

## 研究題目 マラリア原虫 malate-quinone oxidoreductase の触媒機構の解明

### 研究組織

研究代表者：伊藤 剛（愛媛大学大学院農学研究科）

共同研究者：篠原 康雄（徳島大学先端酵素学研究所）

研究分担者：

### 【1】研究の概要

#### [1-1] 本研究の目的・概要

マラリア原虫などの一部の病原微生物に分布するリンゴ酸-キノン酸化還元酵素（MQO）は、リンゴ酸の酸化とキノンの還元を触媒する膜タンパク質である。我々は最近、マラリア原虫 MQO が TCA 回路と呼吸鎖電子伝達反応を担うエネルギー代謝に重要なミトコンドリア酵素であることを、原生生物（真核生物）の MQO としては初めて、実験的に明らかにした [*Microbiol. Spectr.* 11 (2023) e00168-23]。

哺乳類や酵母の TCA 回路では可溶性の  $\text{NAD}^+$  還元型リンゴ酸脱水素酵素（MDH）が利用されるが、マラリア原虫ミトコンドリアには存在しておらず、代わりに MQO が利用される。また、両者はアミノ酸配列においても全く異なる。そのため、MQO は抗マラリア剤の有望な標的分子として期待できる。これまでにマラリア原虫 MQO（PfMQO）に対する阻害剤のスクリーニング研究が精力的になされ、また詳細な kinetics 研究によりその物理化学的な特性が明らかとなった。しかしながら、立体構造についての報告は未だなく、その触媒機構に関する知見は限られたままである。そこで本研究では、マラリア原虫ミトコンドリア MQO について、触媒部位を明らかにし、その触媒メカニズムを解き明かすことを目指した。

#### [1-2] 研究の方法・経過

本研究では、マラリア原虫 MQO（PfMQO）を発現させた酵母ミトコンドリアを実験材料として用いた。また、無水酢酸を用いた化学修飾法を合理的に適用し、PfMQO の構造的および生化学的解析を実施した。具体的には以下のように実施した。

＜リガンド接触可能領域の同定＞ 酵母ミトコンドリアに発現させた PfMQO のタンパク質表面に露出した求核性アミノ酸残基を無水酢酸によって網羅的にアセチル化した。アセチル化部位は LC-MS/MS 解析によって同定し、MQO の AlphaFold モデル上でリガンド接触可能部位としてマッピングした。これにより、モデル構造におけるタンパク質表面領域がマッピング結果と一貫している、すなわちモデル構造がおおむね正確であることを実験的に示した。

＜基質反応部位の探索と触媒メカニズムの解明＞ マッピング結果と MQO モデル構造を統合し、補酵素 FAD が結合する、かつ基質などのリガンドが接触可能な cavity を見出した。続いて、その cavity 周辺のアミノ酸残基について点変異解析を行った。各変異 MQO について酵素活性を測定し、変異の影響を調べることで、触媒部位を精密に解析した。さらに、リガンド接触可能部位および触媒部位に関する実験結果をモデル構造に照らし合わせ、酵素反応のメカニズムを考察した。

### 【2】研究成果

#### [2-1] 本共同研究で明らかになった研究成果

本共同研究では、古典的な化学修飾法によるタンパク質表面構造の解析、AI 予測によるモデル立体構造の構築、および点変異解析による触媒部位の解析を合理的に組み合わせることで、PfMQO の触媒メカニズムについて一定の知見を得た。補酵素 FAD や基質リンゴ酸の結合様式は、比較的相同性の高いグリセロール-3-リン酸化酵素（identity 23%; PDB 4X9M）や 2-ヒドロキシグルタル酸脱水素酵素（identity 22%;

PDB 8W78) で報告されているパターンと一貫している。これらの酵素における触媒メカニズムを参照するとともに、点変異解析の結果に基づき、リンゴ酸の酸化反応機構を提案した。

[2-2] 本共同研究による波及効果及び今後の発展性

MQO はマラリア原虫等の一部の病原性微生物に分布するエネルギー代謝酵素であり、有望な薬剤標的分子である。薬剤標的分子の機能メカニズムの解明は、創薬研究（ドラッグデザイン）の進展に資する。したがって、本共同研究により見出された MQO の触媒機構に関する知見は、MQO を標的として薬剤開発を進める上で重要な手掛かりとなる。

### 【3】主な発表論文等

[3-1] 論文発表

- 1) Takeshi Ito, Yuma Tojo, Minori Fujii, Kohei Nishino, Hidetaka Kosako, and Yasuo Shinohara. Insights into the mechanism of catalytic activity of *Plasmodium* parasite malate-quinone oxidoreductase. *ACS Omega* 9: 21647–21657, 2024.

[3-2] 学会発表

- 1) Yuma Tojo, Takeshi Ito, Minori Fujii, Kohei Nishino, Hidetaka Kosako, and Yasuo Shinohara. Identification of catalytic site of malate-quinone oxidoreductase. 第 15 回日本生物物理学会 中四国支部大会, 徳島大学, 5 月 25 日, 2024 年

[3-3] 成果資料等

### 【4】今後の課題等

今後の課題、その他等

本共同研究により、リンゴ酸の酸化反応機構について一定の知見が得られた。しかしながら、電子受容体であるキノンの結合部位や還元反応機構については未だ知見が限られたままである。MQO における触媒メカニズムの全容解明のため、キノンの結合様式の同定を達成しなければならない。