

明 細 書

発明の名称：

新規ステビオール配糖体およびその製造方法、ならびにそれを含む甘味料組成物

技術分野

[0001] 本発明は、新規ステビオール配糖体およびその製造方法、ならびにそれを含む甘味料組成物に関する。本発明はさらに、新規ステビオール配糖体を含む飲食品、植物体およびその抽出物、ならびに風味調整剤にも関する。

背景技術

[0002] キク科ステビア(*Stevia rebaudiana*)の葉にはジテルペノイドの一種であるステビオール(*Steviol*)とよばれる二次代謝産物が含まれており、ステビオール配糖体は砂糖の約300倍もの甘味を呈することからカロリーレスの甘味料として食品産業に利用されている。肥満が深刻な社会問題として国際的に発展しており、健康増進および医療費削減の観点からもカロリーレスの甘味料の要望は日々大きくなっている。現在では人工的に合成されたアミノ酸誘導体のアスパルテーム(*Aspartame*)やアセスルファムカリウム(*Acesulfame Potassium*)が人工甘味料として利用されているが、ステビオール配糖体のように天然に存在するカロリーレス甘味料はより安全で消費者理解(*Public Acceptance*)が得られやすいと期待される。

[0003] ステビアの主要なステビオール配糖体は最終的には4つの糖が付いたレバウディオサイドA (*Rebaudioside A*; *Reb. A*)と呼ばれる配糖体にまで糖で修飾される(図1)。その前駆体であるステビオール3糖配糖体のステビオシド(*Stevioside*)が量的に最も多く、これら2つがステビアの甘味の中心的な物質である。ステビオシドは、ステビア葉で最も含有量が多く、砂糖の250~300倍程の甘味を呈することが知られている。*Reb. A*は、甘味が高く(砂糖の350~450倍)、且つ味質が良いとされるステビオール4糖配糖体であり、これらはカロリーレス甘味料として注目されている。これら以外に反応中間体と思われる

る配糖体や糖の種類が異なる類縁体の存在が知られている。例えば、Reb. Aの4つの配糖体糖はすべてグルコースであるが、このうち13位のグルコースの2位にグルコースではなくラムノースが付加されたレバウディオサイドC(Reb. C)や、同位置にキシロースが付加されたレバウディオサイドF(Reb. F)が知られている。

[0004] これまで4つの配糖体糖がすべてグルコースであるReb. Aの味質が良好であるとして、野生型のステビア植物よりもReb. Aの含有量の多いステビア植物を品種改良等によって得ようという試みがなされている（例えば、特許文献1）。また、味質が良好であるレバウディオサイドM（Reb. M（Reb. Xとも称される））などの既知のステビオール配糖体を酸で分解することで、新たなステビオール配糖体を得る試みもなされている（例えば、特許文献2）。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：特許第3436317号公報

特許文献2：国際公開第2014/146135号

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] ステビオール配糖体は骨格となるジテルペン構造に付加する糖分子の数や種類の違いによって甘味度や味質が大きく異なることがあるため、新規なステビオール配糖体が求められている。

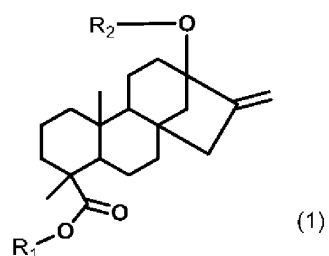
課題を解決するための手段

[0007] 本発明は、次に示す、キシロースを含む新規ステビオール配糖体、これを含む甘味料組成物および飲食品などを提供する。

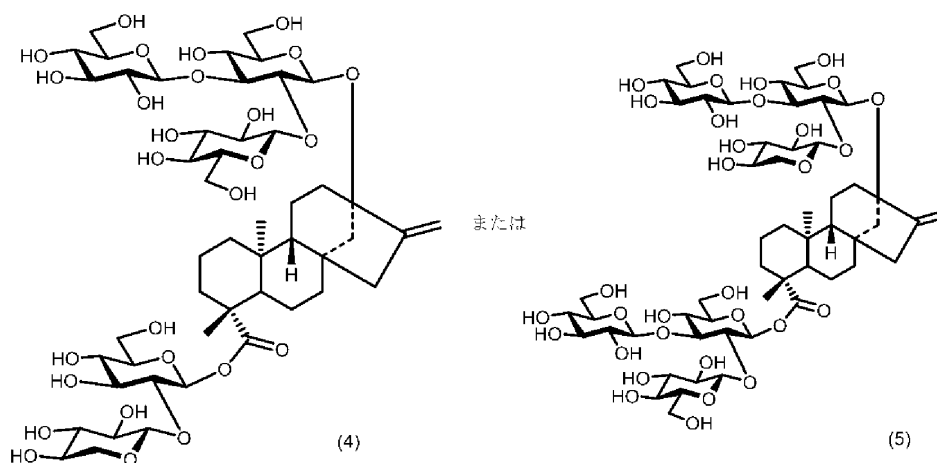
[1]

式(1)：

[化1]



[化3]



で示される [1] または [2] に記載の化合物、またはその塩、もしくは水和物。

[4]

植物由来物、化学合成物、または生合成物である、 [1] ～ [3] のいずれかに記載の化合物。

[5]

[1] ～ [4] のいずれかに記載の化合物を含む、飲食品。

[6]

[1] ～ [4] のいずれかに記載の化合物の含有量が 1 質量 ppm ～ 6 0 0 質量 ppm である、 [5] に記載の飲食品。

[7]

[1] ～ [4] のいずれかに記載の化合物を含む、甘味料組成物。

[8]

[1] ～ [4] のいずれかに記載の化合物の含有量が 1 重量 % ～ 9 9 重量 % である、 [7] に記載の甘味料組成物。

[9]

レバウディオサイド A、レバウディオサイド B、レバウディオサイド C、レバウディオサイド D、レバウディオサイド E、レバウディオサイド F、レ

バウディオサイドI、レバウディオサイドJ、レバウディオサイドK、レバウディオサイドN、レバウディオサイドM、レバウディオサイドO、レバウディオサイドQ、レバウディオサイドR、ズルコサイドA、ズルコサイドC、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およびステビオシドからなる群から選択される一種以上のステビオール配糖体をさらに含む、〔7〕または〔8〕に記載の甘味料組成物。

〔10〕

〔7〕～〔9〕のいずれかに記載の甘味料組成物を含む飲食品。

〔11〕

飲料である、〔10〕に記載の飲食品。

〔12〕

〔1〕～〔3〕のいずれかに記載の化合物の甘味料としての使用。

発明の効果

〔0008〕 本発明によれば、キシロースを含む新規ステビオール配糖体、その製造方法、ならびに新規ステビオール配糖体を含む甘味料組成物、飲食品、植物およびその抽出物、ならびに風味調整剤を提供することができる。本発明の好ましい態様のステビオール配糖体は優れた味質と高い甘味度を有する。本発明の他の態様の甘味料組成物は、優れた味質を有する。

図面の簡単な説明

〔0009〕 〔図1〕ステビオール配糖体の構造と名称を示す図である。

〔図2〕開発品種Aのm/z 1097.4の選択イオンクロマトグラムを示す図である。

〔図3〕開発品種Aのm/z 1259.5の選択イオンクロマトグラムを示す図である。

〔図4〕新規ステビオール配糖体1EのMS/MSおよびMS³断片化マススペクトルを示す図である。

〔図5〕新規ステビオール配糖体2EのMS/MSおよびMS³断片化マススペクトルを示す図である。

〔図6〕化合物15の¹H-NMRスペクトル(400MHz, Pyr-d₅)を示す図である。

〔図7〕化合物15の¹³C-NMRスペクトル(100MHz, Pyr-d₅)を示す図である。

[図8]化合物 1 7 の¹H-NMRスペクトル(400MHz, Pyr-d5)を示す図である。

[図9]化合物 1 7 の¹³C-NMRスペクトル(100MHz, Pyr-d5)を示す図である。

[図10]新規ステビオール配糖体 1 E (ステビア葉抽出物)と化学合成品(化合物 1 5 のβ体)の抽出イオンクロマトグラムを示す図である。

[図11]新規ステビオール配糖体 1 E (ステビア葉抽出物)と化学合成品(化合物 1 5 のβ体)のMS/MSおよびMS³断片化マススペクトルを示す図である。

[図12]新規ステビオール配糖体 2 E (ステビア葉抽出物)と化学合成品(化合物 1 7 のβ体)の抽出イオンクロマトグラムを示す図である。

[図13]新規ステビオール配糖体 2 E (ステビア葉抽出物)と化学合成品(化合物 1 7 のβ体)のMS/MSおよびMS³断片化マススペクトルを示す図である。

[図14]新規ステビオール配糖体 A を、砂糖(sugar)、レバウディオサイド A、レバウディオサイド D およびレバウディオサイド M とを比較した官能評価の結果を示す図である。

[図15]新規ステビオール配糖体 B を、砂糖(sugar)、レバウディオサイド A、レバウディオサイド D およびレバウディオサイド M とを比較した官能評価の結果を示す図である。

[図16]実施例における遺伝的特徴の同定に関して行った発現解析結果を示す図である。

発明を実施するための形態

[0010] 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、本発明をこの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。なお、本明細書において引用した全ての文献、および公開公報、特許公報その他の特許文献は、参照として本明細書に組み込むものとする。また、本明細書は、2019年7月31日に出願された本願優先権主張の基礎となる日本国特許出願(特願2019-141627号)の明細書及び図面に記載の内容を包含する。

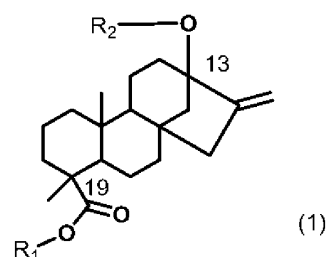
[0011] 本明細書において、「レバウディオサイド」、「Reb」および「Reb.」は同

じ意味を表すものであり、いずれも「rebaudioside」を意味するものである。同様に、本明細書において、「ズルコサイド」は「dulcoside」を意味するものである。

[0012] 1. 新規ステビオール配糖体

本発明者らは、キシロースを含む新規ステビオール配糖体の構造を初めて特定した。本発明の新規ステビオール配糖体（本明細書中、「本発明の配糖体」ともいう）は、式（1）：

[化4]



（式中、

（i） R_1 が、Xyl(1-2)Glc1-を表し、かつ、 R_2 がGlc(1-2)[Glc(1-3)]Glc1-を表すか：（ii） R_1 が、Glc(1-2)[Glc(1-3)]Glc1-を表し、かつ、 R_2 が、Xyl(1-2)[Glc(1-3)]Glc1-を表し、

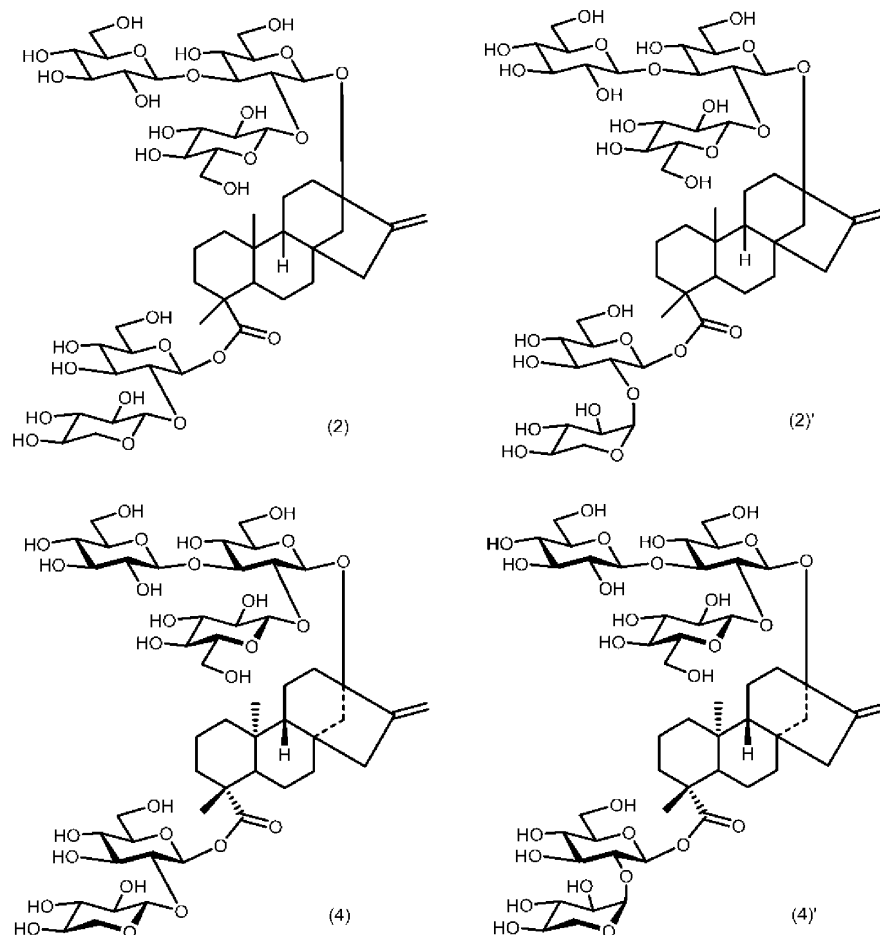
Glcはグルコースを表し、Xylはキシロースを表す）

で示される化合物、またはその塩、もしくは水和物である。なお、糖鎖中のグルコース分子とキシロース分子は、それぞれグルコピラノシルとキシロピラノシルとも称される。

[0013] 本発明の配糖体は、上記のとおり、ステビオールの第13位に3分子のグルコースを含む糖鎖を有し、第19位に1分子のグルコースと1分子のキシロースを有するステビオール配糖体（本明細書中、「本発明の配糖体A」ともいう）と、ステビオールの第13位に2分子のグルコースと1分子のキシロースを含む糖鎖を有し、第19位に3分子のグルコースを含む糖鎖を有するステビオール配糖体（本明細書中、「本発明の配糖体B」ともいう）を包含する。

- [0014] また、上記のとおり、Glcはグルコースを表し、Xylはキシロースを表す。
本明細書において、Glcは α -グルコースまたは β -グルコースであってよく、
Xylは α -キシロースまたは β -キシロースであってよい。あるいは本明細書に
おいて、Glcは α -グルコースおよび β -グルコースであってよく、Xylは α -キ
シロースおよび β -キシロースであってよい。そして、「Glc1-」はグルコー
スの1位の炭素原子がステビオールとグリコシド結合していることを示し、
「Glc(1-3)-Glc1-」は「Glc1-」で示されるグルコースの3位の炭素原子に更
なるグルコースの1位の炭素原子がグリコシド結合していることを示す。ま
た、「Xyl(1-2)-Glc1-」は「Glc1-」で示されるグルコースの2位の炭素原子
にキシロースの1位の炭素原子がグリコシド結合していることを示す。さら
に、「Xyl(1-2)[Glc(1-3)]Glc1-」は、「Glc1-」で示されるグルコースの2
位の炭素原子にキシロースの1位の炭素原子がグリコシド結合し、かつ、「G
lc1-」で示されるグルコースの3位の炭素原子にグルコースの1位の炭素原
子がグリコシド結合していることを示す。
- [0015] 配糖体Aとしては例えば、式(2)、式(2)'、式(4)および式(4
)'で示される構造を有する配糖体が含まれる。

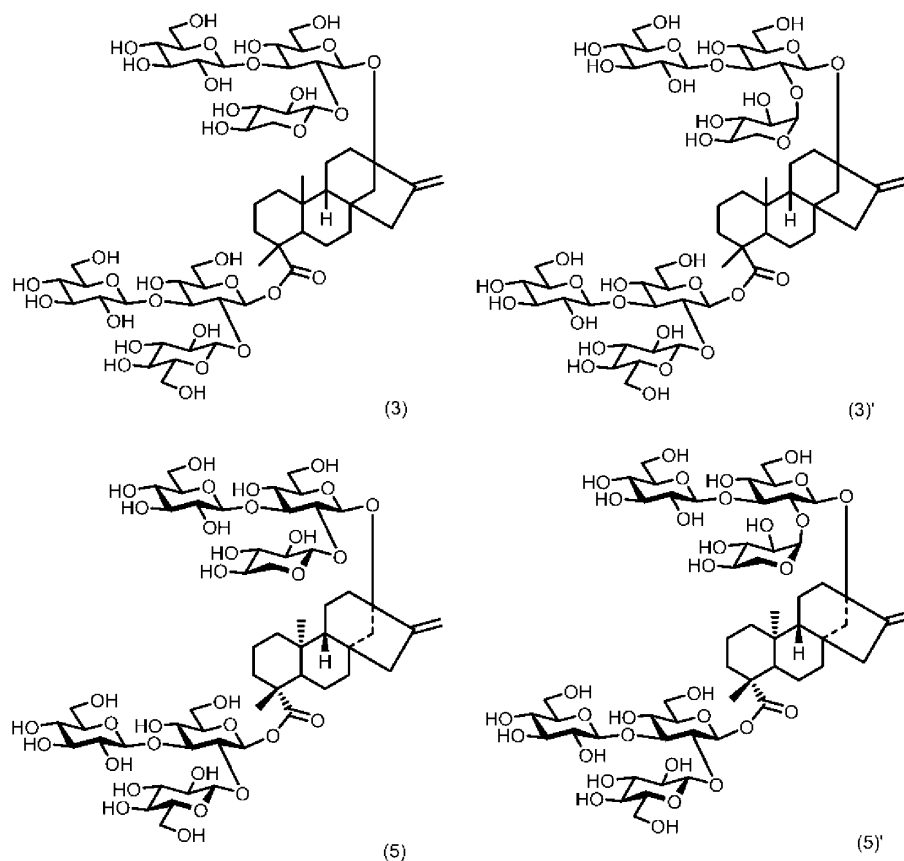
[化5]



式(2)で示される配糖体Aは、ステビオールの19位のカルボキシル基にグルコースが β グルコシド結合しており、そのグルコースにキシロースが β 1-2結合しており、式(2)'で示される配糖体Aは、ステビオールの19位のカルボキシル基にグルコースが β グルコシド結合しており、そのグルコースにキシロースが α 1-2結合している。式(4)と式(4)'は、それぞれ式(2)と式(2)'の配糖体Aの立体配座をさらに特定した構造を示す。

[0016] 配糖体Bとしては例えば、式(3)、式(3)'、式(5)および式(5)'で示される構造を有する配糖体が含まれる。

[化6]



式(3)で示される配糖体Bは、ステビオールの13位のヒドロキシ基にグルコースが β グルコシド結合しており、そのグルコースに他のグルコースが β 1-3結合しており、かつ、キシロースが β 1-2結合している。式(3)'で示される配糖体Bは、ステビオールの13位のヒドロキシ基にグルコースが β グルコシド結合しており、そのグルコースに他のグルコースが β 1-3結合しており、かつ、キシロースが α 1-2結合している。式(5)と式(5)'は、それぞれ式(3)と式(3)'の配糖体Bの立体配座をさらに特定した構造を示す。

[0017] 本発明の配糖体には上記のように α 体や β 体等の異性体も包含される。したがって、本発明の配糖体は α 体のみ、 β 体のみ、または α 体と β 体の混合物のいずれであってもよい。本発明の配糖体は、 β 体の割合が、80%以上

であることが好ましく、90%以上であることがより好ましく、95%以上であることがさらに好ましく、99%以上であることが特に好ましい。なお、 α 体と β 体は高速液体クロマトグラフィー (High Performance Liquid Chromatography: HPLC)、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、単離・精製することができる。

[0018] 本発明の配糖体は、式(1)で示される化合物だけではなく、その誘導体、塩、若しくは水和物であってもよい。本明細書において、「誘導体」とは、化合物中の小部分の構造上の変化があつてできる化合物をいい、例えば、ヒドロキシ基の一部が他の置換基に置換されているような化合物を意味する。したがって、式(1)で示される化合物の誘導体としては、該化合物に含まれるヒドロキシ基の一部が、水素、ハロゲン、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、アリール基、アミノ基、シアノ基などから選択される置換基で置換された化合物を含む。本明細書において、「式(1)の化合物の塩」とは式(1)の化合物の生理学的に許容可能な塩、例えばナトリウム塩、を意味する。また、本明細書について「式(1)の化合物の水和物」とは、式(1)の化合物に水分子が付加された化合物を意味する。

[0019] 本発明の配糖体は、特に限定されないが、植物由来物、化学合成物、または生合成物であってもよい。例えば、本発明の配糖体を多く含む植物体から単離、精製してもよいが、化学合成や生合成によって得てもよい。本発明の配糖体の製造方法の詳細については本明細書において後述する。

[0020] 本発明の配糖体は、砂糖(ショ糖、スクロース)よりも高い甘味を有し、飲食品等に少量含まれるだけで甘みに影響を与えることができる。したがって、本発明の配糖体は新規な甘味料として使用することができる。

[0021] 本発明の好ましい態様の配糖体は、配糖体Aまたは配糖体Bから選択される。配糖体Aは、砂糖よりも高い甘味度を有し、甘味と苦味の後引きが少なく、苦味は砂糖を含めた他の成分に比べ少ない。配糖体Bも、砂糖よりも高

い甘味度を有し、他のステビオール配糖体よりも苦みが弱い。したがって、本発明のステビオール配糖体、後述のように甘味料として様々な用途に好適に使用することができる。

[0022] 2. 新規ステビオール配糖体を含む甘味料組成物

本発明の一態様によれば、式（１）で示される化合物、またはその誘導体、塩、もしくは水和物を含む甘味料組成物（本明細書中、「本発明の甘味料組成物」ともいう）が提供される。本発明の甘味料組成物は、式（１）で示される化合物、またはその誘導体、塩、もしくは水和物を含んでいれば特に限定されず、式（１）で示される化合物、またはその誘導体、塩、もしくは水和物を含む抽出物を含む組成物であってもよい。

[0023] 本発明の甘味料組成物に含まれる本発明の配糖体の量は特に限定されないが、例えば、甘味料組成物の総量に対して、１重量％～９９重量％、５重量％～９５重量％、１０重量％～９０重量％、１５重量％～８５重量％、２０重量％～８０重量％、２５重量％～７５重量％、３０重量％～７０重量％、３５重量％～６５重量％、４０重量％～６０重量％、４５重量％～５５重量％、１重量％～５重量％、１重量％～１０重量％、１重量％～１５重量％、１重量％～２０重量％、１重量％～２５重量％、１重量％～３０重量％、１重量％～３５重量％、１重量％～４０重量％、１重量％～４５重量％または１重量％～５０重量％であってもよい。

[0024] 本発明の甘味料組成物は、さらに他のステビオール配糖体を含んでいてもよい。例えば、本発明の甘味料組成物は、本発明の配糖体に加え、レバウディオサイドＡ、レバウディオサイドＢ、レバウディオサイドＣ、レバウディオサイドＤ、レバウディオサイドＥ、レバウディオサイドＦ、レバウディオサイドＩ、レバウディオサイドＪ、レバウディオサイドＫ、レバウディオサイドＮ、レバウディオサイドＭ、レバウディオサイドＯ、レバウディオサイドＱ、レバウディオサイドＲ、ズルコサイドＡ、ズルコサイドＣ、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およびステビオシドからなる群から選択される一種以上のステビオール配糖体をさら

に含んでいてもよい。

[0025] 他のステビオール配糖体が含まれる場合、本発明の配糖体と他のステビオール配糖体との組成比は、質量比で1 : 99 ~ 99 : 1、5 : 95 ~ 95 : 5、10 : 90 ~ 90 : 10、15 : 85 ~ 85 : 15、20 : 80 ~ 80 : 20、25 : 75 ~ 75 : 25、30 : 70 ~ 70 : 30、35 : 65 ~ 65 : 35、40 : 60 ~ 60 : 40、45 : 65 ~ 65 : 45または50 : 50であってよい。また、本発明の配糖体は、一種類のみ用いてもよく、また複数種類を用いてもよい。

[0026] 本発明の甘味料組成物は、さらにステビオール配糖体以外の甘味料を含んでいてもよい。そのような甘味料としては、果糖、砂糖、果糖ぶどう糖液糖、ぶどう糖、麦芽糖、高果糖液糖、糖アルコール、オリゴ糖、はちみつ、サトウキビ搾汁液（黒糖蜜）、水飴、羅漢果末、羅漢果抽出物、甘草末、甘草抽出物、ソーマトコッカスダニエリ種子末、ソーマトコッカスダニエリ種子抽出物などの天然甘味料や、アセスルファムカリウム、スクラロース、ネオテーム、アスパルテーム、サッカリンなどの人工甘味料などが挙げられる。中でもすっきりさ、飲みやすさ、自然な味わい、適度なコク味の付与の観点から、天然甘味料を用いることが好ましく、特に、果糖、ぶどう糖、麦芽糖、ショ糖、砂糖が好適に用いられる。これら甘味成分は一種類のみ用いてもよく、また複数種類を用いてもよい。

[0027] 本発明の甘味料組成物の製造方法は、上記の組成を有する甘味料組成物が得られれば特に限定されない。本発明の一態様によれば、本発明の甘味料組成物の製造方法であって、本発明の配糖体を得る工程と、前記配糖体と他のステビオール配糖体またはステビオール配糖体以外の甘味料とを混合する工程とを含む製造方法が提供される。本発明の配糖体を得る工程は、植物体からの単離・精製、化学合成または生合成によって行ってもよく、この工程によって得られる本発明の配糖体は、他のステビオール配糖体（例えば、Reb, AやReb, D）との混合物として得られてもよい。

[0028] 3. 新規ステビオール配糖体を含む飲食品、香料及び医薬品

本発明の一態様によれば、式（１）で示される化合物、またはその誘導体、塩、もしくは水和物または本発明の甘味料組成物を含む飲食品、香料及び医薬品（本明細書中それぞれ「本発明の飲食品」、「本発明の香料」及び「本発明の医薬品」ともいう）が提供される。本発明の飲食品、香料及び医薬品は、式（１）で示される化合物、またはその誘導体、塩、もしくは水和物を含んでいれば特に限定されず、式（１）で示される化合物、またはその誘導体、塩、もしくは水和物を含む抽出物や甘味料組成物を含む飲食品、香料及び医薬品であってもよい。ここで飲食品とは、飲料および食品を意味する。したがって、ある実施態様では、本発明は新規な飲料又は食品を提供し、また、当該飲料又は食品の製造方法を提供する。

[0029] 本発明の飲食品、香料及び医薬品に含まれる本発明の配糖体の量は、具体的な飲食品によって異なるが、飲料の場合、おおむね１質量ｐｐｍ～６００質量ｐｐｍであるのが好ましく、例えば、２０質量ｐｐｍ～５５０質量ｐｐｍ、２５質量ｐｐｍ～５５０質量ｐｐｍ、３０質量ｐｐｍ～５５０質量ｐｐｍ、３５質量ｐｐｍ～５５０質量ｐｐｍ、４０質量ｐｐｍ～５５０質量ｐｐｍ、４５質量ｐｐｍ～５５０質量ｐｐｍ、５０質量ｐｐｍ～５５０質量ｐｐｍ、５５質量ｐｐｍ～５５０質量ｐｐｍ、２０質量ｐｐｍ～５４０質量ｐｐｍ、２５質量ｐｐｍ～５４０質量ｐｐｍ、３０質量ｐｐｍ～５４０質量ｐｐｍ、３５質量ｐｐｍ～５４０質量ｐｐｍ、４０質量ｐｐｍ～５４０質量ｐｐｍ、４５質量ｐｐｍ～５４０質量ｐｐｍ、５０質量ｐｐｍ～５４０質量ｐｐｍ、５５質量ｐｐｍ～５４０質量ｐｐｍ、２０質量ｐｐｍ～５３０質量ｐｐｍ、２５質量ｐｐｍ～５３０質量ｐｐｍ、３０質量ｐｐｍ～５３０質量ｐｐｍ、３５質量ｐｐｍ～５３０質量ｐｐｍ、４０質量ｐｐｍ～５３０質量ｐｐｍ、４５質量ｐｐｍ～５３０質量ｐｐｍ、５０質量ｐｐｍ～５３０質量ｐｐｍ、５５質量ｐｐｍ～５３０質量ｐｐｍ、２０質量ｐｐｍ～５２０質量ｐｐｍ、２５質量ｐｐｍ～５２０質量ｐｐｍ、３０質量ｐｐｍ～５２０質量ｐｐｍ、３５質量ｐｐｍ～５２０質量ｐｐｍ、４０質量ｐｐｍ～５２０質量ｐｐｍ、４５質量ｐｐｍ～５２０質量ｐｐｍ、５０質量ｐｐｍ～５２０質量ｐｐ

m、55質量ppm～520質量ppm、20質量ppm～510質量ppm、25質量ppm～510質量ppm、30質量ppm～510質量ppm、35質量ppm～510質量ppm、40質量ppm～510質量ppm、45質量ppm～510質量ppm、50質量ppm～510質量ppm、55質量ppm～510質量ppm、20質量ppm～505質量ppm、25質量ppm～505質量ppm、30質量ppm～505質量ppm、35質量ppm～505質量ppm、40質量ppm～505質量ppm、45質量ppm～505質量ppm、50質量ppm～505質量ppm、55質量ppm～505質量ppm、20質量ppm～500質量ppm、25質量ppm～500質量ppm、30質量ppm～500質量ppm、35質量ppm～500質量ppm、40質量ppm～500質量ppm、45質量ppm～500質量ppm、50質量ppm～500質量ppm、55質量ppm～500質量ppm、20質量ppm～495質量ppm、25質量ppm～495質量ppm、30質量ppm～495質量ppm、35質量ppm～495質量ppm、40質量ppm～495質量ppm、45質量ppm～495質量ppm、50質量ppm～495質量ppm、55質量ppm～495質量ppm、20質量ppm～490質量ppm、25質量ppm～490質量ppm、30質量ppm～490質量ppm、35質量ppm～490質量ppm、40質量ppm～490質量ppm、45質量ppm～490質量ppm、50質量ppm～490質量ppm、55質量ppm～490質量ppm、100質量ppm～400質量ppm、150質量ppm～400質量ppm、200質量ppm～400質量ppm、250質量ppm～400質量ppm、300質量ppm～400質量ppm、100質量ppm～150質量ppm、100質量ppm～200質量ppm、100質量ppm～250質量ppmまたは100質量ppm～300質量ppmであってもよい。含有量をこの範囲とすることで適度な甘みを付与することができるという利点がある。含有量をこの範囲とすることで後引きを抑えることができるという利点がある。本明細書におい

て「ppm」とは、特に明記しない限り、「質量ppm」を意味する。

[0030] 本発明の飲食品、香料及び医薬品は、さらに他のステビオール配糖体を含んでいてもよい。例えば、本発明の甘味料組成物は、本発明の配糖体に加え、レバウディオサイドA、レバウディオサイドB、レバウディオサイドC、レバウディオサイドD、レバウディオサイドE、レバウディオサイドF、レバウディオサイドI、レバウディオサイドJ、レバウディオサイドK、レバウディオサイドN、レバウディオサイドM、レバウディオサイドO、レバウディオサイドQ、レバウディオサイドR、ズルコサイドA、ズルコサイドC、ルブソシド、ステビオール、ステビオールモノシド、ステビオールビオシドおよびステビオシドからなる群から選択される一種以上のステビオール配糖体をさらに含んでいてもよい。

[0031] 他のステビオール配糖体が含まれる場合、本発明の配糖体と他のステビオール配糖体との組成比は、質量比で1：99～99：1、5：99～95：5、10：90～90：10、15：85～85：15、20：80～80：20、25：75～75：25、30：70～70：30、35：65～65：35、40：60～60：40、45：65～65：45または50：50であってよい。

[0032] 本発明の飲食品、香料及び医薬品は、さらにステビオール配糖体以外の甘味料を含んでいてもよい。そのような甘味料としては、果糖、砂糖、果糖ぶどう糖液糖、ぶどう糖、麦芽糖、シヨ糖、高果糖液糖、糖アルコール、オリゴ糖、はちみつ、サトウキビ搾汁液（黒糖蜜）、水飴、羅漢果末、羅漢果抽出物、甘草末、甘草抽出物、ソーマトコッカスダニエリ種子末、ソーマトコッカスダニエリ種子抽出物などの天然甘味料や、アセスルファムカリウム、スクラロース、ネオテーム、アスパルテーム、サッカリンなどの人工甘味料などが挙げられる。中でもすっきりさ、飲みやすさ、自然な味わい、適度なコク味の付与の観点から、天然甘味料を用いることが好ましく、特に、果糖、ぶどう糖、麦芽糖、シヨ糖、砂糖が好適に用いられる。これら甘味成分は一種のみ用いてもよく、また複数種類を用いてもよい。

- [0033] 本発明の食品の例としては、特に限定されるものではないが、食品としては、製菓、製パン類、穀粉、麺類、飯類、農産・林産加工食品、畜産加工品、水産加工品、乳・乳製品、油脂・油脂加工品、調味料またはその他の食品素材等が挙げられる。
- [0034] 本発明の飲料の例としては、特に限定されるものではないが、例えば炭酸飲料、非炭酸飲料、アルコール飲料、非アルコール飲料、ビールやノンアルコールビール等のビールテイスト飲料、コーヒー飲料、茶飲料、ココア飲料、栄養飲料、機能性飲料などが挙げられる。
- [0035] 本発明の飲料は、加熱殺菌をされ、容器に詰められた状態の容器詰飲料として調製してもよい。容器としては、特に限定されず、例えば、PETボトル、アルミ缶、スチール缶、紙パック、チルドカップ、瓶などを挙げることができる。加熱殺菌を行う場合、その種類は特に限定されず、例えばUHT殺菌およびレトルト殺菌等の通常の手法を用いて行うことができる。加熱殺菌工程の温度は特に限定されないが、例えば65～130℃、好ましくは85～120℃で、10～40分である。ただし、上記の条件と同等の殺菌価が得られれば適当な温度で数秒、例えば5～30秒での殺菌でも問題はない。
- [0036] 本発明の飲食品、香料及び医薬品の製造方法は、上記の成分を有する飲食品、香料及び医薬品が得られれば特に限定されない。本発明の一態様によれば、本発明の飲食品、香料及び医薬品の製造方法であって、本発明の抽出物、配糖体または甘味料組成物を得る工程と、前記抽出物、配糖体または甘味料組成物を飲食品、香料及び医薬品又はその原料に添加する工程とを含む製造方法が提供される。本発明の配糖体または甘味料組成物を得る工程は、「2. 新規ステビオール配糖体を含む甘味料組成物」に、本発明の抽出物を得る工程は、「4. 新規ステビオール配糖体を含むステビア植物体およびその抽出物」に、それぞれ記載のとおりである。本発明の抽出物、配糖体または甘味料組成物を飲食品、香料及び医薬品又はその原料に添加する工程は飲食品、香料及び医薬品の製造工程の任意の工程で行うことができ、例えば、飲

食品、香料及び医薬品の原料を混合する際や、飲食品、香料及び医薬品の味の最終調整の際に行ってもよい。

[0037] 4. 新規ステビオール配糖体を含むステビア植物体およびその抽出物

本発明の一態様によれば、式（１）で示される化合物、またはその誘導体、塩、もしくは水和物を含むを含むステビア植物体およびその抽出物（本明細書中、「本発明の植物体およびその抽出物」ともいう）が提供される。また本発明の他の一態様によれば、本発明の植物体またはその抽出物を含む、飲食品、香料及び医薬品、好ましくは飲料、が提供される。本発明の植物体に含まれる本発明の配糖体の量は、特に限定されないが、乾燥葉中に０．００１重量％～１．０００重量％、０．００５重量％～０．９５０重量％、０．００８重量％～０．９００重量％、０．０１０重量％～０．８５０重量％、０．０１５重量％～０．８００重量％であってもよい。

[0038] 本発明の一態様において、本発明の植物体は、以下の（１）～（８）の少なくとも１つの遺伝的特徴を有する。

（１）配列番号１の２９８位、配列番号３の１１位、配列番号５の２１位または配列番号７の２６位に相当する位置の塩基がＴであるアレルについてホモ接合性またはヘテロ接合性である。

（２）配列番号１の３２８位、配列番号９の１１位、配列番号１１の２１位、配列番号１３の２６位に相当する位置の塩基がＣであるアレルについてホモ接合性またはヘテロ接合性である。

（３）配列番号１の３６０位、配列番号１５の１１位、配列番号１７の２１位、配列番号１９の２６位に相当する位置の塩基がＴであるアレルについてホモ接合性またはヘテロ接合性である。

（４）配列番号１の３８６位、配列番号２１の１１位、配列番号２３の２１位、配列番号２５の２６位に相当する位置の塩基がＴであるアレルについてホモ接合性またはヘテロ接合性である。

（５）配列番号１の３９３位、配列番号２７の１１位、配列番号２９の１８位、配列番号３１の２３位に相当する位置の塩基がＴであるアレルについて

ホモ接合性またはヘテロ接合性である。

(6) 配列番号1の411位、配列番号33の11位、配列番号35の18位、配列番号37の23位に相当する位置の塩基がTであるアレルについてホモ接合性またはヘテロ接合性である。

(7) 配列番号1の427位、配列番号39の11位、配列番号41の18位、配列番号43の23位に相当する位置の塩基がCであるアレルについてホモ接合性またはヘテロ接合性である。

(8) 配列番号1の453位、配列番号45の11位、配列番号47の18位、配列番号49の23位に相当する位置の塩基がTであるアレルについてホモ接合性またはヘテロ接合性である。

[0039] 本発明の他の態様において、本発明の植物体は、遺伝的特徴(1)～(8)の少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも6つ、少なくとも7つまたは8つ全ての遺伝的特徴を有する。

[0040] 「～に相当する位置(又は部分)」とは、ゲノム中に基準配列(例えば、配列番号1など)と同一の配列が存在する場合は、ゲノム中に存在するその配列中の位置又は部分(例えば、298位、328位、360位、386位、393位、411位、427位および453位など)を意味し、ゲノム中に基準配列と同一の配列が存在しない場合は、ゲノム中の基準配列に相当する配列中の、基準配列中の位置又は部分に相当する位置又は部分を意味する。ゲノム中に基準配列と同一又はそれに相当する配列が存在するかどうかは、例えば、基準配列をPCRで増幅し得るプライマーで、対象となるステビア植物体のゲノムDNAを増幅し、増幅産物のシーケンシングを行い、得られた配列と基準配列とのアラインメント解析を行うことで決定することができる。基準配列に相当する配列の非限定例としては、例えば、基準配列に対し60%以上、70%以上、75%以上、80%以上、81%以上、82%以上、83%以上、84%以上、85%以上、86%以上、87%以上、88%以上、89%以上、90%以上、91%以上、92%以上、93%以上、94%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、98.

1%以上、98.4%以上、98.7%以上、99%以上、99.2%以上、99.5%以上又は99.8%以上の配列同一性を有する塩基配列が挙げられる。ゲノム中の基準配列に相当する配列中の、基準配列中の位置又は部分に相当する位置又は部分は、基準配列中の位置又は部分の前後の塩基配列等を考慮して決定することができる。例えば、基準配列とゲノム中の基準配列に相当する配列とのアライメント解析により、ゲノム中の基準配列に相当する配列中の、基準配列中の位置又は部分に相当する位置又は部分を決定することができる。

[0041] 例えば、本発明の遺伝的特徴(1)の「配列番号1の298位に相当する位置」を例にとると、ステビア植物体のゲノムが配列番号1と同一の塩基配列からなる部分を有している場合、「配列番号1の298位に相当する位置」はゲノム中の配列番号1と同一の塩基配列からなる部分の5'側から298位である。一方、ステビア植物体のゲノムが配列番号1と同一ではないがこれに相当する塩基配列からなる部分を有している場合、ゲノムは配列番号1と同一の塩基配列からなる部分を有しないため、「配列番号1の298位に相当する位置」は、必ずしも配列番号1に相当する部分の5'側から298位に該当するわけではないが、配列番号1の298位の前後の塩基配列等を考慮し、かかるステビア植物体のゲノムにおける「配列番号1の298位に相当する位置」を特定することができる。例えば、ステビア植物体のゲノムにおける配列番号1に相当する部分の塩基配列と、配列番号1の塩基配列とのアライメント解析により、ステビア植物体のゲノムにおける「配列番号1の298位に相当する位置」を特定することができる。

[0042] 上記の遺伝的特徴は、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、RAD (random amplified polymorphic DNA) 法、制限酵素断片長多型 (RFLP) 法、PCR-SSCP法、AFLP (amplified fragment length polymorphism) 法、SSLP (simple sequence length polymorphism) 法、CAPS (cleaved amplified polymorphic sequence) 法、dCAPS (derived cleaved amplified polymorphi

c sequence) 法、アレル特異的オリゴヌクレオチド (ASO) 法、ARMS 法、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動 (DGGE) 法、CCM (chemical cleavage of mismatch) 法、DOL 法、MALDI-TOF/MS 法、TDI 法、パドロックプローブ法、分子ビーコン法、DASH (dynamic allele specific hybridization) 法、UCAN 法、ECA 法、PINPOINT 法、PROBE (primer oligo base extension) 法、VSET (very short extension) 法、Survivor assay、Sniper assay、Luminex assay、GOOD 法、LCx 法、SNAPSHOT 法、Mass ARRAY 法、パイロシーケンス法、SNP-IT 法、融解曲線分析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。

[0043] 特定の態様において、「配列番号 1 に相当する塩基配列からなる部分」には、例えば、配列番号 51 の塩基配列を含むフォワードプライマーと、配列番号 52 の塩基配列を含むリバースプライマーとを用いた PCR により増幅され得るステビア植物体のゲノムの部分が含まれる。

[0044] 特定の態様において、「配列番号 1 の 298 位に相当する位置の塩基が T であるアレル」は、配列番号 4、6 または 8 の塩基配列を含む。

特定の態様において、「配列番号 1 の 328 位に相当する位置の塩基が C であるアレル」は、配列番号 10、12 または 14 の塩基配列を含む。

特定の態様において、「配列番号 1 の 360 位に相当する位置の塩基が T であるアレル」は、配列番号 16、18 または 20 の塩基配列を含む。

特定の態様において、「配列番号 1 の 386 位に相当する位置の塩基が T であるアレル」は、配列番号 22、24 または 26 の塩基配列を含む。

特定の態様において、「配列番号 1 の 393 位に相当する位置の塩基が T であるアレル」は、配列番号 28、30 または 32 の塩基配列を含む。

特定の態様において、「配列番号 1 の 411 位に相当する位置の塩基が T であるアレル」は、配列番号 34、36 または 38 の塩基配列を含む。

特定の態様において、「配列番号 1 の 427 位に相当する位置の塩基が C であるアレル」は、配列番号 40、42 または 44 の塩基配列を含む。

特定の態様において、「配列番号1の453位に相当する位置の塩基がTであるアレル」は、配列番号46、48または50の塩基配列を含む。

[0045] 本発明の植物体の作出方法は、特に限定されないが、交雑や、ステビア植物体のゲノムに、本発明の変異を導入することで作出することも可能である。変異の導入は、遺伝子組換え的手法により行っても、非遺伝子組換え的手法により行ってもよい。「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（又は宿主植物体）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、エチルメタンスルホン酸（EMS）及びアジ化ナトリウム等が挙げられる。例えば、エチルメタンスルホン酸（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、吸水過程を経た吸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。

[0046] 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。

[0047] また、「葉に含まれる総ステビオール配糖体量に対して0.050重量%以上である」とは本発明のステビア植物体の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本発明の配糖体が0.050重量%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、レバウディオサイドA、レバウディオサイドB、レバウディオサイドC、レバウディオサイドD、レバウディオサイドE、レバウディオサイドF、レバウディオサイドG、レバウディオサイドI、レバウディオサイドM、レバウディオサイドN、ステビオシド、ズルコサイドA、ステビオールピオシドおよびルブソシド、ならびに新規ステビオール配糖体（新規ステビオール配糖体Aおよび／または新規ステビオール配糖体B）からなる。本発明のステビア植物体は、葉に含まれる新規ステビオール配糖体Aまたは新規ステビオール配糖体Bの含有量が、総ステビオール配糖体量に対して0.055重量%以上、0.060重量%以上、0.065重量%以上、0.070重量%以上、0.075重量%以上、0.080重量%以上、0.085重量%以上、0.090重量%以上、0.095重量%以上、0.10重量%以上、0.15重量%以上、0.20重量%以上、0.30重量%以上、0.50重量%以上、0.60重量%以上、0.80重量%以上、1.00重量%以上、2.00重量%以上、4.00重量%以上、6.00重量%以上、8.00重量%以上、10.00重量%以上の量であってよく、かつ、10.00重量%以下、8.00重量%以下、6.00重量%以下、4.00重量%以下、2.00重量%以下、1.00重量%以下、0.80重量%以下、0.60重量%以下、0.30重量%以下であってもよい。

[0048] あるいは、本発明のステビア植物体は、葉に含まれる新規ステビオール配糖体Aまたは新規ステビオール配糖体Bの含有量が、葉に含まれるレバウディオサイドA、レバウディオサイドB、レバウディオサイドC、レバウディオ

オサイドD、レバウディオサイドF、レバウディオサイドN、レバウディオサイドMおよびステビオシドの合計含有量に対して、0.050重量%以上、0.055重量%以上、0.060重量%以上、0.065重量%以上、0.070重量%以上、0.075重量%以上、0.080重量%以上、0.085重量%以上、0.090重量%以上、0.095重量%以上、0.10重量%以上、0.15重量%以上、0.20重量%以上、0.30重量%以上、0.50重量%以上、0.60重量%以上、0.80重量%以上、1.00重量%以上、2.00重量%以上、4.00重量%以上、6.00重量%以上、8.00重量%以上、10.00重量%以上の量であってよく、かつ、10.00重量%以下、8.00重量%以下、6.00重量%以下、4.00重量%以下、2.00重量%以下、1.00重量%以下、0.80重量%以下、0.60重量%以下、0.30重量%以下であってもよい。

[0049] ここで本発明の植物体の乾燥葉とは、本発明の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。

[0050] 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、花卉、莖、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。

[0051] 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、花卉、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。

- [0052] 本発明の植物体の抽出物は、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、エーテルおよ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。抽出条件等は国際公開2016/090460号に記載の方法や、後述の実施例に記載の方法を参照することができる。
- [0053] 本発明の植物体の抽出物は、総ステビオール配糖体量に対して0.050重量%以上の本発明の配糖体を含むことが好ましい。本発明の他の態様において、本発明の配糖体の含有量は、総ステビオール配糖体量に対して0.055重量%以上、0.060重量%以上、0.065重量%以上、0.070重量%以上、0.075重量%以上、0.080重量%以上、0.085重量%以上、0.090重量%以上、0.095重量%以上、0.10重量%以上、0.15重量%以上、0.20重量%以上、0.30重量%以上、0.50重量%以上、0.60重量%以上、0.80重量%以上、1.00重量%以上、2.00重量%以上、4.00重量%以上、6.00重量%以上、8.00重量%以上、10.00重量%以上の量であってよく、かつ、10.00重量%以下、8.00重量%以下、6.00重量%以下、4.00重量%以下、2.00重量%以下、1.00重量%以下、0.80重量%以下、0.60重量%以下、0.30重量%以下であってもよい。
- [0054] あるいは、本発明の植物体の抽出物は、新規ステビオール配糖体Aまたは新規ステビオール配糖体Bの含有量が、レバウディオサイドA、レバウディオサイドB、レバウディオサイドC、レバウディオサイドD、レバウディオサイドF、レバウディオサイドN、レバウディオサイドMおよびステビオシドの合計含有量に対して、0.050重量%以上、0.055重量%以上、0.060重量%以上、0.065重量%以上、0.070重量%以上、0.075重量%以上、0.080重量%以上、0.085重量%以上、0.090重量%以上、0.095重量%以上、0.10重量%以上、0.15重量%以上、0.20重量%以上、0.30重量%以上、0.50重量%以上、0.60重量%以上、0.80重量%以上、1.00重量%以上、2.

00重量%以上、4.00重量%以上、6.00重量%以上、8.00重量%以上、10.00重量%以上の量であってよく、かつ、10.00重量%以下、8.00重量%以下、6.00重量%以下、4.00重量%以下、2.00重量%以下、1.00重量%以下、0.80重量%以下、0.60重量%以下、0.30重量%以下であってもよい。

[0055] 本発明の一態様において、本発明の植物体の抽出物を含む飲食品が提供される。さらに本発明の他の態様において、飲食品は飲料である。飲食品の種類としては、「3. 新規ステビオール配糖体を含む飲食品」に記載のものが挙げられる。

[0056] 5. 新規ステビオール配糖体を含む風味調整剤

本発明の一態様によれば、上記式(1)で示される化合物またはその誘導体、塩、もしくは水和物を含む風味調整剤が提供される。本発明の一態様において、「2. 新規ステビオール配糖体を含む甘味料組成物」に記載の組成を有する組成物を風味調整剤として使用することもできる。

[0057] 本明細書において、「風味調整剤」とは、飲食品に添加された場合に、その飲食品の風味を調整する物質のことをいう。本発明の風味調整剤は、好ましくは、飲食品に添加された際に、風味調整剤自体の味を消費者が認識することなく、その飲食品自体の風味を調整することができる。例えば、本発明のステビオール配糖体は、従来のステビオール配糖体に比べて苦味が弱いという特徴を有するため、風味調整剤として使用することで飲食品の苦味を調整することができる。

[0058] 本発明の風味調整剤は、上記式(1)で示される化合物またはその誘導体、塩、もしくは水和物に加え、一種以上の他の甘味料を含んでいることが好ましい。そのような甘味料としては、レバウディオサイドA、レバウディオサイドB、レバウディオサイドC、レバウディオサイドD、レバウディオサイドE、レバウディオサイドF、レバウディオサイドI、レバウディオサイドJ、レバウディオサイドK、レバウディオサイドN、レバウディオサイドM、レバウディオサイドO、レバウディオサイドQ、レバウディオサイドR

、ズルコサイドA、ズルコサイドC、ルブソシド、ステビオール、ステビオールモノシド、ステビオールビオシドおよびステビオシドからなる群から選択される一種以上のステビオール配糖体や、果糖、砂糖、果糖ぶどう糖液糖、ぶどう糖、麦芽糖、ショ糖、高果糖液糖、糖アルコール、オリゴ糖、はちみつ、サトウキビ搾汁液（黒糖蜜）、水飴、羅漢果末、羅漢果抽出物、甘草末、甘草抽出物、ソーマトコッカスダニエリ種子末、ソーマトコッカスダニエリ種子抽出物などの天然甘味料や、アセスルファムカリウム、スクラロース、ネオテーム、アスパルテーム、サッカリンなどの人工甘味料などが挙げられる。

[0059] 6. 新規ステビオール配糖体の製造方法

上述のとおり、本発明のステビオール配糖体は、（A）植物体からの単離・精製、（B）化学合成、または（C）生合成によって製造することができる。それぞれについて以下に説明する。

[0060] （A）植物体からの単離・精製

新規ステビオール配糖体を含む植物体は、例えば、上記の遺伝的特徴を有する植物体を公知の任意のスクリーニング方法を用いて入手することができる。そして、該植物体から新規ステビオール配糖体を単離・精製することができる。新規ステビオール配糖体は、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、エーテルおよ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。抽出条件等は国際公開第2016/090460号に記載の方法や、後述の実施例に記載の方法を参照することができる。

[0061] 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）、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新規ステビオール配糖体を単離・精製することができる。

[0062] 植物体中の新規ステビオール配糖体含有量は、国際公開2016/090

460号に記載の方法や、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。

[0063] (2) 化学合成

本発明のステビオール配糖体は、例えば、国際公開第2018/181515号に記載の公知の化学合成法によって合成することができる。より具体的には、本発明のステビオール配糖体は、後述の実施例に記載の方法によって製造することができる。

[0064] (3) 生合成

本発明のステビオール配糖体は、配糖化酵素などの所定のタンパク質をコードするポリヌクレオチドを、細菌、植物、昆虫、ヒトを除く哺乳動物などに由来する宿主細胞に導入して、ステビオールやステビオール配糖体、UDP-グルコースおよび/またはUDP-キシロースを基質として生成することもできる。基質であるステビオール、ステビオール配糖体、UDP-グルコース、UDP-キシロースは、与えてもよいし、細胞内で生合成させてもよい。

[0065] 所定のタンパク質をコードするポリヌクレオチドは、好ましくは、適切な発現ベクターに挿入された状態で宿主に導入される。そのようなポリヌクレオチドは、個々に別のベクターに挿入されてもよい。

[0066] 適切な発現ベクターは、通常、

- (i) 宿主細胞内で転写可能なプロモーター；
- (ii) 該プロモーターに結合した、本発明のポリヌクレオチド；および
- (iii) RNA分子の転写終結およびポリアダニル化に関し、宿主細胞内で機能するシグナルを構成要素として含む発現カセットを含むように構成される。

[0067] 発現ベクターの作製方法としては、プラスミド、ファージまたはコスミドなどを用いる方法、あるいは必要な構成要素を有するDNA分子が挙げられるが特に限定されない。

[0068] ベクターの具体的な種類は特に限定されず、宿主細胞中で発現可能なベク

ターが適宜選択され得る。すなわち、宿主細胞の種類に応じて、確実に本発明のポリヌクレオチドを発現させるために適宜プロモーター配列を選択し、これと本発明のポリヌクレオチドを各種プラスミド等に組み込んだベクターを発現ベクターとして用いればよい。

[0069] 発現ベクターは、導入されるべき宿主の種類に依存して、発現制御領域（例えば、プロモーター、ターミネーターおよび／または複製起点等）を含有する。細菌用発現ベクターのプロモーターとしては、慣用的なプロモーター（例えば、*t r c* プロモーター、*t a c* プロモーター、*l a c* プロモーター等）が使用され、酵母用プロモーターとしては、例えば、グリセルアルデヒド3リン酸デヒドロゲナーゼプロモーター、*P H O 5* プロモーター、*G A L 1 / 1 0* プロモーター等が挙げられ、糸状菌用プロモーターとしては、例えば、アミラーゼ、*t r p C* 等が挙げられる。また、植物細胞内で目的遺伝子を発現させるためのプロモーターの例としては、カリフラワーモザイクウィルスの35S RNAプロモーター、*r d 2 9 A* 遺伝子プロモーター、*r b c S* プロモーター、前記カリフラワーモザイクウィルスの35S RNAプロモーターのエンハンサー配列をアグロバクテリウム由来のマノピン合成酵素プロモーター配列の5'側に付加した*m a c - 1* プロモーター等が挙げられる。動物細胞宿主用プロモーターとしては、ウイルス性プロモーター（例えば、SV40初期プロモーター、SV40後期プロモーター等）が挙げられる。外的な刺激によって誘導性に活性化されるプロモーターの例としては、mouse mammary tumor virus (MMTV) プロモーター、テトラサイクリン応答性プロモーター、メタロチオネインプロモーターおよびヒートショックプロテインプロモーター等が挙げられる。

発現ベクターは、少なくとも1つの選択マーカーを含むことが好ましい。このようなマーカーとしては、栄養要求性マーカー（*LEU2*、*URA3*、*HIS3*、*TRP 1*、*u r a 5*、*n i a D*）、薬剤耐性マーカー（ハイグロマイシン、ゼオシン）、ジェネチシン耐性遺伝子（*G 4 1 8 r*）、銅耐性遺伝子（*C U P 1*）（*M a r i n e t a l . , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U*

SA, vol. 81, p. 337, 1984)、セルレニン耐性遺伝子 (fas2m、PDR4) (それぞれ、猪腰淳嗣ら、生化学, vol. 64, p. 660, 1992; Hussain et al., Gene, vol. 101, p. 149, 1991) などが利用可能である。

[0070] 宿主細胞の形質転換方法としては一般に用いられる公知の方法が利用できる。例えば、エレクトロポレーション法 (Mackenzie, D. A. et al., Appl. Environ. Microbiol., vol. 66, p. 4655-4661, 2000)、パーティクルデリバリー法 (特開2005-287403)、スフェロプラスト法 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 75, p. 1929, 1978)、酢酸リチウム法 (J. Bacteriology, vol. 153, p. 163, 1983)、Methods in yeast genetics, 2000 Edition: A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manualなどに記載の方法) で実施可能であるが、これらに限定されない。

[0071] その他、一般的な分子生物学的な手法に関しては、"Sambrook & Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual Vol. 3, Cold Spring Harbor Laboratory Press 2001"、"Methods in Yeast Genetics, A laboratory manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY)"等を参照することができる。

[0072] このようにして得られた非ヒト形質転換体を培養することにより、非ヒト形質転換体にステビオール配糖体を生産させることが可能である。このような非ヒト形質転換体は、好ましくは酵母である。また、非ヒト形質転換体の培養は、ステビオールを含む培地で行うことが好ましい。蓄積されたステビオール配糖体を抽出・精製することにより、本発明のステビオール配糖体を得ることができる。

実施例

[0073] 以下、本発明を実施例により詳細に説明するが、本発明の内容がこれにより限定されるものではない。

[0074] [新規ステビオール配糖体の単離]

サントリーグローバルイノベーションセンター株式会社(SIC)で開発した、

2系統の新規ステビア植物体(開発品種A (EM3-4) および開発品種B (EM2-27-15))を用意した。これらの開発品種は以下のようにして得た。まず、市販ステビア種子を播種、育苗し、得られた種子に対して0.2% (開発品種B) 又は0.3% (開発品種A) のエチルメタンスルホン酸 (EMS) 処理による遺伝子改変を行った。EMS処理済み種子を、サントリーワールドリサーチセンター内温室で播種し、EMS処理当代 (M0世代) 苗を得た。処理濃度間での発芽率差異は見られなかった。開発品種Aは、このM0世代の個体に由来する。さらに、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、サントリーワールドリサーチセンター内の温室内で播種し、M1世代苗を得た。開発品種Bは、このM1世代の個体に由来する。

[0075] 開発品種Aおよび開発品種Bの葉から得られた抽出物の高速液体クロマトグラフィー(HPLC)分離-質量分析(MS)を行い、D-グルコピラノシル (Glc)、キシロピラノシル (Xyl) を含む糖鎖で構成されたステビオール配糖体の分子量をもとに、ステビア植物体に含有されるステビオール配糖体のスクリーニング分析を行った。ここで、開発品種Aおよび開発品種Bは後述の遺伝的特徴1~8を有する植物体である。

[0076] 検液の調製方法は、凍結乾燥処理を行ったステビア乾燥葉それぞれ10.0 mgをガラスバイアルに秤量し、抽出溶媒として水/メタノール(1/1 vol/vol)を1.0 mL添加し、その後超音波洗浄器(AS ONE, AS52GTU)にて20分間、25℃の設定温度にて超音波を照射し、ステビア葉からステビオール配糖体の抽出液を得た。さらにHPLC-MSに供するために、水/メタノールで10倍希釈を行い、細孔サイズ0.45 μm のフィルター(ナカライテスク、コスモナイスフィルターS(溶媒系))にてろ過を行った。

[0077] HPLC - MSのHPLCは、送液ユニットLCポンプにはNexera LC-30AD(島津製作所)、分離カラムにはSM-C18 (4.6×250 mm)(インタクト社製)を用いた。LC移動相の送液は、移動相Aは0.2%酢酸含有ミリQ水、移動相Bはメタノールを用い、バイナリーグラジエント勾配を0-5分間は移動相B濃度10%で一定にし、そ

の後15分間で移動相B濃度を10%から70%まで変化させ、さらに5分間でB濃度を70%から100%まで変化させ、最後に5分間移動相B濃度を100%に維持して終了した。移動相の流速は0.4 mL/分で行い、希釈後フィルターろ過されたステビア葉抽出液は5 μ L 注入した。

[0078] MSは、エレクトロスプレーイオン化(ESI)イオン源を取り付けた三連四重極型質量分析計LCMS-8030 (島津製作所)を用いた。質量分析測定は、負イオン測定モード、 m/z 値を選択して測定を行う選択イオンモニタリング(SIM)モードで測定を行った。選択する m/z 値は、D-グルコピラノシル (Glc)、キシロピラノシル (Xyl) を含む糖鎖に構成されたステビオール配糖体の分子量をもとに計算した m/z 値を選択した。したがって、 $m/z = 965.3$ (Glc (4))、1097.4 (Glc (4)、Xyl (1))、1127.4 (Glc (5))、1259.5 (Glc (5)、Xyl (1))、および1289.5 (Glc (6))を選択した。さらに、入手可能な高純度試薬、レバウディオサイドA、DおよびMの測定も同条件にて行うことにより、HPLCの負イオン m/z 値、保持時間の確認を行った。検出された主なステビオール配糖体のピーク面積値 (任意の単位: arbitrary unit) を表1に示す。

[0079] [表1]

表1. HPLC-MSのSIM測定で観測されたピーク面積値

m/z 値	965.3	1097.4	1127.4	1259.5	1289.5
糖分子数	Glc (4)	Glc (4) Xyl (1)	Glc (5)	Glc (5) Xyl (1)	Glc (6)
保持時間	29.82	29.05	28.26	29.30	28.90
化合物名 試料名	Reb A	新規ステビオール配糖体 1 E	Reb D	新規ステビオール配糖体 2 E	Reb M
開発品種 A	103,431,572	101,224	2,683,364	77,724	1,935,022
開発品種 B	41,706,992	82,333	3,975,990	42,787	2,966,927

[0080] 図2に開発品種Aの m/z 1097.4の選択イオンクロマトグラムを示す。ステビオール配糖体の修飾されている糖鎖が4個のグルコース(Glc)と1個のキシロース(Xyl)を含むステビオール配糖体 (m/z 1097.4) の選択イオンクロマトグラム中にこれまでに報告の無い分子量を持つピークが観測された。つまり、図2に示される、Rt29.05分のピークについては未知の物質である。この

物質を仮に「新規ステビオール配糖体 1 E」とした。開発品種 B についても同様のピークが検出された。

[0081] 図 3 に開発品種 A の m/z 1259.5 の選択イオンクロマトグラムを示す。ステビオール配糖体の修飾されている糖鎖が 5 個のグルコース (Glc) と 1 個のキシロース (Xyl) を含むステビオール配糖体 (m/z 1259.5) の選択イオンクロマトグラム中にこれまでに報告の無い分子量を持つピークが観測された。つまり、図 3 に示される、 R_t 29.30 分のピークについては未知の物質である。この物質を仮に「新規ステビオール配糖体 2 E」とした。開発品種 B についても同様のピークが検出された。

[0082] [新規ステビオール配糖体の構造解析]

本発明において、開発品種から検出された新規ステビオール配糖体 1 E および 2 E の構造解析は次の手順で行った。

(i) 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) – 高分解能質量分析 (MS) および MS/MS、3 段階までのイオンの断片化 (MS^3 断片化) のフラグメント化解析による構造推定、

(i i) 化学反応による推定ステビオール配糖体標準品の化学合成、

(i i i) 化学合成標準品の HPLC – 高分解能 MS および MS^3 断片化の保持時間と断片化パターンの一致による構造確認

[0083] 上記 (i) ~ (i i i) の工程のそれぞれについて、以下に詳細に説明する。

[0084] (i) 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) – 高分解能質量分析 (MS) および MS/MS、3 段階までのイオンの断片化 (MS^3 断片化) のフラグメント化解析による構造推定

検液の調製は、凍結乾燥処理を行ったステビア乾燥葉それぞれ 10.0 mg をガラスバイアルに秤量し、抽出溶媒として水/メタノール (1/1 vol/vol) を 1.0 mL 添加し、その後超音波洗浄器 (AS ONE, AS52GTU) にて 20 分間、25°C の設定温度にて超音波を照射し、ステビア葉からステビオール配糖体の抽出液を得た。さらに HPLC-MS に供するために、水/メタノールで 10 倍希釈を行い、細孔サ

イズ0.45 μm のフィルター(ナカライテスク、コスモナイスフィルターS(溶媒系))にてろ過を行った。

[0085] 高速液体クロマトグラフィー-エレクトロスプレーイオン化精密質量分析(HPLC-ESI-HRMS)の機器構成において、HPLCの機器構成は、送液ユニットLCポンプにはProminence LC-20AD(島津製作所)を用い、分離カラムにはSM-C18(4.6×250 mm)(インタクト社製)を用いた。LC移動相の送液は、移動相Aとしては0.2% 酢酸含有ミリQ水を用い、移動相Bとしてはメタノールを用い、バイナリーグラジエント勾配を0-5分間は移動相B濃度10%で一定とし、その後15分間で移動相B濃度を10%から70%まで変化させ、さらに5分間でB濃度を70%から100%まで変化させた。最後に5分間、移動相B濃度を100%に維持して終了した。移動相の流速は0.4 mL/分で行い、希釈後フィルターろ過されたステビア葉抽出液は20 μL 注入した。質量分析部は、ESIイオン源を取り付けたOrbitrap Elite MS(サーモフィッシャーサイエンティフィック社製)を用いた。質量分析測定は、負イオン測定モード、 m/z 150 - 2000の範囲、設定分解能60,000で測定を行った。MS/MS測定は、ターゲットの m/z 1095.4または1257.5を選択し、不活性ガスとの衝突によって断片化を行うCIDモードで行った。MS³のターゲットイオンはMS/MSスペクトルで最も強度の強いイオンとした。断片化に必要なエネルギーの照射は装置固有の衝突エネルギー基準である35で行った。

[0086] 新規ステビオール配糖体1 Eおよび2 Eの断片化パターンを理解するために構造既知である標品レバウディオサイド Aおよび D、MのMS/MSおよびMS³断片化パターン解析を行った。その結果、新規ステビオール配糖体のMS/MSでは19位にエステル結合している糖鎖の全てが脱離したピークのイオン強度が最も強く現れるデータが得られた。この結果は19位の炭素にエステル結合している、糖鎖の分子量の合計を示している。

[0087] 図4に新規ステビオール配糖体1 E (m/z 1097.4、 R_t :29.05に相当する)のMS/MSおよびMS³断片化マススペクトルを示す。新規ステビオール配糖体のMS/MSスペクトルからはGlc 1個分とXyl 1個分の脱離に相当する m/z 803.37にピークが主ピークとして検出された。この結果から19位の炭素にエステル結合

している糖鎖数がGlc1個分とXyl1個であることが分かる。さらに構造情報を得るために、MS/MSで得られた主ピークm/z 803.4を断片化するMS³スペクトルを取得した。その結果、レバウディオサイド AのMS³スペクトル (965.4→803.4→)と同様のピークパターンを持つスペクトルが得られた。このことから、13位に結合した糖鎖は、レバウディオサイドAと同じであると推測出来る。推定される構造を図4中に示す。

[0088] 図5に新規ステビオール配糖体2E (m/z 1259.5、Rt:29.30に相当する)のMS/MSおよびMS³断片化マススペクトルを示す。新規ステビオール配糖体のMS/MSスペクトルからはGlc3個分の脱離に相当するm/z 773.36にピークが主ピークとして検出された。この結果から19位の炭素にエステル結合している糖鎖数がGlc3個分であることが分かる。さらに構造情報を得るために、MS/MSで得られた主ピークm/z 773.4を断片化するMS³スペクトルを取得した。その結果、レバウディオサイドFのMS³スペクトル (935.4→773.4→)と同様のピークパターンを持つスペクトルが得られた。このことから、13位に結合した糖鎖は、レバウディオサイドFと同じであると推測出来る。推定される構造を図5中に示す。

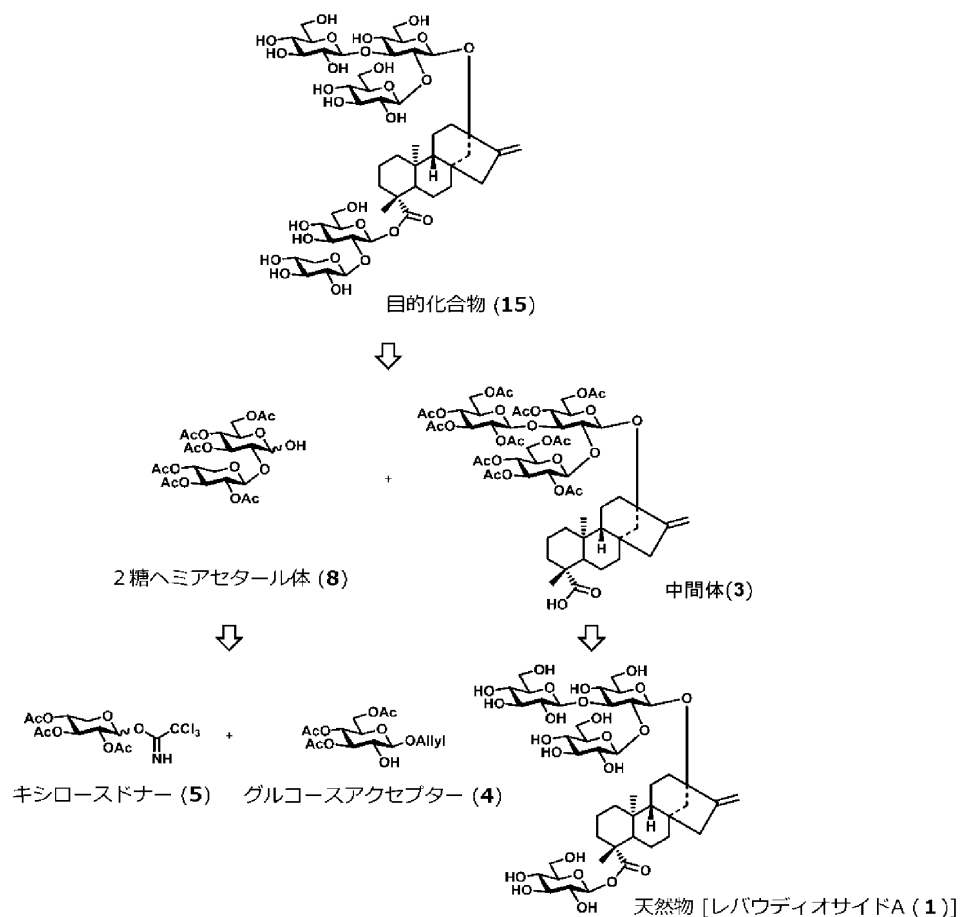
[0089] (ii) 化学反応による推定ステビオール配糖体標準品 (新規ステビオール配糖体1Sおよび2S) の化学合成

[新規ステビオール配糖体1Sの合成]

(1) 合成経路の概要

[化7]

スキーム1 新規ステビオール配糖体1 Sの合成戦略



スキーム1に示したように、新規ステビオール配糖体1 S（目的化合物15）の合成では、中間体（3）と2糖ヘミアセタール体（8）を、光延反応で縮合することで、新規ステビオール配糖体1 S（目的化合物15）の骨格を得る事とした。中間体（3）の合成では、既知の天然物であるレバウディオサイドA（1）のステビオール19位のエステル結合をアルカリ加水分解後、糖鎖のヒドロキシ基をアセチル（Ac）基で保護することで、中間体（3）を得た。2糖ヘミアセタール体（8）の合成では、適切に保護されたグルコースアクセプター（4）とキシロースドナー（5）の縮合反応によって、2糖骨格を作り、還元末端1位の保護基を脱保護することで、2糖ヘミア

セタール体（８）を得た。得られた中間体（３）と２糖ヘミアセタール体（８）を、光延反応で縮合したところ、７９％（βのみ）と高収率且つ完全なβ選択性で反応が進行した。得られた化合物の保護基を脱保護することで、新規ステビオール配糖体１Ｓ（目的化合物１５）を得た。

次に、各合成工程について説明する。

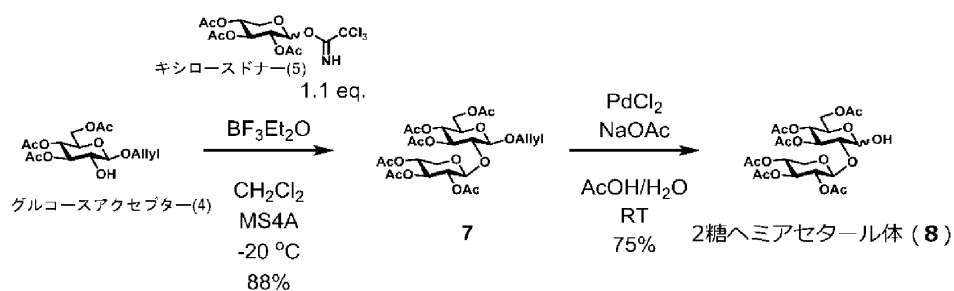
[0090] （２）中間体（３）の合成

中間体（３）は国際公開第２０１８／１８１５１５号に記載の方法で行った。

[0091] （３）２糖ヘミアセタール体の合成

[化８]

スキーム２ ２糖ヘミアセタール体（８）の合成



スキーム２に示したように、２糖ヘミアセタール体（８）の合成では、グルコースアクセプター（４）（４０．０ｇ、１１５ｍｍｏｌ）とキシロースドナー（５）（５３．４ｇ、１２７ｍｍｏｌ）、モレキュラーシーブス４Å（６０ｇ）をジクロロメタン（１．２Ｌ）に溶解させ、三フッ化ホウ素ジエチルエーテル錯体（１．４６ｍＬ、１１．５ｍｍｏｌ）を－２０℃で加え、－２０℃にて１時間攪拌した。反応終了をＴＬＣ（酢酸エチル／ヘキサン＝１／１、Ｒ_f値＝０．２）にて確認後、トリエチルアミン（２．０ｍＬ）で中和（ｐＨ＝８）し、モレキュラーシーブス４Åを濾別し、減圧濃縮して得られたシラップをシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供し、溶出液（酢酸エチル／ヘキサン＝１／１）にて化合物７（６１．２ｇ、８８％）を得た。

NMRスペクトルは、「AVANCE III HD 400 spectrometer」、Bruker社製を用い、 ^1H -NMRと ^{13}C -NMRとを測定した。測定に用いた溶媒および周波数は以下のとおりである。NMRスペクトルの測定は、後述の他の化合物についても同じ装置を用いて行った。

[化合物7]

^1H -NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 2.01-2.10 (complex, 18H, OAc), 3.35 (dd, 1H), 3.68 (m, 1H), 3.73 (t, 1H), 4.13-4.27 (complex, 4H), 4.38 (m, 1H), 4.48 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 4.74 (d, $J = 6.4$ Hz, 1H), 4.86 (t, 1H), 4.90-4.99 (complex, 2H), 5.09 (t, 1H), 5.35 (d, 1H), 5.91 (m, 1H); ^{13}C -NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ 20.6 $\times$ 2, 20.7 $\times$ 2, 20.8 $\times$ 2, 61.9, 62.0, 68.7, 68.9, 70.5, 70.7, 71.2, 71.5, 74.5, 98.9, 100.3, 117.8, 133.4, 169.4, 169.7, 170.0, 170.7.

[0092] 化合物7 (2.3 g、3.8 mmol) を酢酸 (100 mL) と水 (10 mL) に溶解させ、塩化パラジウム (1.2 g、6.8 mmol) を室温で加え、アルゴン雰囲気下、室温にて18時間攪拌した。反応終了をTLC (クロロホルム/酢酸エチル=2/1、R_f値=0.2) にて確認後、塩化パラジウムを濾別し、減圧濃縮して得られたシラップをシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供し、溶出液 (クロロホルム/酢酸エチル=2/1) にて2糖ヘミアセタール体 (8) (1.6 g、75%) を得た。

[2糖ヘミアセタール体 (8)]

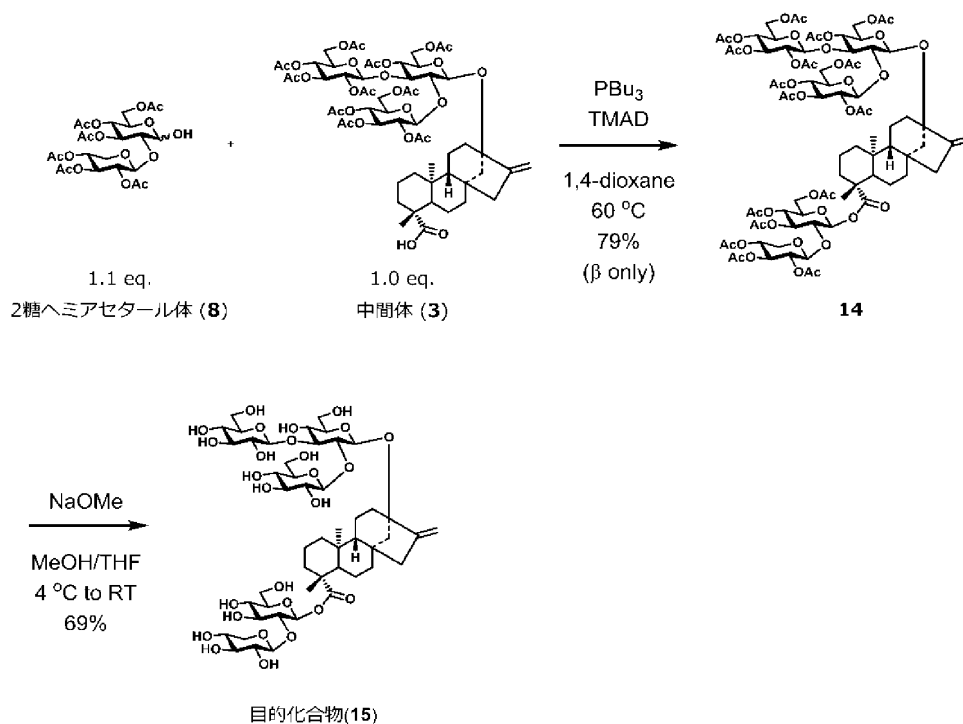
^1H -NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 2.00-2.15 (complex, 27H, OAc), 3.31-3.39 (complex, 2H), 3.53-3.79 (complex, 3H), 3.86 (d, $J = 2.8$ Hz, 1H), 4.06-4.33 (complex, 6H), 4.58 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 4.83-5.06 (complex, 5H), 5.09-5.22 (complex, 2H), 5.35 (m, 1H), 5.45 (t, 1H); ^{13}C -NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ 20.4, 20.5, 20.6 $\times$ 2, 20.7 $\times$ 2, 61.9, 62.2, 67.2, 68.3 $\times$ 2, 68.5, 68.7, 70.7, 71.4, 71.5, 76.7, 92.0, 101.6, 169.5, 169.7, 169.8

×2, 170.1, 170.7.

[0093] (4) 化合物 15 の合成

[化9]

スキーム3 新規ステビオール配糖体 15 の合成



スキーム3に示したように、化合物14の合成では、2糖ヘミアセタール体(8)(9.4g、16.7mmol)と中間体(3)(18.6g、15.1mmol)を1,4-ジオキサン(150mL)に溶解させ、トリブチルホスフィン(14.9mL、60.6mmol)、1,1'-アゾビス(N,N'-ジメチルホルムアミド)(TMAD)(10.4g、60.6mmol)を室温に加え、60℃にて1時間攪拌した。反応終了をTLC(トルエン/酢酸エチル=3/2、R_f値=0.2)にて確認後、酢酸エチルで希釈し、有機層を水、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥した。硫酸マグネシウムを濾別し、減圧濃縮して得られたシラップをシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供し、溶出液

(トルエン／酢酸エチル＝3／2)にて化合物14(21.1g、79%)を得た。

[化合物14]

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ 0.75–1.32 (complex, 13H), 1.37–2.32 (complex, 77H), 3.36 (t, 1H), 3.50–3.72 (complex, 4H), 3.75–4.29 (complex, 14H), 4.41 (m, 1H), 4.52–4.65 (complex, 2H), 4.77–5.27 (complex, 20H), 5.62 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz) δ 16.3, 19.3, 20.3, 20.4, 20.5 $\times$ 2, 20.6 $\times$ 3, 20.7 $\times$ 3, 20.9, 21.2, 21.3, 28.9, 36.5, 36.8, 39.3, 40.3, 41.1, 42.6, 43.3, 43.8, 45.1, 47.2, 53.5, 57.3, 60.3, 61.1, 61.7, 62.0, 62.6, 67.9, 68.0, 68.1, 68.3, 68.7, 70.6, 71.4, 71.6, 71.7, 71.8, 72.1, 72.9, 73.0, 74.7, 80.1, 85.8, 85.9, 91.2, 96.2, 98.9, 99.2, 100.9, 104.5, 125.2, 128.1, 128.7, 152.7, 168.9, 169.2, 169.3 $\times$ 2, 169.6, 169.7, 169.9, 170.0 $\times$ 2, 170.3 $\times$ 2, 170.5, 170.7, 174.5.

[0094] 化合物(14)(20.0g、11.3mmol)をメタノール(100mL)、THF(100mL)に溶解させ、ナトリウムメトキサイド(メタノール中0.5M)(25mL)を4℃で加え、室温にて1時間攪拌した。反応終了をTLC(クロロホルム／メタノール／水＝5／4／0.1、Rf値＝0.1)にて確認後、Ambertite120B(H)を加え中和し、減圧濃縮して得られたシラップをゲルろ過カラム(GEHealthcare、SephadexLH-20、エタノール)に供し、化合物15(10.2g、69%)を得た。

[化合物15]

$^1\text{H-NMR}$ (pyridine- d_5 , 400 MHz) δ 0.70 (m, 1H), 0.88 (m, 1H), 0.91–1.40 (complex, 10H), 1.51–2.21 (complex, 14H), 2.43–2.55 (complex, 2H), 3.59–3.70 (complex, 2H), 3.77–4.51 (complex, 36H), 4.91 (s, 1H), 5.03

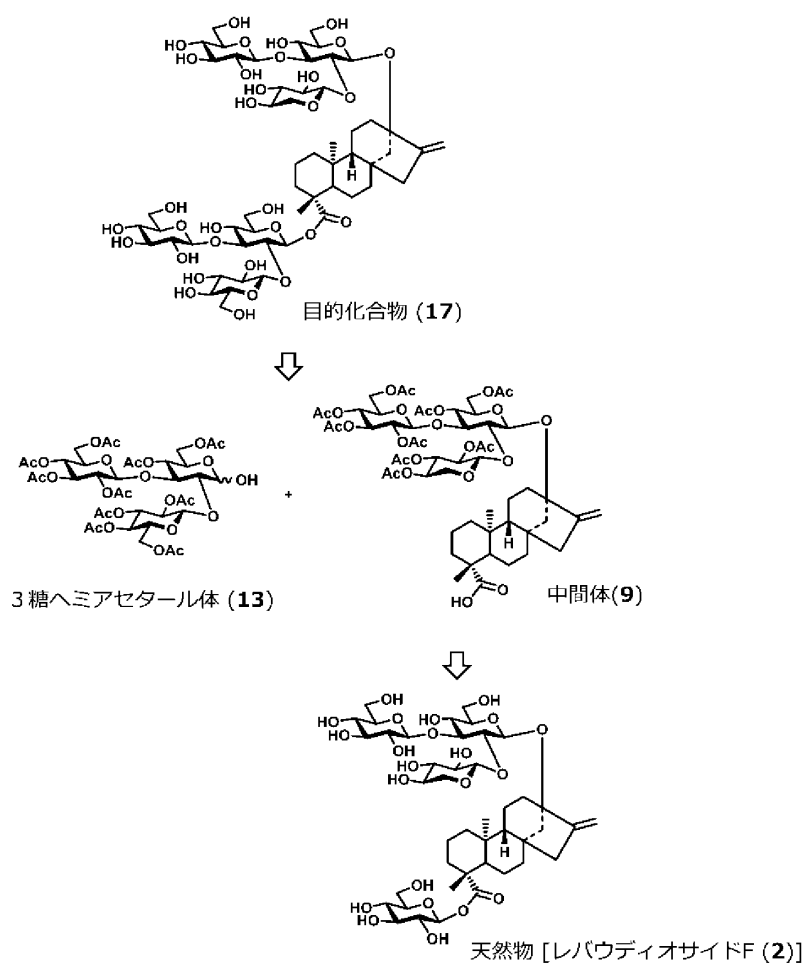
(d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 5.20 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 5.35 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 5.52 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 5.61 (m, 1H), 6.16 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H);
 ^{13}C -NMR (pyridine- d_5 , 100 MHz) δ 17.1, 20.4, 21.0, 22.9, 29.4, 38.1, 38.6, 40.2, 41.1, 42.3, 42.6, 44.4, 44.8, 45.9, 48.2, 54.5, 57.9, 62.6, 62.8 $\times$ 2, 63.8, 67.9, 70.4, 71.3, 71.6, 72.1, 72.8, 75.9, 76.3, 76.9, 77.9, 78.5, 78.7, 78.8, 79.0, 79.1, 79.5, 81.5, 82.3, 87.3, 88.6, 94.1, 98.2, 105.0, 105.1, 105.3, 107.1, 154.4, 176.4.

[0095] [新規ステビオール配糖体 2 S の合成]

(1) 合成経路の概要

[化10]

スキーム4 新規ステビオール配糖体 2 S の合成戦略



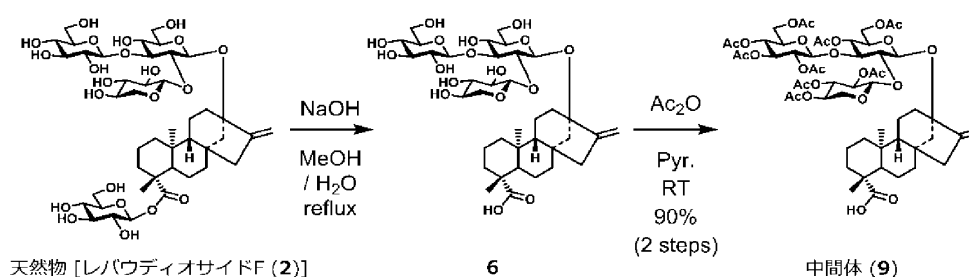
スキーム4に示したように、新規ステビオール配糖体2 S (17)の合成では、中間体(9)と3糖ヘミアセタール体(13)を、光延反応で縮合することで、新規ステビオール配糖体2 S (17)の骨格を得る事とした。中間体(9)の合成では、既知の天然物であるレバウディオサイドF(2)のステビオール19位のエステル結合をアルカリ加水分解後、糖鎖の水酸基をアセチル(Ac)基で保護することで、中間体(9)を得た。得られた中間体(9)と3糖ヘミアセタール体(13)を、光延反応で縮合したところ、53%(β のみ)と高収率且つ完全な β 選択性で反応が進行した。得られた化合物の保護基を脱保護することで、新規ステビオール配糖体2 S (17)を得た。

次に、各合成工程について説明する。

[0096] (2) 中間体(9)の合成

[化11]

スキーム5 中間体(9)の合成



スキーム5に示したように、中間体(9)の合成では、レバウディオサイドF(2)(1.8g、1.9mmol)を、メタノール(20mL)と水(10mL)に溶解させ、2mol/L水酸化ナトリウム(10mL)を室温で加え、100℃にて3時間還流した。反応終了をTLC(クロロホルム/メタノール=4/1、R_f値=0.2)で確認後、反応液をAmbertite 120B(H)で中和(pH7)し、樹脂を濾別後、減圧濃縮して、化合物6(2.1g)を得た。

[0097] 化合物6(2.1g)をピリジン(20mL)に溶解させ、無水酢酸(3

． 6 m L) を室温で加え、室温にて 2 4 時間攪拌した。反応終了を T L C (クロロホルム／メタノール＝ 5 0 ／ 1、R f 値＝ 0. 2) にて確認後、飽和の炭酸水素ナトリウム水溶液 (4 0 m L) を 0℃ で加え、酢酸エチルで 3 回抽出した。有機層を減圧濃縮して得られたシラップをシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供し、溶出液 (クロロホルム／メタノール＝ 5 0 ／ 1) にて中間体 9 (2. 0 g、9 0 % (2 工程)) を得た。

[中間体9]

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ 0.81 (m, 1H), 0.89-1.12 (complex, 8H), 1.22 (s, 3H), 1.41-2.22 (complex, 50H), 3.49 (dd, 1H), 3.58 (m, 1H), 3.65 (m, 1H), 3.85 (t, 1H), 3.96-4.15 (complex, 4H), 4.42 (m, 2H), 4.56 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 4.81-4.94 (complex, 6H), 5.00 (t, 1H), 5.04-5.14 (complex, 3H), 5.25 (t, 1H); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz) δ 16.0, 17.3, 19.1, 20.5, 20.6, 20.7, 20.8 $\times$ 2, 20.9, 21.8, 29.1, 29.8, 37.9, 38.0, 39.5, 40.7, 41.5, 42.2, 43.8, 44.0, 48.4, 53.8, 56.8, 61.7, 63.1, 66.8, 68.0, 68.7, 68.8, 69.7, 71.0, 71.6, 71.9, 72.4, 72.8, 81.3, 87.3, 96.6, 96.8, 99.2, 105.6, 151.9, 169.0, 169.5, 169.6, 170.1 $\times$ 2, 170.3, 170.6, 170.9, 171.0, 182.5.

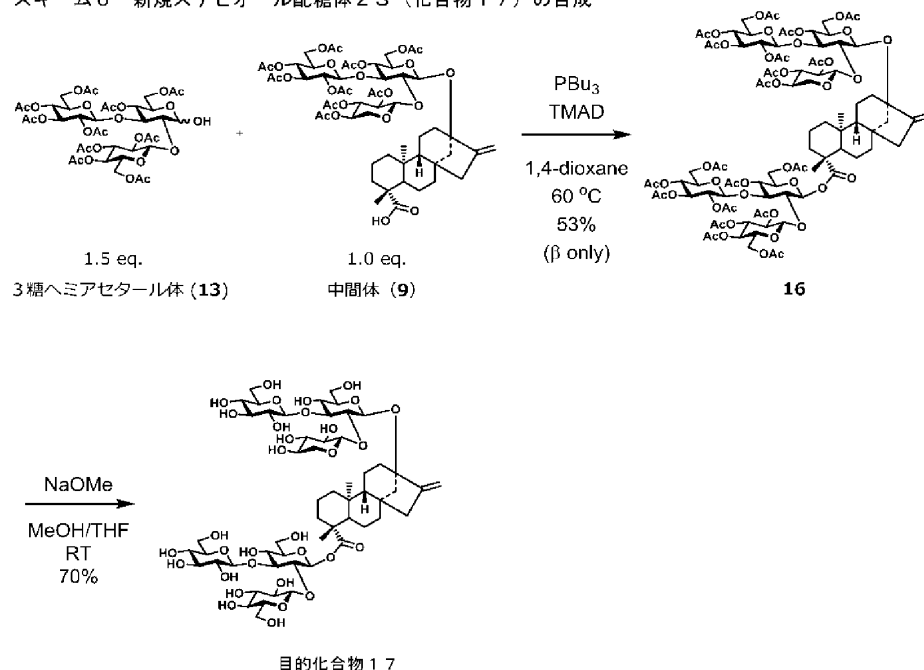
[0098] (3) 3糖ヘミアセタール体の合成

3糖ヘミアセタール体の合成は、国際公開第 2 0 1 8 / 1 8 1 5 1 5 号に記載の方法で行った。

[0099] (4) 化合物 1 7 の合成

[化12]

スキーム 6 新規ステビオール配糖体 2 S (化合物 17) の合成



スキーム 6 に示したように、化合物 16 の合成では、3 糖ヘミアセタール体 (13) (2.4 g、2.6 mmol) と中間体 (9) (2.0 g、1.7 mmol) を 1,4-ジオキサン (20 mL) に溶解させ、トリブチルホスフィン (4.3 mL、17.3 mmol)、1,1'-アゾビス (N,N'-ジメチルホルムアミド) (TMAD) (3.0 g、17.3 mmol) を室温に加え、60 °C にて 2 時間攪拌した。反応終了を TLC (酢酸エチル／ヘプタン = 2／1、R_f 値 = 0.1) にて確認後、酢酸エチルで希釈し、有機層を水、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥した。硫酸マグネシウムを濾別し、減圧濃縮して得られたシラップをシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供し、溶出液 (酢酸エチル／ヘプタン = 2／1) にて化合物 16 (1.9 g、53%、β のみ) を得た。

[化合物16]

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ 0.78–1.05 (complex, 9H), 1.25 (t, 4H), 1.36–2.31 (complex, 86H), 3.51 (dd, 1H), 3.59 (m, 1H), 3.61–3.78 (complex, 4H), 3.81 (t, 1H), 3.91–4.21 (complex, 11H), 4.31 (dd, 1H), 4.40–4.59 (complex, 4H), 4.73–5.29 (complex, 21H), 5.60 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H);
 $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz) δ 16.8, 17.5, 19.5, 20.5, 20.7 $\times$ 3, 20.8 $\times$ 3, 20.9 $\times$ 3, 21.0, 21.1 $\times$ 2, 21.5, 29.2, 37.4, 37.5, 39.6, 40.5, 41.6, 42.5, 43.8, 44.2, 48.1, 53.8, 57.4, 61.7, 62.0, 62.1, 62.3, 63.1, 66.7, 67.4, 68.0, 68.3, 68.4, 68.6, 68.8, 69.7, 71.1, 71.5, 71.8, 71.9, 72.0, 72.2, 72.3, 72.4, 72.9, 73.1, 75.0, 80.1, 81.5, 86.8, 91.3, 96.4, 97.0, 99.2, 99.3, 99.6, 104.9, 152.8, 169.0, 169.1, 169.3, 169.5 $\times$ 2, 169.6, 170.1 $\times$ 2, 170.2 $\times$ 3, 170.5, 170.6, 170.9, 174.8.

[0100] 化合物(16) (2.2 g、1.1 mmol) をメタノール (10 mL)、THF (10 mL) に溶解させ、ナトリウムメトキサイド (MeOH 中 0.5 M) (2.5 mL) を室温に加え、室温にて3時間攪拌した。反応終了を TLC (クロロホルム/メタノール/水 = 5/4/1、R_f 値 = 0.4) にて確認後、Ambertite 120B (H) で中和 (pH 7) し、樹脂を濾別後、減圧濃縮して得られたシラップを MeCN/H₂O = 1/2 に溶解し、凍結乾燥を行った。これにより化合物 17 (1.0 g、70%) を得た。

[化合物17]

$^1\text{H-NMR}$ (pyridine- d_5 , 400 MHz) δ 0.78 (m, 1H), 0.91 (m, 1H), 1.08 (m, 1H), 1.31–1.48 (complex, 9H), 1.62–1.80 (complex, 3H), 1.81–1.89 (complex, 3H), 2.00–2.06 (complex, 2H), 2.29 (m, 3H), 2.47 (m, 1H), 2.69 (m, 1H), 2.80 (m, 1H), 3.41 (t, 1H), 3.81 (m, 1H), 3.90–4.41 (complex, 33H), 4.53–4.61 (complex, 2H), 4.70 (m, 1H), 4.88–5.22 (complex, 14H), 5.30 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 5.37 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 5.51–5.57 (complex, 2H), 5.61 (s, 1H), 5.77 (s, 2H), 5.84 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 6.46

(d, $J = 8.0$ Hz, 1H); ^{13}C -NMR (pyridine- d_5 , 100 MHz) δ 18.3, 21.2, 21.7, 25.1, 29.8, 39.9, 41.3, 41.7, 42.5, 44.2, 44.7, 45.8, 47.9, 55.9, 58.9, 63.3, 63.5, 63.6, 64.2, 65.6, 68.5, 71.7, 72.2, 72.6, 72.9, 75.2, 76.9, 77.0, 77.2, 78.4, 79.2, 79.3, 79.4, 79.5, 79.6, 79.9, 80.0, 80.6, 83.7, 89.2, 89.5, 90.2, 96.5, 97.7, 105.4, 105.7, 105.9, 106.4, 107.3, 154.9, 178.5.

[0101] (iii) 化学合成標準品のHPLCー高分解能MS/MSおよびMS³断片化の保持時間と断片化パターンの一致による構造決定

(i) に記載の条件で、HPLC-ESIイオン源を取り付けたOrbitrap Elite MS (サーモフィッシャーサイエンティフィック社製)を用いて、HPLCー高分解能MS/MSおよびMS³断片化による新規ステビオール配糖体1の化学合成品(化合物15の β 体)とステビア葉抽出液の比較を行った結果、保持時間29.34分または29.37分のピークで化学合成品とステビア葉抽出液からのピークが検出された(図10)。なお、図10における保持時間29.34分または29.37分のピークが、図2における保持時間29.05分のピークに相当することは、化学合成品を用いて図2において使用した装置(LCMS-8030)における保持時間を測定することで確認した。また、それぞれのMS/MSおよびMS³断片化マススペクトル(図11)も一致した。この結果から、植物体の抽出液から得られた新規ステビオール配糖体1Eは化合物15の β 体と同じ構造を有することが確認された。

[0102] さらに、(i) に記載の条件で、HPLC-ESIイオン源を取り付けたOrbitrap Elite MS (サーモフィッシャーサイエンティフィック社製)を用いて、HPLCー高分解能MS/MSおよびMS³断片化による新規ステビオール配糖体2の化学合成品(化合物17の β 体)とステビア葉抽出液の比較を行った結果、保持時間29.67分または29.68分のピークで化学合成品とステビア葉抽出液からのピークが検出された(図12)。なお、図12における保持時間29.67分または29.68分のピークが、図3における保持時間29.30分のピークに相当することは、化学合成品を用いて図3において使用した装置(LCMS-8030)における

保持時間を測定することで確認した。また、それぞれのMS/MSおよびMS³断片化マススペクトル（図13）も一致した。この結果から、植物体の抽出液から得られた新規ステビオール配糖体2Eは化合物17のβ体と同じ構造を有することが確認された。

[0103] 新規ステビオール配糖体の甘味度評価

新規ステビオール配糖体AとBの甘味度を評価するため、Brix3.0から5.0まで0.5刻となるよう砂糖を純水に添加したサンプルを調製した。新規ステビオール配糖体AとBとしては、それぞれ化学合成によって得た化合物15と17を用い、400mLの純水中に48mgの試料を溶解させて試験した。また、対比用にRebA、RebDおよびRebMをそれぞれ48mgずつ400mLの純水に溶解させた試料も作成した。

[0104] (1) 新規ステビオール配糖体Aの甘味度評価

評価は新規ステビオール配糖体を添加されたサンプルと同等の甘味強度を持つ砂糖添加サンプルを選択することによって行われ、甘味料の官能に関して訓練を受けた者（7名）がパネラーとなって官能評価を行った。その結果、本発明の新規ステビオール配糖体Aは砂糖に対し平均で354倍程度の甘味度を持つことがわかった。

[表2]

表2：新規ステビオール配糖体Aの甘味度評価

甘味度	新規ステビオール配糖体A	RebA	RebD	RebM
最小	319.0	243.0	253.5	286.0
最大	415.8	398.9	398.0	352.2
平均	354.1	312.0	317.9	341.1

[0105] (2) 新規ステビオール配糖体Bの甘味度評価

新規ステビオール配糖体Aと同様に甘味度を評価した。その結果、本発明の新規ステビオール配糖体Bは砂糖に対し平均で250倍程度の甘味度を持つことがわかった。結果を下表に示す。

[表3]

表3：新規ステビオール配糖体Bの甘味度評価

甘味度	新規ステビオール配糖体B	RebA	RebD	RebM
最小	223.6	239.5	241.1	236.5
最大	299.2	329.2	393.6	373.4
平均	249.6	288.3	310.3	323.6

[0106] 新規ステビオール配糖体A（化合物15）の官能評価

各種ステビオール配糖体の味質の評価を行うため、Reb. Aと、Reb. Dと、Reb. Mと、砂糖と、新規ステビオール配糖体A（化合物15）とをそれぞれ純水に添加して、飲料サンプルを調製した。飲料サンプルは全て、甘味度をReb. Aについては312、Reb. Dについては317、Reb. Mについては341、新規ステビオール配糖体A（化合物15）については354として、砂糖（スクロース）換算の甘味度（Brix）が最終的に5となるように調整した。

[0107] 得られた飲料サンプルについて、甘味立ち上がり、甘味後引き、苦味、および苦味後引きの指標で官能評価を行った。甘味料の官能に関して訓練を受けた者（7名）がパネラーとなって評価を行い、評価基準は次の通りとした。各評価項目において砂糖を3点とし、各ステビオール配糖体の点数を0.5点刻みで点数付けした。数値が高いほど、甘味立ち上がりが速く、甘味後引きが短く、苦味が少なく、苦味後引きが短い。結果を図14に示す。図中に示す評点は8名のパネラーによる評点の平均値である。官能評価の結果、新規ステビオール配糖体Aは、他の配糖体と比べ、甘味と苦味後引きが少なく、苦味は砂糖を含めた他の成分に比べ少ないことが分かった。

[0108] 新規ステビオール配糖体B（化合物17）の官能評価

各種ステビオール配糖体の味質の評価を行うため、Reb. Aと、Reb. Dと、Reb. Mと、砂糖と、新規ステビオール配糖体B（化合物17）とをそれぞれ純水に添加して、飲料サンプルを調製した。飲料サンプルは全て、甘味度をReb. Aについては288、Reb. Dについては310、Reb. Mについては324、新規配糖体B（化合物17）については25

0として、砂糖（スクロース）換算の甘味度（Brix）が最終的に5となるように調整した。

[0109] 得られた飲料サンプルについて、甘味立ち上がり、甘味後引き、苦味、および苦味後引きの指標で官能評価を行った。甘味料の官能に関して訓練を受けた者（7名）がパネラーとなって評価を行い、評価基準は次の通りとした。各評価項目において砂糖を3点とし、各ステビオール配糖体の点数を0.5点刻みで点数付けした。数値が高いほど、甘味立ち上がりが速く、甘味後引きが短く、苦味が少なく、苦味後引きが短い。結果を図15に示す。図中に示す評点は6名のパネラーによる評点の平均値である。官能評価の結果、新規ステビオール配糖体Bは、他の配糖体に比べ苦味が低いことが分かった。

[0110] 新規ステビオール配糖体AおよびBを含む植物体に含まれる遺伝的特徴の同定

新規ステビオール配糖体AおよびBを豊富に含む系統（変異型：開発系統Aおよび開発系統B）と新規配糖体AおよびBの含有量が少ない系統（野生型：開発系統Xおよび開発系統Y）を用いて、新規配糖体AおよびBを豊富に含む系統に特異的な遺伝的特徴の特定を検討した。各系統のゲノムをシーケンスしたところ、新規配糖体AおよびBを豊富に含む系統は、野生型（WT）に対して、配列番号1の298番目、328番目、360番目、386番目、393番目、411番目、427番目および453番目の塩基における置換、配列番号57の90番目の塩基と91番目の塩基との間における15塩基の挿入、配列番号59の98番目、102番目、111番目、113番目、116番目、119番目および122番目の塩基における置換を有することが分かった（配列番号1、57および59に対応する変異型系統の塩基配列を配列番号2、58および60にそれぞれ示す）。また、配列番号1における置換、配列番号57における挿入、および配列番号59における置換は、それぞれ配列番号53、61および63のアミノ酸配列を含むタンパク質（本明細書中、それぞれP1、P2およびP3と称することがある）を

コードする遺伝子のイントロン領域に存在することも分かった。次に、これらの変異が各遺伝子の発現量に影響を及ぼすか否かを検討した。開発品種A、B、X (S R 0 0 1)、Y (S S 0 7 5 - 4 9) の展開葉100mgを液体窒素で凍結粉碎後、QIAGEN社のRNAeasy Plant mini kitを用い、製造者のプロトコルに従いtotalRNAを抽出した。抽出したtotalRNA 500ngを逆転写に用いた。逆転写にはThermo Fisher Scientific社製のSuperScript IV VI L0を用い、製造者のプロトコルに従いcDNAを合成した。逆転写反応液を1/10に希釈した溶液1μLを用いて半定量PCRを行った。半定量PCRは島津製作所社製のAmpdirectを用い、製造者のプロトコルに従いPCRを行った。PCR反応は95℃ 10分で熱変性させた後、94℃ 30秒、55℃ 30秒、72℃ 25秒の反応をP3は32サイクル、P1、P2は33サイクル、対照区のアクチン、ユビキチンは28サイクル行った。PCR反応後の電気泳動はPerkinElmer社製のLabChip GX Touchを用い、製造者のプロトコルに従い行った。

[0111] 半定量PCRには以下のプライマーを使用した。

P 1

フォワード: CCTGTTTCATTACAAATTCAACCCG (配列番号55)

リバース: AACCCCTAACATGTTCAATGTCCCTA (配列番号56)

P 2

フォワード: ATCAGATTTATCATCTTGCATGCCC (配列番号65)

リバース: TGCCAATTACATTGCTCTTAATCGT (配列番号66)

P 3

フォワード: AAAAGTTGCTGGTTGAAGTTGATCA (配列番号67)

リバース: CACACTAAATATGCTTGGTCTTGC (配列番号68)

アクチン

フォワード: CGCCATCCTCCGTCTTGATCTTGC (配列番号69)

リバース: CCGTTCGGCGGTGGTGTA (配列番号70)

ユビキチン

フォワード：TCACTCTTGAAGTGGAGAGTTCCGA（配列番号 7 1）

リバース：GCCTCTGTTGGTCCGGTGGG（配列番号 7 2）

- [0112] 発現解析結果を図 1 6 および表 4 に示す。表 4 に示す数値は、図 1 6 に示す電気泳動像において、ユビキチン遺伝子のバンド強度を 1 0 0 としたときの P 1 ～ P 3 遺伝子のバンド強度の相対値を表す。

[表4]

表 4：各開発品種における P 1 ～ P 3 遺伝子の発現量

試料名	P1	P2	P3
開発品種 A	146.27	126.23	99.01
開発品種 B	124.57	107.76	93.79
開発品種 X	0.20	72.14	40.23
開発品種 Y	0.13	94.66	77.95

これらの結果から新規配糖体 A および B を含有する 2 系統において、P 1 遺伝子が高発現していることが確認された。P 1 遺伝子中に見出された変異はイントロン領域に存在するものであるが、これらの変異のいずれか 1 つ以上の存在により P 1 の発現量が増加することで、新規配糖体 A および B の合成が植物中で促進されているものと推察される。

[0113] 遺伝的特徴 1 ～ 8 を有する植物体中の新規配糖体 A 含有量の同定

上記「新規ステビオール配糖体 A および B を含む植物体に含まれる遺伝的特徴の同定」において用いた開発品種 A、B、X および Y の個体より、適量の新鮮葉をサンプリングし、LC/MS-MS（島津 LCMS8050）にて甘味成分の濃度を定量した。具体的には、所定量の新鮮葉をフリーズドライにより乾燥し、破碎物乾物を純水中に投入した。超音波処理 2 0 分にて抽出し、遠心・濾過した後に 5 m L 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 分析を行い、Reb. A、Reb. B、Reb. C、Reb. D、Reb. E、Reb. F、Reb. G、Reb. I、Reb. M、Reb. N、ステビオシド、ズルコサイド A、ステビオールピオシド、ルブソシドおよび新規ステビオール配糖体 A の濃度を定量し、その合計を甘味成分の濃度とした（本実施例における総ステビオール配糖体量（TSG））。乾燥葉の水分量はいずれも約 3 % 未満であった。結

果を表5～9に示す。下記の結果はそれぞれ2回の測定の平均値である。

[表5]

表5：各開発品種の乾燥葉中のTSG量

試料名	ステビア葉重量(g)	TSG濃度(mg/L)	TSG量(mg)	TSG率(%)
開発品種A	0.0565	1617.35	8.087	14.3%
開発品種B	0.0501	905.42	4.527	9.0%
開発品種X	0.0445	1142.40	5.712	12.9%
開発品種Y	0.0576	1267.14	6.336	11.1%

[表6]

表6：各開発品種の乾燥葉中に含まれるTSG中の各ステビオール配糖体の比率

試料名	TSG中の各ステビオール配糖体の比率									
	Reb A	Reb B	Reb C	Reb D	ステビオシド	Reb F	Reb M	Reb N	新規ステビオール配糖体A	合計※
開発品種A	40.4%	0.2%	36.6%	0.7%	11.0%	7.9%	0.2%	0.2%	0.061%	100%
開発品種B	64.6%	0.6%	11.8%	7.7%	5.5%	4.0%	2.3%	1.3%	0.205%	100%
開発品種X	24.1%	0.1%	6.1%	0.5%	62.4%	1.2%	0.0%	0.1%	0.017%	100%
開発品種Y	38.9%	0.2%	6.5%	1.9%	47.9%	1.7%	0.1%	0.4%	0.045%	100%

※：合計含有量には、Reb A、Reb B、Reb C、Reb D、Reb E、Reb F、Reb G、Reb I、Reb M、Reb N、ステビオシド、ズルコサイドA、ステビオールピオシド、ルブソシドおよび新規ステビオール配糖体Aが含まれる。

[表7]

表7：8種類の主要なステビオール配糖体^{※1}に対する新規配糖体Aの比率

試料名	ステビオール配糖体Aの比率
開発品種A	0.063%
開発品種B	0.210%
開発品種X	0.018%
開発品種Y	0.046%

※1：表6に記載のReb A、Reb B、Reb C、Reb D、Reb F、Reb M、Reb Nおよびステビオシド

[表8]

表8：各開発品種の乾燥葉中に含まれる各ステビオール配糖体の比率

試料名	乾燥葉中の各ステビオール配糖体の含有量									
	Reb A	Reb B	Reb C	Reb D	ステビオシド	Reb F	Reb M	Reb N	新規ステビオール配糖体A	TSG
開発品種A	5.8%	0.0%	5.2%	0.1%	1.6%	1.1%	0.0%	0.0%	0.009%	14.3%
開発品種B	5.8%	0.1%	1.1%	0.7%	0.5%	0.4%	0.2%	0.1%	0.019%	9.0%
開発品種X	3.1%	0.0%	0.8%	0.1%	8.0%	0.1%	0.0%	0.0%	0.002%	12.9%
開発品種Y	4.3%	0.0%	0.7%	0.2%	5.3%	0.2%	0.0%	0.0%	0.005%	11.1%

[表9]

表9：各開発品種の乾燥葉中に含まれる各ステビオール配糖体に対する新規ステビオール配糖体Aの比率

試料名	乾燥葉中の各ステビオール配糖体に対する新規ステビオール配糖体Aの比率								
	Reb A	Reb B	Reb C	Reb D	ステビオシド	Reb F	Reb M	RebN	Reb A+ ステビオシド
開発品種A	0.15%	30.00%	0.16%	8.57%	0.55%	0.76%	30.00%	30.00%	0.12%
開発品種B	0.33%	35.00%	1.78%	2.73%	3.82%	5.25%	9.13%	16.15%	0.30%
開発品種X	0.08%	20.00%	0.33%	4.00%	0.03%	1.67%		20.00%	0.02%
開発品種Y	0.13%	25.00%	0.77%	2.63%	0.10%	2.94%	50.00%	12.50%	0.06%

[0114] 遺伝的特徴1～8を有する植物体中の新規配糖体B含有量の同定

上記「新規ステビオール配糖体AおよびBを含む植物体に含まれる遺伝的特徴の同定」において用いた開発品種BおよびXの個体より、適量の新鮮葉をサンプリングし、LC/MS-MS（島津LCMS8050）にて甘味成分の濃度を定量した。具体的には、所定量の新鮮葉をフリーズドライにより乾燥し、破碎物乾物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5mL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分析を行い、Reb. A、Reb. B、Reb. C、Reb. D、Reb. E、Reb. F、Reb. G、Reb. I、Reb. M、Reb. N、ステビオシド、ズルコサイドA、ステビオールビオシド、ルブソシドおよび新規ステビオール配糖体Bの濃度を定量し、その合計を甘味成分の濃度とした（本実施例における総ステビオール配糖体量（TSG））。乾燥葉の水分量はいずれも約3%未満であった。結果を表10～14に示す。

[表10]

表10：各開発品種の乾燥葉中のTSG量

試料名	ステビア葉重量(g)	TSG 濃度(mg/L)	TSG 量(mg)	TSG 率(%)
開発品種B	0.0524	777.42	3.887	7.4%
開発品種X	0.0553	1672.45	8.362	15.1%

[表11]

表 1 1 : 各開発品種の乾燥葉中に含まれる T S G 中の各ステビオール配糖体の比率

試料名	TSG 中の各ステビオール配糖体の比率									合計※
	Reb A	Reb B	Reb C	Reb D	ステビオシンド	Reb F	Reb M	RebN	新規ステビオール配糖体B	
開発品種B	66.6%	0.7%	7.2%	10.0%	4.1%	2.2%	4.9%	1.9%	1.328%	100%
開発品種X	30.8%	0.1%	6.0%	0.8%	58.0%	1.1%	0.0%	0.1%	0.000%	100%

※：合計含有量には、Reb A、Reb B、Reb C、Reb D、RebE、Reb F、RebG、RebI、Reb M、Reb N、ステビオシンド、ズルコサイドA、ステビオールピオシンド、ルプシンドおよび新規ステビオール配糖体Bが含まれる。

[表12]

表 1 2 : 8 種類の主要なステビオール配糖体※¹に対する新規配糖体Bの比率

試料名	ステビオール配糖体Bの比率
開発品種B	1.360%
開発品種X	0.000%

※1：表 1 1 に記載の Reb A、Reb B、Reb C、Reb D、Reb F、Reb M、Reb N およびステビオシンド

[表13]

表 1 3 : 各開発品種の乾燥葉中に含まれる各ステビオール配糖体の比率

試料名	乾燥葉中の各ステビオール配糖体の含有量									TSG
	Reb A	Reb B	Reb C	Reb D	ステビオシンド	Reb F	Reb M	RebN	新規ステビオール配糖体B	
開発品種B	4.9%	0.1%	0.5%	0.7%	0.3%	0.2%	0.4%	0.1%	0.099%	7.4%
開発品種X	4.7%	0.0%	0.9%	0.1%	8.8%	0.2%	0.0%	0.0%	0.000%	15.1%

[表14]

表 1 4 : 開発品種Bの乾燥葉中に含まれる各ステビオール配糖体に対する新規ステビオール配糖体Bの比率

試料名	乾燥葉中の各ステビオール配糖体に対する新規ステビオール配糖体Bの比率								
	Reb A	Reb B	Reb C	Reb D	ステビオシンド	Reb F	Reb M	RebN	Reb A+ステビオシンド
開発品種B	1.99%	178.85%	18.32%	13.29%	32.22%	59.12%	27.25%	71.02%	1.88%