

| | |
|--------------|--|
| Title | ナノ粒子 - 生体膜相互作用の解析：細胞サイズリポソームを用いた物理化学的アプローチ |
| Author(s) | 濱田, 勉 |
| Citation | Bio industry, 30(6): 48-53 |
| Issue Date | 2013-06 |
| Type | Journal Article |
| Text version | publisher |
| URL | http://hdl.handle.net/10119/11925 |
| Rights | Copyright (C) 2013 シーエムシー出版. 濱田勉, Bio industry, 30(6), 2013, pp.48-53. 本著作物はシーエムシー出版の許可のもとに掲載するものです。 |
| Description | |

ナノ粒子—生体膜相互作用の解析：細胞サイズリポソームを用いた物理化学的アプローチ

Physicochemical Analysis of the Interaction between Nanoparticles and Lipid Membranes Using a Cell-sized Liposome

濱田 勉*

近年のナノ粒子の研究開発の進展に伴い、人体に対する安全性の確立、すなわち、生体系への作用メカニズムの理解が急がれている。本稿では、生細胞膜の特徴的構造である膜ドメインを備えた人工細胞膜（細胞サイズリポソーム）を用いた、ナノ粒子と生体膜の相互作用解析の研究を紹介する。生体膜の‘やわらかさ’が、ナノ粒子との相互作用に与える影響について述べる。

1. はじめに

近年のナノテクノロジーの発展に伴い、新たな機能性材料としてナノ粒子の研究開発が進んでいる。ナノ材料が持つユニークな特性を生かし、医療や化粧品など多くの産業分野への応用が期待されている。しかし、ナノサイズの物質が生体や人体に対して与える影響はよく分かっておらず、安全な材料開発に向けて、生体作用メカニズムの理解が急がれている¹⁾。これまでに、細胞を用いたナノ粒子作用の実験が行われ、細胞膜表面へのナノ粒子の吸着および細胞内部への取り込み等が報告されている。生体作用機構を理解するためには、細胞表面、すなわち厚さ5ナノメートルの脂質2分子から成る膜表面でのナノ粒子の振る舞いを明らかにすることが重要である（図1）。ナノ粒子と界面との相互作用は、一般的に van der Waals 力と静電相互作用を考慮した DLVO 理論により記述できる。このため、表面物性を変化させた様々な材質のナノ粒子が開発されている。し

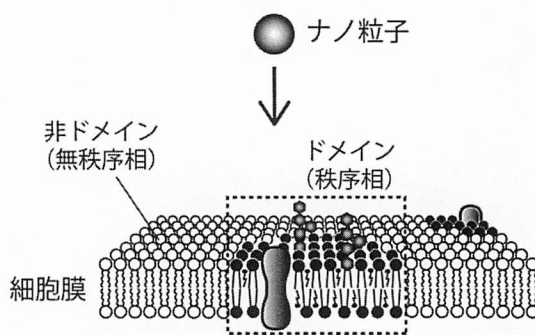


図1 細胞膜へのナノ粒子の作用

かし、生体膜はソフトな界面であり、界面自体が変形しやすい性質を備えている。この界面の‘やわらかさ’が、ナノ粒子との相互作用に与える影響はほとんど分かっていない。

本稿では、生細胞膜の特徴的構造を再現した人工細胞膜（細胞サイズリポソーム）を用いた、ナノ粒子と生体膜の相互作用解析の研究成果を紹介する²⁾。ソフトな界面としての生体膜の弾性特性が、ナノ粒子との相互作用にあたる影響につい

*Tsutomu Hamada 北陸先端科学技術大学院大学 マテリアルサイエンス研究科 准教授

て考察する。

2. 細胞膜表面の不均一性：膜ドメイン

生体膜は、多成分の脂質およびタンパク質から成る分子集合体である。基本構造は脂質2分子膜であり、両親媒性の脂質分子が疎水基を内側に向けて自己集合している。膜を構成する脂質分子は、膜面で一様に混合せず、主に飽和アシル基を持つスフィンゴ脂質やコレステロールが多く含まれる領域（膜ドメイン、例えば脂質ラフト）を形成している（図1）³⁾。ドメイン内の脂質分子はアシル基の運動性が抑えられた「秩序相」状態にあり、周囲は流動性の高い「無秩序相」状態である。この膜ドメインは受容体タンパク質等を選択的に局在させ、シグナル伝達や小胞輸送などの場とし

て機能すると考えられている。すなわち、膜ドメインは、外部からの物理化学的刺激を認識するために重要な働きをしている。

3. 細胞サイズリポソームを用いた細胞機能解析

細胞の機能は、多様な膜動態により調整されている。この生体膜の動的特性を理解するため、筆者らは人工細胞膜（細胞サイズリポソーム）の実験を進めている（図2a）⁴⁻⁶⁾。リポソームは脂質分子だけから成る単純なシステムであるが、高度な細胞機能を再現することができる。例えば、エンドサイトーシス（出芽小胞の形成）^{7,8)} やオートファジー（円盤膜の小胞化）⁹⁾ を人工的に創り出すことに成功している。このような膜動態の制御

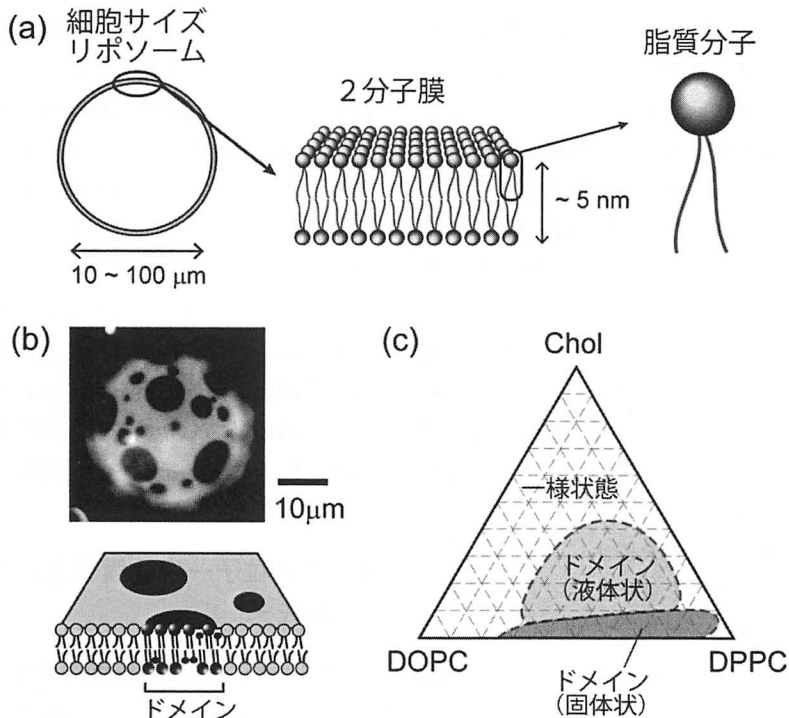


図2 (a)細胞サイズリポソーム。(b)蛍光顕微鏡で観察したリポソーム表面のドメイン構造。流動性の高い非ドメイン領域に局在する蛍光色素を用いている (Adapted from Ref. 10 with permission from The Royal Society of Chemistry)。(c)不飽和脂質ジオレイルフォスフォコリン (DOPC)・飽和脂質ジパルミトイルフォスフォコリン (DPPC)・コレステロール (Chol) の3成分系の相図。グレー領域でドメイン形成が観察される。

メカニズムは、膜の自由エネルギーによって記述できる。そして、その物理原理に基づけば、変形プロセスを可逆的に操作することも可能である^{7,9)}。すなわち、脂質膜は細胞の動的機能に必要な基本的物性を備えていると言える。

前項で述べた不均一界面（膜ドメイン）についても、リポソーム膜上で再現することができる。脂質膜には、熱力学的な固一液相転移が存在する。相転移温度以上では膜は流動的な液体状態（無秩序液体相または液晶相とよばれる）をとり、相転移温度以下では固体状態（秩序固体相またはゲル相とよばれる）を示す。また、コレステロールが含まれると、中間的な性質を持つ相（秩序液体相）が形成されることが知られている。相転移温度は、脂質分子の構造により決まる。不飽和脂質は飽和脂質に比べて、相転移温度が低い。これは、アシル基の2重結合の存在が隣り合う分子間での引力を弱め、液体状態となり易いためである。また、アシル基の数が多いほど分子間の引力が大きくなり、液体状態を取りにくくなる。すなわち、相転移温度が高くなる。生体膜は多成分の脂質分子から成るため、様々な相転移温度を有する脂質が混在している。結果、膜面内で相分離が生じ、秩序相と無秩序相が共存した状態が形成される。この相分離構造は、二種類以上の脂質分子で作製したリポソーム膜上で再現することが可能である（図2b）¹⁰⁾。図2cに、飽和脂質と不飽和脂質とコレステロールの3成分系の典型的な相図を示した。相図は、温度や膜張力などの熱力学パラメータにより変化する¹⁰⁾。さらに、リポソームを用いれば、ドメイン構造を膜上に再現するだけでなく、その動的機能を解析することも可能である。例えば、ドメインはエンドサイトーシスの場と考えられている³⁾。筆者らは、リポソーム膜表面のドメインから、サイズの揃ったエンドサイトーシス小胞が形成される様子を観察することに成功している^{8,11)}。

4. 細胞サイズリポソーム表面へのナノ粒子の吸着挙動

筆者らは、このドメイン構造を備えた細胞サイズリポソームを、ナノ粒子—生体膜相互作用の解析に適用した²⁾。膜ドメイン領域はエンドサイトーシスの場であることから、細胞表面に吸着した後の細胞内取り込み過程を議論する上で、ドメインあるいは非ドメイン領域への物質の吸着挙動は重要な情報である。筆者らは、リポソームに対して、直径50~500nmのポリスチレン粒子を添加し、相互作用を蛍光顕微鏡で観察した。用いたポリスチレン粒子のゼータ電位はほぼ一定（約-35mV）であり、性質としては粒子サイズのみが異なる。図3aは、リポソーム表面に吸着した100nmのナノ粒子の顕微鏡像である。粒子は、ドメイン領域に選択的に局在している。これに対して、500nmのナノ粒子は非ドメイン領域に局在する（図3b）。また、それぞれのサイズのナノ粒子に対して、局在する膜領域の統計データを得た（図3c）。粒子サイズ200nmを境に、小さい粒子はドメインに、大きい粒子は非ドメイン領域に選択的に吸着していることが分かる。また、温度変化による一時的なドメイン消滅や、レーザートラップによる外力印加などの揺動に対して、ナノ粒子はこの局在性を維持することも確認している。生細胞において膜ドメインはエンドサイトーシス小胞の場であり、筆者らの実験結果は、小さいナノ粒子はドメインを介して細胞内に取り込まれやすいことを示唆している。

5. ナノ粒子—生体膜相互作用の自由エネルギー

次に、ナノ粒子と生体膜の相互作用の物理メカニズムについて考察する。van der Waals力と静電力を考慮したDLVO理論だけでは、今回の実験結果を説明するのは難しい。生体膜界面は、ソフトマターとしての性質を備え、外力や揺動に対して大きな膜変形が引き起こされる。すなわち、物質吸着に伴う膜の形状変化のエネルギーが重要

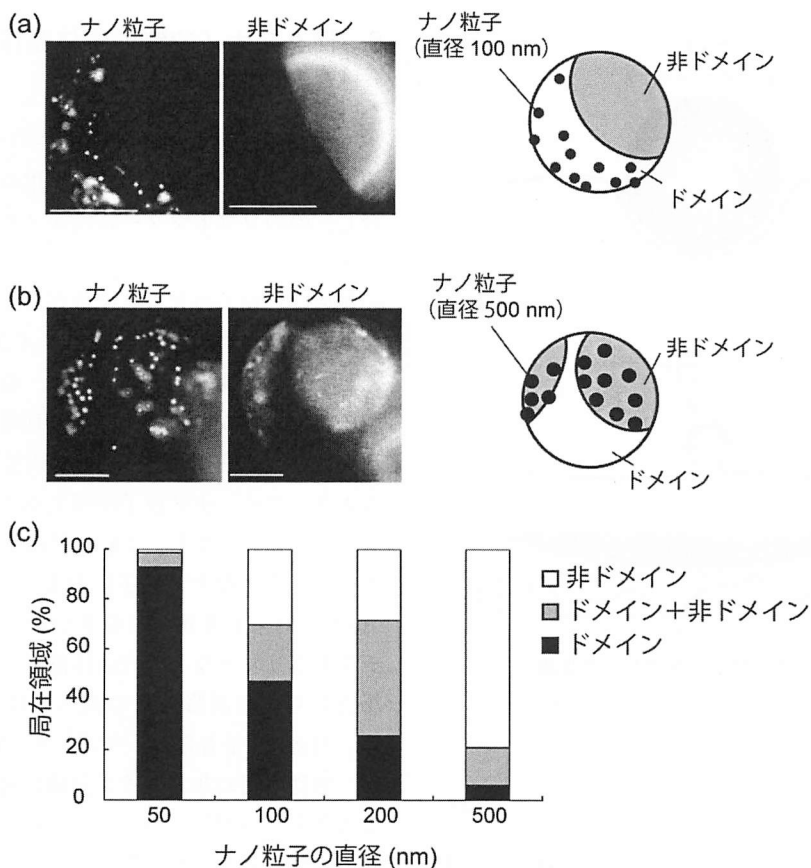


図3 (a, b) 細胞サイズリポソームへのナノ粒子吸着の蛍光顕微鏡像。100nm (a) と500nm (b)のナノ粒子の作用。スケールバーは10 μ m。(c)粒子サイズに依存した選択的な膜局在。

(Adapted with permission from Ref.2, Copyright 2012 American Chemical Society)

となる。ナノ粒子が膜へ強く吸着する場合、接触面積を増やすために膜は粒子を覆うように変形する。変形した膜には弾性エネルギーが生じる。すなわち、吸着力が膜の弾性力に打ち勝つと、膜変形が生じる。吸着と弾性の2つの競合する力(エネルギー)を比較すると、膜変形を誘起するのに必要な粒子直径 $D^* = 2(\frac{\kappa}{w})^{\frac{1}{2}}$ が求まる。ここで、 w は膜と粒子の吸着エネルギー、 κ は膜のかたさ・やわらかさに関する弾性係数(約 10^{-19} J)を表す。この直径 D^* より大きな粒子 ($D > D^*$) は、吸着力の寄与が大きく、膜は粒子を覆うように変形する(図4a)。膜が変形する場合、単位面積あたりの自由エネルギー変化は次の式で記述で

きる。

$$\Delta F = \frac{\kappa}{2}(c_1 + c_2 - c_0)^2 \quad (1)$$

ここで、 c_1 と c_2 は主曲率、 c_0 は自発曲率を表す。このエネルギーは弾性係数(κ)に比例するため、弾性係数の小さい無秩序相の非ドメイン領域への局在が安定となる。一方、小さいナノ粒子 ($D < D^*$) は、吸着力よりも弾性力の寄与が大きく、膜の曲率変形は起こりにくい(図4b)。しかし、粒子の吸着に伴い膜の熱揺らぎ運動の空間が制限されるため、エントロピーが減少する。このときの単位面積あたりの自由エネルギー変化は次の式で表される。

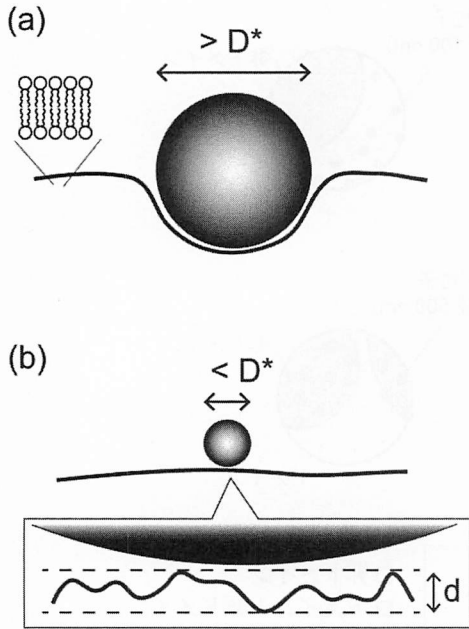


図4 ナノ粒子が吸着した生体膜
大きいナノ粒子(a)と小さいナノ粒子(b)の場合

$$\Delta F = \frac{3(k_B T)^2}{2\pi^2 \kappa d^2} \quad (2)$$

ここで、 k_B はボルツマン定数、 T は温度、 d は熱揺らぎの制限空間の特徴的な長さを表す。このエネルギーは、弾性係数 (κ) に反比例するため、元々揺らぎが少ない秩序相の膜ドメインに吸着する方が安定となる。なお、膜揺らぎの自由エネルギーは、大きいナノ粒子の吸着の際にも存在するが、膜変形の自由エネルギーに比べて小さい。

本実験条件では、中性リン脂質（ジオレオイルフォスフォコリン）と負電荷ナノ粒子を用いており、吸着の主な力は van der Waals 力であると考えられる。そこで、吸着のエネルギー (w) として van der Waals 力を計算すると、 D^* が 260nm と求まる。この値は、実験で観察されたドメイン・非ドメイン局在を選択する粒子直径 (200nm) とほぼ一致する。このように、膜の自由エネルギーにより、サイズ依存的な粒子の分配挙動を説明することができる。

6. 様々なナノ物質の生体膜作用メカニズムの理解に向けて

本稿では、50~500nm の直径のポリスチレン製ナノ粒子と脂質膜との相互作用の解析結果を紹介し、膜のソフトマター特性がメカニズム理解に重要であることを述べた。ナノ粒子が吸着する膜の領域は、粒子の大きさに依存して変化する、すなわち、小さい粒子ほど膜ドメインに局在する。そして、その物理メカニズムは、粒子吸着に伴う膜の自由エネルギー変化により理解できる。今回用いたナノ粒子は2分子膜の厚さ (5 nm) よりも大きいため、ナノ粒子が膜表面上に吸着すると考えられる。しかし、2分子膜の厚さと同スケールのより微小なナノ粒子になると、2分子膜への‘挿入’効果も考慮する必要がある。また、ペプチドやポリマーなどで表面修飾されたナノ粒子の場合にも、表面修飾基の膜への挿入が考えられる。例えば、筆者らは、ペプチド (アミロイド β) が、無秩序相の非ドメイン領域に選択的に局在することを見いだしている¹²⁾。これは、ペプチドが膜の内部に挿入される際、流動性が高い (やわらかい) 非ドメイン領域を拡張する方がエネルギー的に得であることに起因すると考えられる。このように、物理化学的メカニズムを理解する上で、人工細胞膜は非常に強力な実験ツールとなる。今後、様々な物質分子と膜との相互作用の解析を進め、ナノ物質の生体作用に関する物理法則・評価基準を確立したいと考えている。

[謝辞] 共同研究者である北陸先端科学技術大学院大学の 高木昌宏教授、森田雅宗博士に感謝いたします。本研究は、科学研究費補助金およびサントリー生命科学財団の支援を受けて行われました。

文 献

- 1) A. Nel *et al.*, *Science*, 311, 622 (2006)

- 2) T. Hamada *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **134**, 13990 (2012)
- 3) K. Simons & M. J. Gerl, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **11**, 688 (2010)
- 4) T. Hamada & K. Yoshikawa, *Materials*, **5**, 2292 (2012)
- 5) 濱田勉, 薬剂学, **72** (4), 211 (2012)
- 6) 濱田勉, 機能材料, **30** (7), 50 (2010)
- 7) K. Ishii *et al.*, *ChemBioChem*, **10**, 251 (2009)
- 8) T. Hamada *et al.*, *J. Phys. Chem. B*, **111**, 10853 (2007)
- 9) T. Hamada *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **132**, 10528 (2010)
- 10) T. Hamada *et al.*, *Soft Matter*, **7**, 9061 (2011)
- 11) 研究室 HP の動画, <http://www.jaist.ac.jp/ms/labs/hamada/>
- 12) M. Morita, *et al.*, *Soft Matter*, **8**, 2816 (2012)