

機関番号：14401

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20760114

研究課題名 (和文) 非平衡・非定常状態における細胞膜機能変化の分子的機構：せん断力による変化

研究課題名 (英文) Molecular Mechanisms about Changes of Cell Membranes Functions: Induced by Shear Forces

研究代表者

越山 顕一郎 (KOSHIYAMA KENICHIRO)

大阪大学・基礎工学研究科・助教

研究者番号：80467513

研究成果の概要 (和文)：

異種の脂質分子、およびコレステロールを含む細胞膜系の分子シミュレーションを行い、より現実に近い状態での細胞膜分子モデルを構築し、それらの物性値を明らかにした。また、細胞膜分子モデルに対して、非平衡・非定常状態でせん断力を与えるコードを開発し、せん断力下で、コレステロールの含有によって膜厚さの変化が抑制される事等を明らかにした。さらに、応力負荷後の膜への水分子導入をきっかけとして孔構造が自発的に形成することも明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：

We developed more realistic molecular model of cell membranes and obtained their physical characters by conducting molecular simulations of cell membranes composed of different types of lipids and cholesterol. The application of shear stresses to the cell membrane model revealed, for example, that the inclusion of cholesterol hampers the thinning the membrane. Furthermore, we found that the water penetration into the membrane caused by such stresses can induce spontaneous formation of a pore structure in the membrane.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009年度	600,000	180,000	780,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：流体力学

科研費の分科・細目：機械工学・流体力学

キーワード：細胞膜, 超音波, キャビテーション, ドラッグデリバリー

1. 研究開始当初の背景

細胞膜は細胞の内外を隔てるバリアであり、膜を隔てた分子、イオンの輸送を制御しつつ細胞内部を保護している。細胞膜は、様々な環境において力学的な刺激を受け、その構造が一時的に変化することで細胞内外

の物質が流出・流入することがある。例えば、血液循環補助装置に用いるための軸流ポンプ内において、赤血球は非生理的なせん断流れにさらされ、またポンプ形状によっては壁の一部に激しく衝突する。この時に生じる機械的応力による赤血球の変形により、赤血球

膜が局所的に破断し、赤血球内のヘモグロビンが溶出する（溶血）。このことは、ポンプの酸素輸送性能を著しく低下させるので、血液循環補助装置の設計において、溶血を引き起こさないポンプをいかに設計するかが重要である。さらに、医学分野においては、2000年頃から物理的な作用で細胞膜を非平衡・非定常状態にして膜機能を変化させ、治療につなげる研究が行われている。例えば、超音波や衝撃波などの波動を細胞に照射することで、細胞膜の物質透過性を一時的に変化させ、細胞内への薬剤分子の導入を促進する技術や、電場を細胞に作用させることで遺伝子を細胞内へと導入する技術が開発されている。その一方で、このような非平衡・非定常状態での細胞膜の構造変化や物性値があまり理解されておらず、開発段階においてその効率や安全性の検討が十分に行われていないのが現状である。

2. 研究の目的

分子シミュレーションを行うことで、外力（衝撃波、超音波、張力、電場、放射線、呼吸や拍動に伴うせん断流）による非平衡・非定常状態での細胞膜の機能変化を分子レベルで検証することが可能である。本研究では流体现象に伴って発生するせん断力を外力として想定し、細胞膜の機能変化を分子レベルの構造変化とそれに基づく物性値の変化という観点から明らかにすることを研究の目的とする。

3. 研究の方法

非平衡・非定常状態における細胞膜の機能変化を解明するために、まず、平衡状態における細胞膜の分子シミュレーションを行い、平衡状態における細胞膜系の物性値を明らかにする。そして平衡状態におけるシミュレーション技術や物性値の解析方法を基礎として、非平衡・非定常のコードを開発し、非平衡における物性値の評価方法を提案し、物性値の比較と膜構造の比較から膜機能の変化を明らかにしていく。特に、せん断力を外力として想定しているため、研究代表者が過去に開発してきた衝撃波力積値モデルを改良し、そのモデルを用いた細胞膜系の MD シミュレーションを実行することで目的達成に取り組む。

4. 研究成果

(1)平衡状態における細胞膜分子モデルの構築

①DPPC/POPC 混合脂質膜

両親媒性の脂質分子が水中で自発的に形成する二重層構造は脂質二重層と呼ばれ、すべての細胞膜の基本構造として知られている。本研究では、疎水鎖が飽和脂肪酸である代表的な脂質である DPPC 分子と、その一部に不飽和脂肪酸を含む POPC 分子を用い、それぞれの単一分子でできた脂質膜と、二種類の脂質を等モル比で混合した混合脂質膜を用いて、温度 323K、圧力 1 bar で一定の平衡分子動力学(MD)シミュレーションを行った。図 1 にシミュレーションによって得られた、POPC/DPPC 混合脂質膜のスナップショットを示す。脂質分子で形成された二層が水分子で形成された層で挟まれた典型的な脂質二重層構造をとっていることがわかる。脂質膜の構造的な特徴を表す物性値の一つである“脂質分子一個あたり膜面積”を解析したところ、その値は混合によって小さくなることがわかった。また、疎水鎖の炭化水素間のなす角度から計算されるオーダーパラメータ、膜の厚み、疎水鎖の長さの全てにおいて、混合脂質膜での値が単一脂質膜の値よりも大きくなることがわかった。特に、膜のオーダーパラメータは脂質膜を通過する際の低分子の透過係数に関連することから、分子の透過を分子シミュレーションで調べる際には、用いる細胞膜分子モデルの選択に注意しなければならないことが示唆された。

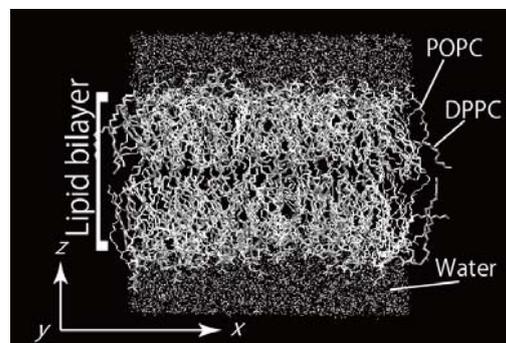


図 1 混合脂質膜のスナップショット

②POPC/コレステロール膜

赤血球や内皮細胞など実際にせん断流れにさらされる機会の多い細胞膜においては、その膜の構成成分としてコレステロール分子が比較的高い割合で含まれている。そこで、赤血球膜に最も近い 40%のコレステロールを含む POPC/コレステロール膜を用いて、温度・圧力一定の MD シミュレーションを行った。その結果から、POPC/コレステロール膜ではコレステロール分子が POPC 分子に比べて膜の中央に寄って脂質膜を形成してい

ることがわかった(図2参照). さらに, POPC分子一個あたりの膜面積を Voronoi 解析することにより計算したところ, POPC膜の場合に比べて約40%減少していた. また, 疎水鎖に関するオーダーパラメータも POPC/コレステロール膜では増加しており, このことからコレステロールの含有により, 膜が秩序化することが示唆された. ここで, 膜の体積弾性率を計算したところ, POPC膜に比べて, POPC/コレステロール膜の方が約40%増加していることもわかった.

③膜タンパク質を含む脂質膜

細胞膜の透過性が変化する機構として膜に存在する張力感受性タンパク質の張力変化に応じた構造変化があげられる. そのため, 張力感受性タンパク質の一つである MscL を含む脂質膜の MD シミュレーションを行った. しかし, タンパク質の構造を脂質膜内で固定させるための手法に困難が生じ, また構造安定には長時間の計算が必要なことから, 安定した物性値を得るには至らなかった. これより, 短時間でタンパク質構造が膜内で安定するような制御手法を計算コードに組み込むことが必要であることがわかった.

(2)せん断応力下での細胞膜構造変化

上記(1)の研究成果によって得られた細胞膜分子モデルの中から, POPC/コレステロール膜を初期構造として使用し, 研究代表者がこれまで開発してきた衝撃波力積モデルを用いて片側の膜面に対して任意の方向に力積を与える. 衝撃波力積モデルでは, 衝撃波の圧力履歴の時間積分で定義される衝撃波力積値を, 膜に近接する水分子集団の運動量変化としてモデル化する非平衡・非定常 MD 法である. 本研究では, 力積値として 40 mPa・s を選択し, 力積を与える方向 θ は 0° , 60° とした(図2参照). 比較のために, POPC膜に関しても同様の衝撃波力積モデルを用いた計算を実行した.

力積が作用した時の明白な膜構造変化の一つとして膜厚さの変化が観察された. そこで, 図3に本計算条件において得られた, 力積が作用した時の POPC/コレステロール膜の膜厚さの経時変化を示す. 比較のために POPC膜の場合のデータを図3に載せている. 力積を与える方向 θ を 0° から 60° に変えることで, 膜厚さの変化が小さくなることがわかる. POPC/コレステロール膜の構造変化に伴う膜厚さの最小値は, POPC膜の場合よりも大きくなる. これは同じ大きさの力積が与えられた場合は, POPC/コレステロール膜の方が膜に垂直方向の変形量が小さくなること

を示す. POPC分子は炭化水素基が一部を除いて飽和結合して鎖状に繋がり, 比較的に変形しやすい構造をしている. 一方で, コレステロールは多環構造を持っているため変形しにくく, このため垂直方向の構造変化が抑制されたと考えられる.

次に, POPC分子親水頭部の重心と疎水鎖の重心とを結んだ直線の傾きの時間変化を調べた(図4). この解析手法は, 非平衡・非定常状態における分子構造を解析するために, 研究代表者が新たに開発したものである. 力積が直接作用する膜面側(Outer layer)の POPC分子とその反対側(Inner layer)の POPC分子それぞれの傾きの変化を示している. これより, Outer layerに含まれる POPC分子は, 斜めに与えた力積に応じて速やかに傾き, 無次元時間2程度でその傾きは一定となること

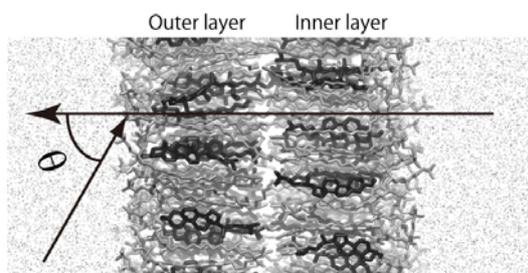


図2 POPC/コレステロール膜. コレステロール分子を黒色の棒状モデル, POPC分子を灰色の棒状モデル, 水分子を黒色のドット状モデルで示す.

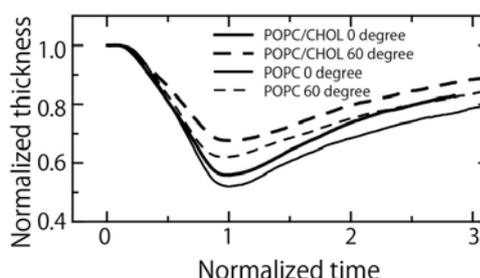


図3 POPC/コレステロール膜, POPC膜の衝撃波が0および60度で衝突したときの膜厚さ経時変化. 膜厚さは初期の膜厚さで無次元化した.

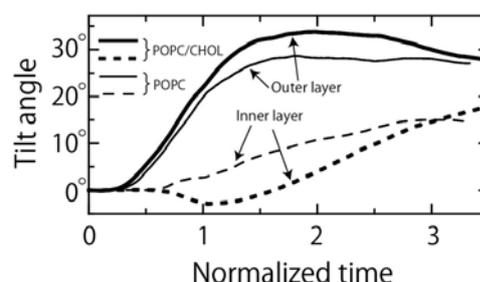


図4 POPC分子の傾き角度の経時変化

がわかる。一方で、Inner layer の POPC 分子の傾きの増加は緩やかである。最大の傾きは、POPC/コレステロール膜で約 30°, POPC 純膜で 25°となり、POPC/コレステロール膜の POPC 分子の方が若干傾きやすいことがわかる。

(3) 膜への水分子導入と自発的な孔構造形成
 これまでの研究により、衝撃波などの強い波動の影響により、脂質膜の疎水部分に水分子が導入されることが確認されている。また、上記(2)で実行した計算においても、同様にせん断力によって膜への水分子の導入が観察された。これより、膜疎水部への水分子導入がより大きな構造変化を引き起こすことが予想された。そこで、上記(1)で開発した細胞膜分子モデルから DPPC 膜を選び、その疎水部分に任意の数の水分子を挿入し、その後、温度・圧力を一定状態にする MD 計算を実行した。本研究課題では、非平衡・非定常状態に興味があるために温度・圧力一定状態になるまでの膜構造の過渡的変化を詳細に解析した。図 5 に膜疎水部に挿入した水分子の濃度が約 200 kg/m³を超えたときだけに形成した膜を貫く孔構造を示す。この孔構造は、水分子の柱を脂質分子の親水性の部分で裏打ちした構造をしており、100 ns 以上安定に存在する場合もあった。また、疎水部分へ挿入した水分子の濃度を増加させると、孔の形成確率が増加し、また、異なった形成パターンが生成される事もわかった。

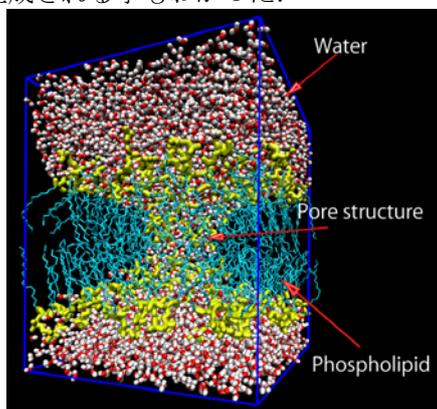


図 5 DPPC 膜中の孔構造

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

- ① Koshiyama K., Yano T, Kodama T., Self-organization of a stable pore structure in a phospholipid bilayer, *Physical Review Letters*, 査読有, 105, 2010, 018105.
- ② 越山 顕一郎, 和田成生, せん断応力下での細胞膜構造変化: 分子シミュレーション, 日本機械学会 2010 年度年次大会講演論文集, 査読無, 8, 2010, 131-132.

ン, 日本機械学会 2010 年度年次大会講演論文集, 査読無, 8, 2010, 131-132.

- ③ 越山 顕一郎, 和田成生, 細胞の高速な変形に伴う膜破断: 分子動力学シミュレーション, 第 23 回計算力学講演会 CMD2010 要旨集, 査読無, 2010, in CD.
- ④ Koshiyama K., Molecular Dynamics Simulation of Rupture of a Phospholipid Bilayer under Mechanical stresses, *Proceedings of Third Switzerland-Japan Workshop on Biomechanics 2009*, 査読有, 2009, 102.
- ⑤ 越山 顕一郎, 二種類の脂質分子による脂質膜の分子動力学シミュレーション, 計算工学講演会論文集, 査読無, 14, 2009, 35-36.
- ⑥ Kodama T., Tomita Y., Watanabe Y., Koshiyama K., Yano T., Fujikawa S., Cavitation Bubble Mediated Molecular Delivery During Sonoporation, *Journal of Biomechanical Science and Engineering*, 4, 査読有, 2009, 124-140.
- ⑦ 越山 顕一郎, 混合リン脂質二重層膜の分子動力学シミュレーション, 査読無, 2008, 405-405.

[学会発表] (計 5 件)

- ① 越山 顕一郎, 和田成生, 細胞の高速な変形に伴う膜破断: 分子動力学シミュレーション, 第 23 回計算力学講演会, 2010.9.23, 北見.
- ② 越山 顕一郎, 和田成生, せん断応力下での細胞膜構造変化: 分子シミュレーション, 日本機械学会 2010 年度年次大会, 2010.9.7, 名古屋.
- ③ Koshiyama K., Molecular Dynamics Simulation of Rupture of a Phospholipid Bilayer under Mechanical Stresses. *Third Switzerland-Japan Workshop on Biomechanics 2009*, 2009.9.2, Engelberg, Switzerland.
- ④ 越山 顕一郎, 二種類の脂質分子による脂質膜の分子動力学シミュレーション, 第 14 回計算工学講演会, 2009. 5.12, 東京.
- ⑤ 越山 顕一郎, 混合リン脂質二重層膜の分子動力学シミュレーション, 日本流体力学会年会 2008, 2008.9.7, 神戸.

[その他]

ホームページ等

<http://sites.google.com/site/drkklab/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

越山 顕一郎 (KOSHIYAMA KENICHIRO)
 大阪大学・基礎工学研究科・助教
 研究者番号: 80467513