

明 細 書

発明の名称：高レバウジオシドC含有ステビア植物

技術分野

[0001] 本発明は、レバウジオシドCの含有量が高いステビア植物に関する。

背景技術

[0002] 多様化する消費者ニーズに対応すべく、様々な飲料が開発され、市販されている。ショ糖等の糖類は、甘味を与える等の目的で飲料にごく普通に配合される成分であるが、過剰摂取による健康への影響が指摘されてきており、より低カロリーであり、かつ天然由来の甘味料に対するニーズが高まりつつある。例えば特許文献1は、ビタミン、高甘味度甘味料、及び甘味改善組成物を含有する機能性甘味料組成物を開示している。

[0003] レバウジオシド (Rebaudioside、以下「Reb」ともいう) は、ステビア抽出物に含まれる甘味成分として知られている。ステビア抽出物は、ステビア乾燥葉から抽出、精製されたものである。ステビアは南米パラグアイを原産地とする菊科多年生植物で、学名をステビア・レバウディアナ・ベルトニー (Stevia Rebaudiana Bertoni) という。ステビアは砂糖の約300倍以上の甘味を持つ成分を含むので、この甘味成分を抽出して天然甘味料として用いる為に栽培されている。Rebとしては、Reb A、Reb B、Reb C、Reb D、Reb E、Reb M等、様々な配糖体の存在が報告されている (特表2012-504552)。様々なRebの中で、例えばReb Aは、高甘味度と良質甘味を有する甘味料として評価されており、広く用いられている。その他のRebについても、その独自の甘さおよび付随する味を有することが判明しつつある。

[0004] そのような状況において、レバウジオシドCを乾燥葉あたり3～8重量%含むステビア植物体が知られている (特許文献3)。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：特表2009-517043号明細書

特許文献2：特表2016-515814号明細書

特許文献3：国際出願公開パンフレットWO2016/090460

発明の開示

[0006] これらステビア植物の甘味成分は、程よい甘味を呈するものの、ショ糖に比べて甘味の後引きが見られることが問題となっている。この問題に対し、本発明者らは、その後引きの程度はステビア抽出物の組成により異なることを見出し、特にステビア抽出物の中に含まれるレバウジオシドC（以下「RebC」ということもある）が甘味の後引きを改善することを見出した。

そこで、レバウジオシドCをさらにより多く含むステビア植物体の取得、そのような植物体を作出するための手段、そのような植物体より得られる乾燥葉、この乾燥葉より得られたレバウジオシドCを含む食物や飲料などの提供が望まれている。

[0007] 本出願は、野生型ステビア種と比べて高含有量でレバウジオシドCを含む高レバウジオシドC含有型非遺伝子組み換えステビア植物体並びに当該植物体の作出方法及びスクリーニング方法を提供する。

[0008] 本発明によって、レバウジオシドCをより多く含むステビア植物体の取得、そのような植物体を作出するための手段、そのような植物体より得られる乾燥葉、この乾燥葉より得られたレバウジオシドCを含む食物や飲料などの提供が可能になる。

発明を実施するための形態

[0009] 以下、本発明を詳細に説明する。以下の実施の形態は、本発明を説明するための例示であり、本発明をそのような実施の形態のみに限定する趣旨ではない。本発明は、その要旨を逸脱しない限り、様々な形態で実施をすることができる。

[0010] 1. 本発明の高レバウジオシドC含有型非遺伝子組み換えステビア植物体

本発明は、野生型ステビア種と比べレバウジオシドCを20%以上高い含量で含む高レバウジオシドC含有型非遺伝子組み換えステビア植物体であっ

て、かつ総ステビオール配糖体に占めるレバウジオシドCの割合が40%以上である、前記植物体（以下、「本発明の植物体」）を提供する。

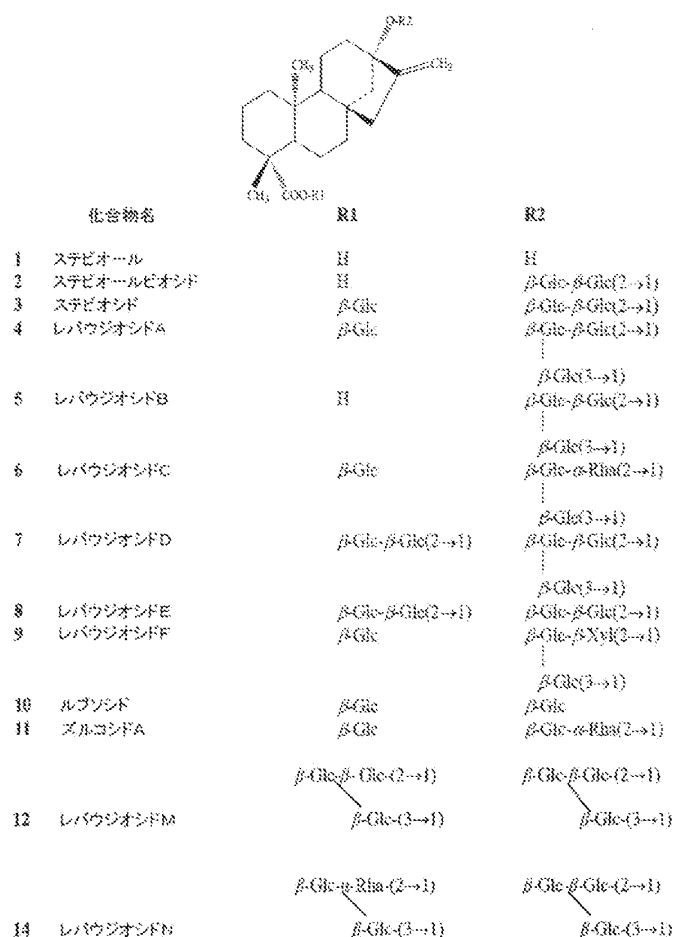
本発明のステビア植物体は、野生種のステビア植物体から派生した種であるが、レバウジオシドCが高くなるように遺伝子に変異が生じたものである。かつ当該遺伝子の変異は非遺伝子組換え的に生じるものである（後述）。

[0011] 「野生型ステビア種と比べレバウジオシドCを20%以上高い含量で含む」とは、野生型ステビア植物体の新鮮葉（非乾燥葉）から得られた抽出液の単位量（例えば10ml）あたりに含まれるレバウジオシドCの量を基準（濃度）とした場合、本発明のステビア植物体の新鮮葉（非乾燥葉）から得られた抽出液の同一単位量（前記野生型ステビア植物体の葉から得られた抽出液と同一量）あたりに含まれるレバウジオシドCの量（濃度）が20%以上高いことを意味する。ここで、本発明のステビア植物体は、野生型ステビア種と比べレバウジオシドCを20%以上、22%以上、24%以上、26%以上、28%以上、30%以上、32%以上、34%以上、36%以上、38%以上、40%以上、42%以上、44%以上、46%以上、48%以上、50%以上、52%以上、54%以上、56%以上、58%以上、60%以上、62%以上、64%以上、66%以上、68%以上、70%以上高い含量で含んでいてもよい。

[0012] また、「総ステビオール配糖体に占めるレバウジオシドCの割合が40%以上である」とは本発明のステビア植物体の新鮮葉（非乾燥葉）から得られた抽出液に存在する総ステビオール配糖体量に対してレバウジオシドCが40%以上の比率で存在することを意味する。ここで、総ステビオール配糖体とは、未知のステビオール配糖体を含むものではなく、また検出限界未満で存在するステビオール配糖体も含まない。好ましくは、総ステビオール配糖体とは、レバウジオシドA、レバウジオシドB、レバウジオシドC、レバウジオシドD、レバウジオシドE、レバウジオシドF、レバウジオシドI、レバウジオシドJ、レバウジオシドK、レバウジオシドN、レバウジオシドM、レバウジオシドO、レバウジオシドQ、レバウジオシドR、ズルコシドA

、ルブソシド、ステビオール、ステビオールモノシド、ステビオールピオシド及びステビオシドからなる群より選択される2つ以上の任意の組み合わせである。例えば、ある実施形態では、総ステビオール配糖体は、レバウジオシドA、レバウジオシドB、レバウジオシドC、レバウジオシドD、レバウジオシドF、レバウジオシドM及びステビオールからなり、別の実施形態では総ステビオール配糖体は、レバウジオシドA、レバウジオシドB、レバウジオシドC、レバウジオシドD、レバウジオシドF、レバウジオシドM、レバウジオシドN、レバウジオシドO及びステビオールからなるものであってもよい。

[化1]



[0013] 本発明の植物体に占めるレバウジオシドCの含有量は以上のとおりであるが、本発明の植物体から乾燥葉を得た場合、当該乾燥葉の重量に対しレバウジオシドCは7重量%以上、8重量%以上、9重量%以上、10重量%以上、11重量%以上、12重量%以上、13重量%以上、14重量%以上、15重量%以上、16重量%以上、17重量%以上、18重量%以上、19重量%以上、20重量%以上の量で存在していてもよい。

[0014] ここで本発明の植物体の乾燥葉とは、本発明のステビア植物体の新鮮葉を乾燥させることにより含水量を10重量%以下、7重量%以下、5重量%以下、4重量%以下、3重量%以下、2重量%以下、1重量%以下にまで減らしたものをいう。好ましくは、本発明の植物体の乾燥葉の含水量は3～4重量%である。

[0015] 本発明の植物体は、レバウジオシドCに係る上記特性に加え、以下の特性の少なくとも1つを有していてもよい。

(1) 野生型ステビア種と比べレバウジオシドAの含量(産生量)が低い。より具体的には、野生型ステビア種と比べレバウジオシドAの含量(例えば乾燥葉などにおける重量濃度)が、約40%以上、約50%以上、約60%以上、約70%以上、または、約80%以上低い。

(2) 野生型ステビア種と比べステビオシドの含量(産生量)が低い。より具体的には、野生型ステビア種と比べステビオシドの含量(例えば乾燥葉などにおける重量濃度)が、約50%以上、約60%以上、約70%以上、または、約80%以上低い。

(3) 野生型ステビア種と比べレバウジオシドFの含量(産生量)が高い。より具体的には、野生型ステビア種と比べレバウジオシドFの含量(例えば乾燥葉などにおける重量濃度)が、約2倍以上、約3倍以上、約4倍以上、約5倍以上、または、約6倍以上高い。

[0016] (4) 野生型ステビア種と比べ、総ステビオール配糖体に占めるレバウジオシドAの割合が低い。より具体的には、野生型ステビア種と比べ(例えば乾燥葉などにおける)総ステビオール配糖体に占めるレバウジオシドAの割合

が約8%以上、約20%以上、約30%以上、約40%以上、約50%以上、約60%以上、または、約70%以上低い。

(5) 野生型ステビア種と比べ、総ステビオール配糖体に占めるステビオシドの割合が低い。より具体的には、野生型ステビア種と比べ（例えば乾燥葉などにおける）総ステビオール配糖体に占めるステビオシドの割合が約30%以上、約40%以上、約50%以上、約60%以上、または、約70%以上低い。

(6) 野生型ステビア種と比べ、総ステビオール配糖体に占めるレバウジオシドFの割合が高い。より具体的には、野生型ステビア種と比べ（例えば乾燥葉などにおける）総ステビオール配糖体に占めるレバウジオシドFの割合が約3倍以上、約4倍以上、約5倍以上、または、約6倍以上低い。

[0017] 上記(1)～(6)の特性は、本発明の植物体の特定の1個体と野生型ステビア種の特定の1個体との比較を基準にしても、本発明の植物体の複数の個体からなる集団における算術平均値と、野生型ステビア種の複数の個体からなる集団における算術平均値との比較を基準にしてもよい。

一部の態様において、本発明の植物体は、レバウジオシドCに係る上記特性に加え、野生型ステビア種と比べレバウジオシドAおよびステビオシドの含量（産生量）が低く、かつ、レバウジオシドFの含量（産生量）が高く、および／または、野生型ステビア種と比べ、総ステビオール配糖体に占めるレバウジオシドAおよびステビオシドの割合が低く、かつ、総ステビオール配糖体に占めるレバウジオシドFの割合が高い。

[0018] 前述のとおり、本発明のステビア植物体は、野生種のステビア植物体から派生した種であり、レバウジオシドCが高くなるように遺伝子に変異が生じたものである。また、当該遺伝子の変異は天然条件下で生じるか、あるいは非遺伝子組換え的手法により生じるものである。その遺伝子変異は、配列番号1に示すとおりである（以下、「本発明の遺伝子多型」という）。配列番号1の塩基配列は、対応する野生型アレルの塩基配列（配列番号2）の第60番目の塩基配列が野生型のAからTに変異した一塩基多型（SNP：以下

、「本発明のSNP」という)を有する。

したがって、本発明のステビア植物体は、配列番号1に示す多型をゲノム中に有することを特徴とする。これらの多型は、高レバウジオシドC含有という表現型と統計学上の相関関係を有することが実施例において確認されている。

本発明のステビア植物体は前記遺伝子多型をヘテロ接合型で有していてもよく、あるいはホモ接合型で有していてもよい。一般に前記遺伝子多型をホモ接合型で有する植物体はヘテロ接合型と比べてレバウジオシドC含有量が高くなる傾向がある。

これらの遺伝子多型は、PCR法、TaqMan PCR法、シーケンス法、マイクロアレイ法、インベーター法、TILLING法等により検出することが可能であるが、検出方法はこれらに限定されるものではない。遺伝子多型の検出方法の詳細については後述する。

[0019] 本明細書中、「非遺伝子組換え的手法」の例としては、外来遺伝子の導入を行わずに宿主細胞(または宿主植物体)の遺伝子に変異を誘発する方法が挙げられる。そのような方法としては植物細胞の変異誘発剤を作用させる方法が挙げられる。そのような変異誘発剤としては、エチレンメタンスルホン酸(EMS)及びアジ化ナトリウム等が挙げられる。例えば、エチレンメタンスルホン酸(EMS)は、0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%、1.0%などの濃度で植物細胞を処理することができる。処理時間は1～48時間、2～36時間、3～30時間、4～28時間、5～26時間、6～24時間である。処理の手順自体は公知であるが、吸水過程を経た給水種子を上記濃度で変異誘発剤を含む処理液に、上記処理時間浸漬することで行うことができる。

あるいは、非遺伝子組換え的手法の例としてX線、γ線、紫外線などの放射線や光線を植物細胞に照射する方法もできる。この場合、適当な紫外線の照射量(紫外線ランプ強さ、距離、時間)を用いて照射した細胞を、選択培地などで培養させた後、目的の形質を有する細胞、カルス、植物体を選択で

きる。その際の照射強度は0.01~100Gr、0.03~75Gr、0.05~50Gr、0.07~25Gr、0.09~20Gr、0.1~15Gr、0.1~10Gr、0.5~10Gr、1~10Grであり、照射距離は1cm~200m、5cm~100m、7cm~75m、9cm~50m、10cm~30m、10cm~20m、10cm~10mであり、照射時間は1分~2年、2分~1年、3分~0.5年、4分~1か月、5分~2週間、10分~1週間である。照射の強度、距離及び時間は、放射線の線種や照射対象となる状態（細胞、カルス、植物体）により異なるが、当業者であれば適宜調整することができる。

また、細胞融合、薬培養（半数体育成）、遠縁交雑（半数体育成）などの手法も公知である。

一般に、植物細胞は、培養の間に変異を伴うことがあるため、より安定した形質維持のために植物個体に戻すことが好ましい。

なお、本発明の植物体は非遺伝子組み換えステビア植物体であるが、本発明の植物体を宿主として事後的に遺伝子組み換えを行って得られた植物体（例えば、本発明の植物体を宿主として遺伝子組み換えを行って、さらに別の形質を付加した植物体）も、本発明の範囲から除外されるものではない。

[0020] レバウジオシドCは、本発明の植物体の新鮮葉または乾燥葉に適切な溶媒（水等の水性溶媒又はアルコール、エーテル及びアセトン等の有機溶媒）を反応させることにより抽出液の状態で抽出することができる。抽出条件等はWO2016/090460に記載の方法や、後述の実施例に記載の方法を参照することができる。

さらに、このようにして得られた抽出液に対し、酢酸エチルその他の有機溶媒：水の勾配、高速液体クロマトグラフィー（High Performance Liquid Chromatography：HPLC）、ガスクロマトグラフィー、飛行時間型質量分析（Time-of-Flight mass spectrometry：TOF-MS）、超高性能液体クロマトグラフィー（Ultra（High）Performance Liquid chromatography：UPLC）等の公知の方法を用いることによりレバウジオシドCを精製することができる。

[0021] 本発明に係るレバウジオシドC含量は、WO2016/090460に記載の方法や、後述の実施例に記載の方法で測定することができる。具体的に

は本発明のステビア植物体から新鮮葉をサンプリングし、LC/MS-MSを行うことにより測定することができる。

[0022] 本発明の植物体には植物体全体のみならず、植物器官（例えば葉、花弁、茎、根、種子など）、植物組織（例えば表皮、師部、柔組織、木部、維管束、柵状組織、海綿状組織など）あるいは種々の形態の植物細胞（例えば、懸濁培養細胞）、プロトプラスト、葉の切片、カルスなどが含まれ得る。

[0023] また、本発明の植物体には、組織培養物又は植物培養細胞も含まれ得る。このような組織培養物又は植物培養細胞を培養することにより、植物体を再生することができるからである。本発明の植物体の組織培養物又は植物培養細胞の例としては、胚、分裂組織細胞、花粉、葉、根、根端、花弁、プロトプラスト、葉の切片およびカルス等が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

[0024] 2. 本発明の植物体の作出方法

本発明は、別の実施態様において、本発明のステビア植物体と第2のステビア植物体とを交雑させる工程を含む、野生型ステビア種と比べレバウジオシドCを20%以上高い含量で含む高レバウジオシドC含有型ステビア植物体を作成する方法（以下、「本発明の作出方法」という）を提供する。

当該方法により作出される「野生型ステビア種と比べレバウジオシドCを20%以上高い含量で含む高レバウジオシドC含有型ステビア植物体」は、本発明の植物体と同じ表現型と遺伝的性質を有する。

[0025] 具体的には、本発明の作出方法により作出される植物体の表現型は、野生型ステビア種と比べレバウジオシドCを20%以上高い含量で含み、かつ総ステビオール配糖体に占めるレバウジオシドCの割合が40%以上である。ここで、「野生型ステビア種と比べレバウジオシドCを20%以上高い含量で含む」とは前述のとおりである。また、「総ステビオール配糖体に占めるレバウジオシドCの割合が40%以上である」とは前述のとおりである。

[0026] さらに本発明の作出方法により作出された植物体から乾燥葉を得た場合、当該乾燥葉の重量に対しレバウジオシドCは7重量%以上、8重量%以上、

9重量%以上、10重量%以上、11重量%以上、12重量%以上、13重量%以上、14重量%以上、15重量%以上、16重量%以上、17重量%以上、18重量%以上、19重量%以上、20重量%以上の量で存在していてもよい。乾燥葉の定義については前述のとおりである。

[0027] 本発明の作出方法により作出される植物体の遺伝的性質は、配列番号1に示す遺伝子多型を有することである。本発明の作出方法により作出される植物体は前記遺伝子多型をヘテロ接合型で有していてもよく、あるいはホモ接合型で有していてもよい。これらの多型の検出方法については、前述及び後述のとおりである。

[0028] 本発明の作出方法において、「交雑させる」とは、本発明の植物体と、第2の植物体とを交配させることにより、その子植物体（本発明の作出方法により作出される植物体）を得ることを意味する。交雑方法としては、戻し交雑が好ましい。「戻し交雑」とは、本発明の植物体と第2の植物体との間に生まれた子植物体を、さらに本発明の植物体（つまり、本発明の遺伝子多型を有する植物体）と交雑させて、本発明の遺伝子多型のホモ接合型植物体を作成する手法である。本発明の作出方法に用いられる第2の植物体が、本発明の植物体と同じ表現型と遺伝的性質を有する場合には、実質的に戻し交雑となる。本発明の遺伝子多型はメンデルの法則に従って遺伝し、これに伴って当該遺伝子多型と相関する表現型、つまり高レバウジオシドC含有という表現型も、メンデルの法則に従って遺伝する。

[0029] あるいは、本発明の植物体は自殖により作出することもできる。自殖は、本発明の植物体のおしべの花粉を本発明の植物体のめしべに自家受粉させることにより行うことができる。

[0030] 本発明の作出方法により作出される植物体は、表現型及び遺伝的性質が本発明の植物体と同じであるため、本発明の作出方法により作出される植物体をさらに第3のステビア植物体とを交雑させることにより、野生型ステビア種と比べレバウジオシドCを20%以上高い含量で含む高レバウジオシドC含有型ステビア植物体を作成することも可能である。

[0031] 別の態様として、本発明の植物体は、先に述べた組織培養物又は植物培養細胞を培養することにより植物体を再生することで作出することも可能である。培養条件については、野生型ステビア植物の組織培養物又は植物培養細胞を培養する条件と同じであり、公知である（Protocols for In Vitro cultures and secondary metabolite analysis of aromatic and medicinal plants, Method in molecular biology, vo. 1391, pp113-123.）。

[0032] 3. 本発明の植物体のスクリーニング方法

本発明の植物体および本発明の植物体と同じ表現型と遺伝的性質を有する植物体は、当該植物体の組織から本発明の遺伝子多型を検出することによりスクリーニングすることができる。ここで、「スクリーニング」とは、本発明の植物体とそれ以外の植物体とを識別し、本発明の植物体を選択することを意味する。

したがって、本発明は、別の実施形態として、被験植物のゲノムに配列番号1に示す多型を同定する工程を含む、高レバウジオシドC含有型ステビア植物体をスクリーニングする方法（以下、「本発明のスクリーニング方法」という）を提供する。

[0033] 本発明のスクリーニング方法としては、

(a) 本発明の遺伝子多型の塩基配列を含むオリゴヌクレオチドプローブ、及び/又は前記遺伝子の塩基配列及びその相補配列の少なくとも一方を増幅したときの増幅断片中に前記変異部位が含まれるように作製されたオリゴヌクレオチドプライマーを用いて被検ステビア植物体のゲノム又はcDNAライブラリーについて増幅処理及び/又はハイブリダイゼーション処理を行う工程、及び、

(b) 前記処理物を分析することにより変異部位を検出する工程を含む、方法が挙げられる。

[0034] このような検出方法の具体例としては、PCR法、TaqMan PCR法、シーケンス法、マイクロアレイ法、インベーター法やTILLING法が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

PCR法の場合、3' 末端部分が本発明のS N Pに相補的な配列を有するようなプライマーを作製することが好ましい。このように設計されたプライマーを用いると、鋳型となるサンプルが変異を有する場合には、プライマーが完全に鋳型にハイブリダイズするため、ポリメラーゼ伸長反応が進むが、鋳型が本発明のS N Pを有しない場合には、プライマーの3' 末端のヌクレオチドが鋳型とミスマッチを生じるので、伸長反応は起こらない。したがって、このようなプライマーを用いてPCR増幅を行い、増幅産物をアガロースゲル電気泳動などによって分析し、所定のサイズの増幅産物が確認できれば、サンプルである鋳型が変異を有していることになり、増幅産物が存在しない場合には、鋳型が変異を有していないものと判断できる。

あるいは、本発明のS N Pとプライマー配列とは重複させず、かつ本発明の遺伝子多型をPCR増幅させることが可能なようにプライマー配列を設計し、増幅されたヌクレオチド断片の塩基配列をシーケンスすることにより、本発明の遺伝子多型を検出することができる。

PCR及びアガロースゲル電気泳動については、以下を参照：Sambrook, Fritsch and Maniatis, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" 2nd Edition (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press。

[0035] TaqMan PCR法とは、蛍光標識したアレル特異的オリゴとTaq DNAポリメラーゼによるPCR反応とを利用した方法である (Livak, K.J. Genet. Anal. 14, 143 (1999); Morris T. et al., J. Clin. Microbiol. 34, 2933 (1996))。

シーケンス法とは、変異を含む領域をPCRにて増幅させ、Dye Terminatorなどを用いてDNA配列をシーケンスすることで、変異の有無を解析する方法である (Sambrook, Fritsch and Maniatis, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" 2nd Edition (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press)。

DNAマイクロアレイは、ヌクレオチドプローブの一端が支持体上にアレイ状に固定されたものであり、DNAチップ、Geneチップ、マイクロチップ、ビーズアレイ等を含むものである。本発明の遺伝子多型と相補的な配列を含むプロ

ープを用いることで、網羅的に本発明の遺伝子多型の有無を検出することができる。DNAチップなどのDNAマイクロアレイアッセイとしてはGeneChipアッセイが挙げられる（Affymetrix社；米国特許第6,045,996号、同第5,925,525号、及び同第5,858,659号参照）。GeneChip技術は、チップに貼り付けたオリゴヌクレオチドプローブの小型化高密度マイクロアレイを利用するものである。

インベーター法とは、SNP等の遺伝子多型のそれぞれのアレルに特異的な2種類のレポータープローブ及び1種類のインベータープローブの鋳型DNAへのハイブリダイゼーションと、DNAの構造を認識して切断するという特殊なエンドヌクレアーゼ活性を有するCleavase酵素によるDNAの切断を組み合わせた方法である（Livak, K. J. Biomol. Eng. 14, 143-149 (1999); Morris T. et al., J. Clin. Microbiol. 34, 2933 (1996); Lyamichev, V. et al., Science, 260, 778-783 (1993)等）。

TILLING (Targeting Induced Local Lesions IN Genomes) 法とは、変異導入した突然変異体集団のゲノム中の変異ミスマッチをPCR増幅とCEL Iヌクレアーゼ処理によってスクリーニングする方法である。

[0036] 4. 本発明の植物体由来抽出物及びそれを用いた製品

本発明のさらなる態様において、本発明の植物体、または当該植物体の種子若しくは乾燥葉から抽出物を得る工程を含む、レバウジオシドC含有抽出物の製造方法（以下、「本発明の抽出物の製造方法」という）が提供される。さらに、本発明の抽出物の製造方法により得られた抽出物からレバウジオシドCを精製する工程を含む、レバウジオシドCの製造方法（以下、「本発明のレバウジオシドCの製造方法」という）が提供される。

レバウジオシドC含有抽出物は、本発明の植物体の新鮮葉または乾燥葉に適切な溶媒（水等の水性溶媒又はアルコール、エーテル及びアセトン等の有機溶媒）を反応させることにより得ることができる。抽出条件等はWO 2016/090460に記載の方法や、後述の実施例に記載の方法を参照することができる。

また、レバウジオシドC含有抽出物を酢酸エチルその他の有機溶媒：水の勾配、高速液体クロマトグラフィー（High Performance Liquid Chromatography：HPLC）、ガスクロマトグラフィー、飛行時間型質量分析（Time-of-Flight mass spectrometry：TOF-MS）、超高性能液体クロマトグラフィー（Ultra（High）Performance Liquid chromatography：UPLC）等の公知の方法を用いることによりレバウジオシドCを精製することができる。

[0037] 本発明の抽出物の製造方法により得られた抽出物（以下、「本発明の抽出物」という）は、野生型ステビア種と比べレバウジオシドCを20%以上高い含量で含み、かつ総ステビオール配糖体に占めるレバウジオシドCの割合が40%以上であることを特徴とする。ここで、「野生型ステビア種と比べレバウジオシドCを20%以上高い含量で含む」とは前述のとおりである。また、「総ステビオール配糖体に占めるレバウジオシドCの割合が40%以上である」とは前述のとおりである。本発明の抽出物は、野生型ステビア種から同様に抽出した抽出物と比べ、少なくとも総ステビオール配糖体に占めるレバウジオシドCの割合が異なるため、野生型ステビア種から同様に抽出した抽出物とは味覚特性などの特性が異なっていると考えられる。

[0038] このようにして得られた本発明の抽出物及び／又は本発明のレバウジオシドCの製造方法により得られるレバウジオシドCと他の成分とを混合することにより、レバウジオシドCの含量を高めた新規な医薬品、香料又は飲食品を製造することができる。そこで、本発明は、別の実施態様として、本発明の抽出物及び／又は本発明のレバウジオシドCの製造方法により得られるレバウジオシドCと他の成分とを混合する工程を含む、医薬品、香料又は飲食品の製造方法を提供する。さらに、本発明は、前記製造方法により得られた、レバウジオシドCの含量を高めた新規な医薬品、香料又は飲食品を提供する。ここで飲食品とは、飲料及び食品を意味する。したがって、ある実施態様では、本発明は新規な医薬品、香料、飲料又は食品を提供し、また、当該医薬品、香料、飲料又は食品の製造方法を提供する。

[0039] 他の成分としては、医薬品、香料又は飲食品に使用し得るものであれば特

に限定されず、天然成分及び非天然成分を使用することができる。非天然成分としては、天然に存在しない化合物、例えば、合成風味料、合成保存料などの合成添加物、発酵産物などが挙げられる。

[0040] 医薬品（医薬組成物）の剤型は、特に限定されず、溶液状、ペースト状、ゲル状、固体状、粉末状等任意の剤型をとることができる。また、本発明の医薬品（医薬組成物）は、オイル、ローション、クリーム、乳液、ゲル、シャンプー、ヘアリンス、ヘアコンディショナー、エナメル、ファンデーション、リップスティック、おしろい、パック、軟膏、パウダー、歯磨、エアロゾル、クレンジングフォーム等の皮膚外用薬の他、浴用剤、養毛剤、皮膚美容液、日焼け防止剤等に用いることができる。本発明の医薬品（医薬組成物）は、必要に応じてさらに、その他の医薬活性成分（例えば、消炎成分）又は補助成分（例えば、潤滑成分、担体成分）を含んでいてもよい。医薬活性成分又は補助成分は、天然成分であっても非天然成分であってもよい。

[0041] 飲料の例としては、限定されずに、果汁飲料、清涼飲料、スポーツ飲料、茶飲料（例えば、緑茶などの不発酵茶、ウーロン茶などの半発酵茶、紅茶などの全発酵茶、プーアル茶などの後発酵茶）、発酵飲料（例えば、乳酸飲料、清酒、ワイン、ビール、薬用酒などのアルコール飲料）、スムージー、ミルクセーキなどが挙げられる。

食品は任意の加工食品を包含する。加工食品の例としては、限定されずに、パン、麺類、パスタ、ごはん、菓子類（ケーキ、アイスクリーム、アイスキャンデー、ドーナツ、焼き菓子、キャンデー、飴、氷菓、チューインガム、グミ、錠菓、スナック、米菓、コーンカップ、並びに団子及びまんじゅう等の和菓子）、豆腐及びその加工品、フルーツ缶詰等の農産食品、料理酒、薬用酒、みりん、食酢、醤油、みそ、塩辛、バーモント酢、甘酢らっきょ漬、甘酢生姜、酢レンコン、漬物等の発酵食品、ヨーグルト、ハム、ベーコン、ソーセージ等の畜産食品、かまぼこ、揚げ天、はんぺん、しめ鯖等の水産食品、スープ、ポタージュ、ゼリー、佃煮、ドレッシング、麺つゆ、天ぷらのタレ、カバ焼きのタレ、冷やし中華のタレ、焼肉のタレ、ソース、歯磨

きペースト、さつま揚げ、だし巻き、焼きそばソース、練り製品、味付け海苔、天カス、ふりかけなどが挙げられる。一態様において、加工食品は天然物を原料とするが、天然物とはその特性（例えば、弾力性、粘性、硬度などの物理的特性、味、匂い、食感などの官能的特性）が異なる。別の態様において、加工食品は非天然成分を含む。

実施例

[0042] 以下に本発明に関する実験例、実施例等を記載するが、本発明はこれらの具体的な態様に限定されるものではない。

[0043] (1) 高RebC型系統の個体の単離 (M0世代)

野生型ステビア種子（タイ国での市販品種、2014年8月に導入）約2000個（重量換算）を3つに分けて、各々に対して0.1%、0.2%又は0.3%のエチレンメタンスルホン酸（EMS）処理を行って遺伝子改変を行った。

このEMS処理済み種子及び無処理の種子を、サントリー研究センター内温室にて播種し、EMS処理当代（M0世代）苗および無処理苗を得た。処理濃度間での発芽率差異は見られなかった。

EMS処理当代（M0世代）および無処理個体より適量の新鮮葉をサンプリングし、LC/MS-MS（島津LCMS8050）にて各ステビオール配糖体の濃度を定量した。具体的には、0.25gの新鮮葉をフリーズドライにより乾燥し、破砕物乾物0.05gを純水中に投入した。超音波処理20分にて抽出し、遠心・濾過した後に0.33mlの抽出液を得た。この抽出液をLCMS8050イオンモード（島津LCMS8050）にてLC/MS-MS分析を行ったところ、以下の分析結果が得られた。分析結果を以下の表に示す（表1-1、表1-2）。表中、EMの後の数字が処理濃度を示す（すなわち、EM1=0.1%処理）。

各植物体のスクリーニングの結果、乾燥葉中のレバウジオシドC（RebC）の濃度が5.68～9.96重量%であり、かつ総ステビオール配糖体に占める割合が40%以上のRebC含有系統（高RebC型系統）を複数得た。なお、これら高RebC型系統は共通してRebA生産量が低下していた。（表中「STV」はステビオシドを表す）。

[乾燥葉中の重量濃度]

[表1-1]

○高RebC型系統

乾燥葉中の濃度(%)					
系統番号	Reb A	Reb C	Stevios	Reb F	合計
EM2-14	2.69	7.83	2.11	1.92	13.99
EM2-11	2.06	5.68	1.70	1.00	10.47
EM2-16	4.98	8.66	2.10	1.57	17.35
EM3-4	9.29	9.96	1.73	1.81	22.95

○無処理系統

乾燥葉中の濃度(%)					
系統番号	Reb A	Reb C	Stevios	Reb F	合計
EM0-12	10.37	1.17	8.29	0.38	20.4
EM0-2	13.79	1.26	5.07	0.38	20.78
EM0-3	8.39	1.08	9.01	0.28	19.0

[総ステビオール配糖体中の割合]

[表1-2]

○高RebC型系統

総ステビオール配糖体量占める割合(%)					
系統番号	Reb A	Reb C	Stevios	Reb F	
EM2-14	19.2	56.0	15.1	9.47	
EM2-11	19.7	54.3	16.2	9.55	
EM2-16	28.7	49.9	12.1	9.06	
EM3-4	40.5	43.4	7.5	7.90	

○無処理系統

総ステビオール配糖体量占める割合(%)					
系統番号	Reb A	Reb C	Stevios	Reb F	
EM0-12	51.0	5.75	40.7	1.9	
EM0-2	66.39	6.05	24.38	1.85	
EM0-3	44.3	5.68	47.5	1.5	

[0044] (2) 高RebC型系統の個体の単離 (M1世代)

上記M0世代全個体の自殖により処理第一代 (M1世代) 種子を採種した。3種EMS処理合計で115集団を作製した。

上記M1世代種子をサントリー研究センター内の温室内で播種し、M1世代苗を得た。上記M1世代個体より適量の新鮮葉をサンプリングし、LC/MS-MS (島津LCMS8050) にてステビオール配糖体を定量した。

具体的には、0.25gの新鮮葉をフリーズドライにより乾燥し、破砕物乾物0.05gを純水中に投入した。超音波処理20分にて抽出し、遠心・濾過した後に0.33mlの抽出液を得た。この抽出液をLCMS8050イオンモード（島津LCMS8050）にてLC/MS-MS分析を行ったところ、以下の分析結果が得られた（表2-1、表2-2）。

表中、EMの後の数字は処理濃度を表す（すなわち、EM1=0.1%処理）。

分析結果に基づき、高RebC個体を複数選抜した。

○高RebC型系統

[乾燥葉中の重量濃度]

[表2-1]

系統 番号	乾燥葉中の濃度 (%)				
	RebA	RebC	STV	RebE	合計 TSG
EM3-45-1	0.75	14.40	0.20	3.25	18.60
EM2-15-47	0.33	1.82	0.71	0.37	3.24
EM2-15-33	0.27	1.24	0.46	0.22	2.19
EM2-15-55	0.58	1.81	0.51	0.35	3.25
EM2-15-48	0.37	1.13	0.31	0.24	2.04
EM2-15-38	0.29	0.93	0.31	0.15	1.68
EM3-18-24	2.11	6.26	2.31	1.09	11.75
EM2-15-41	0.80	1.68	0.51	0.34	3.12
EM2-15-9	0.74	1.82	0.59	0.36	3.51
EM2-15-37	0.34	1.30	0.60	0.28	2.49
EM2-15-81	0.42	1.28	0.48	0.30	2.48
EM2-11-87	0.51	2.69	1.52	0.45	5.13
EM2-15-7	0.58	1.32	0.41	0.27	2.58
EM2-11-14	0.87	3.64	2.44	0.66	7.62
EM2-14-11	2.55	5.82	3.70	1.05	13.15
EM2-14-18	1.77	5.56	3.56	0.88	11.78
EM2-14-30	2.84	6.97	4.23	1.21	15.27
EM2-12-48	5.03	14.79	19.42	2.15	32.4
EM2-3-24	5.95	8.63	3.29	1.66	19.90
EM2-3-1	7.26	8.84	3.30	1.84	21.35
EM2-18-12	9.51	13.87	8.37	2.71	34.5
EM2-10-2	5.66	5.43	2.22	1.27	14.90

[総ステビオール配糖体中の割合]

[表2-2]

系統 番号	TSGに占める割合(%)				合計
	RebA	RebC	STV	RebE	
EM2-45-1	4.90	77.91	1.09	17.46	100.00
EM2-15-47	10.26	58.38	21.88	11.42	100.00
EM2-15-33	12.50	58.31	20.93	10.19	100.00
EM2-15-35	19.58	48.44	14.82	10.05	100.00
EM2-15-46	18.07	48.19	14.95	11.62	100.00
EM2-15-35	17.12	48.95	18.14	8.73	100.00
EM2-18-24	17.94	53.26	19.67	9.01	100.00
EM2-15-41	19.40	53.22	16.48	10.79	100.00
EM2-15-8	20.57	48.08	16.19	10.04	100.00
EM2-15-37	13.67	48.96	23.98	10.30	100.00
EM2-15-61	16.89	48.71	19.42	11.90	100.00
EM2-11-87	9.99	49.63	29.54	8.75	100.00
EM2-15-7	21.67	37.58	16.04	10.56	100.00
EM2-11-14	11.36	47.75	22.05	8.60	100.00
EM2-14-11	16.31	47.46	26.80	7.55	100.00
EM2-14-18	15.90	47.20	30.26	7.43	100.00
EM2-14-30	18.62	45.61	27.68	7.94	100.00
EM2-12-48	15.52	45.46	32.14	6.63	100.00
EM2-3-24	29.90	43.38	16.56	9.87	100.00
EM2-3-1	34.02	41.41	15.46	8.62	100.00
EM2-19-12	27.55	40.18	24.24	7.88	100.00
EM2-10-2	33.32	36.43	14.88	8.55	100.00

○低RebC型もしくは通常濃度の系統

[乾燥葉中の重量濃度]

[表3-1]

高級 番号	乾燥薬中の濃度(%)				
	ResA	ResC	STV	ResF	合計 TSG
EM2-4-13	0.00	0.00	15.14	0.00	15.14
EM2-6-32	0.00	0.00	4.63	0.00	4.63
EM2-4-4	0.00	0.00	15.91	0.00	15.91
EM2-4-17	0.02	0.00	17.48	0.00	17.50
EM2-4-88	0.02	0.00	15.47	0.00	15.49
EM2-8-93	0.00	0.00	4.88	0.00	4.87
EM2-8-84	0.02	0.00	8.05	0.00	8.06
EM2-4-9	0.05	0.01	18.90	0.00	18.96
EM1-6-30	0.89	0.13	4.45	0.04	6.34
EM1-6-19	0.76	0.08	1.25	0.02	2.81
EM2-11-7	0.80	0.39	12.21	0.04	13.42
EM2-11-66	0.79	0.43	13.06	0.06	14.34
EM3-3-5	1.66	0.13	1.67	0.03	4.02
EM3-3-19	3.08	0.20	1.90	0.03	5.87
EM1-23-53	2.15	0.11	0.40	0.05	3.12
EM2-18-7	2.19	0.12	0.68	0.05	3.39
EM2-14-43	3.07	0.18	0.23	0.07	4.83
EM1-23-90	0.95	0.06	0.45	0.03	1.89
EM2-14-57	1.74	0.10	0.49	0.04	2.49
EM1-23-38	2.24	0.14	0.68	0.06	3.54
EM1-23-15	2.07	0.19	0.62	0.08	4.56
EM2-1-18	2.88	0.22	1.15	0.19	5.37
EM1-23-31	2.09	0.14	0.81	0.06	3.46
EM1-23-58	1.87	0.14	1.04	0.08	3.50
EM2-32-6	1.61	0.23	2.18	0.07	5.51
EM1-23-46	2.81	0.20	1.23	0.08	4.71
EM2-2-7	7.47	0.79	8.27	0.28	17.86
EM3-39-11	2.97	0.20	0.76	0.09	4.32
EM1-23-62	1.35	0.08	0.14	0.03	1.74
EM2-27-7	7.04	0.89	8.08	0.22	18.19
EM3-45-4	4.88	0.30	0.65	0.11	6.29
EM3-19-41	4.82	0.59	6.17	0.16	12.46
EM2-14-27	18.19	1.00	11.89	0.57	33.65
EM2-18-28	17.94	1.54	10.43	0.57	31.88
EM3-13-18	6.94	0.75	7.81	0.23	15.71
EM1-20-28	11.73	1.02	7.40	0.34	20.80
EM2-14-38	15.49	2.00	22.50	0.51	40.88
EM2-14-37	19.19	1.74	11.86	0.81	34.30
EM2-14-40	18.29	1.61	9.88	0.54	32.04
EM2-19-22	19.26	1.96	19.91	0.43	38.24
EM2-1-49	2.45	0.29	1.87	0.09	5.69
EM2-9-20	10.88	2.05	25.95	0.53	38.75
EM2-4-14	10.79	1.38	13.67	0.32	28.88
EM2-9-28	7.07	0.62	8.72	0.19	11.70
EM2-14-29	12.87	2.01	22.14	0.49	37.84
EM2-14-25	13.83	1.72	15.69	0.46	32.03
EM2-4-5	13.55	1.31	8.89	0.30	24.28
EM2-27-14	8.06	1.06	9.56	0.29	19.09
EM2-4-12	12.75	1.84	13.13	0.36	27.88
EM2-9-02	6.19	0.80	3.17	0.13	10.22
EM2-27-23	10.53	1.07	8.04	0.34	19.02
EM2-8-73	6.06	0.51	2.73	0.14	8.53

[ステビオール配糖体中の割合]

[表3-2]

系統 番号	TSGに占める割合(%)				合計
	RetA	RetC	STV	RebF	
EM2-4-13	0.02	0.00	99.98	0.00	100.00
EM2-5-32	0.04	0.00	99.96	0.00	100.00
EM2-4-4	0.02	0.00	99.98	0.00	100.00
EM2-4-17	0.09	0.01	99.89	0.00	100.00
EM2-4-48	0.10	0.01	99.87	0.00	100.00
EM2-3-53	0.10	0.01	99.88	0.00	100.00
EM2-2-84	0.20	0.02	99.77	0.00	100.00
EM2-4-9	0.26	0.04	99.69	0.01	100.00
EM1-6-30	13.82	2.01	84.16	0.00	100.00
EM1-6-19	26.01	2.89	71.11	0.00	100.00
EM2-11-7	5.88	2.81	91.31	0.00	100.00
EM2-11-66	5.45	3.01	91.54	0.00	100.00
EM3-3-5	11.28	3.22	85.49	0.00	100.00
EM3-3-10	22.43	3.48	74.09	0.00	100.00
EM1-22-53	6.22	3.82	89.96	0.00	100.00
EM2-14-7	6.76	3.85	89.39	0.00	100.00
EM2-14-43	6.76	3.87	89.37	0.00	100.00
EM1-22-50	6.77	3.87	89.36	0.00	100.00
EM2-14-57	6.73	3.90	89.37	0.00	100.00
EM1-22-38	6.09	3.94	89.97	0.00	100.00
EM1-22-15	6.21	3.95	89.84	0.00	100.00
EM2-1-18	6.15	4.03	89.82	0.00	100.00
EM1-22-31	6.27	4.09	89.64	0.00	100.00
EM1-22-56	6.48	4.09	89.43	0.00	100.00
EM2-32-6	7.91	4.09	88.00	0.00	100.00
EM1-22-46	6.43	4.17	89.40	0.00	100.00
EM2-2-7	11.82	4.45	83.73	0.00	100.00
EM3-39-11	6.01	4.50	89.49	0.00	100.00
EM1-22-62	6.25	4.51	89.24	0.00	100.00
EM2-27-7	7.71	4.67	87.62	0.00	100.00
EM3-45-4	7.22	4.71	88.07	0.00	100.00
EM3-19-41	10.51	4.72	84.77	0.00	100.00
EM2-14-27	6.05	4.83	89.12	0.00	100.00
EM2-14-28	6.28	4.84	88.88	0.00	100.00
EM3-19-18	10.75	4.87	84.38	0.00	100.00
EM1-20-26	6.56	4.90	88.54	0.00	100.00
EM2-14-38	10.08	4.82	85.10	0.00	100.00
EM2-14-37	6.29	5.02	88.69	0.00	100.00
EM2-14-40	6.18	5.03	88.79	0.00	100.00
EM2-19-22	11.97	5.06	83.00	0.00	100.00
EM2-1-49	10.00	5.11	84.89	0.00	100.00
EM2-9-20	27.36	5.18	67.46	0.00	100.00
EM2-4-14	11.88	5.28	82.84	0.00	100.00
EM2-2-28	6.43	5.31	88.26	0.00	100.00
EM2-14-29	14.01	5.32	80.67	0.00	100.00
EM2-14-25	13.18	5.28	81.54	0.00	100.00
EM2-4-5	6.81	5.39	87.80	0.00	100.00
EM2-27-14	12.21	5.53	82.26	0.00	100.00
EM2-4-12	15.60	5.89	78.51	0.00	100.00
EM2-2-32	6.59	5.89	87.52	0.00	100.00
EM2-27-23	18.46	5.81	75.73	0.00	100.00
EM2-8-73	6.43	5.95	87.62	0.00	100.00

[0045] (3) 高RebC型系統の個体の単離 (M2世代)

高RebC型系統についてさらにReb0およびRebN濃度を定量した。定量条件は上記と同じである。RebC、Reb0、RebNは共通して、分子内にラムノース残基を有するため、糖の転移に関与する同一の酵素がこれらの含有比率に影響しているのではないかと仮定し、各成分の濃度が比例関係にある場合に本仮説

を支持できると考え実施したものである。

[乾燥葉中の重量濃度]

[表4-1]

		乾燥葉中の濃度(%)							
表頭欄	系統番号	Reb A	Reb C	Steroids	Reb F	Reb N	Reb G	合計	
高RebC型	EM3-45-1	2.1	28.4	0.5	0.5	0.00	0.00	31.5	
高RebC型	EM2-3-24	20.4	14.1	4.0	0.4	0.03	0.00	38.8	
高RebC型	EM2-14-11	18.9	17.1	15.3	0.3	0.02	0.00	49.8	
高RebC型	EM3-16-24	20.2	15.9	8.5	0.3	0.02	0.00	45.0	
高RebC型	EM2-19-12	19.1	17.2	13.8	0.3	0.02	0.00	49.4	
高RebC型	EM2-14-18	20.2	20.4	18.3	0.3	0.02	0.00	60.4	
高RebC型	EM2-14-30	15.0	15.2	15.3	0.3	0.01	0.00	45.1	
高RebC型	EM2-3-1	28.1	14.6	4.5	0.3	0.05	0.00	45.9	
高RebC型	EM2-12-48	12.8	14.4	10.4	0.3	0.04	0.00	37.1	
その他	EM2-3-31	17.2	7.1	1.8	0.2	0.05	0.01	25.2	
その他	EM2-3-26	26.5	19.9	5.2	0.3	0.07	0.01	44.9	
その他	EM2-2-10	35.0	11.1	4.6	0.3	0.10	0.02	51.2	
その他	EM2-3-19	30.0	9.2	4.5	0.2	0.10	0.01	44.4	
その他	EM2-27-1	17.2	5.9	0.6	0.1	0.08	0.03	23.7	
その他	EM2-27-15	19.4	1.7	1.1	0.1	0.14	0.05	22.7	
低RebC型	SR4	50.1	2.9	23.2	0.1	0.06	0.00	75.1	
低RebC型	SR19	59.0	2.3	19.0	0.1	0.18	0.00	71.7	
低RebC型	SR2-102	21.2	0.6	1.1	0.0	0.14	0.00	23.3	
null型	EM1-11	0.0	0.0	94.7	0.0	0.00	0.00	94.8	
null型	EM2-4-4	0.0	0.0	94.7	0.0	0.00	0.00	94.7	
null型	EM2-4-13	0.0	0.0	90.8	0.0	0.00	0.00	90.8	

[総ステビオール配糖体中の割合]

[表4-2]

		ステビオール配糖体における割合(%)					
表頭欄	系統番号	Reb A	Reb C	Steroids	Reb F	Reb N	Reb G
高RebC型	EM2-45-1	8.6	89.9	1.6	1.9	0.0	0.0
高RebC型	EM2-3-24	52.5	36.1	10.3	0.9	0.1	0.0
高RebC型	EM2-14-11	33.6	34.7	11.1	0.5	0.0	0.0
高RebC型	EM3-16-24	43.9	34.6	20.7	0.7	0.0	0.0
高RebC型	EM2-19-12	38.0	34.3	27.0	0.7	0.0	0.0
高RebC型	EM2-14-18	33.5	33.8	22.1	0.6	0.0	0.0
高RebC型	EM2-14-30	32.6	33.0	23.7	0.6	0.0	0.0
高RebC型	EM2-3-1	66.8	32.2	10.1	0.7	0.1	0.0
高RebC型	EM2-12-48	29.5	30.6	39.1	0.5	0.1	0.0
その他	EM2-3-31	65.2	27.0	8.8	0.7	0.2	0.0
その他	EM2-3-26	63.4	24.0	11.7	0.9	0.2	0.0
その他	EM2-2-10	68.2	21.7	9.1	0.3	0.2	0.0
その他	EM2-3-19	67.5	20.6	10.8	0.4	0.2	0.0
その他	EM2-27-1	83.1	12.5	2.1	0.5	0.3	0.1
その他	EM2-27-15	85.6	7.8	4.7	0.2	0.6	0.2
低RebC型	SR4	65.8	3.3	30.9	0.1	0.1	0.0
低RebC型	SR19	82.4	2.5	13.9	0.1	0.2	0.1
低RebC型	SR2-102	90.2	2.4	4.8	0.1	0.8	0.2
null型	EM1-11	0.0	0.1	99.9	0.0	0.0	0.0
null型	EM2-4-4	0.0	0.0	99.9	0.0	0.0	0.0
null型	EM2-4-13	0.0	0.0	100.0	0.0	0.0	0.0

[0046] (4) 高RebC含有植物体の遺伝子多型について

[0047] (5) 高RebC含有植物体に特有の遺伝子多型の検出について

本発明の遺伝子多型の有無を調査したいステビア葉からゲノムDNAを抽出し、抽出したゲノムDNAを鋳型にPCRを行った。PCRはBlend Taq(東洋紡)を使用

しBlend Taqの説明書に従い反応液を作製した。PCRによるDNA断片の増幅にはFwプライマーとして5'-TGGTCACCCCTCTAATCATGCTACCG-3'（配列番号3）とRvとして5'-TTAACTCTCATGATCGATGGCAACCGCACGCGCATTCTTTTCCAAC-3'（配列番号4）を用いてPCRを行った。PCRの条件は95℃ 2分、55℃ 30秒、72℃ 30秒の3段階の反応を35回繰り返した。PCRで増幅したDNA断片は制限酵素（Spe I：東洋紡）で切断した。PCR後の反応液12μLにH buffer 2μL、SpeI 1μL、純水5μLの酵素反応液を作製した。酵素反応液は37℃で16時間静置し酵素反応させた。制限酵素反応後の酵素反応液はLabChip GX Touch HT（Perkin elmer社）を使って行った。微量の酵素反応液をDNA 5k/RNA CZE LabChip上で電気泳動を行い、UVにより移動相内のDNAの含量を検出し疑似的な電気泳動像を作製しマーカーの検出を行った。

[0048] 上記の検出の結果、#8の断片（1412、A>T）を用いると、RebC濃度が非常に高い個体（EM3-45-1、EM3-16-24、EM2-14-11、EM2-14-18、EM2-14-30）において、野生型よりも上側にバンドが検出された。一方、RebC濃度が野生型と同レベルかいくらか高い個体（EM2-14、EM2-11、EM2-16、EM2-14-38、EM3-19-16、EM2-14-27、EM2-2-7、EM2-32-6、EM1-11、EM2-4-4、EM2-4-13）では、野生型と同サイズ又は同程度のサイズのバンドが、ホモ型又はヘテロ型で検出された。

各バンドのポリヌクレオチドについて塩基配列を解析した。EM3-16-24、EM2-14-11、EM2-14-18、EM2-14-30のバンドの塩基配列（ヘテロ接合）を配列番号5に示し、EM-3-45-1のバンドの塩基配列（ホモ接合）を配列番号6に示し、及びEM2-14-38、EM1-11、EM2-2-4のバンドの塩基配列を配列番号7（ホモ接合）に示す。

[0049] 高RebC表現型の株は、全てが共通して配列番号1の塩基配列を有していた。これは対応する野生型の配列（配列番号2）の5'側から60番目の塩基がAからTに変異した多型である。さらに高RebC濃度の表現型と配列番号1の多型との相関関係について統計解析を行ったところ、当該多型は高RebC濃度の表現型と統計学上の相関関係を有することが明らかになった。具体的に

は、高RebC型（ヘテロ型A/T）×低RebC型（野生ホモ型A/A）の後代における分離比は、帰無仮説に基づけば高RebC型：低RebC型＝1：1と推定できる。上記検定交雑より得られた後代22個体のRebC表現型における観測値は高：低＝7：15となったため、期待値は高：低＝11：11となる。分離分析結果について適合度検定を行ったところ、 $\chi^2=2.91$ となり、 $df=1$ 、 $\alpha=0.05$ における棄却域が3.84であるため、観測値（実際の実験結果）と期待値との間には統計的に有意な違いはなく、両者は適合すると判断した。

つまり、検定交雑の結果、高RebC型：低RebC型は1：1に分離したため、マーカー検定結果と表現型は一定の関係にあり、本SNPによってRebC遺伝子型を規定できることが判明した。

以上の結果から、本発明の遺伝子多型の有無について本手順を用いると、RebC濃度が高い個体を遺伝子レベルで検出することが可能であることが判明した。

産業上の利用可能性

[0050] 本発明によってレバウジオシドCがより効率的に提供可能になるので、レバウジオシドCを十分な量含むことによってステビアによる甘味の後引きが改善された医薬品、香料又は飲食品などを提供できる。