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

Penetration of Gold Nanoparticle into Model Biological Membrane : MD Simulation Study

仲村 英也*, 江端 陽一, 綿野 哲

Hideya Nakamura, Yoichi Ebashi, Satoru Watano

Received 21 March 2013; Accepted 31 May 2013

This paper presents molecular dynamics (MD) simulations of penetration behavior of gold nanoparticles into a model biological membrane (lipid bilayer). Gold nanoparticles functionalized with alkanethiol ligands having different charge properties and different alkyl chain lengths were used as model particles. Effects of the particle surface properties on the nanoparticle penetration behavior into a lipid bilayer were investigated. The simulation results showed that the neutral and negatively charged gold nanoparticles did not penetrate into the lipid bilayer, while a positively charged gold nanoparticle spontaneously penetrated into the lipid bilayer and highly disrupted original structure of the lipid bilayer. However, positively charged gold nanoparticles modified by longer alkyl chain than that of lipid molecules were internalized into hydrophobic interior of the lipid bilayer without any disruption of the lipid bilayer. The simulation results can provide insight into design of the nanoparticles at molecular level to achieve various bio-applications of the gold nanoparticles.

Keywords: Gold nanoparticle, Lipid bilayer, Nanoparticle-cell interaction, MD simulation

1. 緒 言

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積極的に検討されているナノ粒子の一つである¹⁾。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。したがって、“金ナノ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最も本質的で重要な課題である。特に粉体

工学の観点においては、粒子と生体膜との相互作用に対する粒子表面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、例えば、文献番号2~10) などがある。これらによると、細胞への金ナノ粒子の取り込み経路は、エンドサイトーシスのような細胞内の生化学反応によって生じるエネルギーを利用する取り込み経路（エネルギー依存型の取り込み経路）^{5, 7, 8)}、もしくは、粒子が生体膜を直接侵入・透過することで細胞内へと取り込まれる経路（エネルギー非依存型の取り込み経路）^{4, 6, 7)}の2種類に大きく大別できる。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非常に難しい。さらに、実験的手法では金ナノ粒子と生体膜の界面で起こ

粉体工学会2012年度秋期研究発表会 BP 賞受賞研究
大阪府立大学 大学院工学研究科 化学工学分野
(〒599-8531 大阪府堺市中区学園町 1-1)
Department of Chemical Engineering, Osaka Prefecture
University
(1-1, Gakuen-cho, Naka-ku, Sakai, Osaka 599-8531, Japan)
* 責任著者連絡先 hnakamura@chemeng.osakafu-u.ac.jp

る微視的な現象を捉えることは困難である。この場合、微視的な現象を分子レベルで考察することが可能な分子動力学 (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。

生体膜の基本構造は両親媒性分子であるリン脂質から構成されるリン脂質二重膜である。これまでに、リン脂質二重膜に関する MD シミュレーションモデルが主に計算化学や生物物理の分野において開発されてきた¹¹⁾。これらのシミュレーションモデルを応用して、種々のナノ材料とリン脂質二重膜との相互作用に関する MD シミュレーションを行い、エネルギー非依存型の取り込み経路を解析する試みが報告され始めている。例えば、フラーレンやカーボンナノチューブ¹²⁾、デンドリマー¹³⁾等の有機ナノ材料を対象とした研究に端を発し、ここ最近では無機結晶ナノ粒子とリン脂質二重膜との相互作用に関する研究が報告され始めており、粒子のサイズ¹⁴⁾、形状^{15, 16)}、表面電荷^{16, 17)}、親疎水性¹⁸⁾などの影響について解析した結果が報告され始めている。さらに、無機結晶ナノ粒子表面をリガンド^{19, 20)}や核酸分子²¹⁾で修飾したより複雑なナノ粒子をモデル化し、これとリン脂質二重膜との相互作用に関する MD シミュレーションも報告され始めている。しかしながら、金ナノ粒子に関する報告は少なく、特に粉体工学の観点において重要となる粒子表面物性の影響については十分な検討がなされていない。

そこで本研究では、MD シミュレーション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することを試みた。具体的には、本研究では取り扱う現象をエネルギー非依存型の取り込み経路に限定し、その中でも粒子がモデル生体膜内に付着・侵入する過程をシミュレートした。モデル粒子として、金ナノクラスター表面にアルカンチオールが化学結合したナノ粒子を用いた。本研究では特に、粒子の表面電荷特性および修飾分子である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。

2. 計算手法

2. 1 粗視化分子動力学シミュレーション

本研究で必要となる計算領域はナノ粒子を含む比較的大きな計算領域 (一辺約 20nm の 3 次元立方体) であり、通常的全原子分子動力学法では計算負荷が極めて高くなり実質的にはシミュレーションを行うことができない。そこで本研究では、計算手法として粗視化分子動力学法を用いた。その中でも特に、リン

脂質二重膜の計算モデルとして広く用いられている MARTINI 粗視化モデル²²⁾を採用した。MARTINI 粗視化モデルでは、基本的に水素原子を除く 4 つの原子群が 1 つの相互作用点 (粗視化サイト) で粗視化され、系全体の分子の挙動は個々の粗視化サイトについて以下の運動方程式を解くことで求められる：

$$m_i \frac{d^2 \mathbf{X}_i}{dt^2} = -\frac{\partial \mathbf{U}_i}{\partial \mathbf{X}_i} \quad (1)$$

ここで、 m_i は粗視化サイト i の質量 [kg]、 $\mathbf{X}_i$ は粗視化サイト i の位置ベクトル [m]、 t は時間 [s]、 $\mathbf{U}_i$ は粗視化サイト i に作用する全ポテンシャル [J/mol] である。本研究では、運動方程式の数値積分手法として Leap-frog 法を用いた。個々の粗視化サイトに作用するポテンシャルには、非結合ポテンシャルとして Lennard-Jones (LJ) ポテンシャル U_{LJ} [J/mol] およびクーロンポテンシャル U_c [J/mol] を、結合ポテンシャルとして原子間の共有結合ポテンシャル U_b [J/mol] および結合鎖の剛性を表すポテンシャル U_a [J/mol] が考慮される²²⁾：

$$U_{LJ} = 4\epsilon_{ij} \left\{ \left(\frac{\sigma_{ij}}{r} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r} \right)^6 \right\} \quad (2)$$

$$U_c = \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0\epsilon_r r} \quad (3)$$

$$U_b = \frac{1}{2} K_b (r - r_0)^2 \quad (4)$$

$$U_a = \frac{1}{2} K_a (\cos \theta - \cos \theta_0)^2 \quad (5)$$

ここで、 r は粗視化サイト間の距離 [m]、 θ は結合している 3 つの粗視化サイトがなす角度 [°] を表す。その他の変数は原子種または結合種に応じて定義されるパラメータである。LJ ポテンシャルおよびクーロンポテンシャルの計算の際はカットオフ処理を行い、そのカットオフ距離は両ポテンシャルとも 1.2 nm²²⁾とした。ここで、クーロンポテンシャルに関しては Particle Mesh Ewald 法²³⁾による計算も行い、カットオフ距離以上で作用する長距離クーロンポテンシャルも考慮した。

2. 2 分子モデル

Fig. 1 に本研究で用いた計算系を示す。リン脂質二重膜が上下の水分子層で水和されているものをモデル生体膜として用いた。金ナノ粒子の初期位置は上層の水分子層に設定し、計算開始とともに粒子 1 個を自由拡散させ、その際に、粒子がリン脂質二重膜に付着・

Fig. 1 Overall view of simulated system

侵入する挙動をシミュレートした。

用いたリン脂質二重膜は電氣的に中性なリン脂質および負帯電性リン脂質の2成分で構成し、一般に負に帯電している実際の細胞膜の電荷特性を模擬した。電氣的中性リン脂質としてジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC) を、負帯電性リン脂質としてジパルミトイルホスファチジルグリセロール (DPPG) を用いた。リン脂質二重膜の上下層の組成は等しいものとした。Fig. 2 にモデル生体膜を構成する各分子の粗視化モデル²²⁾の模式図を示す。各リン脂質の親水性頭部およびグリセロール骨格はそれぞれ2個の粗視化サイトでモデル化され、疎水性尾部は4個の粗視化サイトでモデル化される。DPPC に関してはその頭部を正および負電荷サイトでモデル化する一方、DPPG に関しては頭部を中性および負電荷サイトでモデル化することで、それぞれのリン脂質の電荷特性を表現した。水分子に関しては、4つの水分子が1つの粗視化サイトでモデル化される。ここで、Particle Mesh Ewald 法を適用するためには、計算系全体を電氣的に中性に

Fig. 2 Coarse grained model of lipids, water, and sodium ion

しなければならない。そこで、水分子層にナトリウムイオンを対イオンとして必要量加えて、計算系全体を電氣的に中性とした。ナトリウムイオンに関しては、1つのナトリウムイオンが1つの粗視化サイトでモデル化される。

一般に金ナノ粒子を医療応用に用いる場合、機能性を付与するために粒子表面は種々の分子で修飾される。そこで本研究では、実験研究^{2, 3, 7, 9)}においても広く用いられている、アルカンチオールが修飾分子として金ナノ粒子表面に化学結合した粒子を計算に用いた (Fig. 3)。コア粒子として、面心立方格子状に金原子を配置した切頂八面体形態を有したものをを用い、金原子数は314個とした。粒子は以下の手順でモデル化した。はじめに、コア粒子の安定な結晶構造を計算した。まず、面心立方格子状に金原子を配置して立方体形状のコア粒子を作り (Fig. 3 (a)), これを切り出すことで金原子数314個の切頂八面体コア粒子を得

Fig. 3 Modeling procedure of gold nanoparticle (Au-NP) functionalized with alkanethiols

Table 1 Alkanethiol modified gold nanoparticles used in this study

Gold nanoparticle	Alkanethiol	Number of alkanethiols (calc.) [–]	Functional terminal group	Coverage ratio of functional group [–]	Distance between adjacent alkanethiols (ave.) [nm]	Morphology of alkanethiol layer
Au-C8-P	C ₈ H ₁₇ SH	120	Plain	0	0.54	Homogeneous
Au-C8-C70	C ₈ H ₁₇ SH	120	COO [–]	0.7	0.55	Random
Au-C8-N10	C ₈ H ₁₇ SH	120	NH ₃ ⁺	0.1	0.54	Random
Au-C8-N30	C ₈ H ₁₇ SH	120	NH ₃ ⁺	0.3	0.55	Random
Au-C8-N70	C ₈ H ₁₇ SH	120	NH ₃ ⁺	0.7	0.57	Random
Au-C16-N70	C ₁₆ H ₃₃ SH	120	NH ₃ ⁺	0.7	0.75	Random
Au-C24-N70	C ₂₄ H ₄₉ SH	120	NH ₃ ⁺	0.7	0.97	Random

た。次に、切り出したコア粒子の安定な結晶構造を、モンテカルロ (MC) シミュレーションにより計算した (Fig. 3 (b))。この際、ポテンシャル関数として結晶中の金属原子に関する多体ポテンシャル関数²⁴⁾を用いた。最終的に得られたコア粒子の直径は 2.2 nm であった。次に、アルカンチオール分子で表面が覆われた粒子の構造を MD シミュレーションにより計算した (Fig. 3 (c))。具体的には、アルカンチオールのみを含む溶媒中にコア粒子 1 個が分散したものを初期状態とし、計算系全体の温度を増減させながら安定構造を探索する Simulated Annealing 法を適用した MD シミュレーション²⁵⁾を行い、エネルギー的に最も安定な被覆構造を計算した。この際、コア粒子は剛体分子として取り扱った。すなわち、モンテカルロ計算で得た安定な結晶構造を保つようにすべての金原子の並進運動に拘束条件を与え、この拘束条件付きの運動方程式を解くことでコア粒子の運動を計算した。数値計算法としては LINCS 法²⁶⁾を用いた。アルカンチオール分子は united atom モデルでモデル化し、金-硫黄原子間には Morse ポテンシャルを、その他の原子間相互作用には LJ ポテンシャルをそれぞれ適用した。この際の力場パラメータは既出のものを用いた²⁵⁾。最後に、得られたアルカンチオール修飾金ナノ粒子の構造を粗視化し、生体膜との粗視化シミュレーションに用いる粒子を得た (Fig. 3 (d))。粗視化の際は、金原子および硫黄原子に関しては 1 個の原子を 1 個の粗視化サイトでモデル化し、アルカンチオールの炭素鎖に関してはリン脂質の疎水性尾部と同様の粗視化を行った。また、金原子および硫黄原子からなるコア粒子は剛体分子として取扱い、アルカンチオールの炭素鎖はフレキシブルな分子として取り扱った。正帯電もしくは負帯電した金ナノ粒子をモデル化する際は、ランダムに選択したアルカンチオールの末端の粗視化サイト (C1) を正荷電サイト (Qd) もしくは負荷電サイト

Table 2 Well depth ϵ and collision diameter σ used in this study(a) Interaction matrix²²⁾

	Qd	Qa	Q0	P4	Na	N0	C5	C1
Qd	I	0	II	0	I	IV	V	IX
Qa	0	I	II	0	III	IV	V	IX
Q0	II	II	IV	0	III	IV	V	IX
P4	0	0	0	I	III	IV	V	VIII
Na	I	III	III	III	III	IV	IV	VI
N0	IV	IV	IV	IV	IV	IV	IV	VI
C5	V	V	V	V	IV	IV	IV	V
C1	IX	IX	IX	VIII	VI	VI	V	IV

(b) ϵ and σ in Lennard-Jones potential function²²⁾

Interacton level	ϵ [kJ/mol]	σ [nm]
0	5.6	0.47
I	5.0	0.47
II	4.5	0.47
III	4.0	0.47
IV	3.5	0.47
V	3.1	0.47
VI	2.7	0.47
VII	2.3	0.47
VIII	2.0	0.47
IX	2.0	0.62

(Qa) で置換した (Fig. 3 (e))。ここで、Qd および Qa サイトは、MARTINI 粗視化モデルにおいてはそれぞれアンモニウム基およびカルボキシレート基を表現する粗視化サイトとして用いられている。さらに、置換する粗視化サイトの割合を変化させることで、異なる表面電荷密度を持つ金ナノ粒子をモデル化した。**Table 1** に本計算で用いた粒子の主な物性を示す。表面電荷極性、表面電荷密度、およびアルカンチオール鎖長の異なる 7 種類の粒子を用いた。

本研究では、リン脂質二重膜を精度よく計算できる MARTINI 力場²²⁾に従い各粗視化サイト間のポテンシャル関数のパラメータを定義し計算を行った。**Table 2**

Table 3 Simulation conditions

Temperature	[K]	323
Pressure	[Pa]	10 ⁵
Number of lipid molecules	[—]	1152
DPPC mole fraction	[—]	0.7
DPPG mole fraction	[—]	0.3
Number of water sites	[—]	46080
Number of gold nanoparticle	[—]	1
Calculation time step	[fs]	15
Total simulation time	[ns]	150

に用いた LJ ポテンシャルに関する力場パラメータを示す。

計算は 3 次元領域で行い、全方向に周期境界条件を適用した。温度および圧力を一定とする NPT アンサンブル下で計算を行い、温度および圧力の制御には Berendsen 法²⁷⁾を用いた。主な計算条件を **Table 3** に示す。ここで、本研究における計算時間は 150 ns であり、これは実際の実験において観察される細胞へのナノ粒子取り込み時間の一般的なスケールと比べて著しく短いものである。ここで、実験で観察される粒子取り込み時間は、粒子の細胞膜付近までの拡散、膜への付着・侵入・透過、その後の細胞質への粒子放出といった複数の素過程に要した総時間であると考えることができる。この内、本研究では、単一のナノ粒子が細胞膜表面近傍まで移動してきた後に、生体膜に付着・侵入する過程に限定し計算を行った。したがって、100 ns スケールでも対象とする過程は解析可能であると考えてシミュレーションを行った。計算は分子

シミュレーションのフリーソフトウェアパッケージである GROMACS²⁸⁾ (ver. 4.0.7) を用いて行った。

3. 結果および考察

3. 1 粒子の表面電荷極性および電荷密度の影響

Fig. 4 に表面電荷極性および電荷密度が異なる金ナノ粒子を用いた場合の計算結果のスナップショットを示す。図は全てシミュレーション時間 150 ns における結果であり、DPPG に作用する全ポテンシャルエネルギーの経時変化からこの時間では計算系は平衡状態となっていることを確認している。また、図は生体膜に対して垂直な方向の断面図を示す。結果より、電気的に中性および負帯電性の粒子は生体膜表面に付着しなかったが (**Fig. 4 (a)** および (**b)**), 正帯電性の金ナノ粒子は生体膜に自発的に付着・侵入することが分かった (**Fig. 4 (c)–(e)**)。これは、負帯電性の生体膜に、正帯電性金ナノ粒子が静電引力によって引き付けられたためであると考えられる。既往の実験研究において、表面電荷極性の異なる金ナノ粒子の生細胞の取り込み量を検討した結果、正帯電性金ナノ粒子は中性および負帯電性の金ナノ粒子と比較して細胞膜表面への付着量および細胞内への取り込み量が顕著に多いことが報告されている^{8, 9)}。したがって、本シミュレーション結果は、既往の実験結果と傾向は一致しているといえる。

次に、正帯電粒子の表面電荷密度の影響について検討した。その結果、正帯電量が低い場合 (**Fig. 4 (c)** および (**d)**), 金ナノ粒子は生体膜表面に付着した後、

Fig. 4 Snapshots of interactions of gold nanoparticles having different surface charge sign and cationic charge densities with lipid bilayer at the end of 150 ns simulation. Snap shots are cross section view (depth=2.0 nm) on membrane normal-direction. Water sites are not shown for clarity.

Fig. 5 Number of water passed across membrane at different cationic surface charge densities

リン脂質二重膜の上層内部へと侵入するが、下層の構造を乱すことはなく、最終的に粒子の一部が二重膜の上層に埋没したような形態をとり、膜全体の構造は大きくは変化しなかった。しかしながら、正帯電量が高い場合 (Fig. 4 (e)), 粒子はリン脂質二重膜の元の構造を大きく変化させ、最終的には粒子近傍において膜を破断することが分かった。

Fig. 4 (e) 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、Eq. (6) で定義した単位時間・単位面積あたりに生体膜を透過した水分子数 ϕ [$\text{molecule}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$] を算出した：

$$\phi = \frac{N_w}{\langle S \rangle t} \quad (6)$$

ここで、 N_w は上下方向によらず生体膜を透過した水分子の数 [-], $\langle S \rangle$ は時間平均の生体膜表面積 [m^2], t は時間 [s] である。生体膜表面積 S は、計算領域の xy 平面の面積で定義した。 ϕ を求める際は、系が平衡に達したシミュレーション時間 120 ns から 150 ns の間における計算結果を用いた。Fig. 5 にその結果を示す。Au-C8-N10 および Au-C8-N30 が侵入した膜を透過した水分子数は、生体膜のみの場合とほとんど

ど変化がなかった。これは、表面電荷密度の低い Au-C8-N10 および Au-C8-N30 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、Au-C8-N70 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、Au-C8-N70 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。したがって、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された。

ここで、実験研究において、正帯電性ナノ粒子は中性または負帯電性ナノ粒子と比べてリン脂質膜を破壊しやすいことが報告されている。例えば、正および負帯電性のアルカンチオール修飾金ナノ粒子をベシクル水溶液に加えた場合、正帯電性粒子においてベシクルが顕著に破壊されることが報告されている³⁾。また、AFM を用いた直接観察から、正帯電性金ナノ粒子は支持脂質二重膜の欠損を引き起こすことも報告されている²⁹⁾。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中性および負帯電性のナノ粒子と比べて高い細胞毒性を示すことが報告されており^{3, 30)}、現在のところ、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^{3, 30)}。以上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より示された粒子表面電荷極性の影響と間接的ではあるが良く一致している。

次に、表面電荷密度の高い Au-C8-N70 が生体膜を破断した理由について考察した。まず、Fig. 6 に生体膜を破断しなかった Au-C8-N30 の生体膜への侵入挙動を示す。初期状態において粒子は膜上部の水分子層に位置している (Fig. 6 (a))。シミュレーション開始直後、生体膜上層が静電引力により粒子に引き付けられ粒子表面に付着した (Fig. 6 (b))。その後、粒子は徐々に生体膜の内部へと侵入するが (Fig. 6 (d)), 生体膜下層は粒子に付着することではなく、その構造は維持された。最終的に粒子は生体膜上層にのみ埋没した

Fig. 6 Penetration behavior of Au-C8-N30 gold nanoparticle into lipid bilayer

Fig. 7 Penetration behavior of Au-C8-N70 gold nanoparticle into lipid bilayer

形態をとり平衡状態に達した (Fig. 6 (f))。一方, Fig. 7 に生体膜を破断した Au-C8-N70 の生体膜への侵入挙動を示す。Au-C8-N30 と同様に, シミュレーション開始直後, 生体膜上層が粒子表面に付着した (Fig. 7 (b))。しかしその後, Au-C8-N30 とは異なり, 生体膜の下層も粒子に付着した (Fig. 7 (c))。このとき, 負電荷を持つ DPPG の親水性頭部が正電荷を持つアルカンチオール末端に静電引力によって引き付けられ, 下層のリン脂質はその親水性頭部を粒子に向けて付着した結果, 粒子近傍において生体膜下層の局所的な欠損 (図中の矢印) が生じた。その後, 粒子は DPPG を選択的に引き付けたまま生体膜内部へと徐々に侵入し, それと同時に粒子に付着していないリン脂質は拡散運動を続けるが, 膜の欠損は修復されないまま粒子は膜の中央付近で停止し, 最終的に粒子近傍において膜の破断が引き起こされた (Fig. 7 (f))。

Fig. 8 に, Au-C8-N30 および Au-C8-N70 の粒子重心からの各粗視化サイトの動径分布関数を示す。図中の PO4 サイト (DPPG の親水性頭部) の動径分布関数は, 初期状態における DPPG の位置 (生体膜の上層もしくは下層) に応じて区別して計算した。なお, 動径分布関数は系が平衡となったシミュレーション時間 120 ns から 150 ns の間における結果を時間平均した。結果より, Au-C8-N70 は Au-C8-N30 と比べてアルカンチオール末端に付着した DPPG が顕著に増大していることが分かる。さらに, Au-C8-N30 において粒子に付着している DPPG は全て生体膜の上層由来のものであるが, Au-C8-N70 においては, 生体膜の上層および下層の両方から由来するものであることが分

Fig. 8 Radial distribution function of alkanethiol terminals and PO4 sites of DPPG with different cationic surface charge densities

かる。以上の結果より, 表面電荷密度の高い Au-C8-N70 は, 生体膜上層だけでなく下層のリン脂質も静電引力によって引き付け, その際, リン脂質の親水性頭部が粒子表面に特異的に付着する結果, 粒子近傍において膜が破断したものと考えられる。

3. 2 修飾分子鎖長の影響

Fig. 9 に, 粒子表面に修飾したアルカンチオールの分子鎖長が長い Au-C24-N70 が生体膜に侵入した際のシミュレーション結果を示す。結果より, 修飾分子鎖長が長い場合でも, 修飾分子鎖長の短い Au-C8-N70 と同様に, 粒子は生体膜の内部に自発的に侵入し

Fig. 9 Penetration behavior of Au-C24-N70 gold nanoparticle into lipid bilayer

Fig. 10 Number of water passed across membrane at different alkanethiol lengths

たが、Au-C8-N70 で見られた生体膜の破断が、Au-C24-N70 では観察されなかった。**Fig. 10** に、生体膜を透過した水分子数を示す。Au-C8-N70 と比較して、Au-C16-N70 および Au-C24-N70 においては、生体膜を透過する水分子数は大きく減少し、生体膜のみの場合とほぼ同等となった。このことから、修飾分子鎖長が長い場合は膜の破断や欠損が起こらないことが確認された。**Fig. 11** に、修飾分子鎖長の異なる正帯電性金ナノ粒子重心からの DPPG 親水性頭部の PO4 サイトおよび疎水性尾部末端の C4A サイトの動径分布関数を示す。修飾分子鎖長が短い場合、DPPG の親水性頭部よりも疎水性尾部が粒子重心より離れた位置に存在していることから、DPPG はその親水性頭部を粒子に向けて付着していることが分かる。しかしながら、修飾分子鎖長の増大に伴い、DPPG の疎水性尾部は親水性頭部よりも粒子に近い位置に存在するようになる。すなわち、修飾分子鎖長の増大に伴い、粒子に付着する DPPG の配向が変化し、DPPG はその疎水鎖を粒子に向けて付着するようになることが分かった。ここで、この変化が生じる理由について考察する。本計算で用いたリン脂質 (DPPC および DPPG) は炭素数15個の疎水性尾部を有している。したがって、リン脂質の疎水性尾部よりも修飾分子鎖長が短い Au-C8-N70 (炭素数8個) の場合、粒子に引き付けられた DPPG の疎水鎖は粒子表面のアルカンチオール間の疎水性の空間に納まりにくい。その結果、粒子に引き付けられた DPPG はその親水性頭部を粒子に向けて付着する。その結果、生体膜下層の破断が引き起こされる。一方、リン脂質の疎水性尾部よりも修飾分子鎖長が長い Au-C16-N70 (炭素数16個) および Au-C24-N70 (炭素数24個) の場合、粒子に引き付け

Fig. 11 Radial distribution function of hydrophilic head (PO4) and hydrophobic tail (C4A) of DPPG around positively charged gold nanoparticles modified by different lengths of alkanethiol

られた DPPG はその疎水鎖をアルカンチオール層の疎水性空間に収めることができる。これは、**Fig. 11** (c) において DPPG の疎水鎖がアルカンチオール末端よりも粒子の重心に近い位置に存在していることから確認できる。その結果、粒子に付着した DPPG は疎水性尾部を粒子に向けた付着形態をとる。ここで、この付着形態を取る場合、粒子が生体膜下層を引き付ける際に生体膜下層は元の構造を維持しながら粒子に付着することができる。そのため、修飾分子鎖長が長い粒子においては膜の破断・欠損が見られなくなったと考えられる。

既往の実験研究において、修飾分子鎖長の異なるアルカンチオールで修飾された正帯電性金ナノ粒子とプラスミド DNA の複合粒子を調製し、生細胞に投与すると、粒子のプラスミド DNA 担持量は同じにも関わらず、修飾分子鎖長の増加に伴い細胞内へのプラスミド DNA の導入効率が增加する結果が報告されている²⁾。この報告では、修飾分子鎖長の増加に伴う粒子ー生体膜間相互作用の変化について詳細に検討されていないものの、本シミュレーション結果が示すように、修飾分子鎖長の違いが粒子の生体膜への侵入挙動に影響を与えることを強く示唆するものである。

4. 結 言

アルカンチオールで表面修飾した金ナノ粒子のモデル生体膜（リン脂質二重膜）への付着・侵入挙動をMDシミュレーションにより解析した。特に、粒子の表面電荷特性および修飾分子の鎖長が付着・侵入挙動に及ぼす影響について解析を行った。

正に帯電した金ナノ粒子は電氣的に中性および負帯電性の粒子とは異なり、生体膜内に自発的に侵入することが分かった。さらに、正帯電性粒子の表面電荷密度を過度に増大させると、生体膜下層のリン脂質頭部を粒子が引き付ける結果、生体膜の元の二重膜構造が変化し、膜を局所的に破断することも分かった。これより、生体膜透過能を向上させるには粒子表面を正帯電させることが有効であるが、過度に正帯電させた粒

子は生体膜の欠損を引き起こす可能性があることが示唆された。また、同じ正帯電性粒子であっても修飾分子鎖長が生体膜を構成するリン脂質の疎水性尾部のよりも短い場合、膜の破断を引き起こすが、修飾分子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し、その疎水鎖を粒子に向けて付着するようになる。その結果、粒子は生体膜下層を破壊せず、膜の破断・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。

Nomenclature

K_a : force constant for angle potential	[J/mol]	θ : bond angle	[—]
K_b : force constant for bond potential	[J/(mol•m ²)]	θ_0 : reference angle of bond	[—]
m : mass of atom	[kg]	σ : collision diameter in Lennard-Jones potential function	[m]
N_w : number of water molecules permeate across the membrane	[—]	ϕ : Number of water passed across membrane	[molecules/(m ² •s)]
q : partial charge on atom	[C]		
r : distance between coarse grained beads	[m]		
r_0 : reference length of bond	[m]	subscript	
S : surface area of membrane	[m ²]	i : atom i	
t : time	[s]	j : atom j	
U : interatomic potential	[J/mol]	ij : between two atoms i and j	
X : position vector of atom	[m]	LJ : Lennard-Jones potential	
ϵ : well depth parameter in Lennard-Jones potential function	[J/mol]	c : Coulomb potential	
ϵ_0 : dielectric constant in vacuum	[F/m]	b : bond potential	
ϵ_r : relative permittivity	[—]	a : angle potential	

References

- 1) Rana, S., A. Bajaj, R. Mout and V. M. Rotello : “Monolayer Coated Gold Nanoparticles for Delivery Applications”, *Adv. Drug Deliver. Rev.*, **64**, 200-216 (2012)
- 2) Sandhu, K. K., C. M. McIntosh, J. M. Simard, S. W. Smith and V. M. Rotello : “Gold Nanoparticle-Mediated Transfection of Mammalian Cells”, *Bioconjugate Chem.*, **13**, 3-6 (2002)
- 3) Goodman, C. M., C. D. McCusker, T. Yilmaz and V. M. Rotello : “Toxicity of Gold Nanoparticles Functionalized with Cationic and Anionic Side Chains”, *Bioconjugate Chem.*, **15**, 897-900 (2004)
- 4) Geiser, M., B. Rothen-Rutishauser, N. Kapp, S. Schürch, W. Kreyling, H. Schulz, M. Semmler, V. I. Hof, J. Heyder and P. Gehr : “Ultrafine Particles Cross Cellular Membranes by Nonphagocytic Mechanisms in Lungs and in Cultured Cells”, *Environ. Health Persp.*, **113**, 1555-1560 (2004)
- 5) Chithrani, B. D., A. A. Ghazani and W. C. W. Chan : “Determining the Size and Shape Dependence of Gold Nanoparticle Uptake into Mammalian Cells”, *Nano Lett.*, **6**, 662-668 (2006)
- 6) Rothen-Rutishauser, B., S. Schürch, B. Haenni, N. Kapp and P. Gehr : “Interaction of Fine Particles and Nanoparticles with Red Blood Cells Visualized with Advanced Microscopic Techniques”, *Environ. Sci. Technol.*, **40**, 4353-4359 (2006)
- 7) Verma, A., O. Uzun, Y. Hu, Y. Hu, H. S. Han, N. Watson, S. Chen, D. J. Irvine and F. Stellacci : “Surface-Structure-Regulated Cell-Membrane Penetration by Monolayer-Protected Nanoparticles”, *Nat. Mater.*, **7**, 588-595 (2008)

- (2008)
- 8) Cho, E. C., J. Xie, P. A. Wurm and Y. Xia : "Understanding the Role of Surface Charges in Cellular Adsorption versus Internalization by Selectively Removing Gold Nanoparticles on the Cell Surface with a I2/KI Etchant", *Nano Lett.*, **9**, 1080-1084 (2009)
 - 9) Arvizo, R. R., O. R. Miranda, M. A. Thompson, C. M. Pabelick, R. Bhattacharya, J. D. Robertson, V. M. Rotello, Y. S. Prakash and P. Mukherjee : "Effect of Nanoparticle Surface Charge at the Plasma Membrane and Beyond", *Nano Lett.*, **10**, 2543-2548 (2010)
 - 10) Verma, A. and F. Stellacci : "Effect of Surface Properties on Nanoparticle-Cell Interactions", *Small*, **6**, 12-21 (2010)
 - 11) Gurtovenko, A. A., J. Anwar and I. Vattulainen : "Defect-Mediated Trafficking across Cell Membranes : Insights from in Silico Modeling", *Chem. Rev.*, **110**, 6077-6103 (2010)
 - 12) Monticelli, L., E. Salonen, P. C. Ke and I. Vattulainen : "Effects of Carbon Nanoparticles on Lipid Membranes : A Molecular Simulation Perspective", *Soft Matter*, **5**, 4433-4445 (2009)
 - 13) Tian, W. and Y. Ma : "Theoretical and Computational Studies of Dendrimers as Delivery Vectors", *Chem. Soc. Rev.*, **42**, 705-727 (2013)
 - 14) Lin, X., Y. Li, and N. Gu : "Nanoparticle's Size Effect on Its Translocation Across a Lipid Bilayer : A Molecular Dynamics Simulation", *J. Comput. Theor. Nanosci.* **7**, 269-276 (2010)
 - 15) Yang, K. and Y. Q. Ma : "Computer Simulation of the Translocation of Nanoparticles with Different Shapes Across a Lipid Bilayer", *Nat. Nano.*, **5**, 579-583 (2010)
 - 16) Nangia, S. and R. Sureshkumar : "Effects of Nanoparticle Charge and Shape Anisotropy on Translocation through Cell Membranes", *Langmuir*, **28**, 17666-17671 (2012)
 - 17) Li, Y. and N. Gu : "Thermodynamics of Charged Nanoparticle Adsorption on Charge-Neutral Membranes : A Simulation Study", *J. Phys. Chem. B*, **114**, 2749-2754 (2010)
 - 18) Li, Y., X. Chen and N. Gu : "Computational Investigation of Interaction between Nanoparticles and Membranes : Hydrophobic/Hydrophilic Effect", *J. Phys. Chem. B*, **112**, 16647-16653 (2008)
 - 19) Lin, J., H. Zhang, Z. Chen and Y. Zheng : "Penetration of Lipid Membranes by Gold Nanoparticles : Insights into Cellular Uptake, Cytotoxicity, and Their Relationship", *ACS Nano*, **4**, 5421-5429 (2010)
 - 20) Ding, H., W. Tian and Y. Ma : "Designing Nanoparticle Translocation through Membranes by Computer Simulations", *ACS Nano*, **6**, 1230-1238 (2012)
 - 21) Lee, O. S. and G. C. Schatz : "Computational Simulations of the Interaction of Lipid Membranes with DNA-Functionalized Gold Nanoparticles", *Methods Mol. Biol.*, **726**, 283-296 (2011)
 - 22) Marrink, S. J., H. J. Risselada, S. Yefimov, D. P. Tieleman and A. H. de Vries : "The MARTINI Force Field : Coarse Grained Model for Biomolecular Simulations", *J. Phys. Chem. B*, **111**, 7812-7824 (2007)
 - 23) Essmann, U., L. Perera, M. L. Berkowitz, T. Darden, H. Lee and L. G. Pedersen : "A Smooth Particle Mesh Ewald Potential", *J. Chem. Phys.*, **103**, 8577-8592 (1995)
 - 24) Yang, Z., X. Yang and Z. Xu : "Molecular Dynamics Simulation of the Melting Behavior of Pt-Au Nanoparticles with Core-Shell Structure", *J. Phys. Chem. C*, **112**, 4937-4947 (2008)
 - 25) Luedtke, W. D. and U. Landman : "Structure and Thermodynamics of Self-Assembled Monolayers on Gold Nanocrystallites", *J. Phys. Chem. B*, **102**, 6566-6572 (1998)
 - 26) Hess, B., H. Bekker, H. J. C. Berendsen and J. G. E. M. Fraaije : "LINCS : A Linear Constraint Solver for Molecular Simulations", *J. Comp. Chem.*, **18**, 1463-1472 (1997)
 - 27) Berendsen, H. J. C., J. P. M. Postma, A. DiNola and J. R. Haak : "Molecular Dynamics with Coupling to An External Bath", *J. Chem. Phys.*, **81**, 3684-3690 (1984)
 - 28) van der Spoel, D., E. Lindahl, B. Hess, G. Groenhof, A. E. Mark and H. J. C. Berendsen : "GROMACS : Fast, Flexible and Free", *J. Comp. Chem.* **26**, 1701-1718 (2005)
 - 29) Leroueil, P. R., A. B. Stephanie, K. Duthie, G. Han, V. M. Rotello, D. Q. McNerny, J. R. Baker, Jr., B. G. Orr and M. M. Banaszak Holl : "Wide Varieties of Cationic Nanoparticles Induce Defects in Supported Lipid Bilayers", *Nano Lett.*, **8**, 420-424 (2008)
 - 30) Harper, S. L., J. L. Carriere, J. M. Miller, J. E. Hutchison, B. L. S. Maddux and R. L. Tanguay : "Systematic Evaluation of Nanomaterial Toxicity : Utility of Standardized Materials and Rapid Assays", *ACS Nano*, **5**, 4688-4697 (2011)