

# 環境応答型スマート材料としてのケラチンゲルの創出

信州大学繊維学部

藤井 敏弘

Human hair is mainly composed of cysteine-rich proteins such as keratin and keratin-associated proteins (KAPs). When a keratin solution was incubated with 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC), the zero-length cross linker between amino and carboxyl groups, the solution changed to opaque white/light beige color gel in appearance. The gel was formed according to the EDC and protein concentrations. Electrophoresis showed that the cross-linked proteins were free of KAPs and composed of keratin only. Thus, the gel was named "keratin gel". The keratin gel could both retain various proteins and release some of them. Ovalbumin (MW=45 kDa; pI=5.2) incorporated into EDC/keratin gel was continuously released for 24 h. This time-release was suppressed when the incorporated gel was treated with oxidative treatment such as H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, while the release was slightly increased after reductive treatment of the gel. The keratin gels will be available for the controlled-release of macromolecules corresponding to oxidation-reduction environment.

## 1. 緒言

光、温度、pHなどの変化に反応する環境応答型ゲルは、次世代の高機能性マテリアルとして注目されている。医学から工学までの広い分野で利用が想定されており、生体親和性や環境低負荷性が求められている。

私たちは2002年から“セルフリサイクル”の概念を提唱して、これを実証する研究・開発を進めている。これから生まれてくる製品を“セルフリサイクル製品”と名付け、「動物や他者の生体組織・材料を使わず、本人由来の生体物質を原料として、本人が使用するための品」と定義した<sup>1,2)</sup>。この生体物質として毛髪組織に注目した。この理由として、血液と比べて、毛髪は採取する負担が小さく、大量に入手が可能で、フィルム、ゲルなどへと加工する技術を開発すれば、安全・安心なマテリアルとなるものと考えている。硬ケラチンを抗原としてマウスに投与して免疫原性を調べたところ、マウス体毛ケラチンはヒト毛髪および爪ケラチンと比べて、100~200倍も免疫応答性が低いことを報告している<sup>3)</sup>。またヒト毛髪タンパク質フィルムはプロテアーゼにより分解を受けることや、ヒト毛髪および爪タンパク質とそれらのフィルムはラット腹腔由来の肥満細胞を刺激しないことを私たちは見出している<sup>4,5)</sup>。また、羊毛およびヒト由来の硬ケラチンフィルムやスポンジは細胞培養の足場として期待されており、線維芽細胞などの接着性、生存、増殖などにおいて問題がなく、コラーゲンに匹敵する

スキヤホールド機能を有していることが報告されている<sup>6,7)</sup>。これらのことは、毛髪タンパク質は生体適合性に優れたバイオマテリアルであることを示唆している。

再生医療を含めた自然科学の最近の最大トピックスとして、人工多機能性幹細胞(iPS)の樹立とその応用があげられる。これは「自分由来の細胞で、自分を治療する技術」であるため、移植医療に代わる再生医療として注目され多額の予算が投入されている。これは、新しい産業創出にも繋がるため、国民の期待は高い。一方では、「国民医療費」は40兆円におよぶと報道されており、毎年1兆円もの増加となっている。この要因としては高齢化が進んだことに加えて、CT、MRI、内視鏡などの診断や治療に使用している「高度医療技術」が挙げられてきている。iPS細胞から作られるセルシートや組織などが治療に利用できるようになれば移植医療にとっては福音となるが、さらなる高額な医療費を国民に負担させることになる。このため、今後、低コストで品質の高い医療用の材料と診断・治療技術を社会が求めてくることを確信している。

私たちは、ケラチンを原材料としたフィルムへの加工技術を開発しているが、ゲルへの加工技術は未だ確立していない。本研究では、簡便な技術を組み合わせ、スマート材料でかつ生体適合性にも優れたケラチンゲルを開発することを目的とする。

## 2. 実験

### 2.1 毛髪タンパク質溶液の調製とケラチンゲルの作製

化学処理が施されていないボランティアから提供された頭髮を用いた。毛髪を信大法溶液(5M尿素, 2.6Mチオ尿素, 5% 2-メルカプトエタノール, 25mM Tris-HCl, pH 8.5)に浸し、50℃で3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、タンパク質溶液を得た<sup>8)</sup>。この溶液は蒸留水に透析後、不溶物を遠心で取り除き使用



Creation of the keratin gel: an environmental response type smart material

Toshihiro Fujii

Faculty of Textile Science and Technology, Shinshu University

した。タンパク質濃度は牛血清アルブミンを標準として Bradford 法で測定した<sup>9)</sup>。

ゲル形成は小試験管中の毛髪タンパク質溶液にゼロ距離化学架橋剤 (EDC ; 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride) を加えてインキュベートし、一定時間後に倒立試験により確認した。ゲルの還元処理はチオグリコール酸、酸化処理は過酸化水素を用いた。

## 2.2 電気泳動

倒立試験の1/10のスケールでタンパク質と試薬を加えて反応させ、可溶化成分を Tricine/SDS-ポリアクリルアミドゲルの電気泳動 (トリシン/SDS-PAGE) によって分析した。泳動後のゲルは、0.1% クマシーブリアントブルー R-250、10% 酢酸、40% エタノールで2時間染色後、10% 酢酸溶液で脱色処理を行った<sup>10)</sup>。

## 2.3 遊離(放出) 試験

ゲルへの高分子量成分の保持と遊離は、6種のタンパク質のブレンドを毛髪タンパク質に混ぜ、100 mM EDC を加えてゲル化した。ゲル化されなかったものを0.5×PBSにより洗浄後、0.5×PBSを加え37℃下で遊離してくるタンパク質量と成分を Bradford 法と電気泳動で分析した。

## 3. 結果

### 3.1 EDC 濃度がゲルの形成に与える影響

EDCによる架橋は近距離のアミノ基とカルボキシル基の間にペプチド結合を作り、副産物は尿素で未反応EDCとともに水洗により除去ができる。このため生体適合性の保持が期待できる。EDCはタンパク質間の相互作用を調べるために多用されている。ケラチンと同類の筋肉に含まれている中間径フィラメントであるデスミンがカルポニンなどの細胞骨格タンパク質とEDCにより架橋することを報告している<sup>11)</sup>。

可溶化した毛髪タンパク質溶液 (10mg/ml) に0-100mMまでEDC濃度を変えて加えた。37℃、30分間インキュベーション後に小試験管を倒立させたところ、0-5 mM EDCにおいてはタンパク質溶液の操作直後に落下することが観察されたが、20mM以上のEDC濃度では試験管の底にゲル状の凝集体が形成され、これらは倒立しても落下せずに底部に保持されていた (Fig.1A)。中間の7-10mM EDCにおいては試験管の底から壁に半固体の物質が残存していることから、倒立試験に耐えられるまでのゲルとなっていないことが示された。これらの結果、毛髪タンパク質はEDCにより架橋が生じゲル凝集体が形成す

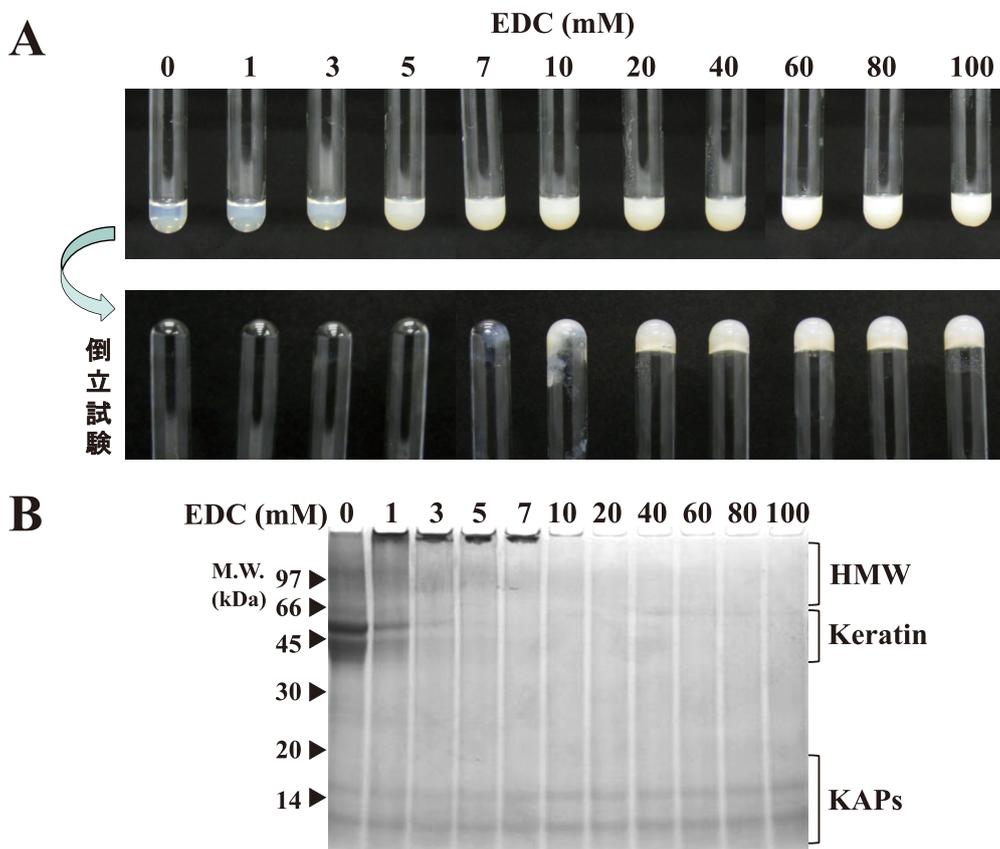


Fig. 1 ケラチンゲル形成における EDC の影響

ることが示された。また半透明なタンパク質溶液は、ゲル化により不透明で白色～淡ベージュ色を呈していた。

上記した条件を1/10のスケールでおこない、可溶性タンパク質をトリシン/SDS-PAGEで分析した (Fig.1B)。毛髪タンパク質溶液は高分子量成分 (>90kDa)、ケラチン (40 - 65kDa)、ケラチン結合タンパク質 (KAPs; 6 - 20kDa) から構成されていた。1 mM EDCの添加によりケラチンバンドが減少し、スタッキングゲルの上部が強く染色されることから、超高分子量成分が形成されたことが示された。EDC濃度が10mM以上となると、ケラチン、高分子量成分、超高分子量成分のバンドは見かけ上ほぼ完全に消失していた。このことは、架橋がさらに進み、スタッキングゲルにすら入らないぐらいまでの高分子となっていることが示唆された。一方、低分子量タンパク質のKAPsは100mM EDCの添加条件下でも残存していることから、ほとんど架橋されないことが示された。この結果、EDC誘導の毛髪タンパク質ゲルはケラチンを主成分としているため、ケラチンゲルと呼ぶことにした。

### 3.2 EDC依存性ゲル形成の諸性質

EDC/ケラチンゲルの形成はタンパク質濃度に依存していた。これは毛髪タンパク質溶液のロットあるいは保存期間により変動した。ここでは、5 mM EDC添加時におけるケラチンゲル形成について、処理時間、温度、pHの影響を倒立法で調べた (Table 1)。処理温度が37℃において、60分以上のインキュベーションでゲル形成が見られた。このため、60分間の処理時間で温度変化を調べたところ、35℃以下ではゲル形成は見られないが、40 - 50℃ではゲル形成が観察された。50℃においては、30分以内でもゲルが生じていた。反応溶液のpHの影響を調べたところ、

Table 1 各種条件がケラチンゲル形成に与える影響

Factors and conditions		Gel formation
Time (min)	30	×
	60	○
	90	○
	120	○
Temperature (°C)	25	×
	30	×
	35	×
	40	○
	45	○
	50	○
pH	6	○
	7	×
	8	×
	9	×

○, formed ×, not formed

pHが6の時のみにゲルが形成していた。ケラチンの等電点はtype Iが4.8 - 6、type IIが5.9 - 7.8であることから、等電点に近い条件下では凝集性が高まりゲル化しやすいことが考えられる。

### 3.3 タンパク質のケラチンゲルへの保持と放出

ケラチンゲルへのタンパク質の保持と放出性を調べるため、phosphorylase b (97kDa), bovine serum albumin (66kDa), ovalbumin (45kDa), carbonic anhydrase (30kDa), trypsin inhibitor (20kDa), α-lactalbumin(14kDa) からなるタンパク質カクテル (LMW-ST) を用いた。

ケラチンゲルの形成は外部タンパク質の添加により抑制されるため、ここでは毛髪タンパク質の1/10濃度のタンパク質カクテルと100mM EDCを加え、37℃、60分間放置してゲルを作製した。形成したゲルは簡単に洗浄した後、37℃、0.5×PBS溶液にインキュベーションして24時間までの放出試験を行った (Fig.2A)。2時間ぐらいまでは放出タンパク質は見られないが、3時間後から経時的な放出が検出できた。24時間後においては、加えたタンパク質の約30%が外液中に回収された。一方、カクテルを加えてないケラチンゲルからの放出はほとんど見られなかった。

次に、外液に放出されたタンパク質の成分を電気泳動で調べたところ、bovine serum albumin, ovalbumin, carbonic

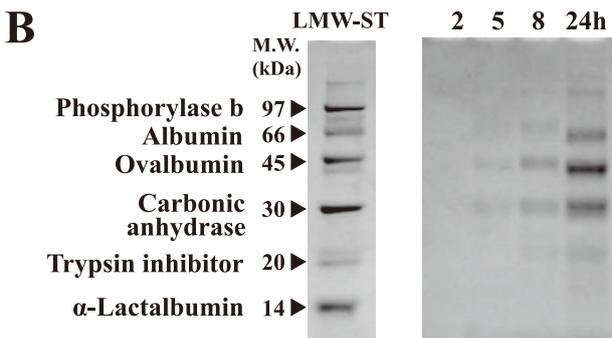
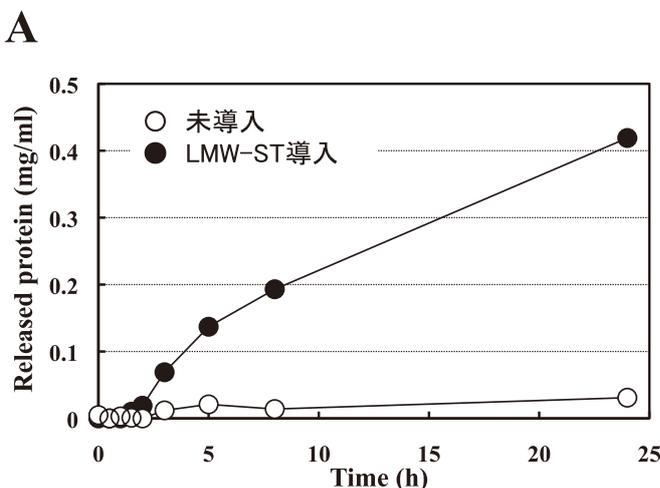


Fig. 2 ケラチンゲルからのタンパク質の放出

anhydraseは有意に、trypsin inhibitorは僅かに検出ができた。一方、phosphorylase bと $\alpha$ -lactalbuminは24時間後の外液中にも検出できなかったことから、有意に放出がなされないことが明らかとなった (Fig.2B)。

タンパク質カクテルを構成している6種類のタンパク質の分子量、等電点、システイン含量をTable 2に示す。このカクテル自体とカクテルに毛髪タンパク質溶液を加えた条件でEDC処理したところ、trypsin inhibitorは見かけ上減少するが、他のタンパク質のバンドには影響を与えないため化学的に結合は生じていないことが示された。これらの結果は、ケラチンゲルからのタンパク質の放出は分子量だけに依存しているのではないことが明らかとなった。また、平均的な電荷状態をあらわす等電点においては、放出されない $\alpha$ -lactalbuminがケラチンの等電点に近いことから関連することが推測できるが、例数を増やす必要がある。

### 3.4 還元-酸化処理が放出反応へ与える影響

毛髪ケラチン分子の特徴として、システインを多く含むことであり、これから作られる-S-S-結合は髪の毛がもつしなやかさと硬さを作り出す基本と考えられている。還元剤存在下で抽出された毛髪タンパク質はシステインの状態であると考えられる。そこで、ケラチンゲルをパーマ施術で多用されている還元剤のチオグリコール酸と酸化剤の過酸化水素を用いて処理した後、放出試験を行った。これらの処理は、肉視レベルにおいて影響を与えなかった。100mMチオグリコール酸で処理をしたケラチンゲルは未処理ゲルと比べて、放出量の増加が見られるのに対して、過酸化水素で処理したケラチンゲルは放出量の顕著な減少が見られた。還元と酸化処理がゲルに与える違いは、保水量においても見ることができた。

## 4. 考察

毛髪の主成分のケラチンは細胞骨格タンパク質の中間径フィラメントに分類されており、デスミン、ビメンチンなどと同じく、ケラチン単量体は自己集合し、直径10nmの枝分かれがないフィラメントとなる。私たちは、平滑筋のデスミンがカルボニンとEDCにより架橋されることを以前に報告している<sup>11)</sup>。ケラチンを含む中間径フィラメントの分子間相互作用の解明に化学架橋剤は有効なツールであることを示している。EDCはコラーゲンを高分子化するのに使用されており、この方法で作製したコラーゲンゲルの生体適合性は高いことが知られている<sup>12)</sup>。本研究において、毛髪ケラチンはEDCにより架橋されてゲル化することが明らかとなった。毛髪組織の構築は、ケラチンフィラメントからなるマイクロフィブリルがマトリックスと呼ばれるKAPsを介して長軸に整列し、マクロフィブリルを形成する。このマクロフィブリルは、細胞膜複合体により長

Table 2 封入タンパク質の性質と放出性

Protein	M.W. (kDa)	pI	Release from EDC-gel
Phosphorylase b	97	6.8	×
Albumin	66	5.6	○
Ovalbumin	45	5.2	○
Carbonic anhydrase	30	6.4	○
Trypsin inhibitor	20	4.6	△/×
$\alpha$ -Lactalbumin	14	4.8	×

軸に整列してコルテックス部位を作り上げている<sup>13)</sup>。しかしながら、ケラチンとKAPs間のEDC-複合体は形成されなかった (Fig. 1)。

私たちは、ヒト毛髪から効率の高いタンパク質の抽出方法 (信大法) と、この溶液に含まれているケラチンの自己集合を誘発させてフィルム形成をする技術を独自に開発してきている<sup>8, 14)</sup>。このフィルムは淡パーフェクト色を帯びた不透明なフィルムであるが、チオグリコール酸などの還元剤の処理により、半透明なフィルムに変化する。半透明フィルムは臭素酸などによる酸化剤で処理すると、元の不透明なフィルムに戻る。還元-酸化状態に伴い、フィルムの微細構造もダイナミックに変化が生じていることを見出している。不透明-半透明-不透明の変化は数回繰り返すことが可能である。つまり、還元、酸化といった環境状態においてケラチンフィルムおよびその素材であるケラチンは環境応答性をもつタンパク質であることが示された<sup>15, 16)</sup>。

毛髪ケラチンは約9%ものシステインを含み、ジスルフィド結合により高強度を示し、階層的な構造体と合わせて、毛髪のしなやかな物性を生み出している。一方、KAPsのシステイン含量は20%以上もあり、両者間のジスルフィド結合を利用すれば、新しいタイプのゲルの作製が可能であると思われる。EDC-ケラチンゲルを還元剤および酸化剤で処理すると、ゲル内に封入したタンパク質の放出量が増えるため、ケラチンネットワークの網目密度が増えることが示された (Fig.3)。このことは、ケラチンゲルがEDCにより架橋されてゲル形成した場合においても、酸化および還元状態で性能が変化する環境応答型のスマート材料であることが示された。さらに、①化学架橋剤を使用しない条件下でのゲルの形成、②ケラチン単独ではなく、KAPsを含んだケラチンゲルの形成、③網目構造を変化させ、強度などの物性や分子ふるい効果が調整できるゲルの形成、の可能性が示された。

美容師や理容師は他人の髪と長時間接触するにも関わらず、これが原因とする職業病の発生は知られていない。頭髪は1日150-300mg合成され、その質量の70-80%はタンパク質である。毛髪同様に再生される血液やリンパ液

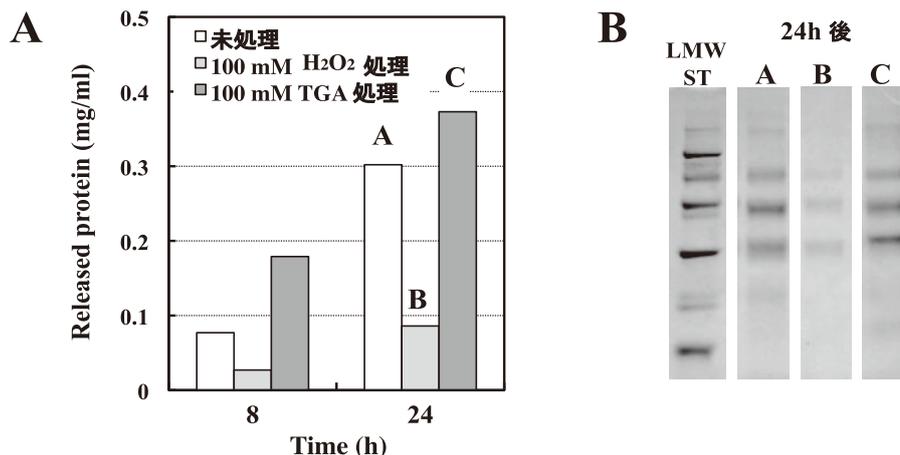


Fig. 3 酸化 / 還元がタンパク質放出に与える影響

は、生体に不可欠で多様な生体成分と多様な細胞を含んでいる長所をもつ。しかしながら、血液やリンパ液を原料とした場合と比べ、毛髪は安全面、保存面、採取負担などにおいて優れている。特に、本人由来の毛髪組織を使用して化粧品・医用材料などに適用できるようになれば、私たちにとっては安全・安心な生体資源となる。

謝 辞

本研究にご助成頂きました公益財団法人コスメトロジー研究振興財団に深謝申し上げます。また、本研究の遂行にあたり、共同研究者の伊藤弓子さんに厚く御礼申し上げます。

(参考文献)

- 1) 藤井敏弘, :セルフメディケーションに向けたヒト毛髪蛋白質フィルムの創製と販売, バイオインダストリー, 19, 22-27, 2002.
- 2) 藤井敏弘, 小林俊一, :セルフ-リサイクルに向けたヒト毛髪タンパク質からの個人対応材料の開発, 日本化粧品学会誌, 30, 5-9, 2006.
- 3) 井出裕介, 藤井敏弘, :硬ケラチンを含有する毛髪タンパク質の免疫原性, 繊維学会誌, 60, 276-279, 2004.
- 4) 井出裕介, 藤井敏弘, :ヒト毛髪タンパク質およびフィルムのプロテアーゼによる分解, 高分子論文集, 61, 153-156, 2004.
- 5) Fujii, T, Murai, S, Ohkawa, K, Hirai, T, :Effects of human hair and nail proteins and their films on rat mast cells, J. Mater. Sci.: Mater. Med., 19, 2335-2342, 2008.
- 6) Katoh, K, Tanabe, T, Yamauchi, K, :Novel approach to fabricate keratin sponge scaffolds with controlled pore size and porosity, *Biomaterials*, 25, 4255-4262, 2004
- 7) Verma, V, Verma, P, Ray, P, Ray, AR, :Preparation

- of scaffolds from human hair proteins for tissue-engineering applications, *Biomed Mater* 3, 1-12, 2008.
- 8) Nakamura, A, Arimoto, M, Takeuchi, K, Fujii, T, :A rapid extraction procedure of human hair proteins and identification of phosphorylated species, *Biol. Pharm. Bull.*, 25, 569-572, 2002.
- 9) Bradford, MM, :A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248-254, 1976.
- 10) Schagger, H, von Jagow, G, :Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.*, 166: 368-379, 1987.
- 11) Fujii, T, Takagi, H, Arimoto, M, Ootani, H, Ueeda, T, :Bundle formation of smooth muscle desmin intermediate filaments by calponin and its binding site on the desmin molecule. *J. Biochem.*, 127, 457-465, 2000.
- 12) 井原慶児, 永井展裕, 柚木俊二, 森一生, :鮭皮コラーゲンのバイオマテリアル化技術の開発と商品化, 生物工学会誌, 85, 126-131, 2007.
- 13) 松崎貴, 新井幸三, 上甲恭平, 細川 稔, 中村浩一, :最新の毛髪科学, フレグランスジャーナル社, 2003.
- 14) Fujii T, Ogiwara D, Arimoto M, :Convenient procedures for human hair protein films and properties of alkaline phosphatase incorporated in the film, *Biol. Pharm. Bull.*, 27, 89-93, 2004.
- 15) Kawasoe T, Takayama S, Ito Y, Fujii T, :Effects of reductive and/or oxidative treatment during permanent wave procedure on human hair keratin films, *J. Jpn. Cosmet. Sci. Soc.*, 35, 306-311, 2011.
- 16) 藤井敏弘, :毛髪ケラチンフィルムによるパーマ処理損傷評価, *Fragrance J.*, 39, 46-52, 2011.