

질량 분석기를 이용한 트랜스아미나제 반응 분석을 위한 케토산 화학 수식법 개발

† 이 창 수 · 김 윤 곤 · 김 은 미 · 김 병 기
서울대학교 공과대학 응용화학부
† 충남대학교 공과대학 신소재 공학부 화학공학과
(접수 : 2004. 9. 11., 게재승인 : 2004. 10. 23.)

Derivatization of α -ketoacid for the Analysis of Aminotransferase Reaction Using Mass Spectrometry

Chang-Soo Lee[†], Yun-Gon Kim, Eun-Mi Kim, and Byung-Gee Kim
School of Chemical Engineering and Institute of Molecular Biology and Genetics,
Seoul National University, Kwanak-Gu, Seoul 151-742, Korea

[†] Department of Chemical Engineering, Chungnam National University, Yuseong-Gu, Daejeon 305-764, Korea
(Received : 2004. 9. 11., Accepted : 2004. 10. 23.)

A derivatization method in mass spectrometry for small molecular analysis was developed to solve the problems of volatility of many analytes, difficult ionization of analytes, and indiscriminating isobaric analytes. This derivatization method, oximation of α -ketoacid, in the transaminase reaction leads to change of mass difference between amine reactants and ketoacid products. In addition, regardless of the kinds of ketoacid, the linear relationship between the peak intensity and its concentration (from 1 mM to 10 mM) shows that quantitative analysis of the conversion of the reaction can be executed by the analysis of peak intensity of the corresponding oximated ketoacids. Furthermore, this method can be used for identifying transaminase as well as determining its substrate specificity

Key Words : Mass spectrometry, screening, derivatization, transaminase, substrate specificity

서 론

제약 산업에 있어서 수천 혹은 수만 가지 화합물들 중에서 생물학적으로 의미 있는 물질을 발굴하는 고속 탐색 기술은 매우 중요한 기술로 자리잡고 있다(1). 특히, 효소의 생화학 반응 기질과 생성물, 대사 중간체, 생체 고분자 및 세포 구조를 이루는 구조 성분 (Building block), 및 의약품 등과 같은 저 분자량 화학 물질들은 매우 중요한 역할을 하고 있다. 하지만, 이런 가치에 비하여 저 분자량 고속 대용량 탐색 발굴 방법 (High throughput screening)은 대부분 형광법을 근거로 한 방법에 의존하고 있으며(2, 3) 또한, 생체 및 최종 산물의 농도가 매우 적어서 검출 한계가 있다(4). 그리고, 여러 가지

반응물 및 생체 물질의 분석 시 기타 부산물이 관심 대상 물질의 분석에 방해를 하여 기존 분석법에 제한을 가지고 있는 것이 현실이다(5). 따라서, 대부분 관심 있는 저 분자량 물질을 분석 전에 많은 분리 정제 시간을 들여 분석하고 있다. 그러나, 최근 질량 분석기를 이용한 분석 방법이 생물학, 화학, 식품 및 생물 공학 분야에 있어서 중요한 방법 널리 이용되고 있다. 질량 분석기를 이용한 분석 방법은 형광법과는 달리 다양한 장점을 가지고 있다. 첫째는 특별한 화학적 수식이 필요 없으며 둘째는 많은 양질의 데이터를 실시간으로 얻을 수 있으며, 셋째는 높은 감도와 정확도를 지니며, 넷째는 신속한 데이터 처리의 장점을 가지고 있어 고속 탐색 발굴 분석 방법으로 매우 큰 주목을 받고 있다(6).

대표적인 질량 분석기를 이용한 분석법은 매트릭스 보조 레이저 탈착/ 이온화 (matrix assisted laser desorption/ionization), 전극분무 이온화 (electrospray ionization) 그리고 기체, 액체 크로마토 그래피 (gas or liquid chromatography)이 적용되고 있다. 그 가운데서도 특히, 매트릭스 보조 레이저

[†] Corresponding Author : Department of Chemical Engineering,
Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea
Tel & Fax : +82-42-821-5896
E-mail : rhadum@cnu.ac.kr

탈착/ 이온화 질량 분석기와 전극분무 이온화 (electrospray ionization)는 연성 이온화 성질 (soft ionization property)을 가지고 있어 생체 고분자 분석에 현재 많이 사용되고 있다(7). 따라서, 이런 질량 분석기를 이용하여 유기산, 아미노산, 펩타이드, 인산, 당, 당지질 등과 같은 다양한 저 분자량 물질을 분석할 수 있는 가능성이 있으며 이를 통하여 효소 반응의 기질과 반응물의 발굴 탐색 (screening), 미생물 배양 중 대사 물질의 분석, 대사 흐름 분석 (metabolic flux analysis)을 수행 할 수 있다(8). 그러나 질량 분석기를 이용한 저 분자량 물질 분석방법은 첫째, 대부분 분석 물질이 높은 휘발성으로 인해 건조 및 결정화 단계를 거치면서 많은 손실을 가져오게 되고 특히, 고 진공 상태의 매트릭스 보조 레이저 탈착/ 이온화 질량 분석기를 이용하여 분석하게 되면 분석하는 동안 분석물의 손실이 크며 둘째, 대부분 저 분자량 물질이 극성 기능기들의 부족으로 인해 이온화가 쉽게 이루어지지 않아 한계가 있으며, 셋째, 매트릭스 보조 레이저 탈착/ 이온화 질량 분석기에서 사용되는 유기 매트릭스는 저 분자량 물질 분석의 피크를 감소시키거나 피크가 겹치게 될 수 있는 단점이 있다(9).

질량 분석기를 이용한 분석 방법들 가운데 생체 반응의 기본인 효소 반응을 고속으로 빠르고 정확하게 저 분자량 물질의 분석 방법은 매우 필요한 예이다. 공업적으로 유용한 효소들은 일반적으로 넓은 기질 선택성과 의약품들의 키랄 중간체등의 광학활성 물질 합성에 널리 이용되고 있다(10). 따라서, 효소의 기질 특이성, 효소의 기능, 저해제 발굴 및 광학 선택성을 신속히 분석할 수 있는 방법은 제약 및 생물 산업에 있어서 매우 중요하다. 그러나 현재 대부분 사용되는 효소 반응의 분석 방법은 기체, 액체 크로마토그래피(11), 자외선 분광법(12), 미세관 전기영동법(13), 이원색원편광분광기법 (circular dichroism)(14), 핵자기 공명법 (NMR)(15), 또는 형광이미지 분석법 (fluorescence image analysis)(16) 등이 사용되어 오고 있다. 그러나 이런 분석 방법들은 대부분 시료의 분리 정제를 요구하거나 분석 감도 및 분석 시간이 매우 떨어져서 현재 저 분자량 고속 탐색 발굴 방법으로는 적합하지 않다. 이런 분석 방법들의 단점은 최근 단백질 및 유전체 분석에 널리 이용되는 질량 분석기를 이용한다면 문제점들을 극복할 수 있을 것으로 기대되나, 트랜스아미나제 반응의 기질 및 그 생성물이 비슷한 분자량의 기능기를 교환함으로 인해 이들을 구별하는 것이 매우 어렵다(17).

이 문제점을 극복하기 위해 유도체화 반응을 통해 질량 차이를 크게 증가시키면 반응 전 후의 반응물과 생성물을 정확하게 빠르게 분석할 수 있게 될 것이다. 특히, 본 연구에서 표본 시스템으로 선정한 트랜스아미나제 반응은 아민 혹은 아미노산과 같은 아미노 공여자 (donor)는 케톤 또는 케토산과 같은 아미노 수여자 (acceptor)는 다시 아미노산으로 각기 전환된다. 이때 아미노산과 케토산은 질량 차이가 '1'로 인해 질량 분석기를 이용하여 분석 시에 동중 원소 (isobaric) 피크와 겹치게 되는 문제점이 있으며 또한, 케토산 자체가 쉽게 이온화가 되지 못함으로 인해 많은 질량 분석기를 이용하는데 어려움이 있게 된다(Fig. 1). 이에 반응 후에 케토산만 선택적으로 유도체화를 하게 되면 질량 차이를 증가 시키는 동시에 이온화도 쉬워짐으로 인해 질량 분석기를 이용할 수 있

게 된다. 현재까지 유도체화 방법은 액체 크로마토그래피, 기체 크로마토그래피 등에서 널리 사용되나 질량 분석기를 이용한 방법은 일부만 보고 되고 있다(18, 19). 유도체화 방법을 통하여 쉽게 이온화할 수 있는 기능기를 분석물에 도입하여 피크 세기를 증가시킬 수 있으며, 휘발성을 감소시키고, 더 나아가 질량 이동 (mass-shifting)을 통해 매트릭스 및 혼합물에서 같은 질량으로 인한 분석 오류를 줄일 것으로 기대되며, 마지막으로 불안정한 대사물질을 유도체 방법을 통해 안정화될 수 있을 것이다.

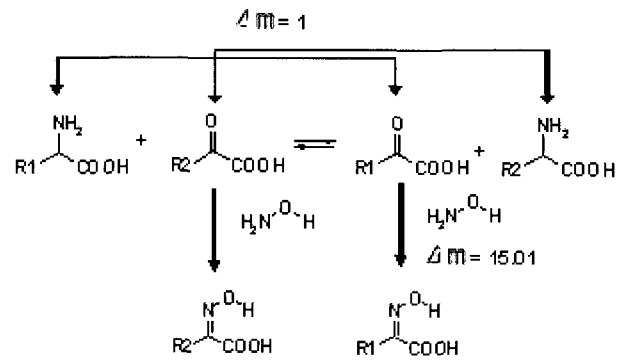


Figure 1. The transaminase catalyzed reaction and the route of oximation of α -ketoacids.

이에 본 연구는 질량 분석기를 이용한 저 분자량 물질 분석 기술 개발을 위하여 표본 시스템으로 트랜스아미나제 효소 반응 분석시 문제가 되는 케토산 (α -ketoacid)을 화학적 수식 방법을 통한 고속 대용량 분석방법의 가능성을 조사하고자 한다.

재료 및 방법

사용된 모든 유기 화학물 및 용매는 시약용 제품을 구입하여 사용하였다. 유도체화 방법은 에펜도르프 PCR 튜브에서 수행하였고, 반응 후 전체 용액을 분리정제 과정 없이 바로 분석에 이용하였다. 먼저, 케토산 유도체화 반응인 옥심화 반응 (oximation)은 시료 부피와 같은 부피의 hydroxylamine hydrochloride 혹은 O-ethylhydroxylamine (10 mM, 50% 에탄올)을 첨가한 후 암실 상온에서 15분간 정치하였다.

매트릭스 보조 레이저 탈착/ 이온화 질량 분석기 방법

매트릭스 보조 레이저 탈착/ 이온화 질량 분석기에 사용된 유기 매트릭스, 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB; 30 mg/ mL)는 0.1% trifluoroacetic acid (TFA)가 함유된 용매(acetonitrile : water = 5 : 5)에 녹여 사용하였으며, 시료 준비는 dried droplet 방법을 이용하여 제조하였다(20). 사용된 질량 분석기는 337 nm 질소 레이저 (Bruker, Bremen, Germany)가 장착된 Biflex IV를 이용하여 분석하였다. 사용된 레이저의 세기는 최적 분해능 및 신호대 잡음비를 가질 수 있도록 30%에서 50% 사이에서 적절하게 사용하였다. 또한 분석된 스펙트럼은 100번 조사를 한 평균치를 취하였으며 분석 전 질량 분석기의 질량 보정은 β -Gly-Asp (Mw; 190.0589), bradkynin

1-5 (Mw; 572.3070), bradykinin 2-9 (Mw; 903.4603), angiotensin I (Mw; 1295.6774), adrenocorticotrophic hormone rat fragment 1-16 (Mw; 1935.9776) and adrenocorticotrophic hormone fragment 18-39 (Mw; 2464.1909)로 구성된 혼합물을 가지고 보정하였다. 모든 실험은 세 번 이상을 수행하여 얻어진 값의 평균치로 구하였으며 사용된 프로그램은 Bruker X-TOF 5.1.1 and Biotools 2.0 program (Bruker, Bremen, Germany)을 이용하여 분석하였다.

전극분무 이온화 질량 분석기 (Electrospray ionization mass spectrometry) 방법

미세관 액체 크로마토그래피 (Agilent 1100, Palo Alto, CA)가 장착된 LCQ 테카 이온 트랩 질량 분석기 (ThermoFinnigan, San Jose, CA, U.S.A.) 를 이용하여 분석하였다. 이동상 용매는 아세토나이트릴 (Acetonitrile)과 물의 일대일 혼합 용매를 5 µl/min 속도로 흘렸다. 주입된 시료의 부피는 0.2 µl로 고정하였으며 그 외 질량 분석기 조건은 기존 연구의 분석 조건을 그대로 이용하였다(20).

결과 및 고찰

케토산의 옥심화 유도체 반응 (Oximation for α-ketoacid)

먼저, 트랜스아미나제 반응의 대표 기질인 케톤산인 피루빅산 (pyruvate)과 알파케토글루타르산 (α-ketoglutarate)를 하이드록실 아민 (hydroxyl amine)과 반응을 시켜 옥심화 반응 전후의 질량 분석기를 통하여 분석을 시도하였다(Fig. 2). 반응후 질량 분석기를 통한 분석 결과는 미 반응 케토산의 검출되지 않았으므로 과량의 하이드록실 아민은 케토산을 거의 모두 유도체화 시킨 것으로 추측된다. 이를 통하여 본래 질량에서 약 '15' 정도 증가한 산물을 전극 분무 질량 분석기를 통해 쉽게 검출할 수 있었다.

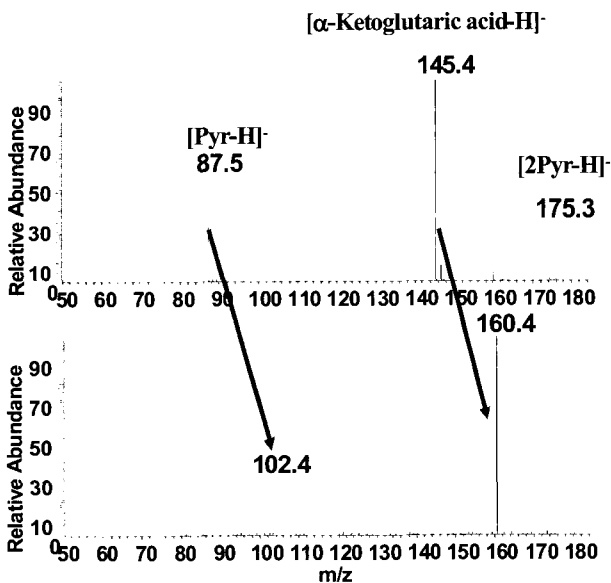


Figure 2. Negative ion ESI-MS spectrum of oximated pyruvate and α-ketoglutarate; the specified masses are m/z values of the negative ions.

또한 이 방법은 동질량의 라이신 아미노산과 알파 케토글루타르산 (α-ketoglutarate) 혼합물을 옥심화 반응을 시킨 후 질량 분석기를 통하여 분석하였다. Fig. 3에서 보듯 이 옥심화 반응은 하이드록실 아민이 케톤산과 반응하였으며 라이신 아미노산과는 반응을 하지 않는 것으로 판명이 났다. 따라서 본 방법은 동 질량의 다른 유기화합물과 케토산을 구별할 수 있었다. 더불어, 이 유도체화 반응의 선택성을 확인하기 위해 세 가지 아미노산이 혼합된 용액에서 옥심화 반응을 시킨 후 분석하였다(Fig. 4). 이 옥심화 유도체화 반응은 아미노산과는 반응 선택성이 없으며 오직 케토산과 선택적 반응이 있음을 알 수 있었다. 따라서, 본 방법을 통하여 실제 트랜스아미나제 반응에 적용할 수 있음을 명확히 보여준다.

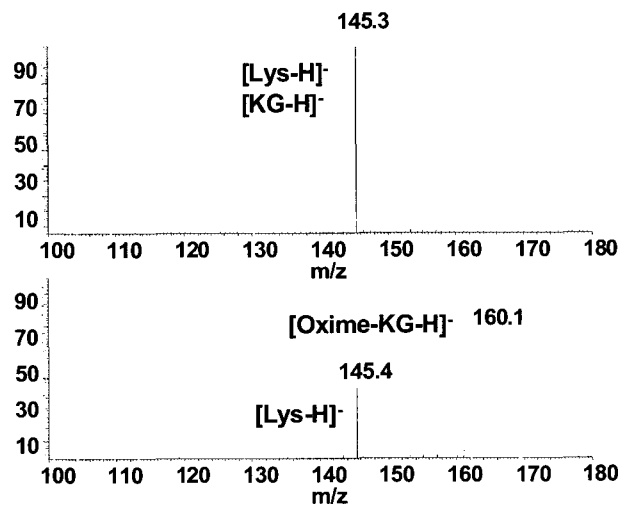


Figure 3. The distinctive mass spectrum in the case of analysis of isobaric compounds such as lysine and α-ketoglutarate.

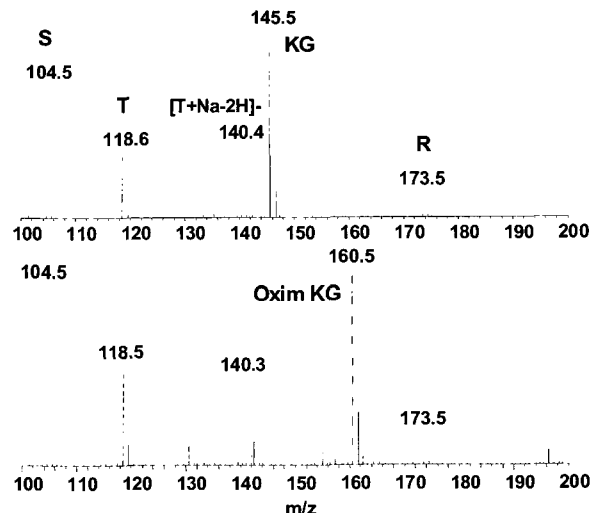


Figure 4. The selective derivation of ketoacid; this spectrum indicate the hydroxylamine selectively reacted with ketoacid. The concentration of used aminoacids, serine, threonine and arginine, is 1 mM, respectively.

전극 분무 이온화 질량분석기 (ESI-MS)를 이용한 정량분석

여러 가지 농도의 반응물과 생성물의 혼합물 상황에서 케토산을 유도체화 시킨 후 전극 분무 이온화 질량 분석기를

통하여 분석된 피크의 세기를 이용화하여 정량 분석 가능성을 조사해 보았다. 케톤산의 농도를 1 mM부터 10 mM까지 변화시킨 후 유도체화시킨 피크의 세기는 선형적으로 증가함을 보여주고 있다. Fig. 5는 옥심 유도체화 반응이 케토산 종류와 무관하게 유사한 선형 분석 형태를 보이고 있다. 따라서, 이 방법은 반응 기질의 전환을 및 생성물의 농도를 질량 분석기를 통해 분석할 수 있음을 알 수 있었다.

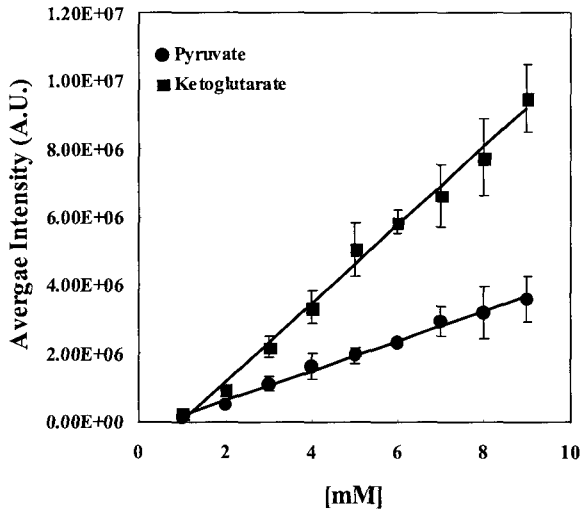


Figure 5. The linear increase of peak intensity with the increase of concentration of ketoacid.

아스파티산 트랜스아미나제 기질 특이성 분석

여러 가지 다양한 아미노 공여체들을 아스파티산 트랜스아미나제와 반응 시킨 후 반응 전후의 피크 변화를 추적하면 이 트랜스아미나제의 기질 특이성을 예측할 수 있다. 트랜스아미나제는 일반적으로 기질 특이성과 유전자 서열 유사성 (sequence homology)을 바탕으로 네가지 소그룹 (subgroup)으로 분류되나 넓은 의미로는 반응 기질의 아미노 그룹의 위치에 따라 크게 알파 아미노산의 알파 아미노기를 아미노기 전이 반응 (transamination)시키는 알파 아미노산 트랜스아미나제 (ω -AT; subgroups I, III, IV) 또는 오메가 트랜스아미나제 (ω -AT; subgroup II)로 분류된다(21). 그 중에서도 아스파티산 트랜스아미나제 (aspartate, 2-oxoglutarate aminotransferase, EC 2.6.1.1; AspAT)는 호모다이머 구조를 가지며 아스파티산과 같은 산성 기질에 기질 특이성을 보이며 방향족 아미노산들과는 반응성이 거의 없는 것으로 알려졌다(22).

상기의 지식을 바탕으로 5가지의 아미노산 혼합 기질을 가지고 효소 반응을 보낸 후 매트릭스 보조 레이저 탈착 이온화 질량 분석기를 통한 반응 전후의 기질들과 반응 생성물을 분석한 결과, 반응 기질 중 아스파티산과 케토산은 반응 30분 후 거의 다 소모 되었으며 반면에 이 기질이 반응하여 생성된 생성물인 글루타믹산이 검출되었다. 하지만 그 외의 반응 기질은 피크의 세기 변화가 거의 없으므로 반응이 진행되지 않았음을 알 수 있었다(Fig. 6). 따라서, 본 연구에서는 반응 기질들의 특이성을 토대로 사용된 효소가 아스파티산 트랜스아미나제를 증명할 수가 있었다. 또한 이 결과는 기존의

연구 결과와 매우 일치하여 이런 유도체화 반응을 통하여 질량 분석기를 이용한 탐색 발굴 기술은 기질 특이성과 사용된 트랜스아미나제의 소그룹 (subgroup)을 결정하는데 응용될 수가 있을 것으로 기대된다.

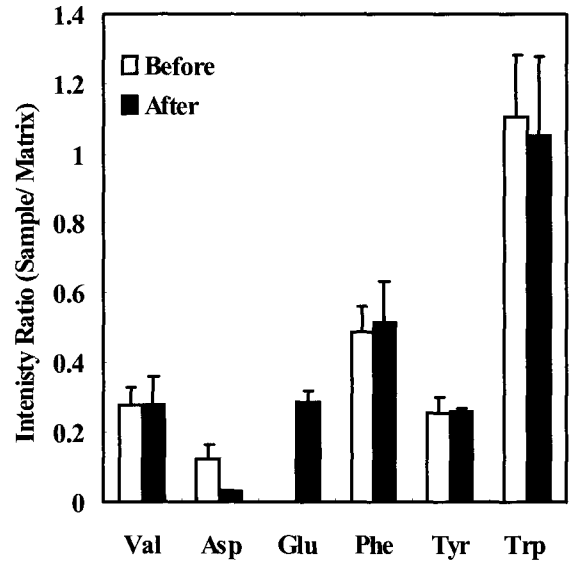


Figure 6. The screening of substrate specificity with aspartate aminotransferase by difference of relative peak intensity after reaction, which was obtained from MALDI-MS; In the case of MALDI-MS, the matrix peaks are used for internal standard.

요 약

본 연구에서는 고속 탐색 발굴의 핵심으로 사용되는 질량 분석기를 이용하여 저 분자량 생화학 물질을 분석할 경우의 문제점들인 고 휘발성, 이온화의 어려움, 그리고 동중 원소 분석 문제를 유도체화 반응을 통하여 기존의 분석 방법보다 효율적이며 신속한 분석 방법으로 대처할 수 있는 고속 탐색 발굴 방법을 새롭게 제시하였다. 특히, 트랜스아미나제 반응 분석 시 문제가 되는 케토산을 옥심 유도체화 반응을 통하여 선택적으로 질량 차이를 유도할 수 있었으며, 또한 생성된 유도체는 질량 분석기를 통하여 케토산 1 mM부터 10 mM 내에서 정량화가 가능함을 보여주었다. 이 방법을 통하여 트랜스아미나제 효소 반응을 분석할 수 있었으며, 효소의 기질 특이성을 한번에 쉽게 분석할 수 있는 방법으로 응용되었다. 또한, 사용된 효소의 특성을 쉽게 파악할 수 있는 매우 간편하고 정확한 방법으로 평가되었다. 이 방법은 기존의 질량 분석기의 응용 범위를 다양한 저 분자량 물질 분석까지 확대할 수 있을 것이다. 본 연구에서 제시한 유도체화 반응은 반응 용액을 가지고 직접 반응하고 매우 쉽게 구현이 가능하여 효율성과 분석 감도를 증가시킬 수 있었다. 본 연구 결과에서 보듯, 이 방법을 통하여 동 중량체 (isobaric compounds)의 저 분자량을 질량 차이를 유도하여 분석할 수 있으며, 특정 효소의 기질 특이성 및 그 효소의 종류를 구별할 수 있음을

알 수 있었으며 이를 바탕으로 미지의 효소에 대한 기능을 예측할 수 있는 방법까지 응용될 것으로 기대된다.

감 사

본 연구는 과학 기술부 한국과학 재단 지정 우수 연구 센터 (Nano Bioelectronics & Systems Research Center) 및 보건 복지부 International Mobile Telecommunications 2000 R&D Project (01-PJ11-PG9-01NT00-0040) 지원을 받아 수행하였기에 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Cacace, A., M. Banks, T. Spicer, F. Civoli, and J. Watson (2003), An ultra-HTS process for the identification of small molecule modulators of orphan G-protein-coupled receptors, *Drug Discov. Today* **8**, 785-792.
- Shogren-Knaak, M. A., P. J. Alaimo, and K. M. Shokat (2001), Recent advances in chemical approaches to the study of biological systems, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **17**, 405-433.
- Parker, G. J., T. L. Law, F. J. Lenocho, and R. E. Bolger (2000), Development of high throughput screening assays using fluorescence polarization: nuclear receptor-ligand-binding and kinase/phosphatase assays, *J. Biomol. Screen* **5**, 77-88.
- Guo, Z., D. Zhou, and P. G. Schultz (2000), Designing small-molecule switches for protein-protein interactions, *Science* **288**, 2042-2045.
- Min, D. H., W. J. Tang, and M. Mrksich (2004), Chemical screening by mass spectrometry to identify inhibitors of anthrax lethal factor, *Nat. Biotechnol.* **22**, 717-723.
- Wei, J., J. M. Buriak, and G. Siuzdak (1999), Desorption-ionization mass spectrometry on porous silicon, *Nature* **399**, 243-246.
- Chovan, L. E., C. Black-Schaefer, P. J. Dandliker, and Y. Y. Lau (2004), Automatic mass spectrometry method development for drug discovery: application in metabolic stability assays, *Rapid Commun. Mass Spectrom* **18**, 3105-3112.
- Ozbal, C. C., W. A. LaMarr, J. R. Linton, D. F. Green, A. Katz, T. B. Morrison, and C. J. Brenan (2004), High throughput screening via mass spectrometry: a case study using acetylcholinesterase, *Assay Drug Dev. Technol.* **2**, 373-381.
- Shen, Z. and E. P. Go (2004), A mass spectrometry plate reader: monitoring enzyme activity and inhibition with a Desorption/Ionization on Silicon (DIOS) platform, *Chembiochem.* **5**, 921-927.
- Hicks, G. P. and W. J. Blaedel (1965), Coupled Reaction System for Determination of Transaminase Enzymes. Application to Glutamic Oxaloacetic Transaminase, *Anal. Chem.* **37**, 354-358.
- Reetz, M. T., K. M. Kuhling, S. Wilensek, H. Husmann, U. W. Hausig, and M. Hermes (2001), A GC-based method for high-throughput screening of enantio selective catalysts, *Catalysis Today* **67**, 389-396.
- Tielmann, P., M. Boese, M. Luft, and M. T. Reetz (2003), A practical high-throughput screening system for enantioselectivity by using FTIR spectroscopy, *Chemistry* **9**, 3882-3887.
- Farre, C., A. Sjoberg, K. Jardemark, I. Jacobson, and O. Orwar (2001), Screening of ion channel receptor agonists using capillary electrophoresis-patch clamp detection with resensitized detector cells, *Analytical Chemistry* **73**, 1228-1233.
- Reetz, M. T., K. M. Kuhling, H. Hinrichs, and A. Deege (2000), Circular dichroism as a detection method in the screening of enantioselective catalysts, *Chirality* **12**, 479-482.
- Fejzo, J., C. Lepre, and X. Xie (2003), Application of NMR screening in drug discovery, *Curr. Top Med. Chem.* **3**, 81-97.
- Soleilhac, J. M., F. Cornille, L. Martin, C. Lenoir, M. C. Fournie-Zaluski, and B. P. Roques (1996), A sensitive and rapid fluorescence-based assay for determination of tetanus toxin peptidase activity, *Anal. Biochem.* **241**, 120-127.
- Lee-Peng, F. C., M. A. Hermodson, and G. B. Kohlhaw (1979), Transaminase B from *Escherichia coli*: quaternary structure, amino-terminal sequence, substrate specificity, and absence of a separate valine-alpha-ketoglutarate activity, *J. Bacteriol.* **139**, 339-345.
- Effkemann, S., S. Brodsgaard, P. Mortensen, S. A. Linde, and U. Karst (1999), Determination of gas phase peroxyacetic acid using pre-column derivatization with organic sulfide reagents and liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* **855**, 551-561.
- Streeter, J. G. and C. E. Strimbu (1998), Simultaneous extraction and derivatization of carbohydrates from green plant tissues for analysis by gas-liquid chromatography, *Anal. Biochem.* **259**, 253-257.
- Lee, C. S., Y. G. Kim, H. S. Joo, and B. G. Kim (2004), Structural analysis of lipid A from *Escherichia coli* O157 : H7 : K-using thin-layer chromatography and ion-trap mass spectrometry, *J. Mass Spectrometry* **39**, 514-525.
- Mehta, P. K., T. I. Hale, and P. Christen (1993), Aminotransferases: demonstration of homology and division into evolutionary subgroups, *Eur. J. Biochem.* **214**, 549-561.
- Kuramitsu, S., K. Hiromi, H. Hayashi, Y. Morino, and H. Kagamiyama (1990), Pre-steady-state kinetics of *Escherichia coli* aspartate aminotransferase catalyzed reactions and thermodynamic aspects of its substrate specificity, *Biochemistry* **29**, 5469-5476.