

等温滴定カロリメトリーを用いたフルオロ酢酸デハロゲナーゼによる脱ハロゲン化反応の速度論的パラメータの算出

(長浜バイオ大バイオサイエンス¹・京大エネ研²) ○中村 卓¹・塩田 雄大¹・中田 栄司²・森井 孝²

Determination of kinetic parameters of dehalogenation reaction catalyzed by fluoroacetate dehalogenase using isothermal titration calorimetry (¹*Bioscience, Nagahama Institute of Bio-Science and Technology*, ²*Institute of Advanced Energy, Kyoto University*) ○ Takashi Nakamura,¹ Yuudai Shioda,¹ Eiji Nakata,² Takashi Morii²

Monofluoroacetate dehalogenase (MFADEX) from *Burkholderia* sp. catalyzes the dehalogenation reaction of monofluoroacetate (MFA) with a very stable C-F bond more efficiently than that of monochloroacetate (MCA). Meanwhile, haloacid dehalogenase L-DEX YL catalyzed the dehalogenation reaction of MCA much more efficiently than MFA. To elucidate this MFA-specific reaction mechanism of MFADEX, we determined the kinetic parameters of the dehalogenation reaction of MFADEX to MFA and MCA using an isothermal titration calorimeter. As a result, the kinetic parameters of MFA-DEX against MFA and MCA at 30°C, pH 9.5 were determined as follows: K_m and k_{cat} , 10.7 ± 1.0 mM, 20.9 ± 3.6 sec⁻¹ for MFA and 34.0 ± 8.0 mM, 1.4 ± 0.2 sec⁻¹ (n=5) for MCA. The K_m value for MFA was comparable to that determined by colorimetric assay (5.1 mM).¹⁾ Thus, the decrease in k_{cat} is the main reason for the decrease in the dechlorination reaction by MFADEX. No product inhibition was observed in both MFADEX reactions, but product inhibition was observed in the L-DEX YL defluorination reaction.

Keywords : Monofluoroacetate dehalogenase; Isothermal titration calorimetry; Monofluoroacetate; Monochloroacetate; kinetic parameter

Burkholderia sp. FA1 由来のフルオロ酢酸デハロゲナーゼ (MFA-DEX) は、C-Cl 結合を有するモノクロロ酢酸 (MCA) よりも強固な C-F 結合を有するモノフルオロ酢酸 (MFA) を効率よく分解する。一方、これまで研究してきた *Pseudomonas* sp. 由来のハロ酸デハロゲナーゼ L-DEX YL は MCA を良く分解できるものの MFA を分解する力は非常に弱い。そこで我々は、等温滴定カロリメーターを用いて MFADEX の MFA と MCA に対する速度論的パラメータを決定し、MFA-DEX が MFA を MCA より分解できる理由を考察することにした。その結果、pH 9.5、30°C の条件で MFA-DEX の MFA 分解反応に対する K_m , k_{cat} は 10.7 ± 1.0 mM, 20.9 ± 3.6 sec⁻¹ (n=5) となり、比色定量で得られた文献値¹⁾の K_m (5.1 mM) とほぼ同程度の値となった。また、pH 9.5、30°C における MCA 分解反応に対する K_m , k_{cat} は 34.0 ± 8.0 mM, 1.4 ± 0.2 sec⁻¹ (n=5) となり、 k_{cat} の低下が MCA に対する活性低下の主な原因であった。なお、両者の反応で、L-DEX YL の MFA 分解反応で確認された生成物阻害は観測されなかった。

1) Purification, characterization, and gene cloning of a novel fluoroacetate dehalogenase from *Burkholderia* sp. FA1. T. Kurihara, T. Yamauchi, S. Ichiyama, H. Takahata, N. Esaki, *J. Mol. Catal. B: Enzymol.* **2003**, 23, 347.