



Aspergillus属糸状菌を用いたBilirubin oxidaseの 生産および新規染色技術「酵素ヘアカラー」の開発 とその事業化

堀口, 悠

(Degree)

博士 (科学技術イノベーション)

(Date of Degree)

2025-09-25

(Date of Publication)

2027-09-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第9345号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/0100498385>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(別紙様式 3)

論文内容の要約

氏 名 堀口 悠

専 攻 科学技術イノベーション専攻

論文題目 (外国語の場合は, その和訳を併記すること。)

Aspergillus 属糸状菌を用いた Bilirubin oxidase の生産および新規染毛技術「酵素ヘアカラー」の開発とその事業化

指導教員 辻野 義雄

(注) 2, 000 字～4, 000 字でまとめること。

第1章 序論

本章では、ヘアカラーの起源から現代に至る染毛技術の進展と市場動向、さらに健康被害に関する課題について整理した。古代エジプトのヘナやローマ時代の鉱物系染料など、天然由来の染毛から始まり、20世紀にはジアミン系染料と過酸化水素を用いた酸化染毛剤の登場により、多様な色彩と高い色持ちを実現する技術が確立された。一方で、これらの成分による皮膚アレルギーや頭皮炎、毛髪損傷といった健康被害の報告が増加し、消費者の安全志向が高まっている。特に日本では、年間1億人以上がヘアカラーを使用していると推定されるなか、安全性への配慮が急務である。こうした背景から、ジアミン系染料や過酸化水素を使用しない新たな染毛技術の開発が求められている。なかでも酵素を用いた酸化反応は、温和な反応条件で高い選択性を示すことから、安全性と機能性の両立が期待されている。本研究は、酵素を活用した染毛技術の実用化を目指し、そのための基礎技術と応用展開について検討する。

第2章 *Aspergillus* 属糸状菌を宿主とした酸化酵素の高生産と特性解析

安全かつ高機能な染毛技術の実現に向け、酸化酵素ビリルビンオキシダーゼ (BOD) の高生産系の構築を目指した。*Aspergillus oryzae* および *A. niger* を宿主とし、改良型プロモーター・5'UTR・終結配列を組み込んだ BOD 高発現ベクターを設計、導入することで、形質転換体を作出した。得られた形質転換体の BOD 生産性は約 1.2 g/L を示した。さらに、L-アスコルビン酸および尿酸を用いた脱酸素・還元処理により、BOD の比活性は最大 154.1 U/mg と約 2.3 倍に向上した。反応速度論解析では、 K_m 値に大きな変化はなく、 k_{cat} 値が 2 倍以上に上昇し、触媒回転効率の向上が確認された。電子常磁性共鳴 (EPR) 解析から、活性化処理による銅中心の電子状態変化も観察された。これらの結果より、BOD の産業応用に向けた実用的な生産基盤が確立された。

第3章 *Aspergillus* 属糸状菌での酸化酵素の耐熱化と特性解析

実用化に向けた酵素の課題の一つが安定性の低さであり、本章ではアミノ酸置換による構造安定化を検討した。BOD の配列アライメントと既知の結晶構造情報に基づき、タンパク質の安定性に寄与すると考えられる構造部位を予測し、プロリン置換、塩橋導入、疎水性相互作用強化の 3 つの戦略により変異体を設計した。耐熱性の向上に寄与した 4 変異と、耐熱性は変化しなかったが構造の安定化に寄与すると推定された変異とを組み合わせた多重変異体を作製し、耐熱性を評価した。その結果、60℃、30 分加熱後の残存活性は野生型で 24% であるのに対し、多重変異体は 61% に向上した。さらに比活性を維持したまま、最適温度を 35℃ から約 10℃ 向上させることに成功した。以上より、実用化に耐える酵素設計に関する新たな知見を提供し、BOD の産業応用の可能性を大きく高める成果が得られた。

第4章 酸化酵素の染毛応用性と毛髪損傷評価

酸化酵素 BOD を用いた染毛剤を調製し、その染毛性能および毛髪損傷への影響を評価した。染毛基剤には染料である 5,6-ジヒドロキシインドール (DHI) を配合し、pH4.0～11.0 の条件下で染毛試験を行った。その結果、pH7.0 前後の中性条件でも十分な染毛効果が得られた。さらに、従来のアルカリ性酸化染毛剤 (pH11) と比較して、処理後の毛髪における水滴接触角、摩擦係数、変性温度といった指標において、毛髪の撥水性・強度・構造の保持が確認され、明らかな損傷抑制効果が示された。以上の結果から、BOD を用いた新規染毛技術は、高い染色力と毛髪健康維持を両立させる優れたアプローチであり、従来の酸化染毛剤に代わる有力な代替技術としての可能性を示した。

第5章 イノベーション・アイディア

本章では、第2章から第4章にかけて得られた技術的成果を統合し、新規染毛技術「酵素ヘアカラー」という製品構想を提示した。本製品は、*Aspergillus* 属糸状菌を宿主とする酸化酵素の高生産技術および耐熱化技術により、pH 中性条件下で高い染毛力と毛髪損傷の少なさを実現する。ジアミン系染料や過酸化水素を含まない処方により、アレルギーや皮膚刺激といった健康リスクを軽減し、消費者に対して「安全で高機能なヘアカラー」という新たな価値を提供する。また、美容師にとっては職業性皮膚障害のリスクを軽減し、美容室経営者には人材確保やサービス品質の向上、顧客満足度向上による収益性強化に寄与する。これらの価値提供により、消費者、美容師、美容室経営者という複数のステークホルダーにとって有益な製品となり得ることから、ヘアサロン市場を起点に展開可能な事業アイデアとして位置付けた。

第6章 イノベーション・ストラテジー

本章では、酵素ヘアカラーの社会実装に向けた事業戦略を体系的に構築した。サプライチェーン分析を通じて、酵素製造から製品化、美容室への導入までの流れを整理し、OEM との連携による柔軟な供給体制を提案した。外部・内部環境分析に基づき、ターゲット市場として美容室向け業務用製品を選定した。バリューチェーン分析と競合分析により「低刺激性」「ナチュラル」「中性 pH 染毛」などの差別化軸を明確化し、独自の事業モデルを設計した。マーケティング戦略では Proof of Concept (PoC) の実施を通じて顧客満足度や販売データを評価し、インフルエンサー活用や EC 展開を含む複合施策を講じた。さらに、既存特許や新規技術の権利化を通じた知財戦略、初期費用を抑えた資金調達と設備投資計画による財務戦略も整備し、持続可能かつ競争優位性のある事業展開を目指した。

第7章 結論

本研究では、ジアミン系染料や過酸化水素を含む従来の酸化染毛剤による健康被害や毛髪損傷という課題を解決するため、*Aspergillus* 属糸状菌を宿主とした酸化酵素（BOD）を用いた新規染毛技術の開発と、その社会実装に向けた戦略構築を行った。まず、酸化酵素の高効率な発現と生産を実現し、比活性や安定性に優れた酵素の取得に成功した。さらに、耐熱性付与を目的としたアミノ酸改変により、実用条件下での使用に耐えうる酵素の設計と製造が可能となった。染毛応用検討では、酵素を用いることで中性条件下において高い染毛力と毛髪損傷の抑制を両立することが示された。加えて、製品開発およびマーケティング・知財・財務の各戦略を含めた包括的な事業構想を策定した。本研究により、安全性・機能性・持続可能性を兼ね備えた次世代ヘアカラーの実現可能性が明確となり、化粧品産業への新たな技術潮流をもたらす先駆的成果といえる。