

# 豚小腸粘膜のペプチダーゼに関する研究

## 第4報 膜結合アミノペプチダーゼの諸性質 について

長谷川喜斐<sup>\*</sup>・児玉 治・赤塚 尹 巳

### Studies on Hog Small Intestinal Mucosa Peptidases

#### IV. Some Properties of Membrane-bound Aminopeptidases

YOSHII HASEGAWA, OSAMU KODAMA and  
TADAMI AKATSUKA

#### 緒 言

小腸粘膜において蛋白質の分解産物であるペプチド類の加水分解にペプチダーゼが重要な役割を果たしている。

最近ラット小腸粘膜の細胞質に存在するアミノペプチダーゼと刷子縁膜に結合しているアミノペプチダーゼは基質特異性が異なると報告されており<sup>1)</sup>、それぞれ異なる機能を有すると推定され局在性を異にするアミノペプチダーゼの性質を明らかにすることは小腸粘膜におけるペプチド類の消化、吸収を明らかにする上で重要である。

著者らは豚小腸粘膜の抽出液を実験材料に用い、局在性を異にするアミノペプチダーゼの精製を進めており、前報<sup>2)~4)</sup>において可溶性アミノペプチダーゼの精製ならびに性質について報告した。本報では豚小腸粘膜抽出液の膜結合酵素であるアミノペプチダーゼの可溶化を試み、基質特異性を異にする3種のアミノペプチダーゼを可溶化、分離し若干の性質を明らかにしたので報告する。

#### 実 験 方 法

##### 1. 粗酵素液の調製

屠殺直後の豚小腸粘膜をはぎとりビーカーに集め約3倍量の1/15 Mリン酸緩衝液 (pH 7.0) を加え0℃で1時間攪拌した後、三枚重ねのガーゼを用いて濾過した。得られた濾液を3,000 × g, 10分間遠心分離し生じた上澄液を10,000 × g, 10分間遠心分離し沈澱物はさらに1/15 Mリン酸緩衝液 (pH 7.0) に懸濁後再び10,000 × g, 10分間遠心分離を行った。2回の10,000 × gの遠心分離で生じた上澄液を合わせ105,000 × g, 60分間遠心分離し沈澱物を少量の1/15 Mリン酸緩衝液 (pH 7.0) に懸濁し懸濁液を粗酵素液として使用した。

##### 2. 酵素活性の測定

###### (1) ペプチドを基質にした場合

###### a. ニンヒドリン法

試験管に1/15 Mリン酸緩衝液 (pH 8.0) 0.9mlおよび酵素液0.1mlを加え40℃, 5分間放置後, 10mMの基質溶液 20 μl を加え酵素反応を開始し20分間反応させた。反応終了後, 2mlのニンヒドリン溶液を加え100℃, 10分間加熱後水冷し5mlの50%アセトン溶液を加え575 nmの吸光度を測定し, 1分間に1 μmoleのアミノ酸を遊離する酵素量を1単位とした。なおニンヒドリン溶液の調製法は次のようにして行った。すなわち

\* 福島県立会津短期大学化学研究室

0.3 Mクエン酸緩衝液 (pH 5.2) とメチルセロソルブを等容量を含む液にニンヒドリンを1%になるように加え使用直前に必要量のニンヒドリン混合液に塩化第一スズ粉末を約0.1%になるように加えた。

b. 酵素法

Nicholson と Kim の方法<sup>9)</sup> に準じて行った。試験管に10mMの基質を含む50mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) 0.25ml およびL-アミノ酸 オキシダーゼ試薬0.5mlを加え40℃, 5分間放置後, 酵素液25μlを加え酵素反応を開始し20分間反応させた。40%硫酸溶液0.5mlを加え反応を停止させた後, 10分以上室温で放置し530nmの吸光度を測定し, 1分間に1μmoleのロイシンを遊離する酵素量を1単位とした。L-アミノ酸オキシダーゼ試薬の調製法は次のごとくである。L-アミノ酸オキシダーゼ20mg (約7ユニット), 西洋ワサビパーオキシダーゼ2mg (約400ユニット) および5mlのエタノールに溶解したo-ジアニシジン10mgを50mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) に溶解し同緩衝液により100mlとした。

(2) アミノ酸 *p*-ニトロアニリドを基質にした場合  
試験管に1/15 Mリン酸緩衝液 (pH 8.0) 1.6ml および酵素液0.4mlを加え40℃, 5分間放置後0.6mMのアミノ酸 *p*-ニトロアニリド溶液0.4mlを加え酵素反応を開始し20分間反応させた後, 反応混液の405nmの吸光度を測定した。405nmにおける *p*-ニトロアニリンのモル吸光係数を8,800 M<sup>-1</sup>, cm<sup>-1</sup>として, 1分間に1μmoleの *p*-ニトロアニリンを遊離する酵素量を1単位とした。

3. 蛋白濃度の測定

牛血清アルブミンを標準物質とし, トリトンX-100存在下で測定可能なLowry法の改良法であるDulleyとGrieveの方法<sup>10)</sup>により測定した。

実験結果

1. アミノペプチダーゼの可溶化および部分精製

粗酵素液の蛋白濃度を5mg/mlに調整した後, トリトンX-100の終濃度が1%になるようにトリトンX-100を粗酵素液に加え0℃, 1時間攪拌し可溶化を行

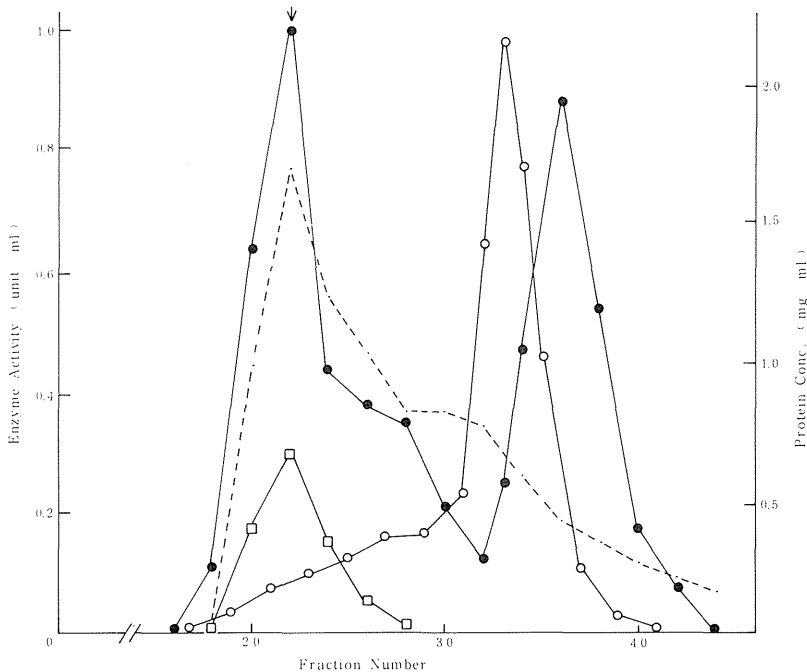


Fig. 1. Gel Chromatography of Solubilized Aminopeptidases from Hog Small Intestinal

Mucosal Extracts on Sephadex G-200.

Column (2.1 × 50 cm) was previously equilibrated and eluted with 1/15 M phosphate buffer (pH 7.0) containing 0.1% Triton X-100. Each fraction was 3.5 ml. An arrow indicates the void volume (V<sub>0</sub>) of the column. Each fraction of No. 19 to No. 26 (aminopeptidase I fraction), and No. 30 to No. 39 (aminopeptidase II and III fraction) was pooled. -----, protein; —●—, activity for Leu-Gly-Gly; —○— activity for Leu-Gly; —□—, activity for Leu-p-nitroanilide.

った。次に105,000 × g, 1時間遠心分離を行い上澄液を限外濾過法(東洋ウルトラフィルターUK-10)により濃縮し濃縮液を0.1%トリトンX-100を含む1/15Mリン酸緩衝液(pH 7.0)で平衡化したセファデックスG-200によるゲル濾過を行い、その溶出パターンをFig. 1に示した。

セファデックスG-200のゲル濾過のV<sub>0</sub>付近に溶出

したアミノペプチダーゼ活性およびアリルアミダーゼ活性を示す画分は限外濾過による濃縮後、0.1%トリトンX-100を含む1/15Mリン酸緩衝液(pH 7.0)で平衡化したセファローズ4Bによるゲル濾過を行い、トリペプチダーゼ活性およびアリルアミダーゼ活性を示す画分をアミノペプチダーゼIとして実験に使用した。

(Fig. 2)。

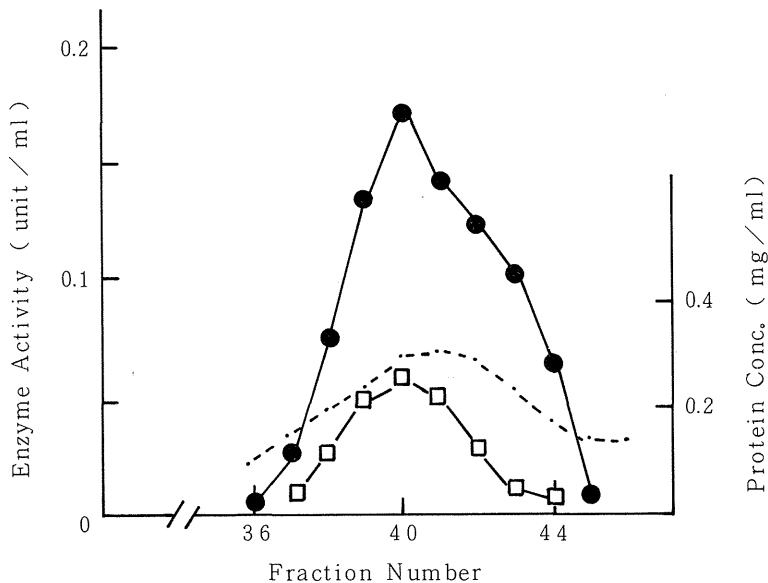


Fig. 2. Gel Chromatography of Aminopeptidase I Fraction of Sephadex G-200 on Sepharose 4B.

The aminopeptidase I fraction obtained by a Sephadex G-200 eluate was concentrated by ultrafiltration and applied to a column (2.1 × 48 cm) of Sepharose 4B, equilibrated with the same buffer as seen in Fig. 1. Each fraction was 4.5 ml. All symbols are the same as those in Fig. 1.

セファデックスG-200のフラクションNo.32から No.42の間に溶出してくるジペプチダーゼ活性とトリペ

プチダーゼ活性を示す画分を集め0.1%トリトンX-100を含む1/15Mリン酸緩衝液(pH7.0)で平衡化したDEAE-セルロースによるイオン交換クロマトグラフィーを行った。その結果Fig.3に示したよう

にトリペプチダーゼ活性はDEAE-セルロースの素通り区分に溶出し、この活性画分をアミノペプチダーゼIIIとした。ジペプチダーゼ活性は緩衝液の塩化ナトリウム濃度を上昇させるに従って溶出し、この画分をアミノペプチダーゼII

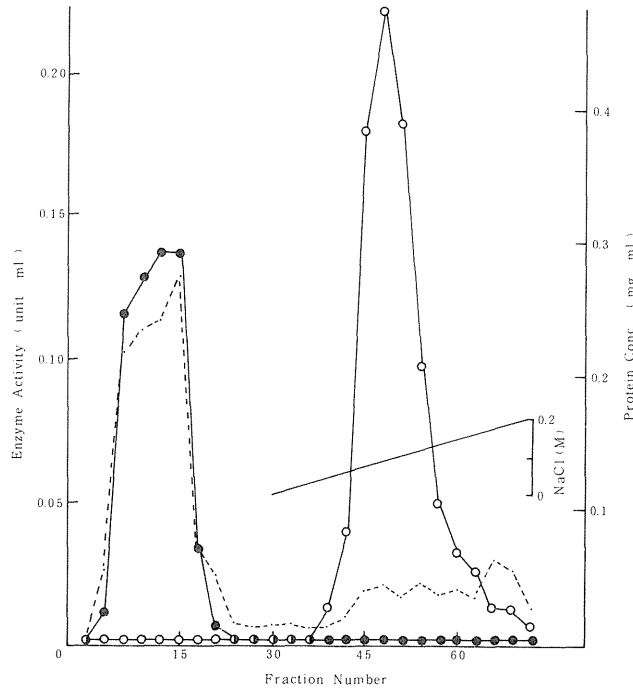


Fig. 3. DEAE-cellulose Column Chromatography of Fraction No. 32-No. 42 of Sephadex G-200 Gel Chromatography.

The Fraction of No. 32 to No. 42 obtained by a Sephadex G-200 eluate was applied to a column (1.2 × 13 cm) of DEAE-cellulose, equilibrated with the same buffer as seen in Fig. 1 and eluted by a linear gradient of NaCl (0 ~ 0.2 M) in the same buffer. The eluate was collected in 8 ml fractions. All symbols are the same as those in Fig. 1.

とした。

次にDEAE-セルロースの素通り区分に認められたアミノペプチダーゼIIIの画分を蒸留水で6倍に希釈しpHを7.6に調整し、さらに0.1%トリトンX-100を含む0.002Mリン酸緩衝液(pH7.6)で平衡化したDEAE-セルロースに吸着させ十分量の同緩衝液でカラムを洗浄した。次に緩衝液の塩化ナトリウム濃度を0~0.2Mに直線的に増加させアミノペプチダーゼIIIの溶出を行い、その溶出パターンをFig. 4に示し、この活性画分を実験に使用

した。

## 2. 分子量の推定

アミノペプチダーゼI、IIおよびIIIの分子量を明らかにする為、分子量既知の標準蛋白質とともにゲル濾過した結果をFig. 5および6に示した。この結果、アミノペプチダーゼI、IIおよびIIIの分子量はそれぞれ約28万、約8万および約5万と推定された。

## 3. 至適pH

酵素活性におよぼすpHの影響をFig. 7に示した。

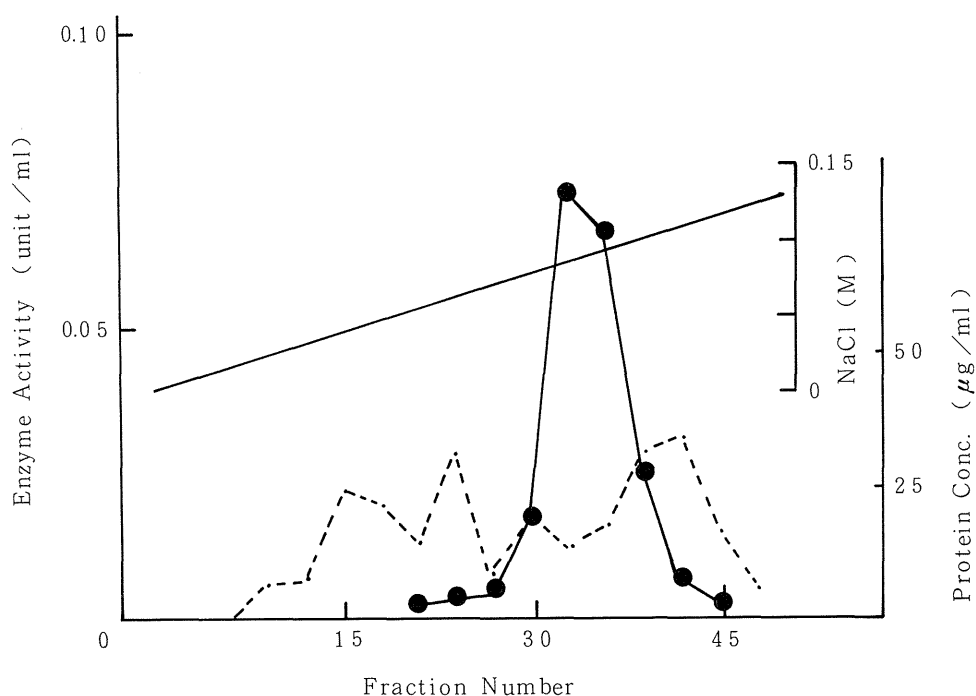


Fig. 4. DEAE-cellulose Column Chromatography of Aminopeptidase III

The aminopeptidase III fraction obtained by a DEAE-cellulose eluate was applied to a column ( $1.6 \times 10$  cm) of DEAE-cellulose, equilibrated with 0.002 M phosphate buffer (pH 7.6) containing 0.1% Triton X-100 and eluted by a linear gradient of NaCl (0~0.2 M) in the same buffer. The eluate was collected in 10 ml fractions. The symbols are the same as those in Fig. 1.

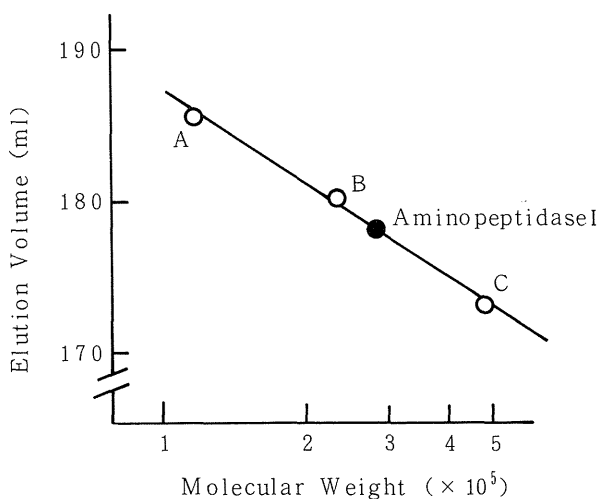


Fig. 5. Estimation of Molecular Weight of Aminopeptidase I by Gel Filtration on

Sepharose 4B.

The column (2.1 × 48 cm) of Sepharose 4B was equilibrated with 1/15 M phosphate buffer (pH 7.0) containing 0.1% Triton X-100. A, alkaline phosphatase (calf intestine); B, catalase; C, urease.

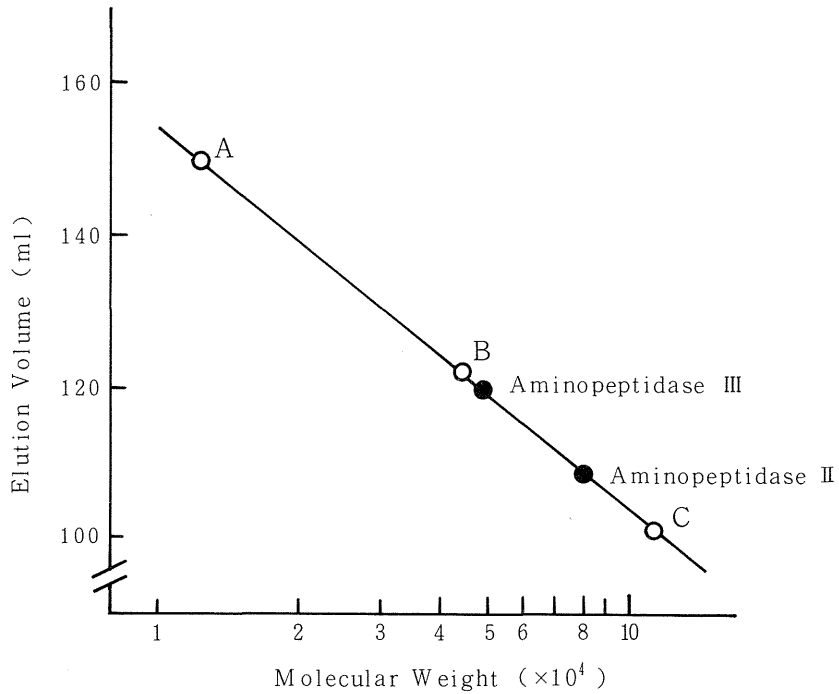


Fig. 6. Estimation of Molecular Weight of Aminopectidase II and III by Gel Filtration on Sephadex G-200.

The column (2.1 × 50 cm) of Sephadex G-200 was equilibrated with 1/15 M phosphate buffer (pH 7.0) containing 0.1% Triton X-100. A, cytochrome c (horse); B, egg albumin; C, alkaline phosphatase (calf intestine).

活性発現の最適pHはアミノペプチダーゼIおよびIIIが約8, アミノペプチダーゼIIは約7であった。

#### 4. 最適温度

酵素反応におよぼす温度の影響をpH 8.0, 20分の

反応で調べた結果をFig. 8に示した。その結果, 活性発現の最適温度はアミノペプチダーゼIが50℃, アミノペプチダーゼIIおよびIIIが40℃付近に認められた。

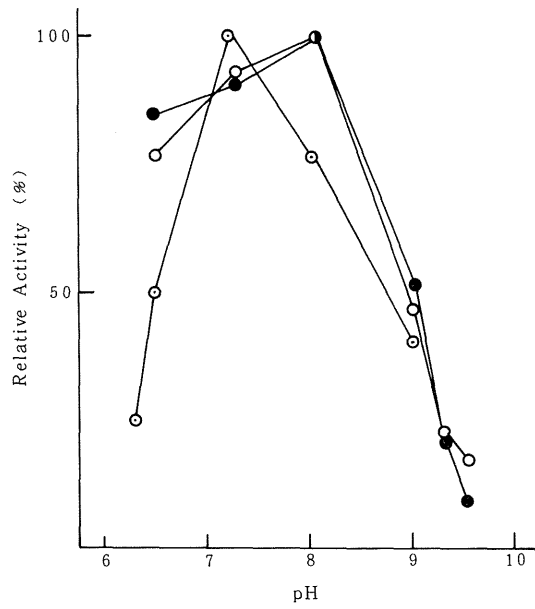


Fig. 7. Effect of pH on the Activity of Aminopeptidase I, II and III.

The activity was assayed with Leu-Gly-Gly (aminopeptidase I and III) or Leu-Gly (aminopeptidase II) as substrate. Buffer used was 1/15 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  -  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$  buffer. —○—, aminopeptidase I; —○—, aminopeptidase II; —●—, aminopeptidase III.

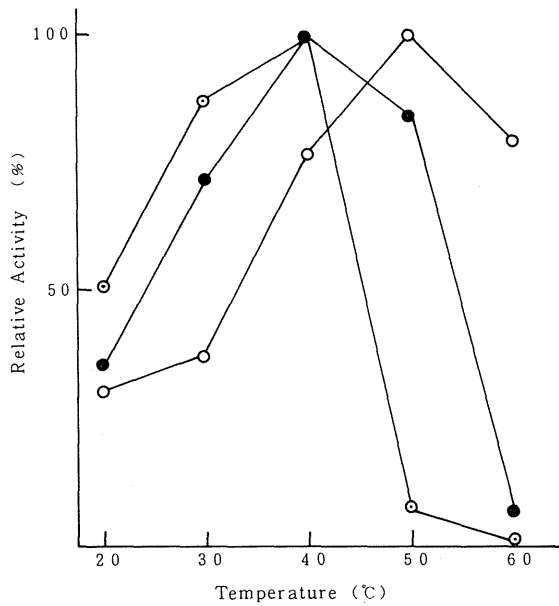


Fig. 8. Effect of Temperature on the Activity of Aminopeptidase I, II and III.

The activity was assayed with Leu-Gly-Gly (aminopeptidase I and III) or Leu-Gly (aminopeptidase II) as substrate at various temperature for 20 min at pH 8.0. —○—, aminopeptidase I; —●—, aminopeptidase II, —●—, aminopeptidase III.

5. 各種金属イオンの影響

酵素活性におよぼす金属イオンの影響をpH 8.0で各金属塩化物とともに10分間室温でプレインキュベート

した後に40℃, 30分間の酵素反応で調べた。その結

果, Table I に示したようにアミノペプチダーゼIはMg<sup>2+</sup>イオンおよびMn<sup>2+</sup>イオンによりそれぞれ約40%およ

Table 1. Effect of Various Metal Ions on Enzyme Activities

Metal Ions	Relative activity (%)		
	Aminopeptidase I	Aminopeptidase II	Aminopeptidase III
None	100	100	100
CoCl <sub>2</sub>	98	105	121
ZnCl <sub>2</sub>	91	47	93
MgCl <sub>2</sub>	137	89	94
MnCl <sub>2</sub>	120	62	114
HgCl <sub>2</sub>	0	0	0

Mixture of enzyme and indicated metal ion was preincubated for 10 min at room temperature. After incubation, each activity for Leu-Gly-Gly (Aminopeptidase I and III) or Leu-Gly (Aminopeptidase II) was assayed by ninhydrin method and compared with a control.

び20%の活性増加が認められたが, Co<sup>2+</sup>イオンによる影響は受けなかった。アミノペプチダーゼIIIはCo<sup>2+</sup>イオンにより約20%の活性増加が認められたがMg<sup>2+</sup>イオンによる活性増加は認められなかった。アミノペプチダーゼIIは金属イオンによる活性増加は認められず, Zn<sup>2+</sup>イオンおよびMn<sup>2+</sup>イオンによる活性阻害が認められた。

6. 各種試薬の影響

各種試薬の酵素活性におよぼす影響について金属イオンの影響を調べた場合と同様な方法で検討し, その結果をTable II に示した。アミノペプチダーゼI, IIおよびIIIとも金属キレート試薬であるo-フェナントロリンにより強く阻害を受けたが, 同じ金属キレート試薬であるEDTAによってはアミノペプチダーゼIIだけが強い阻害を受けた。アミノペプチダーゼIIおよびIIIはSH試薬であるPCMBにより著しい阻害を受け, SH還元試薬である2-メルカプトエタノールによりアミノペプチ

ダーゼIIIは約30%活性増加が認められた。有機リン剤であるDFPによる阻害は受けなかったがハロゲン化スルホニルであるPMSFによりアミノペプチダーゼIIおよびIIIは著しい阻害を受けた。

アミノペプチダーゼI, IIおよびIIIはいずれもo-フェナントロリンにより著しく活性の阻害を受けるので, o-フェナントロリン処理酵素の金属イオン添加による活性の回復について検討した。その結果Table III に示したようにアミノペプチダーゼIにおいてはCo<sup>2+</sup>イオンの添加によりo-フェナントロリンにより阻害された酵素活性は完全に回復した。一方アミノペプチダーゼIIはCo<sup>2+</sup>イオンおよびZn<sup>2+</sup>イオンの添加により約30%の活性が回復したにすぎず, アミノペプチダーゼIIIにおいてはo-フェナントロリンにより阻害を受けた酵素活性は金属イオンの添加により回復しなかった。

7. 基質特異性



Table II Effect of Various Reagents on Enzyme Activities

Reagents	Concentration (mM)	Remaining activity (%)		
		Aminopeptidase I	Aminopeptidase II	Aminopeptidase III
None (control)		100	100	100
Ethylene diamine tetraacetate (EDTA)	0.1	85	18	106
Ethylene diamine tetraacetate (EDTA)	1	71	12	103
<i>o</i> -Phenanthroline	1	4	1	11
<i>p</i> -Chloromercuribenzoic acid (PCMB)	0.1	89	1	1
2-Mercaptoethanol	0.1	97	70	127
Diisopropylphospho fluoride (DFP)	0.1	88	78	105
Phenylmethane sulfonyl fluoride (PMSF)	0.1	95	31	19
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	0.1	101	79	40

Mixture of enzyme and indicated reagent was preincubated for 10 min at room temperature. After incubation, each activity for Leu-Gly-Gly (Aminopeptidase I and III) or Leu-Gly (Aminopeptidase II) was assayed by ninhydrin method and compared with a control.

Table III. Reactivation of *o*-Phenanthroline-inactivated Aminopeptidase I, II and III by Several Metal Ions

Metal added	Extent of reactivation (%)		
	Aminopeptidase I	Aminopeptidase II	Aminopeptidase III
CoCl <sub>2</sub>	100	32	0
ZnCl <sub>2</sub>	34	34	0
MgCl <sub>2</sub>	3.3	5	0
MnCl <sub>2</sub>	29	0	0

The native enzyme was incubated with 1 mM *o*-phenanthroline at room temperature. After 10 min, metal salt (10 mM) was added to the incubation mixture. Ten min later, the enzyme activity for Leu-Gly-Gly (Aminopeptidase I and III) or Leu-Gly (Aminopeptidase II) was assayed by ninhydrin method.

各種ペプチドおよびアミノ酸の

-

ニトロアニリドに 対する基質特異性について検討した (Table IV, V)。 その結果アミノペプチダーゼ I はロイシルグリシルグリシン, アラニルグリシルグリシンおよびアラニルグリシ

Table IV. Action of Aminopeptidase I, II and III on Several Peptides

Substrate	Relative activity (%)		
	Aminopeptidase I	Aminopeptidase II	Aminopeptidase III
Leu-Gly	1	100	0
Leu-Gly-Gly	100	0	100
Ala-Gly	6	153	4
Ala-Gly-Gly	71	0	94
Ala-Gly-Gly-Gly	88	0	0
Gly-Gly	0	4	0
Pro-Gly	0	0	0
Gly-Leu	0	89	5

The final substrate concentration was 0.2 mM. Enzyme activity was assayed by ninhydrin method. Relative activity was calculated with activity against Leu-Gly-Gly (Aminopeptidase I and III) or Leu-Gly (Aminopeptidase II) taken as 100.

Table V. Action of Aminopeptidase I, II and III on Several Amino Acid-*p*-nitroanilides

Substrate	Relative activity (%)		
	Aminopeptidase I	Aminopeptidase II	Aminopeptidase III
Leu- <i>p</i> -nitroanilide	100	0	0
Ala- <i>p</i> -nitroanilide	111	0	0
Lys- <i>p</i> -nitroanilide	65	0	0
Glu- <i>p</i> -nitroanilide	11	0	0
Benzoyl-arg- <i>p</i> -nitroanilide	0	0	0

Relative activity was calculated with activity against Leu-*p*-nitroanilide taken as 100.

ルグリシルグリシンを良く水解し、アミノ酸の *p*-ニトロアニリドも水解しアルリアミダーゼ活性も認められたが、ジペプチド類の水解は殆ど認められなかった。アミノペプチダーゼIIはジペプチドであるアラニルグリシン、ロイシルグリシンおよびグリシルロイシンのみを水解し、アミノペプチダーゼIIIはトリペプチドであるロイシルグリシルグリシンおよびアラニルグリシルグリシンのみを良く水解した。

考 察

豚小腸粘膜のリン酸緩衝液による抽出液の 10,000 × g 上澄液の 105,000 × g 沈澱画分より基質特異性を異にする3種のアミノペプチダーゼを分離した。このうちアミノペプチダーゼIはトリペプチドおよびテトラペプチドを良く水解することから、アミノポリペプチダーゼと考えられる。アミノペプチダーゼIIおよびIIIと異なりSH試薬であるPCMBによる阻害を受けなかったが、*o*-フェナントロリンによる阻害後、Co<sup>2+</sup>イオンの添加により酵素活性が完全に回復することからアミノペプチダーゼIは金属酵素と思われる。

Maroux ら<sup>7)</sup>は豚小腸粘膜の刷子縁膜よりアミノペプ

チダーゼをトリトンX-100により可溶化，精製している。本酵素の分子量は28万，トリペプチド，ヘプタペプチドを水解し，アリアルミダーゼ活性も示すことからアミノペプチダーゼIと同一の酵素と考えられるが詳細な酵素化学的性質は報告されていない。

Kim と Brophy<sup>9)</sup> はラット小腸粘膜の刷子縁膜よりペプチダーゼの精製を報告している。本酵素の分子量は28万，トリペプチド，テトラペプチドを良く水解し *o*-フェナントロリンにより阻害を受けた酵素活性は  $\text{Co}^{2+}$  イオンの添加により活性は回復することからアミノペプチダーゼIときわめて類似の性質を有している。アミノペプチダーゼIは刷子縁膜に結合していると推定されるが，詳細には小腸粘膜の細胞分画を行う必要がある。

アミノペプチダーゼIIはジペプチドであるロイシルグリシン，アラニルグリシンおよびグリシルロイシンを良く水解したが，トリペプチド，テトラペプチドおよびアミノ酸の *p*-ニトロアニリドを全く水解しなかったことから，アミノペプチダーゼIIはジペプチダーゼと考えられる。本酵素はきわめて不安定であり可溶化後4℃で4日経過すると活性は完全に失活した。

アミノペプチダーゼIIIはトリペプチドを良く水解するがジペプチド，テトラペプチドを殆ど水解せずアリアルミダーゼ活性も示さないことからトリペプチダーゼと考えられる。本酵素は2-メルカプトエタノールにより活性増加が認められ，PCMBにより著しい阻害を受けることから，活性発現にSH基の関与が示唆される。アミノペプチダーゼIIIはPMSFによって強く阻害を受けるがDFPによって阻害を受けないので，PMSFはSH基と反応し酵素を不活性化したと推測される。

小腸粘膜のジペプチダーゼおよびトリペプチダーゼは細胞質に存在する場合と膜に結合している場合の2種類存在することが報告されている。<sup>9)</sup>

豚小腸粘膜のジペプチダーゼおよびトリペプチダーゼについては古くSmith, Bergman<sup>10)</sup> およびJohnson<sup>11)</sup> の報告があるが彼らの報告した酵素の局在性は明らかでない。

小腸内において蛋白質の分解産物であるジペプチドは

膜結合酵素により膜消化を受けてアミノ酸になってから膜内に取り込まれる場合と，ジペプチドのまま膜内に取り込まれ細胞質に存在するペプチダーゼにより細胞内消化を受ける場合が考えられる。アミノペプチダーゼIIおよびIIIは小腸粘膜を細胞分画した結果，刷子縁膜に認められたことから（未発表），ジペプチドを水解するアミノペプチダーゼIIは刷子縁膜に結合しジペプチド類の膜消化をする作用を有していると考えられる。

一方，前報<sup>9)</sup> において報告した細胞質に存在する分子量約17万のアミノペプチダーゼは膜内に取り込まれたジペプチドを水解しジペプチド類の細胞内消化に関与していると推定される。

## 要 約

1. 豚小腸粘膜抽出液の105,000×g沈澱画分より基質特異性の異なる3種類のアミノペプチダーゼ（アミノペプチダーゼI，IIおよびIIIと仮称）をトリトンX-100を用いて可溶化し，ゲル濾過，イオン交換クロマトグラフィーにより分離した。
2. アミノペプチダーゼIの分子量は約28万であり，至適pHは8，至適温度は50℃であった。*o*-フェナントロリンにより著しい阻害を受けたが，*o*-フェナントロリンにより失活した酵素活性は  $\text{Co}^{2+}$  イオンの添加により完全に回復した。トリペプチドおよびテトラペプチドを良く水解し，またアリアルミダーゼ活性も示した。
3. アミノペプチダーゼIIの分子量は約8万，至適pHは7，至適温度は40℃であり，PCMB，EDTAおよび*o*-フェナントロリンにより強い阻害が認められた。*o*-フェナントロリンにより阻害を受けたアミノペプチダーゼIIは  $\text{Co}^{2+}$  または  $\text{Zn}^{2+}$  イオンの添加により活性は約30%回復した。アミノペプチダーゼIIはロイシルグリシン，アラニルグリシンおよびグリシルロイシンを水解したが，トリペプチド，テトラペプチドおよびアミノ酸の *p*-ニトロアニリドを水解せず，ジペプチダーゼと考えられる。
4. アミノペプチダーゼIIIの分子量は約5万，至適pHは8，至適温度は40℃であり，PMSF，PCMBお

よび *o*-フェナントロリンにより著しい阻害が認められ、2-メルカプトエタノールにより約30%活性が増加し活性発現にSH基の関与が示唆された。トリペプチドであるロイシルグリシルグリシンおよびアラニルグリシルグリシンを水解したが、テトラペプチド、ジペプチドおよびアミノ酸 *p*-ニトロアニリドを水解せずアミノペプチダーゼⅢはトリペプチダーゼと推定される。

文 献

1) Kim, Y. S., W. Bitwhistl and Y. W. Kim : J. Clin. Invest., **51**, 1419 (1972)  
 2) 長谷川喜斐・児玉治・赤塚尹巳：茨大農学術報告, **24**, 127 (1976)  
 3) 長谷川喜斐・児玉治・赤塚尹巳：同上, **25**, 61 (1977)

4) 長谷川喜斐・児玉治・赤塚尹巳：同上, **26**, 135 (1978)  
 5) Nicholson, J. A. and Y. S. Kim : Anal. Biochem., **63**, 110 (1975)  
 6) Dulley, J. R. and P. A. Grieve : Anal. Biochem., **64**, 136 (1975)  
 7) Maroux, S., D. Louvard and J. Baratti : Biochem. Biophys. Acta, **321**, 282 (1973)  
 8) Kim, Y. S. and E. J. Brophy : J. Biol. Chem., **251**, 3199 (1976)  
 9) Peters, T. J. : Biochem. J., **120**, 195 (1970)  
 10) Smith, E. L. and M. Bergman : J. Biol. Chem., **153**, 627 (1944)  
 11) Johnson, M. J. : J. Biol. Chem., **122**, 89 (1937)

Summary

Amino peptidases were solubilized from 105,000 × g precipitate of hog small intestinal mucosa extracts by Triton X-100. Three kinds of amino peptidase, designated as amino peptidase I, II and III with different substrate specificity, were isolated by means of gel filtration and ion exchange chromatography. The molecular weights of amino peptidase I, II and III were 280,000, 80,000 and 50,000, respectively. pH optima of amino peptidase I and II were about 8 and that of amino peptidase III was about 7. Optimal temperature of amino peptidase I was 50 °C and that of amino peptidase II and III were 40 °C. Amino peptidase I was strongly inhibited by *o*-phenanthroline and activated by Mg<sup>2+</sup> ion. The activity of amino peptidase I which had been inactivated with *o*-phenanthroline could be restored by the addition of Co<sup>2+</sup> ion. Amino peptidase II and III were strongly inhibited by PCMB and *o*-phenanthroline. Amino peptidase I was active against tripeptide, tetrapeptide and amino acid-*p*-nitroanilide. Amino peptidase II was most active against dipeptide and amino peptidase III was active against tripeptide.