Title	アクアポリン6のアニオン透過メカニズムの解明
Sub Title	Anion permeation mechanism of aquaporin 6
Author	山本, 詠士(Yamamoto, Eiji)
Publisher	
Publication year	2020
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2019.)
JaLC DOI	
Abstract	膜貫通タンパク質であるアクアポリンによる分子の選択的透過機構を分子レベルで明らかにするために，分子動力学シミュレーションを行った．アニオンチャネルとして知られるアクアポリン6は実験による立体構造の報告がないため，タンパク質立体構造予測法によって構造をモデル化した．モデル化したタンパク質構造の生体膜中における安定性をシミュレーションにより確認した．さらに，塩化物イオンの透過経路を特定し，イオン透過時の透過経路内への水分子の充填が重要であることを分子レベルで明らかにした． Molecular dynamics simulations were performed to elucidate the molecular mechanism of selective permeation of molecules through aquaporins. The structure model of aquaporin 6, which is known as an anion channel, was predicted by a homology modeling because its structure has not been reported experimentally. The stability of the predicted protein conformation in a biological membrane was confirmed by simulations. Furthermore, we clarified the permeation pathway of chloride ions in the aquaporin 6, and that the packing of water molecules into the permeation pathway is important for the ion permeation event.
Notes	研究種目：若手研究 研究期間：2018～2019 課題番号：18K13517 研究分野：生物物理
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_18K13517seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　２ 年　 ５ 月 ２８ 日現在

機関番号：３２６１２
研究種目：若手研究
研究期間：2018～2019
課題番号：１８Ｋ１３５１７

研究課題名（和文）アクアポリン6のアニオン透過メカニズムの解明

研究課題名（英文）Anion permeation mechanism of aquaporin 6

研究代表者
山本　詠士（Yamamoto, Eiji）

慶應義塾大学・理工学部（矢上）・助教

研究者番号：００７７９３４０

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,200,000円

研究成果の概要（和文）：膜貫通タンパク質であるアクアポリンによる分子の選択的透過機構を分子レベルで明らかにするために，分子動力学シミュレーションを行った．アニオンチャネルとして知られるアクアポリン6は実験による立体構造の報告がないため，タンパク質立体構造予測法によって構造をモデル化した．モデル化したタンパク質構造の生体膜中における安定性をシミュレーションにより確認した．さらに，塩化物イオンの透過経路を特定し，イオン透過時の透過経路内への水分子の充填が重要であることを分子レベルで明らかにした．

研究成果の学術的意義や社会的意義
立体構造予測法および分子動力学シミュレーション法を実験による立体構造の報告がない膜貫通タンパク質へ適応し，タンパク質による分子の選択的透過機構を分子レベルで明らかにしたことは，学術的意義がある．アクアポリンは高速かつ選択的な分子透過を実現している膜貫通タンパク質であり，そのようなタンパク質の分子透過機構の解明は，淡水化技術への応用を見据えたナノスケール細孔の開発にも繋がり，学術的・社会的に意義がある．

研究成果の概要（英文）：Molecular dynamics simulations were performed to elucidate the molecular mechanism of selective permeation of molecules through aquaporins. The structure model of aquaporin 6, which is known as an anion channel, was predicted by a homology modeling because its structure has not been reported experimentally. The stability of the predicted protein conformation in a biological membrane was confirmed by simulations. Furthermore, we clarified the permeation pathway of chloride ions in the aquaporin 6, and that the packing of water molecules into the permeation pathway is important for the ion permeation event.

研究分野：生物物理

キーワード：アクアポリン　分子動力学計算　分子透過　細胞膜　浸透圧　アニオン透過　水透過　タンパク質立体構造予測

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９（共通）

１．研究開始当初の背景

現在，哺乳類が持つアクアポリン（AQP）は 13 種類（AQP0-AQP12）が同定されており，ほとんどの AQP は水分子のみを選択的に透過させるが，中には水分子以外の低分子（グリセロール，過酸化水素水，アンモニア，イオンなど）を透過させるものが存在する．特に，AQP6 は，アニオンを選択的に透過させるアニオンチャネルとして知られている[文献①]．AQP6 は，他の AQP に共通している膜貫通 α ヘリックスの 2 番目に存在するグリシン（GLY）が，アスパラギン（ASN）である点が特徴的である（図 1）．この ASN が GLY に変異した AQP6 は，中性条件下（pH7.5 程度）において，アニオンの透過性が阻害され，水分子の透過性が上がるという性質がある[文献②]．また，酸性条件下（pH4.0 程度）において，AQP6 の水分子・アニオン透過性が共に増加することが明らかになっている．しかし，AQP6 に関するタンパク質の立体構造の報告がないため，上記で述べた AQP6 のアニオン透過に関する分子機構は一切明らかになっていなかった．

２．研究の目的

本研究では，AQP6 のアニオン透過機構を分子レベルで解明することを目的とし，コンピュータによって予測した AQP6 の立体構造を用い，AQP6 の生体膜中におけるアニオン・水分子透過現象を分子動力学（MD）シミュレーションによって解析した．

３．研究の方法

（1）AQP6 の立体構造モデルはテンプレートベースモデリング法によって予測した（図 1）．予測した立体構造の妥当性を検証するために，AQP6／生体膜／水分子／イオン系の 1 マイクロ秒の平衡 MD シミュレーションを行った．AQP は生体膜中で 4 量体を形成するため，4 量体を形成させシミュレーションを行った．

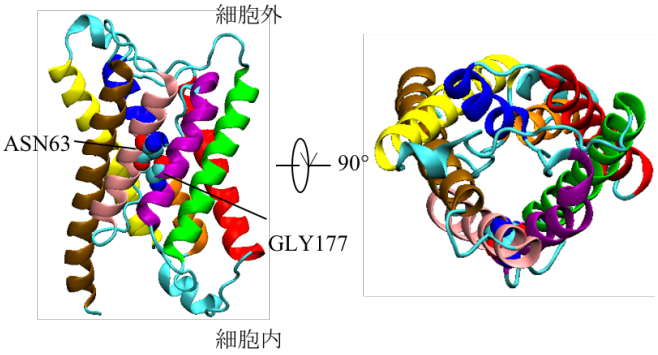

図 1 AQP6 の立体構造モデル（単量体）．

（2）AQP6 のイオン透過現象を観測するために，細胞内外のイオン濃度勾配を再現し，生体膜に電位差を生じさせる非平衡 MD シミュレーションを行った．通常の MD シミュレーションでは周期境界条件を使用しているため，上下，左右の境界が繋がっており，分子が移動する．そのため，細胞内外の分子の濃度勾配を維持することができない．イオンの濃度勾配を維持するために，生体膜を 2 枚設置し，イオン濃度が中心（溶液 A）と外側（溶液 B）で異なる系を構成し，非平衡 MD シミュレーションを行った（図 2）．濃度勾配を一定に保つために，イオンが溶液 A から溶液 B に（またはその逆方向に）AQP を透過して移動した場合，移動したイオンを確率的に移動前の溶液中水分子と入れ替え，イオンの濃度勾配を一定に保つシミュレーションを行った．生体膜の細胞外側と細胞内側に約 800 mV の電位差が生じる条件で，0.4 マイクロ秒のシミュレーションを行った．

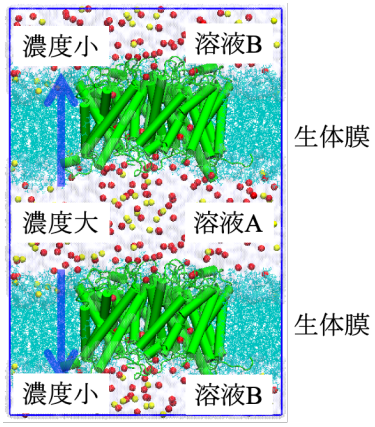

図 2 イオン濃度勾配下での非平衡 MD シミュレーション系．

４．研究成果

（1）予測された AQP6 のタンパク質構造は，実験によって結晶構造が得られている他の AQP に類似した構造となった．生体膜中における AQP6 の平衡 MD シミュレーションを 1 マイクロ秒行った結果，膜中においてもタンパク質構造は安定していた．膜貫通タンパク質の X 線結晶構造を用いた通常の MD シミュレーションにおいても、平均二乗偏差（RMSD）による解析では，同程度かそれ以上の構造変化を示すため，予測した構造が非常に安定であると考えられる．また，AQP 細孔内部への水分子の透過も確認された．しかし，イオン濃度勾配がなく濃度が均一な場合，酸性条件下においても野生型 AQP6 による塩化物イオンの透過現象は，シミュレーション時間内では観測されなかった．

（2）イオン濃度勾配があり生体膜に電位差が生じる非平衡 MD シミュレーションでは，酸性条件において野生型 AQP6 を塩化物イオンが透過した．特に，塩化物イオンはタンパク質 4 量体

で構成される中心細孔を透過することが分子レベルで明らかになった（図 3）．ASN63 が位置する部分から細胞外側にかけての領域が塩化物イオン透過の際の障壁となっており，塩化物イオンが透過する際には，その領域に水分子が充填されることがわかった．

（3）過去の実験研究［文献②]より，アミノ酸残基の変位（N63G）によってアニオンの透過性が阻害されることが知られているが，非平衡 MD シミュレーションでも同様に，アミノ酸変位型 AQP6（N63G）ではアニオン透過性が阻害されることを確認した．酸性条件では、0.4 マイクロ秒のシミュレーション時間内において，約 60 を超える塩化物イオンが AQP6 四量体の中心細孔を透過することを確認したが、中性条件では塩化物イオンの透過はほとんど確認されなかった。

（4）非平衡 MD シミュレーションから，アニオン透過現象において重要な pH 変化を検知するアミノ酸も同定した．

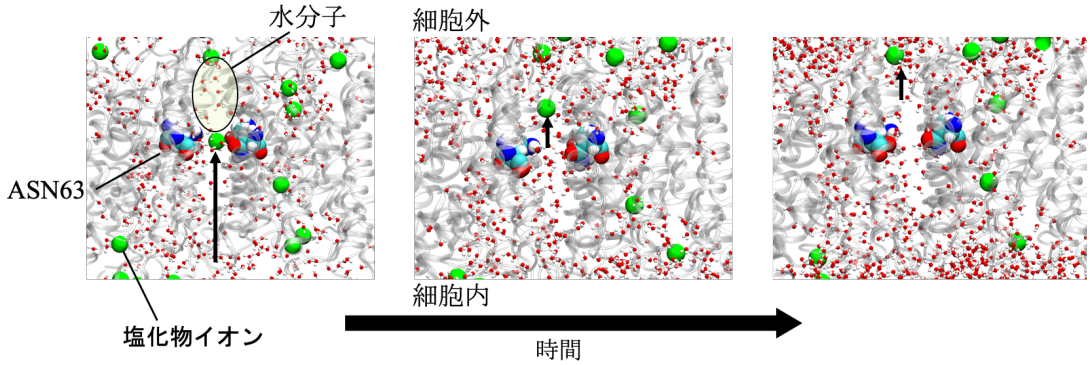

図 3 生体膜中 AQP6 の中心細孔を透過する塩化物イオン（緑色）．AQP6 の 4 量体は白色，水分子は赤色．

＜引用文献＞

① M. Yasui, A. Hazama, T.-H. Kwon, S. Nielsen, W.B. Guggino, and P. Agre, Rapid gating and anion permeability of an intracellular aquaporin, *Nature* **402**, 184-187 (1999).

② K. Liu, D. Kozono, Y. Kato, P. Agre, A. Hazama, and M. Yasui, Conversion of aquaporin 6 from an anion channel to a water-selective channel by a single amino acid substitution, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 2192-2197 (2005).

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計0件

〔学会発表〕　計5件（うち招待講演　3件／うち国際学会　1件）

１．発表者名 Eiji Yamamoto, Keehyoung Joo, Jooyoung Lee, Masato Yasui, Mark S.P. Sansom
２．発表標題 Molecular Dynamics Simulation Study of the Molecular Mechanism of Anion Permeation through Aquaporin-6
３．学会等名 The 2nd Pacific Rim Thermal Engineering Conference（国際学会）
４．発表年 2019年

１．発表者名 山本詠士
２．発表標題 分子シミュレーションによるアクアポリンの分子透過メカニズムの解明
３．学会等名 第13回In vivo実験医学シンポジウム ～アクアポリン研究の最前線～（招待講演）
４．発表年 2019年

１．発表者名 山本詠士
２．発表標題 生体膜における水分子の輸送現象をコンピューターシミュレーションによって可視化する
３．学会等名 機能性食品研究会講演会 第1回研究会「Water Biology 生命にとって大切な水」（招待講演）
４．発表年 2019年

１．発表者名 塚田拓大，佐藤洋平，菱田公一，安井正人，山本詠士
２．発表標題 分子動力学シミュレーションを用いたアクアポリンにおける水透過性の解明
３．学会等名 第32回分子シミュレーション討論会
４．発表年 2018年

１．発表者名 山本詠士
２．発表標題 分子動力学シミュレーションを用いた生体膜近傍における水分子ダイナミクスの解明
３．学会等名 MIMS/CMMA Mini Workshop「中枢神経系における水の膜輸送と流れの数理生理学」（招待講演）
４．発表年 2018年

〔図書〕　計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

―

６．研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考