

パパインの反応機構について

その反応動力学定数による推定

河 邊 誠 一 郎*

(昭和52年9月16日受理)

緒 言

酵素パパインの反応機構については、これまで合成基質を用いた様々な研究^{1)~8)}がなされてきている。これまでの報告を総合するとパパインの反応機構は2段階の触媒プロセス機構という点で一致している。すなわち、キモトリプシンの場合と同様、アシル化と脱アシルであり色々な基質について総反応速度定数が決定されている⁹⁾。また合成基質に対する活性基はSH基と、COOH基¹⁰⁾であり、アクティブサイト中にヒスチジンが存在するという事がわかっている^{11),12)}。しかし、このパパインも、その反応機構については、まだ十分はっきりした事は、わかっていない。そこで、以上の事を参考にしながらパパインの動力学定数のpH変化を測定し、得られた知見をもとに酵素活性発現に必須のパパインの活性解離基について検討すると共にパパインの反応機構を推定した。

実 験 方 法

1. 試料 a) 酵素：酵素パパインは東京化成工業(株)製の粉末パパインを使用した。この酵素の分析値は明らかではないが、Kjeldahl法¹³⁾およびLowry-Folin法¹⁴⁾よりこの蛋白純度を測定した結果、約20%であった。実験に際してはこの酵素粉末を緩衝液に溶解し不溶物質を口過除去した粗酵素液を用い精製は行わなかった。

b) 基質：主にプロテアーゼ活性の測定にカゼイン(乳製、純正化学製、MW:40,000)を、アミダーゼ活性の測定にはN- α -Benzoyl-DL-arginine-p-nitro anilide hydro-chloride(以下BAPAと略す)(純正化学製)を用いた。この他にエステラーゼ活性の測定にN- α -Benzoyl-L-arginine ethyl ester hydro chloride(以下BAEEと略す、BDH chemi Ltd製)およびN-Benzoyl-L-tyrosine ethyl ester(以下BTEEと略す、BDH chemi Ltd製)も使用した。BAEEは水に易溶、BTEEおよびBAPAは水に難溶なためジメチルスルフォキシド(以下DMSOと略す)に完全に溶解した後緩衝液に溶解させた(DMSO各々10%、5%含有)。なおBAPAはDL混合物であるため、これより得られる動力学定数は見掛けの値である。

c) 酵素活性化剤：未処理状態のパパインは非常に低い酵素活性しか示さない。そこで

* 岡山理科大学基礎理学科

酵素反応に際して、1mlの酵素活性化剤溶液（0.01Mシスチン+0.004MEDTA含有緩衝液）で15分間以上活性化を行った。

2. 酵素活性測定法：パパインのプロテアーゼ活性（基質カゼイン）の測定には Kunitz 法¹⁵⁾を、アミダーゼ活性（基質 BAPA）の測定には410nmにおける比色法を、更にエステラーゼ活性（基質 BAEE, BTEE）の測定には pH スタット法¹⁶⁾を用いた。

a) 基質カゼイン使用による Kunitz 法：パパイン存在下でカゼインの加水分解により生成する低分子分解生成物（トリニトロ酢酸に可溶性物質）を全てL-チロジンとしてその280nmにおける紫外吸収を測定することにより定量しプロテアーゼ活性の目安とした。

b) 基質 BAPA 使用による比色法：パパインの存在下で BAPA のアミド結合の開裂により生じるp-ニトロアニリンを比色定量（410nm）¹⁷⁾することにより定量しアミダーゼ活性の目安とした。

c) 基質 BAEE, BTEE 使用による pH スタット法：パパイン存在下で BAEE, および BTEE のエステル結合の開裂により生じるフリーのカルボキシル基の pH スタットによる滴定により定量しエステラーゼ活性の目安とした。

しかし本実験では滴定剤として使用した NaOH が低濃度であり空气中的 CO₂ ガスの影響が大きく、これら基質による測定値は参考程度に示した。

なお、反応停止剤にはカゼインの場合、5%トリルロク酢酸、その他は30%酢酸水溶液を用いた。

結果と考察

1. 異種の基質に対する最適 pH

基質にカゼインと BAPA を使いパパインの基質に対する最適 pH がどのように変化するかをしらべ、その比活性を求めた。その結果を図1に示す。基質カゼインの場合、パパ

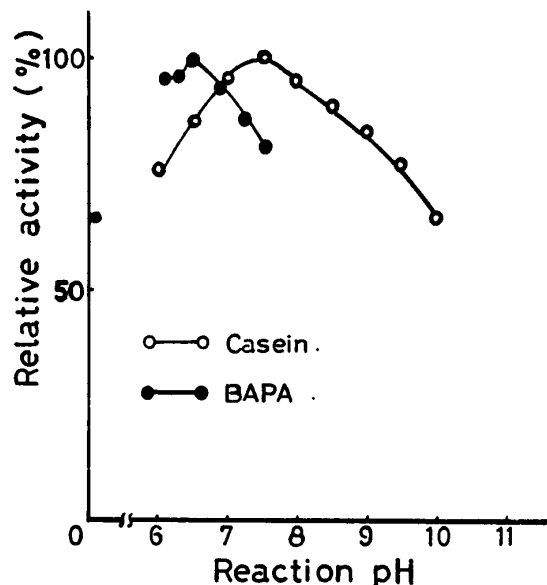


Fig. 1. Effect of reaction pH on relative activity of papain.

インの最適 pH は7.6前後、基質 BAPA の場合、最適 pH は6.5前後であり基質によりパパインの最適 pH が異っている。

一般的に最適 pH は酵素活性発現に必須の活性解離基（通常 2 個）の pK 値 (pK_1, pK_2) の中間値となるのでこの結果からカゼインの場合と BAPA の場合とではパパインの活性解離基が異なるのではないかと考えられた。

2. 各種基質に対する反応初速度

4 種類の基質の反応初速度を比較し基質特異性についてしらべた。すなわち、a) 基質にカゼインを用い反応酵素量を変化させ pH7.6, 40°C, 20分間酵素反応を行ない生成チロジン量を測定した。b) 基質に BAEE を用い pH7.5, 40°Cで同様に生成 N- α -ベンゾイル-L-アルギニン量を求めた。c) 基質 BTEE を用い pH7.4, 40°Cで同様に生成 N-ベンゾイル-L-チロジン量を求めた。d) 基質 BAPA を用い pH6.8, 35°Cで同様に反応を行ない生成 p-ニトロアニリン量を測定した。その結果、各種基質と反応初速度の関係は表 1 のようになった。なお基質カゼインについては、反応初速度の定義が他の合成基質の場合と異なるので、ここでは比較検討の対象からはずした。

Table 1. Relationship between each substrate and reaction initial velocity of papain.

Substrate	Reaction initial velocity
Casein	3.08×10^{-6} M-tyr/mg•E•min
BAEE	94.2×10^{-8} M-BA/mg•E•min
BTEE	14.3×10^{-8} M-BT/mg•E•min
BAPA	1.19×10^{-8} M-PNA/mg•E•min

BAEE : N- α -Benzoyl-L-arginine ethyl estel hydrochloride.

BTEE : N-Benzoyl-L-tyrosine ethyl ester.

BAPA : N- α -Benzoyl-DL-arginin-p-nitroanilide hydrochloride.

BAEE と BTEE の反応初速度の大きさは BAEE>BTEE でありこの点からは、パパインは側鎖の大きなアミノ酸より、塩基性アミノ酸のカルボキシル側のエステル結合を開裂しやすいことがわかる。BAEE と BAPA を比較すると BAEE>BAPA であり反応初速度の比較からは、パパインはアミド結合よりもエステル結合を開裂しやすいことがわかった。

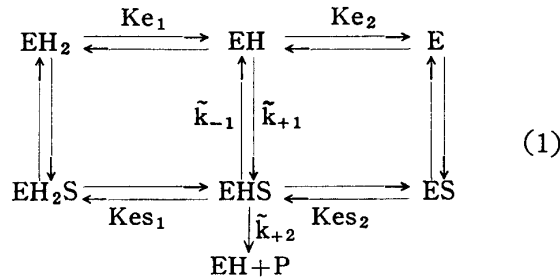
3. 活性解離基の推定

前項で得られた結果を裏づけるため、反応 pH を変化させて動力学定数 (K_m, V_{max}) を求め Dixon プロットを作成し基質カゼインおよび BAPA に対するパパインの活性解離基を推定した。次に解離基の役割を推定する 1 つの手掛りとなる pK_e, pK_{es} 値を求めるために必要な Dixon プロットに関する説明を L. Michaelis¹⁸⁾, M. Dixon¹⁹⁾, K. J. Laidler²⁰⁾, 小野²¹⁾, らの反応速度論を参考に述べる。

酵素反応の速度を pH に対して図示すると多くの場合、ある pH で極大をもつほぼ左右

対称釣鐘形になることは酵素反応の大きな特徴とされている。この pH 依存性は水溶液中の酵素分子が多く解離基をもつ両性イオンであり、pH の変化によってそれらの解離状態が変化するが、その中の少数（通常 2 ケ）の特定の解離基の特定の解離状態が反応のために必要であると考えて説明することができる。

いま酵素の活性に関係ある 2 個の解離基に着目し、その pK 値の小さいものを B、大きいものを A であらわすと、それらの解離状態は pH の増加に伴って (AH, BH) → (AH, B) → (A, B) と変化する。これらの解離状態にある酵素をそれぞれ EH₂, EH および E で表わし、いずれもが基質 S と結合して複合体を作りうるが、その中で EHS だけが生成物を生じるとすると、次の模式がかかる。



\tilde{k}_{+1} , \tilde{k}_{-1} , \tilde{k}_{+2} は模式図中に示したように pH に依存しない速度定数を、 K_{e_1} , K_{e_2} はそれぞれ基質と結合していない遊離の酵素における解離基 [A], [B] の水素イオンの解離定数を、 $K_{e_s_1}$, $K_{e_s_2}$ はそれぞれ基質と結合した酵素における、それらの解離基の解離定数を表わす。すなわち、

$$\left. \begin{aligned}
 K_{e_1} &= \frac{[\text{EH}][\text{H}]}{[\text{EH}_2]}, & K_{e_2} &= \frac{[\text{E}][\text{H}]}{[\text{EH}]} \\
 K_{e_s_1} &= \frac{[\text{EHS}][\text{H}]}{[\text{EH}_2\text{S}]}, & K_{e_s_2} &= \frac{[\text{ES}][\text{H}]}{[\text{EHS}]}
 \end{aligned} \right\} (2)$$

この模式から初速度 v が次式で与えられる。

$$v = \frac{k_{+2}e_0S}{\tilde{K}_m \left(1 + \frac{[\text{H}]}{K_{e_1}} + \frac{K_{e_2}}{[\text{H}]}\right) + S \left(1 + \frac{[\text{H}]}{K_{e_s_1}} + \frac{K_{e_s_2}}{[\text{H}]}\right)} \quad (3)$$

ここで $\tilde{K}_m = (\tilde{k}_{-1} + \tilde{k}_{+2}) / \tilde{k}_{+1}$ で pH に無関係な真の Michaelis 定数を表わし、 $[\text{H}]$ は水素イオン濃度を表わす。ある一定の pH で基質濃度 S を変えることにより得られる見かけの Michaelis 定数 K_m および最大速度 V は、それぞれ

$$K_m = \tilde{K}_m \cdot \frac{1 + \frac{[\text{H}]}{K_{e_1}} + \frac{K_{e_2}}{[\text{H}]}}{1 + \frac{[\text{H}]}{K_{e_s_1}} + \frac{K_{e_s_2}}{[\text{H}]}} \quad (4), \quad V = \tilde{V} \cdot \frac{1}{1 + \frac{[\text{H}]}{K_{e_s_1}} + \frac{K_{e_s_2}}{[\text{H}]}} \quad (5)$$

で与えられる。ただし $\tilde{V} = k_{+2} \cdot e_0$ である。また

$$\frac{V}{K_m} = \frac{\tilde{V}}{\tilde{K}_m} \cdot \frac{1}{1 + \frac{[\text{H}]}{K_{e_1}} + \frac{K_{e_2}}{[\text{H}]}} \quad (6) \quad \text{となる。}$$

$1/K_m$, V , V/K_m の対数を pH に対してプロットすると、図 2 のような曲線が得られ、

これらのプロットは Dixon プロットと呼ばれ解離基の pK 値およびその役割を推定するのに便利である。

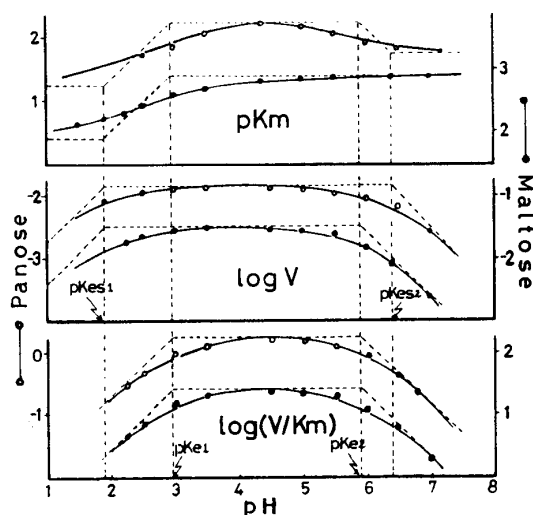


Fig. 2. Dixon Plot²¹⁾. (Enzyme: glucoamilase, 25°C)

たとえば $\log V/Km \sim pH$ のプロットについて、 $H \gg Ke_1$ の領域では(6)式右辺の分母の第2項が主としてきて傾斜1の直線を与え、 $Ke_1 \gg H \gg Ke_2$ の領域では傾斜0、 $Ke_2 \gg H$ では傾斜-1の直線を与える。これらの直線を guide line と呼び図中の破線で示してある。相隣る guide line の交点の pH 値がそれぞれ図中に示した pKe_1 、 pKe_2 を与え、実際の曲線はその交点より $\log 2$ だけ低いところにある。同様に $\log V \sim pH$ 曲線の guide line の交点は $pKes_1$ 、 $pKes_2$ を与える。対応する pKe と $pKes$ とが等しい場合は $pKm \sim pH$ プロットは平坦になるが pKe と $pKes$ とが等しくない場合は pKm のプロットに波を生じ guide line は、図のように階段状になる。それらの交点は pKe 、 $pKes$ に対応する。 pKe と $pKes$ との相対的な大きさは、この解離基の役割を推定する1つの手がかりとなる。すなわち、i). $pKe = pKes$ ならばこの解離基の水素イオンの解離が、基質が酵素に結合することによって影響されないことを、いいかえれば基質と酵素との結合はこの解離基の水素イオンの有無に関係しないことを意味し、この解離基が基質との結合に関与していないことを推定させる。

これに対して ii). $pKe \neq pKes$ の場合基質との結合によってこの解離基の解離が影響されることを意味する。

一般には、図2の例のように $pKes$ が pKe の外側にあることが多い。 $pKes_1 < pKe_1$ (すなわち $Ke_1 > Kes_1$) は、解離基Bの水素イオンの解離が、基質が結合することによって促進されることを(基質と水素イオンとが解離基を奪い合う)意味し、解離基Bの水素イオンが解離した形が基質との結合によっていることを推定させる。

同様にして $pKe_2 < pKes_2$ (すなわち $Ke_2 > Kes_2$) は解離基Aの水素イオンの解離が基質が結合することによって抑制されること(基質が解離基Aの非解離形を安定させること)

を意味し、Aの水素イオンをつけた形が基質との結合によっていることを推定させる。極端な場合 pK_{es_1} が非常に小さく、または pK_{es_2} が非常に大きくなり、これらが $\log V \sim pH$ プロットに現われず、このプロットの片側が平坦になる場合もある。 pK_e と pK_{es} とのずれの度合いは、その解離基が酵素と基質との結合にどれだけの寄与をするかによって変わりその寄与の程度の一つの尺度となると考えられる。また(1)式で EHS だけが生成物を生じるとした仮定からわかるように、 $\log V \sim pH$ プロットに現われる解離基は、基質-酵素複合体の生成物への分解過程に不可欠であるといえることができる。なお Dixon プロットは解離基の役割の推定に便利であるが、 pK 値 (pK_e , pK_{es}) を求めるにはあまり正確とはいえない。とくに2つの解離基の差が $3pH$ 単位以下の場合にはかなりの誤差を伴う。これに対して次の方法は一般的に適用できて便利である。

すなわち V または V/K_m を pH に対してプロットし、その極大値を V_{max} または $(V/K_m)_{max}$ とし、このときの水素イオン濃度を H_0 とする。これを最適水素イオン濃度という。この $1/2$ の値に相当する水素イオン濃度を H_1 (酸性側)、 H_2 (アルカリ側) とすれば、 V のプロットから次式が成り立つ。

$$H_1 + H_2 = Kes_1 + 4H_0 \quad (7) \quad H_0 = (Kes_1 \cdot Kes_2)^{1/2} \quad (8)$$

これを用いて Kes_1 , Kes_2 が求められる。(V/K_m プロットからは、同様にして Ke_1 , Ke_2 が求められる。)

また、蛋白質のもつ解離基の種類は限られており、その pK 値は、大体解離基に固有な特性的な値を持つので、 pK_e 値を知ることで、ほぼその解離基の種類を推定することがで

Table 2. pK values of ionization of some groups present in proteins.¹⁹⁾

Group	pK (25°C)
Carboxyl (α)	3.0— 3.2
Carboxyl (aspartyl)	3.0— 4.7
Carboxyl (glutamyl)	ca. 4.4
Phenolic hydroxy (tyrosin)	9.8—10.4
Salphidryl	8.3— 8.6
Imidazolium (histidine)	5.6— 7.0
Ammonium (α)	7.6— 8.4
Ammonium (α , cystine)	6.5— 8.5
Ammonium (ϵ , lysine)	9.4—10.6
Guanidium (arginine)	11.6—12.6

きる。表2に蛋白質中に見出される種々の解離基の特性的な pK 値の値を列挙し、Dixon プロットから得られた pK 値と比較する事によって酵素の活性基推定をおこなった。以上の理論をもとに、基質 BAPA, カゼインに関するパパインの K_m , V_{max} を求め Dixon

Table 3. Relationship between pH and kinetics constant.

pH	$K_m \times 10^3$ [M]	$V \times 10^8$ $\left\{ \frac{M \cdot PNA}{mg \cdot E \cdot min} \right\}$	V $K_m \times 10^5$	$\log \frac{V}{K_m}$	$\log V$	pKm
3.5	1.59	0.189	0.119	-5.925	-8.724	2.799
4.0	1.32	0.417	0.317	-5.500	-8.380	2.881
4.5	2.00	1.000	0.500	-5.301	-8.000	2.699
5.0	2.08	1.493	0.717	-5.145	-7.826	2.681
5.5	3.33	3.333	1.000	-5.000	-7.477	2.477
6.0 (Cit.)	5.88	6.667	1.133	-4.946	-7.176	2.231
6.0 (Phos.)	4.44	4.349	0.979	-5.009	-7.362	2.352
6.5	4.17	4.000	0.960	-5.018	-7.398	2.380
7.0	3.51	3.226	0.919	-5.037	-7.491	2.455
7.5	2.63	2.777	1.055	-4.977	-7.556	2.580
8.0	3.08	2.410	0.783	-5.106	-7.618	2.512
8.5 (Phos.)	3.57	2.439	0.683	-5.666	-7.613	2.447
8.5 (Ammo.)	2.63	1.818	0.691	-5.161	-7.740	2.580
9.0	2.38	1.449	0.606	-5.216	-7.839	2.623

Buffer; Cit.: Citrate, Phos.: Phosphate, Ammo.: Ammonum.
Substrate: BAPA.

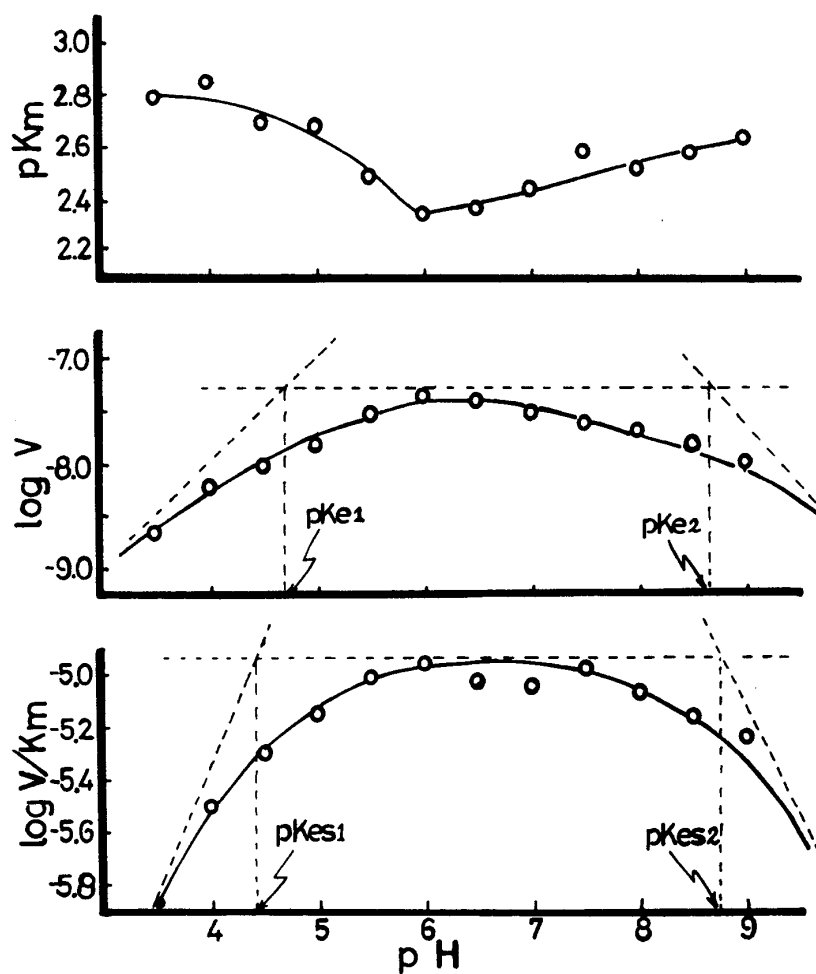


Fig. 3. Dixon Plot: Effect of pH on K_m , V and V/K_m . Enzyme: Papain, Substrate: BAPA.

プロット, および(7)式, (8)式により各 pK 値を求めた.

a). 基質BAPA

0.6mg のパパインを用い35°C, 30分間酵素反応させて, Lineweaver-Burk プロットより Km, Vmax を算出した. 反応 pH は3.5~6.0 (0.05M クエン酸緩衝液), 6.0~8.5 (0.1Mリン酸緩衝液), 8.5~9.0 (0.1Mアンモニア緩衝液) と変化させた.

酵素反応時基質濃度は (1, 1/2, 1/3, 1/4, 1/6, 1/8) × 10⁻³ [M] と変化させた. その結果を表 3 に示す. この結果より, Dixon プロットを作成し図 3 に示した. この Dixon プロットに guide line を引き, その交点より pKe₁, pKe₂, pKes₁, pKes₂ を求めた. 更に(7)式, (8)式を用いて同じ pK 値を求めるため, pH~V/Km の関係を図 4 に, pH~V の関係を図 5 に示した. Dixon プロットおよび(7), (8)式により求めた pKe₁, pKe₂, pKes₁, pKes₂ の

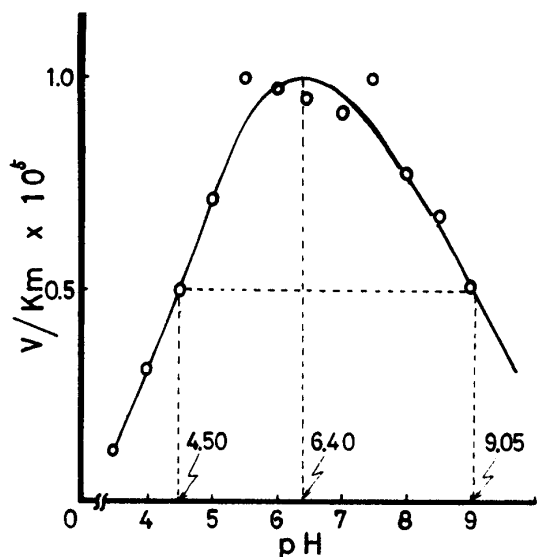


Fig. 4. Effect of pH on V/Km. Enzyme: Papain, Substrate: BAPA.

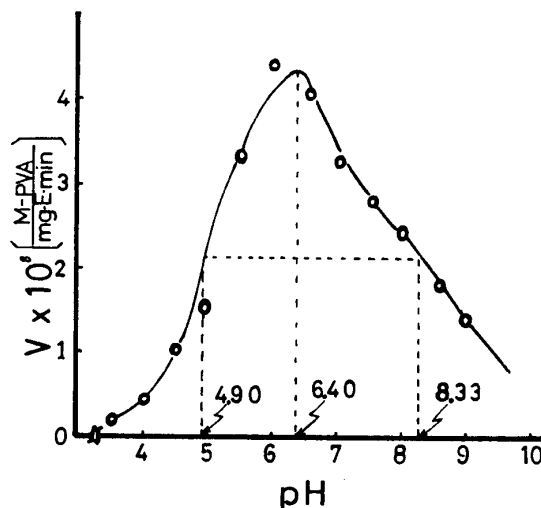


Fig. 5. Effect of pH on V. Enzyme: Papain, Substrate: BAPA.

値を表 4 にまとめた. 以上の実験で得られた pKe 値を表 2 の値と比較して活性解離基 [A],

Table 4. Ionization constants of papain active ionizing group.

Ionizing group	from Dixon plot	from (7), (8)
pKe ₁	4.45	4.51
pKe ₂	8.78	8.29
pKes ₁	4.72	5.00
pKes ₂	8.70	7.84

Substrate: BAPA.

[B] の種類を推定した. すなわち,

- { 活性解離基 [A] …… アスパラギン酸またはグルタミン酸のカルボキシル基
- { 活性解離基 [B] …… システインのスルフヒドリル基

と考えられパパインの合成基質 BAPA に対する活性解離基が, SH 基および COOH 基で

あるという結果は他の多くの研究者^{22) 23) 24)}によって調べられている結果と一致した。

b). 基質カゼイン

基質にカゼインを用い0.2mgのパパインを用いて35°C, 5分間酵素反応させて Lineweaver-Burk プロットより Km, Vmaxを算出した. 反応 pH は6.0~8.5 (0.1Mリン酸緩衝液) 8.5~10.5 (0.1Mアンモニア緩衝液) と変化させた. 酵素反応時の基質濃度は (1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16) × 10⁻⁴[M] と変化させた結果を表5に示した. この表をもとに Dixon プ

Table 5. Relationship between pH and kinetics constant.

pH	Km × 10 ⁴ [M]	V × 10 ⁶ ($\frac{M-tyr}{mg \cdot E \cdot min}$)	$\frac{V}{Km} \times 10^2$	log $\frac{V}{Km}$	log V	pKm
6.0	1.08	6.25	5.81	-1.236	-5.214	3.969
6.5	1.25	7.58	6.06	-1.217	-5.121	3.903
7.0	1.14	7.25	6.38	-1.195	-5.140	3.945
7.5	1.47	9.09	6.18	-1.209	-5.041	3.833
8.0	0.758	5.26	6.94	-1.158	-5.279	4.120
8.5 (Phos.)	0.758	5.26	6.94	-1.158	-5.279	4.120
8.5 (Ammo.)	0.769	5.52	7.18	-1.144	-5.258	4.114
9.0	0.730	4.88	6.68	-1.175	-5.312	4.137
9.5	0.641	4.81	7.50	-1.125	-5.318	4.193
10.0	0.746	5.24	7.02	-1.154	-5.281	4.127
10.5	0.714	4.53	6.34	-1.198	-5.344	4.146

Buffer; Phos.: Phosphate, Ammo.: Ammonum.
Substrate: Casein.

ロットを作成し, BAPA の場合と同様にして pKes₁, pKes₂ を求めた (なお pKe₁, pKe₂ については解析不可能だった). さらに(7),(8)式からも pKes₁, pKes₂ を求め (同じく pKe₁, pKe₂ は解析不能) その値を表6にまとめた.

Table 6. Ionization constants of papain active ionizing group.

Ionizing group	from Dixon plot	from (7), (8)
pKes1	5.92	5.75
pKes2	8.83	9.25

Substrate: Casein.

ここで得られた pKes₁, pKes₂ の値は表2の pK 値と単純には比較はできないが pKe₁ と pKes₁, pKe₂ と pKes₂ の値は近いと思われるので活性解離基 [A], [B] の種類を以下のように推定した. すなわち

- { 活性解離基 [A] ……ヒスチジンのイミダゾリウム基
- { 活性解離基 [B] ……システインのスルフヒドリル基

と考えられる.

以上からパパインの BAPA およびカゼインに対する活性解離基は次のようになっている

ることがわかった。

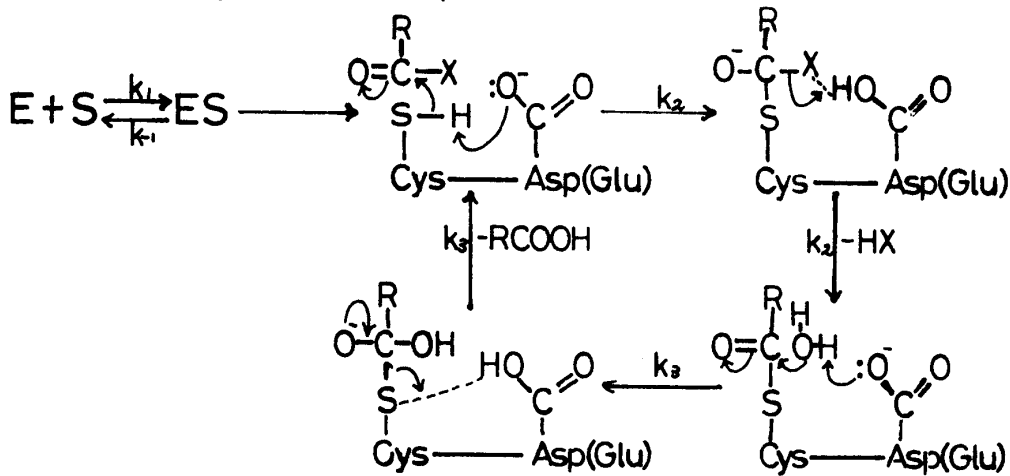
活性解離基 $\left\{ \begin{array}{l} \text{基質 BAPA} \cdots \cdots \text{スルフヒドリル基, カルボキシル基} \\ \text{基質 カゼイン} \cdots \cdots \text{スルフヒドリル基, イミダゾリウム基} \end{array} \right.$

4. パパインの反応機構の推定

パパインの反応機構については、まだ十分はっきりしたことはわかっていないが、これまでなされた合成基質に対する研究を総合^{11) - 13)}すると、パパインの反応機構は次のような2段階の触媒プロセス機構である点で一致²⁵⁾している。

すなわち $E + S \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} ES \xrightarrow[\text{アシル化}]{k_2} ES' + P_1 \xrightarrow[\text{脱アシル化}]{k_3} E + P_2$ 。ここで E は酵素, S は基質, ES は酵素-基質複合体, ES' はアシル化酵素, P₁ はエステル基質の場合基質のアルコール部分で, P₂ は基質のカルボン酸部分である。また合成基質に対する活性基は SH 基と COOH 基¹⁰⁾であり, アクティブサイト中にヒスチジンが存在する^{11), 12)}ということが, わかっている。以上のことを参考にして, 前項で得た活性解離基よより以下にパパインの反応機構を図6に示した。

I) Substrate : BAPA .



II) Substrate : Casein .

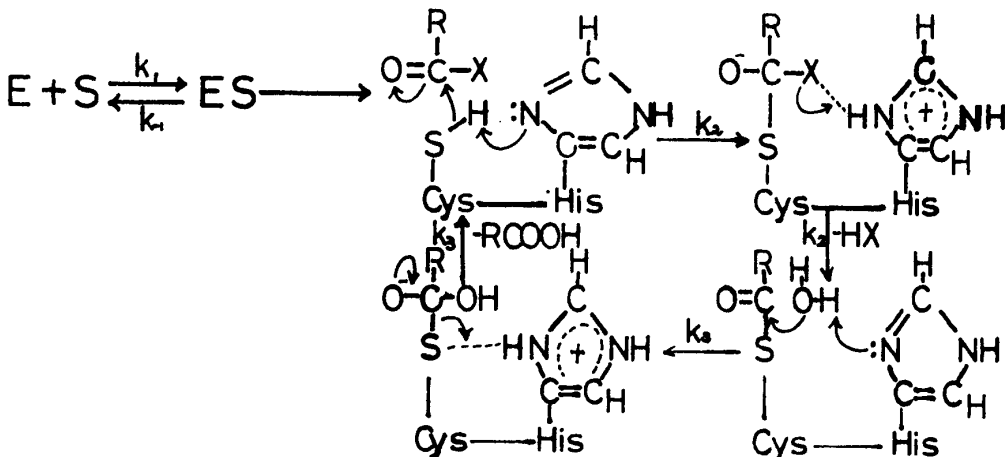


Fig. 6. Estimation of reaction mechanism of papain.

References

- 1) E. L. Smith, *J. Biol. Chem.*, **233**, 1387 (1958)
- 2) E. L. Smith and M. J. Parker, *ibid.*, **233**, 1392 (1958)
- 3) E. L. Smith, V. J. Chavre and M. J. Parker, *ibid.*, **233**, 1392 (1958)
- 4) J. R. Whitaker and M. L. Bender, *J. Am. Chem. Soc.*, **87**, 2787 (1965)
- 5) G. Lowe and A. Williams, *Biochem. J.*, **96**, 199 (1965)
- 6) J. F. Kirsch and M. Igelstrom, *Biochemistry*, **5**, 783 (1966)
- 7) M. L. Bender and L. J. Brubacher, *J. Am. Chem. Soc.*, **88**, 5880 (1966)
- 8) W. Cohen and P. J. Petra, *Biochemistry*, **6**, 1047 (1967)
- 9) R. Arnon, *Methodo in Enzymology* **19**, 226 (1970), Academic Press
- 10) 太垣和一郎, 酸素反応のしくみ, p129 (1975) 東京化学同人
- 11) S. S. Hussain and G. Lowe, *Biochem. J.*, **108**, 855 (1968)
- 12) S. S. Hussain and G. Lowe, *ibid.*, **108**, 861 (1968)
- 13) 小竹無二雄他, 実験化学講座, 23巻, p35 (1957) 丸善
- 14) 永井裕, 生化学研究法Ⅱ, p442 (1967) 朝倉書店
- 15) M. Kunitz, *J. Gen. Physiol.*, **30**, 291 (1947)
- 16) E. L. Smith and M. J. Parker, *J. Biol. Chem.*, **233**, 1387 (1958)
- 17) B. F. Erlanger, N. Kokowsky and W. Cohen, *Arch. Biochem. Biophys.*, **95**, 271 (1961)
- 18) L. Michaelis, M. L. Menten, *Biochem. Z.* **49**, 333 (1913)
- 19) M. Dixon and E. C. Webb, *Enzymes*, 120 (1958) 1st. ed., Longmans
- 20) K. J. Laidler, Department of Chemistry, 528 (1954)
- 21) 小野宗三郎, 広海啓太郎, 化学の領域, 19, 461 (1966)
- 22) M. L. Bender and L. J. Brubacher, *J. Am. Chem. Soc.*, **86**, 5333 (1964)
- 23) G. R. Schonbaum and M. L. Bender, *ibid.*, **82**, 1900 (1960)
- 24) D. C. Williams and J. R. Whitaker, *Biochemistry*, **7**, 2562 (1968)
- 25) J. R. Whitaker and M. L. Bender, *J. Am. Chem. Soc.*, **87**, 2728 (1965)

Reaction Mechanism of Papain

-Estimation of its Mechanism from Kinetics Constant-

Seiichiro KAWABE

Abstract

Active-ionizing group and reaction mechanism of papain were investigated by using the following four substrates; Casein, *N*- α -Benzoyl-DL-arginin-p-nitroanilide hydrochloride (BAPA), *N*- α -Benzoyl-L-arginin ethyl ester hydrochloride (BAEE), and *N*-Benzoyl-L-tyrosine ethyl ester (BTEE).

The specificity of papain for various substrates was investigated on the basis of the reaction initial velocity and the kinetics constants were determined by reaction pH values. And then pK values were determined by using Dixon plot. From these results, in case BAPA and Casein were used, active-ionizing groups and reaction mechanism of papain were estimated as follows:

- A). Active-ionizing group of papain ;
 BAPA : Sulphydryl, Carboxyl.
 Casein : Sulphydryl, Imidazole.
- B). Reaction mechanism of papain ; refer to Fig. 6.