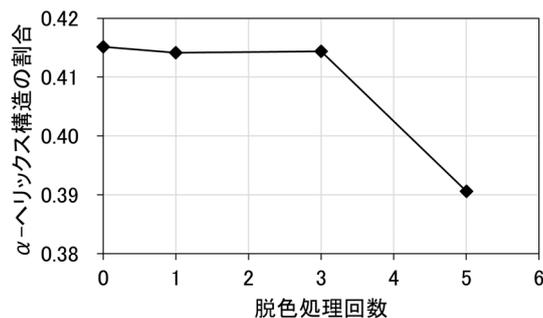


Fig. 2 脱色処理回数による  $\alpha$ -ヘリックス構造の割合変化。

### 今後の課題：

本研究にて示された、脱色処理の繰り返しによるタンパク質二次構造の変化挙動の理解を深めるため、来期以降さらに検討を進めていく予定である。

- [1] F.J. Wortmann, et al., Journal of Thermal Analysis & Calorimetry, 140, 2171 (2020).
- [2] 吉田正人ら, 平成 25 年度繊維学会秋季研究発表会要旨, IC07, 名古屋 (2013.9) .
- [3] 木村洋則ら, 繊維学会秋季研究発表会, 1P-71, 鳥取 (2022).
- [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, 382-396 (2015).