

機関番号：24403

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24760624

研究課題名(和文) ナノ粒子 生体膜界面における表面修飾金ナノ粒子の生体膜内侵入メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of penetration mechanisms of surface-functionalized gold nanoparticles into lipid bilayer

研究代表者

仲村 英也 (Nakamura, Hideya)

大阪府立大学・工学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：00584426

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、分子動力学シミュレーション法を用いて、アルカンチオール修飾金ナノ粒子の生体膜(リン脂質2重膜)に対する付着・侵入・透過挙動を解析した。特に粒子表面物性(表面電荷・表面修飾分子鎖長)およびモデル生体膜の組成や構造が、粒子-生体膜間相互作用に及ぼす影響について解析した。その結果、粒子表面物性が粒子-生体膜間相互作用に及ぼす作用機構を分子レベルで明らかにすることができた。さらに、実際の生細胞膜の構造を模擬したモデル生体膜を新たに導入することで、ナノ粒子が生体膜を自発的に透過する様子もシミュレートすることができた。

研究成果の概要(英文)：In this study, molecular dynamics simulations of interaction of alkanethiol-functionalized gold nanoparticles with lipid bilayer (model of a biological cell membrane) were conducted. In particular, effects of surface charge, length of a carbon chain of the alkanethiol, and composition and structure of the lipid bilayer were analyzed. As a result, effects of surface properties of the gold nanoparticles on their adhesion and penetration mechanism into the model cell membrane at molecular level were elucidated. It was also found that more realistic structure of the lipid bilayer highly induces spontaneous permeation of nanoparticles across the whole lipid bilayer.

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学・化工物性・移動操作・単位操作

キーワード：金ナノ粒子 脂質2重膜 相互作用 分子動力学計算

1. 研究開始当初の背景

金ナノ粒子は、薬物分子・核酸分子・タンパク質などを細胞内に送達するためのキャリアとしての応用が精力的に検討されているナノ粒子の一つである。この場合、粒子は細胞を覆う最も基本的な生体障壁である生体膜と何らかの相互作用を経た後に細胞内へと送達され、その効果を発現することになる。従って、“粒子が生体膜とどのように相互作用するのか？”を理解することは、ナノ粒子の医療応用を実現する上で本質的に重要な学術的課題である。特に粒子を合成し利用する工学的な観点においては、粒子物性の作用機構を明らかにすることが重要である。

これまでに、金ナノ粒子と生細胞の相互作用に関しては多くの実験研究が報告されている。しかしながら、使用する細胞の種類、実験環境、実験手順、粒子特性の評価法などが各々の研究によって異なることから、粒子-生体膜間相互作用に関して統一的な見解を得ることは現在のところ難しい。さらに、実験的手法ではナノ粒子と生体膜の界面で起こる分子レベル(ナノメートル・ナノ秒スケール)の微視的な現象を捉えることは困難である。従ってこの場合、微視的な現象を分子レベルで追跡可能である分子動力学(MD)シミュレーションを用いた解析が有効であると考えられる。

金ナノ粒子-生体膜界面における相互作用現象の分子動力学シミュレーションを実施するためには、生体膜および金ナノ粒子に関する2種類の計算モデルが必要となる。この内、生体膜に関しては、高精度のモデルがすでにいくつか開発されているが、それらは主に生体分子(有機分子)を対象としたものであり、金ナノ粒子のような無機材料を取り扱うことができない。従って、ナノ粒子-生体膜界面の分子動力学計算に適用可能な金ナノ粒子の計算モデルを新たに構築する必要がある。その上で、金ナノ粒子-生体膜界面における相互作用現象の解明に取り組むという着想に至った。

2. 研究の目的

はじめに、ナノ粒子-生体膜界面の分子動力学計算に向けた表面修飾金ナノ粒子計算モデルの開発を目的とした。医療応用に用いられる金ナノ粒子は、通常、粒子表面を種々の分子で修飾したものが用いられる。従って、コアとなる金ナノ粒子の結晶構造だけでなく、粒子表面の修飾分子構造も含めた、表面修飾金ナノ粒子全体を取り扱うことが可能な計算モデルの構築に取り組んだ。

次に、構築したシミュレーションモデルを用いて金ナノ粒子とモデル生体膜(リン脂質二重膜)の相互作用現象を解析した。金クラスター表面にアルカンチオールが配位結合したナノ粒子を解析対象とした。特に、粒子表面物性(表面電荷およびアルカンチオールの

分子鎖長)が粒子のモデル生体膜への付着・侵入挙動に及ぼす影響について解析を行った。さらに、モデル生体膜の構造が粒子の生体膜への侵入・透過挙動に及ぼす影響についても解析を行った。

3. 研究の方法

本研究では、合成が容易かつ生体適合性が高いことから医療分野への応用が精力的に検討されているアルカンチオール修飾金ナノ粒子をモデルナノ粒子として用いた。修飾金ナノ粒子は以下の手順に従ってモデル化した。

まず、コアとなる金クラスターの結晶構造を、固体物理分野における計算手法を用いて計算した。具体的には、原子挿入法ポテンシャルを用いたモンテカルロ計算により決定した。具体的には、314個の金原子からなる切頂八面体形態の結晶(魔法数金クラスター)をモデル化した。次に金クラスター表面の金原子に配位結合したアルカンチオールの修飾構造を表面化学分野における計算手法(Simulated Annealing法)を用いて計算した。Fig. 1に計算結果を示す。計算された粒子の粒子径は約4nmであった。最後に、異なる表面電荷極性や電荷密度を有する修飾金ナノ粒子をモデル化するために、任意の数の修飾分子末端をアンモニウム基もしくはカルボキシレート基で修飾した。モデル化した金ナノ粒子は、モデル生体膜系に導入した(Fig. 2)。モデル生体膜には電気的に中性であるDPPCおよび負帯電性であるDPPGの2種類のリン脂質分子から構成される脂質二重膜を用い、一般に負帯電性である実際の生体膜の電荷特性を模擬した。脂質二重膜は上下の水分子層に水和されており、粒子を上層の水分子層に挿入した状態を初期状態とした。

計算は3次元方向に周期境界条件を適用し、修飾金ナノ粒子を自由拡散させることで、リン脂質二重膜への付着・侵入・透過挙動を解析した。本研究では複数の原子をある1個の相互作用点で代表させる粗視化分子動力学モデルを用いた。

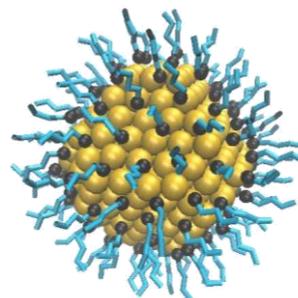


Fig. 1. 計算されたアルカンチオール修飾金ナノ粒子

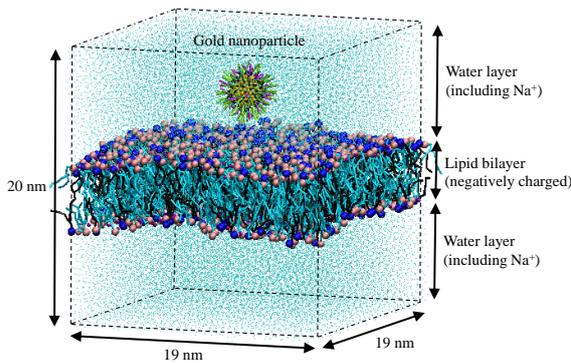


Fig. 2. 計算系の外観

4. 研究成果

(1) 計算結果の妥当性確認

修飾金ナノ粒子の計算結果の妥当性を検証した. 計算されたブタンチオール修飾金ナノ粒子の構造を解析したところ, 金クラスター表面に結合しているブタンチオール分子数は 120 個であった. ここで, 既往の実験結果より, 同一の金クラスター表面に配位結合するブタンチオールの分子数はおよそ 100 個であることが報告されており, これは本計算結果と比較的良好に一致していた. 加えて, 計算結果より求められた金原子とチオールの硫黄原子間の平均ポテンシャルエネルギーは 192 kJ/mol であったが, これは既往の報告における値(約 170 kJ/mol)に近い値を取ることが分かった. 以上より, 修飾金ナノ粒子の計算モデルの妥当性を確認した.

次に, モデル生体膜(リン脂質二重膜)の計算結果の妥当性を検証した. はじめに, 計算された生体膜の厚みおよびリン脂質 1 分子あたりの膜表面積を求め, これらを実際の測定結果と比較したところ, 両者は良好に一致した. さらに, 生体膜を構成するリン脂質分子の側方拡散係数を求め実験結果と比較したところ, これも良好に一致した. これらより, 実際のリン脂質二重膜の静的特性および動的特性を本計算モデルは良好にシミュレートできていることを確認した.

(2) ナノ粒子の生体膜への付着・侵入・透過挙動の解析

はじめに, 金ナノ粒子の生体膜透過性に関係する重要な因子の一つである粒子表面電荷に着目し, その影響について検討を行った. なお, ここではモデル生体膜の上下層に含まれる負帯電性リン脂質(DPPG)の分子数は等しい条件下で計算を行った. 計算の結果, 電氣的に中性および負帯電性の金ナノ粒子は生体膜内部へと侵入しなかった. その一方で,

正帯電性金ナノ粒子は生体膜の構造を変形させながら生体膜内部に侵入していくことがわかった. Fig. 3 に, 表面電荷密度が 5.5 e/nm^2 の正帯電性金ナノ粒子の生体膜侵入過程を示す. なお, 図は生体膜に対して垂直な面における断面を示している. 粒子は初期状態において, 水分子層に位置している (Fig. 3a). 金ナノ粒子は生体膜と相互作用し始めると, 粒子は生体膜の構造を変形させながら, 膜内部へと侵入した (Fig. 3b-d). このとき, 粒子は正に帯電しているため, 負帯電性リン脂質である DPPG に覆われた. ナノ粒子がさらに生体膜へと侵入していくと, 生体膜は元の自己組織化構造を維持できなくなることが分かった (Fig. 3f).

金ナノ粒子を正帯電させることで生体膜内部へと自発的に侵入することが分かったため, 次に粒子の表面電荷密度が生体膜との相互作用に及ぼす影響について検討を行った. 計算された 500 ns 後のスナップショットを Fig. 4 に示す. 図より, 表面電荷密度が小さい場合は粒子が生体膜の上層に侵入するだけであったが, 表面電荷密度が 5.5 e/nm^2 の粒子はモデル生体膜の上層だけでなく下層とも強く相互作用し, 生体膜の自己組織化構造を大きく崩すことが分かった.

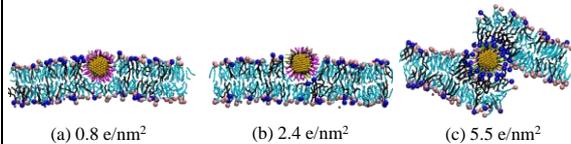


Fig. 4. 異なる表面電荷密度における計算結果

5.5 e/nm^2 の粒子において, 生体膜が一部破断していたことから, 生体膜のバリア能が大きく変化することが予想された. そこで, このバリア能を定量的に評価するために, 単位時間・単位面積あたりに生体膜を透過した水分子数を算出した (Fig. 5). 表面電荷密度が 0.8 e/nm^2 および 2.4 e/nm^2 の場合, 膜を透過した水分子数は, 生体膜のみの場合とほとんど変化がなかった. これは, 表面電荷密度の低い粒子は生体膜のバリア能を変化させないことを意味している. しかしながら, 5.5 e/nm^2 においては, 生体膜を透過する水分子数が大きく増大していることが分かった. これは, 粒子が生体膜内に侵入した際に形成された破断箇所を通じて水分子が膜を透過しやすくなったためである. 従って, 正帯電量の高い粒子は, 生体膜を欠損し膜本来のバリア能を低下させる可能性が計算結果から示唆

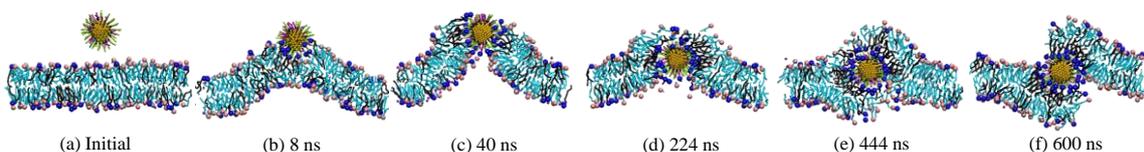


Fig. 3. 正帯電性粒子(表面電荷密度 = 5.5 e/nm^2)の生体膜への侵入挙動

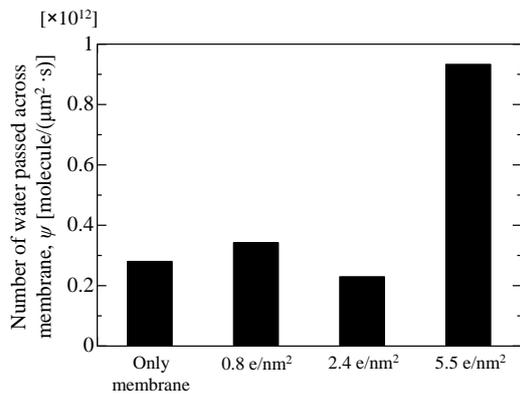


Fig. 5. 異なる表面電荷密度における生体膜を透過した水分子数

された。ここで、実験研究において、正帯電性ナノ粒子はリン脂質膜を破壊しやすいことが報告されている。さらに、実際の生細胞を用いた検討では、正帯電性ナノ粒子は比較的高い細胞毒性を示すことが報告されており、この原因として、粒子が生体膜を破壊し細胞質の細胞外への漏出を引き起こすことが一つの可能性として指摘されている。これらの実験結果より得られている知見は、本シミュレーション結果と間接的ではあるが良く一致している。

本研究では、粒子表面のアルカンチオール鎖長の影響についても解析を行った。その結果、同じ正帯電性粒子であってもアルカンチオール鎖長が生体膜を構成するリン脂質の疎水性尾部よりも短い場合、膜の欠損を引き起こすが、アルカンチオール鎖長がリン脂質の疎水性尾部よりも長い場合、静電引力で粒子に引き付けられたリン脂質の配向が変化する結果、膜の欠損が起こらないことが分かった。以上の結果より、ナノ粒子の表面物性は生体膜への付着・侵入過程を大きく変化させることが明らかとなった。これは、ナノ粒子の表面物性を適切に設計することで、粒子の生体膜への付着・侵入挙動を制御可能であることを意味している。

既往の実験研究において、ナノ粒子は細胞が能動的にナノ粒子を取り込む機構を介さなくても、粒子が細胞膜を直接透過する結果が報告されている。しかしながら、ここまでの解析では、ナノ粒子が生体膜を透過することはなかった。この原因は、上下層の組成が等しい(上下層が対称な)リン脂質2重膜モデルを用いたためであると考えられる。実際の細胞(例えば赤血球)の細胞膜は、細胞内部に面している層に負帯電性リン脂質が多く

分布しており、その組成は不均一であることが知られている。さらに、実際の生細胞系は細胞内外に多くのイオンが存在しており、その濃度も均一ではない。そこでこれらの非対称性が考慮されたモデル生体膜を新たに構築し、生体膜の非対称構造が粒子の侵入・透過挙動に及ぼす影響について解析した。具体的には、Fig. 6 に示す Double Lipid Bilayer (DLB) を新たに提案した。このモデル生体膜においては、負帯電性リン脂質は内側の水分子層に面している層にのみ含有させ、実際の細胞膜組成の不均一性を模擬した。さらに、リン脂質二重層を2つ重ねることで、細胞内外のイオンの濃度の違いを考慮した。

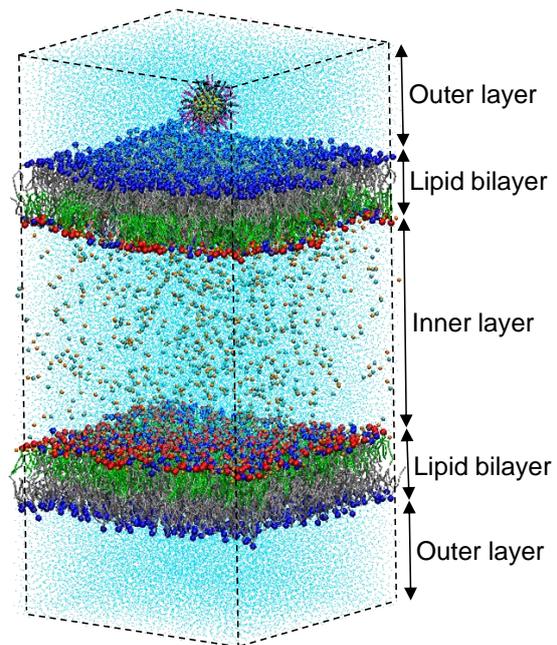


Fig. 6. 提案した計算系 (double lipid bilayer)

Fig. 7 に、不均一構造を持つモデル生体膜に対する正帯電性金ナノ粒子の挙動を示す。膜構造が均一な生体膜においては、生体膜の構造が崩され、膜欠損が見られたが (Fig. 3), 不均一構造のモデル生体膜では粒子が膜内に侵入した直後に形成される一時的な欠陥を、リン脂質分子が再び自己組織化することで修復し、最終的に粒子は生体膜全体を自発的に透過した。その透過メカニズムを詳しく解析したところ、以下に示すような機構であることが明らかとなった。まず、二重膜内層の負帯電性リン脂質分子が粒子表面に吸着

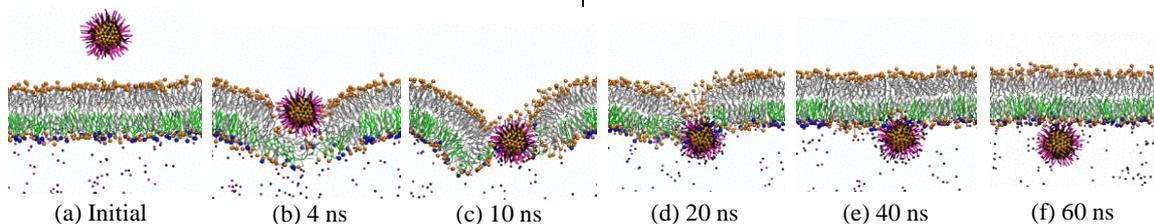


Fig. 7. ナノ粒子の生体膜透過挙動

することで膜内に間隙が生成する。この生成した間隙を通じて、膜内側の水分子層に存在する粒子の対イオンが粒子表面に吸着することにより、粒子表面が静電遮蔽されリン脂質分子と粒子間の静電引力が弱まる。これにより、リン脂質分子が粒子表面から脱離し自己組織化することで間隙が縮小する。その結果、粒子は膜内層を通過し、膜全体を透過することが分かった。本結果は、ナノ粒子の自発的な透過をシミュレートした初めての成果であり、さらに、細胞膜の不均一構造が粒子の膜透過を誘発する重要な要素であることを初めて示した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

- ① 仲村英也, 江端陽一, 綿野哲, 金ナノ粒子のモデル生体膜への侵入挙動: 分子動力学シミュレーションによる解析, 粉体工学会誌, 50, 485-494, 2013, 有

〔学会発表〕(計13件)

- ① Y. Koizumi, H. Nakamura, S. Watano, Effect of Nanoparticle Size on Its Cellular Uptake: Insights from MD simulation, The 7th World Congress on Particle Technology, 2014/05/19, China (発表確定)
- ② H. Nakamura, Y. Koizumi, K. Shimizu, S. Watano, MD Simulation of Nanoparticle Translocation through Model Cell Membranes, The 7th World Congress on Particle Technology, 2014/05/19, China (発表確定)
- ③ 清水健太, 仲村英也, 綿野哲, アルカンチオール修飾金ナノ粒子の生体膜透過現象の分子動力学解析, 日本薬学会第134年会, 2014/03/28, 熊本
- ④ 清水健太, 仲村英也, 綿野哲, ナノ粒子の表面電荷特性が生体膜透過挙動に及ぼす影響, 第16回化学工学学生発表会, 2014/03/01, 大阪
- ⑤ H. Nakamura, Y. Koizumi, Y. Ebashi, S. Watano, Permeation of Monolayer Coated Gold Nanoparticle across Lipid Bilayer, The 5th Asia Pacific Congress on Computational Mechanics & 4th International Symposium on Computational Mechanics, 2013/12/11, Singapore
- ⑥ 小泉雄平, 仲村英也, 綿野哲, 水酸化フラーレンの親水性・疎水性が生体膜透過性に及ぼす影響, 粉体工学会 2013年度秋期研究発表会, 2013/10/08, 大阪
- ⑦ 仲村英也, ナノ粒子-生体膜間相互作用の分子動力学解析, 2013年度第1回・第2回粉体操作に伴う諸現象に関する勉強会, 2013/08/01, 赤穂(招待講演)
- ⑧ 小泉雄平, 仲村英也, 綿野哲, 分子動力学シミュレーションを用いたナノ

粒子-細胞膜間相互作用の解析: C60 フラーレンの親水・疎水性が膜透過性に及ぼす影響, 日本薬学会第133年会, 2013/03/27, 横浜

- ⑨ 江端陽一, 仲村英也, 綿野哲, 表面修飾金ナノ粒子と細胞膜の相互作用の分子動力学シミュレーション, 粉体工学会 2012年度秋期研究発表会, 2012/11/27, 東京
- ⑩ 仲村英也, 江端陽一, 綿野哲, アルカンチオール修飾金ナノ粒子と生体膜の相互作用: 分子動力学シミュレーションによる解析, バイマテリアル学会シンポジウム2012, 2012/11/26, 仙台
- ⑪ 仲村英也, 江端陽一, 野崎 祐介, 綿野哲, 分子動力学シミュレーションを活用した医療用ナノ粒子の設計と細胞膜透過現象の解析, 第29回製剤と粒子設計シンポジウム, 2012/10/25, 豊橋
- ⑫ H. Nakamura, Y. Nozaki, S. Watano, Computer Simulation of Interaction of Functionalized Fullerenes C60(OH)_n with model cell membrane, The 5th Asian Particle Technology Symposium, 2012/07/03, Singapore.
- ⑬ Y. Ebashi, H. Nakamura, S. Watano, Interaction of functionalized Gold Nanoparticles with Lipid bilayer, The 5th Asian Particle Technology Symposium, 2012/07/03, Singapore

6. 研究組織

(1) 研究代表者

仲村 英也 (NAKAMURA, HIDEYA)
大阪府立大学・大学院工学研究科・助教
研究者番号: 00584426