J0240103

引張下のコレステロール含有リン脂質二重膜中での $L_{\beta}I$ 相形成の 分子動力学シミュレーション：力学的要因による溶血現象の解明に向けて

重松 大輝^{*1}, 越山 顕一朗^{*1}, 和田 成生^{*1}

Molecular Dynamics Simulation of $L_{\beta}I$ Phase Formation in Stretched Phospholipid/Cholesterol Bilayer: Toward Understanding Mechanical Hemolysis

Taiki SHIGEMATSU^{*1}, Kenichiro KOSHIYAMA^{*1}, and Shigeo WADA^{*1}^{*1} Graduate School of Engineering Science, Osaka University
Machikaneyamacho 1-3, Toyonaka, Osaka, 560-8531 Japan

We have performed molecular dynamics simulations of phospholipid bilayers under stretching, in order to understand the detailed mechanisms of rupture of red blood cell membranes (hemolysis). In this study, we performed unsteady and quasistatic stretching simulations for phospholipid/cholesterol bilayers, which are expressed by applying the equibiaxial stretching algorithm that is the proportional scaling of both the atom positions and the system box lengths. We investigated the effects of the stretching speed on (i) the critical areal strain where the rupture occurs, (ii) the relationships between the tension and the areal strain of the bilayer, and (iii) the stretch-induced phase transition from L_O to $L_{\beta}I$ phase, in the cholesterol-including bilayers. We found that the critical areal strain in the unsteady stretching simulations are larger than that in the quasistatic stretching simulations, in agreement with previous experimental observations. In both the stretching simulations, the tension of the bilayer non-monotonically changes with the increase of the areal strain. The tendency of the relationship between the tension and the areal strain is insensitive to the stretching speed. The non-monotonic relationship between the tension and areal strain of phospholipid/cholesterol bilayers is significantly different from the monotonic one of pure phospholipid bilayers reported in our previous study. From the visual inspection of the snapshots of the stretched bilayers focusing on the orientation of the phospholipid molecules and the bilayer thickness, the phase transition from L_O to $L_{\beta}I$ phase is observed in both the stretching simulations.

Key Words : Interdigitated phase, Red blood cell, DPPC, Rupture, Stretching speed

1. 結 言

赤血球膜が非生理的な力学的負荷にさらされることで破断し、内部のヘモグロビン等が赤血球外に流出する現象を溶血⁽¹⁾という。この溶血の詳細なメカニズムの解明のために、過去様々な実験⁽²⁻⁵⁾が行われてきた。それらの実験により、例えば、膜に与える力学的負荷の速さが大きいほど膜の破断に必要な負荷が大きくなることが明らかにされている⁽⁴⁾。しかし、膜の破断は膜を構成する分子の局所的な再配列が引き金となる進行が非常に速い現象であるため、膜の破断の詳細を実験的な手法により直接捉えることは難しく、これらの実験報告⁽²⁻⁵⁾の背後にある分子レベルのメカニズムの詳細は未だ明らかになっていない。そこで、我々は、細胞膜の基本構造である脂質二重膜に対して引張を与える分子動力学 (MD) シミュレーションを行い、膜の破断の分子レベルでのメカニズムについて調査してきた^(6,7)。例えば、リン脂質分子のみから成る脂質二重膜に対して準静的および動的な引張を与えるシミュレーションを行い、実験報告と同様に、動的な引張を与えた場合の方が膜が破断したときに膜が受けている面積ひずみ（破断面積ひずみ）が大きいことを明らかにした⁽⁶⁾。また、実際の赤血球の脂質二重膜中にはコレステロールが豊富に存在することから、コレステロールを含有した脂質二重膜に対して準静的な引張を与え

^{*1} 正員, 大阪大学 大学院基礎工学研究科 (〒560-8531 大阪府豊中市待兼山町 1-3)
E-mail: t.shigematsu@biomech.me.es.osaka-u.ac.jp

るシミュレーションを行い、コレステロールを含まない膜と比較して破断面積ひずみが大きくなること、および、引張を受けることによって膜の相状態が二層構造である L_o 相からそれぞれの層が互いに噛み合い単層構造となった L_d 相に転移することを明らかにした⁷⁾。本発表では、実際の赤血球膜の構成を模したコレステロール含有脂質二重膜に対して、準静的および動的な引張を与える MD シミュレーションを行い、引張速さの違いがコレステロール含有脂質二重膜での (i) 破断面積ひずみ、(ii) 膜張力と膜の面積ひずみの関係、(iii) 引張による相転移に与える影響について調べた結果を報告する。

2. 方 法

2・1 計算系

本研究では、リン脂質分子のジパルミトイルフォスファチジルコリン (DPPC) とコレステロールによる混合脂質二重膜系を用いる。直方体の計算系を用い、系の xyz 方向に周期境界条件を設定する。 xy 平面に膜を設置し、系内の膜部分以外は水分子で満たす。系は DPPC128 個、コレステロール 86 個、そして水分子 13842 個で構成され、温度および圧力がそれぞれ 323 K および 0.1 MPa の状態で安定化されている。ここで、膜のコレステロール含有率は 40 mol% となっており、実際の赤血球膜でのコレステロール含有率と同程度となっている。

2・2 引張シミュレーション

2・1 節において構築した系から初期状態を抽出して、それらに対して非定常および準静的引張シミュレーションを行う。非定常引張シミュレーションは Koshiyama and Wada の方法⁶⁾を用いて行う。系の一辺の長さ l_i ($i = x, y, z$) と系内のすべての原子の座標 $\mathbf{r}$ を係数 μ を用いて μl_i および $\mu \mathbf{r}$ に比例的に変化させることで動的な引張を表現する。ここでは二軸引張を膜に与えるので、 x, y 方向には

$$\mu = 1 + \frac{c}{l_i} \Delta t \quad (1)$$

を用いて値を変換する。ここで、 Δt は時間ステップ、 c は引張速さを表す。ここで引張速さは 0.05 m/s とする。この値はピペット吸引実験に代表される赤血球の引張実験^(2,4)において用いられる引張速さより遥かに速いと見積もられるが、計算機の限界からこの値を用いる。 z 方向には、Berendsen の圧力制御⁸⁾を行い、

$$\mu = 1 - \frac{\beta \Delta t}{3\tau_p} \{P_0 - P(t)\} \quad (2)$$

を用いて系の z 方向の圧力を $P_0 = 0.1$ MPa に保つよう、 z 方向の系の長さ l_z と原子の z 座標を変換する。ここで時定数 $\tau_p = 0.5$ ps、等温圧縮率 $\beta = 4.5 \times 10^{-10}$ Pa⁻¹ とする。また、同時に系の温度を 323 K に維持する。以上により、膜に対して x, y 方向に引張を与えつつ、 z 方向には自由に収縮できるような状態を再現できるようになる。

準静的引張シミュレーションでは、2・3 で定義する膜の面積ひずみ ε_A が任意の値をとる状態の系を非定常引張シミュレーション中から抽出し、初期状態として用いる。それらの系の x, y 方向への変形を拘束し、非定常引張シミュレーション時と同様の手法で系の温度および z 方向の圧力をそれぞれ 323 K および 0.1 MPa に維持した状態で、MD 計算を 100 ns 以上行うことで準静的な引張を表現する。

分子レベルでの膜の破断は統計的な現象であるため⁹⁾、非定常引張シミュレーションは初期状態を変えて 3 回行う。同様の理由から、準静的引張シミュレーションにおいても、先行研究⁷⁾から膜の破断が起きうると予想される面積ひずみである $\varepsilon_A = 1.2, 1.4$ の場合に対して、初期状態を変えて 3 回シミュレーションを行う。

2・3 解析方法

膜が受けている引張の程度を表す指標として、膜の面積ひずみ ε_A を

$$\varepsilon_A = \frac{A}{A_0} - 1 \quad (3)$$

と定義する。ここで、 A および A_0 はそれぞれ引張中における系の xy 平面の面積および引張前の平衡状態における平均の xy 平面の面積とする。膜の面積ひずみの増加に伴って発生する膜張力 γ を

Fig. 1 The representative snapshots of DPPC/cholesterol bilayers before stretching (A), under unsteady stretching (US) (B-D) and quasistatic stretching (QS) (E-H) simulations. The areal strains of the bilayers are 0.0 (A), 0.4 (A and E), 0.6 (C and F), 1.0 (D and G), and 1.4 (H). The DPPC headgroups are shown in red, the DPPC tails in orange, and the cholesterol molecules in green. The water molecules are not shown for clarity. The white bar in the panel (H) corresponds to 2 nm.

$$\gamma = - \left(\frac{p_x + p_y}{2} - p_z \right) l_z \quad (4)$$

と定義する．ここで p_i ($i=x,y,z$) は系の各方向に垂直な面にかかる圧力であり，それぞれの方向への運動量とビリアルから算出する⁽¹⁰⁾．

3. 結果および考察

3・1 破断面積ひずみ

図1に非定常および準静的引張シミュレーション中における膜のスナップショットの一例を示す．非定常および準静的引張シミュレーションともに，引張による面積ひずみの増加に伴い，膜の厚さが減少していき（図1, A-DおよびA, E-G），やがて膜の面積ひずみがある値を超えると，膜が破断した（図1H）．3回行った非定常引張シミュレーションでは，破断面積ひずみがそれぞれ1.43, 1.69, 1.57となった．一方，準静的引張シミュレーションでは，面積ひずみが1.4で3回行ったシミュレーション中3回で膜の破断が起こったのに対して，面積ひずみが1.2の場合での3回を含む，面積ひずみが1.2以下のすべてのシミュレーションで膜の破断は起こらなかった．このことから，準静的引張シミュレーションでは，破断面積ひずみが1.2から1.4の間に存在すると考えられる．以上から，コレステロールを含む膜において，準静的に引張を与えた場合よりも動的に引張を与えた場合の方が破断面積ひずみが大きくなることが分かった．この傾向は過去の実験⁽⁴⁾およびシミュレーション結果⁽⁶⁾と定性的に一致する．

3・2 膜張力と面積ひずみの関係

図2に非定常および準静的引張シミュレーションにより得られた膜張力と面積ひずみの関係の一例を示す．非定常引張シミュレーションにおいては，引張による面積ひずみの増加に伴い，非線形的に張力が変化した．面積ひずみの増加に伴い，張力は増加し，面積ひずみが0.1程度でピークを示した．ピーク到達後においては，面積ひずみの増加に伴い，張力は減少し，面積ひずみが0.9程度から再び増加し始めた．その後，面積ひずみがある値を超えたところで，膜が破断し，張力が急激に減少した．ここでは張力の急激な減少は面積ひずみが1.4程度で起こった．以上の非定常引張シミュレーションから得られた膜張力の一連の変化をその特徴から，面積ひずみが0.0から0.1, 0.1から0.9, 0.9から1.4, そして1.4以上の合計4つの区間に分け，それぞれ区間I, II, III, IVと呼ぶ．準静的引張シミュレーションにおいては，おもに区間IIで非定常引張シミュレーションと比べて張力の値が小さいが，それぞれの区間において非定常引張シミュレーションと同様の傾向が見られた．コレステロールを含まない脂質二重膜では，膜の面積ひずみの増加に伴い，膜張力が単調に増加し，膜の破断と同時に張力が急激

Fig. 2 The representative relationships between tension γ and areal strain ε_A of the bilayer in the unsteady stretching (black curve) and quasistatic stretching (circle) simulations. The values of γ in the unsteady stretching simulations are smoothed by taking running average for clarity.

に減少することが報告されており⁽⁶⁾，ここで得られた膜張力と面積ひずみの関係とその傾向が異なる．このことから，コレステロールの含有は膜張力と面積ひずみの関係に対して大きく影響することが明らかになった．

3・3 引張による相転移

非定常および準静的引張シミュレーション中におけるコレステロール含有脂質二重膜の相転移について明らかにするために，各区分での膜構造のスナップショットを調べた．準静的引張シミュレーションにおいては，引張前および区分 I においては，膜は明確な二層構造をとり，DPPC とコレステロールは膜面に垂直な方向に配向しているため（図 1A）， L_o 相と呼ばれる相状態になっていると考えられる⁽¹¹⁾．一方，区分 III では，膜のそれぞれの層の分子が互いに噛み合い，さらにリン脂質分子が膜に垂直な方向に配向していることから（図 1G）， $L_{\beta I}$ 相と呼ばれる相状態になっていると考えられる⁽¹²⁾．このことから，引張に伴って膜が L_o 相から $L_{\beta I}$ 相へと相転移したと考えられる．非定常引張シミュレーションにおいては，準静的引張シミュレーションと比べ，区分 II および III での DPPC とコレステロールの配向方向に乱れがあるものの，同様の傾向が得られた（図 1D）．以上から，コレステロール含有脂質二重膜の引張による L_o 相から $L_{\beta I}$ 相へと相転移は，静的な引張下だけでなく動的な引張下においても起こりうることを示唆された．また，膜張力の変化により定義した区分ごとで膜の相状態が異なっていることから，ここで得られた膜張力と面積ひずみの関係（図 2）と膜の相転移には密接な関係があることが推測された．

4. まとめ

本研究では，実際の赤血球膜の構成を模したコレステロール含有脂質二重膜に対して，準静的および動的に引張を与える MD シミュレーションを行い，引張速さの違いがコレステロール含有脂質二重膜での (i) 破断面積ひずみ，(ii) 膜の面積ひずみと膜張力の関係，(iii) 引張による相転移に与える影響を調べた．その結果，コレステロールを含む膜においても，動的に引張を与えた場合の方が準静的に引張を与えた場合より破断面積ひずみが大きいことが分かった．また，脂質二重膜へのコレステロールの含有は，膜の面積ひずみと膜張力の関係の傾向を大きく変化させることが分かった．さらに，準静的な引張下で確認されていたコレステロールを含む膜の L_o 相から $L_{\beta I}$ 相へと相転移は動的な引張下でも生じることが示唆された．

謝 辞

本研究は一部, JSPS 科研費(24240073, 23686031)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

文 献

- (1) Paul, R., Apel, J., Klaus, S., Schügner, F., Schwindke, R., and Reul, H., "Shear stress related blood damage in laminar couette flow", *Artificial Organs*, Vol. 27, No. 6 (2003), pp. 517-529.
- (2) Mohandas, N. and Evans, E., "Mechanical properties of the red cell membrane in relation to molecular structure and genetic defects", *Annual Reviews Biophysics and Biomolecular Structure*, Vol. 23, (1994), pp. 787-818.
- (3) Evans, E., Waugh, R., and Melnik, L., "Elastic area compressibility modulus of red cell membrane", *Biophysical Journal*, Vol. 16, No. 6 (1976), pp. 585-595.
- (4) Evans, E., Heinrich, V., Ludwig, F., and Rawicz, W., "Dynamic tension spectroscopy and strength of biomembranes", *Biophysical Journal*, Vol. 85, No. 4 (2003), pp. 2342-2350.
- (5) Li, F., Chan, C.U., and Ohl, C.D., "Yield strength of human erythrocyte membranes to impulsive stretching", *Biophysical Journal*, Vol. 105, No. 4 (2013), pp. 872-879.
- (6) Koshiyama, K. and Wada, S., "Molecular dynamics simulations of pore formation dynamics during the rupture process of a phospholipid bilayer caused by high-speed equibiaxial stretching", *Journal of Biomechanics*, Vol. 44, No. 11 (2011), pp. 2053-2058.
- (7) Shigematsu, T., Koshiyama, K., and Wada, S., "Molecular dynamics simulations of pore formation in stretched phospholipid/cholesterol bilayers", *Chemistry and Physics of Lipids*, Vol. 183, (2014), pp.43-49.
- (8) Berendsen, H.J.C., Postma, J.P.M., van Gunsteren, W.F., DiNola, A., and Haak, J.R., "Molecular dynamics with coupling to an external bath", *The Journal of Chemical Physics*, Vol. 81, No. 8 (1984), pp. 3684-3690.
- (9) Koshiyama, K., Yano, T., and Kodama, T., "Self-Organization of a Stable Pore Structure in a Phospholipid Bilayer", *Physical Review Letters*, Vol. 105, No. 1 (2010), 018105.
- (10) Chiu, S.W., Clark, M., Subramaniam, S., Scott, H.L., and Jakobsson, E., "Incorporation of surface tension into molecular dynamics simulation of an interface: a fluid phase lipid bilayer membrane", *Biophysical Journal*, Vol. 69, No. 4 (1995), pp. 1230-1245.
- (11) Sankaram, M.B. and Thompson, T.E., "Cholesterol-induced fluid-phase immiscibility in membranes", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 88, No. 19 (1991), pp. 8686-8690.
- (12) Slater, J.L. and Huang, C., "Interdigitated bilayer membranes", *Progress in lipid research*, Vol. 27, No. 4 (1988), pp. 325-359.