

氏 名 Saree Phongphanphanee

学位（専攻分野） 博士（理学）

学位記番号 総研大甲第 1189 号

学位授与の日付 平成 20 年 9 月 30 日

学位授与の要件 物理科学研究科 機能分子科学専攻
学位規則第 6 条第 1 項該当

学位論文題目 Conduction Mechanism of Aquaporin Channels Studied
by the Statistical Mechanics of Liquids

論文審査委員 主 査 教授 桑島 邦博
教授 平田 文男
教授 齋藤 真司
准教授 米満 賢治
教授 木寺 詔紀（横浜市立大学）

論文内容の要旨

Aquaporins (AQPs), known as the water channel, are membrane proteins that can conduct water across cell membrane. Then they play an important role to maintain the homeostasis of a cell. AQPs function not only as a water channel, but several members in the aquaporin family are also permeable by glycerol, urea, ammonia and other molecules. In spite that intensive efforts have been devoted to clarify the molecular mechanism of the aquaporin functions, there are many questions remained unanswered. Among the questions, the followings are most sharply focused in the experimental and as well as theoretical studies: 1) What is the role of R189 in the gating mechanism of aquaporins? 2) Why protons do not permeate through the channels, while water does? 3) Why both cations and anions are prohibited to transmit through the channels? And 4) Do small molecules other than water, such as, CO₂ and NH₃, permeate through AQP1?

In the thesis work, he studied the molecular mechanism of aquaporin functions based on the RISM and 3D-RISM theories, and tried to answer the questions with respect to the molecular mechanism of aquaporins listed above. The RISM and 3D-RISM theories are the statistical mechanical integral equation theories of molecular liquids which have been developed by Hirata's group. The theories enable one to calculate the three dimensional distribution of water as well as other solute molecules around and inside a protein in aqueous solution.

For study the gating mechanism, he had calculated the distribution of water in AQPZ by using the RISM/3DRISM method. The positions of the water molecules inside some cavities of the protein, which have not been identified by the experiments, are also reported. The density profiles of water inside the channels with four different conformations, one open and three closed, have demonstrated good agreement with the experimental data. The water molecules distribute continuously along the channel in the open conformation, whereas the distributions in the closed conformations are interrupted by the gap at the location of the side chain R189. The results indicate that water cannot pass through the AQPZ channel in its close conformation. The results confirm the experimental postulate for the role of R189 in the gating mechanism of AQPZ.

The mechanism underlying the proton exclusion from AQP1 and GlpF has also elucidated in this work. It is found that the mechanisms to exclude the proton transport through AQP1 and GlpF are different. In AQP1 the hydronium ion is banned in a wide area, from the NPA region to the SF region, which is equivalent with the existence of the high positive barrier in the potential mean of force (PMF) along the entire channel. The proton cannot transport across this barrier. The high positive electrostatic potential is the primary cause to the high positive barrier in PMF. In GlpF, the electrostatic potential inside the channel is not as high as in AQP1. Hydronium ions can be distributed almost throughout the channel except the SF region; there is a small gap of distribution of hydronium ion at this region. The electrostatic potential itself cannot completely prevent protons from transportation because a proton may jump across the gap of distribution around SF area due to the Grothuss mechanism. His analysis of the distribution functions has clarified that the hydrogen-bonded chain of water in the channel was disrupted due to the bipolar coordination of water molecules to the atoms in the side chains, which in turn interrupts the Grothuss

mechanism to take place. It was concluded that the two mechanisms, electrostatic repulsion and bipolar coordination of orientation of water, are the causes to prevent the proton from transporting in GlpF.

In order to clarify the mechanism of ion exclusions from AQP1 and GlpF, he has calculated the distribution functions and PMF of ions, including cations, sodium and hydronium ions, and anion, chloride ion, in both channels. The distributions and PMF of both cations are similar. The results indicate that different mechanisms are working on the exclusion of cations and anion. In AQP1, there is a large gap in the distribution of each cation, spanning from SF to NPA regions. The gap in the distribution is equivalent to the high positive potential in PMF. The cations are excluded from the channel due to this high potential barrier. The essential cause of the barrier is the electrostatic field produced by protein. For the case of anion, the gap in the distribution is much narrower than the cations, which is limited at the SF region. This gap in the distribution corresponds to a high positive potential in PMF. Unlike the case of cations, the barrier is created by the steric effect due to the bulkiness of the ion, not by the electrostatic repulsion between the ion and channel atoms. Unlike AQP1, the distribution of cations in GlpF has three large minimums, corresponding to the three positive barriers in PMF. The height of the barriers is lower than those in AQP1 due to weaker electrostatic potential inside the channel. These barriers prevent the cations from transmitting across the channel. On the other hand, PMF of the anion is negative throughout the channel, and it has a deep well at the SF region. This result suggests another mechanism for the exclusion of ion transport through the channel. The anion is trapped at the SF region due to the strong electrostatic "attraction," which prevents the ion from permeating across the channel

To know whether the gas molecules can permeate through AQP or not, he has presented the results of the distribution and PMF of CO₂ and NH₃ in both central channel and water channel of AQP1. The results show that CO₂ and NH₃ cannot permeate through the central channel of the tetramer. In the water channel, the distribution function of CO₂ is discontinuous; it is interrupted by a gap. The corresponding PMF show a very high positive potential barrier at the gap area. The results suggest that CO₂ is prevented from transporting through the water channel. The distributions of NH₃ is similar to that of water, however the PMFs of both are different at R197 area. At this area, PMF of NH₃ rises up to the peak whereas that of water falls down to the minimum. The height of the peak of PMF of NH₃, ~2.5 kJ/mol, is similar to the thermal energy. It suggests that NH₃ has possibility to transport through the channel, although its permeability is lower than water.

In conclusion, he has applied the statistical mechanics theories of liquid to explore the mechanism of transportation of solute through the AQPs. The result of distribution of water in AQPZ give a good agreement with experimental data, and confirm the role R189 side chain on opening and closing channel. He also clarified the mechanism of proton and ions exclusion in AQPs, and proposes the new mechanism to prevent anion to transport through GlpF. Furthermore, he also showed that NH₃ can permeate through AQP1 but CO₂ can not.

論文の審査結果の要旨

本論文はアクアポリンによる低分子（水、炭酸ガス、アンモニア）やイオンの伝達機構を液体の統計力学（RISM/3D-RISM）に基づき解析したものである。本論文は以下の各章より構成される。

第1章は本論文の序章であり、生体内におけるアクアポリンの構造、機能、その分類、さらにはその研究における未解決課題などを含む本研究の位置づけおよびその背景が詳しく述べられている。

第2章は本研究で使う方法論である RISM/3D-RISM 理論に関する簡単な説明に当てられている。

第3章はアクアポリンのゲーティング（弁の開閉）機構に関する理論的解析が述べられている。アクアポリンチャンネルには選択的フィルター（SF）領域と呼ばれる狭隘な領域があり、その近傍にあるアルギニンの側鎖の構造変化がゲーティングに関わっていると考えられている。本論文ではチャンネル（AQPZ）内部の水分子の分布を 3D-RISM 理論により求め、その分布と SF 領域にあるアミノ酸残基（R189）のコンフォメーションとの相関を明らかにした。それによると、R189 がチャンネル中心から外側に配向した構造（開構造）では水分子が概ねチャンネル内全体に分布しており、この構造が水分子を通すことを示している。一方、R189 がチャンネル中心に向かって配向した構造（閉構造）では水分子は SF 領域で大きなギャップをもっており、水分子の透過が遮断されることを示している。これらの結果から、R189 の構造揺らぎが AQPZ のゲーティング機構に関わっていると結論した。第4章ではアクアポリンのプロトンに対する選択的な排斥機構について述べられている。アクアポリンのプロトン排斥機構には次の二つのモデルが提案されている。一つはプロトンジャンプ阻害機構であり、他はチャンネル内静電場による静電的反撥機構である。本論文では二種類のアクアポリン（AQP1, GlpF）チャンネル内部のヒドロニウムイオン(H_3O^+)の分布を 3D-RISM 理論により求め、これらのチャンネルのプロトン排斥機構を解明している。まず、AQP1 ではチャンネルの正の電場による反撥のためヒドロニウムイオンはチャンネル内にほとんど存在しない。したがって、この大きな静電反撥力がプロトン排斥機構の本質的要因であると考えられる。一方、GlpF の場合、静電場が比較的弱く、ヒドロニウムイオンは SF 領域を除くチャンネル内部に広く分布している。しかしながら、この場合は NPA 領域にある一個の水分子がふたつのアルギニンと水素結合をつくることによりプロトンジャンプ機構が阻害される。すなわち、SF 領域ではヒドロニウムイオンとしての拡散が排斥され、NPA 領域ではプロトンジャンプ機構が排除される。以上が GlpF のプロトン排斥機構であると結論している。

第5章ではイオン (Na^+ , Cl^-) の透過可能性について解析を行っている。アクアポリンは正、負の両イオンを通さないことが実験的に知られている。本論文では AQP1 および GlpF チャンネル内の Na^+ および Cl^- の分布および平均力ポテンシャルを 3D-RISM 理論で計算し、イオンの透過機構について考察を行った。まず、 Na^+ については、両チャンネルとも内部の静電ポテンシャルが正であり、 Na^+ イオンが静電的には排除されるためにチャンネルを通過できない。一方、 Cl^- イオンは、静電的な引力によって、チャンネル内に安定に存在することができる。それでは、何故、アクアポリンはこのイオンを透過しないのか？本論文はその

物理的理由が AQP1 と GlpF では全く異なることを明らかにした。AQP1 はチャネルの内径が小さいため比較的大きなサイズをもつ Cl⁻ はフィルター領域 (SF) で「幾何学的反発」によって遮断される。一方、GlpF では Cl⁻ イオンはチャネル内部の強い静電引力によって捕捉されるため、チャネルを通過できない。

第6章では AQP1 の炭酸ガスおよびアンモニアの透過可能性について解析を行っている。AQP1 の CO₂ および NH₃ の透過可能性についてはいくつかの実験的研究が行われているが、その結果には多くの矛盾がある。本研究で AQP1 内部の CO₂ および NH₃ の PMF を 3D-RISM 理論を求めたところ、CO₂ の PMF は SF 領域で大きな障壁を持っているためチャネルを透過しない。一方、NH₃ のそれは熱運動エネルギー以下の小さな障壁しかもたないため、チャネルを通過する可能性があることを示唆している。

第7章では3-6章の結果を要約すると同時に、3D-RISM 理論がアクアポリンによる低分子やイオンの透過の分子機構解析にとって有効であると結論している。

本論文はアクアポリンによる分子（水、炭酸ガス、アンモニア）やイオンの伝達機構を液体の統計力学 (RISM/3D-RISM) に基づき解析した最初の論文であり、その先駆性は高く評価される。所属研究室 (平田グループ) にはアクアポリンに関する研究蓄積が全くなかったにも関わらず、自ら研究の位置づけと問題の設定を行って、研究を実施し完成させたことは高く評価される。これらの研究成果は既報 (2編) および印刷中 (1編) の論文計3編に発表されている。本論文は理論生物物理の発展に多大な寄与をなすものであり、審査員一同は本論文が博士 (理学) の学位論文として十分であると判断した。