

鶏血漿中Aspartate-およびAlani-aminotransfererase 系 アミノ基転移酵素の分別法について

誌名	日本獣医学雑誌 = The Japanese journal of veterinary science
ISSN	00215295
著者	山田, 一彦
巻/号	34巻1号
掲載ページ	p. 39-48
発行年月	1972年2月

鶏血漿中 Aspartate- および Alanine-aminotransferase 系アミノ基 転移酵素の分別法について

山 田 一 彦

大阪府立大学農学部家畜生理飼養学教室

(昭和45年11月2日受付)

人においては、肝、心筋などにおける炎症の発現時や、その急性経過時に、それらの炎症組織中から急速に血漿中へ逸脱すると考えられている Aspartate aminotransferase (GOT) および Alanine aminotransferase (GPT) は、正常時の血漿中にも、常時一定のレベルで分布していることが知られている。^{3~5)}

しかしながら、これら血漿中に分布するアミノ基転移酵素 (T-ase) の蛋白質化学的性質の検討^{9,10,13~16,19~22)}は、その origin と考えられる、肝、その他の組織に含まれる GOT や GPT に関するほどには行なわれておらず、またそれらの酵素分別と精製の試みも、今日までなされていない。

そこで本報告では、活性傾向の上で、人、その他の哺乳動物と比較して著しい相違点が認められる、^{31~33)} 鶏血漿中 GOT, GPT の二つをとりあげ、これら T-ase の反応系を Forward (F), Reverse (R) の両系に分け、それぞれの系上で対応する非可逆的な T-ase の存在を想定して、F-GOT, R-GOT, そして F-GPT, R-GPT と名づけて分類し、それらの血漿中からの分別を試みた。

実験材料と方法

A. 実験材料

Arbor Acres 種、240 日令、平均体重 3.65 kg の雄 200 羽から、頸静脈血を採取し、その血液 1 ml 当たり 2 mg の二重碳酸塩を添加した後、700×g、20 分の遠沈操作により得られる上清部をとり血漿試料とした。本試料の pH は 7.9±0.1、総蛋白質量は 46.06±1.09 g/l である。

B. 実験方法

1. 血漿蛋白質の分別法

等電点沈殿法^{1,12,34)}と、COHN⁷⁾および ONCLEY²⁷⁾

らの低温 Ethanol (EtOH) 分別法を用いた。なお、本文中に記載している EtOH 濃度は、常に各分画分別時の終濃度を示しており、すべて容量%で表現してある。

2. T-ase 活性の測定とその表示法

分類上 4 種の各 T-ase 活性の測定は、REITMAN-FRANKEL²⁹⁾の著者変法^{31~33)}を用いて行ない、血漿中から分別された T-ase 活性部分の等電点沈降物、もしくは低温 EtOH 分画物の蛋白質 N 1 mg 当たりで産生される α -ケト酸の Hydrazone 化合物の μ Moles (μ M) を、直接、活性値として表現する方法^{17,31~33)}をとった。

なお、活性表現の単位に用いている蛋白質 N 量は、0.005 M Phosphate で pH 7.0 に調整した蒸留水による各分画物懸濁液 0.5 ml に、TCA を終濃度 10% まで添加し、250×g、15 分の遠沈操作後、得られた全沈降物の N 量を micro-Kjeldahl 法¹¹⁾で定量したものである。

実験結果

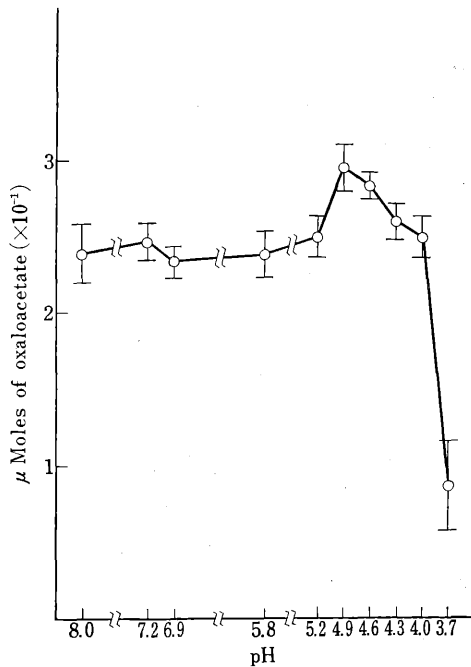
A. 等電点沈殿法によって認められる血漿中 F, R 系 GOT, GPT 活性部分の等電点沈降域。

Fig. 1, および 2 の各 (A, B) 中、横軸には、等電点沈殿実施のために設定した COHN 6 法を基礎とした pH 範囲を示してある。また、縦軸には、それらの各 pH 条件下で、弱アルカリ側から酸性側にかけて、段階的に同一試料から連続分別して得られる各沈降物の T-ase 活性を示してある。

それによると、F-GOT は pH 7.2 と 4.9 とに、R-GOT は pH 6.9 と 5.2 とに、それぞれ等電点を示す沈降物に対して、おもに活性を持っている。R-GOT の場合には、さらに pH 4.3~3.7 の強酸性 pH 区で分別される沈降物に、な

Fig. 1 (A and B). Transaminase Activities of Precipitates Separated from Fowl Blood Plasma by Means of Successive Fractional Precipitation at Controlled pH

(A) F-GOT Activity.



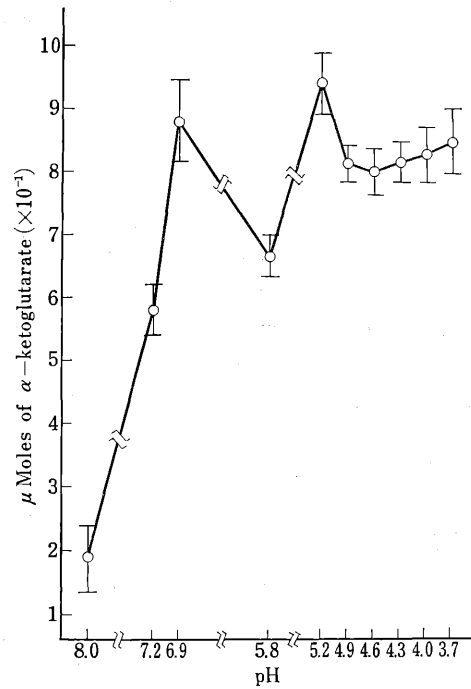
Remarks.

- pH was adjusted with the following solutions:
 - 0.5 N acetate.
 - 0.04 N ammonia.
- pH determination was made by means of a glass electrode.
- The sample was centrifuged at 700 xg at 0°C for 20 minutes. The supernatant was saved. The precipitate was washed thoroughly, resuspended in distilled water buffered at pH 7.0 with 0.005 M phosphate, and recentrifuged at 250 xg at 0°C for 10 minutes. Before use, the precipitate was resuspended in the same distilled water as mentioned above.
- The result obtained is expressed by the mean of 30 experiments and standard deviation.

お、かなりの活性の発現が認められる。しかし、F-GOT は、この pH 区の沈降物に対しては著しく活性を減弱する。

このように、F-GOT と R-GOT の活性部分間には、完全に一致する等電点沈降域は存在しない。しかしながら、それぞれ 2 個の主活性部分は、比較的接近した pH 区を等電点としているの

(B) R-GOT Activity.



Remarks.

See the remarks of Fig. 1-(A).

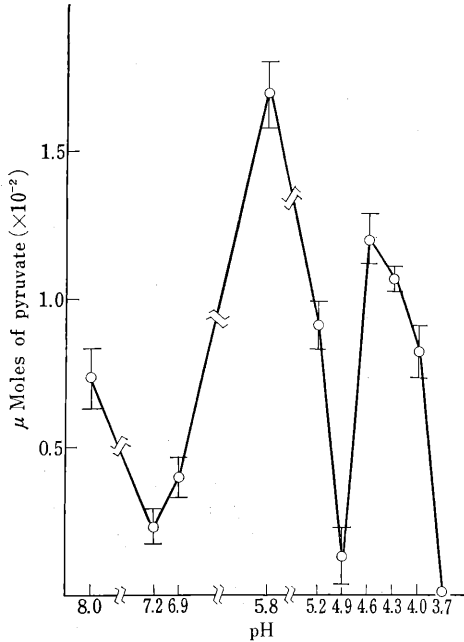
が認められる。

これに対して GPT の F, R 系 T-ase の活性部分は、前者が pH 5.8 と 4.6、後者が pH 6.9 と 4.6 のそれぞれ二つの pH 区に、等電点を持っている。これらのうち、pH 4.6 の等電点沈降物中には、両 T-ase に共通の活性部分が含まれているが、しかし、もう一つの活性部分は、かなり離れた pH 区に等電点があり一致しない。

ここで、これら GOT, GPT の各 F, R 系 T-ase の活性部分の等電点沈降域を、F, R それぞれの系の T-ase 同志で比較してみると次のとおりである。すなわち F-GOT および F-GPT の活性部分には、共通の等電点沈降域は存在しないが、これに対して、R-GOT および R-GPT では、pH 6.9 に等電点を示す沈降物中に共通の活性部分を持っており、しかも、他のもう一つの活性部分も、pH 5.2 と 4.6 の比較的近い pH 区に等電点が存在し、R 系両 T-ase の活性部分は、

Fig. 2 (A and B). Transaminase Activities of Precipitates Separated from Fowl Blood Plasma by Means of Successive Fractional Precipitation at Controlled pH

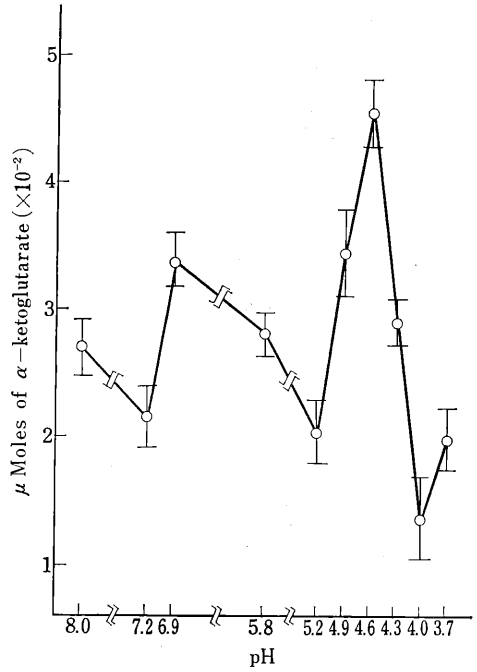
(A). F-GPT Activity.



Remarks.

See the remarks of Fig. 1-(A).

(B) R-GPT Activity.



Remarks.

See the remarks of Fig. 1-(A).

かなり類似する等電点 pH 区に沈降性を持つていることが示されている。しかし R-GOT が pH 4.3~3.7 間の沈降物に対して発現する活性傾向は、F系両 T-ase の場合と同じく、R-GPT の場合にも認めることはできない。

B. ONCLEY 9 法 (A, B) によって分別される血漿中 F, R 系 GOT および GPT の活性分画群の分類とその活性値

等電点沈殿法の結果からも明らかなように、分類上 4 種の T-ase の主活性部分は、すべて pH 7.2~5.8, pH 5.2~4.6 の二つの範囲内に限定される等電点に沈降性を持っており、しかも活性部分の多くが、COHN 6 法分画群の Fraction (F)-II+III, IV-4 中に分別される可能性を示している。このことから、これら分画群をさらに細分別するために、ONCLEY 9 法 (A, B) を用いてみた。

なお、ONCLEY 9 法 (A, B) の命名分類は、著者によるもので、ONCLEY 9 法のうち、F-II+III

の細分画法で、分別 pH 区を pH 7.4~5.2 に持つものを ONCLEY 9 法 (A) とし、同じく F-IV-4 の細分画法で、分別 pH 区を pH 6.0~4.4 に持つものを ONCLEY 9 法 (B) として、分類している。

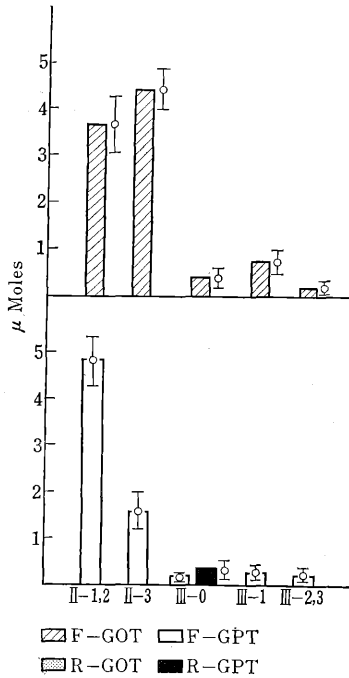
1. ONCLEY 9 法 (A) 分画群の T-ase 活性

Fig. 3 の上の図は GOT, 下の図は GPT の各 F, R 系 T-ase の活性関係を示すもので、両図とも、横軸には、ONCLEY 9 法 (A) によって得られた分画物名を、縦軸には、それらの各 T-ase 活性値を示してある。

これをみると、F-GOT および F-GPT の活性は、F-II 群においてとくに高い。しかし、F-III 群では、これと比較して、その活性は、はるかに低い。

ここで、F-II 群中の 2 分画が持っている F-GOT および F-GPT の各活性値を、その原分画である F-II+III が有する F-GOT 活性値 $1.10 \pm 0.18 \mu\text{M}$ および F-GPT 活性値 $0.62 \pm 0.25 \mu\text{M}$

Fig. 3. Transaminase Activities of Fractions Sub-fractionated from Fraction II+III by Use of the 9th Method of Oncley



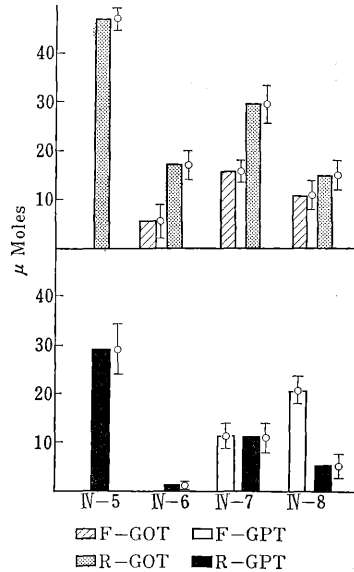
Remarks.

The result obtained is expressed by the mean of 60 experiments and standard deviation.

と比較してみると、F-GOT に関しては、F-II-3 ($4.45 \pm 0.45 \mu\text{M}$) > F-II-1, 2 ($3.70 \pm 0.65 \mu\text{M}$) であり、F-GPT に関しては、F-II-1, 2 ($4.92 \pm 0.55 \mu\text{M}$) > F-II-3 ($1.62 \pm 0.35 \mu\text{M}$) の関係にある。このように、F-II 群の F-GOT 活性は、原分面の 3~4 倍、F-GPT 活性は原分面の 3~8 倍で、いずれも原分面より高い活性を持つ分画として分別されている。

これに対して、R-GOT および R-GPT に活性を持つ分画を ONCLEY 9 法 (A) 分画群中から求めてみると、原分面中、 $0.47 \pm 0.04 \mu\text{M}$ の活性を持っていた R-GOT の活性部分は、本法では全く分別回収が不可能で、R 系両 T-ase のうちでは、R-GPT に活性を示す F-III-O のみが、わずかに分別されているに過ぎない。この F-III-O の R-GPT 活性値は $0.35 \pm 0.03 \mu\text{M}$ であるが、これは、原分面の持つ R-GPT 活性値 $0.31 \pm 0.03 \mu\text{M}$ とほぼ同じで、原分面中の R-

Fig. 4. Transaminase Activities of Fractions Sub-fractionated from Fraction IV-4 by Use of the 9th Method of Oncley



Remarks.

The result obtained is expressed by the mean of 110 experiments and standard deviation.

GPT 活性部分のほとんどが F-III-O 中に分別されているとよい。

2. ONCLEY 9 法 (B) 分画群の T-ase 活性

Fig. 4 で、上の図は GOT, 下の図は GPT の各 F, R 系 T-ase の活性関係を示しており、両図とも、横軸には、ONCLEY 9 法 (B) によって得られた分画物名を、縦軸には、それらの各 T-ase 活性値を示してある。

これをみると、ONCLEY 9 法 (B) 分画群中、F-GOT に活性を持つ分画と、その活性値は、F-IV-7 ($15.75 \pm 2.15 \mu\text{M}$) > F-IV-8 ($11.05 \pm 2.25 \mu\text{M}$) > F-IV-6 ($5.65 \pm 2.05 \mu\text{M}$) のように表わされる。これらを、原分面 F-IV-4 の F-GOT 活性値が $1.67 \pm 0.35 \mu\text{M}$ であったのと比較すると、これら 3 分画は、その 3~9 倍相当の活性を持つ分画として分別されている。

これに対して、R-GOT には、F-IV-5 ($47.55 \pm 1.75 \mu\text{M}$) > F-IV-7 ($29.76 \pm 2.77 \mu\text{M}$) > F-IV-6 ($17.05 \pm 2.05 \mu\text{M}$) > F-IV-8 ($14.85 \pm 2.05 \mu\text{M}$) の序列で、ONCLEY 9 法 (B) 分画群のすべてが活性を持っており、いずれの活性値も、原分面 R-

GOT の 15~54 倍に相当する。

F-GPT は、分別 4 分画中では、F-IV-8 ($20.85 \pm 2.15 \mu\text{M}$) > F-IV-7 ($11.5 \pm 2.05 \mu\text{M}$) の 2 分画にのみ活性が認められる。これは、原分画の F-GPT 活性値が $0.98 \pm 0.12 \mu\text{M}$ であるのと比較して 12~21 倍に相当する。

これに対して、R-GPT 活性部分の分別 4 分画間での分布態度は R-GOT の場合とほぼ同じで、その活性傾向も似がよっており、原分画の R-GPT 活性値が $0.28 \pm 0.02 \mu\text{M}$ であるのと比較して、F-IV-5 ($29.07 \pm 3.97 \mu\text{M}$) > F-IV-7 ($11.45 \pm 2.15 \mu\text{M}$) > F-IV-8 ($5.22 \pm 1.74 \mu\text{M}$) > F-IV-6 ($1.33 \pm 0.25 \mu\text{M}$) で示される各活性値は 4~104 倍に相当する。このうち、とくに F-IV-5 は、R-GPT に対して著しい高活性を持つ分画として分別されていることが示されている。

考 察

A. 等電点沈殿法で確認された血漿中 T-ase の活性部分の分別に用いた ONCLEY 9 法 (A, B) の有用性

ONCLEY 9 法 (A) 分画群中、F-GOT に主として活性を持つ分画は F-II-1, 2 であったが、この分画は、pH 5.2, EtOH 17% を沈降条件として F-II-3 を分別除去した後の上清液 (Sup.) II-3 を、さらに pH 7.4, EtOH 25% で分別して得られるものである。このことから、pH 7.2 付近に等電点を持つ F-GOT 活性部分のうちの一つは、本分画中にそのほとんどが分別されるものと考えられる。

ONCLEY 9 法 (B) によれば、F-GOT 活性部分の一部は、pH 4.4 および 4.9 の近縁条件下で、それぞれ EtOH 18% および 40% の添加によって分別される F-IV-6 および IV-8 中に分布している。これは、等電点沈殿法によって F-GOT の場合に認められた二個の活性部分のうちの一つが等電点を pH 4.9 付近に持つと推察された点と一致している。

そのほか、ONCLEY 9 法 (B) 分画群中では、pH 6.0, EtOH 40% を分別条件としている F-IV-7 中に、F-IV-6 および IV-8 と比べて、さらに大きな F-GOT 活性部分が分別されてくるが、これは、等電点沈殿法で確認した pH 7.2 および 4.9 以外の pH 区に分布している活性部分が、低

温 EtOH 処理によって等電点沈降性を持つてくことを示唆するものと考えられる。これらのことから、鶏血漿中 F-GOT の活性部分は、少なくとも 2~3 カ所に等電点沈降域を持つ成分中に、分別されるものであると見てよいであろう。

これに対して、R-GOT 活性部分は、ONCLEY 9 法 (A) 分画群中には分別することができない。このことは、R-GOT 活性部分が、ONCLEY 9 法 (A) 分画群の各 Sup. へ移行することを示唆するものと考えられた。そこで、それぞれの Sup. の R-GOT 活性を測定したところ、Sup. II-1, 2 および Sup. III-2, 3 中に、分別条件からみて等電点 pH を 6.9 に持つと考えられた R-GOT 活性部分の一つが、分別移行していることが確かめられた。

その他、等電点を pH 5.2 区にもつもう一つの R-GOT 活性部分は、ONCLEY 9 法 (B) によると、F-IV-5 および IV-8 中に分別されるものと考えられる。このうち、F-IV-5 は Source sample (SS) を F-IV-5+6 に、F-IV-8 はその F-IV-5+6 を除去した後の Sup. IV-5+6 から、pH 6.0, EtOH 40% で沈降する F-IV-7 を分別した後の Sup. IV-7 を SS としているが、しかし、これら両分画の分別 pH 区は、ともに pH 4.9 にあり、添加 EtOH の終濃度は、F-IV-5 が 1%, F-IV-8 が 40% であるところから、成分的にかなり異なる両分画中に、活性部分が分別されているものと考えられる。このことは、等電点沈殿法で pH 5.2 付近に分布していた R-GOT 活性部分の多くが、これらの分画中に、ほとんど分別されて来るとしても、この pH 区に等電点を持つ活性部分は、少なくとも二つの沈降性状を持つ成分を含むものと考えられる。

また、F-IV-6 中には、その分別条件からみて、等電点を pH 4.6~3.7 間を持つ強酸性側活性部分の一部が分別されて来ているものと思われ、さらに F-IV-7 中には、R-GOT の一方の活性部分である pH 6.9 部分に近縁の成分が分別されるものと推察される。

一方、F-GPT 活性部分のうちの一つは、等電点を pH 5.8 に持っていたが、ONCLEY 9 法 (A) によれば、この部分は、主として F-II-3 中に分別されるものと考えられる。このことは、さきに述べた F-GOT と同系中で、しかも比較的近縁の

分画中に、F-GPT の活性部分が分別されて来ることを示している。また、ONCLEY 9 法 (B) 分画群中では、F-IV-7 および IV-8 中に F-GPT 活性部分が分別され、これらが、それぞれ pH 6.0 および 4.9 を分別条件としているところから、pH 5.8 および 4.6 付近に等電点を持つ F-GPT の活性部分は、ONCLEY 9 法 (B) によればその両者を同時に分別することが可能であり、しかもこのうち、F-IV-7 中の活性部分は、F-II-3 中のそれと沈降性質上、類似するものと考えられる。

R-GPT 活性部分は、pH 6.9 と 4.6 とに等電点が存在していたが、ONCLEY 9 法 (A) 分画群中では、pH 5.7, EtOH 25% を分別条件としている F-III-O のみに活性が認められており、しかもそれは、原分画 F-II+III の R-GPT 活性と、ほぼ同じ活性値を持っている。このことから、等電点を pH 6.9 付近に持つと考えられた R-GPT 活性部分のうちの一つは、低温 EtOH 処理によって pH 5.7 付近に沈降性を持つ成分として分別されて来たものと考えられる。

また、pH 4.6 に等電点をおつ活性部分は、ONCLEY 9 法 (B) によって、F-IV-5, IV-6 および IV-8 中に分別されるものと考えられ、これは、R-GOT 活性部分と共通の分画中に R-GPT の活性部分の一部が存在していることを示している。これらの結果は、R 系両 T-ase が、同種、もしくはきわめて類似した成分を、活性部分として含んでいることを示唆するものと考えられる。

以上、述べて来たように、各系 T-ase の持つ複数の活性部分は、ONCLEY 9 法 (A, B) によって大部分をその分別系傘下の分画中に分別することができる。しかし、分類上 4 種の T-ase に対して、とくに高活性を持つ分画の分取を可能とさせるという点では、ONCLEY 9 法 (B) が、(A) 法にまさっている。

そのほか、COHN 6 法および ONCLEY 9 法分画群のうち、脂質含有分画において、とくに認められた R 系 T-ase の独立的な、しかも高活性の発現については、今後の T-ase 精製上の問題点として留意することが必要である。たとえば、人血漿中の脂質成分は、COHN および ONCLEY によると、F-III-O, IV-1 および IV-5 にその大部分が分別され、このうち、F-IV-5 には、電気

泳動上 α_1 -globulins (globs.) 位に一致する Lipoprotein が主成分として含まれていると述べている。

しかし、鶏血漿から得られる F-IV-5 は、多量のコレステロールを含む脂質分画ではあるが、これは、泳動成分上からは、おもに β -globs. 位の Lipoprotein から成っており、しかも本分画は、いずれの R 系 T-ase に対しても特徴的に高活性を示す結果が得られている。また、そのほか、COHN が人血漿中脂質成分の分別分画として指摘している F-IV-1 を、鶏血漿から分別した結果からは、この分画も、F-IV-5 と同じく、R 系の両 T-ase に対して活性を持ち、また同様に、F-III-O では、R-GPT のみにとくに活性の発現が認められるなどの知見が得られている。現在のところ、これらの結果は、単に鶏血漿から得られる脂質を高率に含有する分画において、特徴的に R 系の T-ase のみが高活性の発現をみせるという点を指示するのみにとどまっているが、このことは、今後の R 系 T-ase の分別精製において、SS としての血漿からの脂質成分の除去、もしくはその方法などに関して考慮が必要であることを示唆するものと考えられる。

B. ONCLEY 9 法 (B) 分画群の Disc 電気泳動成分から考察される各 T-ase の担体成分

ONCLEY 9 法 (B) によって分別される 4 分画のすべて、もしくはそのうちの数分画は、F, R 系の GOT, GPT に対して、それぞれ活性を持っているが、これらの活性分画の Disc 電気泳動^{8, 23-26, 28)}の結果から、特定の T-ase に対して活性を持つ分画間には、数個の共有成分が含まれていることがわかっている。

そこで、これら分画間の共有成分と活性 T-ase の種類から、各 T-ase 別に、その担体成分を推察してみると、次のとおりである。

なお、各分画中、含有成分の表示のために、算用数字—アルファベットを用いているが、これは、Disc 電気泳動によって分離する鶏血漿中蛋白質成分の「相対移動度¹⁸⁾」を基本とした、7 群 21 種の成分分類法に準拠するもので、それらの関係は、著者によってまとめられている。

ここで、F-GOT に活性を持つ分画間で共有される含有成分を求めてみると、それらからは、そ

れに相当する共通成分を、直接的にみつけることはできない。しかし、 α -Lipoprotein (α L: 2-a), α_2 -globs. (2-c), Fast α_2 -globs. ($F\alpha_2$: 3-b), Transferrin C (Tr.: 3-d), β -, r-globs. (5-a) の5成分が、いずれも共通して、活性分画間から除去されていることが認められる。これらの結果は、活性3分画中に残存する含有成分のうち、Albumin (Alb.), α -globs. group の一部、 β '-globs. らのいずれかの成分が、単一、もしくは複合して、F-GOT の担体成分として関係していることを示すものである。

一方、F-GPT に活性を持つ分画間では、明らかに 1-b 位の Alb. と、4-a 位の β '-globs. が共有成分として認められる。

これに対して、これら F 系両 T-ase に対応する R 系両 T-ase が活性を持つ分画間で共有される成分には、 α -globs. groups のうちでは、2-b 位の α_1 -globs., 3-a 位の $F\alpha_2$, 6-c 位の $S\alpha_2$, また β -globs. group のうちでは 4-b, c 位の β '-globs., さらに β -, r-globs. group のうちでは 5-b, 6-b 位の β -, r-globs. などのほか、3-c 位の Tr. らをあげることができる。このことから、R 系両 T-ase の担体成分としては、これら4成分群8種中のいずれかが、それに当たるものと考えられる。

このように、各 T-ase, とくに対応 T-ase 別に必要と推察される担体成分の種類は、必ずしも同じではない。しかし、活性分画の分布態度を同じくする R 系両 T-ase は、当然ながら、きわめて類似の成分群を担体とするが、対応 F 系 T-ase, とくに F-GPT は、そのうちの成分の一つを、担体として要求するものと考えられる。

ここで、以上の考察点を要約してみると、次のとおりである。

1. Alb. 成分は、GPT の F 系 T-ase の担体成分として必要であると考えられる。とくに、この Alb. を構成する3成分のうちの1~2個の成分が、特定 T-ase の担体としての役割をになうものと推察される。

2. α -globs. group のうち、 α_1 -globs., $F\alpha_2$, $S\alpha_2$ らの各成分を、GOT および GPT の F 系 T-ase は、ともに必要としない。しかし、R 系の両 T-ase は、これらのうちのいずれか一つを、必要な担体成分として要求するものと考えられ

る。しかし、 α L, α_2 -globs. らは、4種の T-ase の担体として、ともに必要ではないと考えられる。この結果は、SHEPHERD & McDONALD³⁰⁾ が人血清中 GOT の担体成分として α_2 -globs. をあげている点とは異なっているところである。

3. Tr. は、F 系の両 T-ase の担体には不要である。しかし、R 系の両 T-ase は Tr. を必要としているものと考えられる。

4. β -globs. group のうち、 β '-globs. は、F-GPT, R 系の両 T-ase らの担体成分として必要であると考えられる。しかし、これは、F-GOT の場合に関しては明らかではない。 $S\beta$ は、4種の T-ase とも必要としないものと考えられる。

5. β -, r-globs. group のうち、一部の β -, r-globs. は、F-GPT と R 系の両 T-ase の担体として必要である。

このように、ここで述べてきた要約点のいくつかは、F-GPT と R 系両 T-ase の担体成分上の部分的な近縁関係を推察させるが、これに対し、F-GOT の場合に関しては、その点十分明らかではなく、さらに精製した活性分画から、これら各 T-ase の担体成分を同定確認することが、今後、必要であると考えられる。

要 約

A. 等電点沈殿法によって確認された、Aspartate aminotransferase (GOT), および Alanine aminotransferase (GPT) の Forward (F) および Reverse (R) 系アミノ基転移酵素 (T-ase) の主活性部分の等電点 pH 区は、それぞれ次のとおりである。

1. GOT

(a) F-GOT: pH 7.2, 4.9.

(b) R-GOT: pH 6.9, 5.2.

2. GPT

(a) F-GPT: pH 5.8, 4.6.

(b) R-GPT: pH 6.9, 4.6.

これら T-ase のうち、R-GOT は、上に述べた二つの主活性部分のほかに、pH 4.0 以下に等電点を持つ沈降成分に対しても、なお活性を持っている。

B. ONCLEY 9 法 (A, B) によれば、各系 T-ase の活性部分を、その分画系傘下の特定分画中に分別することができる。このうち、ONCLEY 9

法 (A) は、その分画群中の数個に F-GOT および F-GPT を主に、その他、R-GPT にわずかに活性を持つ部分を分別し得るのみであるが、これに対して、ONCLEY 9 法 (B) は、分類上 4 種の T-ase の活性部分を、その分画群中に分別し得る。しかも、これは、ONCLEY 9 法 (A) 分画群が持つ各 T-ase 活性値より、さらに高い活性部分を分別し得るという点でまざっている。

ここで、その高活性分画の沈降分別条件を ONCLEY 9 法 (B) からまとめてみると、次のとおりである。

1. GOT

- (a) F-GOT: F-IV-7 (pH 6.0, EtOH 40%).
- (b) R-GOT: F-IV-5 (pH 4.9, EtOH 1%).

2. GPT

- (a) F-GPT: F-IV-8 (pH 4.9, EtOH 40%).
- (b) R-GPT: F-IV-5 (pH 4.9, EtOH 1%).

文 献

- 1) 赤堀 (編) (1955): 酵素研究法, **1**, 129~130頁, 東京, 朝倉書店.
- 2) 赤堀, 水島 (編) (1957): 蛋白質化学, **3**, 356~359頁, 東京, 共立出版.
- 3) 赤堀 (編) (1963): 酵素研究法, **4**, 732~740頁, 東京, 朝倉書店.
- 4) 赤堀, 沖中 (監修) (1964): 臨床酵素学, 411頁, 東京, 朝倉書店.
- 5) 赤堀 (監修) (1966): 酵素ハンドブック, 274~277頁, 東京, 朝倉書店.
- 6) 安藤, 寺山, 西沢, 山川 (編) (1967): 生化学研究法, **II**, 497~498頁, 東京, 朝倉書店.
- 7) COHN, E. J., STRONG, L. E., HUGHES, W. L. Jr., MULFORD, D. J., ASHWORTH, J. N., MELIN, M. and TAYLOR, H. L. (1946): *J. Am. Chem. Soc.*, **68**, 459~462.
- 8) DAVIS, B. J. (1964): *Ann. New York Acad. Sci.*, **121**, 404.
- 9) FASELLA, P., RIVA, F., GIARTOSIO, A. and TURANO, C (1964): *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **16**, 227~228.
- 10) FASELLA, P. and HAMNES, G. G. (1964): *Biochemistry*, **3**, 530.
- 11) 藤井 (1964): 生化学実験法, 改訂13版 (定量篇), 75~83頁, 東京, 南山堂.
- 12) 藤井 (1964): 生化学実験法, 改訂13版 (定量篇), 489~510頁, 東京, 南山堂.
- 13) JENKINS, W. T., SIZER, I. W. and YPHANTIS, D. A. (1959): *J. Biol. Chem.*, **234**, 51~57.
- 14) JENKINS, W. T. and SIZER, I. W. (1960): *J. Biol. Chem.*, **235**, 620~621.
- 15) JENKINS, W. T. (1961): *Federation Proc.*, **204**, 4~7.
- 16) JENKINS, W. T. (1962): *Biochem. J.*, **82**, 1~2.
- 17) 金井 (1964): 臨床検査法提要, 改訂増補 21~23版, VII-50~54頁, 東京, 金原出版.
- 18) 小林, 森 (編) (1960): 沔紙電気泳動法の実際, 193~221頁, 東京, 南江堂.
- 19) LIS, H. (1958): *Biochem. Biophys. Acta*, **28**, 191~192.
- 20) LIS, H., FASELLA, P., TURANO, C. and VECCHINI, P. (1960): *Biochem. Biophys. Acta*, **45**, 529~530.
- 21) MORINO, Y., ITOH, H. and WADA, H. (1963): *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **13**, 348.
- 22) MORINO, Y., KAGAMIYAMA, H. and WADA, H. (1964): *J. Biol. Chem.*, **239**, 943~944.
- 23) 守屋, 渡辺 (1964): 生物物理化学, **10**, 2, 95.
- 24) 茂木, 青柳, 鈴野, 分山, 中村 (1964): 生物物理化学, **10**, 2, 95~104.
- 25) 永井 (1964): 蛋白質・核酸・酵素, **11**, 9, 744~749.
- 26) 永井 (1964): 蛋白質・核酸・酵素, **11**, 10, 818~823.
- 27) ONCLEY, J. L., MELIN, M., RICHERT, D. A., CAMERON, J. W. and GROSS, P. M. Jr. (1949): *J. Am. Chem. Soc.*, **71**, 541~542.
- 28) ORNSTEIN, L. (1964): *Ann. New York Acad. Sci.*, **121**, 321.
- 29) REITMAN, S. and FRANKEL, S. (1957): *Am. J. Clin. Pathol.*, **28**, 56~63.
- 30) SHEPHERD, H. G. Jr., and McDONALD, H. J. (1958): *CLIN. CHEM.*, **4**, 1319.
- 31) 山田 (1967): 日獣誌 (学会号), **29**, Suppl., 136.
- 32) 山田 (1968): 日獣誌 (学会号), **30**, Suppl., 38~39.
- 33) 山田 (1969): *Bull. Univ. Osaka Pref.*, **21**, Series B, 343~345.
- 34) 吉川 (1954): pH の理論と測定法, 359~399頁, 東京, 丸善.

STUDIES ON A METHOD FOR SEPARATING ASPARTATE- AND ALANINE-AMINO TRANSFERASE IN FOWL BLOOD PLASMA

Kazuhiko YAMADA

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

(Received for Publication November 2, 1970)

In purifying the transaminase in fowl blood plasma, it is necessary to use a method for systematic separation of the blood plasma. No detailed investigations on this aspect have been reported. Then, during the days previous to the subfractionation of plasma protein components, the plasma was separated by means of successive fractional precipitation at a controlled pH value. The isoelectric point of transaminase in the fowl blood plasma was determined as follows.

In addition, the aspartate aminotransferase (GOT) and alanine aminotransferase (GPT) reported in this paper could be classified into four types known by the general terms F-GOT, R-GOT, F-GPT, and R-GPT. These terms were used as synonyms of forward-GOT, reverse-GOT, forward-GPT, and reverse-GPT, respectively. Each of them was divided by the kind of transaminase that was directly related to the reversible transamination reaction.

- (a) F-GOT: pH 7.2 and 4.9
- (b) R-GOT: pH 6.9 and 5.2
- (c) F-GPT: pH 5.8 and 4.6
- (d) R-GPT: pH 6.9 and 4.6

These findings offered helpful suggestions for the fractionation of transaminases by the use of Cohn and Oncley's methods. Then, of these methods, the 6th and 9th methods were used experimentally for the purpose of fractionating the transaminase. As a result, it was found that the 9th method of ONCLEY was effective for practical purposes. Especially, the fractions of IV-5, 6, 7, and 8 that had been subfractionated from Cohn's fractions.

IV-4 by the 9th method of ONCLEY showed activities higher than the remaining fractions.

In those fractions, especially that of IV-5, nothing could compensate the appearance of F-GOT and F-GPT activities, but only R-GOT and R-GPT activated the fraction of IV-5. This result suggests that there may be some correlation concerning the mode of fractional precipitation between R-GOT and R-GPT. More detailed information on this aspect is to be given in a report to come.

In this way, each of the active fractions for individual transaminase is no good agreement concerning the mode of fractional precipitation.

On the basis of the results obtained, the conditions for fractionating the transaminases in fowl blood plasma can be expressed as follows.

	Transaminase	Fraction	Method for separating fraction	
			pH	Final concentration of ethanol (vol. %)
(a)	F-GOT	IV-7	6.0	40
(b)	R-GOT	IV-5	4.9	1
(c)	F-GPT	IV-8	4.9	40
(d)	R-GPT	IV-5	4.9	1