

自己組織的構造転移に基づいた 無機クラスターの生理活性機能の発現

山形大学理学部
並河 英紀

「海外半年以上」滞在の半数、多剤耐性菌に感染

海外に半年以上滞在した日本人の約半数が、複数の抗生物質が効かない多剤耐性菌の「ESBL産生大腸菌」に感染していたことが、東京医大などの研究チームの調査で分かった。研究チームは、海外赴任がある企業の協力を得て、2012年9月から15年3月までの間、20～50歳代の男女45人について渡航前と帰国後のふん便を調査。その結果、22人からESBL産生大腸菌を検出。渡航先別では、サハラ以南のアフリカが最多の7人、東南アジア6人、南アジア5人、中東・北アフリカ4人。欧米の赴任者7人からは検出されなかった。

多剤耐性菌は、過剰や過少な抗生物質の使用などにより変異した細菌。複数の抗生物質を分解する能力がある。健康な人が感染してもすぐに発病するわけではなく、今回感染が確認された22人も無症状だった。ただ、抵抗力が弱い入院患者らの場合は、重症化につながる恐れがある。

従来のantibioticsとは異なる原理で機能するantibioticsの探索が
持続可能な人類の生命維持に必須

「海」
海
耐
究
得
人
産
南
ら
数
わ
が

NATURE | NEWS

WHO warns against 'post-antibiotic' era

Agency recommends global system to monitor spread of resistant microbes.

Sara Reardon

30 April 2014

[Rights & Permissions](#)



Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is now invulnerable to many antibiotics.

Melissa Danke/CDC

半数、多剤耐性菌に感染

■ A post-antibiotic era（一般的な感染症や怪我が死を招く時代）は、SFではなく21世紀の現実的な未来。

■ にもかかわらず、多剤耐性菌に関する地球規模での把握が出来ていない。

■ 企業にはもはや新しい抗生物質を開発する経済的インセンティブは無い。

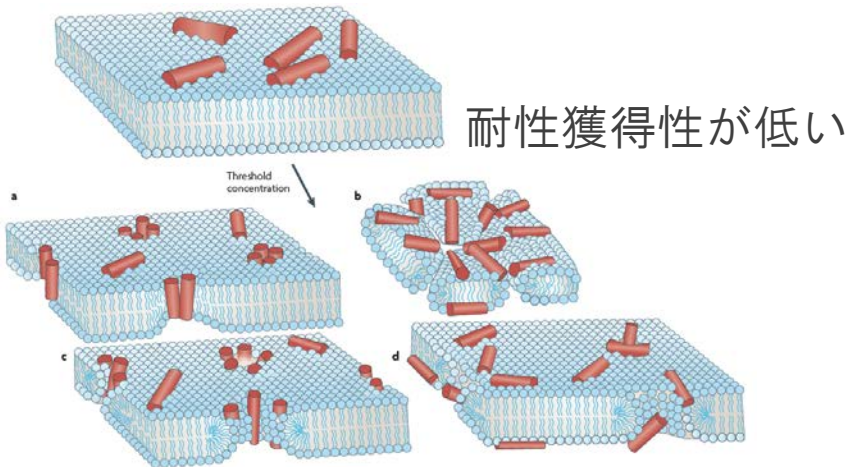
■ 早急に地球規模の監視ネットワークの構築と、post-antibiotic eraの到来へ向けた対策が必須。

剤
研
を
5
L
東
か
複
る
力

従来のantibioticsとは異なる原理で機能するantibioticsの探索が
持続可能な人類の生命維持に必須

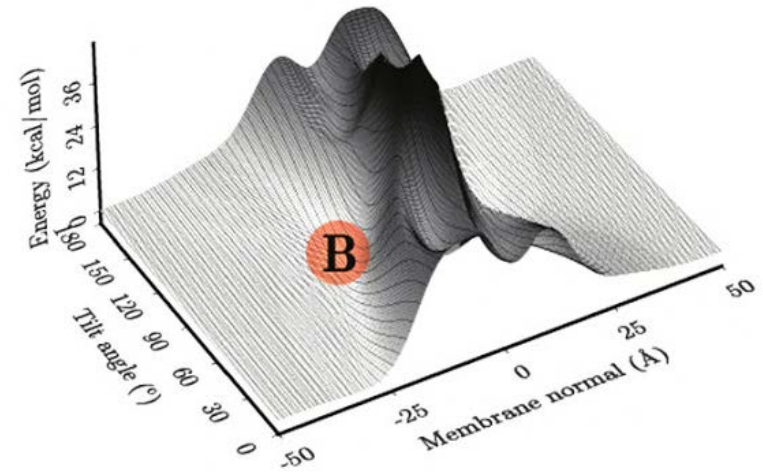
生命に学ぶ：自己組織的膜破壊による自然免疫

ポア形成ペプチド



Nature Review Microbiology, 7, 245 (2009).

エネルギーランドスケープ



S. Neidle et al., *Molecular Simulations and Biomembranes: From Biophysics to Function* (2010).

エネルギー地形に沿った自己組織的な構造転移が機能発現の鍵

適切なデザインが適切な物性を引き出す

生命に学ぶ：自己組織的膜破壊による自然免疫

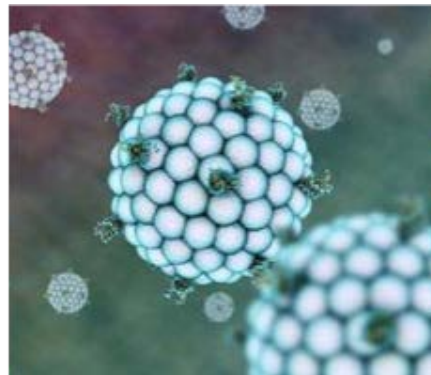
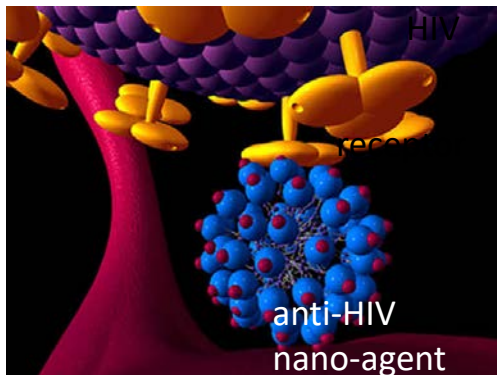


人工材料へ：化学的・物理的安定性の向上



news in *Nature* (28 SEP 2011)

” With **hundreds of nanoproducts currently being tested** in humans, recommendations aim to safeguard trial participants.”

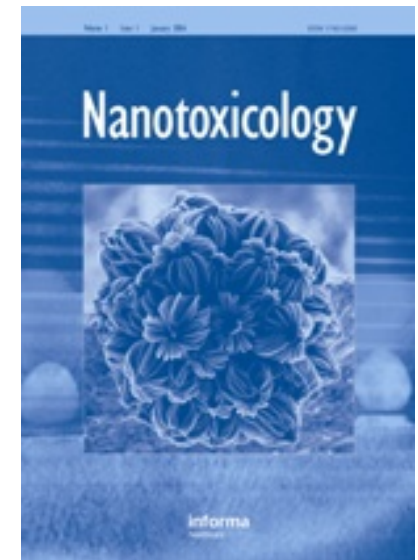
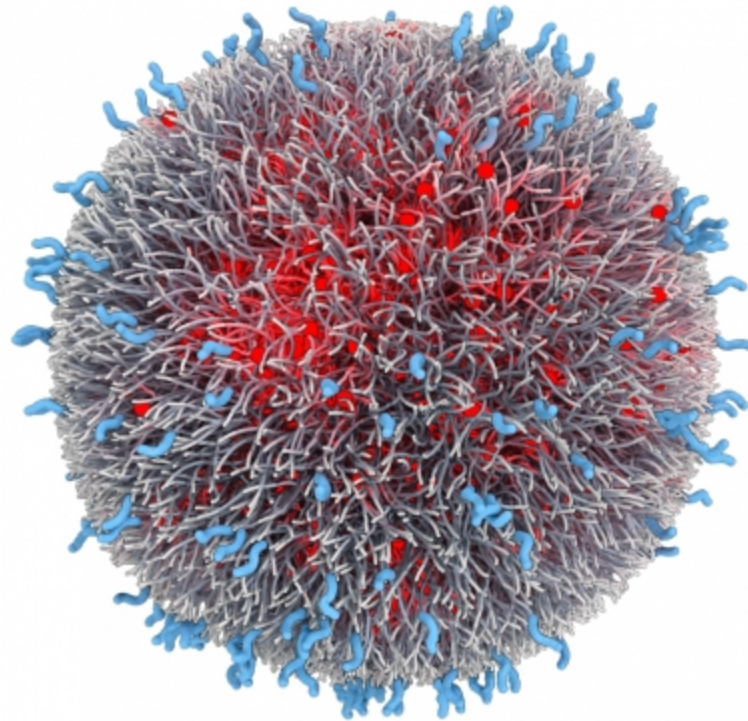
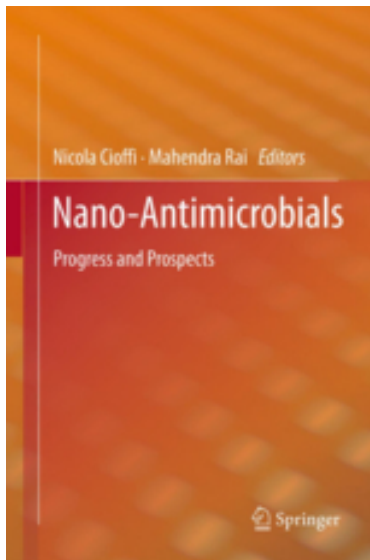


Metal nanoparticles (Ag, Cu)

Metal oxide nanoparticles (ZnO, TiO₂)

etc...

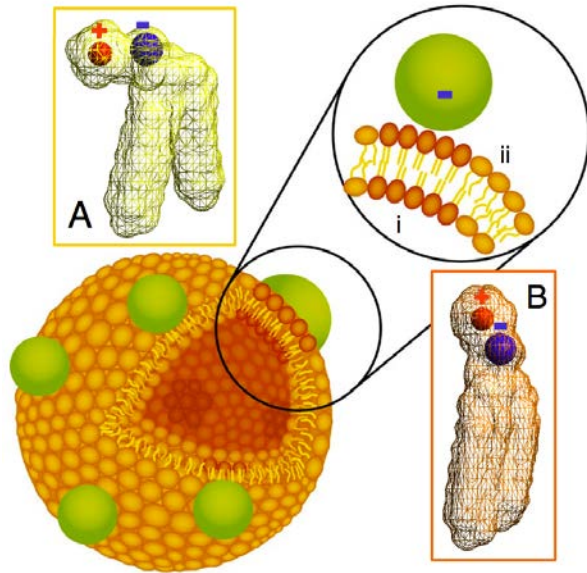
人工生理活性ナノ材料の光と影



適切なデザインが適切な物性を引き出す

生理活性ナノ粒子

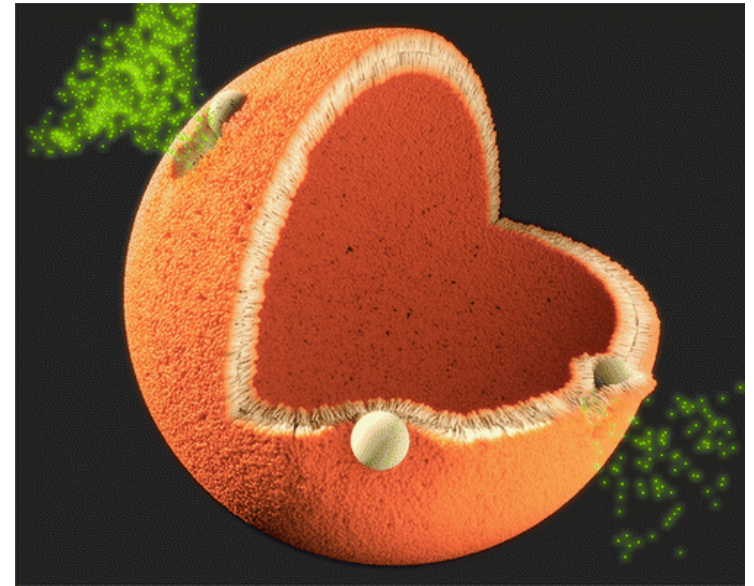
高分子ナノ粒子



B. Wang et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 105, 18171 (2008).

膜表面に吸着し脂質分子再配向

金属ナノ粒子



B. Y. Moghadam et al., Langmuir, 28, 16318 (2008).

膜内へ侵入しポア形成

エネルギー地形に沿った自己組織的な構造転移

適切なデザインが適切な物性を引き出す

生理活性ナノ粒子

生体機能



人工材料



安定性



低コスト



易合成性



細胞膜標的性

生理活性ナノ粒子

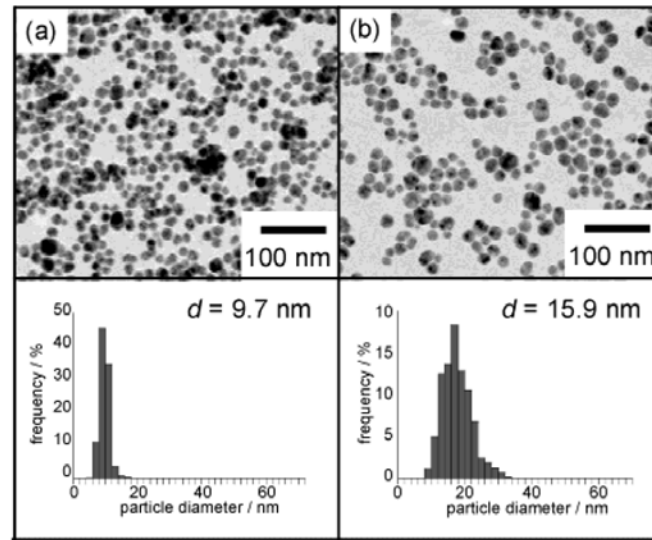
生体機能



人工材料



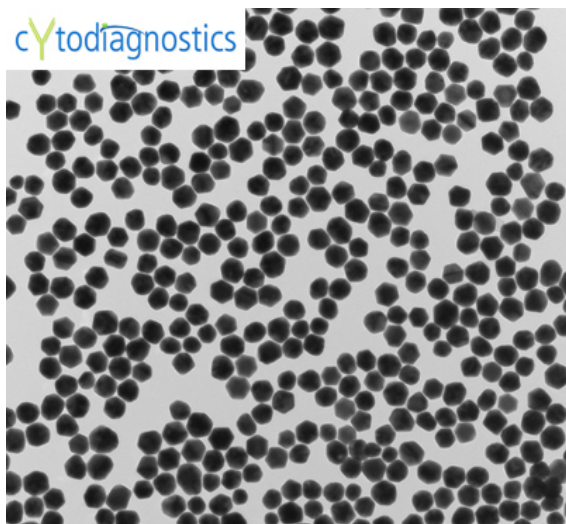
サイズ分散性



H. Nabika et al., J. Phys. Chem. B, 107, 9161 (2003).

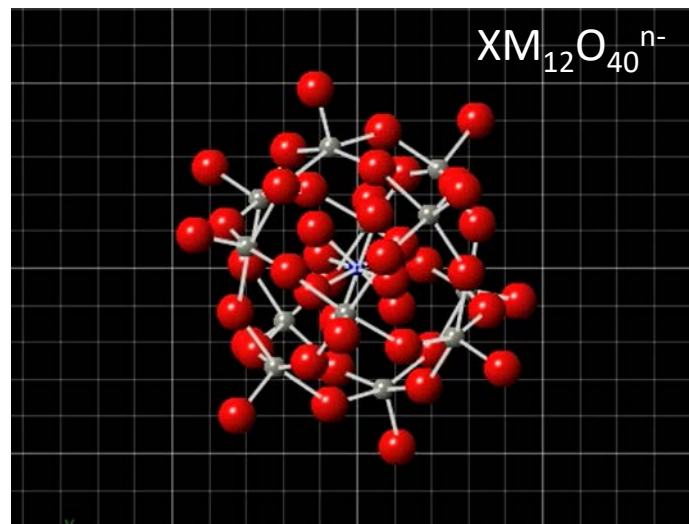
ナノ粒子からナノクラスターへ


60 nmの標準Auナノ粒子



- OK 安定性
- OK 低コスト
- OK 易合成性
- OK 細胞膜標的性
- NG 多分散性

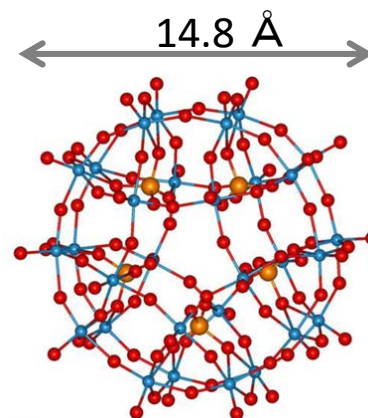
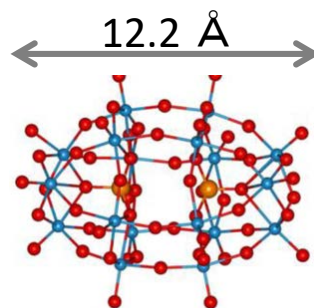
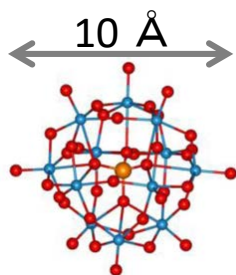
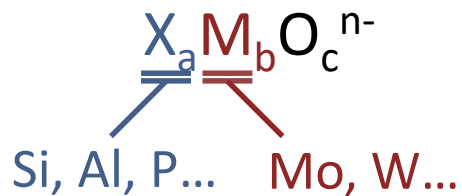
1 nmの金属酸化物クラスター



- OK 安定性
 - OK 低コスト
 - OK 易合成性
 - 細胞膜標的性
 - OK 単分散性（分子性）
- 

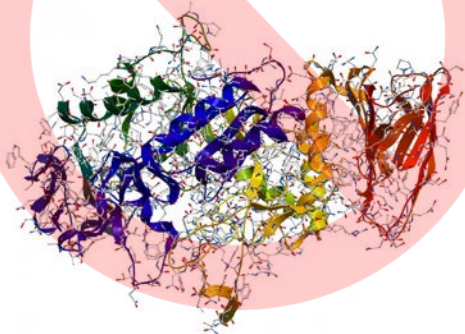
ポリオキシメタレート (POM)

アニオン性金属酸化物
with definite molecular formula

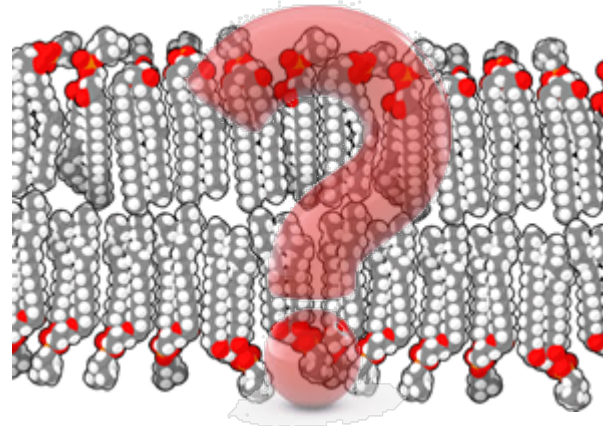


etc.

- ✓ アミロイドβペプチド
- ✓ リン酸化酵素
- ✓ プリオン

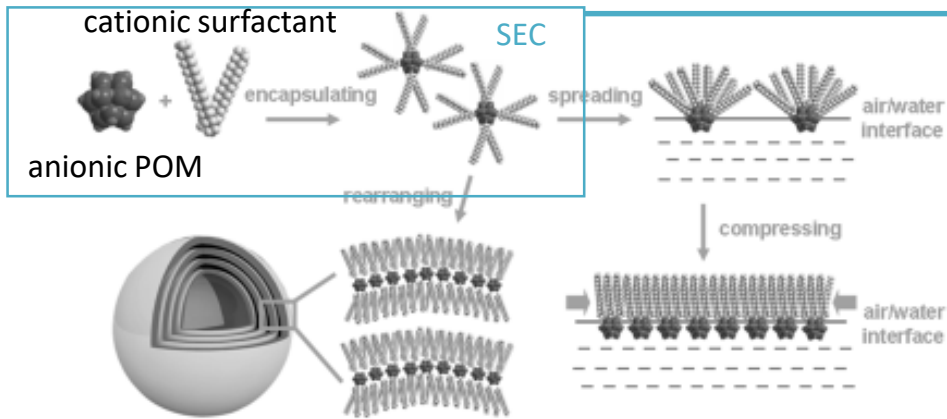


- ✓ 細胞 (細胞膜)



ポリオキシメタレート (POM)

Surfactant Encapsulated Cluster (SEC)



H. Li et al., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **46**, 1300 (2007).

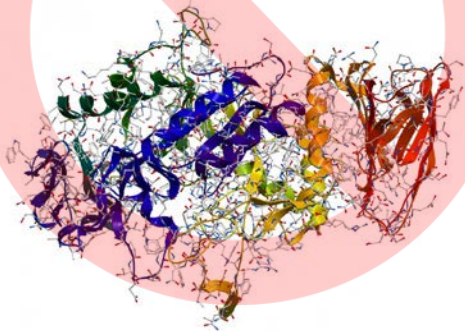
POM + 界面活性剤 = SEC

POM + リン脂質 = SEC ?

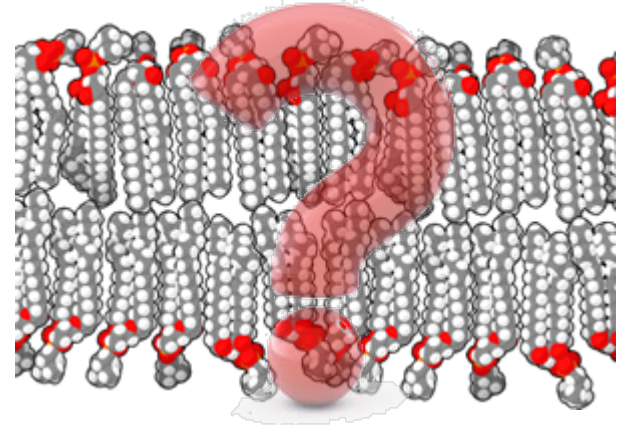
POM + リン脂質二重膜 = SEC ?

二重膜から脂質分子を奪いSECを形成するなら、細胞膜標的性を有する生理活性材料として機能できる。

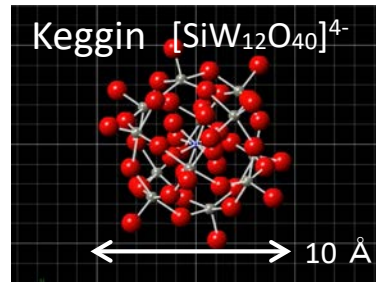
- ✓アミロイドβペプチド
- ✓リン酸化酵素
- ✓プリオン



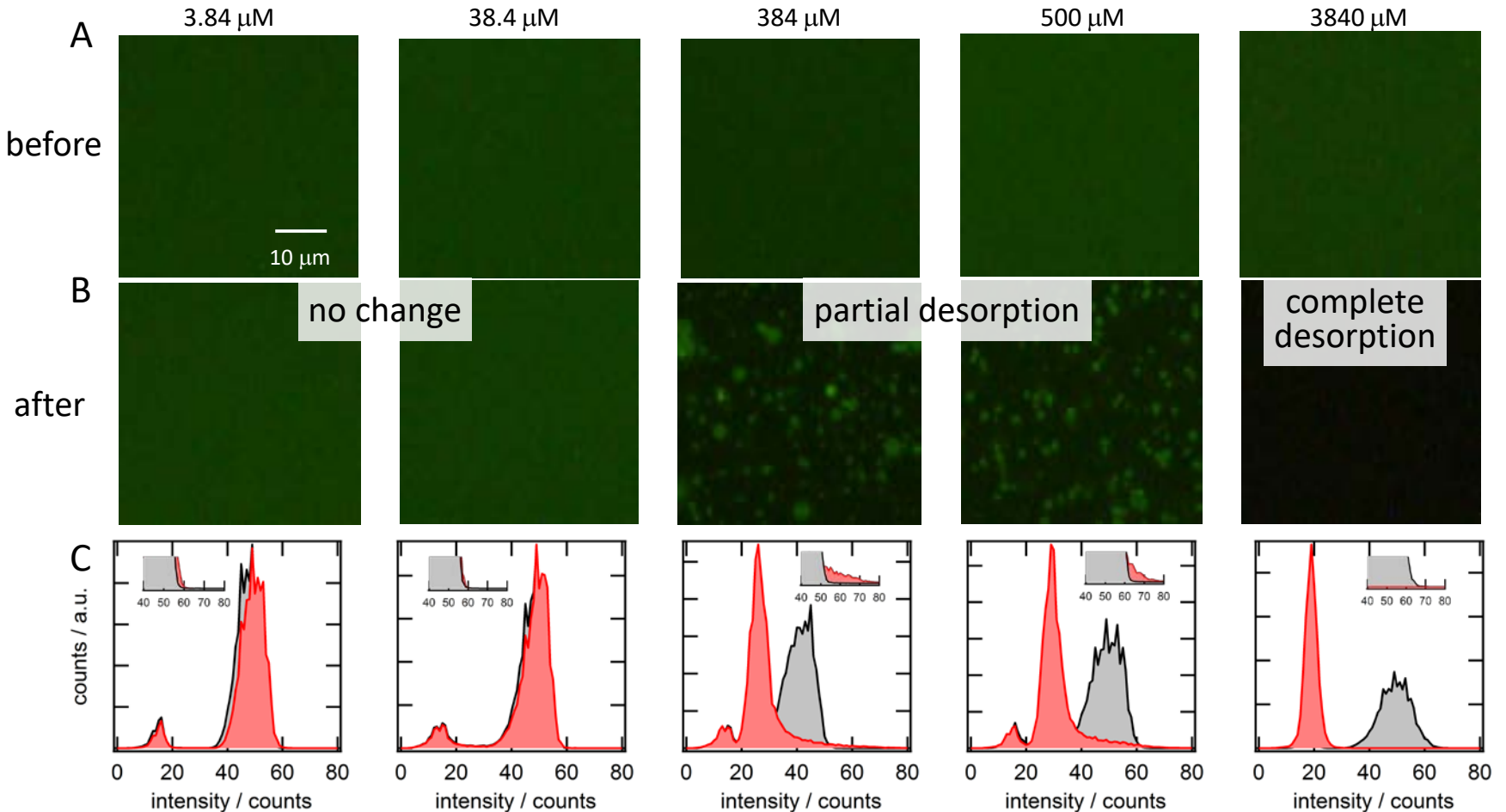
- ✓細胞 (細胞膜)



POM + 脂質膜 =

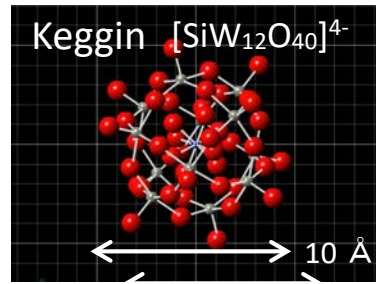


lipid: solid-supported DMPC bilayer



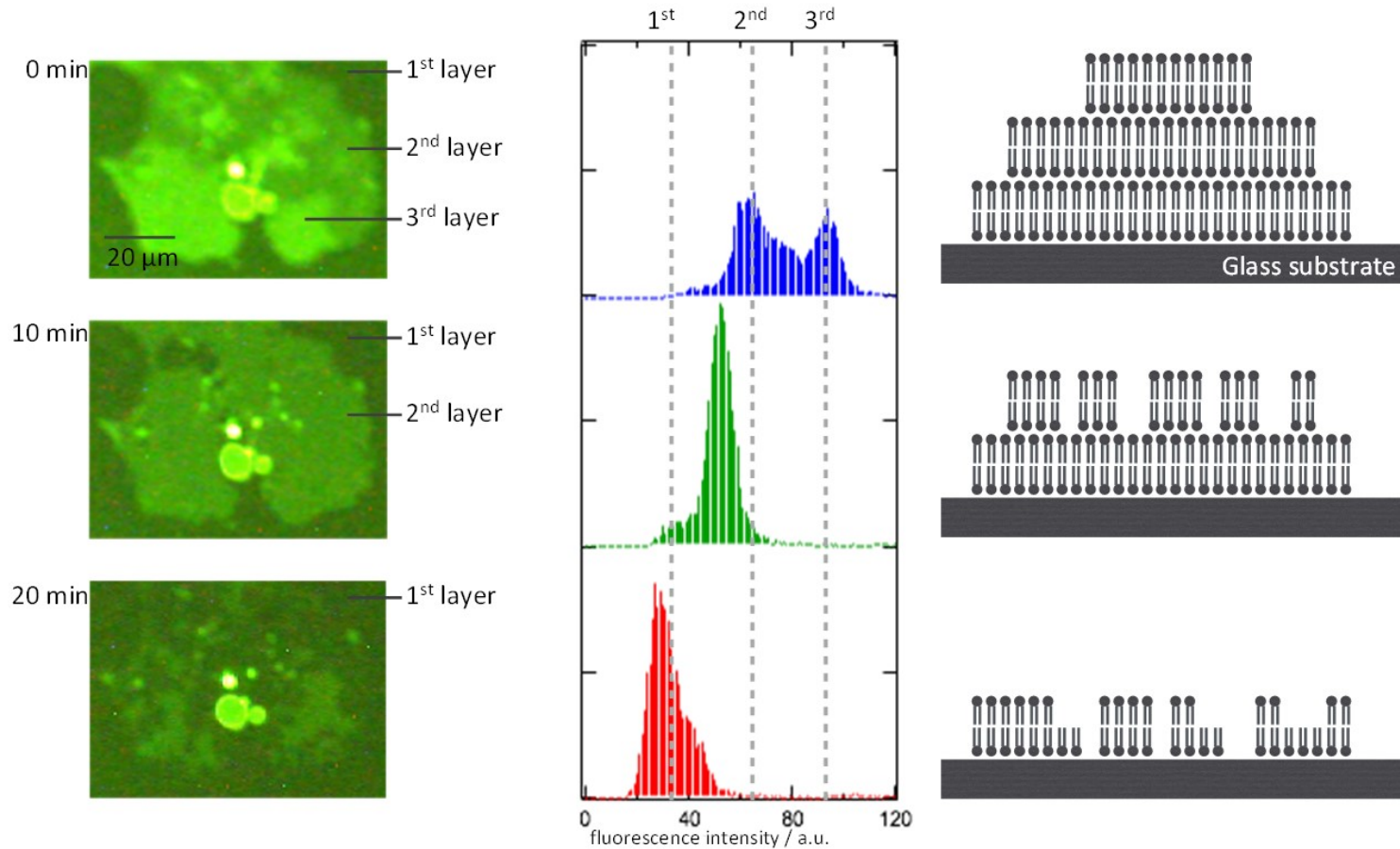
POMが脂質分子を奪い微小構造物への自己組織的転移を誘起

POM + 脂質膜 =



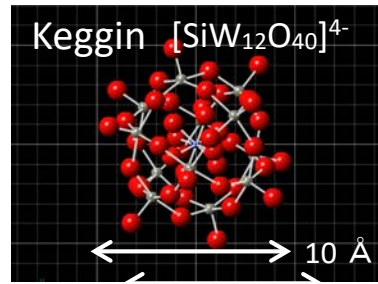
lipid: solid-supported DMPC bilayer

POM: $\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}^{4-}$ 162 μM

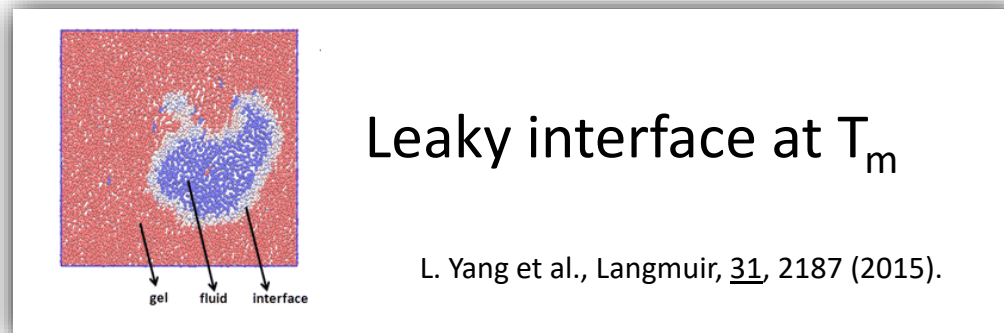
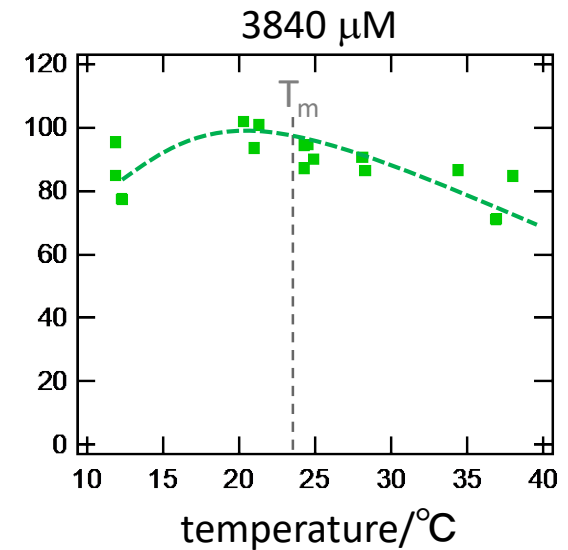
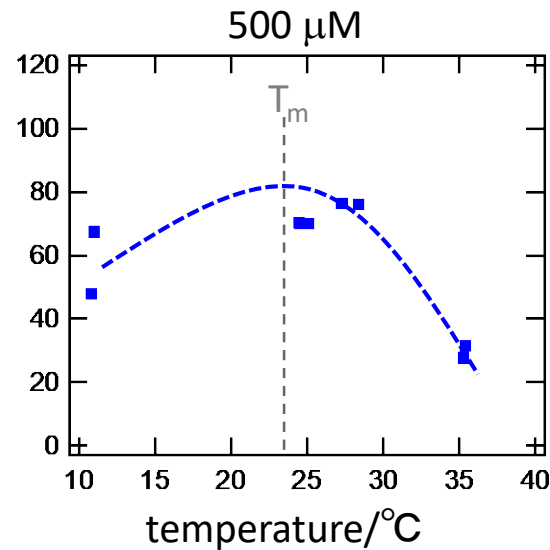
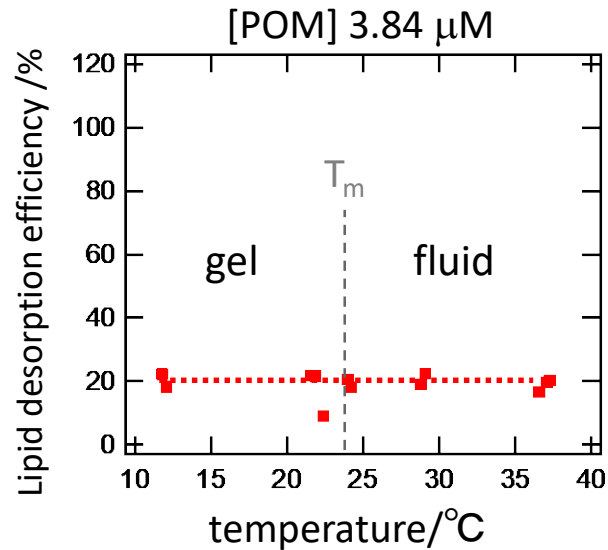


POMは溶液側から作用し外層膜から脂質分子を脱離

温度依存性



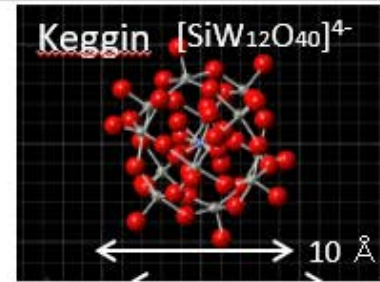
lipid: solid-supported DMPC bilayer



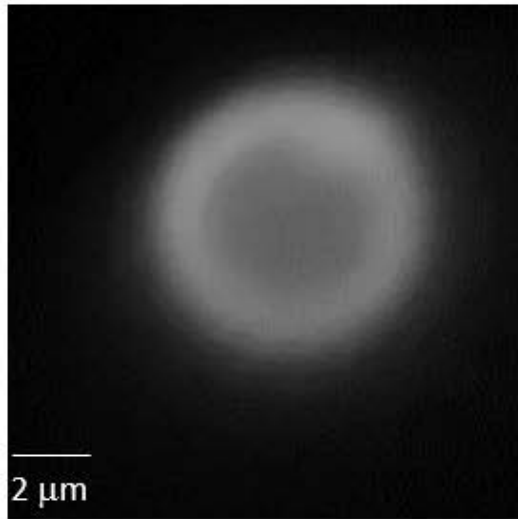
POMは溶液側から作用し不安定領域から脂質分子を脱離

リポソーム

lipid: egg-PC liposome

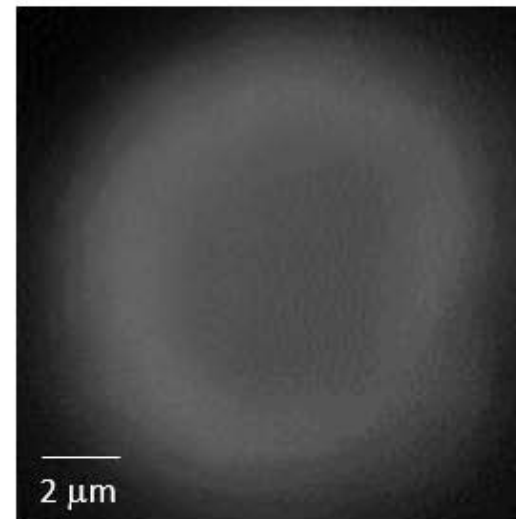


low dose (μM)

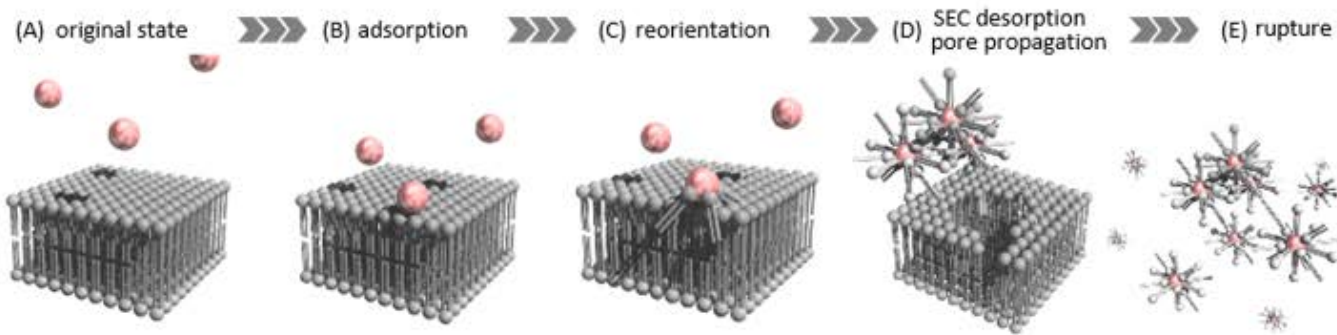


脂質分子脱離
↓
ポア成長
↓
崩壊

high dose (mM)

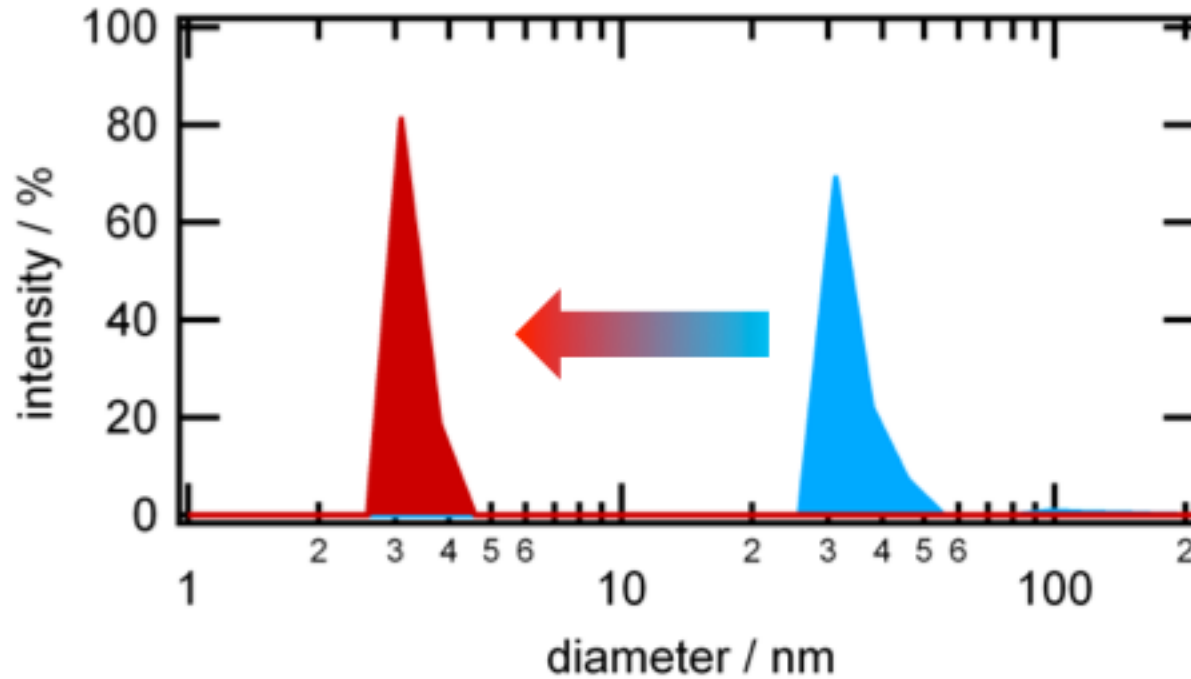
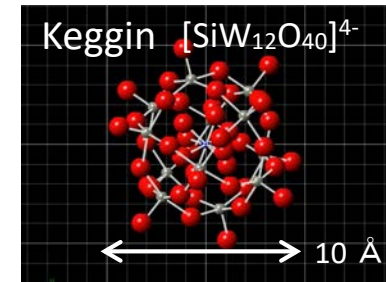


多点で
脂質分子脱離
↓
シュリンク
↓
崩壊



脂質分子の脱離がリポソームの崩壊を誘導する

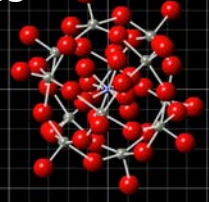
DLS測定



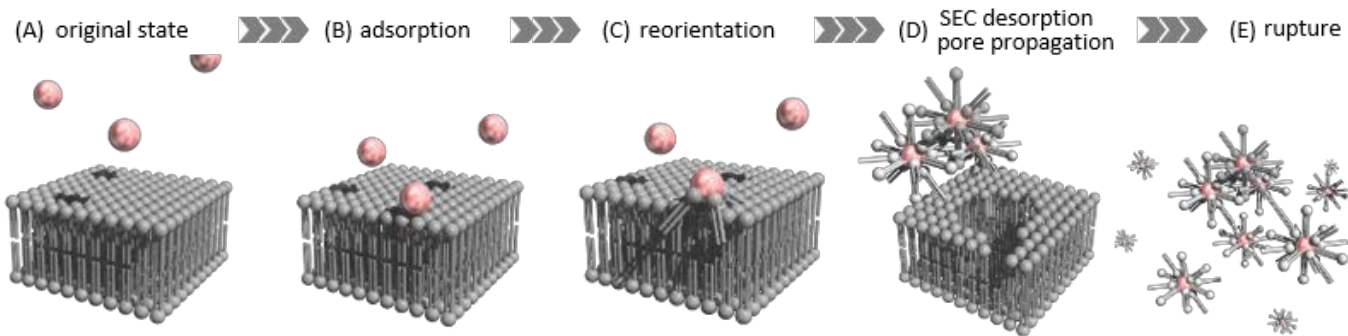
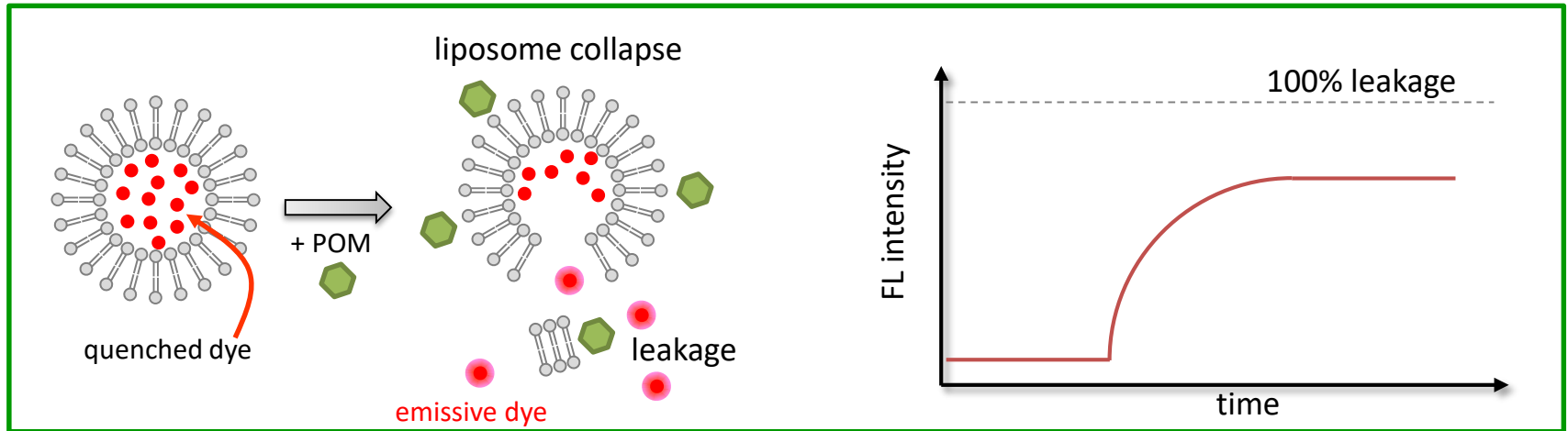
リポソームの崩壊と微小構造体の形成を確認

Leakage実験

Keggin $[\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}]^{4-}$



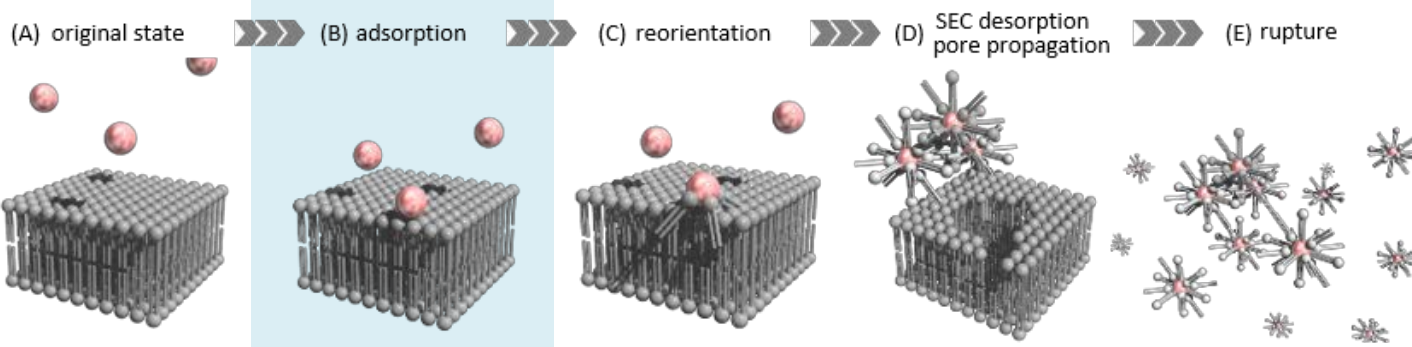
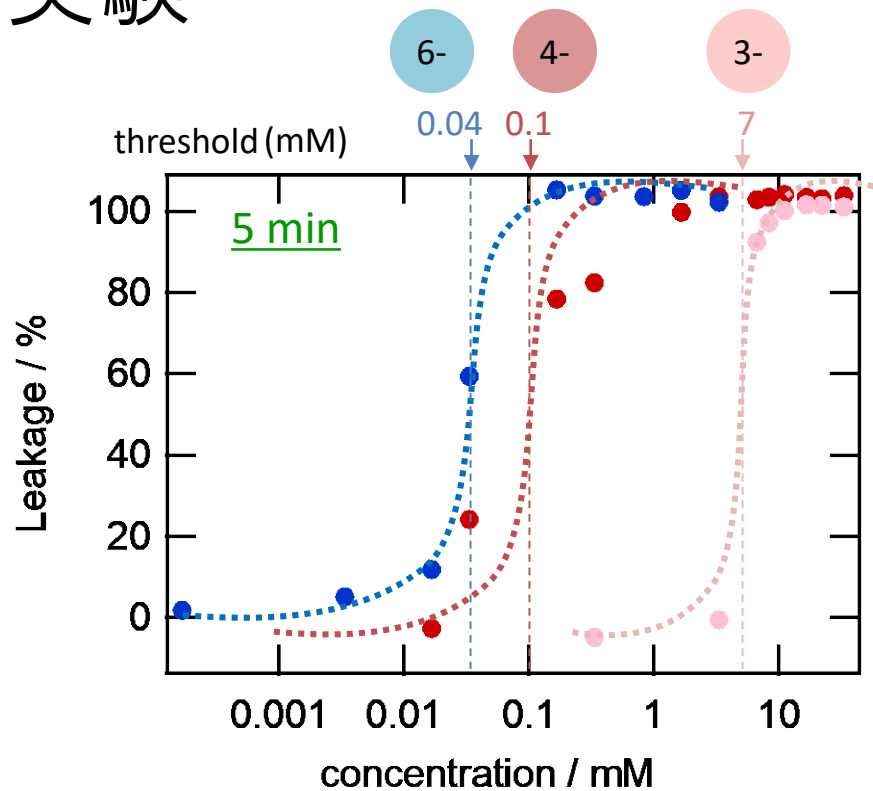
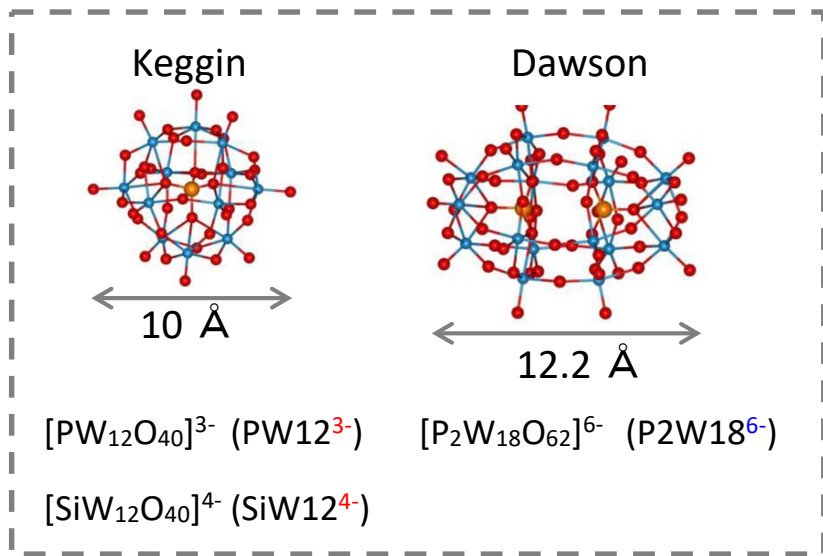
10 Å



脂質分子の脱離がリポソームの崩壊を誘導する

Leakage 実験

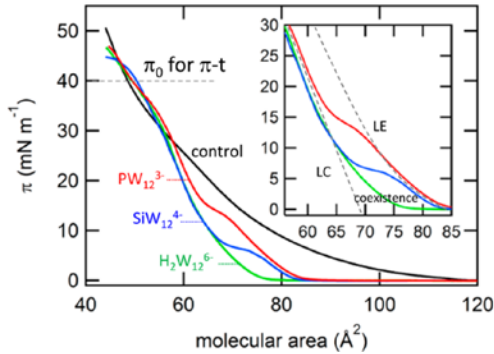
lipid: egg-PC liposome



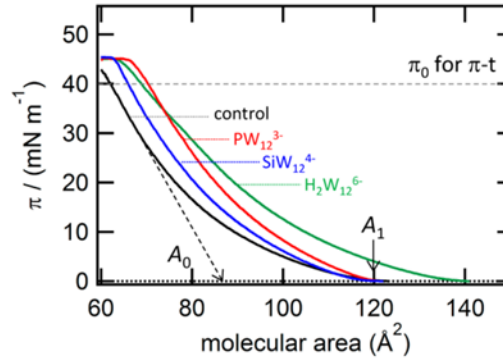
静電気的相互作用？

π-A実験：脂質電荷依存性

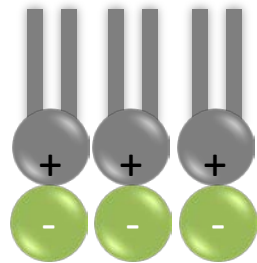
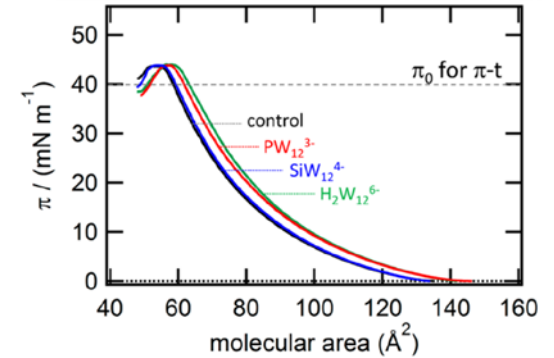
Cationic DPTAP



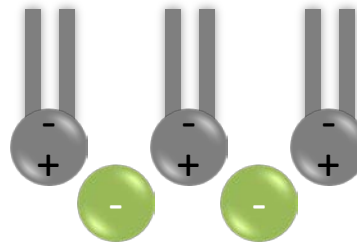
Zwitterionic egg-PC



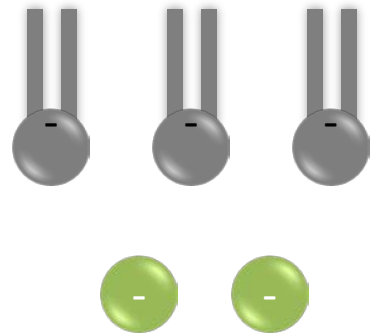
Anionic POPG



膜の結晶化



膜の膨張



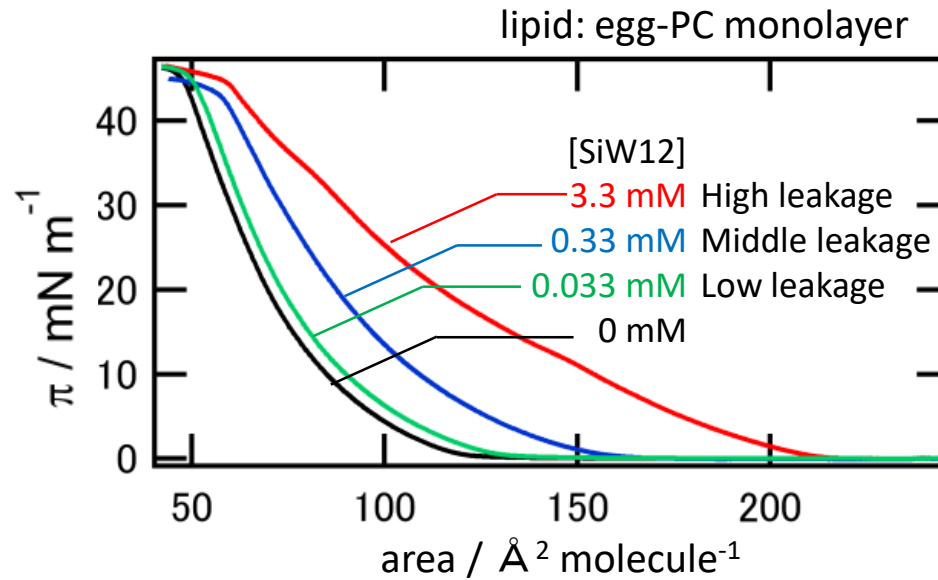
カウンターカチオンの吸着

強い作用を及ぼすのは最外層にカチオン性部位のあるリン脂質

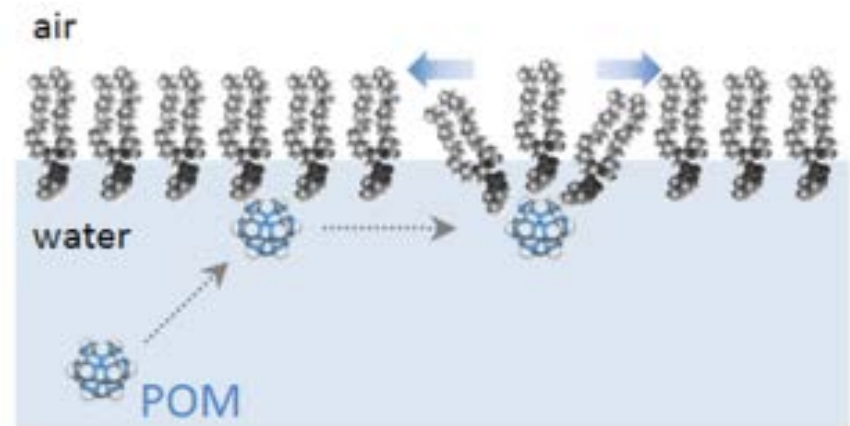
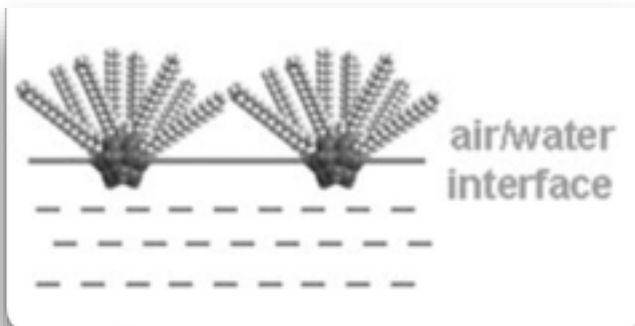


POMとリン脂質の静電的相互作用がトリガー

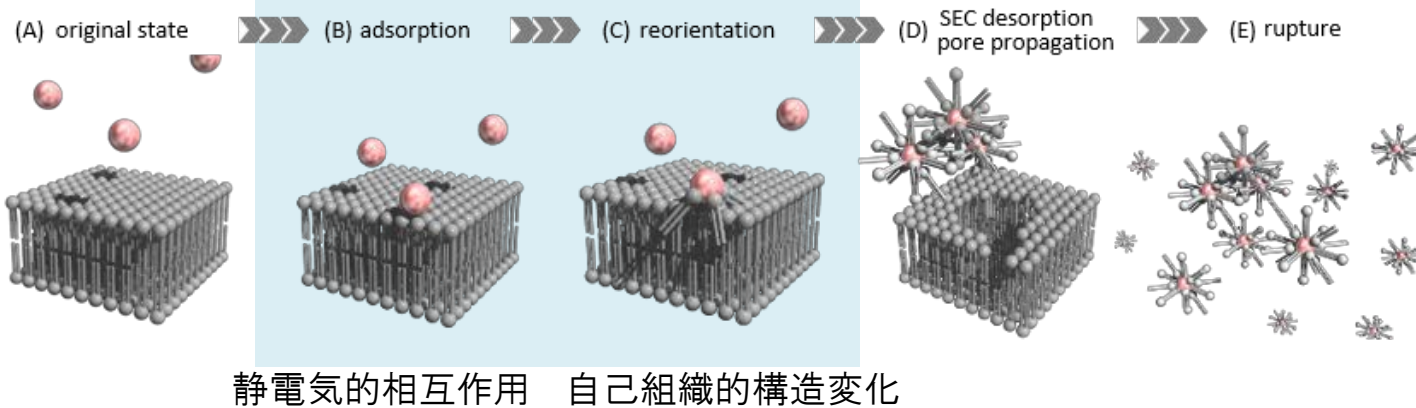
π -A実験：POM濃度依存性



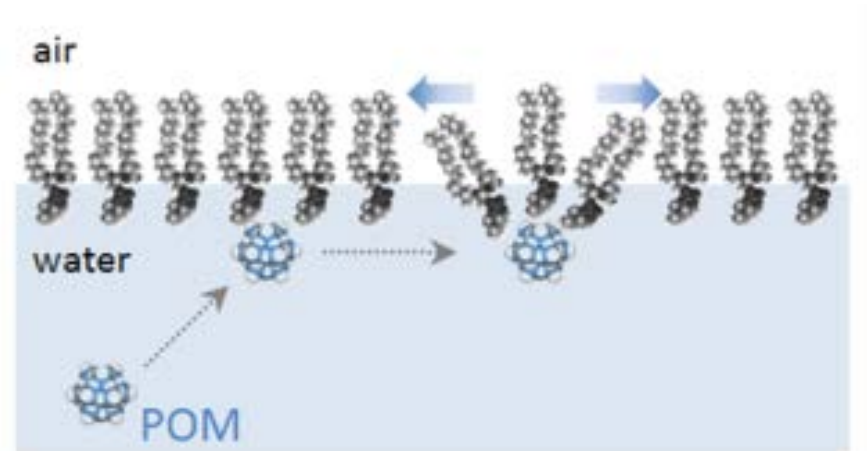
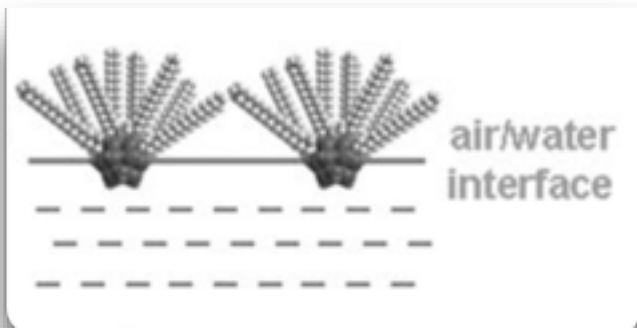
POM + surfactant = **SEC**
(Surface Encapsulated Cluster)



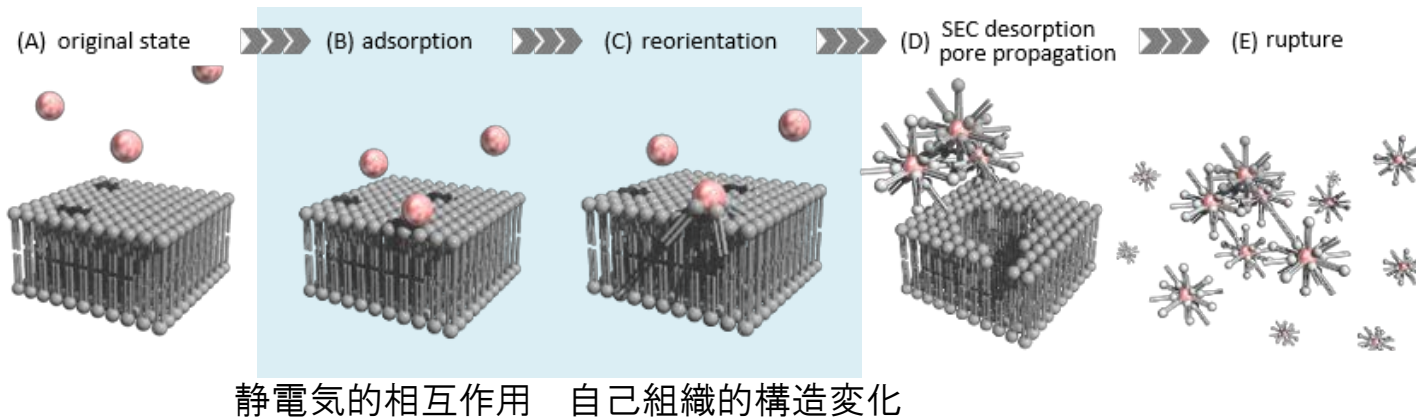
π-A実験



POM + surfactant = SEC
(Surface Encapsulated Cluster)



ここまでのまとめ



- ✓ POMが脂質分子の電荷（化学的性質）・相状態（熱力学的性質）を認識し吸着
- ✓ 吸着後、POM-リン脂質間で自己組織的に構造転移
- ✓ 不安定化による膜崩壊が誘発

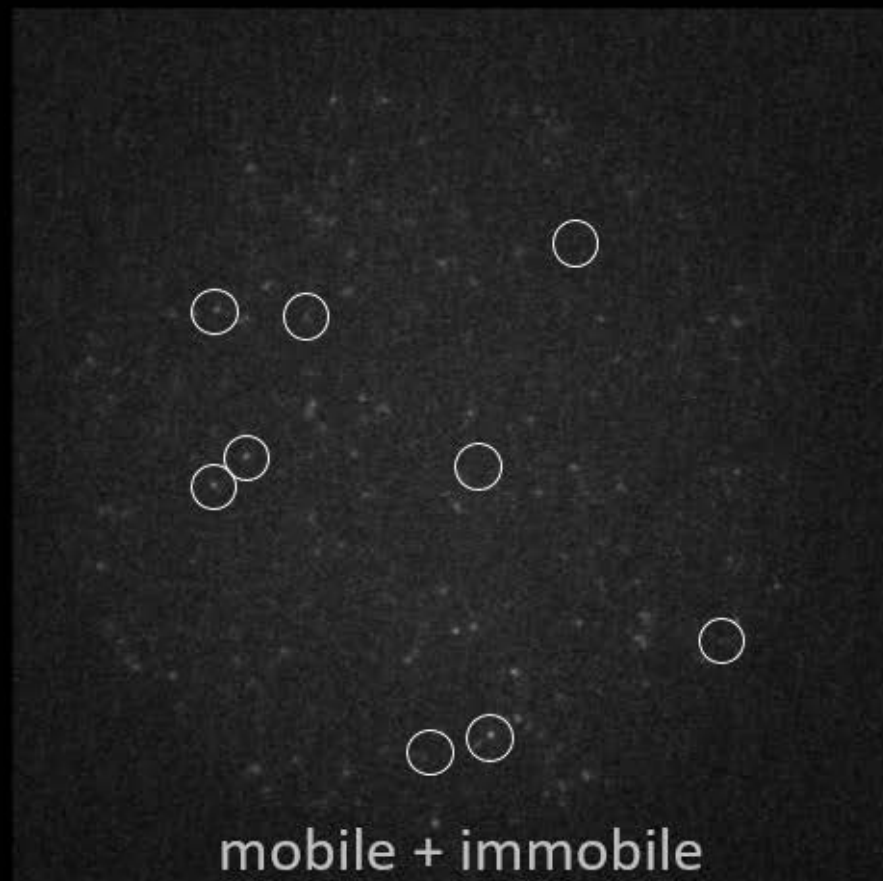
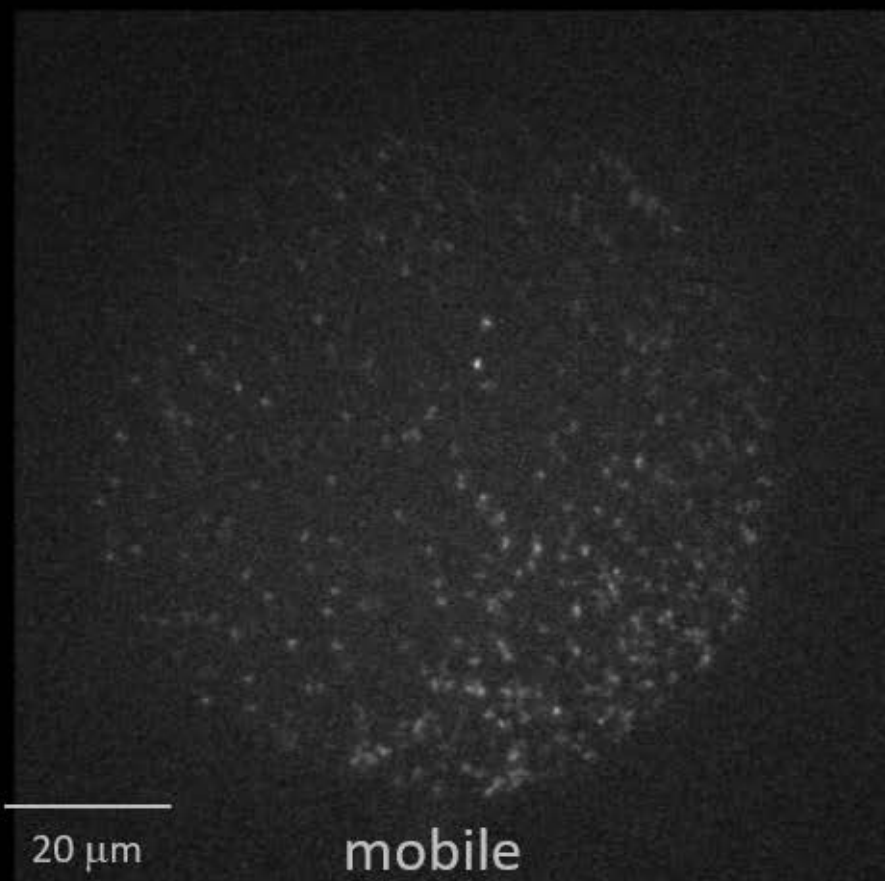
倒立型レーザー全反射顕微鏡による単一分子観察

POM: $\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}^{4-}$

lipid: solid-supported egg-PC bilayer doped with dye-labeled lipid

0 μM

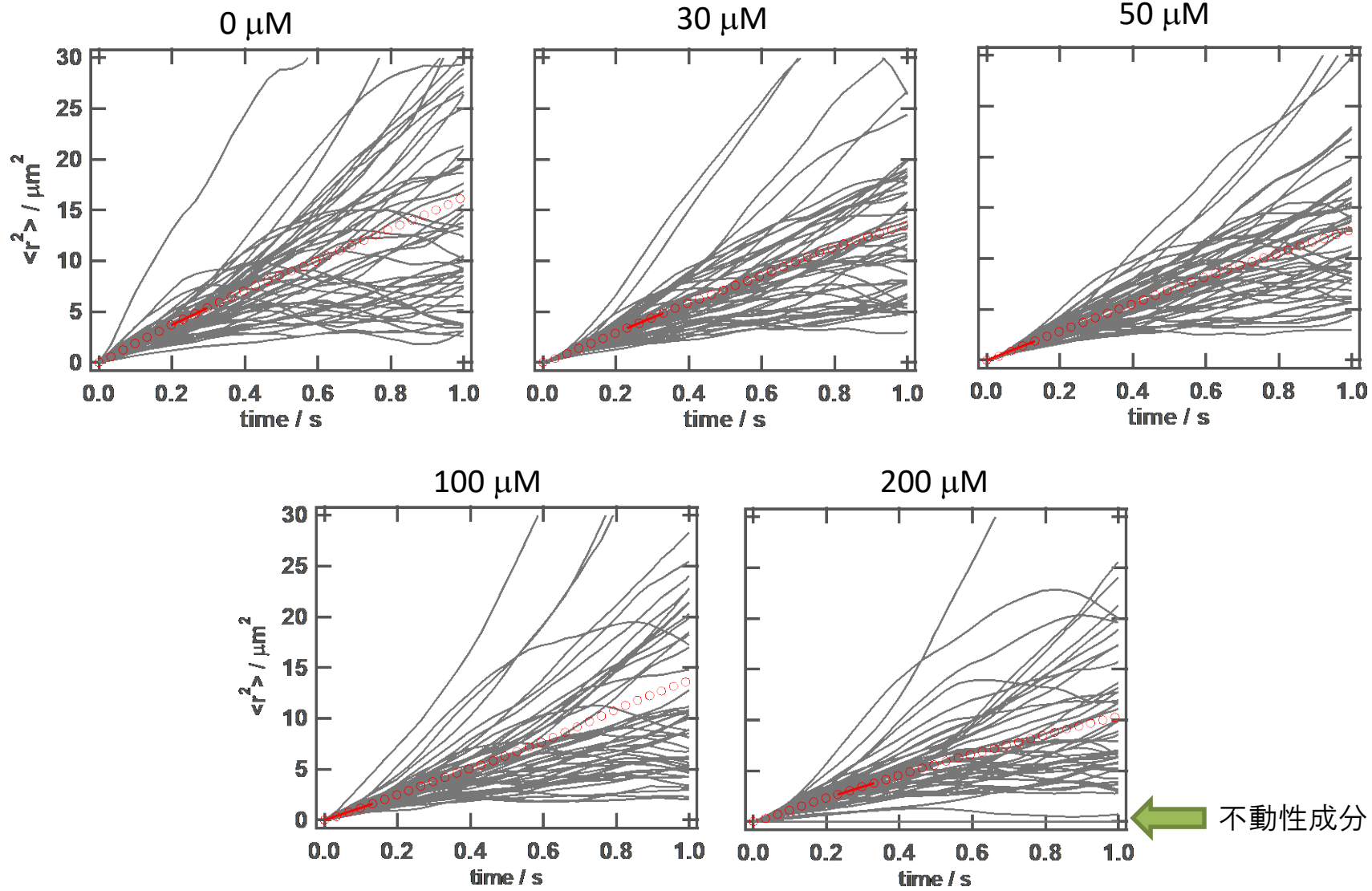
200 μM



POMにより脂質分子に微視的動的挙動に変化

拡散性の定量評価：平均二乗変位（MSD）解析

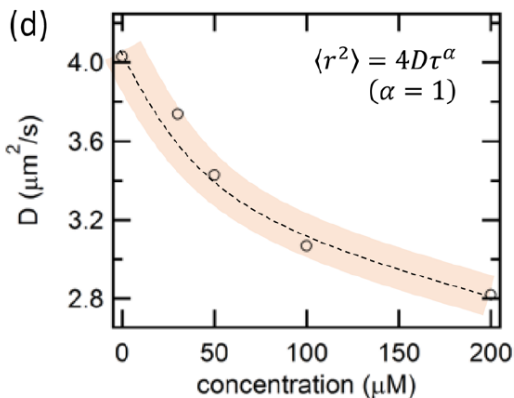
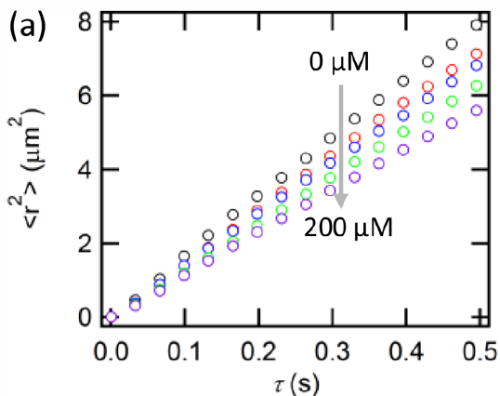
50 molecules (trajectories) in each condition



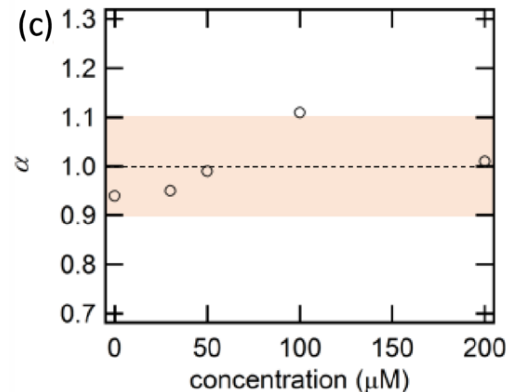
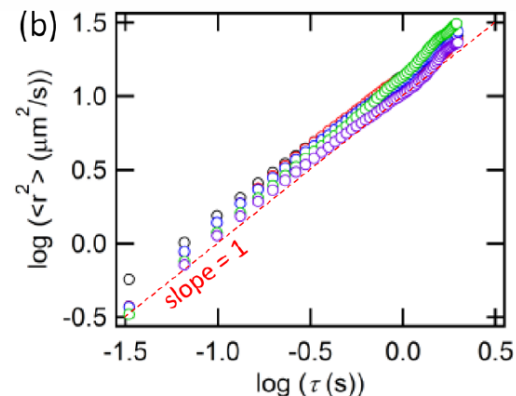
不動性成分

拡散性の定量評価：平均二乗変位（MSD）解析

拡散係数解析



異常指数解析



$$\langle r^2 \rangle = 4D\tau^\alpha$$

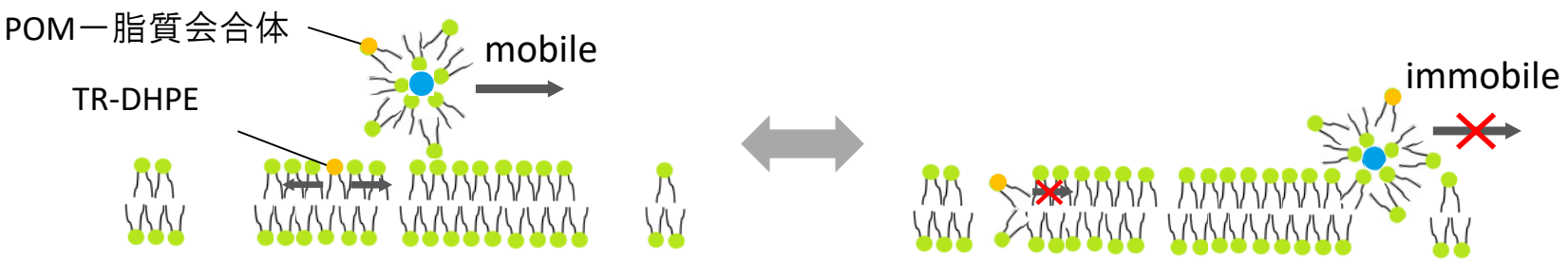
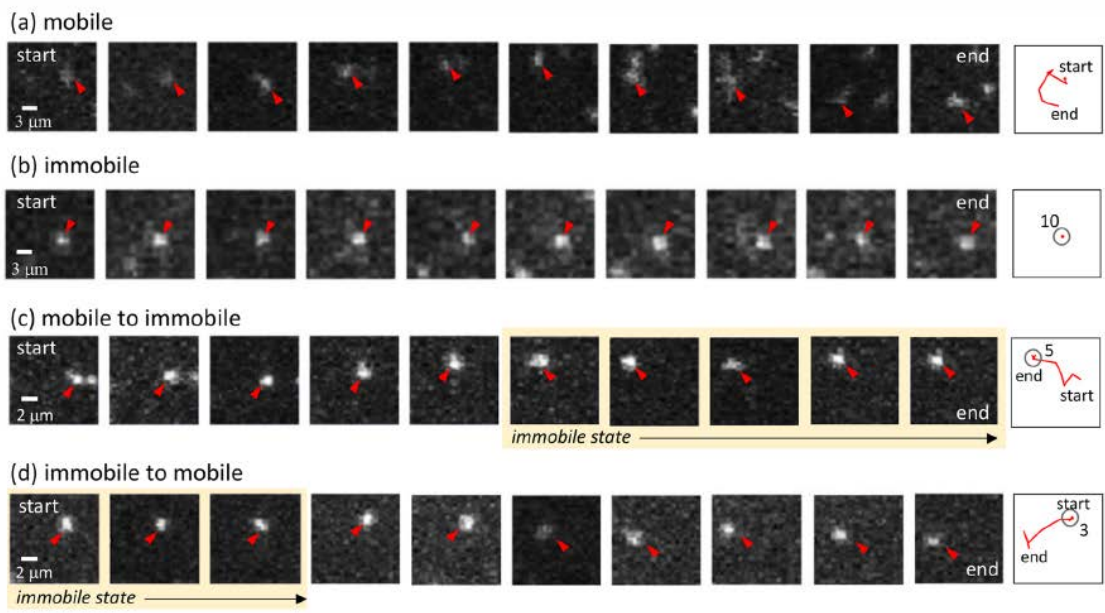
D : 拡散係数
 α : 拡散異常指数

- $\alpha > 1 \Rightarrow$ 異方性拡散
- $\alpha = 1 \Rightarrow$ ブラウン拡散
- $\alpha < 1 \Rightarrow$ 閉じ込め拡散

拡散係数は低下しているが、等方拡散は維持されている

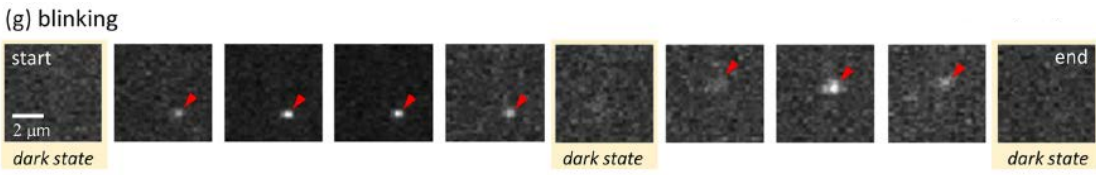
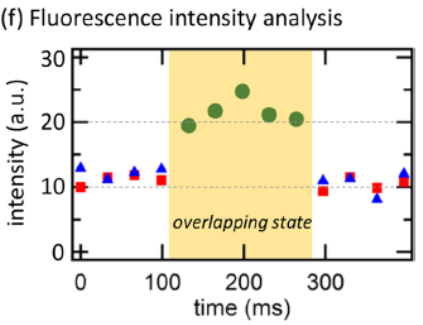
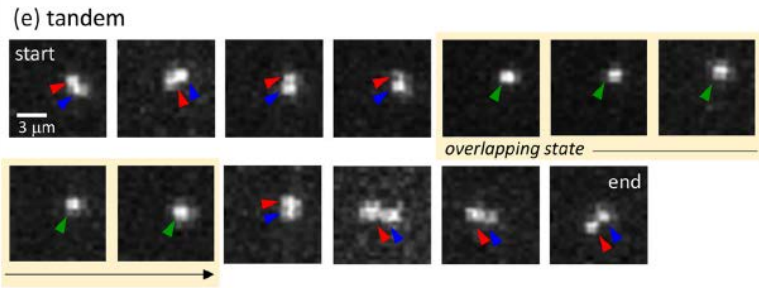
\Rightarrow ランダムな 拡散抑制状態 (SEC?) の形成

異常拡散成分

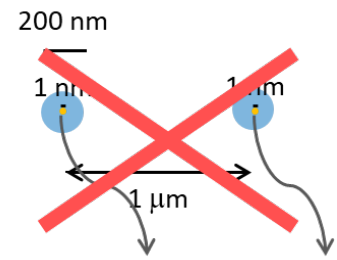


TR-DHPE単体またはSECが欠陥にトラップ

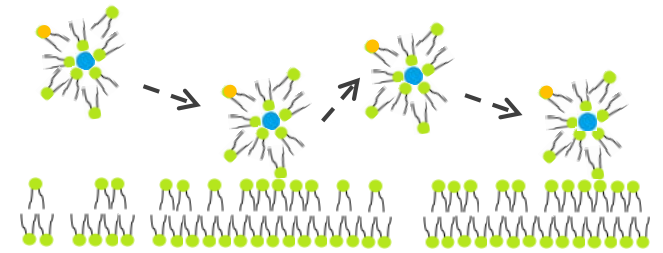
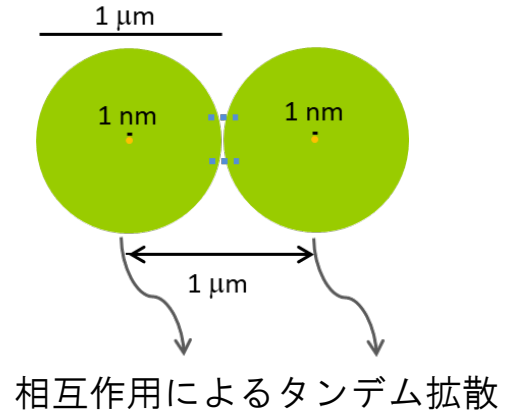
異常拡散成分



TR-DHPEの場合



SECの場合



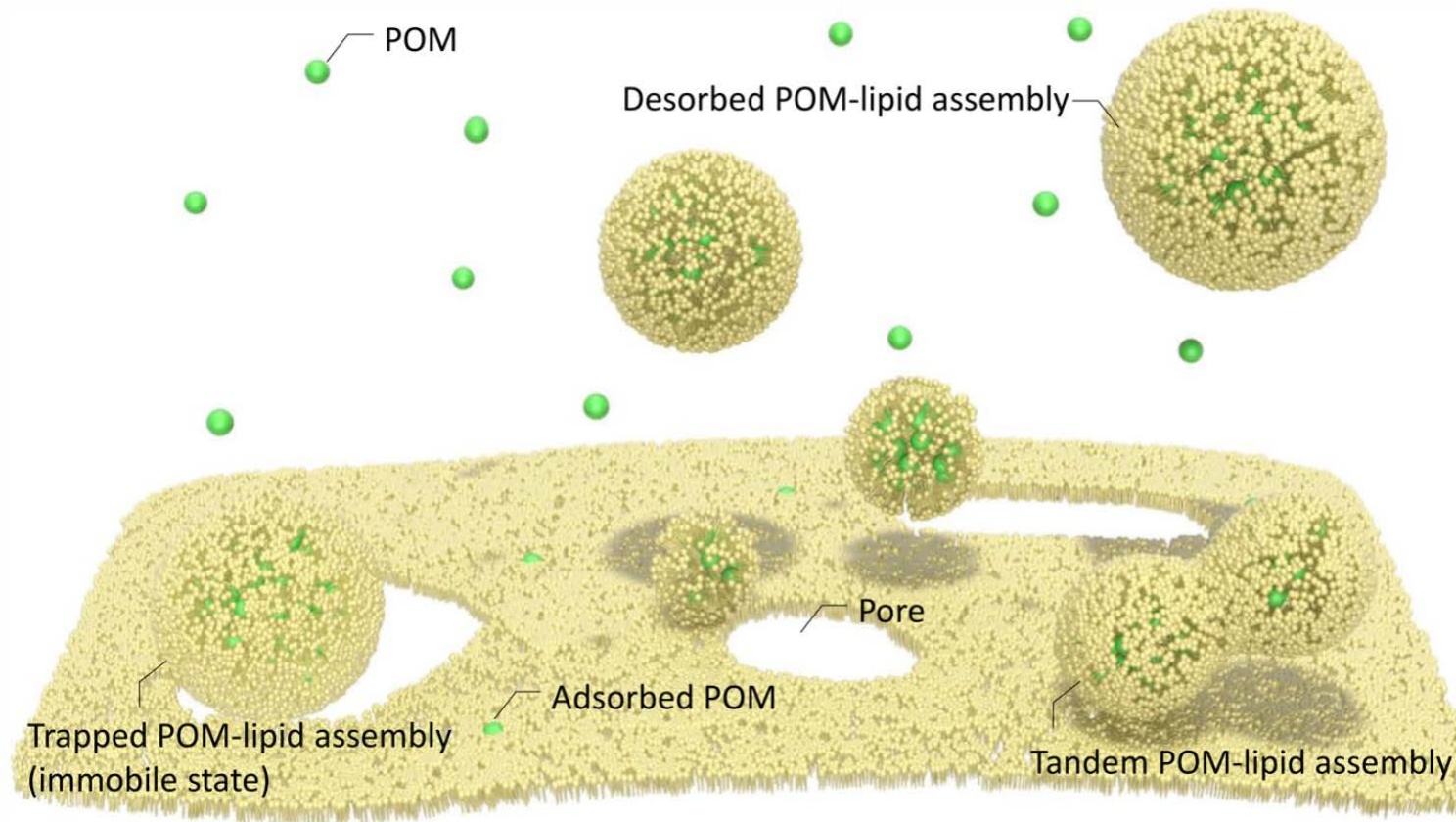
二重膜界面でのSECの逐次的脱離・吸着

TR-DHPEではなくSECによる拡散挙動を確認

⇒ POMが脂質分子との会合体SECを形成

Effect of POM to lipid membrane

POM has both macroscopic and microscopic effect on the lipid diffusivity in the membrane, offering novel function as **membrane-targeting bioactive nanomaterials**.



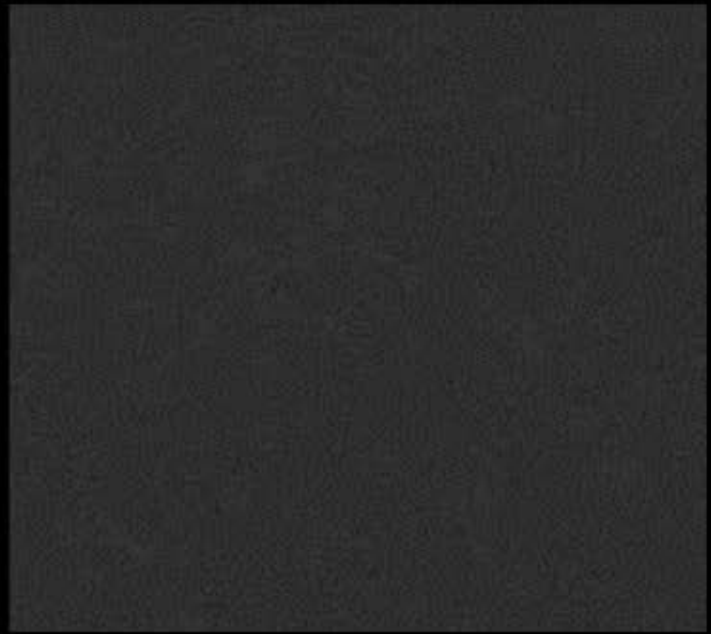
脂質二重膜に吸着したPOMが脂質分子との自己組織的な再構成を誘起し、[水溶性SECへと転移し脱離する](#)ことで細胞膜を崩壊

Dynamic re-organization from bilayer to myelin by POM

Fluorescence microscope imaging

POM: $\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}^{4-}$ lipid: solid-supported egg-PC bilayer doped with dye-labeled lipid

× 2.7 speed



10 μm

flat bilayer to tubular myelin
constructive re-organization



50 μm

collapse of cell-sized lipid aggregate
destructive re-organization

まとめ

- ✓ 脂質分子との静電氣的相互作用が膜構造の自己組織的变化を誘発
- ✓ 相界面など熱力学的に特異かつ構造揺らぎの大きな部位に対して選択的に相互作用する
- ✓ 水溶性のPOM-脂質会合体を構築し膜から脱離することで細胞膜崩壊を誘発

特定の無機クラスターは細胞膜の化学的・熱力学的性質を認識因子としたmembrane-targeting nano-medicineとしての機能性を有し、独自の作用機構で微生物（細胞膜）との相互作用を形成させることが可能となる。