ヒト毛髪タンパク質と絹フィブロインから成る複合フィルムの作製と性質

信州大学繊維学部 藤井敏弘・荻原大祐・松岡和法・奈倉正宣

Preparation and Properties of Composite Film Consisting of Human Hair Proteins and Silk Fibroin

Toshihiro Fujii, Daisuke Ogiwara, Kazunori Matsuoka, and Masanobu Nagura

Faculty of Textile Science and Technology, Shinshu University,
3-15-1, Tokida, Ueda, Nagano 386-8567, Japan.

Abstract : The technology of film production is important in the biomedical and cosmetics fields. We have developed convenient procedures for preparing human hair protein film mainly consisting of hard keratins. The mechanical strength of the hair protein films is too weak to use for practical application. Fibroin, a protein fiber synthesized in silkworm, can also form a film with higher mechanical strength. Thus, we prepared the composite films consisting of human hair proteins and silk fibroin. The composite films were translucent and became flexible in a wet state, and they formed a micro phase separation structure, which has each crystal of two protein components. The breaking stress of the composite films was gradually decreased with increasing content of hair proteins. Practical usage seems to be possible when the weight content of hair protein is lower than 70%. The UV-absorption around 270-295 nm wavelength and protease sensitivity of the hair protein film were higher than those of the fibroin film. The composite films exhibited the middle values for UV-absorption. Interestingly, the degradation of the films was dependent on the kinds of proteases used and on the constituent ratio of the two proteins. These results suggest that a simple mixing procedure can control the properties of the protein film including mechanical strength, UV-absorption, and protease sensitivity. Furthermore, the composite film can be customized for individuals, and for such a film the biocompatibility should be considered.

(Received 8 April, 2006 ; Accepted 10 July, 2006)

1. 緒 言

動物や他人由来ではなく、自己由来の組織要素を原材料として有用加工品の作製に展開する技術確立し、さらに製品化できれば社会にとって大きなプラスになるものと私たちは考えている。この理由としては、自己由来の原料からできた製品を本人が使用するため、免疫原性が低いことが期待できる。このため、拒絶反応やアレルギー反応に関係する様な安全性を求められる製品への適用が想定できる。これらを“セルフリサイクル製品”と名付け、「動物や他人由来のものを使わず、自己由来の生体材料を使用して再利用する製品」と定義している[1-3]。

セルフリサイクル製品の原料として、毛髪と爪を第一に考えている。髪の毛と爪は一生にわたり合成されており、余分な毛髪と爪は、通常不要物質として切れ廃棄されている持続性のある資源である。血液、リンパ液などと比べ採取に負担が少なく、特に、毛髪はある程度まとまった量を集めることが可能である。毛髪と爪の70-80%は、ケラチンを主成分とするタンパク質で構成されている。私たちは、毛髪から簡便にタンパク質を抽出す

る方法を見出し、信大法と名付けた[1,4]。信大法は従来からの還元抽出法を基本にした方法であるが、溶液pHを8.5としているため、ケラチンの分解がほとんどない。また、尿素とチオ尿素の組み合わせであるため、以前から使用されていた尿素単独を使用していた方法と比べ、抽出タンパク質量は3倍以上多い。マウスを用いた実験で、自己由来の毛髪タンパク質に対する抗原性は、他者由来よりも1/100-1/200低いことを報告している[5]。次に、毛髪タンパク質フィルムを形成する方法を開発した[6,7]。得られたフィルムは乾燥および湿状態において辛うじてハンドリングできる程度の力学的な特性であったが、分解性を示した[8]。ガーゼとの一体化ができたため、このフィルムは皮膚パッチ試験において安全性が高いことを報告している[7]。しかし、このタンパク質フィルムの力学的な強度が低いため、改善する必要がある。

繊維素材の中で、絹は蚕が産出するフィブロインを構成成分としている。フィブロインは、高い生体適合性を利用して縫合糸、細胞増殖基材、創傷被覆膜などの医用や化粧品材料として使用されている。また、その分解物はサプリメント的な使用が進んできており、安全性の高

い天然物質と考えられている。フィブロインはフィルム化しても実用に耐えうる機械的強度を示し、高い生体適合性を示すことが報告されている[9,10]。また、Leeらは、羊毛由来のカルボキシメチル化ケラチンタンパク質に絹フィブロインを混合したフィルムでは、特に、1:1(重量)のブレンドフィルムにおいてはそれぞれ単独のフィルムと比べ血栓形成能が約50%に減少することを報告している[11]。

このため、ヒト由来の毛髪タンパク質と絹フィブロインを混合してフィルム形成すれば、お互いの長所を備えたフィルムとなることが考えられる。本研究では、優れた生体適合性をもつフィブロインと混合した複合型の毛髪タンパク質フィルムを作製し、その力学的評価、構造、成分分析とプロテアーゼ感受性について検討を行った。

2. 実験

2.1 タンパク質の調製とフィルム作製

複数のボランティアから採取した毛髪は、エタノールで洗浄して室温下で保存した。毛髪タンパク質は信大法溶液(5 M 尿素, 2.6 M チオ尿素, 5% 2-メルカプトエタノール, 25 mM Tris-HCl, pH 8.5)により50℃, 3日間抽出した後、蒸留水に透析した[4]。絹フィブロイン溶液は、絹ブルーレットを65% 塩化カルシウムとエタノール(5:2)の混合溶液を加え、沸騰水浴中で調製した。この溶液をろ過し、蒸留水に透析した。タンパク質量は、Bradford 法にて測定した[12]。

蒸留水に対し透析したヒト毛髪タンパク質(30-50 mg/ml)と絹フィブロイン(30-50 mg/ml)を各比率で加え、1時間振動し混合した。この溶液をテフロン板あるいはシャーレにキャストし、室温下で自然乾燥させフィルムを作製した。

フィルムからタンパク質の溶出を防ぐため、各フィルムを70%エタノールに約1時間浸すことによりエタノール処理を行った。

2.2 電気泳動

SDS-ポリアクリルアミド電気泳動は、Laemmliの方法に従って行った[13]。6 M 尿素を含む5%と8%アクリルアミドゲルを使用した。染色は、クマシー・ブリリアントブルー R-250により行った。

2.3 引張り試験

試料はエタノール処理をした後、37℃の蒸留水で1時間膨潤させ、マイクロダンベルで成型し、Toyo Baldwin社製引張り試験機(Tensilon U-II-20)を用い、測定を行った。毛髪タンパク質80%、100%の試料は、強度が弱すぎて測定不能であったので、これ以外の試料を測定し、破断強度と破断伸びを以下の式を用いて算出した。

試料の厚さはマイクロメーターで測定し、5 mm幅の試料を用い、各々の試料の断面積 $S(\text{m}^2)$ を求めた。5回測定を行い平均値を求めた。引張り速度は10 mm/minとした。

$$\text{Strength (Pa)} = (\text{N/m}^2) = W (\text{kg}) \times 9.81 / S (\text{m}^2)$$

$$\text{Elongation (\%)} = L_i (\text{mm}) / L_0 (\text{mm}) \times 100$$

2.4 動的粘弾性測定

アイティ計測制御(株)製の温度コントロール型動的粘弾性装置(DVA-225)を用い、温度範囲は100-300℃、昇温速度は10℃/minで測定した。

2.5 広角X線回折測定

理学電気工学(株)製ゴニオメーター(PMG-GAN215505)を用い、管電圧40kV、管電流150mVで測定を行った。回折角範囲は $2\theta = 2-30^\circ$ 、スキャン速度 $0.5^\circ/\text{min}$ 、スキャン間隔 0.01° とした。

2.6 タンパク質フィルムの分解

フィルムの分解は、TBS緩衝液(20 mM Tris-HCl, 140 mM NaCl, pH 7.5)中で、1/10(wt/wt)の比で各プロテアーゼ(0.3-0.5 mg/ml)と混合し、37℃でインキュベーションした。サンプルは、10.000 g、5分間遠心後、得られた沈渣を蒸留水で洗浄した。この操作を4回繰り返し、乾燥後の凝集体の質量を測定し分解率をもとめた。

3. 結果と考察

(A)

(B)

Fig. 1 Photographs (A) and protein components (B) for the composite films consisting of human hair proteins and silk fibroin: a, silk fibroin; b, hair protein 20%; c, hair protein 40%; d, hair protein 60%; e, hair protein 80%; f, hair protein.

Proteins were analyzed with 8% polyacrylamide gel containing 6 M urea: SF, silk fibroin; HP, hair proteins.

3.1 フィルムの形態観察と構成タンパク質の分析

ヒト毛髪タンパク質および絹フィブロイン水溶液をシャーレにキャストし、室温で乾燥させると半透明なフィルムが形成される。毛髪タンパク質フィルムは薄い茶色を帯び半透明である。一方、フィブロインフィルムは僅かに黄色みを帯びているが透明性が高かった。ブレンドフィルムは、毛髪タンパク質混合量が増加するに従い、絹フィブロインの薄い黄色から茶色の色合いとなった (Fig. 1A)。

ヒト毛髪タンパク質と絹フィブロインの複合フィルムを信大法溶液-9 M 臭化リチウム混合 (1:1) 溶液によりタンパク質を再抽出し、電気泳動を行った (Fig. 1B)。毛髪タンパク質の主成分であるケラチン (40-60 kDa) のバンドは同定できたが、低分子量成分であるマトリックスタンパク質は確認できなかった。フィブロインは 120 kDa 以上を示す太いバンドとして見出された。これを 6 M 尿素/5% ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分析したところ、120-200 kDa と幅広い分子量の範囲で染色されたことから、複数のポリペプチドから成っていることが示された。次に、ブレンドフィルムは毛髪タンパク質とフィブロイン由来のバンドがともに含まれており、その割合はフィルムの混合比に依存して変化した。これらのことは、数ヶ月間室温で保存しておいたフィルムでも見られることから、両タンパク質は安定に存在していることが示唆された。

3.2 乾燥フィルムの構造と物性

Fig. 2 に、エタノール処理をほどこす前後のブレンドフィルムの広角 X 線回折強度曲線を示した。毛髪タンパク質 0-60% の試料では、エタノール処理前は非常に幅広いピークしか見られなかったが (Fig. 2A), エタノール処理後には散乱角 $2\theta=20.5^\circ$ 付近と 24° 付近に、新たなピークが出現した (Fig. 2B)。この新たなピークは、絹フィブロインの β -sheet 構造を有する silk II 型結晶に特徴的な回折ピークで、エタノール処理によって結晶性が低い絹フィブロインが結晶化することが示された。毛髪タンパク質含有率が 50% を超えると、未エタノール処理試料では $2\theta=10^\circ$ 付近と 19.5° 付近に、絹フィブロインの結晶回折ピークとは異なるピークが見られた。 $2\theta=10^\circ$ 付近のピークは毛髪タンパク質結晶内の α -helix 間の周期に相当し、 $2\theta=19.5^\circ$ 付近のものは、 α -helix 構造が羊毛繊維と類似のいわゆる coiled coil 構造をとっていると推測される [14]。これらのピークがエタノール処理によって若干強度が増すことから、毛髪タンパク質の結晶性は増加したと考えられる。

更なるエタノール処理後、絹フィブロイン単独フィルムの最大ピークは $2\theta=20.5^\circ$ で、毛髪タンパク質の割合の増加に伴ってピークの位置が低角度側にシフトしていき、毛髪タンパク質 100% の試料は $2\theta=19.5^\circ$ の値を示した。これは、高角度側の絹フィブロインと低角度側の毛髪タンパク質の両者の回折ピークが重なり合い、混合割合に

Fig. 2 Wide-angle X-ray scattering intensity profiles of untreated (A) and ethanol-treated (B) hair proteins-silk fibroin films: a, silk fibroin; b, hair protein 20%; c, hair protein 40%; d, hair protein 60%; e, hair protein 80%; f, hair protein.

応じてピークの位置が移動したためと考えられる。

上記のことから、絹フィブロインと毛髪タンパク質は、ブレンドすることにより各々の結晶構造を変えることなく独立に存在していることが分かる。即ち、絹フィブロインと毛髪タンパク質がミクロに相分離しているフィルムであることが示唆された。

X 線回折の結果の妥当性を更に検討し、相分離構造である事を確認するために動的粘弾性の測定を行った。Fig. 3 に、エタノール処理をほどこす前と後のブレンドフィルムの貯蔵弾性率 (E') の温度変化を示した。絹フィブロインの E' は 180°C 付近で一旦低下後、再び増加し、次いで 270°C 付近で急激に低下していた (Fig. 3A)。毛髪タンパク質の E' は、 210°C 付近から急激に下がっていた。絹フィブロインのガラス転移温度が 175°C 付近にあることから [15]、絹フィブロインの 180°C 付近の変化は、非晶分子が運動を開始することにより E' が低下し、次いで非晶鎖の結晶化により E' が増加することを示していた。絹フィブロインの 270°C 付近と毛髪タンパク質の 210°C 付近か

Fig. 3 Temperature dependence of dynamic storage modulus of untreated (A) and ethanol-treated (B) hair proteins-silk fibroins : a, silk fibroin ; b, hair protein 20% ; c, hair protein 40% ; d, hair protein 60% ; e, hair protein 80% ; f, hair protein.

らの E' の低下は、測定後の試料が炭化していることから、分解によるものと考えられる。

エタノール処理フィルムの E' の温度変化から、絹フィブロインの 180°C 付近にあった E' の低下が無くなっていた (Fig. 3B)。X 線回折のデータから、エタノール処理により非晶部は β -sheet を含む silk II 型結晶に変化していることを考慮すれば、非晶鎖の運動の開始と結晶化が既に終了していることがこの原因と考えられる。シルクの 270°C 、毛髪タンパク質の 210°C の急激な E' の低下については、未エタノール処理フィルムと同様に考えて良いと言える。これらのブレンドフィルムの E' の結果は、X 線回折における結果と一致し、絹フィブロインと毛髪タンパク質が結晶を含み、結晶部はミクロに相分離していることを示唆した。

乾燥フィルムの光吸収特性を検討するために、石英板上にフィルムを作製し、 $260\text{--}400\text{ nm}$ の UV 吸収スペクトル測定を行った (Fig. 4)。各フィルムは 310 nm 以下の波長で吸収が見られ、 280 nm 付近にピークを示した。毛髪タンパク質含有量が高いフィルムほど吸光度が高くなる

Fig. 4 UV-spectrometry of the hair protein-silk fibroin films. The summation of the amount of hair protein and silk fibroin was 0.3 mg/cm^2 : a, hair proteins ; b, hair protein 80% ; c, hair protein 40% ; d, silk fibroin.

傾向が見られた。これは、チロシンを除いて、シスチン、フェニルアラニン、ヒスチジンの含量が、フィブロインよりも毛髪タンパク質で高いことによっているものと思われる [11,16]。特に、UV-B ($290\text{--}329\text{ nm}$) と UV-C ($100\text{--}290\text{ nm}$) の領域の紫外線を強く吸収するため、低波長紫外線の吸収材となることが期待される。

3.3 含水状態の物性

エタノール未処理試料は毛髪タンパク質の湿潤による溶出が激しく、引っ張り試験を行うには弱すぎるものであった。一方、エタノール処理試料は Fig. 2 でわかるように明らかに結晶性が増大し、その結果、溶出が抑えられ引っ張り試験が可能であった。エタノール処理ブレンドフィルムの破断強度と破断伸度を、湿潤環境下での引っ張り試験により測定した (Fig. 5)。絹フィブロインを 100% 含むフィルムの破断強度が最も高い値で、約 4.5 MPa であった。これは、報告されている値と比較して、むしろ高い値を示した [17]。毛髪タンパク質を 25% まで含む複合フィルムの破断強度は、絹フィブロインフィルムとほとんど変わらない値を示した。さらに毛髪タンパク質混合比率を増加させると、破断強度が下がり、毛髪タンパ

Fig. 5 Tensile properties of the hair proteins-silk fibroin films.

ク質が 40-50% を占めると、2-2.5 MPa と約 1/2 まで低下した。毛髪タンパク質混合比率が 70% を超えると破断強度が著しく低下し、フィルム自体の取り扱いが困難となった。破断伸度は、毛髪タンパク質が 10% 以上含まれるフィルムではフィブロイン単独フィルムよりも 20-25% 低下した。

破断強度が毛髪タンパク質分率 25% までほとんど変化しなかったのは、「3.2」項で考察したように、毛髪タンパク質と絹フィブロインはミクロに相分離しているが、この範囲までは両者の非晶鎖間での相互作用が可能であるためと示唆された。

3.4 フィルムのプロテアーゼ感受性

フィルムは、医療や美容の分野での使用を想定しているため、生分解性は特性の一つといえる。そこで、*in vitro* の条件下での各種プロテアーゼ処理の感受性を調べた。毛髪タンパク質溶液とそのフィルムが、トリプシン、キモトリプシン、プロテアーゼ K、プロナーゼ E により分解を受けることを報告している[8]。一方、フィブロインシートおよびファイバーは、コラゲナーゼなどのプロテアーゼによる分解性が調べられている [18-20]。多くのタンパク質と比べ、フィブロインの分解には高濃度のプロ

Fig. 6 Degradation rate of the hair protein (A) and silk fibroin (B) films by various Proteases. Hair proteins and silk fibroin films were incubated without protease (●) and with 1/10 (wt/wt) trypsin (○), chymotrypsin (△), pronase E (▲), and protease XIV (■) at 37°C for 0-4 h. The quantities of protein recovered as films were calculated by weighing.

Fig. 7 Degradation of the composite films with trypsin and protease XIV. Degradation rate of the composite films by trypsin (●) and protease XIV (○) was calculated by weighing (A), and the protein components after treatment with trypsin (B) and protease XIV (C) were analyzed with 8% polyacrylamide gel containing 6 M urea. a, Untreated film ; b, treated film.

テアーゼと数日にもおよぶ長時間の反応を必要としていた。

毛髪タンパク質あるいはフィブロインから作られたフィルムへのトリプシン、キモトリプシン、プロナーゼ E、プロテアーゼ XIV による分解性を調べた (Fig. 6)。本実験条件下では、トリプシンは毛髪タンパク質フィルムをよく分解するが、フィブロインフィルムへの分解作用はほとんど見られなかった。キモトリプシンについては、毛髪タンパク質フィルムを分解するが、フィブロインフィルムへは 10% とわずかな分解にとどまった。プロナーゼ E とプロテアーゼ XIV は、両フィルムを分解した。特に、プロテアーゼ XIV のフィブロインフィルムへの分解作用が大きいことが示された。

このため、トリプシンとプロテアーゼ XIV を用い、4

時間のインキュベーションによるブレンドフィルムへの分解性を調べた(Fig. 7). トリプシンの場合、毛髪タンパク質含量が増加するにともない、そのフィルム重量は減少した。電気泳動の結果、ケラチンの分解は見られるがフィブロインは残存していた(Fig. 7B)。毛髪タンパク質の割合が80%のフィルムにおいてもその形状が残っていたことから、フィルム形状がフィブロインによって保たれていることが示された。これらの傾向は、キモトリプシンとプロナーゼEの場合においても見られた。次に、プロテアーゼXIVの場合は、約40%の絹フィブロイン単独フィルムの重量を減少させるが、フィルム形状は保っており、電気泳動においてもフィブロインのバンドは確認できた(Fig. 7C)。フィブロイン含量が少ないブレンドフィルムにおいては、ピンセットで軽く接触しても壊れる脆弱なフィルムとなった。

Liらは、本実験条件と同様に、プロテアーゼXIVを使用してフィブロインシートを1 unit/ml, 37°C下で反応させたところ、分解が始まるには5日以上インキュベーションが必要であると報告している[18]。一方、本研究での実験条件も0.2 mg/ml(1 unit/ml)のプロテアーゼXIVを使用しているが、4時間のインキュベーションで30-40%のフィルム重量が減少する結果が得られた。これは、原料となる絹自体、フィブロインの分子種、およびフィルムの厚さなどが関係しているものと考えられる。毛髪タンパク質と絹フィブロインの混合比によりプロテアーゼ感受性が異なるフィルムとなることが示された。

4. まとめ

本研究において：

1. 毛髪タンパク質と絹フィブロインを混合することにより、①機械的強度、②分解性、③紫外領域の吸収の3点を調整できるフィルム作製が可能である。
2. 混合フィルムでは、両者の結晶領域が独立に存在し、ミクロ相分離構造を形成する。
3. 混合フィルムは、一度合成され、採集可能な毛髪からのタンパク質と優れた生体適合性を有するフィブロインを原材料としているため、個人由来の組織を含む安全性の高いフィルムとなり、医用材料や化粧品分野での利用が期待できる。

謝 辞

本研究の一部は、文部科学省科学研究費補助金(COE 形成基礎研究費；10CE2003, 基盤研究B；16350123)とコスメトロジー研究振興財団の助成を受けた。絹ブーレットは、平出真一郎氏から供与を受けた。また、英文は Mike Honywood 氏の協力を得た。ここに深く感謝いたします。

文 献

1. T. Fujii, *Bio Industry*, **19**, 22-27 (2002).
2. S. Kobayashi and T. Fujii, *Jour. Jpn Soc. Mech. Eng.*, **1047**, 121 (2006).
3. T. Fujii and S. Kobayashi, *Nippon Keshohin Gakkaishi*, **30**, 1 (2006).
4. A. Nakamura, M. Arimoto, K. Takeuchi, and T. Fujii, *Biol. Pharm. Bull.*, **25**, 569 (2002).
5. Y. Ide and T. Fujii, *Sen'i Gakkaishi*, **60**, 276 (2004).
6. T. Fujii, D. Ogiwara, and M. Arimoto, *Biol. Pharm. Bull.*, **27**, 89 (2004).
7. T. Fujii and Y. Ide, *Biol. Pharm. Bull.*, **27**, 1433 (2004).
8. Y. Ide and T. Fujii, *Kobunshi Ronbunshu*, **61**, 190 (2004).
9. H. Mori and M. Tsukada, *Rev. Molec. Biotech.*, **74**, 95 (2000).
10. G.H. Altman, F. Diaz, C. Jakuba, T. Calabro, R.L. Horan, J. Chen, H. Lu, J. Richmond, and D.L. Kaplan, *Biomaterials*, **24**, 401 (2003).
11. K.Y. Lee, S.J. Kong, W.H. Park, W.S. Ha, and I.C. Kwon, *J. Biomater. Sci. Polymer Edn.*, **9**, 905 (1998).
12. M.M. Bradford, *Anal. Biochem.*, **72**, 248 (1976).
13. U.K. Laemmli, *Nature*, **227**, 680 (1970).
14. H. Sakabe, T. Miyamoto, and H. Inagaki, *Sen'i Gakkaishi*, **37**, T-273 (1981).
15. M. Nagura, K. Gotoh, and H. Ishikawa, *Kobunshi Ronbunshu*, **34**, 389 (1977).
16. F.-J. Wortmann, G. Wortmann, and H. Zahan, *Text. Res. J.*, **65**, 669 (1995).
17. S. Hirade, *J. Seric. Sci. Jpn.*, **66**, 138 (1997).
18. M. Li, M. Ogiso, and N. Minoura, *Biomaterials*, **24**, 357 (2004).
19. T. Arai, G. Freddi, R. Innocenti, and M. Tsukada, *J. Appl. Polym. Sci.*, **91**, 2383 (2004).
20. R. L. Horan, K. Antle, A.L. Collette, Y. Wang, J. Huang, J. E. Moreau, V. Volloch, D.L. Kaplan, and G.H. Altman, *Biomaterials*, **26**, 3385 (2005).