1E01 引張下でのコレステロール含有脂質膜に形成される孔構造の 分子動力学シミュレーション

Molecular Dynamics Simulations of Hydrophilic Pore Structures in DPPC/Cholesterol Bilayers under Tension

学 ○重松 大輝 (阪大) 正 越山 顕一朗 (阪大) 正 和田 成生 (阪大)

Taiki SHIGEMATSU, Osaka University, 1-3 Machikaneyamacho, Toyonaka, Osaka
Kenichiro KOSHIYAMA, Osaka University
Shigeo WADA, Osaka University

Key words : Cell membrane, Drug delivery system, Sonoporation, Ion transport

1. 緒言

細胞膜は両親媒性の性質を持つ脂質分子による二重の薄膜(脂質二重膜)を基本構造としている。この脂質二重膜は細胞の内外を隔て、物質の受動的な膜透過を制限している。しかし、脂質二重膜に対して力学的な負荷がかかると、場合によっては、膜を貫く水分子で満たされた孔構造が形成され、膜透過性が上昇することが知られている。この現象を積極的に利用したものとして、音場や電場を膜に印加することで人為的に膜に孔構造を形成させて、薬剤を細胞内へ効率的に透過させる手法が挙げられる。このような手法を安全かつ効率的に運用するためには、力学的な負荷による孔構造の形成・消滅を詳細に理解することが必要である。しかし、その孔構造の形成・消滅は分子レベルでの膜構造の変化をきっかけとする現象であるため、実験からその様子を直接観察することは難しい。そのため、これまでに分子動力学法を用いたシミュレーションによる研究が行われてきた¹⁻³⁾。例えば、Leontiadou (2007)らの研究³⁾では、膜に対して一定以上の引張を与えなければ孔構造が自ずと消滅することや孔の大きさが孔構造を通過するイオンの流量に影響を与えることが報告されている。しかしながら、これらの研究のほとんどは純粋な脂質二重膜を用いたものであった。実際の細胞膜は、脂質分子だけでなく、コレステロールや膜たんぱく質といった様々な構成要素から成っている。その多様な構成要素の中でも、特にコレステロールは脂質二重膜の力学特性に影響を与えることが報告されており、孔構造の形成・消滅や大きさへの影響があることが予想される。そこで本研究では、孔構造を含んだコレステロール含有脂質二重膜の分子動力学(MD)シミュレーションを行い、特にコレステロールの含有が孔構造の形成・消滅と大きさに与える影響を調べた。

2. 方法

2.1. 計算系

本研究では、脂質分子のジパルミトイルフォスファチジルコリン(DPPC)のみによる純粋な脂質二重膜系(0 mol%)とDPPCとコレステロールによる混合二重膜系を用いる。混合二重膜系については、コレステロールの含有率が20と40 mol%の2種類の系を用いる。脂質二重膜系ではDPPCを200個、混合二重膜系では20 mol%の系はDPPCを160個、コレステロールを40個、40 mol%の系はDPPCを120個、コレステロールを80個含んでいる。系内の膜以外の空間は水分子で満たされており、その水分子の数はDPPCとコレステロールの合計の数の23倍以上になるように定めている⁴⁾。また、これらの系は温度および圧力がそれぞれ323 K、0.1 MPaの状態では平衡化されており、xyz方向(Fig. 1A, E参照)に周期境界を設定している。

2.2. 孔の形成

2.1.で構築した系から初期状態を抽出し、二軸引張シミュレーション⁵⁾を行うことで膜を引張り、膜の面積を任意の値に増加させ、引張を受けた状態の膜構造を得る。ここで、与える面積ひずみがある値より大きいと膜に孔構造が形成される。この孔構造が形成された系に対して、引張と同様の手法を用いて、膜を圧縮し、膜の面積を任意の値に減少させ、孔構造が形成されている状態で引張を受けた膜構造を得る。以上の引張・圧縮シミュレーションの引張過程から膜の面積ひずみが0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4で孔構造が形成されていない状態を、圧縮過程から膜の面積ひずみが0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6で孔構造が形成されている状態を抽出する。この抽出した系に対して、 xy 方向(膜に平行な方向)への系の変形を拘束し、系の温度と z 方向の圧力をそれぞれ323 K、0.1 MPaに維持し、面積一定のMD計算を100 ns行うことで系の安定化をさせる。

2.3. 解析方法

膜を構成する分子を xy 平面へ投影し、それらの分子が存在しない部分を孔の領域とし、その領域の投影面積 A を孔の大きさと定義する。 A を算出するために、まず、系を一辺0.05 nmの立方体ボックスで分割する。ここで、ボックス内部に水分子を構成する原子を含む場合はそのボックスを水領域、DPPCおよびコレステロールを構成する原子を含む場合は膜領域とする。その後、離散ボロノイ分割を行うことにより、いずれの領域にも属していないすべてのボックスを最も距離に近い領域と同じ領域(水または膜領域)に所属させることで、立方体ボックスで分割した系内を水と膜の領域に分ける。ここで分割した系の膜領域のみに着目し、膜領域を xy 平面に投影した場合の膜領域以外の領域の面積を A とする。

3. 結果および考察

すべての系において、引張過程では、膜の面積の増加に伴い、膜部分の厚さが減少し(Fig. 1A, B)、その後、面積がある値を超えると孔構造が形成された。この孔構造が形成された系のうち最小の面積ひずみはコレステロール含有率が0, 20, 40 mol%の系でそれぞれ0.8, 1.2, 1.4となり、コレステロール含有率の増加に伴い増加した。この傾向はマイクロピペット吸引法による実験から報告されているものと一致する⁶⁾。一方、孔構造形成後の圧縮過程においても、面積ひずみの減少に伴い、孔の大きさが減少する様子が確認され(Fig. 1G, H)、やがて孔構造が消滅した。孔構造が消滅した系のうち最大の面積ひずみはコレステロール含有率が0, 20, 40 mol%の系でそれぞれ0.1, 0.2, 0.3となり、コレステロール含有率の増加に伴い増加した。このことから、純粋な脂質二重膜系では孔構造が消滅しない面積ひずみであっても、コレステロール

Fig. 1 Representative snapshots of the DPPC bilayer including 40 mol% cholesterol obtained by the stretching simulations (A, B, E, and F) and by the following compressing simulations (C, D, G, and H) after the pore formation by the stretching simulation. (A - D) are top views and (E - F) are side views. Areal strains are 0.0 (A and E), 0.6 (B, C, F, and G), and 0.4 (D and H). DPPC molecules are shown in black, the cholesterol molecules in gray, hydrogen atoms of the water molecules in black points, and oxygen atoms of the water molecules in white points. The water molecules in top views are not shown for clarity. The white bar in (E) corresponds to 2 nm.

を含むことによって孔構造が消滅する場合があることがわかった。また、すべての系において、孔構造を含まない状態からある面積ひずみまで引張った場合では膜に孔構造が形成されないが(Fig. 1B, F), すでに孔構造を含んだ状態から同じ面積ひずみまで圧縮した場合では孔構造が形成されたままである場合があった(Fig. 1C, G)。さらに、今回行った計算時間(100 ns)の中では、面積一定の条件の下で孔構造が形成されている状態とされていない状態が互に行き来する様子は確認されず、このような孔構造形成にはエネルギー障壁が存在するという熱力学の理論と一致する⁷⁾。

次に、それぞれのコレステロール含有率・面積ひずみでの A を計算した結果を Fig. 2 に示す。すべてのコレステロール含有率の系において、孔構造が形成されている状態では、面積ひずみの増加に伴い、 A は線型的に増加していることがわかる。一方で、すべての系で孔構造が形成されている面積ひずみが 0.4 以上での結果を見ると、同じ面積ひずみの状態ではコレステロール含有率が大きい系ほど A が小さいことがわかる。

4. まとめ

コレステロールの含有が脂質二重膜中での孔構造の形成・消滅と大きさに与える影響を調べるために、孔構造を含んだコレステロール含有脂質二重膜の MD シミュレーションを行った。コレステロール含有率の増加に伴い、膜に孔構造が形成するときの面積ひずみだけでなく、孔構造が消滅するときの面積ひずみも大きくなることがわかった。さらに、孔構造を含まない状態からある面積ひずみまで引張った場合では膜に孔構造が形成されないが、すでに孔構造を含んだ状態から同じ面積ひずみまで圧縮した場合では孔構造が形成されたままである場合があった。また、今回調べた面積ひずみの範囲(0.1 - 0.6)では、膜全体での面積ひずみの増加に伴い、孔の大きさは線型的に増加し、また、同じ面積ひずみの状態ではコレステロール含有率が大きい系ほど、孔の大きさは小さいことがわかった。

Fig. 2 The relationship between the areas of the pore projected on the xy plane and the corresponding areal strains.

謝辞

本研究は一部、JSPS 科研費(24240073, 236860310)および文部科学省ハイブリッド医工学基盤創生プロジェクトの援助を受けた。

参考文献

- (1) H. Leontiadou et al., Biophys. J. 86, 2156 (2004).
- (2) S. K. Kandasamy and R. G. Larson, J. Chem. Phys. 125, 074901 (2006).
- (3) H. Leontiadou et al., Biophys. J. 92, 4209 (2007).
- (4) C. Hofsaß et al., Biophys. J. 84, 2192 (2003).
- (5) K. Koshiyama and S. Wada, J. Biomech. 44, 2053 (2011).
- (6) D. Needham and R. S. Nunn, Biophys. J. 58, 997 (1990).
- (7) T. V. Tolpekina et al., J. Chem. Phys. 121, 12060 (2004).