

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5721094号  
(P5721094)

(45) 発行日 平成27年5月20日 (2015. 5. 20)

(24) 登録日 平成27年4月3日 (2015. 4. 3)

(51) Int. Cl.		F I	
C 1 2 N	9/96 (2006. 01)	C 1 2 N	9/96
C 1 2 N	9/16 (2006. 01)	C 1 2 N	9/16 B
C 1 2 N	9/26 (2006. 01)	C 1 2 N	9/26 Z

請求項の数 6 (全 32 頁)

(21) 出願番号	特願2010-1986 (P2010-1986)	(73) 特許権者	397022911 学校法人甲南学園
(22) 出願日	平成22年1月7日 (2010. 1. 7)		兵庫県神戸市東灘区岡本8丁目9番1号
(65) 公開番号	特開2010-220607 (P2010-220607A)	(74) 代理人	100156845 弁理士 山田 威一郎
(43) 公開日	平成22年10月7日 (2010. 10. 7)	(74) 代理人	100112896 弁理士 松井 宏記
審査請求日	平成24年12月25日 (2012. 12. 25)	(74) 代理人	100124039 弁理士 立花 顕治
(31) 優先権主張番号	特願2009-46946 (P2009-46946)	(74) 代理人	100124431 弁理士 田中 順也
(32) 優先日	平成21年2月27日 (2009. 2. 27)	(72) 発明者	甲元 一也 兵庫県神戸市中央区港島南町7丁目1番2 0号 甲南大学内
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		

最終頁に続く

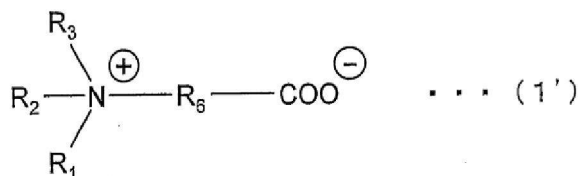
(54) 【発明の名称】 酵素活性を向上させるための組成物およびその利用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

酵素活性を向上させるために用いられる組成物であって、  
当該組成物が、以下の一般式(1')で表される化合物、またはそれらの塩を含むことを特徴とする組成物：

【化 1】



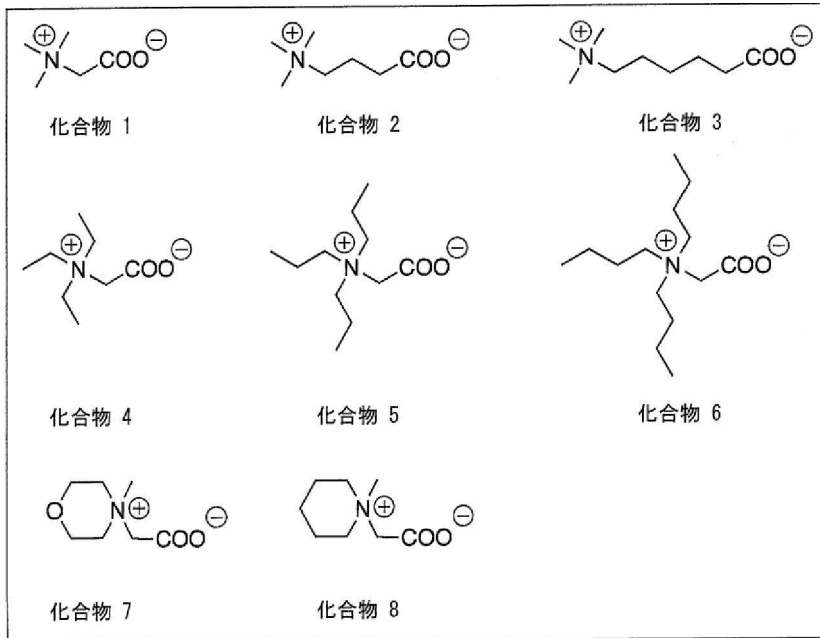
式(1')中、R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、およびR<sub>3</sub>は、同一又は異なって炭素数1~4のアルキル基である；R<sub>1</sub>およびR<sub>2</sub>が結合して炭素数5の環状アルキレン基を形成し、R<sub>3</sub>はメチル基である；或いはR<sub>1</sub>およびR<sub>2</sub>が結合してN原子と共にモルホリノ基を形成し、R<sub>3</sub>はメチル基であり、

R<sub>6</sub>は炭素数1~5のアルキレン基である。

【請求項 2】

一般式(1')で表される化合物が、下記化合物1~8のいずれか少なくとも1つである、請求項1に記載の組成物。

## 【化 2】



10

## 【請求項 3】

上記酵素は、加水分解酵素であることを特徴とする請求項 1 又は 2 に記載の組成物。

20

## 【請求項 4】

上記酵素が、グルコシダーゼ又はアルカリフォスファターゼである、請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の組成物。

## 【請求項 5】

請求項 1 から 4 のいずれか 1 項に記載の組成物と対象酵素とを含むことを特徴とする酵素反応キット。

## 【請求項 6】

酵素活性を向上させる方法であって、

請求項 1 から 4 のいずれか 1 項に記載の組成物を、酵素反応系に加える工程を含むことを特徴とする当該方法（但し、ヒトの治療方法を除く）。

30

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、酵素活性を向上させるための組成物およびその利用に関する。具体的には、例えば - グルコシダーゼといった加水分解酵素等の各種酵素活性を向上させることができる化合物を含む組成物およびその利用に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

一般に、酵素反応は、反応プロセスの過程で反応速度が頭打ちになる。酵素活性を向上させることができれば、例えば酵素反応の反応速度が向上し、酵素反応産物の生産効率が向上する等の工業的メリットが生じるため重要な課題である。

40

## 【0003】

酵素活性を向上させる方法としては、一般的に酵素タンパク質を構成するアミノ酸を変異させて酵素タンパク質の構造を変化させる方法（部位特異的変異法）、アルコールまたは高分子（例えば、ポリエチレングリコール等）等を酵素反応溶液に添加する方法が知られている。

## 【0004】

例えば、非特許文献 1 から 3 には、上記部位特異的変異法により酵素活性を向上させる方法が開示されている。

50

## 【 0 0 0 5 】

また、非特許文献 4 には、アルコールを酵素反応溶液に添加することにより酵素活性を向上させる方法が開示されている。さらに、非特許文献 5 には、ポリエチレングリコールを酵素反応溶液に添加することにより酵素活性を向上させる方法が開示されている。

## 【 0 0 0 6 】

また、非特許文献 6 には、高 NaCl 濃度条件下では酵素活性が阻害されるが、グリシンペタインを添加することにより、高 NaCl 濃度条件下での酵素活性の阻害が軽減され、酵素の安定性が向上することが記載されている。

## 【 0 0 0 7 】

また、非特許文献 7 には、グリシン添加により酵素の至適 pH が上昇すること、および酵素活性が向上することが記載されている。一方、グリシンの代わりにメチルグリシンエステルまたはエチルグリシンエステルを添加したとしても酵素活性向上効果が見られないことが記載されている。

10

## 【先行技術文献】

## 【非特許文献】

## 【 0 0 0 8 】

【非特許文献 1】M. Hashida, B. F. Henrik, Trends Glycosci. Glycotech., 12, 389 (2000).

【非特許文献 2】T. A. Kunkel, J. D. Roberts, R. A. Zakour, Methods in Enzymology, 154, 367 (1987).

20

【非特許文献 3】松沢洋著、タンパク質工学の基礎（応用生命科学シリーズ）東京化学同人

【非特許文献 4】S. N. Timasheff, Adv. Protein Chem., 51, 355 (1998).

【非特許文献 5】K. Hayashi, M. Nakazwa, Y. Ishizaki, N. Hiraoka, A. Obayashi, Nucleic Acids Res., 14, 7817 (1986).

【非特許文献 6】A. Pollard and R. G. Wyn Jones, Planta, 144, 291 (1979).

【非特許文献 7】V. Vathipadiekal, A. Verma, M. Rao, Biol. Chem., 388, 61 (2007).

## 【発明の概要】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【 0 0 0 9 】

30

しかしながら、上記従来の酵素タンパク質を構成するアミノ酸を変異させて酵素タンパク質の構造を変化させる方法では、たとえ酵素タンパク質の立体構造が決定されていたとしても、どのように立体構造を改変すれば酵素活性が向上するかについて予測することは難しいため、酵素活性を効果的に改良することは困難であることは当業者に広く知られている。また、かかる方法は、目的の酵素タンパク質毎にアミノ酸変異を検討する必要があり、非常に手間がかかるという問題を有する。

## 【 0 0 1 0 】

また、酵素反応溶液にアルコールまたは高分子（例えば、ポリエチレングリコール等）等を酵素反応溶液に添加する方法では、これらの物質の添加により酵素タンパク質の安定性が向上する結果として、酵素活性が向上すると考えられている。かかる方法は、アミノ酸を変異させる方法と比べて簡便且つ汎用性があるが、酵素活性を向上させる効果は低いという問題を有する。従って、さらに酵素活性向上効果に優れた物質が求められている。

40

## 【 0 0 1 1 】

本発明は、上記の問題点に鑑みてなされたものであり、その目的は、簡便、且つ効果的に酵素活性を向上させる組成物、および当該組成物の利用を提供することにある。

## 【課題を解決するための手段】

## 【 0 0 1 2 】

本発明者らは上記課題を解決すべく鋭意検討を行った。その結果、特定の構造を有するペタインを酵素反応溶液に添加することにより、酵素活性が顕著に向上することを本発明者らが発見し、本発明を完成させるに至った。ペタインのような比較的低分子の物質を添

50

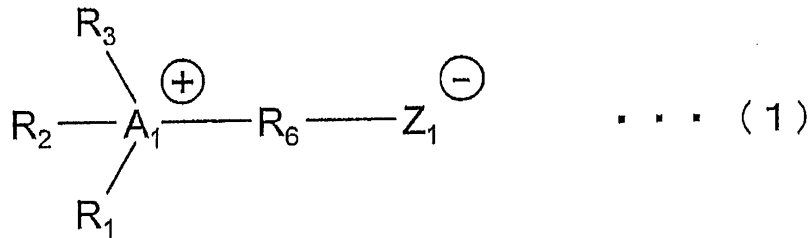
加して酵素活性を顕著に向上させるという報告はこれまでに無く、またベタインに酵素活性を向上させる効果があるということも一切知られていない。特定の構造を有するベタインに酵素活性を顕著に向上させる効果があるということは、本発明者らが初めて見出し、ここに開示するものである。すなわち、本発明は以下の発明を包含する。

## 【0013】

本発明にかかる組成物は、酵素活性を向上させるために用いられる組成物であって、当該組成物が、以下の一般式(1)で表される化合物、またはそれらの塩もしくは誘導体を含むことを特徴としている：

## 【0014】

## 【化1】



10

## 【0015】

ここで、 $R_1$ 、 $R_2$ 、および $R_3$ は、水素を除く、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、およびアリール基からなる群より独立して選択され、同一であっても異なってもよく、当該アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、またはアリール基は官能基を含んでいてもよい基であり、かつ

20

$R_6$ はアルキレン基、アルケニレン基、アルキニレン基、またはアリーレン基であり、当該アルキレン基、アルケニレン基、アルキニレン基、またはアリーレン基は官能基を含んでいてもよい基であり、かつ

$A_1$ は長周期型周期表における5B族元素、かつ

$Z_1$ は $-COO$ 、 $-SO_3$ 、 $-NO_3$ 、または $-HPO_4$ を表し、かつ

下記の(I)または(II)の1つ以上を満たす：

(I)  $R_1$ 、 $R_2$ 、および $R_3$ のいずれか1つ以上が炭素数2以上の基である、

(II)  $R_6$ が炭素数1以上の基である。

30

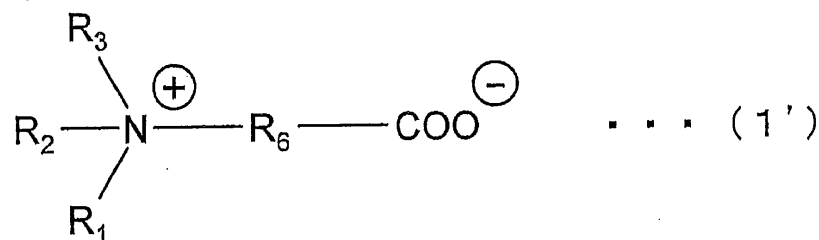
## 【0016】

また、本発明にかかる組成物は、酵素活性を向上させるために用いられる組成物であって、

当該組成物が、以下の一般式(1')で表される化合物、またはそれらの塩もしくは誘導体を含むことを特徴としている：

## 【0017】

## 【化2】



40

## 【0018】

ここで、 $R_1$ 、 $R_2$ 、および $R_3$ は、水素を除く、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、およびアリール基からなる群より独立して選択され、同一であっても異なってもよく、当該アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、またはアリール基は官能基を含んでいてもよい基であり、かつ

$R_6$ はアルキレン基、アルケニレン基、アルキニレン基、またはアリーレン基であり、

50

当該アルキレン基、アルケニレン基、アルキニレン基、またはアリーレン基は官能基を含んでいてもよい基であり、かつ

下記の(Ⅰ)または(Ⅱ)の1つ以上を満たす：

(Ⅰ)  $R_1$ 、 $R_2$ 、および $R_3$ のいずれか1つ以上が炭素数2以上の基である、

(Ⅱ)  $R_6$ が炭素数1以上の基である。

【0019】

また、本発明にかかる組成物は、上記 $R_1$ 、 $R_2$ 、および $R_3$ は、末端に極性官能基を含まない基であることが好ましい。

【0020】

また、本発明にかかる組成物は、上記酵素は、加水分解酵素であることが好ましい。

10

【0021】

本発明にかかる酵素反応キットは、本発明にかかる組成物と対象酵素とを含むことを特徴としている。

【0022】

本発明にかかる方法は、酵素活性を向上させる方法であって、本発明にかかる組成物を酵素反応系に加える工程を含むことを特徴としている。

【0023】

なお、上記非特許文献6は、高NaCl濃度条件下における酵素の安定性の向上に、グリシンベタインが寄与することを示すに過ぎない。また、非特許文献7はそもそもグリシンに関する文献であり、グリシンベタインをはじめとするベタインに酵素活性を向上させる効果があることを示す文献ではない。また非特許文献7にはグリシンの代わりにメチルグリシンエステルまたはエチルグリシンエステルを添加した場合に酵素活性向上効果が見られないことが記載されているため、当業者であれば、グリシンに類似した物質であっても、僅かな構造の変化により酵素活性向上効果が失われるということを理解する。よって、本発明にかかる組成物は、非特許文献6や非特許文献7の記載に基づいて容易に想到し得るものではない。

20

【発明の効果】

【0024】

上記本発明にかかる組成物は、従来用いられるポリエチレングリコール等の添加剤と比較して、非常に優れた酵素活性向上効果を奏するものである。よって、本発明にかかる組成物を用いることによって、簡便、且つ効果的に酵素活性を向上させることができる。

30

【図面の簡単な説明】

【0025】

【図1】各種ベタイン(化合物1~8)の構造を示す図である。

【図2】各種ベタインの添加による - グルコシダーゼの活性比を表すグラフである。

【図3】各種ベタインについて、添加濃度と - グルコシダーゼ活性に及ぼす効果を表すグラフである。

【図4】高濃度の化合物6存在下における - グルコシダーゼタンパク質の沈殿の有無を示すグラフである。

【図5】分子内に1組の双性イオンを持つベタインの製造スキームを示す図である。

40

【図6】化合物6を用い、Saccharomyces由来の - グルコシダーゼを用いた場合の、反応時間(分)に対して産生されたp - ニトロフェノールの濃度を表すグラフである。

【図7】化合物6を用い、Bacillus Stearothermophilus由来の - グルコシダーゼを用いた場合の、反応時間(分)に対して産生されたp - ニトロフェノールの濃度を表すグラフである。

【図8】化合物6を用い、Bakers Yeast由来の - グルコシダーゼを用いた場合の、反応時間(分)に対して産生されたp - ニトロフェノールの濃度を表すグラフである。

【図9】化合物4を用い、Bacillus Stearothermophilus由来の - グルコシダーゼを用いた場合の、反応時間(分)に対して産生されたp - ニトロフェノールの濃度を表すグラフである。

50

【図10】化合物5を用い、Bacillus Stearothermophilus由来の  $\alpha$ -グルコシダーゼを用いた場合の、反応時間(分)に対して産生されたp-ニトロフェノールの濃度を表すグラフである。

【図11】化合物4~6のいずれかを用い、Almond由来の  $\alpha$ -グルコシダーゼを用いた場合の、反応時間(分)に対して産生されたp-ニトロフェノールの濃度を表すグラフである。

【図12】化合物4~6のいずれかを用い、Calf intestine由来のアルカリホスファターゼを用いた場合の、反応時間(分)に対して産生されたp-ニトロフェノールの濃度を表すグラフである。

【図13】化合物4~6のいずれかを用い、Chicken heart由来の乳酸脱水素酵素を用いた場合の、反応時間(分)に対して、基質であるピルビン酸の消費と共に減少したNADHの濃度を表すグラフである。

10

【発明を実施するための形態】

【0026】

本発明の一実施形態について説明すると以下の通りである。ただし、本発明はこれに限定されるものではなく、記述した範囲内で種々の変形を加えた態様で実施できるものである。また、本明細書中に記載された学術文献および特許文献の全てが、本明細書中において参考として援用される。なお、本明細書において特記しない限り「A~B」は、「A以上、B以下」を意味する。

【0027】

20

<1. 本発明にかかる組成物>

本発明にかかる組成物は、酵素活性を向上させるために用いられる組成物に関する。ここで「酵素活性を向上させる」対象となる「酵素」としては、特に限定されるものではなく、例えば、加水分解酵素(例えば、グルコシダーゼ、プロテアーゼ、エステラーゼ、ペプチダーゼ、リパーゼ、ヌクレアーゼ、フォスファターゼ等)、核酸合成酵素(例えば、ポリメラーゼ、RNAポリメラーゼ、逆転写酵素等)、酸化還元酵素(デヒドロゲナーゼ、レダクターゼ、オキシダーゼ等)、トランスフェラーゼ、リガーゼ等を挙げることができる。後述する実施例では、 $\alpha$ -グルコシダーゼ、 $\beta$ -グルコシダーゼ、アルカリホスファターゼ、および乳酸脱水素酵素について、本発明にかかる組成物の効果(酵素活性を向上させる効果)を示した。実施例の結果から、本発明にかかる組成物による効果は、特定の酵素に対するものに限定されないことが分かる。

30

【0028】

また、「酵素活性を向上させる」とは、例えば、本発明にかかる組成物存在下における酵素の反応速度に対する本発明にかかる組成物非存在下における酵素の反応速度の比(以下、「活性比」と称する)が、1より大きくなることを意味する。なお、上記「活性比」は、下記の式(1)を用いて求めることができる。

【0029】

活性比

= (組成物存在下の酵素の反応速度) / (組成物非存在下の酵素の反応速度) ... (1)

40

なお、上記「酵素の反応速度」とは、基質大過剰の条件下における反応初期速度を示す。

【0030】

例えば、加水分解酵素である  $\alpha$ -グルコシダーゼの反応速度は、紫外可視分光測定から加水分解をモニターできる  $p$ -ニトロフェニル-D-グルコピラノシドを基質として用い、反応時間(分)に対する390nmの波長における吸光度変化のグラフの初期の傾きから算出し、加水分解産物であるp-ニトロフェノールのモル吸光係数(pH7.0、37℃)である7660 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>を用いて加水分解速度を算出することができる。

【0031】

本発明にかかる組成物は、既述の一般式(1)で表される化合物、またはそれらの塩も

50

しくは誘導体を含む組成物である。一般式(1)で表される化合物は、その構造から双性イオン化合物であることがわかる。特に記述の一般式(1')で表される化合物は、ベタインに属することがわかる。なお、一般に「グリシンベタイン=トリメチルグリシン」のことを単に「ベタイン」と称する場合があるが、本発明の説明においては「グリシンベタイン=トリメチルグリシン」を「ベタイン」の下位概念であるとして、それぞれを区別する。

#### 【0032】

酵素反応系が水溶液系の場合、本発明にかかる組成物を構成する双性イオン化合物は、酵素反応溶液中で優先的に水和を起こす。その結果、基質、酵素、補酵素類は溶解体積が減少する、いわゆる排除体積効果が生じ、この排除体積効果によって基質、酵素、補酵素類の分子間での会合が促進し、酵素活性が向上するものと考えられる。また後述する実施例に示したように、本発明にかかる組成物を構成するベタインによれば、酵素の基質特異性を高めることができる。このように酵素の基質特異性を向上させることが、酵素活性の向上につながる一つの要因であると考えられる。

10

#### 【0033】

一般式(1)において、 $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ は、水素を除く、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、およびアリール基からなる群より独立して選択される基である。 $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ は全て同一であっても、異なってもよい。また上記アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、またはアリール基には、エーテル、エステル、カルボニル、アミド、アミノ、ハロ、ニトロ、ニトリル、スルホン、スルフィド等の官能基が含まれていてもよい。ただし、上記 $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ の末端には、水酸基、カルボキシル基、アミノ基、スルホン酸基、リン酸基、アミド基、エポキシ基をはじめとする極性官能基が含まれないことが好ましい。

20

#### 【0034】

炭化水素のような疎水性官能基は、水分子と水素結合をするための正に帯電した水素や、非共有電子対を有していない。このような疎水性官能基の周囲に存在する水は、氷殻と呼ばれるネットワーク性の強い水分子のクラスターを形成する(クラスター化すること)が知られている。

#### 【0035】

酵素反応系が水溶液系の場合、本発明にかかる組成物を構成する双性イオン化合物は、酵素反応溶液中で優先的に水和を起こす。双性イオン化合物の分子内に疎水性官能基が含まれる場合、双性イオン化合物と水和した水分子が双性イオン化合物の周囲でクラスター化する。このクラスター化した水分子は、溶質が溶解することができる水分子、いわゆるバルク水(自由水)とは異なり、溶質である酵素や基質が溶解することができない。この結果、上述したような「排除体積効果」が生じるものと考えられる。

30

#### 【0036】

一方、双性イオン化合物の分子内に水酸基のような極性官能基が含まれる場合、疎水性官能基の周囲に存在する水分子同士の結びつきが変化し、双性イオン化合物の周囲でクラスター化する水分子の数が減少する。この結果、双性イオン化合物の分子内に極性官能基が含まれない場合と比較して、「排除体積効果」が低減されるものと考えられる。従って、上記 $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ の末端には、極性官能基が含まれないことが好ましい。

40

#### 【0037】

また一般式(1)において、 $R_6$ はアルキレン基、アルケニレン基、アルキニレン基、またはアリーレン基である。そして上記アルキレン基、アルケニレン基、アルキニレン基、またはアリーレン基には、エーテル、エステル、カルボニル、アミド、アミノ、ハロ、ニトロ、ニトリル、スルホン、スルフィド等の官能基が含まれていてもよい。

#### 【0038】

また一般式(1)において $A_1$ は、窒素(N)、リン(P)をはじめとする長周期型周期表における5B族元素を表す。

#### 【0039】

50

また一般式(1)において、 $Z_1$ は $-COO$ 、 $-SO_3$ 、 $-NO_3$ 、または $-HPO_4$ を表す。

【0040】

さらに一般式(1)において下記の(I)または(II)の1つ以上が満たされる。

(I)  $R_1$ 、 $R_2$ 、および $R_3$ のいずれか1つ以上が炭素数2以上の基である、

(II)  $R_6$ が炭素数1以上の基である。

【0041】

なお、 $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ および $R_6$ の炭素数は、一般式(1)で表される化合物、またはそれらの塩もしくは誘導体(以下「化合物等」という)が酵素-基質反応を行う反応液中に溶解する程度の条件であれば、炭素数の上限は特に限定されるものではない。

10

【0042】

本発明にかかる組成物は、上記一般式(1)で表される化合物からなる群から選択される1つ以上の化合物が含まれていればよい。また本発明にかかる組成物には上記一般式(1)で表される化合物の塩、またはそれらの誘導体であってもよい。また2つ以上の化合物等が組成物に含まれる場合の配合比率は特に限定されるものではなく、酵素-基質反応に適した配合比率を適宜検討のうえ、採用すればよい。

【0043】

なお本発明にかかる組成物に含まれる一般式(1)で表される化合物は、分子内に少なくとも1組以上のカチオンとアニオンとの双性イオンを有する双性イオン化合物(例えばベタイン)であって、(a)カチオンとアニオンと間のスペーサー長が少なくとも $C_1$ 以上である、および/または(b)アンモニウム基の置換基が $C_2$ 以上である双性イオン化合物(例えばベタイン)であるとも表現できる。

20

【0044】

また本発明にかかる組成物は、既述の一般式(1)で表される化合物、またはそれらの塩もしくは誘導体を主成分として含む(50質量%以上、好ましくは70質量%以上、最も好ましくは90質量%以上)ものであればよいが、上記の他、酵素-基質反応の際に好適に使用されている緩衝剤、塩類、補酵素、界面活性剤、タンパク質等が含まれていてもよい。また本発明にかかる組成物は、既述の一般式(1)(または(1'))で表される化合物、またはそれらの塩もしくは誘導体そのものであってもよい。

【0045】

上記、緩衝剤としては特に限定されるものではないが、トリス(TRIS)、トリジン(TRICINE)、ピストリシン(BIS-TRICINE)、ヘペス(HEPES)、モプス(MOPS)、テス(TES)、タプス(TAPS)、ピペス(PIPES)、キャプス(CAPS)、リン酸、酢酸、ホウ酸、炭酸等が挙げられる。

30

【0046】

また上記塩としては特に限定されるものではないが、例えば塩化カリウム、酢酸カリウム、硫酸カリウム、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、酢酸アンモニウム、塩化マグネシウム、酢酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化マンガン、酢酸マンガン、硫酸マンガン、塩化ナトリウム、酢酸ナトリウム、塩化リチウム、酢酸リチウム、塩化鉄、硫酸鉄、塩化亜鉛、硫酸銅、塩化銅、塩化カルシウム等が挙げられる。

40

【0047】

また上記補酵素としては特に限定されるものではないが、例えば、ピロロキノリンキノン(PQQ)、トパキノン(TPQ)、リシンチロシルキノン(LTQ)等のキノン補酵素、チアミンリニン酸(TPP)、フラビンアデニンジヌクレオチド(FAD)、フラビンモノヌクレオチド(FMN)、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NAD)、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリニン酸(NADP)、ピオチン、葉酸などのビタミン補酵素、アデノシン三リン酸(ATP)、ウリジンリニン酸グルコース(UDPG)等が挙げられる。

【0048】

また上記界面活性剤としては特に限定されるものではないが、例えば、TWEEN、T

50



riton X、ラウリル硫酸ナトリウム ( S D S ) 等が挙げられる。

【 0 0 4 9 】

また上記タンパク質としては特に限定されるものではないが、例えば、牛血清アルブミン ( B S A )、シャペロンタンパク質などが挙げられる。

【 0 0 5 0 】

さらに本発明にかかる組成物には、酵素活性を向上させることが公知である、P E G、エタノール、グリセロール、アミノ酸等が、補助成分として含まれていてもよい。

【 0 0 5 1 】

また本発明にかかる組成物の状態は、特に限定されるものではなく、液体であっても、固体の状態であってもよい。

10

【 0 0 5 2 】

#### < 2 . 酵素反応キット >

上記本発明にかかる組成物を用いて酵素反応キットを構成することができる。本発明にかかる酵素反応キットは、本発明にかかる組成物と対象酵素とを含んでいればよく、これらは別々の容器に充填されていてもよいし、同じ容器に充填されていてもよい。上記酵素反応キットは、本発明にかかる組成物を含んでいるため、上記対象酵素の酵素活性を向上させることができる。

【 0 0 5 3 】

なお、上記「対象酵素」とは、酵素活性を向上させる対象となる酵素を指す。上記「対象酵素」としては、特に限定されるものではなく、例えば、加水分解酵素 ( 例えば、グルコシダーゼ等 )、核酸合成酵素 ( 例えば、ポリメラーゼ、R N Aポリメラーゼ、逆転写酵素等 ) 等を挙げることができる。

20

【 0 0 5 4 】

本発明にかかる酵素反応キットには、さらに、既述の緩衝剤、塩類、補酵素、界面活性剤、タンパク質等が含まれていてもよい。

【 0 0 5 5 】

また上記酵素反応キットを構成する成分を格納するための1つ以上の容器 ( 例えば、バイアル、管、アンプル、ピンなど ) が含まれていてもよい。

【 0 0 5 6 】

なお、本発明に係る酵素反応キットを構成する「本発明にかかる組成物」は、既述の一般式 ( 1 ) ( または ( 1 ' ) ) で表される化合物、またはそれらの塩もしくは誘導体そのものであってもよい。

30

【 0 0 5 7 】

#### < 3 . 酵素活性を向上させる方法 >

本発明にかかる酵素活性を向上させる方法は、本発明にかかる組成物を酵素反応系に加える工程を含む。なお、上記「酵素反応系」とは、酵素活性を向上させる対象となる酵素 ( 以下、「対象酵素」という ) を少なくとも含む系を意味する。なお酵素反応系には、上記対象酵素以外に、例えば、既述の緩衝剤、塩類、補酵素、界面活性剤、タンパク質等の酵素反応に必要なものがさらに含まれていてもよい。上記「酵素反応系」の一例として溶液系である酵素反応溶液を挙げることができるが、本発明はこれに限定されない。なお、上記酵素反応系には、上記対象酵素の基質がさらに含まれていてもよいし、含まれていなくてもよい。上記酵素反応系に対象酵素の基質が含まれていない場合は、上記酵素反応系に対象酵素の基質を加える工程が、本発明にかかる酵素活性を向上させる方法に含まれていてもよい。

40

【 0 0 5 8 】

例えば、 - グルコシダーゼによる加水分解反応において、 - グルコシダーゼの活性を向上させる場合には、 - グルコシダーゼおよび - グルコシダーゼの基質を含む酵素反応系に、本発明にかかる組成物を加えればよい。酵素反応の反応条件は、用いられる酵素に応じて適宜設定すればよい。

【 0 0 5 9 】

50

上記「対象酵素」としては、特に限定されるものではなく、例えば、加水分解酵素（例えば、グルコシダーゼ、プロテアーゼ、エステラーゼ、ペプチダーゼ、リパーゼ、ヌクレアーゼ、フォスファターゼ等）、核酸合成酵素（例えば、ポリメラーゼ、RNAポリメラーゼ、逆転写酵素等）、酸化還元酵素（デヒドロゲナーゼ、レダクターゼ、オキシダーゼ等）、トランスフェラーゼ、リガーゼ等を挙げることができる。

【0060】

上記酵素反応系に含まれていることが好ましい双性イオン化合物（例えばベタイン）またはそれらの塩もしくは誘導体の濃度は、反応に用いられる酵素の種類や濃度、基質の濃度、添加されるベタインの構造によって異なるために特に限定されるものではなく、適宜検討のうえ、採用すればよい。

10

【0061】

なお、本発明にかかる酵素活性を向上させる方法において用いられる「本発明にかかる組成物」は、既述の一般式（1）（または（1'））で表される化合物、またはそれらの塩もしくは誘導体そのものであってもよい。

【0062】

本発明は上述した各実施形態に限定されるものではなく、請求項に示した範囲で種々の変更が可能であり、異なる実施形態にそれぞれ開示された技術的手段を適宜組み合わせて得られる実施形態についても本発明の技術的範囲に含まれる。

【実施例】

【0063】

以下、実施例により本発明をさらに詳細に説明するが、本発明は、これに限定されるものではない。

20

【0064】

<実施例で用いたベタイン>

本発明の実施例において用いたベタイン（化合物1～8）について、化合物1としては、市販のグリシンベタイン（スペーサー長： $C_1$ ）（型番023-10862、和光純薬製）を用いた。化合物2～8は、以下のようにして合成したものをを用いた。

【0065】

〔1.前駆体の合成〕

既述の一般式（1）における $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ がエチル基で、 $R_6$ がメチレン基である分子内に1組の双性イオンを持つベタインの前駆体（2-（N,N,N-トリエチルアンモニウム）-酢酸エチルエステル臭化物塩）を、図5に示すスキームに従って合成した。

30

【0066】

まず、トリエチルアミン100mlを酢酸エチル100mlに溶解させた。この溶液に対してプロモ酢酸エチル（37.5g）をゆっくりと滴下した。滴下後、この溶液を室温で一晩攪拌した。その後、生成した沈殿を濾別した。得られた沈殿を真空乾燥して、前駆体1（2-（N,N,N-トリエチルアンモニウム）-酢酸エチルエステル臭化物塩）を得た（収量50.2g、収率86%）。

【0067】

上記で得られた化合物の同定は、IR、および $^1H$  NMRによって行われた。表1にIR解析の結果を、表2に $^1H$  NMR解析の結果を示す。

40

【0068】

【表1】

(ATR-IR)

$\nu / \text{cm}^{-1}$	帰属
1739	C=O伸縮振動

50

【 0 0 6 9 】

【表 2】

(500MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, TMS, rt)

δ / ppm	分裂	積分比	帰属
4.35	s	2H	-N-CH <sub>2</sub> -CO-
4.23	q	2H	-COCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
3.49	q	6H	-N-CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
1.25	t	3H	-COCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
1.22	t	9H	-N-CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>

10

【 0 0 7 0 】

IR、および <sup>1</sup>H NMRの結果、目的物である 2 - ( N , N , N - トリエチルアンモニウム ) - 酢酸エチルエステル臭化物塩 ( すなわち、図 1 における化合物 4 の前駆体 ) が合成されたことが確認できた。

20

【 0 0 7 1 】

図 1 における化合物 2 の前駆体を合成した結果を、表 3 ( IR ) および表 4 ( <sup>1</sup>H NMR ) に示す。表 3 および 4 によれば目的とする化合物が合成されたことを確認することができた。

【 0 0 7 2 】

【表 3】

(ATR-IR)

ν / cm <sup>-1</sup>	帰属
1731	C=O伸縮振動

30

【 0 0 7 3 】

【表 4】

(500MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, TMS, rt)

$\delta$ / ppm	分裂	積分比	帰属
4.07	q	2H	-COCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
3.27	m	2H	-N-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CO-
3.05	s	9H	-N-CH <sub>3</sub>
2.37	t	2H	-NCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CO-
1.92	m	2H	-NCH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> CO-
1.18	t	3H	-CO-CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>

10

【 0 0 7 4 】

図 1 における化合物 3 の前駆体を合成した結果を、表 5 ( I R ) および表 6 ( <sup>1</sup> H N M R ) に示す。表 5 および 6 によれば目的とする化合物が合成されたことを確認することができた。

20

【 0 0 7 5 】

【表 5】

(ATR-IR)

$\nu$ / cm <sup>-1</sup>	帰属
1733	C=O伸縮振動

30

【 0 0 7 6 】

【表 6】  
(500MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, TMS, rt)

$\delta$ / ppm	分裂	積分比	帰属
4.04	q	2H	-COCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
3.26	m	2H	-N-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -
3.03	s	9H	-N-CH <sub>3</sub>
2.31	br s	2H	-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CO-
1.66	t	2H	-NCH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -
1.55	m	2H	-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> CO-
1.25	t	2H	-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -
1.17	t	3H	-CO-CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>

10

20

【 0 0 7 7 】

図 1 における化合物 5 の前駆体を合成した結果を、表 7 ( I R ) および表 8 ( <sup>1</sup> H N M R ) に示す。表 7 および 8 によれば目的とする化合物が合成されたことを確認することができた。

【 0 0 7 8 】

【表 7】  
(ATR-IR)

$\nu$ / cm <sup>-1</sup>	帰属
1743	C=O伸縮振動

30

【 0 0 7 9 】

【表 8】

(500MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, TMS, rt)

$\delta$ / ppm	分裂	積分比	帰属
4.38	s	2H	-N-CH <sub>2</sub> -CO-
4.22	m	2H	-COCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
3.40	br s	6H	-N-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
1.30	br s	6H	-N-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
1.26	t	3H	-COCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
0.90	t	9H	-N-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>

10

【0080】

図1における化合物6の前駆体を合成した結果を、表9 (IR) および表10 (<sup>1</sup>H NMR) に示す。表9および10によれば目的とする化合物が合成されたことを確認することができた。

20

【0081】

【表 9】

(ATR-IR)

$\nu$ / cm <sup>-1</sup>	帰属
1741	C=O伸縮振動

30

【0082】

【表 10】

(500MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, TMS, rt)

$\delta$ / ppm	分裂	積分比	帰属
4.38	s	2H	-N-CH <sub>2</sub> -CO-
4.23	q	2H	-COCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
3.43	m	6H	-N-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
1.62	m	6H	-N-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
1.30	m	6H	-N-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
1.25	t	3H	-COCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
0.93	t	9H	-N-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>

40

50

## 【 0 0 8 3 】

図 1 における化合物 7 の前駆体を合成した結果を、表 1 1 ( I R ) および表 1 2 (  $^1\text{H}$  N M R ) に示す。表 1 1 および 1 2 によれば目的とする化合物が合成されたことを確認することができた。

## 【 0 0 8 4 】

## 【表 1 1】

(ATR-IR)

$\nu / \text{cm}^{-1}$	帰属
1731	C=O伸縮振動

10

## 【 0 0 8 5 】

## 【表 1 2】

(500MHz, DMSO- $d_6$ , TMS, rt)

$\delta / \text{ppm}$	分裂	積分比	帰属
4.72	s	2H	-N- <u>CH<sub>2</sub></u> -CO-
4.26	q	2H	-CO <u>CH<sub>2</sub></u> CH <sub>3</sub>
3.98	m	4H	- <u>CH<sub>2</sub></u> -O- <u>CH<sub>2</sub></u> -
3.71	m	2H	-N- <u>CH<sub>2</sub></u> CH <sub>2</sub> -O- (eq)
3.64	m	2H	-N- <u>CH<sub>2</sub></u> CH <sub>2</sub> -O- (ax)
3.40	s	3H	-N-CH <sub>3</sub>
1.27	t	3H	-CO <u>CH<sub>2</sub></u> CH <sub>3</sub>

20

30

## 【 0 0 8 6 】

図 1 における化合物 8 の前駆体を合成した結果を、表 1 3 ( I R ) および表 1 4 (  $^1\text{H}$  N M R ) に示す。表 1 3 および 1 4 によれば目的とする化合物が合成されたことを確認することができた。

## 【 0 0 8 7 】

## 【表 1 3】

(ATR-IR)

$\nu / \text{cm}^{-1}$	帰属
1738	C=O伸縮振動

40

## 【 0 0 8 8 】

【表 1 4】  
(500MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, TMS, rt)

δ / ppm	分裂	積分比	帰属
4.50	s	2H	-N-CH <sub>2</sub> -CO-
4.21	q	2H	-COCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
3.58	m	2H	-NCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> N- (eq)
3.50	m	2H	-NCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> N- (eq)
3.21	s	3H	-N-CH <sub>3</sub>
1.81	m	4H	-NCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> N-
1.51	m	2H	-NCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> N-
1.23	t	3H	-COCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>

10

20

## 【 0 0 8 9 】

## 〔 2 . ベタインの合成 〕

得られた前駆体 ( 2 - ( N , N , N - トリエチルアンモニウム ) - 酢酸エチルエステル臭化物塩 ) 1 . 0 g を蒸留水 1 0 m l に溶解した。この溶液を陰イオン交換カラム ( アンバーライト : 登録商標 I R - 4 0 2 、ローム アンド ハース社製 ) を充填したカラムに通した。溶離液をエバポレーターで減圧濃縮し、五酸化ニリンの共存下、減圧乾燥し、ベタイン ( 2 - ( N , N , N - トリエチルアンモニウム ) - アセテート ) を得た ( 収量 0 . 5 9 g 、収率 1 0 0 % ) 。

## 【 0 0 9 0 】

上記で得られた化合物の同定は、I R および <sup>1</sup> H N M R によるエステルピークの消失確認と、C、H、N 元素分析による塩の混入の有無を確認することで行った。表 1 5 に I R 解析の結果を、表 1 6 に <sup>1</sup> H N M R 解析の結果を、表 1 7 に元素分析の結果を示す。

30

## 【 0 0 9 1 】

## 【表 1 5】

(ATR-IR)

ν / cm <sup>-1</sup>	帰属
	C=O伸縮振動の消失

40

## 【 0 0 9 2 】



【表 16】

(500MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, TMS, rt)

$\delta$ / ppm	分裂	積分比	帰属
3.46	br s	6H	-N-CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
3.38	s	2H	-N-CH <sub>2</sub> -COO <sup>-</sup>
1.13	br s	9H	-N-CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>

10

【0093】

【表 17】

	実測値	計算値
C%	59.67	59.67
H%	10.95	10.77
N%	8.70	8.70

20

注) 0.1分子の水和物として計算

【0094】

表 15 ~ 17 の結果、目的物である 2 - ( N , N , N - トリエチルアンモニウム ) - アセテート ( すなわち、図 1 における化合物 4 ) が得られたことが確認された。

【0095】

図 1 における化合物 2 を合成した結果を、表 18 ( IR )、表 19 ( <sup>1</sup>H NMR )、および表 20 ( 元素分析 ) に示す。表 18 ~ 20 によれば目的とする化合物が合成されたことを確認することができた。

30

【0096】

【表 18】

(ATR-IR)

$\nu$ / cm <sup>-1</sup>	帰属
	C=O伸縮振動の消失

40

【0097】

【表 19】

(500MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, TMS, rt)

$\delta$ / ppm	分裂	積分比	帰属
3.25	m	2H	-N- <u>CH<sub>2</sub></u> -CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CO-
3.02	s	9H	-N- <u>CH<sub>3</sub></u>
1.80	t	2H	-NCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> - <u>CH<sub>2</sub></u> -CO-
1.75	m	2H	-NCH <sub>2</sub> - <u>CH<sub>2</sub></u> -CH <sub>2</sub> CO-

10

【0098】

【表 20】

	実測値	計算値
C%	56.93	57.19
H%	10.44	10.44
N%	9.50	9.53

20

注) 0.1分子の水和物として計算

【0099】

図1における化合物3を合成した結果を、表21 (IR)、表22 (<sup>1</sup>H NMR)、および表23 (元素分析) に示す。表21 ~ 23によれば目的とする化合物が合成されたことを確認することができた。

30

【0100】

【表 21】

(ATR-IR)

$\nu$ / cm <sup>-1</sup>	帰属
	C=O伸縮振動の消失

40

【0101】

【表 2 2】

(500MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, TMS, rt)

δ / ppm	分裂	積分比	帰属
3.24	m	2H	-N-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -
3.02	s	9H	-N-CH <sub>3</sub>
1.76	t	2H	-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CO-
1.62	m	2H	-NCH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -
1.43	m	2H	-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> CO-
1.22	m	2H	-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -

10

【 0 1 0 2 】

【表 2 3】

	実測値	計算値
C%	61.16	61.43
H%	10.79	11.08
N%	7.96	7.96

20

注) 0.15分子の水和物として計算

30

【 0 1 0 3 】

図 1 における化合物 5 を合成した結果を、表 2 4 ( I R )、表 2 5 ( <sup>1</sup>H N M R )、および表 2 6 ( 元素分析 ) に示す。表 2 4 ~ 2 6 によれば目的とする化合物が合成されたことを確認することができた。

【 0 1 0 4 】

【表 2 4】

(ATR-IR)

ν / cm <sup>-1</sup>	帰属
	C=O伸縮振動の消失

40

【 0 1 0 5 】

【表 2 5】

(500MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, TMS, rt)

$\delta$ / ppm	分裂	積分比	帰属
3.44	s	2H	-N-CH <sub>2</sub> -CO-
3.40	m	6H	-N-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
1.59	m	6H	-N-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
0.87	t	9H	-N-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>

10

【 0 1 0 6 】

【表 2 6】

	実測値	計算値
C%	64.05	63.91
H%	11.88	11.53
N%	6.85	6.78

20

注) 0.3分子の水和物として計算

【 0 1 0 7 】

図 1 における化合物 6 を合成した結果を、表 2 7 ( I R )、表 2 8 ( <sup>1</sup>H N M R )、および表 2 9 ( 元素分析 ) に示す。表 2 7 ~ 2 9 によれば目的とする化合物が合成されたことを確認することができた。

30

【 0 1 0 8 】

【表 2 7】

(ATR-IR)

$\nu$ / cm <sup>-1</sup>	帰属
	C=O伸縮振動の消失

40

【 0 1 0 9 】

【表 2 8】

(500MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, TMS, rt)

$\delta$ / ppm	分裂	積分比	帰属
3.41	m	6H	-N-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
3.33	s	2H	-N-CH <sub>2</sub> -CO-
1.54	m	6H	-N-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
1.26	m	6H	-N-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
0.91	t	9H	-N-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>

10

【 0 1 1 0】

【表 2 9】

	実測値	計算値
C%	66.98	67.10
H%	11.81	12.01
N%	5.67	5.59

20

注) 0.4分子の水和物として計算

【 0 1 1 1】

図 1 における化合物 7 を合成した結果を、表 3 0 ( I R )、表 3 1 ( <sup>1</sup>H N M R )、および表 3 2 ( 元素分析 ) に示す。表 3 0 ~ 3 2 によれば目的とする化合物が合成されたことが確認できた。

30

【 0 1 1 2】

【表 3 0】

(ATR-IR)

$\nu$ / cm <sup>-1</sup>	帰属
	C=O伸縮振動の消失

40

【 0 1 1 3】

【表 3 1】

(500MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, TMS, rt)

δ / ppm	分裂	積分比	帰属
3.88	br s	4H	-CH <sub>2</sub> -C-CH <sub>2</sub> -
3.71	s	2H	-N-CH <sub>2</sub> -CO-
3.48	m	4H	-N-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -O-
3.29	s	3H	-N-CH <sub>3</sub>

10

【 0 1 1 4 】

【表 3 2】

	実測値	計算値
C %	51.95	52.22
H %	8.36	8.28
N %	8.72	8.70

20

注) 0.1分子の水和物として計算

【 0 1 1 5 】

図 1 における化合物 8 を合成した結果を、表 3 3 ( I R )、表 3 4 ( <sup>1</sup>H N M R )、および表 3 5 ( 元素分析 ) に示す。表 3 3 ~ 3 5 によれば目的とする化合物が合成されたことが確認できた。

30

【 0 1 1 6 】

【表 3 3】

(ATR-IR)

ν / cm <sup>-1</sup>	帰属
	C=O伸縮振動の消失

【 0 1 1 7 】

40

【表 3 4】

(500MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, TMS, rt)

δ / ppm	分裂	積分比	帰属
3.64	m	2H	-NCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> N- (eq)
3.56	s	2H	-N-CH <sub>2</sub> -CO-
3.37	m	2H	-NCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> N- (ax)
3.17	s	3H	-N-CH <sub>3</sub>
1.74	m	4H	-NCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> N-
1.50	m	2H	-NCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> N-

10

【 0 1 1 8 】

【表 3 5】

	実測値	計算値
C%	60.26	60.42
H%	9.45	9.65
N%	8.85	8.81

20

注) 0.1分子の水和物として計算

30

【 0 1 1 9 】

〔実施例 1〕

&lt; - グルコシダーゼの加水分解速度に及ぼすベタイン添加の効果 &gt;

得られた各種ベタイン（化合物 1 ~ 8）の添加による酵素活性向上効果を評価、検討するため、ベタイン存在下での - グルコシダーゼの加水分解速度を測定した。 - グルコシダーゼ（Saccharomyces由来）（型番076-02841、和光純薬製）の基質としては、紫外可視分光測定から加水分解をモニターできる - p - ニトロフェニル - D - グルコピラノシド（型番325-34671、和光純薬製）を用いた。

【 0 1 2 0 】

基質である - p - ニトロフェニル - D - グルコピラノシドは 350 nm に極大吸収波長を持つが、 - グルコシダーゼによってグルコースと p - ニトロフェノールに加水分解されると、pH 7.0 においては p - ニトロフェノールは水酸基のプロトンが解離して p - ニトロフェノレートとなる。結果として、極大吸収波長は長波へシフトし、400 nm 近傍の吸光度が上昇する。405 nm の p - ニトロフェノレートのモル吸光係数（pH 7.0、37 °C）である  $7660 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  を利用すれば、加水分解によって生成する p - ニトロフェノールの濃度を見積もることができ、反応速度を算出することができる。ここで 405 nm を使用したのはマイクロプレートリーダーのフィルターの関係である。

40

【 0 1 2 1 】

加水分解速度の測定は、酵素反応溶液（100 mM リン酸緩衝溶液（pH 7.0）, 2 mM - p - ニトロフェニル - D - グルコピラノシド,  $2.5 \times 10^{-5} \text{ mg/mL}$

50

- グルコシダーゼ)を用いて、37で行った。ベタインは、最終濃度50mMとなるように上記酵素反応溶液に添加した。

【0122】

- グルコシダーゼの反応速度は反応時間に対する405nmの吸光度変化のグラフの初期の傾きから算出し、加水分解産物であるp-ニトロフェノールのモル吸光係数(pH7.0、37)7660M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>を用いて加水分解速度を算出した。

【0123】

また、酵素活性の誤差を最小限とするため、ベタイン添加による効果は活性比で表した。当該「活性比」とは、〔発明を実施するための形態〕の<1.本発明にかかる組成物>で上述したように、本発明にかかる組成物存在下における酵素の反応速度に対する本発明にかかると、ベタイン添加の効果は顕著であった。

10

【0124】

結果を図2に示す。図2は、各種ベタインを最終濃度50mMとなるように酵素反応溶液に添加した場合の活性比を表すグラフである。化合物1~8のいずれのベタインを添加した場合も、活性比は1を上回った。これは、ベタインを添加しなかった場合の-グルコシダーゼ活性と比較して、ベタインを添加した場合の-グルコシダーゼ活性が上昇したことを表している。特に、化合物6では活性比は8.7、化合物8では活性比は7.9と、ベタイン添加の効果は顕著であった。

【0125】

一方、後述する比較例1に示すように、酵素活性を向上することが報告されているエタノール(非特許文献4を参照)では活性比は1.0、グリセロール(非特許文献4を参照)では活性比は0.9、ポリエチレングリコール(非特許文献5を参照)では活性比は0.1と、これらの物質を添加することによる酵素活性向上効果はほとんど確認できなかった。

20

【0126】

〔比較例1〕

酵素活性を向上させるために一般的に用いられるエタノール、グリセロール、またはポリエチレングリコール(PEG、平均分子量6,000)をベタインの代わりに最終濃度50mMとなるように酵素反応溶液に添加した以外は、実施例1と同様の方法により-グルコシダーゼ活性を測定し、活性比を求めた。

30

【0127】

〔試験例1〕

<ベタインの濃度の与える効果>

添加するベタインの最適濃度を調べるために、ベタインの濃度を变化させたときの活性比を測定した。一例として、化合物1、化合物2、および化合物6の結果を図3に示す。

【0128】

図3には化合物1、化合物2、および化合物6の濃度変化による活性比の変化が示されている。

【0129】

化合物2を最終濃度50mMで添加した場合の活性比は3.3であったが、添加する化合物2の濃度が上昇すると加水分解速度は濃度依存的に上昇し、最終濃度1.0Mで添加した場合の活性比は9.5であった。

40

【0130】

また、化合物6は最終濃度50mMで添加すると顕著な効果を示したが、最終濃度0.5M以上の濃度では活性比が低下した。

【0131】

化合物6に関し、活性の低下は酵素(-グルコシダーゼ)の沈殿によるものと推察されたため、基質非存在下で酵素溶液の濁度測定を行った。

【0132】

一方、化合物1は最終濃度50mMの添加で活性比の上昇が飽和挙動を示し、活性比2

50



以上となるような酵素活性向上効果はもたらさないことが明らかとなった。これにより、化合物 2 ~ 8 のベタインは、天然のベタインである化合物 1 と比較しても明らかな効果があることが確認された。

【 0 1 3 3 】

また、図 4 は、高濃度の化合物 6 存在下における  $\alpha$ -グルコシダーゼタンパク質の沈殿の有無を示すグラフである。 $\alpha$ -グルコシダーゼタンパク質の沈殿の有無は、沈殿の生成によって生じた粒子の起こす光散乱を検出する方法（濁度測定）により評価した。

【 0 1 3 4 】

具体的に説明すると、本発明にかかる組成物には 500 nm に吸収帯を持つ分子は含まれておらず、沈殿を生じない溶液では光はすべて透過するため、吸光度はゼロとなる。一方、沈殿が生じた場合は光の散乱が生じ、吸光度はゼロよりも大きな値を示す。したがって、沈殿生成による光の散乱に伴う 500 nm の吸光度変化を測定すれば、 $\alpha$ -グルコシダーゼタンパク質の沈殿の有無を評価することができる。ただし、散乱強度は粒子の大きさ等にも依存するため、500 nm の吸光度の強度と沈殿量とは相関はない。

【 0 1 3 5 】

化合物 6 を最終濃度が 0.5 M 以上添加すると活性比が低下したが、これは、図 4 に示すように酵素を沈殿させることが原因であることが判明した。化合物 6 に関しては、低濃度領域（1 mM ~ 0.3 M）において高い活性向上効果が確認されており、この結果は本発明を制限するものではない。

【 0 1 3 6 】

試験例 1 の結果に従って、実施例 1 で用いた各種ベタインの使用濃度範囲と最大効果を表 3 6 に示した。

【 0 1 3 7 】

【表 3 6】

ベタイン誘導体	最大活性比(濃度)	使用濃度範囲
化合物1	2.3 (0.1M以上)	特に制限は無し
化合物2	9.5 (1.0M以上)	特に制限は無し
化合物3	10.7 (1.0M)	特に制限は無し
化合物4	6.0 (1.0M)	特に制限は無し
化合物5	6.9 (0.5M)	1.0M未満
化合物6	9.9 (0.1M)	0.5M未満
化合物7	3.5 (0.5M)	特に制限は無し
化合物8	11.0 (1.0M)	特に制限は無し

【 0 1 3 8 】

化合物 1、化合物 2、および化合物 3 は、ベタインのカチオンとアニオンとの距離をスペーサーによって変化させたものであるが、スペーサー長が長くなれば酵素活性向上効果は高いことが明らかになった。

【 0 1 3 9 】

化合物 4、化合物 5、および化合物 6 は、アルキル鎖長を長くすることによって、カチオンであるアンモニウム基の嵩高さを変えたものであるが、アンモニウム基が嵩高くなる

ほど酵素活性向上効果は高いことが明らかになった。また、ベタインの添加量が低濃度であっても酵素活性向上効果があらわれることが明らかになった。しかし、化合物5、化合物6に関しては高濃度での使用は酵素を沈殿させるため、使用に際しては濃度範囲の調節が必要となることが明らかになった。

【0140】

化合物7、化合物8は、アンモニウム基の嵩高さは同じであるが、アンモニウム基に導入される官能基を疎水性から親水性に変えたものである。アンモニウム基に導入される官能基が疎水性である化合物8の方が、親水性官能基が導入された化合物7よりもその酵素活性向上効果が高いことが明らかになった。

【0141】

〔試験例2〕

<各種 - グルコシダーゼに与えるベタインの効果>

種々の - グルコシダーゼに与えるベタインの添加効果を比較した。 - グルコシダーゼとしては、市販の3種類の - グルコシダーゼ (Saccharomyces由来 (型番076-02841、和光純薬製)、Bacillus Stearothermophilus由来 (型番G3651-250un、シグマアルドリッチ製)、またはBakers Yeast由来 (型番G5003-100un、シグマアルドリッチ製)を用いて評価し、ベタインとしては化合物4、5、および6を用いた。化合物4は、最終濃度が750mMになるように添加し、化合物5は、最終濃度が200mMになるように添加した。化合物6は、沈殿を生じないように最終濃度が50mMになるように添加した。

【0142】

測定条件は実施例1に記載の条件に従って行い、反応時間(分)に対して産生されたp-ニトロフェノールの濃度を測定した結果を図6~10に示す。図6は、Saccharomyces由来の - グルコシダーゼを用い、ベタインとして化合物6を用いた結果を表す。図7は、Bacillus Stearothermophilus由来の - グルコシダーゼを用い、ベタインとして化合物6を用いた結果を表す。図8は、Bakers Yeast由来の - グルコシダーゼを用い、ベタインとして化合物6を用いた結果を表す。図9は、Bacillus Stearothermophilus由来の - グルコシダーゼを用い、ベタインとして化合物4を用いた結果を表す。図10は、Bacillus Stearothermophilus由来の - グルコシダーゼを用い、ベタインとして化合物5を用いた結果を表す。

【0143】

図6~8に示す結果から、由来の異なる3種類の - グルコシダーゼのすべてにおいて、化合物6の添加によって化合物6非存在下と比較して反応速度の上昇が確認された。また、図9および10に示す結果から、化合物4または5の添加によっても、これらの化合物非存在下と比較して反応速度の上昇が確認された。

【0144】

すなわち、これらの結果は、本発明にかかる組成物を構成するベタインを添加することによって酵素タンパク質の沈殿を生じない場合であれば、添加しない場合と比較して、酵素活性が少なくとも1倍より大きくなることを示している。

【0145】

〔試験例3〕

< - グルコシダーゼの基質選択性に与える効果>

- グルコシダーゼの基質選択性に与えるベタインの添加効果を比較した。 - グルコシダーゼとしては、市販の - グルコシダーゼ (Bacillus Stearothermophilus由来 (型番G351-250un)、シグマアルドリッチ製)を用いた。ベタインとしては化合物6を用いた。基質としては、 - p-ニトロフェニル-D-グルコピラノシド (型番325-34671、和光純薬製)、 - p-ニトロフェニル-D-ガラクトピラノシド (型番N0492、東京化成製)、および - p-ニトロフェニル-D-マンノピラノシド (型番N503995、TRC製)を用いた。

【0146】

試験例3では、各基質に対する - グルコシダーゼの反応速度は、反応時間に対する4

10

20

30

40

50

0.5 nmの吸光度変化のグラフの初期の傾きから算出し、加水分解物であるp-ニトロフェノールのモル吸光係数(pH 7.0, 37)  $7660 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ を用いて算出した。

## 【0147】

試験例3では、加水分解速度の測定は、実施例1に記載の酵素反応溶液に、記載のp-ニトロフェニル-D-グルコピラノシドの代わりに、上記の4種類の基質のいずれかを、最終濃度が2 mMになるように上記酵素反応溶液に添加した。また、化合物6を、最終濃度が50 mMになるように上記酵素反応溶液に添加した。上述した以外は実施例1に記載の条件に従って行った。化合物6存在下、または非存在下において、反応時間(分)に対して生成されたp-ニトロフェノールの濃度から算出した反応速度を表37に示す。

## 【0148】

## 【表37】

基質	化合物6非存在下	化合物6存在下	速度比
$\alpha$ -p-ニトロフェニル-D-グルコピラノシド	$9.7 \pm 0.5 \times 10^{-7} \text{ M/min}$	$24.0 \pm 0.3 \times 10^{-7} \text{ M/min}$	2.5
$\beta$ -p-ニトロフェニル-D-グルコピラノシド	$1.7 \pm 0.1 \times 10^{-7} \text{ M/min}$	$1.4 \pm 0.2 \times 10^{-7} \text{ M/min}$	0.8
$\alpha$ -p-ニトロフェニル-D-ガラクトピラノシド	$1.2 \pm 0.7 \times 10^{-7} \text{ M/min}$	$1.0 \pm 0.1 \times 10^{-7} \text{ M/min}$	0.8
$\alpha$ -p-ニトロフェニル-D-マンノピラノシド	$1.7 \pm 0.2 \times 10^{-7} \text{ M/min}$	$1.6 \pm 0.2 \times 10^{-7} \text{ M/min}$	0.9

## 【0149】

-グルコシダーゼの基質であるp-ニトロフェニル-D-グルコピラノシドに対する-グルコシダーゼの反応速度は、化合物6を添加することによって2.5倍に上昇したが、-グルコシダーゼの基質の類似化合物であるp-ニトロフェニル-D-グルコピラノシド、p-ニトロフェニル-D-ガラクトピラノシド、およびp-ニトロフェニル-D-マンノピラノシドに対する-グルコシダーゼの反応速度は、化合物6を添加することで低下した。

## 【0150】

すなわち、この結果は、本発明にかかる組成物を構成するペタインは、-グルコシダーゼの基質に対する反応速度のみを上昇させることを示している。つまり、本発明にかかる組成物を構成するペタインを添加することによって酵素タンパク質の基質選択性(基質特異性)を向上させることができることを示している。

## 【0151】

## 〔試験例4〕

<-グルコシダーゼに与えるペタインの効果>

-グルコシダーゼと異なる糖加水分解酵素である-グルコシダーゼに与えるペタインの添加効果を比較した。-グルコシダーゼとしては、市販の-グルコシダーゼ(Almond由来(型番306-50981)、和光純薬製)を用いた。ペタインとしては化合物4、5および6を用いた。基質としてはp-ニトロフェニル-D-グルコピラノシド(型番N235、東京化成製)を用いた。

## 【0152】

-グルコシダーゼの反応速度は、反応時間に対する405 nmの吸光度変化のグラフの初期の傾きから算出し、加水分解物であるp-ニトロフェノールのモル吸光係数(pH 7.0, 37)  $7660 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ を用いて加水分解速度を算出した。

## 【0153】

試験例4では、測定条件は、酵素反応溶液II(100 mMリン酸緩衝溶液(pH 7.0), 2 mM-p-ニトロフェニル-D-グルコピラノシド,  $1.3 \times 10^{-3} \text{ mg}$

10

20

30

40

50

/mL -グルコシダーゼ)を用いて、37で行った。化合物4~6のいずれかを、最終濃度50mMとなるように上記酵素反応溶液IIに添加し、反応時間(分)に対して産生されたp-ニトロフェノールの濃度を測定した。結果を図11に示す。

【0154】

図11は、化合物4~6のいずれかを用い、Almond由来の -グルコシダーゼを用いた場合の、反応時間(分)に対して産生されたp-ニトロフェノールの濃度を表すグラフである。図11に示す結果から、 -グルコシダーゼとは異なる基質を認識して加水分解する -グルコシダーゼを用いた場合であっても、本発明にかかる組成物を構成するベタインの添加によって、ベタイン非存在下の場合と比較して反応速度が上昇することが確認された。また、化合物4~6のいずれのベタインを用いても、反応速度の上昇効果が認めら

10

【0155】

すなわち、この結果は、本発明にかかる組成物を構成するベタインを添加することによって、 -グルコシダーゼとは異なる糖加水分解酵素についても、その活性を向上させることができることを示している。

【0156】

〔試験例5〕

<アルカリホスファターゼに与えるベタインの効果>

糖加水分解酵素以外の加水分解酵素に与えるベタインの添加効果を調べるために、リン酸エステル加水分解酵素であるアルカリホスファターゼを用いて実験を行った。アルカリホスファターゼとしては、市販のアルカリホスファターゼ(Calf intestine由来(型番308-51041)、和光純薬製)を用いた。ベタインとしては化合物4、5および6を用いた。基質としては、p-ニトロフェニルホスフェート(型番N22002-5G、アルドリッチ製)を用いた。

20

【0157】

アルカリホスファターゼの反応速度は、反応時間に対する405nmの吸光度変化のグラフの初期の傾きから算出し、加水分解物であるp-ニトロフェノールのモル吸光係数( $\text{pH } 7.0$ ,  $37$ )  $7660 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ を用いて加水分解速度を算出した。

【0158】

試験例5では、測定条件は、酵素反応溶液III(100mM Tris-HCl緩衝溶液( $\text{pH } 7.5$ ), 2mM p-ニトロフェニルホスフェート,  $1.0 \times 10^{-3} \text{ mg/mL}$  アルカリホスファターゼ)を用いて、37で行った。化合物4~6のいずれかを、最終濃度50mMとなるように上記酵素反応溶液IIIに添加し、反応時間(分)に対して産生されたp-ニトロフェノールの濃度を測定した。結果を図12に示す。

30

【0159】

図12は、化合物4~6のいずれかを用い、Calf intestine由来のアルカリホスファターゼを用いた場合の、反応時間(分)に対して産生されたp-ニトロフェノールの濃度を表すグラフである。図12に示す結果から、リン酸エステルを加水分解するアルカリホスファターゼを用いた場合であっても、ベタインの添加によって、ベタイン非存在下と比較して反応速度が上昇することが確認された。また、化合物4~6のいずれのベタインを用いても、反応速度の上昇効果が認められた。

40

【0160】

すなわち、この結果は、本発明にかかる組成物を構成するベタインを添加することによって、糖加水分解酵素以外の加水分解酵素の活性についても、その活性を向上させることができることを示している。

【0161】

〔試験例6〕

<乳酸脱水素酵素に与えるベタインの効果>

糖加水分解酵素、リン酸エステル加水分解酵素等の加水分解酵素以外の酵素に与えるベタインの添加効果を調べるため、酸化還元酵素の1つである乳酸脱水素酵素を用いて実験

50

を行った。乳酸脱水素酵素としては、市販の乳酸脱水素酵素（Chicken heart由来（型番305-51431）、和光純薬製）を用いた。ベタインとしては化合物4、5および6を用いた。基質としては、ピルビン酸（型番162-05553、和光純薬製）を用い、補酵素としてNADH（型番305-50451、和光純薬製）を用いた。

【0162】

乳酸脱水素酵素による基質の酸化還元反応速度は、反応時間（分）に対する340nmの吸光度変化のグラフの初期の傾きから算出し、補酵素であるNADHのモル吸光係数（pH7.5, 37） $2970\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ を用いて算出した。

【0163】

基質であるピルビン酸が酸化還元される際に、補酵素であるNADHも等モル消費され、減少する。その結果、NADH極大吸収波長である340nmの吸光度が低下する。このため、NADHのモル吸光係数（pH7.5, 37） $2970\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ を利用すれば、酸化還元によって消費されたNADHの濃度を見積もることができ、反応速度を算出することができる。

10

【0164】

試験例6では、測定条件は、酵素反応溶液IV（80mM Tris-HCl衝溶液（pH7.5）、2mM ピルビン酸、1.5mM NADH、10mM KCl、 $5.0 \times 10^{-5}\text{ mg/mL}$  乳酸脱水素酵素）を用いて、37で行った。化合物4~6のいずれかを、最終濃度50mMとなるように上記酵素反応溶液IVに添加し、反応時間（分）に対して、基質であるピルビン酸の消費と共に減少したNADHの濃度を測定した。結果を

20

【0165】

図13は、化合物4~6のいずれかをを用い、Chicken heart由来の乳酸脱水素酵素を用いた場合の、反応時間（分）に対して、基質であるピルビン酸の消費と共に減少したNADHの濃度を表すグラフである。図13に示す結果から、酸化還元酵素である乳酸脱水素酵素を用いた場合であっても、ベタインの添加によって、ベタイン非存在下と比較して反応速度が上昇することが確認された。また、化合物4~6のいずれのベタインを用いても、反応速度の上昇効果が認められた。

【0166】

すなわち、この結果は、本発明にかかる組成物を構成するベタインを添加することによって加水分解酵素以外の酵素の活性についても、その活性を向上させることができることを示している。

30

【産業上の利用可能性】

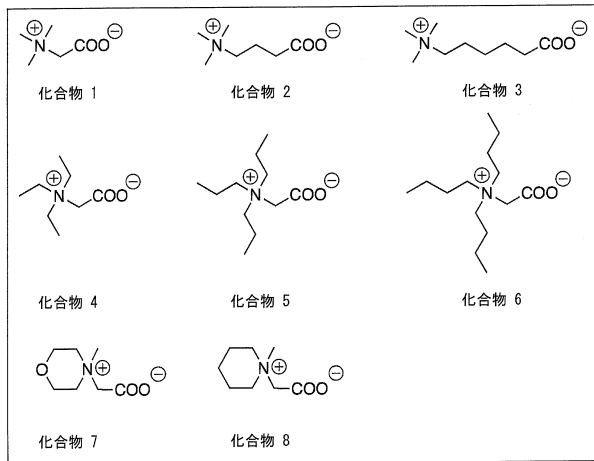
【0167】

上述したように、本発明にかかる組成物を添加するだけで、様々な酵素の酵素活性を向上させることができるという効果を享受できる。

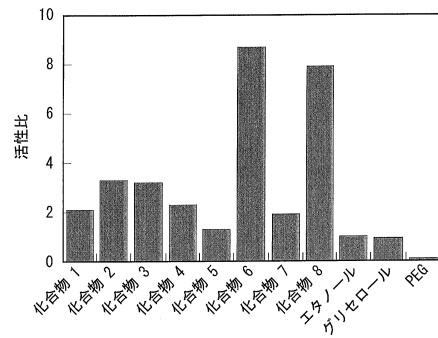
【0168】

酵素反応は、生化学、分子生物学等の学術分野のみならず、生産工程において酵素を利用する全ての産業（医薬品産業、食品産業等）において利用可能である。

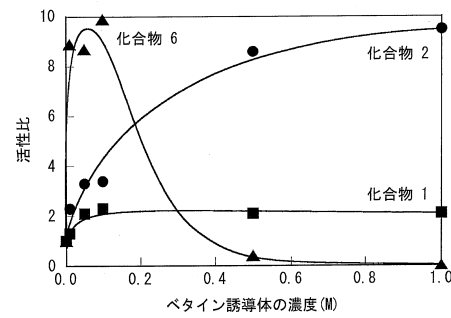
【 図 1 】



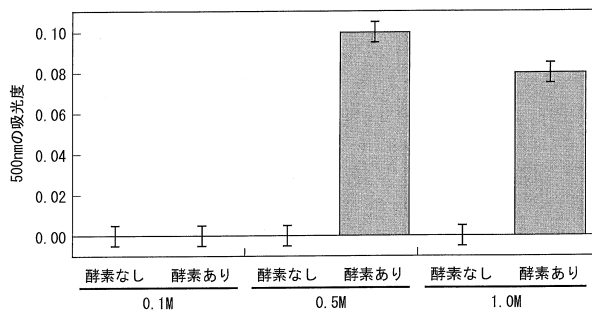
【 図 2 】



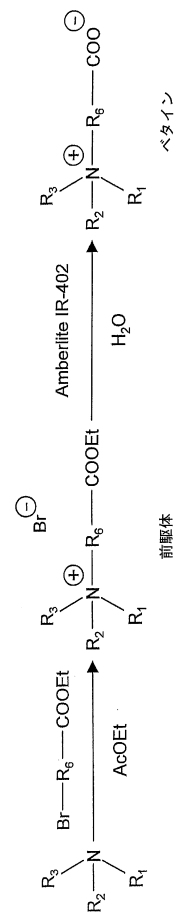
【 図 3 】



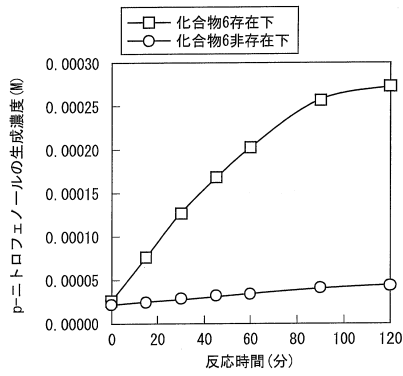
【 図 4 】



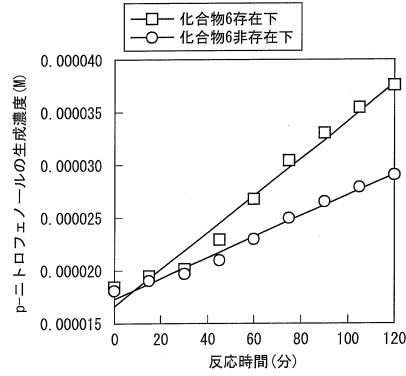
【 図 5 】



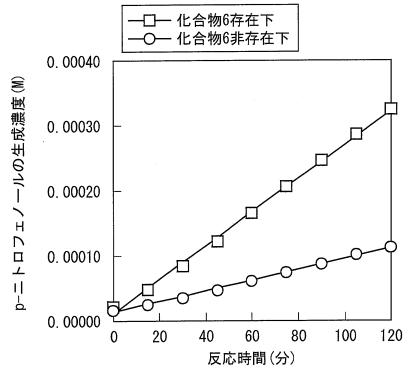
【 図 6 】



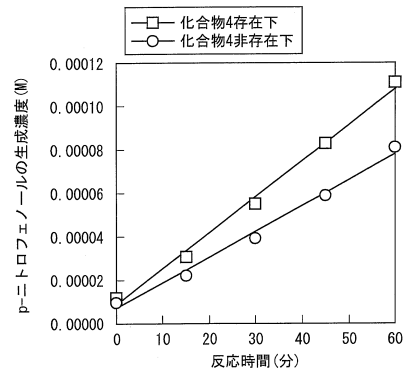
【 図 8 】



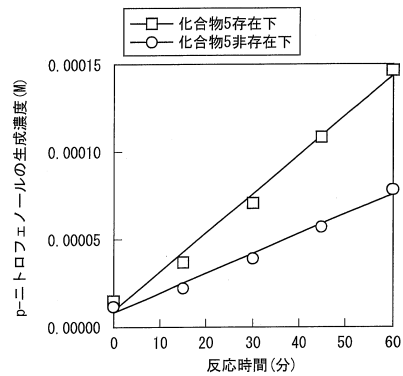
【 図 7 】



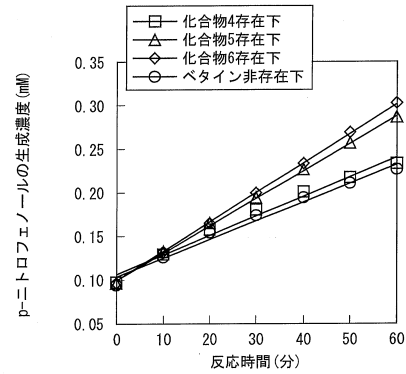
【 図 9 】



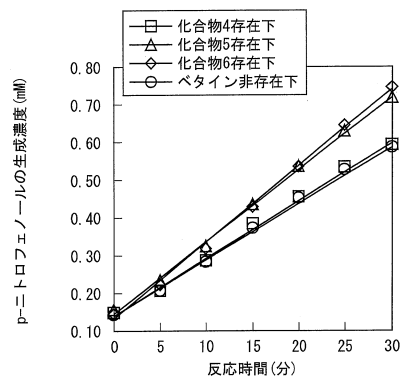
【 図 10 】



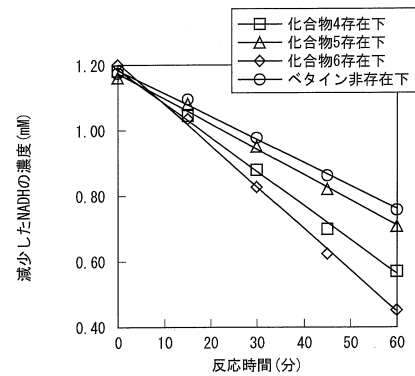
【 図 12 】



【 図 11 】



【 図 13 】



---

フロントページの続き

(72)発明者 出口 瑛介  
兵庫県神戸市中央区港島南町7丁目1番20号 甲南大学内

審査官 吉岡 沙織

(56)参考文献 特開昭60-210984(JP,A)  
特開平02-041398(JP,A)  
特開2002-034558(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
C12N 9/  
CAplus/REGISTRY/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS(STN)  
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)