

2011年度 生物学技術賞

麹菌チロシナーゼで製造したメラニン 前駆体による新規染毛料の開発



中村 幸宏^{1*}・山中 寛之¹・秦 洋二¹・
江波戸厚子²・小池 謙造²

Development of the novel hair coloring system using enzymatically-prepared melanin precursors by *Aspergillus oryzae* tyrosinase

Yukihiro Nakamura^{1*}, Hiroyuki Yamanaka¹, Yoji Hata¹, Atsuko Ebato², Kenzo Koike²
(¹Research Institute, Gekkeikan Sake Company, Ltd. 101 Shimotoba Koyanagicho, Fushimiku, Kyoto 612-8385, ²Beauty Research Center, Kao Corporation, 2-1-3 Bunka, Sumidaku, Tokyo 131-8501) Seibutsu-kogaku 90: 115-121, 2012.

はじめに

メラニン色素は皮膚や毛髪に存在する色素で、加齢により毛根のメラノサイトが減少すると毛髪内のメラニンが減少して白髪になる¹⁾。毛髪断面を図1に示すが、白髪と黒髪で異なる点はメラニン色素が含まれるか否かだけである。白髪染めユーザーは白髪を黒く染めたいと望み、それを実現するため一般的な白髪染めには化学合成染料や天然物由来の染料が配合されている。仮に白髪をメラニン色素で染めることができればもとの黒髪と同様になるであろうと想像されるが、高分子化合物であるメラニンを毛髪に浸透させるのは大変難しい。そこで、低分子化合物であるメラニンの前駆体を染料として毛髪に塗布し、キューティクル内でメラニンをつくる方法で白髪を黒くすることが考えられたが、この方法では、メラニン前駆体が空気中において不安定な物質であり、容易にメラニンを形成してしまうため工業的な製造が難しい。化学合成メラニン前駆体を用いた染毛料²⁾が欧州の一部で上市されているものの、まだ広く定着した技術とは言えないだろう。

話は変わり、清酒業界では昭和初期に、酒を搾って得られた酒粕に黒い斑点が生じる「黒粕」現象が問題となった。「黒粕」の原因は麹菌 *Aspergillus oryzae* のチロシナーゼの作用により生じるメラニンとされている³⁾。そこで、チロシナーゼ活性の低い麹菌株を選抜する方法が検討され⁴⁾、醸造に必要な酵素の力価を保持しながらチロシ

ナーゼ活性を抑える育種法⁵⁾も開発された結果、現在の清酒醸造現場において「黒粕」を目にする機会は大変少なくなった。

1990年代に入ると麹菌の遺伝子解析が進められ、米麹などの固体培養で特異的に発現するチロシナーゼ遺伝子 *melB* が単離され、「黒粕」の原因遺伝子であることが明らかにされた⁶⁾。従前の「黒粕」関連研究は、目的がメラニン生成の抑制に限定されていたが、遺伝子特定をきっかけに意図的にチロシナーゼやメラニンを生産し有効利用しようとする考え方が生まれた。ここで改めて麹菌 *A. oryzae* の中からチロシナーゼ活性が著しく強い株を探索してみると、通常の清酒醸造の方法でも図2に示すように並外れて黒い米麹と酒粕が得られ、麹菌チロシナーゼを活用した染毛料の実現可能性が強く示唆された。

こうして、染毛と醸造というこれまでまったく接点の

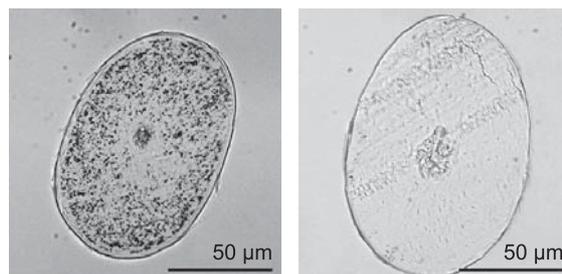


図1. 白髪と黒髪の断面。左が黒髪、右が白髪の断面で、メラニン顆粒の有無が異なる。

*著者紹介 月桂冠株式会社総合研究所 (研究員) E-mail: yukihiro@gekkeikan.co.jp

¹月桂冠株式会社総合研究所, ²花王株式会社ビューティーケア研究センター

清酒醸造プロセス概略

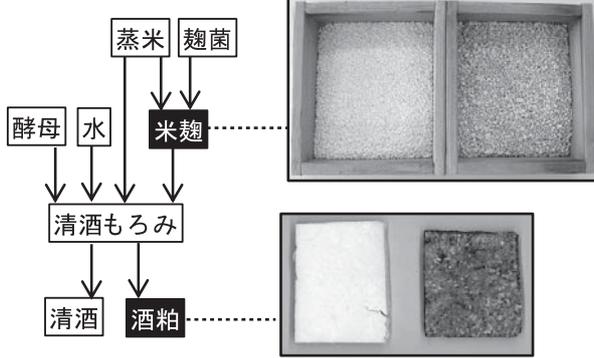


図2. 通常の麹菌株 (左) および著しくチロシナーゼ活性が高い麹菌株 (右) を用いて調製した米麴と清酒醸造後に得られた酒粕。

なかった研究が融合し新技術が生まれることとなった⁷⁾。

基本技術の開発

麹菌チロシナーゼ 麹菌 *A. oryzae* のチロシナーゼには MelB だけでなく、MelO⁸⁾ や MelD⁹⁾ などのアイソザイムも知られているが、古来、食経験が豊富な米麴で生じるメラニン色素を染毛料に応用するという趣旨により、本研究では「黒粕」の原因酵素として特定された MelB を使用している¹⁰⁾。

表1に検討に用いた酵素を示す。主に基礎データ収集のために精製品を使用し、工業生産においては生産性に優れハンドリングが容易なものを使用した。

一般にチロシナーゼは、モノフェノール化合物の水酸基オルト位にさらに水酸基を付加する反応と、オルトジフェノール化合物をオルトキノンに酸化する両反応を触媒し、MelBにおいても両反応が確認されている。

図3に本酵素の反応至適pHと熱安定性を示す。至適pHは5.5~6.0で、後述するメラニン前駆体蓄積反応の触媒として好ましい性質を備えていた。工業用酵素としては必ずしも高い熱安定性とは言えないものの、本プロセスで設定した反応温度は概ね35°C以下であり実用上問題は生じていない。

メラニン関連化合物 メラニン生合成経路は、図4に示すようにチロシンやDOPAを出発物質として、複

表1. 検討に用いた酵素の形態

形態	製法
A 精製酵素溶液 (溶液)	大腸菌でHis-tag付加したmelBを発現させ、細胞を破碎して精製した酵素
B 米麴 (未精製)	褐変性の強い麹菌 (月桂冠株式会社保存株) で製麹
C 微生物細胞 (未精製)	・melBを発現させた大腸菌 ・melBを発現させた清酒酵母

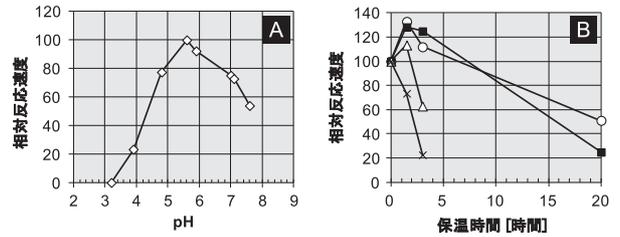


図3. 酵素の諸性質. DOPA酸化反応により生じるドーパクロムを475 nmの吸光度で測定し相対反応速度を示す. A, 反応の至適pH; B, 酵素の熱安定性. 各温度で一定時間保温した後、DOPA酸化反応の速度を測定. 保温温度は、○, 30°C; ■, 40°C; △, 45°C; ×, 50°C.

数の酸化反応を含む多段階反応を経由してメラニンに至る¹¹⁾。しかし、チロシンとDOPAは空气中でメラニン色素を生じにくく、染毛料には適さない。一方、図4の点線枠内の化合物は空气中で容易にメラニン色素を生じる低分子化合物であるため染毛料に適し、本研究では「メラニン前駆体」と呼ぶ。また、本経路の最終産物であるメラニンは高分子化合物で、前述の通り染毛料に適さず副生成物となる。

麹菌チロシナーゼMelBの基質特異性は幅広く、チロシナルキルエステルや、カテキン類など、フェノール性水酸基を有するさまざまな化合物が基質となりうるが、天然と同様のメラニン色素で髪を染めるという研究の趣旨により、基質は図4の生合成経路に含まれるチロシンまたはDOPAに限定し、「メラニン前駆体」蓄積反

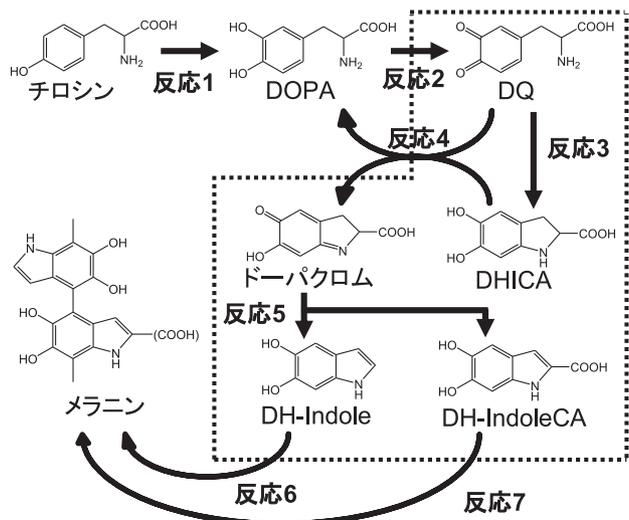


図4. メラニン生合成経路. DOPA, β-(3,4-ジヒドロキシフェニル)アラニン; DQ, ドーパキノン; DHICA, 5,6-ジヒドロキシインドリン-2-カルボン酸; DH-Indole, 5,6-ジヒドロキシインドール; DH-IndoleCA, 5,6-ジヒドロキシインドール-2-カルボン酸. 本研究では点線枠内の成分を「メラニン前駆体」と呼ぶ. 反応1および反応2は、チロシナーゼが触媒し酵素供給が必要. 反応3から反応5までは非酵素反応. 反応6と反応7はチロシナーゼが触媒する一方で、非酵素的にも比較的容易に進行し、いずれの場合でも酵素供給が必要.

応への適性を検討した。1 mlの小スケール実験系を構築し、各基質に対して一定量の精製チロシナーゼを加え強く攪拌する反応操作を行った。メラニン生合成経路の反応速度研究事例¹²⁾に準じて、検出はHPLCと、ドーパクロムに特異的な475 nm吸光度の測定を併用した。

チロシンとDOPAのいずれを基質とした場合も、検出される主要な「メラニン前駆体」はドーパクロムのみであった。このことから、以下の速度関係が考えられる。

・ 反応5 < 反応2 << {反応3および反応4} (1) 式

・ 反応5 < {反応6および反応7} (2) 式

また、チロシンを基質とした場合にDOPAは検出されなかった。したがって、以下の速度関係が考えられる。

・ 反応1 < 反応2 (3) 式

(1) 式を言い換えると、反応2と反応5の速度差により「メラニン前駆体」であるドーパクロムを蓄積させることができる。一方、(2) 式からは、一連の反応中にドーパクロムより下流の「メラニン前駆体」を蓄積させることはできないと言える。また、(3) 式より、チロシンを基質とすると自ずと反応1が律速となり反応2と反応5との速度差の確保が難しくなるため、基質にはDOPAが適すると言える。

第一ステップ（中間成分の蓄積） ここで蓄積させる中間成分とはドーパクロムを指す。第一ステップの重要な点は、反応2と反応5の速度差を大きくすることである。

反応2は麹菌チロシナーゼが触媒する酸化反応であるため、速度を増加させるためには、反応系に加えるチロシナーゼ活性を多くすることと、酸素供給速度を確保することが有効であった。供給ガス量を変化させたり、ガスの種類を空気と純酸素で比較した結果、過剰な酸素供給による反応速度低下などの弊害は認められなかった。

反応5は非酵素的に進行する異性化反応であり、酸化反応ではないため、酸素の有無は進行に関係ない。反応速度を減少させるためには、反応系に加える緩衝液濃度を下げることが有効であった。特に緩衝液を加えない場合、蓄積したドーパクロムの減少は顕著に遅くなった。また、特定の金属イオン、特に銅イオンの混入は反応5の速度を増大させることを見いだした。この作用はキレート剤で抑制できる。

反応2と反応5の両方に影響する因子も多い。その代表例がpHで、図5のAの反応初速から判断してドーパクロム生成はpH5.5～pH8.0がもっとも速い。吸光度が極大値をとる時間から判断してpHが高くなるほどいったん蓄積したドーパクロム蓄積が速やかに減少に転じてしまう。これは、高いpHで反応5の進行が速いことと、生じたDH-IndoleまたはDH-IndoleCAもチロシナーゼの基質となるため、反応2、6、7が競合し相対的に反応2の速度が低下するためと考えられる。総合するとpH5.5

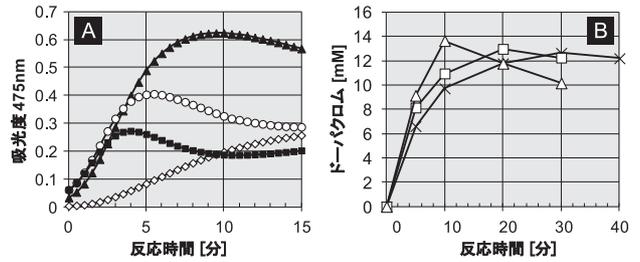


図5. A, pHとドーパクロム蓄積量の関係(475 nmの吸光度による)。◇, pH4.0; ▲, pH5.5; ○, pH6.5; ■, pH8.0. B, 反応温度とドーパクロム蓄積量の関係(HPLC測定による)。△, 35°C; □, 25°C; ×, 15°C.

付近がドーパクロム蓄積に適する。なお、反応進行に伴いpH低下する傾向が認められるため、反応効率を維持するためには設定pHを維持する必要がある。

もうひとつの例が温度で、HPLCによるドーパクロム測定結果を図5のBに示す。測定した範囲において、高温になると反応2、反応5どちらも速くなることが読み取れる。高温ほどドーパクロムの最大濃度が高いため、反応2と反応5の速度差が開くと考えられる。

第二ステップ（目的成分への変換） 第一ステップで得られたドーパクロムは安定保存が困難である。pH調整、窒素置換、粉末化、-20°C凍結、酸化防止剤配合などを検討したものの、いずれの条件でも数日以上保存に成功しなかった。-80°C凍結で長期保存できることを見だし、研究用には保存できたが、工業的な応用は困難で、保存に適した成分への変換を試みた。

反応6および反応7が酸化反応であることから、酸素を除去すればドーパクロムからDH-IndoleまたはDH-IndoleCAが得られると予想される。実際、窒素ガスパージや酸化防止剤添加のどちらの方法でもDH-IndoleとDH-IndoleCAの混合溶液が得られた。

その際、pHを制御することで図6のように両成分の構成比を制御できることを見いだした。いったん生じたDH-IndoleCAを酸性条件にしても脱炭酸によるDH-Indole生成は観察されず、反応5の時点でのpH制御は

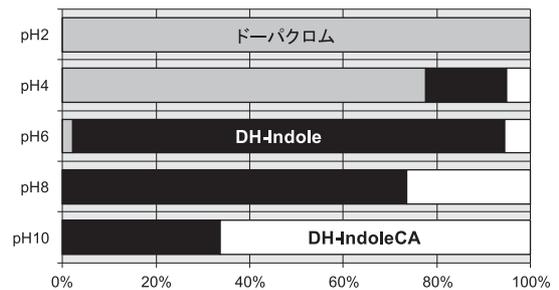


図6. DH-Indole, DH-IndoleCA構成比の調整. 目的pHに調整したドーパクロム溶液を窒素雰囲気下で1時間保管後、HPLCを用いて各成分を定量。

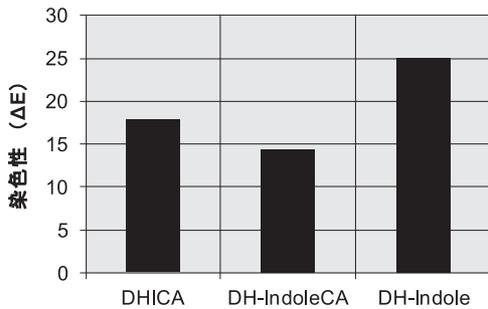


図7. 染色性の比較. 各成分の0.1%溶液を調製し, 一定時間白髪を浸したときの染色性を評価した. 値が大きいほど染色性が良好であることを示す.



図8. DH-Indoleを主成分とする「メラニン前駆体溶液」の保存試験. ガラス製アンプルに溶液1mlを入れ窒素を封入した.

大変重要である.

染毛料への応用にはいずれの成分が適するか, 染毛性能を評価した(図7). その結果に基づき目的成分をDH-Indoleと定め, 第二ステップのpHは中性付近に設定した. なお, 反応5が進行する際, pHが上昇する傾向があり, DH-Indoleの構成比を高めるためには設定pHを維持する必要があった. pHが上昇する現象は, 脱炭酸反応が生じていることを支持すると思われる.

DH-Indoleの保存安定性についても試験を行った. 図8に示すガラスアンプルに窒素封入して-80°Cから40°Cの温度で保管し1年間の経過を追跡した. 高温側でやや色調が濃くなる変化が生じたものの, HPLCによるDH-Indole定量値の減少は認められなかった.

基本プロセスの完成 第一ステップと第二ステップを組み合わせて, DOPAを出発原料としてDH-Indoleを製造する図9に示す基本プロセスが完成した.

第一ステップにおいて, DOPAからドーパクロムへのモル収率は60~85%であった. 反応5を停止することができないため, 現在の技術水準ではやむを得ないと考えている. 反応時間が短いほど収率は良好であった. 第二ステップのドーパクロムからDH-Indoleへのモル収率は95%以上であった.

第一ステップ (中間成分の蓄積)



- ・チロシナーゼが触媒として作用する酸化反応で, 酸素供給が必要
- ・pH維持が必要 (対処しない場合は pH低下傾向)
- ・反応時間は短いほど高収率で, 数十分以内が望ましい



第二ステップ (目的成分への変換)



- ・酸素遮断条件で反応を進行させる
- ・pH維持が必要(対処しない場合は pH上昇傾向)
- ・反応時間は数時間から十数時間

図9. 「メラニン前駆体」製造基本プロセス. DOPAを原料とし, 目的成分をDH-Indoleとする. 酸素供給が必要な第一ステップと, 酸素除去が必要な第二ステップから成る.

メラニン前駆体製造の工業化

実験室で構築した基本プロセスを工業的に実施するための検討を行った¹³⁾. その際, 下記三点を特に考慮した.

- (1) 第一ステップ, 第二ステップいずれもpHが重要であり, しかも進行に伴ってpHが変動するため, pHを維持する方法を開発すること.
- (2) 第一ステップは酸素供給が必須で, 第二ステップは酸素除去が必須である. それらを両立するDO(溶存酸素)制御の方法を開発すること.
- (3) 第一ステップは反応時間が短いほど収率が良く, 数十分以内の短時間反応を実現すること.

これらを満たす可能性が見込まれる方法として, 連続反応カラム方式と, 通気攪拌バッチ方式を比較検討した.

連続反応カラム方式 反応触媒には, 単位重量当たりのチロシナーゼ活性が高く, 精製酵素より安価に製造できるという理由で, 麹菌チロシナーゼを発現させた大腸菌を用い, アルギン酸カルシウムで細胞ごと包括固定化したゲルを充填したカラムを調製した. 通常, 図4の反応2(DOPA酸化反応)を進行させるため酸素供給が必要だが, ここでは液相反応とするため過酸化水素添加で代用した¹⁴⁾. 10 mM DOPA, 20 mM過酸化水素, 50 mMコハク酸-NaOH緩衝液(pH6.0), 0.2% CaCl₂から成る基質溶液をカラム入口から供給し, 出口から2.7 mMドーパクロム溶液を得た. さらにこの溶液を窒素ガス雰囲気下に置き, ドーパクロムのほぼ全量をDH-Indoleへ変換した(図10). この方法は連続生産可能な点が魅力だが, 反応収率が低い上, 後述する通気攪拌バッチ方式と比較して生成物濃度が薄いため, 精製工程コストや原料コストが割高となり, 工業的に不利であると判断された.

反応収率が改善できない原因はpH維持の必要性から

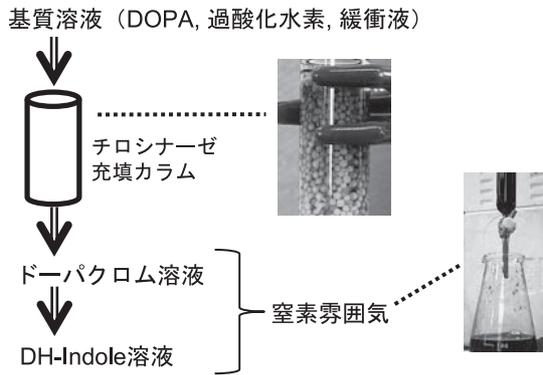


図10. 連続反応カラム方式. カラム内で第一ステップの反応が進行し中間成分が蓄積. 出口溶液を窒素雰囲気中で保管することで第二ステップの反応が進行.

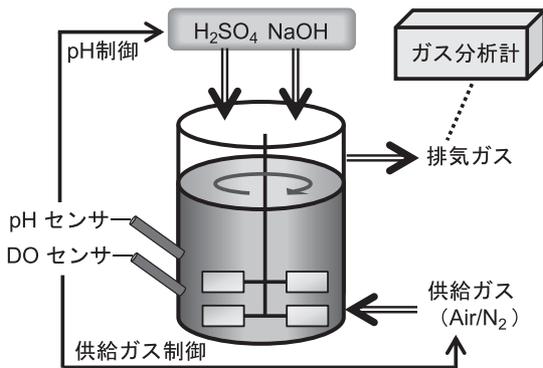


図11. 通気攪拌バッチ反応方式. 一つの発酵槽内で第一ステップ, 第二ステップの反応を順次進行させる.

反応系の緩衝液を除去できず, 図4の反応5が速くなるためだと考えられる. 一方, 生成物濃度を高められない制限要因は, 反応させるDOPAの2倍濃度の過酸化水素添加が必要だが, 過酸化水素が20 mMを超えると酵素反応阻害が顕著になり, DOPA濃度上限が10 mM程度に制約されるためである.

通気攪拌バッチ反応方式 連続反応カラム方式に代わる方法として, 食品・医薬品業界などで一般的に用いられる微生物発酵槽を使用する反応方式を検討した. 通気, 攪拌と温度, pHの制御が可能な点が本プロセスに適合すると期待された. 図11のような装置構成で, 20 mM DOPAを基質溶液として反応槽へ仕込み, 触媒投入後に酸素を供給して, 第一ステップの反応を開始した.

反応触媒には, 高密度培養を安定して実施でき, 単位培養体積当たり得られる活性が高い¹⁵⁾という理由で, 麹菌チロシナーゼを発現させた酵母菌体を細胞ごと使用した. また, 原料DOPAは植物より抽出, 精製したものを使用した. 反応第一ステップの収率低下を引き起こす緩衝液の使用は避け, pH変動を防止するために水酸化

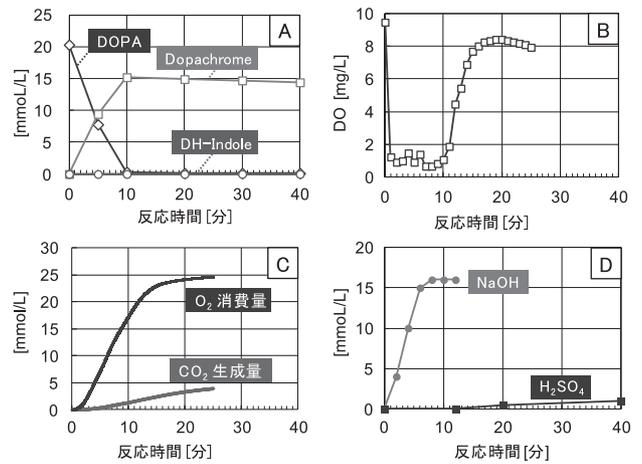


図12. 通気攪拌バッチ方式で行う第一ステップの反応データ. A, サンプル品のHPLC分析値. B, DOデータ. C, ガス分析計の計測濃度より算出した累積のO₂消費量とCO₂発生量. D, 発酵槽の自動制御によりpH維持のため添加された酸とアルカリの累積量.

ナトリウムと硫酸を自動制御により添加した.

図12に第一ステップの反応データを示す. 工程時間が数十分と短いため, HPLCなどを用いたオフライン分析では実施中にデータが得られない. そこで, 酸やアルカリの添加量, DO, 排気ガス分析値などのオンラインデータで反応の進捗判定を行った. 酸素消費速度が低下してDOが上昇し, 添加するpH調節剤がアルカリから酸に切り替る15分前後に基質DOPAはほぼ消費されたと判断し, 後に得たHPLC分析値により裏付けを行った. DOPAを残存させないため, 一定の時間に渡って酸素供給を継続し, その後供給ガスを窒素に切り替えた.

本反応例では酸素消費速度が最大180 mmol/l/hであり, 酸素供給に優れた発酵槽が必要であった. また, 第一ステップは発熱反応であり, 冷却能力不足の場合は反応開始時の温度を下げることで対応した.

発酵槽内のDOがゼロに達すると第一ステップの反応は終点となり, 第二ステップへ移行する. 第二ステップは第一ステップと比較して数時間から十時間程度で完了する遅い反応であるため, HPLC分析でメラニン前駆体組成を確認し, ドーパクロムからDH-Indoleへの変換の完了をもって第二ステップの終点と判断し, 以下の精製工程へ供した.

精製工程では, 窒素ガス雰囲気下で触媒として用いた酵母細胞の除去とたんぱく質除去を目的に限外濾過膜を透過させ, 減圧濃縮および加水により所定のDH-Indole濃度に調整した溶液を得た. これを「バイオ生産メラニン前駆体」溶液と称する. 「バイオ生産メラニン前駆体」溶液は保管と輸送のため図13に示す構造のステンレスコンテナに格納し, 空気中の酸素との接触を避けるため窒素ガスを充填した.

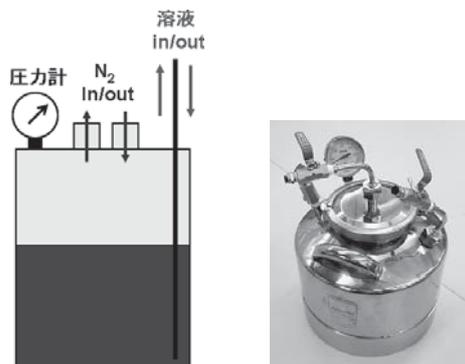


図13. 「バイオ生産メラニン前駆体」の保管および輸送容器例

染毛料の開発

染毛料の設計 「バイオ生産メラニン前駆体」の製造が可能となったところで、それに合わせた染毛料の設計に着手した¹⁶⁾。「バイオ生産メラニン前駆体」の主成分であるDH-Indole濃度を検討したところ、0.1~0.3%としたとき良好な染色性が得られた。「バイオ生産メラニン前駆体」は空気に対して不安定であり、まず安定化に取り組んだ。安定化には適量の酸化防止剤の添加とエアゾール容器使用が適していた。一方、染色性を左右するメラニンの黒色色素生成作用は、弱アルカリ性で強まるためアルカリ剤を添加した。さらに、ハンドリングを良好にするため最適な増粘剤などを検討した。エアゾール容器から出した直後のフォームは「バイオ生産メラニン前駆体」が無色であるため白く見え、その後速やかにメラニンを生じて黒く変化する(図14)。

染毛効果の確認 本染毛料を用いて白髪の本(トレス)



図14. エアゾール容器から空気中に出された「バイオ生産メラニン前駆体」配合染毛料フォーム

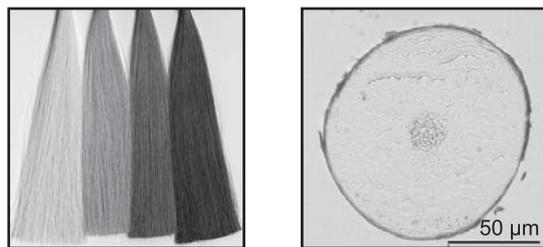


図15. 左図：白髪トレス。左より染毛操作0回、1回、3回、5回。右図：染毛操作5回の毛髪断面。表面のキューティクル層のみ黒色に染色されている。

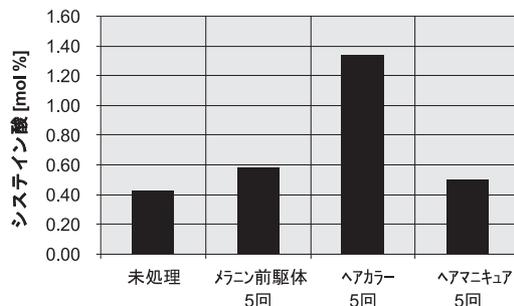


図16. 毛髪へのダメージ測定。染色後の毛髪を酸加水分解して得られたアミノ酸に占めるシステイン酸の割合を示す。傷んだ髪ではシステイン酸が増加するため、値が大きいほど毛髪へのダメージが大きい。

ス)を染色した。白髪トレスに染毛料を塗布後、5分間放置し、その後シャンプー、水洗、乾燥させる操作を1回の染色処理とした。図15に示すように、この染色処理を3回~5回繰り返すと徐々に黒色が濃くなった。したがって、染める回数を調節することで好みの色味が得られる。また、5回染色後の毛髪断面を観察すると、「バイオ生産メラニン前駆体」は毛髪表面付近のキューティクル層に浸透しメラニンを生じたことがわかる。

既存染毛料との比較 現在一般的に使用されている染毛方法には、永久染料とも呼ばれるヘアカラーと、一時染めとも呼ばれるヘアマニキュアがある。前者は酸化型染料中間体と酸化剤を使用時に混合する2剤式で、毛髪内部で染料を生じる。染色性に優れる一方で、酸化剤などの影響で毛髪が痛みやすく、2剤式の取り扱いも煩雑であるというデメリットも有する。後者は酸性染料がタンパク質に付着する性質を利用しており、1剤式で確実に染まる一方、毛髪以外の頭皮なども染めてしまうというデメリットを有する。

「バイオ生産メラニン前駆体」を用いた染毛料が毛髪に与えるダメージを測定した結果、図16のように酸化剤を用いるヘアカラーよりかなり低いことが示された。また、ヘアマニキュアのような皮膚着色のレベルは極めて低かった。

つまり、「バイオ生産メラニン前駆体」配合染毛料は、毛髪へのダメージが低く、少しずつ染まっていく作用の穏やかな点が特徴であると言える。染色性が既存のヘアカラーやヘアマニキュアより低い特性を生かした商品開発に取り組んだ。

使用者テスト 白髪染め使用者は、当然白髪が黒くなることを望んでいる。既存の一般的な白髪染めは1回使用すればはっきり黒色に染まるのに対して、徐々に染まる特性の本染毛料が市場に受け入れられるのかどうか、モニターアンケートなどを用いて慎重にデータ収集した。

その結果、特に男性で急激な髪色の変化を嫌がり、また、めんどろな染毛操作を敬遠する傾向が見いだされた。

そのため、白髪が気になっていても実際に白髪を染めている人の割合は女性と比較して大幅に少ない。そこで、白髪染め未使用だが実は白髪が気になっているモニターに実際に使用してもらい、下記のコメントを得た。

- ・5歳くらい若くなると同僚に言われた。
- ・自然な感じで、良い感じ。
- ・不自然さが嫌でカラーしなかったが、これなら良い。
- ・使い方が簡単でよかった。

商品開発 以上の検討を踏まえて、「バイオ生産メラニン前駆体」の特徴を反映させた染毛料を開発した。白髪が気になっているが白髪染め未使用の男性を主なユーザーに設定し、繰り返し使用することで徐々に好みの色味に近づけていける製品とした。毛髪ダメージが低い点がこの繰り返し使用を可能にした。また、繰り返し使用の場合は簡便性も重要であり、本製品は1剤式で、髪につけて洗い流すだけというように自宅で比較的簡単に使用できるよう設計されている。使用方法は、髪が乾いた状態でエアゾール缶より泡を出し、髪になじませる。そのまま5分程度待ち、その後は通常の髪を洗う要領でシャンプーして洗い流せばよい。通常は3回から5回程度の使用で白髪が灰色から黒っぽい色味になり、その後は数週間ごとに1度使用することでその色味を維持することが可能である。本製品は2009年秋より「STEP COLOR」という名称で販売されている。

おわりに

本研究では天然物由来の原料を、清酒醸造で長年使用されてきた麹菌の酵素を用いて「メラニン前駆体」に変換し、白髪を黒髪に近いメラニン色素で染める染毛料を開発した。この染毛料は髪に与えるダメージが少ない上、一回の使用で確実に染まる一般的な白髪染めと異なり、徐々に黒く染まる特性を有する。そのため、白髪が気になっているものの急に真っ黒に染まる事を好まず、白髪染め使用に踏み切れなかった方に新しい選択肢を提供する商品となった。2009年秋の発売開始2週目で国内の男性用白髪染めシェア10% (3位) を記録し、2011年現在も引き続き全国で販売されている。

技術の観点からは、「黒粕」の原因酵素として醸造分野で嫌われていたチロシナーゼを逆に有効利用して、醸造と染毛という異分野融合の新商品を実用化できた点に意義があると考えている。これをきっかけに、今後とも両分野の特徴をうまく生かした技術研究を進めていく所存である。

本技術はユーメラニンと呼ばれる黒色メラニンの前駆体に関するものであるが、チロシナーゼによるDOPA酸化反応の際にシステインが共存するとフェオメラニンと呼ばれる赤色メラニンが生じることが知られている。その反応経路はユーメラニンよりさらに複雑¹⁷⁾である

ため、その前駆体生産プロセス構築は困難が予想されるが、それが実現すれば色合いの異なる染毛料を開発することが可能となり、ニーズに合わせたより多くの選択肢を提供できるものと期待される。

また、本プロセスを実施する際に廃棄物として使用済み触媒チロシナーゼが発生する。反応速度が重要な本プロセスでは活性不足だが、工業排水などのフェノール性有害物質除去を目指した環境分野での応用¹⁸⁾も研究されており、今後の技術進展に期待される。

本技術に関する研究開発は、月桂冠株式会社と花王株式会社のみなさまをはじめ、関係各社の多くの方々にご支援いただき、実用化にこぎつけることができました。心より御礼申し上げます。

文 献

- 1) 青木仁美, 國貞隆弘: フレグランスジャーナル, **36** (9), 10-16 (2009).
- 2) コンラート ギュンター, マツィーク イドゥナ, リースケ エトガル: 特許第2996724号.
- 3) 村上英也, 河合美登利: 醸協, **53**, 88-92 (1958).
- 4) 原 昌道, 菅間誠之助: 醸協, **70**, 169-173(1975).
- 5) 小畑 浩, 秦 洋二, 川戸章嗣, 安部康久: 特許第4043847号.
- 6) Obata, H., Ishida, H., Hata, Y., Kawato, A., Abe, Y., Akao, T., Akita, O., and Ichishima, E.: *J. Biosci. Bioeng.*, **97**, 400-405 (2004).
- 7) 小池謙造, 秦 洋二: フレグランスジャーナル, **38**, 16-20 (2010).
- 8) Fujita, Y., Uruga, Y., and Ichishima, E.: *Biochim. Biophys. Acta*, **1261**, 151-154 (1995).
- 9) 町田雅之, 阿部敬悦, 五味勝也, 浅井 潔, 佐野元昭, 金 大心, 長崎英樹, 細山 哲, 秋田 修, 小笠原直毅, 久原 哲, 小畑 浩, 中村幸宏, 秦 洋二, 川戸章嗣, 安部康久: 特許第4267318号.
- 10) 山中寛之, 中村幸宏, 東田克也, 秦 洋二, 斉藤芳紀, 小池謙造: 日本生物工学会大会講演要旨集, p.167 (2009).
- 11) Prota, G.: *Med. Res. Rev.*, **8**, 525-556 (1988).
- 12) Rodriguez-Lopez, J. N., Tudela, J., Varon, R., Garcia-Carmona, F., and Garcia-Canovas, F.: *J. Biol. Chem.*, **267**, 3801-3810 (1992).
- 13) 山中寛之, 福田克治, 中村幸宏, 松村憲吾, 東田克也, 秦 洋二, 渡邊高明, 小池謙造: 日本生物工学会大会講演要旨集, p.167 (2009).
- 14) Jimenez, M. and Garcia-Carmona, F.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **373**, 255-260 (2000).
- 15) 佐原弘師: バイオサイエンスとインダストリー, **68**, 350-352 (2010).
- 16) 江波戸厚子, 小池謙造, 斉藤芳紀, 岡田一廣, 宮武良和, 渡邊高明, 東田克也, 秦 洋二: 日本生物工学会大会講演要旨集, p.167 (2009).
- 17) Donato, P. D. and Napolitano, A.: *Pigment Cell Res.*, **16**, 532-539 (2003).
- 18) Yamada, K., Tamura, T., Azaki, Y., Kawashima, A., Hata, Y., Higashida, K., and Nakamura, Y.: *J. Polym. Environ.*, **17**, 95-102 (2009).