Thermodynamics of Enzymatic Transamination of F-GOT in Normal Fowl Blood Plasma

II. pH Dependence of Enzyme Activity

Kazuhiko YAMADA

*Department of Animal Physiology and Feeding, College of Agriculture,
University of Osaka Prefecture, Sakai-shi, Osaka 591*

(Received for publication August 4, 1975)

Abstract. The pH dependence of F-GOT activity was studied over a pH range from 6.0 to 9.0. Phosphate and Tris-HCl buffers were used as solvents for substrate, since they have a significant effect on transamination reaction. The results obtained are summarized as follows.

1. When a pH-activity curve was drawn, it suggested a possibility that phosphate ion might have acted as a catalyst, and sodium and potassium ions as inhibitors. Within a pH range from 6.0 to 7.8, the optimum pH values were 7.0 and 7.2.

2. The Tris-HCl buffer was less active than the phosphate one at both optimum pH values.

A most striking feature was that although the curve obtained with the Tris-HCl buffer was composed of three curves which presented a peak at an alkaline pH value within a range of 7.0-7.2 and 8.0-8.2, and at pH 8.6, respectively, no liberation of pyridoxal 5'-phosphate from the denatured enzyme was recognized.

Apparently, that curve was characteristic in showing the following significance. The maximal velocity and the Michaelis constant for alpha-ketoglutarate were not dependent upon pH value within a pH range from 7.0 to 9.0. The enzyme was stable, and the substrate does not ionize throughout this pH range.

These results suggest that the variation in activity may have been induced by the ionization of some groups contained in the enzyme. They also indicate that the method of assay used in this experiment was satisfactory even at a pH value exceeding 8.5.

鶏血漿中 F-GOT の酵素作用の性質について

II. F-GOT 反応における pH の影響

山田一彦

大阪府立大学農学部家畜生理・飼養学教室

pH 6.8-8.2 区のリン酸塩系の溶媒中において解離状態下の鶏血漿中 F-GOT [19] が示す作用活性と pH 間の関係は、pH 7.0-7.2 区と pH 8.0-8.2 区付近に、それぞれ活性ピークを持つ、二峰性かつ尖型の特異な活性-pH 曲線として示されることは、すでに知られている [18].

しかしながら、これら二つの作用 pH 区の存在とその曲線型式が、本系酵素の特性を指示する主要データとして考慮されるためには、本作用区における当該緩衝系の作用活性への影響をはじめ、系上関係成分の pH dependence の程度や、Pyridoxal 5'-phosphate (PALP) 遊離などによる酵素変性らが、F-GOT 反応

の速度や基質-酵素間の結合の程度に、どのような影響を与えているかが検討されなければならない。

また、これらの作用区、あるいはさらに高アルカリ区での F-GOT 活性を、従来の測定法 [13, 18] に従って、系上 Oxaloacetate (Ox) 実量から、比活性として換算・表現する場合、その測定 Ox 値に与える血漿試料中の共存物質や測定時の基質もしくは反応液 pH などの影響に関しても、なお吟味の余地が残されている。

そこで本報告では、これらの点に関して以下の実験を試み、二三の所見を得たので報告する。

材料および方法

A. 実験材料

Arbor Acres 種, 8カ月齢, 平均体重 3.65 kg の雄 60 羽を用い, 頸静脈から採血した後, 型のごとく分離した二重蔭酸加血漿 [18] を試料として用いた。

本試料の pH は 7.9 ± 0.1 , 総蛋白質量は 4.6 ± 0.1 g/dl である。

B. 実験方法

1. 基質の調製および活性測定法

いずれも 0.2 pH 差で調製した, pH 6.0-7.8 区の 0.1-0.5 M リン酸塩系緩衝液 (PBS) および pH 7.0-9.0 区の 1M Tris-HCl 系緩衝液 (T-CBS) を用いて, α -Ketoglutarate (KG) および L-Aspartate (Asp) を, それぞれ 2mM および 2×10^2 mM の割合で含む基質群を調製し, 著者法 [18] に従って活性を測定した。

測定活性は, 比活性 [16, 18] として表現した。

2. 反応系の pH dependence の解析法

a. 最大反応速度 ($V_{\max}$) および Michaelis 定数 (K_m) の測定法

pH 7.0-9.0 区の 1M T-CBS を溶媒として, Velick ら [17] の方法に準拠して調製した“基質 α -KG”および“基質 L-Asp” [20] を用いて, 型のごとく活性を測定し, Lineweaver-Burk (L-B) の図解法 [14, 15] に従って, 各 pH 区における $V_{\max}$ および K_m を算定した [20]。

b. 系上関係成分の含有濃度の測定法

系上産生 Ox と, α -KG など残基質成分との共存状態下にある反応液から, Ox 量を測定するための基準として, 一定比の Ox/ α -KG 配合比溶液 [13, 18] 群を, 上述 B-1 項記載の PBS および T-CBS を溶媒とする t-Ox 溶液 [11] および F-GOT 基質を用いて調製した [18]。そしてこれらを活性測定法に準拠して

40°C, 60 分間反応させた後, 二分し, 一方を対照として 0°C 下に置いた。そして他方を, さらに 0°C, 700×g, 15 分間, 遠沈した後, その上清部を取り, 対照試料とともに発色させた後, 各被検液の吸光度 $OD_{505m\mu}$ [18] 差から, Reitman-Frankel (R-F) 法 [13] によって Ox 量を求めた。

対照 OD 値には, 同様配合比溶液の R-F 法による $OD_{505m\mu}$ 値を用いた。また, 反応条件下の基質中 α -KG および L-Asp 濃度は, それぞれ $OD_{520m\mu}$ 値 [21] および $OD_{570m\mu}$ 値 [9] として測定した。

この場合の被検試料は, B-1 項の方法により調製した基質で, 反応条件下の各基質試料の調製法は, 上述した Ox/ α -KG 配合比溶液の処理法に同じである。

c. 低濃度基質の調製と活性測定法

系上基質成分の有効濃度範囲と活性-pH 間の関係を求めるために, pH 7.0-9.0 区の 1M T-FCBS を溶媒として, 0.25 mM 差の, 0.25-2.00 mM の α -KG に対して, それぞれ 10^2 倍相当の L-Asp を含む基質群を調製し, これらに未処理の血漿試料を加えて, 型のごとく活性を測定した。

なお本活性-pH 曲線の作図は, Karmen ら [6] の方法に準拠して行った。

d. 反応液の pH および液中蛋白質濃度の測定法

系上産物の pH 影響や, 反応時の蛋白質濃度の変化を知るために, Hydrazine 添加 [13, 18] 前の, 基質-酵素より成る反応液を二分し, その一方を取って, 0°C, 700×g, 15 分の条件下で分離した遠沈上清部を被検試料とした。そして残りの一方および反応前試料を対照として, 各試料のガラス電極法による pH 測定を行い, また, 同試料の $OD_{280m\mu}$ 値から, 試料中蛋白質濃度を測定した。

e. 調製 PALP-Blood plasma (BP) mixtures の吸光度と活性測定法

PALP を, 終濃度 1×10^{-3} M となるように血漿に添加し, 20°C 下で 30 分間反応させた後, 0°C に 10 分間冷却して“PALP-BP mixtures”を調製した。そして未処理の血漿を対照試料に, pH 6.0-9.0 区内で調製された 0.5 M PBS および 1M T-CBS の両系基質を用いて, 各活性を測定した。

同時に, pH 7.0-9.0 区の 1M T-CBS 系基質中に含まれている反応前・後の同上 mixtures の $OD_{418m\mu}$ 値 [12] を測定し, 本区内における PALP の遊離 pH 区を求めた。

反応液中 PALP 濃度の検定は, Dempsey ら [1] の

Fig. 1. Effect of varying molarity on blood plasma F-GOT activity

Remarks.

Molarity of phosphate buffer used: 0.1 M (●—●) and 0.5 M (●—●). The result obtained is expressed by the mean of 60 experiments. A vertical bar indicates the standard deviation.

方法に準拠して行った。なお、使用 PALP の純度は 0.1 mM PALP-0.1 M PBS, pH 7.4 下の $OD_{418m\mu}$ 位成分として 95% であることが確認されている。

結 果

A. F-GOT 反応における緩衝系と活性-pH の関係

1. 同一緩衝系のモル濃度差と活性-pH

0.1 M 差で調製した 0.1-0.5 M の PBS 系基質による pH 6.8-7.8 区における F-GOT の活性-pH 曲線の基本型には、各モル濃度間で著差は認められず、至適 pH 範囲は、いずれも pH 7.0-7.2 区にある。

しかしながら、本緩衝系では、モル濃度の増加につれて、F-GOT 活性は pH 7.2-7.4 区を境に、酸性側の各 pH 区では漸減し、アルカリ性側の各 pH 区では漸増する。Fig. 1 は、これらの場合に、活性範囲の上・下限値を示した、0.1 M および 0.5 M の両 PBS 系

Fig. 2. Variation of activity with pH

Remarks.

Buffers used: phosphate (●—●, ●—●) and Tris-HCl (○—○, ○—○).

Curves:

- Upper: Activation of blood plasma F-GOT by pyridoxal 5'-phosphate.
- Lower: Effects of buffers and pH on blood plasma F-GOT activity.

Ordinate (right): The variation of activity value with pH was calculated in relation to that of the region pH 7.4. It is indicated by 0 and arrow signs.

See also the remarks in Fig. 1.

基質群による活性-pH 関係を図示したものである。

2. 同一イオン強度の 2 種の緩衝系と活性-pH

イオン強度がいずれも 0.1 の、pH 6.0-7.8 区の 0.5 M PBS および pH 7.0-9.0 区の 1 M T-CBS の両系基質群を用いて得た F-GOT の活性-pH 曲線では、FGOT の主活性領域であるアルカリ側の作用 pH 区として、pH 7.0-7.2 区、pH 8.0-8.2 区および pH 8.6 区の合計 3 区が確認された。

両系基質群に共通する pH 7.0-7.8 区の活性値間では、pH 7.8 区の活性値関係を除き、いずれも PBS 系

基質の方に活性は大であった。とくに pH 7.0-7.2 の作用区活性間には明らかに差が認められる。

Fig. 2 (下段) に、これらの実際例を図示した。

図中、右縦軸の数値は、矢印で示した pH 7.4 区活性を 0 として、各 pH 区活性の増減を、比活性単位で表わしたものである。

B. 反応系の pH dependence

1. $V_{\max}$ および K_m の pH dependence

pH 7.0-9.0 区の 1 M T-CBS を溶媒とする“基質 α -KG”による F-GOT の $V_{\max}$ および基質 K_m の上・下限値は、それぞれ $\{(3.6 \pm 0.1) - (2.6 \pm 0.1)\} \times 10^{-2} \text{ mM}$ および $(1.05 \pm 0.04) - (0.77 \pm 0.03) \text{ mM}$ である。この間、pH 8.8-9.0 区の両値に若干の pH dependence が見られるが、その程度は低い。

三作用区の $V_{\max}$ および K_m は、それぞれ pH 7.0-7.2 区で $\{(3.1 \pm 0.1) - (3.1 \pm 0.1)\} \times 10^{-2} \text{ mM}$ および $(0.83 \pm 0.03) - (0.86 \pm 0.04) \text{ mM}$ 、pH 8.0-8.2 区で $\{(3.4 \pm 0.1) - (3.6 \pm 0.1)\} \times 10^{-2} \text{ mM}$ および $(0.78 \pm 0.03) - (0.77 \pm 0.03) \text{ mM}$ 、pH 8.6 区では $(3.6 \pm 0.1) \times 10^{-2} \text{ mM}$ および $(0.80 \pm 0.03) \text{ mM}$ であり、その間に著しい差は見られない。

一方、“基質 L-Asp”の pH 7.0-9.0 区における $V_{\max}$ および K_m の上・下限値は、それぞれ $\{(3.1 \pm 0.1) - (1.5 \pm 0.06)\} \times 10^{-3} \text{ mM}$ および $(8.45 \pm 0.33) - (17.95 \pm 0.70) \text{ mM}$ であるが、pH 7.0-8.2 区と pH 8.4-9.0 区に明らかに二分される L-Asp の pH dependence の程度は、後者できわめて高い。この影響は、三作用区の $V_{\max}$ および K_m 値にも示されており、各作用区でのこれらの値の上・下限値は、それぞれ pH 7.0-7.2 区で $\{(2.8 \pm 0.1) - (3.0 \pm 0.1)\} \times 10^{-3} \text{ mM}$ および $(9.52 \pm 0.37) - (9.43 \pm 0.37) \text{ mM}$ 、pH 8.0-8.2 区で $\{(3.1 \pm 0.1) - (2.9 \pm 0.1)\} \times 10^{-3} \text{ mM}$ および $(8.65 \pm 0.34) - (8.87 \pm 0.35) \text{ mM}$ 、pH 8.6 区では $(2.0 \pm 0.1) \times 10^{-3} \text{ mM}$ および $14.37 \pm 0.56 \text{ mM}$ である。なお pH 7.4 区の両基質成分の両値には pH dependence は認められない。

Fig. 3 に、これらの実際例を図示した。

図中、左縦軸の数値は、L-B 法に準拠して、 $1/V_i = 0$ に補外した場合の $1/V_{\max}$ [20] の実測値単位を示しており、本値を基準に算定された各 K_m は、右縦軸の数値を単位として表わしてある。

2. 反応系上関係成分の pH dependence

各 pH 区基質成分の反応前・後の濃度に差はない。反応液の pH および液中の添加酵素蛋白質濃度にも

Fig. 3. pH dependence of maximum velocity and Michaelis constant

Remarks.

Abbreviations used: $1/V_{\max}$, reciprocal of maximum velocity; K_m , Michaelis constant.

Explanation of curves:

- (a) Curves (○—○):
 - i. Upper: K_m of L-aspartate.
 - ii. Lower: $1/V_{\max}$ of L-aspartate.
- (b) Curves (●—●):
 - i. Upper: K_m of α -ketoglutarate.
 - ii. Lower: $1/V_{\max}$ of α -ketoglutarate.

著しい差は認められない。また、基質両成分濃度の低下は比例的な活性値の減少として示されるが、活性-pH 曲線の基本型に変化はない。

さらにまた、一定比で増量・配合した同一 pH 区の Ox/ α -KG 溶液群の示す $OD_{505m\mu}$ 値を各 pH 区別にプロットすると、いずれも直線関係が認められるが、同 μM の配合比下にある各 pH 区 Ox/ α -KG 溶液の $OD_{505m\mu}$ 値相互をプロットすると、pH 8.4-8.6 区をピークとする OD 曲線が得られた。

その他、pH 7.0-9.0 区の PALP-BP mixtures の Enzyme spectra によると、本 pH 区内での PALP 遊離は認められず、PALP 添加による活性の賦活は対照試料活性の 1.8-2.0 倍に相当する。しかし、活性-pH 間関係の推移は、対照例に全く一致する Fig. 2, 4 に、これらの結果を図示した。

Fig. 4. Experiments to determine whether the pH-activity curve is good or not

Remarks.

With Tris-HCl buffer, pH dependence of the assay system was studied over a pH range from 7.0 to 9.0.

Quantitative determination of the components in the sample was made by spectrophotometry. Detailed procedures are adequately discussed in the text.

Determination of pH was made by means of a glass electrode.

Components determined: Protein (a), alpha-ketoglutarate (b), oxaloacetate/alpha-ketoglutarate (c), substrate (d_1 and d_2), L-aspartate (e), and pyridoxal 5'-phosphate-blood plasma mixtures (f).

考 察

pH 6.8-7.8 区において、0.1-0.5 M の PBS 系基質による F-GOT の作用活性と pH 間の関係は、緩衝液モル濃度の高低に支配され、特定 pH 区を境に逆転する (A-1 項)。

これは、GOT 系酵素のアミノ基転移反応においては、リン酸塩イオンが触媒的な効果 [2, 10] を持ち、

ナトリウムおよびカリウムの両イオンは、活性発現の阻害因子として作用する [10] といわれる点に関して示唆的なデータを提供している。

一方、同一イオン強度の PBS および T-CBS の両系基質により確認された活性-pH 関係は、両系基質間でほぼ一致している。そして、そこで示された三峰性・尖型の同曲線は、F-GOT の主活性領域であるアルカリ側の作用 pH 区として、すでに知られている二作用区 [18] のほか、さらに一区、合計三区の存在することを明らかに指示している (A-2 項)。また、これらの作用区で知られた反応系の pH dependence に関する諸結果 (B-1, 2 項) は、本酵素における当該作用区の有意性と、その分類上の特性を示唆しているものと考えられる。

そこで本項では、これらの示唆点の論拠となった、系上関係成分の pH dependence の解析結果を中心に考察を加えてみる。

酵素反応の基質、促進剤など、反応系の一部の沈澱に起因する有効濃度の低下が、非対称的な活性-pH 曲線の成因の一つとして考えられる場合 [15] がある、しかしながら、上述 B-2 項の結果が示すように、本反応系上では、基質成分の有効濃度および酵素濃度は定常態に維持されていることが確認されており、しかも、反応液中加入された十分な緩衝系は、反応産物による系上 pH の変化を抑止しているものと考えられる。これらのことから、系上関係成分の変動に由来する反応速度変化が当該曲線の成因として提起されることはないことがわかる。この点は、また、問題の三作用区において、とくに活性発現に支配的な α -KG [17, 20] が示した ($V_{\max}$ - K_m) 関係 [20] の定常性 (B-1 項) からも支持される。

このように、基質と酵素間の反応条件については問題がないとすると、当該曲線の成因として、系上活性に読みかえられる Ox の定量法に問題点がしばられてくる。しかし、これらの吟味点の一つである血漿中共存物質の影響に関する問題は、活性測定時の対照試料の吸光度との相殺操作によって解決されることから、UV 法による Ox の定量 [11] において、従来、しばしば問題となっている、pH 8.5 区以上の反応液中産生 Ox の Pyruvate(Py) への転化 [5, 11] を、F-GOT 作用区、とくに pH 8.6 区付近の活性曲線の成因として考えてみた。しかしながら、本報告法では、系上関係 α -ケト酸のすべてを Hydrazone 化合物として把握することができ、しかも各 pH 区にあって α -KG

と共存する一定 μM のOxまたはPy溶液の示すOD_{505m μ} 値は、相互にきわめて近似[18]しており、その μM -OD_{505m μ} 関係は明らかに直線関係を示す[18]ことがわかっている(B-2項)。これらのことから、当該化合物中の含有ケト酸各成分の相対比の算定に問題点は全く提起されない。したがって、各pH区における系上産生Oxの測定値のばらつきは、当該曲線成因の測定条件側の理由とはなり得ないと考えられる。

また、当該三作用区前後の曲線型とそのpH範囲(A-1, 2項)や、PALP-BP mixturesのEnzyme spectraとその活性-pH関係(B-2項)は、いずれも三作用pH区での酵素変性に関して否定的な結果を提供している。したがって、これらもまた、曲線成因の測定条件側の理由とならないことは明らかである。

このように、系上関係成分のpH dependenceの程度が、F-GOTにおける複数個の尖型曲線の成因から除外されたとすると、その理由として、当該酵素の表面に分布する特定基のイオン化状態の変化に起因する酵素触媒中心の構造変化を第一義的に考慮しなければならない。

しかし、その結果として示されたこれら活性基由来の三作用区の使用は、従来F-GOT活性として測定・表現されてきたpH 7.4区の活性が、このpH区付近に作用区を持つ活性基の活性傾向を部分的に表現しているに過ぎないことを示しており、この点には留意が必要である。

また、これら活性基のpH dependenceの程度に由来するF-GOTの活性-pH間の曲線型は、GOT群中での本系酵素の分類位置に関しても、以下の示唆点を提供している。すなわち、Lis [7] および Jenkinsら [5] によって、豚心筋から分離・精製されたGOT-S [8] 標品の至適pHは、それぞれpH 7.4およびpH 8-9区にある。またCohenによって、同じく豚心筋から分離・精製されたGOT標品の至適pH [6] は、Lis標品のそれにほぼ一致する。

これらの事実は、豚心筋由来の組織内GOT-S群に、少なくとも2種のGOT-Sが含まれていることを示唆するものと考えられる。そして、その可能性は、これらGOT-SのKm値[3, 8, 17]差からも指摘されるところである[20]。

このGOT-S群が、Enzyme releaseの機構[4]によって血漿中に逸脱すると考えると、当該血漿中GOTの示す活性-pH曲線は逸脱GOT各個の活性-pH関係が集合成された、複峰の曲線型として呈

示されなければならない。しかし実際には、直接的な両者の関係は不明で、わずかに、人血清GOTとCohenの豚心筋内GOTの活性-pH曲線が、いずれも至適pHを7-8区に持つ、一峰性、同型の山型曲線として示され[6]、それらと同じ作図法によれば、鶏血漿中F-GOTの場合も同様の山型曲線を描くことがわかっている(Fig. 4)。したがって、豚心筋由来の組織内GOT-S群と人血清中の逸脱GOT-Sの間で示されるpH dependenceの傾向が、鶏組織と当該血漿中のF-GOTの場合にもあてはまるとすると、組織細胞内から選択的に血漿中へ逸脱したF-GOTは、Lis標品に類似のpH dependenceを持つ、GOT-S系の酵素であると考えられる。

要 約

pH 6.8-7.8 区の各 0.1-0.5 M のリン酸塩系緩衝液 (PBS) をただ一種の溶媒とする基質によって示される一峰性、尖型の F-GOT の作用活性と pH 間の曲線関係は、緩衝液モル濃度の高低によって支配され、pH 7.2-7.4 区を境に逆転する。

一方、同一イオン強度下で、pH 7.0-9.0 区の 1 M Tris-HCl 系緩衝液 (T-CBS) および pH 6.0-7.8 区の 0.5 M PBS を、それぞれ溶媒とする基質の同上関係は、その主活性領域であるアルカリ側区において、pH 7.0-7.2, pH 8.0-8.2 および pH 8.6 の各区をピークとする、三峰性、尖型の活性-pH 曲線として示される。

これらの曲線を呈示する活性 pH 区内では、Pyridoxal 5'-phosphate (PALP) 遊離などによる F-GOT の変性失活や系上関係成分の pH dependence は認められない。また、基質成分 α -Ketoglutarate (KG) および L-Aspartate (Asp) 中では、活性発現においてより支配的な α -KG の、F-GOT 反応時における最大反応速度 ($V_{\max}$) と Michaelis 定数 (K_m) は定常態関係にある。これらのことから、当該曲線は、本系酵素自身の pH に対する酵素作用上の特性を、直接示唆しているものと思われる。

文 献

- [1] Dempsey, W. B., and Christensen, H. N. (1962). The specific binding of pyridoxal 5'-phosphate to bovine plasma albumin. *J. biol. Chem.*, **237**, 1113-1120.
- [2] Fasman, G. D., and Niemann, C. C. (1951).

- A reinvestigation of the kinetics of the urease-catalyzed hydrolysis of urea. I. The activity of urease in the presence of sodium and potassium phosphate. *J. Amer. chem. Soc.*, **73**, 1646-1650.
- [3] Henson, C. P., and Cleland, W. W. (1964). Kinetic studies of glutamic oxaloacetic transaminase isozymes. *Biochemistry*, **3**, 338-345.
- [4] Hess, B. (1963). Mechanism of enzyme release. In *Enzymes in Blood Plasma*, Henley, K. S., translator, Academic Press Inc., New York and London, 48-55.
- [5] Jenkins, W. T., Yphantis, D. A., and Sizer, I. W. (1959). Glutamic aspartic transaminase. I. Assay, purification, and general properties. *J. biol. Chem.*, **234**, 51-57.
- [6] Karmen, A., Wróblewski, F., and La Due, J. S. (1955). Transaminase activity in human blood. *J. clin. Invest.*, **34**, 126-133.
- [7] Lis, H. (1958). Purification of glutamic-aspartic transaminase. *Biochim. biophys. Acta (Amst.)*, **28**, 191-197.
- [8] Morino, Y., Itoh, H., and Wada, H. (1963). Crystallization of 2-oxoglutarate L-aspartate transaminases from mitochondrial and soluble fractions of beef liver. *Biochem. biophys. Res. Commun.*, **13**, 348-352.
- [9] 成田耕造・村上孝夫編(1964). アミノ酸, ペプチドの検出, 定量. クロマトグラフィーの実際 I, 広川書店, 東京, 52-67.
- [10] Nisonoff, A., and Barnes, F. W., Jr. (1952). Mechanisms in enzymatic transamination. Kinetic studies of the glutamate-aspartate reaction. *J. biol. Chem.*, **199**, 713-728.
- [11] Nisonoff, A., Henry, S. S., and Barnes, F. W., Jr. (1952). Variables in the spectrophotometric estimation of glutamate-aspartate kinetics. *J. biol. Chem.*, **199**, 699-711.
- [12] Peterson, E. A., and Sober, H. A. (1954). Preparation of crystalline phosphorylated derivatives of vitamin B₆. *J. Amer. chem. Soc.*, **76**, 169-175.
- [13] Reitman, S., and Frankel, S. (1957). A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminases. *Amer. J. clin. Path.*, **28**, 56-63.
- [14] 佐竹一夫 (1965). 酵素. 一般生物化学, 三共出版, 東京, 211-239.
- [15] 高宮 篤 (1955). 酵素反応の解析的研究法. 酵素研究法, 1, 赤堀四郎編, 朝倉書店, 東京, 198-263.
- [16] 田宮信雄・八木達彦訳 (1974). 酵素. コーン・スタンプ生化学, 3 版, 東京化学同人, 東京, 165-187.
- [17] Velick, S. F., and Vavra, J. (1962). A kinetic and equilibrium analysis of the glutamic oxaloacetate transaminase mechanism. *J. biol. Chem.*, **237**, 2109-2122.
- [18] 山田一彦(1971). 鶏の血漿中 Aspartate-alanine-aminotransferase 系アミノ基転移酵素の活性測定法について. 日獣誌, **33**, 237-249.
- [19] 山田一彦(1973). 鶏血漿中 Globulins から単離した Aspartate および Alanine-aminotransferase 系アミノ基転移酵素の活性とその物理化学的性状について. II. 日獣誌, **35**, 209-221.
- [20] 山田一彦(1976). 鶏血漿中 F-GOT の酵素作用の性質について. I. F-GOT 反応における基質濃度と反応速度との関係. 日獣誌, **38**, 59-64.
- [21] 吉川春寿(1962). α -ケトグルタル酸. 臨床医化学 I, 実験編, 協同医書出版, 東京, 159-160.