(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2025年1月2日(02.01.2025)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2025/005216 A1

(51) 国際特許分類:
A01H 6/14 (2018.01) *C12N 5/04* (2006.01)
A01H 1/02 (2006.01) *C12N 5/10* (2006.01)
A01H 5/00 (2018.01) *C12P 33/00* (2006.01)
A23L 33/11 (2016.01) *C12Q 1/686* (2018.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2024/023454

(22) 国際出願日： 2024年6月28日(28.06.2024)

(25) 国際出願の言語： 日本語

(26) 国際公開の言語： 日本語

(30) 優先権データ：
特願 2023-108844 2023年6月30日(30.06.2023) JP

(71) 出願人: サントリーホールディングス株式会社(**SUNTORY HOLDINGS LIMITED**) [JP/JP]; 〒5308203 大阪府大阪市北区堂島浜２丁目１番４０号 Osaka (JP).

(72) 発明者: 平井 正良 (**HIRAI Tadayoshi**); 〒6190284 京都府相楽郡精華町精華台８－１－１ サントリー ワールドリサーチセンター内 Kyoto (JP). 岩城 一考(**IWAKI Kazunari**); 〒2110067 神奈川県川崎市中原区今井上町１３－２ サントリー商品開発センター内 Kanagawa (JP). 落合 兼太郎(**OCHIAI Kentaro**); 〒6190284 京都府相楽郡精華町精華台８－１－１ サントリー ワールドリサーチセンター内 Kyoto (JP). 宮川 克郎(**MIYAGAWA Katsuro**); 〒6190284 京都府相楽郡精華町精華台８－１－１ サントリー ワールドリサーチセンター内 Kyoto (JP). 岡田 絵美(**OKADA Emi**); 〒6190284 京都府相楽郡精華町精華台８－１－１ サントリー ワールドリサーチセンター内 Kyoto (JP). 小牧 真樹(**KOMAKI Maki**); 〒6190284 京都府相楽郡精華町精華台８－１－１ サントリー ワールドリサーチセンター内 Kyoto (JP).

(74) 代理人: 小林 浩, 外 (**KOBAYASHI Hiroshi** et al.); 〒1006612 東京都千代田区丸の内１丁目９番２号 グラントウキョウサウスタワー１２階 阿部・井窪・片山法律事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類：
— 国際調査報告（条約第21条(3)）
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト（規則5.2(a)）

WO 2025/005216 A1

(54) **Title:** STEVIA PLANT HAVING HIGH REBAUDIOSIDE N CONTENT

(54) 発明の名称： レバウジオシドＮ高含有ステビア植物

(57) **Abstract:** The present invention provides a stevia plant body containing a higher amount of useful steviol glycosides, such as RebN and RebD, than known stevia species. The present invention also provides a method for producing such a stevia plant body, and an extract or the like obtained from such a plant body.

(57) 要約：本発明は、既知のステビア種と比べRebNやRebD等の有用なステビオール配糖体をより高い含量で含むステビア植物体を提供する。本発明はまた、そのようなステビア植物体を作出する方法、そのような植物体から得られる抽出物等も提供する。

明　細　書

発明の名称 ： レバウジオシドＮ高含有ステビア植物

技術分野

[0001] 本発明は、レバウジオシドN、D等の有用なステビオール配糖体の含有量が高いステビア植物及びそのスクリーニング方法等に関する。

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] ステビオール配糖体は、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、主にステビアの葉から抽出、精製される。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。ステビオール配糖体としては、レバウジオシドA(Rebaudioside A、以下「レバウジオシド」(Rebaudioside)を「Reb」と略すことがある)、RebB、RebC、RebD、RebE、RebM、RebN等、様々な配糖体の存在が報告されている(特許文献2)。様々なステビオール配糖体の中で、例えばRebA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。その他のステビオール配糖体についても、その独自の甘さ及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、RebNを乾燥葉あたり2.17％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：WO2007/070224

特許文献2：WO2010/038911

特許文献3：WO2019/104253

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0006] RebNやRebDは天然のステビア植物体からは多くを得ることができず、その効率的な入手が求められている。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明は、野生型ステビア種と比べて高含有量でRebN、RebD等の有用なステビオール配糖体を含む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] 一態様において、本発明は以下を提供する。

[1] 以下の遺伝的特徴(1)～(10)の少なくとも1つを有するステビア植物体。

(1)配列番号1の151～152位に相当する部分の配列がCCAであるアレルについてホモ接合性。

(2)配列番号2の151位に相当する位置の塩基がGであるアレルについてホモ接合性又はヘテロ接合性。

(3)配列番号3の151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。

(4)配列番号4の151位に相当する位置の塩基がGであるアレルについてホモ接合性又はヘテロ接合性。

(5)配列番号5の151位に相当する位置の塩基がGであるアレルについてホモ接合性又はヘテロ接合性。

(6)配列番号6の151位に相当する位置の塩基がAであるアレルについてホモ接合性又はヘテロ接合性。

(7)配列番号7の151位に相当する位置の塩基がAであるアレルについてホモ接

合性又はヘテロ接合性。

(8)配列番号8の151位に相当する位置の塩基がGであるアレルについてホモ接合性。

(9)配列番号9の103位に相当する位置の塩基がGであるアレルについてホモ接合性。

(10)配列番号10の151位に相当する位置の塩基がAであるアレルについてホモ接合性。

[2] 以下の化学的特徴(i)～(viii)の少なくとも1つを有するステビア植物体。

(i)レバウジオシド(Reb)Nの含量が乾燥葉の単位質量当たり2.2%以上。

(ii)RebDの含量が乾燥葉の単位質量当たり6.3%以上。

(iii)RebNとRebDの合計含量が乾燥葉の単位質量当たり7.4%以上。

(iv)RebNとRebMの合計含量が乾燥葉の単位質量当たり2.9%以上。

(v)RebDとRebEの合計含量が乾燥葉の単位質量当たり5.8%以上。

(vi)RebNとRebDとRebMの合計含量が乾燥葉の単位質量当たり9%以上。

(vii)RebNとRebDとRebEの合計含量が乾燥葉の単位質量当たり5.9%以上。

(viii)RebCに対するRebNの質量比が3.8以上。

[3] [1]又は[2]に記載の植物体の死亡組織又は死亡細胞。

[4] [1]又は[2]に記載の植物体と第2のステビア植物体とを交雑させる工程を含む、[1]又は[2]に記載のステビア植物体を作出する方法。

[0009] [5] ステビア植物体のゲノムに以下の少なくとも1つの変異を導入する工程を含む、[1]又は[2]に記載のステビア植物体を作出する方法。

(1)配列番号1の151～152位に相当する部分の配列をCCAにする変異。

(2)配列番号2の151位に相当する位置の塩基をGにする変異。

(3)配列番号3の151位に相当する位置の塩基をTにする変異。

(4)配列番号4の151位に相当する位置の塩基をGにする変異。

(5)配列番号5の151位に相当する位置の塩基をGにする変異。

(6)配列番号6の151位に相当する位置の塩基をAにする変異。

(7)配列番号7の151位に相当する位置の塩基をAにする変異。

(8)配列番号8の151位に相当する位置の塩基をGにする変異。

(9)配列番号9の103位に相当する位置の塩基をGにする変異。

(10)配列番号10の151位に相当する位置の塩基をAにする変異。

[6] [1]若しくは[2]に記載の植物体、又は[3]に記載の死亡組織若しくは死亡細胞の抽出物。

[7] [1]若しくは[2]に記載の植物体、又は[3]に記載の死亡組織若しくは死亡細胞から抽出物を得る工程を含む、ステビオール配糖体含有抽出物の製造方法。

[8] [6]に記載の抽出物からステビオール配糖体を精製する工程を含む、ステビオール配糖体の製造方法。

[0010] [9] [1]若しくは[2]に記載の植物体の抽出物、[3]に記載の死亡組織若しくは死亡細胞の抽出物、或いは、[6]に記載の抽出物を提供する工程、及び
前記抽出物を、飲食品、甘味料組成物、香料又は医薬品の原料に添加する工程
を含む、飲食品、甘味料組成物、香料又は医薬品の製造方法。

[10] [1]若しくは[2]に記載の植物体の抽出物、[3]に記載の死亡組織若しくは死亡細胞の抽出物、或いは、[6]に記載の抽出物を含む飲食品、甘味料組成物、香料又は医薬品。

[11] [6]に記載の抽出物からステビオール配糖体を精製する工程、及び
精製されたステビオール配糖体を、飲食品、甘味料組成物、香料又は医薬品の原料に添加する工程
を含む、飲食品、甘味料組成物、香料又は医薬品の製造方法。

[12] 被験ステビア植物体から、[1]に記載の遺伝的特徴(1)～(10)の少なくとも1つの存在及び/又は不在を検出する工程を含む、[2]に記載の化学的特徴(i)～(viii)の少なくとも1つを有するステビア植物体をスクリーニングする方法。

[13] [1]に記載の遺伝的特徴(1)～(10)の少なくとも1つの存在及び/又は不

在を検出するための試薬を含む、[2]に記載の化学的特徴(i)～(viii)の少なくとも1つを有するステビア植物体のスクリーニングキット。

発明の効果

[0011] 本発明によって、有用なステビオール配糖体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葉、この葉より得られた有用なステビオール配糖体を含む食物や飲料等の提供が可能になる。

図面の簡単な説明

[0012] [図1]図1は、配列番号1の塩基配列における、遺伝的特徴(1)に係る変異の位置を示した図である。括弧内のスラッシュの左側が野生型配列、右側が変異型配列である。

[図2]図2は、配列番号2の塩基配列における、遺伝的特徴(2)に係る変異の位置を示した図である。括弧内のスラッシュの左側が野生型配列、右側が変異型配列である。

[図3]図3は、配列番号3の塩基配列における、遺伝的特徴(3)に係る変異の位置を示した図である。括弧内のスラッシュの左側が野生型配列、右側が変異型配列である。

[図4]図4は、配列番号4の塩基配列における、遺伝的特徴(4)に係る変異の位置を示した図である。括弧内のスラッシュの左側が野生型配列、右側が変異型配列である。

[図5]図5は、配列番号5の塩基配列における、遺伝的特徴(5)に係る変異の位置を示した図である。括弧内のスラッシュの左側が野生型配列、右側が変異型配列である。

[図6]図6は、配列番号6の塩基配列における、遺伝的特徴(6)に係る変異の位置を示した図である。括弧内のスラッシュの左側が野生型配列、右側が変異型配列である。

[図7]図7は、配列番号7の塩基配列における、遺伝的特徴(7)に係る変異の位置を示した図である。括弧内のスラッシュの左側が野生型配列、右側が変異

型配列である。

[図8]図8は、配列番号8の塩基配列における、遺伝的特徴(8)に係る変異の位置を示した図である。括弧内のスラッシュの左側が野生型配列、右側が変異型配列である。

[図9]図9は、配列番号9の塩基配列における、遺伝的特徴(9)に係る変異の位置を示した図である。括弧内のスラッシュの左側が野生型配列、右側が変異型配列である。

[図10]図10は、配列番号10の塩基配列における、遺伝的特徴(10)に係る変異の位置を示した図である。括弧内のスラッシュの左側が野生型配列、右側が変異型配列である。

[図11]図11は、配列番号119の塩基配列における、遺伝的特徴(11)に係る変異の位置を示した図である。括弧内のスラッシュの左側が野生型配列、右側が変異型配列である。

[図12]図12は、配列番号121の塩基配列における、遺伝的特徴(12)に係る変異の位置を示した図である。括弧内のスラッシュの左側が野生型配列、右側が変異型配列である。

[図13]図13は、配列番号123の塩基配列における、遺伝的特徴(13)に係る変異の位置を示した図である。括弧内のスラッシュの左側が野生型配列、右側が変異型配列である。

[図14]図14は、配列番号125の塩基配列における、遺伝的特徴(14)に係る変異の位置を示した図である。括弧内のスラッシュの左側が野生型配列、右側が変異型配列である。

[図15]図15は、配列番号127の塩基配列における、遺伝的特徴(15)に係る変異の位置を示した図である。括弧内のスラッシュの左側が野生型配列、右側が変異型配列である。

[図16]図16は、配列番号129の塩基配列における、遺伝的特徴(16)に係る変異の位置を示した図である。括弧内のスラッシュの左側が野生型配列、右側が変異型配列である。

[図17]図17は、配列番号131の塩基配列における、遺伝的特徴(17)に係る変異の位置を示した図である。括弧内のスラッシュの左側が野生型配列、右側が変異型配列である。

[図18]図18は、配列番号133の塩基配列における、遺伝的特徴(18)に係る変異の位置を示した図である。括弧内のスラッシュの左側が野生型配列、右側が変異型配列である。

[図19]図19は、配列番号135の塩基配列における、遺伝的特徴(19)に係る変異の位置を示した図である。括弧内のスラッシュの左側が野生型配列、右側が変異型配列である。

[図20]図20は、配列番号137の塩基配列における、遺伝的特徴(20)に係る変異の位置を示した図である。括弧内のスラッシュの左側が野生型配列、右側が変異型配列である。

[図21]図21は、ステビア植物体が遺伝的特徴(4)、(7)又は(9)を有するか否かをdCAPS法で分析した結果を示した図である。

発明を実施するための形態

[0013] 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。

なお、本明細書において引用した全ての文献、及び公開公報、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、2023年6月30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2023-108844号)の明細書及び図面に記載の内容を包含する。

[0014] 1.本発明の植物体

1-1.遺伝的特徴(1)～(10)の少なくとも1つを有するステビア植物体

一態様において、本発明は、以下の遺伝的特徴(1)～(10)の少なくとも1つを有するステビア植物体(以下、「本発明の植物体A」又は「本発明のステビア植物体A」と称する場合がある)を提供する。

(1)配列番号1の151～152位に相当する部分の配列がCCAであるアレルについてホモ接合性。

(2)配列番号2の151位に相当する位置の塩基がGであるアレルについてホモ接合性又はヘテロ接合性。

(3)配列番号3の151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。

(4)配列番号4の151位に相当する位置の塩基がGであるアレルについてホモ接合性又はヘテロ接合性。

(5)配列番号5の151位に相当する位置の塩基がGであるアレルについてホモ接合性又はヘテロ接合性。

(6)配列番号6の151位に相当する位置の塩基がAであるアレルについてホモ接合性又はヘテロ接合性。

(7)配列番号7の151位に相当する位置の塩基がAであるアレルについてホモ接合性又はヘテロ接合性。

(8)配列番号8の151位に相当する位置の塩基がGであるアレルについてホモ接合性。

(9)配列番号9の103位に相当する位置の塩基がGであるアレルについてホモ接合性。

(10)配列番号10の151位に相当する位置の塩基がAであるアレルについてホモ接合性。

以下、遺伝的特徴(1)～(10)を、「本発明の遺伝的特徴」と総称することがある。また、ステビアは、ステビア・レバウディアナ・ベルトニー(Stevia Rebaudiana Bertoni)の学名を有する植物である。

[0015] 好ましい態様において、遺伝的特徴(2)、(4)～(7)は以下の通りヘテロ接合性である。

(2')配列番号2の151位に相当する位置の塩基がGであるアレルについてヘテロ接合性。

(4')配列番号4の151位に相当する位置の塩基がGであるアレルについてヘテロ

接合性。

(5')配列番号5の151位に相当する位置の塩基がGであるアレルについてヘテロ接合性。

(6')配列番号6の151位に相当する位置の塩基がAであるアレルについてヘテロ接合性。

(7')配列番号7の151位に相当する位置の塩基がAであるアレルについてヘテロ接合性。

[0016] 「～に相当する位置/部分」とは、ゲノム中に基準配列(例えば、配列番号1～10等)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/部分(例えば、151～152位、151位、103位等)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/部分に相当する位置/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/部分に相当する位置/部分は、基準配列中の位置/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/部分に相当する位置/部分を決定することができる。

[0017] 例えば、本発明の遺伝的特徴(1)の「配列番号1の151～152位に相当する部

分」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151～152位に相当する部分」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151～152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151～152位に相当する部分」は、必ずしも配列番号1に相当する部分の5’側から151～152位に該当するわけではないが、配列番号1の151～152位の前後の塩基配列等を考慮し、かかるステビア植物のゲノムにおける「配列番号1の151～152位に相当する部分」を特定することができる。例えば、ステビア植物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、ステビア植物のゲノムにおける「配列番号1の151～152位に相当する部分」を特定することができる。

[0018] ここで、(1)配列番号1の151～152位に相当する部分、(2)配列番号2の151位に相当する位置、(3)配列番号3の151位に相当する位置、(4)配列番号4の151位に相当する位置、(5)配列番号5の151位に相当する位置、(6)配列番号6の151位に相当する位置、(7)配列番号7の151位に相当する位置、(8)配列番号8の151位に相当する位置、(9)配列番号9の103位に相当する位置、及び(10)配列番号10の151位に相当する位置からなる群から選択される位置を、「本発明の多型部位」又は「本発明の変異部位」と総称することがある。また、上記(1)～(10)の各位置/部分を、「多型部位(1)」、「多型部位(2)」、又は「変異部位(1)」、「変異部位(2)」などと称することがある。

[0019] 「配列番号1に相当する塩基配列からなる部分」は、例えば、配列番号1の塩基配列に対し、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

配列からなる部分を意味する。

[0020] 一部の態様において、「配列番号1に相当する塩基配列からなる部分」には、配列番号1の5’末端から1～150位(すなわち、配列番号1の5’末端から、変異部位(1)の1塩基5’末端側の塩基まで)の部分の相補配列にハイブリダイズするフォワードプライマーと、配列番号1の3’末端側から1～148位(すなわち、配列番号1の3’末端から、変異部位(1)の1塩基3’末端側の塩基まで)の部分にハイブリダイズする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。

ここでは簡潔のため本発明の遺伝的特徴(1)を例に説明したが、本発明の遺伝的特徴(2)～(10)についても同様である。

[0021] 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11の塩基配列を含むフォワードプライマーと、配列番号12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のゲノムの部分が含まれる。

特定の態様において、「配列番号2に相当する塩基配列からなる部分」には、例えば、配列番号13の塩基配列を含むフォワードプライマーと、配列番号14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のゲノムの部分が含まれる。

特定の態様において、「配列番号3に相当する塩基配列からなる部分」には、例えば、配列番号15の塩基配列を含むフォワードプライマーと、配列番号16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のゲノムの部分が含まれる。

特定の態様において、「配列番号4に相当する塩基配列からなる部分」には、例えば、配列番号17の塩基配列を含むフォワードプライマーと、配列番号18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のゲノムの部分が含まれる。

特定の態様において、「配列番号5に相当する塩基配列からなる部分」には、例えば、配列番号19の塩基配列を含むフォワードプライマーと、配列番号2

0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のゲノムの部分が含まれる。

特定の態様において、「配列番号6に相当する塩基配列からなる部分」には、例えば、配列番号21の塩基配列を含むフォワードプライマーと、配列番号22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のゲノムの部分が含まれる。

特定の態様において、「配列番号7に相当する塩基配列からなる部分」には、例えば、配列番号23の塩基配列を含むフォワードプライマーと、配列番号24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のゲノムの部分が含まれる。

特定の態様において、「配列番号8に相当する塩基配列からなる部分」には、例えば、配列番号25の塩基配列を含むフォワードプライマーと、配列番号26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のゲノムの部分が含まれる。

特定の態様において、「配列番号9に相当する塩基配列からなる部分」には、例えば、配列番号27の塩基配列を含むフォワードプライマーと、配列番号28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のゲノムの部分が含まれる。

特定の態様において、「配列番号10に相当する塩基配列からなる部分」には、例えば、配列番号29の塩基配列を含むフォワードプライマーと、配列番号30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のゲノムの部分が含まれる。

[0022] 特定の態様において、「配列番号1の151～152位に相当する部分の配列がCCAであるアレル」は、配列番号31、32、33又は34の塩基配列を含む。

特定の態様において、「配列番号2の151位に相当する位置の塩基がGであるアレル」は、配列番号35、36、37又は38の塩基配列を含む。

特定の態様において、「配列番号3の151位に相当する位置の塩基がTであるアレル」は、配列番号39、40、41又は42の塩基配列を含む。

特定の態様において、「配列番号4の151位に相当する位置の塩基がGであるアレル」は、配列番号43、44、45又は46の塩基配列を含む。

特定の態様において、「配列番号5の151位に相当する位置の塩基がGであるアレル」は、配列番号47、48、49又は50の塩基配列を含む。

特定の態様において、「配列番号6の151位に相当する位置の塩基がAであるアレル」は、配列番号51、52、53又は54の塩基配列を含む。

特定の態様において、「配列番号7の151位に相当する位置の塩基がAであるアレル」は、配列番号55、56、57又は58の塩基配列を含む。

特定の態様において、「配列番号8の151位に相当する位置の塩基がGであるアレル」は、配列番号59、60、61又は62の塩基配列を含む。

特定の態様において、「配列番号9の103位に相当する位置の塩基がGであるアレル」は、配列番号63、64、65又は66の塩基配列を含む。

特定の態様において、「配列番号10の151位に相当する位置の塩基がAであるアレル」は、配列番号67、68、69又は70の塩基配列を含む。

[0023] また、(1)配列番号1の151～152位に相当する部分におけるCAからCCAへの変異、(2)配列番号2の151位に相当する位置におけるAからGへの変異、(3)配列番号3の151位に相当する位置におけるGからTへの変異、(4)配列番号4の151位に相当する位置におけるAからGへの変異、(5)配列番号5の151位に相当する位置におけるAからGへの変異、(6)配列番号6の151位に相当する位置におけるTからAへの変異、(7)配列番号7の151位に相当する位置におけるGからAへの変異、(8)配列番号8の151位に相当する位置におけるCからGへの変異、(9)配列番号9の103位に相当する位置におけるAからGへの変異、及び(10)配列番号10の151位に相当する位置におけるTからAへの変異からなる群から選択される変異を、「本発明の多型」又は「本発明の変異」と総称することがある。また、上記(1)～(10)の各変異を、「本発明の多型(1)」、「本発明の多型(2)」、又は「本発明の変異(1)」、「本発明の変異(2)」などと称することがある。

[0024] 上記の遺伝的特徴は、PCR法、リアルタイムPCR法(例えば、TaqMan PCRなどのハイブリダイゼーション法、インターカレーション法など)、シーケンス法

、マイクロアレイ法、インベーダー法、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 polymorphic 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。

[0025] 特定の態様において、本発明の遺伝的特徴は、以下のプライマーセット及び制限酵素の組合せによるdCAPS法で検出することが可能である。

候補植物体が変異(4')を有する場合、例えば、候補植物体のゲノムDNAに対し、配列番号71に示す塩基配列を有するフォワードプライマー及び配列番号72に示す塩基配列を有するリバースプライマーを用いてPCR増幅を行い、得られたPCR産物(約300bp長、例えば、配列番号73)を制限酵素NdeIで処理すると、約36bp長のバンド(例えば、配列番号74)と約264bp長のバンド(例えば、配列番号75)とが得られる。一方、候補植物体が変異(4')を有しない場合、上記と同様にPCR増幅を行い、得られたPCR産物(約300bp長、例えば、配列番号76)を制限酵素NdeIで処理しても約300bp長のバンド(例えば、配列番号76)しか得られない。したがって、上記のdCAPS法により、分解物に由来する約36bp長のバンド及び/又は約264bp長のバンドと、非分解物に由来する約300bp長のバンドとが認められた場合、本発明の遺伝的特徴(4')を有すると決定することができる。上記手法により遺伝的特徴(4')を検出した例を図21に示す。

[0026] 候補植物体が変異(7')を有する場合、例えば、候補植物体のゲノムDNAに対

し、配列番号77に示す塩基配列を有するフォワードプライマー及び配列番号78に示す塩基配列を有するリバースプライマーを用いてPCR増幅を行い、得られたPCR産物(約264bp長、例えば、配列番号79)を制限酵素SspIで処理すると、約224bp長のバンド(例えば、配列番号80)と約40bp長のバンド(例えば、配列番号81)とが得られる。一方、候補植物体が変異(7')を有しない場合、上記と同様にPCR増幅を行い、得られたPCR産物(約264bp長、例えば、配列番号82)を制限酵素SspIで処理しても約264bp長のバンド(例えば、配列番号82)しか得られない。したがって、上記のdCAPS法により、分解物に由来する約224bp長のバンド及び/又は約40bp長のバンドと、非分解物に由来する約264bp長のバンドとが認められた場合、本発明の遺伝的特徴(7')を有すると決定することができる。上記手法により遺伝的特徴(7')を検出した例を図21に示す。

[0027] 候補植物体が変異(9)を有する場合、例えば、候補植物体のゲノムDNAに対し、配列番号83に示す塩基配列を有するフォワードプライマー及び配列番号84に示す塩基配列を有するリバースプライマーを用いてPCR増幅を行い、得られたPCR産物(約179bp長、例えば、配列番号85)を制限酵素SnaBIで処理すると、約39bp長のバンド(例えば、配列番号86)と約140bp長のバンド(例えば、配列番号87)とが得られる。一方、候補植物体が変異(9)を有しない場合、上記と同様にPCR増幅を行い、得られたPCR産物(約179bp長、例えば、配列番号88)を制限酵素SnaBIで処理しても約179bp長のバンド(例えば、配列番号88)しか得られない。したがって、上記のdCAPS法により、分解物に由来する約39bp長のバンド及び/又は約140bp長のバンドが認められた場合、本発明の遺伝的特徴(9)を有すると決定することができる。上記手法により遺伝的特徴(9)を検出した例を図21に示す。

[0028] 一部の態様において、本発明の植物体Aは、遺伝的特徴(4')、(7')及び(9)を有しないステビア植物体(以下、対照植物体と称することがある)に比べ、RebD、RebE、RebN、ステビオシド(以下、STと略すことがある)、総ステビオール配糖体、RebD+N(RebDとRebNの合計。以下同様)、RebD+M+N、RebN+M、RebD+E、及びRebD+E+Nの含量、並びにRebC含量に対するRebN含量の比(RebN/RebC)

から選択される少なくとも1つの特性が高い。「対照植物体より高い」とは、例えば、同じ栽培条件で栽培した場合、上記成分の含量(例えば、乾燥葉中の含量)又は含量比が対照植物体より多いこと、好ましくは統計学的に有意に多いことを意味する。より具体的には、例えば、同じ栽培条件で栽培した場合、乾燥葉中の上記成分の含量又は含量比が対照植物体における含量又は含量比の1倍超、約1.1倍以上、約1.2倍以上、約1.3倍以上、約1.4倍以上、約1.5倍以上、約1.6倍以上、約1.7倍以上、約1.8倍以上、約1.9倍以上、約2倍以上、約2.1倍以上、約2.2倍以上、約2.3倍以上、約2.4倍以上、約2.5倍以上、約2.6倍以上、約2.7倍以上、約2.8倍以上、約2.9倍以上、約3倍以上、約3.1倍以上、約3.2倍以上、約3.3倍以上、約3.4倍以上、約3.5倍以上、約3.6倍以上、約3.7倍以上、約3.8倍以上、約3.9倍以上、約4倍以上、約4.1倍以上、約4.2倍以上、約4.3倍以上、約4.4倍以上、約4.5倍以上、約4.6倍以上、約4.7倍以上、約4.8倍以上、約4.9倍以上、約5倍以上、約6倍以上、約7倍以上、約8倍以上、約9倍以上、約10倍以上、約15倍以上、約20倍以上、約25倍以上、約30倍以上、約35倍以上、約40倍以上、約45倍以上、約50倍以上、約55倍以上、約60倍以上、約65倍以上、約70倍以上、約75倍以上、約80倍以上、約85倍以上、約90倍以上、約95倍以上又は約100倍以上等であることを意味する。また、例えば、本発明の植物体Aの集団における乾燥葉中の上記成分の含量又は含量比と対照植物体の集団における乾燥葉中の上記成分の含量又は含量比とをWelchのt検定で検定した場合、前者の平均値が後者の平均値より大きく、かつ、両側検定のP値が0.05未満、好ましくは0.01未満、特に好ましくは0.005未満であることを意味する。比較する含量は、複数の個体の平均値であってよい。

[0029] 総ステビオール配糖体(Total Steviol Glycoside：TSG)とは、測定可能なステビオール配糖体の総称であり、未知のステビオール配糖体や、検出限界未満の量で存在するステビオール配糖体を含まない。好ましくは、TSGは、RebA、RebB、RebC、RebD、RebE、RebF、RebG、RebI、RebJ、RebK、RebM、RebN、RebO、RebQ、RebR、ズルコシドA、ルブソシド、ステビオールモノシド、ス

テビオールビオシド及びST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。特定の態様において、TSGは、RebA、RebB、RebC、RebD、RebE、RebF、RebI、RebJ、RebM、RebN及びSTからなる。

[0030] 一部の態様において、本発明の植物体Aは、対照植物体に比べRebIの含量が低い。「対照植物体より含量が低い」とは、例えば、同じ栽培条件で栽培した場合、上記成分の含量(例えば、乾燥葉中の含量)が対照植物体より少ないこと、好ましくは統計学的に有意に少ないことを意味する。より具体的には、例えば、同じ栽培条件で栽培した場合、乾燥葉中の上記成分の含量が対照植物体における含量の1倍未満、約0.98倍以下、約0.96倍以下、約0.94倍以下、約0.92倍以下、約0.9倍以下、約0.88倍以下、約0.86倍以下、約0.84倍以下、約0.82倍以下、約0.8倍以下、約0.78倍以下、約0.76倍以下、約0.74倍以下、約0.72倍以下、約0.7倍以下、約0.65倍以下、約0.6倍以下、約0.55倍以下、約0.5倍以下、約0.45倍以下、約0.4倍以下、約0.38倍以下、約0.36倍以下、約0.35倍以下、約0.34倍以下、約0.32倍以下、約0.3倍以下、約0.28倍以下、約0.27倍以下、約0.26倍以下、約0.25倍以下、約0.24倍以下、約0.22倍以下、約0.2倍以下、約0.18倍以下、約0.16倍以下、約0.15倍以下、約0.14倍以下、約0.12倍以下、約0.1倍以下、約0.08倍以下、約0.06倍以下、約0.04倍以下、又は約0.02倍以下などであることを意味する。また、例えば、本発明の植物体Aの集団における乾燥葉中の上記成分の含量と対照植物体の集団における乾燥葉中の上記成分の含量とをWelchのt検定で検定した場合、前者の平均値が後者の平均値より小さく、かつ、両側検定のP値が0.05未満、好ましくは0.01未満、特に好ましくは0.005未満であることを意味する。比較する含量は、複数の個体の平均値であってよい。

[0031] 一部の態様において、本発明の植物体Aは、上記の遺伝的特徴(1)～(10)を複数有していてもよい。この態様において、遺伝的特徴の数は2～10種のいずれか、すなわち、2、3、4、5、6、7、8、9又は10種であってよい。特定の態様において、本発明の植物体Aは、遺伝的特徴(4')、(7')及び(9)を有する。

[0032] 1-2.化学的特徴(i)～(viii)の少なくとも1つを有するステビア植物体

一態様において、本発明は、以下の化学的特徴(i)～(viii)の少なくとも1つを有するステビア植物体(以下、「本発明の植物体B」又は「本発明のステビア植物体B」と総称する場合がある)を提供する。

(i)RebNの含量が乾燥葉の単位質量当たり2.2%以上。

(ii)RebDの含量が乾燥葉の単位質量当たり6.3%以上。

(iii)RebNとRebDの合計含量が乾燥葉の単位質量当たり7.4%以上。

(iv)RebNとRebMの合計含量が乾燥葉の単位質量当たり2.9%以上。

(v)RebDとRebEの合計含量が乾燥葉の単位質量当たり5.8%以上。

(vi)RebNとRebDとRebMの合計含量が乾燥葉の単位質量当たり9%以上。

(vii)RebNとRebDとRebEの含量が乾燥葉の単位質量当たり5.9%以上。

(viii)RebCに対するRebNの質量比が3.8以上。

[0033] 化学的特徴(i)を有する本発明の植物体Bにおいて、RebNの含量が乾燥葉の単位質量当たり2.2%以上とは、例えば、所定の質量の乾燥葉(例えば、50mg)に、2.2質量%以上の割合のRebN(例えば、1.1mg以上)が含まれることを意味する。この態様における乾燥葉の単位質量当たりのRebNの割合は、限定されずに、例えば、2.2%以上、2.25%以上、2.3%以上、2.35%以上、2.4%以上、2.45%以上、2.5%以上、2.55%以上、2.6%以上、2.65%以上、2.7%以上、2.75%以上、2.8%以上、2.85%以上、2.9%以上、2.95%以上、3%以上、3.05%以上、3.1%以上、3.15%以上、3.2%以上、3.25%以上、3.3%以上、3.35%以上、3.4%以上、3.45%以上、3.5%以上、3.55%以上、3.6%以上、3.65%以上、3.7%以上、3.75%以上、3.8%以上、3.85%以上、3.9%以上、3.95%以上、4%以上等であってよい。乾燥葉の単位質量当たりのRebNの割合の上限は特に限定されないが、例えば、10%、8%、6%、5%等であってよい。

ここで乾燥葉とは、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3～4重量%にまで減らし、細胞を致死させたものをいう。

[0034] 化学的特徴(ii)を有する本発明の植物体Bにおいて、RebDの含量が乾燥葉の単位質量当たり6.3%以上とは、例えば、所定の質量の乾燥葉(例えば、50mg)に、6.3質量%以上の割合のRebD(例えば、3.15mg以上)が含まれることを意味

する。この態様における乾燥葉の単位質量当たりのRebDの割合は、限定されずに、例えば、6.3%以上、6.35%以上、6.4%以上、6.45%以上、6.5%以上、6.55%以上、6.6%以上、6.65%以上、6.7%以上、6.75%以上、6.8%以上、6.85%以上、6.9%以上、6.95%以上、7%以上、7.05%以上、7.1%以上、7.15%以上、7.2%以上、7.25%以上、7.3%以上、7.35%以上、7.4%以上、7.45%以上、7.5%以上等であってよい。乾燥葉の単位質量当たりのRebDの割合の上限は特に限定されないが、例えば、20%、15%、12%、10%等であってよい。

[0035] 化学的特徴(iii)を有する本発明の植物体Bにおいて、RebNとRebDの合計含量が乾燥葉の単位質量当たり7.4%以上とは、例えば、所定の質量の乾燥葉(例えば、50mg)に含まれるRebNとRebDとの合計質量が、7.4質量%以上(例えば、3.7mg以上)であることを意味する。この態様における乾燥葉の単位質量当たりのRebNとRebDの合計の割合は、限定されずに、例えば、7.4%以上、7.5%以上、7.6%以上、7.7%以上、7.8%以上、7.9%以上、8%以上、8.1%以上、8.2%以上、8.3%以上、8.4%以上、8.5%以上、8.6%以上、8.7%以上、8.8%以上、8.9%以上、9%以上、9.1%以上、9.2%以上、9.3%以上、9.4%以上、9.5%以上、9.6%以上、9.7%以上、9.8%以上、9.9%以上、10%以上、10.1%以上、10.2%以上、10.3%以上、10.4%以上、10.5%以上、10.6%以上、10.7%以上、10.8%以上、10.9%以上、11%以上等であってよい。乾燥葉の単位質量当たりのRebNとRebDとの合計の割合の上限は特に限定されないが、例えば、25%、20%、18%、15%等であってよい。

[0036] 化学的特徴(iv)を有する本発明の植物体Bにおいて、RebNとRebMの合計含量が乾燥葉の単位質量当たり2.9%以上とは、例えば、所定の質量の乾燥葉(例えば、50mg)に含まれるRebNとRebMとの合計質量が、2.9質量%以上(例えば、1.45mg以上)であることを意味する。この態様における乾燥葉の単位質量当たりのRebNとRebMの合計の割合は、限定されずに、例えば、2.9%以上、2.95%以上、3%以上、3.05%以上、3.1%以上、3.15%以上、3.2%以上、3.25%以上、3.3%以上、3.35%以上、3.4%以上、3.45%以上、3.5%以上、3.55%以上、3.6%以上、3.65%以上、3.7%以上、3.75%以上、3.8%以上、3.85%以上、3.9%以上、3.95%

以上、4%以上、4.1%以上、4.2%以上、4.3%以上、4.4%以上、4.5%以上、4.6%以上、4.7%以上、4.8%以上、4.9%以上、5%以上等であってよい。乾燥葉の単位質量当たりのRebNとRebMとの合計の割合の上限は特に限定されないが、例えば、10%、8%、6%、5%等であってよい。

[0037] 化学的特徴(v)を有する本発明の植物体Bにおいて、RebDとRebEの合計含量が乾燥葉の単位質量当たり5.8%以上とは、例えば、所定の質量の乾燥葉(例えば、50mg)に含まれるRebDとRebEとの合計質量が、5.8質量%以上(例えば、2.9mg以上)であることを意味する。この態様における乾燥葉の単位質量当たりのRebDとRebEの合計の割合は、限定されずに、例えば、5.8%以上、5.9%以上、6%以上、6.1%以上、6.2%以上、6.3%以上、6.4%以上、6.5%以上、6.6%以上、6.7%以上、6.8%以上、6.9%以上、7%以上、7.1%以上、7.2%以上、7.3%以上、7.4%以上、7.5%以上、7.6%以上、7.7%以上、7.8%以上、7.9%以上、8%以上、8.1%以上、8.2%以上、8.3%以上、8.4%以上、8.5%以上、8.6%以上、8.7%以上、8.8%以上、8.9%以上、9%以上、9.1%以上、9.2%以上、9.3%以上、9.4%以上、9.5%以上、9.6%以上、9.7%以上、9.8%以上、9.9%以上、10%以上等であってよい。乾燥葉の単位質量当たりのRebDとRebEとの合計の割合の上限は特に限定されないが、例えば、25%、20%、18%、15%等であってよい。

[0038] 化学的特徴(vi)を有する本発明の植物体Bにおいて、RebNとRebDとRebMの合計含量が乾燥葉の単位質量当たり9%以上とは、例えば、所定の質量の乾燥葉(例えば、50mg)に含まれるRebNとRebDとRebMとの合計質量が、9質量%以上(例えば、4.5mg以上)であることを意味する。この態様における乾燥葉の単位質量当たりのRebNとRebDとRebMの合計の割合は、限定されずに、例えば、9.1%以上、9.2%以上、9.3%以上、9.4%以上、9.5%以上、9.6%以上、9.7%以上、9.8%以上、9.9%以上、10%以上、10.1%以上、10.2%以上、10.3%以上、10.4%以上、10.5%以上、10.6%以上、10.7%以上、10.8%以上、10.9%以上、11%以上、11.1%以上、11.2%以上、11.3%以上、11.4%以上、11.5%以上、11.6%以上、11.7%以上、11.8%以上、11.9%以上、12%以上等であってよい。乾燥葉の単位質量当たりのRebNとRebDとRebMとの合計の割合の上限は特に限定されないが、例え

ば、25%、20%、18%、15%等であってよい。

[0039] 化学的特徴(vii)を有する本発明の植物体Bにおいて、RebNとRebDとRebEの含量が乾燥葉の単位質量当たり5.9%以上とは、例えば、所定の質量の乾燥葉(例えば、50mg)に含まれるRebNとRebDとRebEとの合計質量が、5.9質量%以上(例えば、2.95mg以上)であることを意味する。この態様における乾燥葉の単位質量当たりのRebNとRebDとRebEの合計の割合は、限定されずに、例えば、5.9%以上、6%以上、6.2%以上、6.4%以上、6.6%以上、6.8%以上、7%以上、7.2%以上、7.4%以上、7.6%以上、7.8%以上、8%以上、8.2%以上、8.4%以上、8.6%以上、8.8%以上、9%以上、9.2%以上、9.4%以上、9.6%以上、9.8%以上、10%以上、10.2%以上、10.4%以上、10.6%以上、10.8%以上、11%以上、11.2%以上、11.4%以上、11.6%以上、11.8%以上、12%以上、12.2%以上、12.4%以上、12.6%以上、12.8%以上、13%以上以上等であってよい。乾燥葉の単位質量当たりのRebNとRebDとRebEとの合計の割合の上限は特に限定されないが、例えば、25%、20%、18%、15%等であってよい。

[0040] 化学的特徴(viii)を有する本発明の植物体Bにおいて、RebCに対するRebNの質量比が3.8以上とは、例えば葉(例えば、乾燥葉又は新鮮葉)に含まれるRebNの質量を、同じ葉から得られたRebCの質量に対する比率としてRebN/RebCで表した場合、RebN/RebCの値が3.8以上であることを意味する。この態様におけるRebN/RebCの値は、限定されずに、例えば、3.8以上、3.9以上、4以上、4.1以上、4.2以上、4.3以上、4.4以上、4.5以上、4.6以上、4.7以上、4.8以上、4.9以上、5以上、5.1以上、5.2以上、5.3以上、5.4以上、5.5以上、5.6以上、5.7以上、5.8以上、5.9以上、6以上、6.1以上、6.2以上、6.3以上、6.4以上、6.5以上等であってよい。RebCに対するRebNの質量比の上限は特に限定されないが、例えば、15、12、10、8等であってよい。

[0041] 一部の態様において、本発明の植物体Bは、上記の化学的特徴を複数有していてもよい。この態様において、化学的特徴の数は2～8種のいずれか、すなわち、2、3、4、5、6、7又は8種であってよい。

[0042] 特定の態様において、本発明は、遺伝的特徴(1)～(10)の少なくとも1つと

、化学的特徴(i)～(viii)の少なくとも1つとを有するステビア植物体(以下、「本発明の植物体C」又は「本発明のステビア植物体C」と総称する場合がある)を提供する。

なお、本発明の植物体A～Cを「本発明の植物体」と総称することがある。

[0043] RebD、RebE、RebM、RebN等のステビオール配糖体は、本発明の植物体の新鮮葉又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Ohta et al.,J. Appl. Glycosci., Vol. 57, No. 3, 199-209 (2010)又はWO2010/038911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個々のステビオール配糖体、例えばRebD、RebE、RebM、RebN等を精製することができる。

[0044] RebD、RebE、RebM、RebN等のステビオール配糖体の含量は、上記Ohta et al.又はWO2010/038911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、例えば、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を行うこと等により測定することができる。

[0045] 本発明の植物体は、遺伝子組換え的手法により得られたもの又はその子孫(以下、「遺伝子組換え植物体」と称することがある)であっても、非遺伝子組換え的手法により得られたもの又はその子孫(以下、「非遺伝子組換え植物体」と称することがある)であってもよい。「非遺伝子組換え的手法」の例としては、交雑や自殖等のほか、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、EMSは、0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%、1.0%等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、例えば、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] 或いは、非遺伝子組換え的手法の例としてX線、γ線、イオンビーム(例えば重イオンビーム)、紫外線等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、例えば、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、選択培地等で培養させた後、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、細胞融合、葯培養(半数体育成)、遠縁交雑(半数体育成)等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。

本発明の植物体を宿主として事後的に遺伝子組換え(例えばゲノム編集等により)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。

[0048] 本発明の植物体には植物体全体のみならず、その部分又は派生物も含まれる。したがって、本発明の植物体には、植物器官(例えば葉、花弁、茎、根、

種子等)、植物組織(例えば表皮、師部、柔組織、木部、維管束、柵状組織、海綿状組織等)或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、カルス等が含まれ得る。

[0049] 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。本発明の植物体の再生可能な形態の例としては、胚、分裂組織細胞、花粉、葉、根、根端、花弁、プロトプラスト、葉の切片及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。

[0050] 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、本発明のステビア植物体を作出する方法(以下、「本発明の作出方法A」と称する場合がある)を提供する。当該方法により作出されるステビア植物体は、本発明の植物体と同じ表現型と遺伝的特徴を有し得る。

本発明の作出方法Aによって得られる植物体における各成分の含量及び質量比の範囲、各特徴(化学的特徴及び/又は遺伝的特徴)の組合せ等は、本発明の植物体について上記したとおりである。

[0051] 本発明の作出方法Aにおいて、「交雑させる」とは、本発明の植物体のいずれか1つ(第一代(S1))と、第2の植物体(S1)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(第二代(S2))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、例えば、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(S2)を、さらに本発明の植物体(つまり、本発明の遺伝的特徴を有する植物体)(S1)と交雑させて、本発明の遺伝子的特徴を有する植物体を作出する手法である。本発明の作出方法に用いられる第2の植物体(S1)が、本発明の植物体と同じ表現型と遺伝的特徴を有する場合には、実質的に戻し交雑となる。交雑は二代以上に亘って行うことが好ましいが、遺伝的特徴がヘテロ接合性等の場合は、一代で所望の遺伝的特徴の組合せを有する植物体が得られることがある。

或いは、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。

[0052] 本発明の作出方法により作出される植物体は、表現型及び遺伝的特徴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交雑させることにより、本発明の植物体と同等の表現型を有するステビア植物体を作出することも可能である。

[0053] 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, vol. 1391, pp113-123)。

[0054] さらに別の態様として、本発明の植物体は、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。したがって、本発明は、ステビア植物体のゲノムに以下の少なくとも1つの変異を導入する工程を含む、本発明のステビア植物体を作出する方法(以下、「本発明の作出方法B」と称する場合がある)を提供する。

(1)配列番号1の151～152位に相当する部分の配列をCCAにする変異。

(2)配列番号2の151位に相当する位置の塩基をGにする変異。

(3)配列番号3の151位に相当する位置の塩基をTにする変異。

(4)配列番号4の151位に相当する位置の塩基をGにする変異。

(5)配列番号5の151位に相当する位置の塩基をGにする変異。

(6)配列番号6の151位に相当する位置の塩基をAにする変異。

(7)配列番号7の151位に相当する位置の塩基をAにする変異。

(8)配列番号8の151位に相当する位置の塩基をGにする変異。

(9)配列番号9の103位に相当する位置の塩基をGにする変異。

(10)配列番号10の151位に相当する位置の塩基をAにする変異。

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。遺伝子組換え的手法の例としては、ゲノム編集などにより宿主細胞(又は宿主植物体)のゲノムに所望の変異を導入する方法が挙げられる。非遺伝子組換え的手法については、本発明の植物体について上記したとおりである。

[0055] 3.本発明の植物体のスクリーニング方法

本発明の植物体及び本発明の植物体と同じ表現型及び/又は遺伝的特徴を有する植物体は、当該植物体の組織から本発明の遺伝的特徴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、別の側面において、被験ステビア植物体から、遺伝的特徴(1)～(10)の少なくとも1つの存在及び/又は不在を検出する工程を含む、化学的特徴(i)～(viii)の少なくとも1つを有する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」と称する場合がある)を提供する。

本発明のスクリーニング方法は、上記の少なくとも1つの遺伝的特徴の存在が検出された植物体を被験植物の中から選択する工程をさらに含んでもよい。

[0056] 本発明の遺伝的特徴の存在は、例えば、

(I)配列番号1の151～152位に相当する部分の配列がCCAであるアレル(例えば、配列番号31、32、33又は34の塩基配列を含むアレル、以下、「アレルi」と称することがある)以外のアレルの不在、

(II)配列番号2の151位に相当する位置の塩基がGであるアレル(例えば、配列番号35、36、37又は38の塩基配列を含むアレル、以下、「アレルii」と称することがある)の存在、

(III)配列番号3の151位に相当する位置の塩基がTであるアレル(例えば、配列番号39、40、41又は42の塩基配列を含むアレル、以下、「アレルiii」と称す

ることがある)以外のアレルの不在、

(IV)配列番号4の151位に相当する位置の塩基がGであるアレル(例えば、配列番号43、44、45又は46の塩基配列を含むアレル、以下、「アレルiv」と称することがある)の存在、

(V)配列番号5の151位に相当する位置の塩基がGであるアレル(例えば、配列番号47、48、49又は50の塩基配列を含むアレル、以下、「アレルv」と称することがある)の存在、

(VI)配列番号6の151位に相当する位置の塩基がAであるアレル(例えば、配列番号51、52、53又は54の塩基配列を含むアレル、以下、「アレルvi」と称することがある)の存在、

(VII)配列番号7の151位に相当する位置の塩基がAであるアレル(例えば、配列番号55、56、57又は58の塩基配列を含むアレル、以下、「アレルvii」と称することがある)の存在、

(VIII)配列番号8の151位に相当する位置の塩基がGであるアレル(例えば、配列番号59、60、61又は62の塩基配列を含むアレル、以下、「アレルviii」と称することがある)以外のアレルの不在、

(IX)配列番号9の103位に相当する位置の塩基がGであるアレル(例えば、配列番号63、64、65又は66の塩基配列を含むアレル、以下、「アレルix」と称することがある)以外のアレルの不在、及び/又は

(X)配列番号10の151位に相当する位置の塩基がTであるアレル(例えば、配列番号67、68、69又は70の塩基配列を含むアレル、以下、「アレルx」と称することがある)以外のアレルの不在の検出

により決定することができる。

[0057] 本発明の遺伝的特徴の不在は、例えば、

(i)アレルiの不在、

(ii)アレルiiの不在、

(iii)アレルiiiの不在、

(iv)アレルivの不在、

(v)アレルvの不在、

(vi)アレルviの不在、

(vii)アレルviiの不在

(viii)アレルviiiの不在

(ix)アレルixの不在及び/又は

(x)アレルxの不在の検出

により決定することができる。

[0058] 本発明の遺伝的特徴の検出方法の具体例としては、PCR法、リアルタイムPCR法(例えば、TaqMan PCRなどのハイブリダイゼーション法、インターカレーション法など)、シーケンス法、マイクロアレイ法、インベーダー法、TILLING法、RAD法、RFLP法、PCR-SSCP法、AFLP法、SSLP法、CAPS法、dCAPS法、ASO法、ARMS法、DGGE法、CCM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法、UCAN法、ECA法、PINPOINT法、PROBE法、VSET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、融解曲線分析法等が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

[0059] 一態様において、本発明の遺伝的特徴(4)は、例えば、以下のプライマーセットと制限酵素とを用いたdCAPS法により検出することができる。

・プライマーセット：

配列番号71の3’末端から15～39塩基長の連続する配列を含むフォワードプライマーと、配列番号73又は76の40位より3’側に位置する任意の連続する15塩基以上の配列に相補的な配列(例えば、配列番号72)を含むリバースプライマーとを含むプライマーセット。

・制限酵素：NdeI又はそのアイソシゾマー

[0060] 一態様において、本発明の遺伝的特徴(7)は、例えば、以下のプライマーセットと制限酵素とを用いたdCAPS法により検出することができる。

・プライマーセット：

配列番号79又は82の224位より5’側に位置する任意の連続する15塩基以上

の配列(例えば、配列番号77)を含むフォワードプライマーと、配列番号78の3’末端から15～39塩基長の連続する配列を含むリバースプライマーとを含むプライマーセット。

・制限酵素：SspI又はそのアイソシゾマー

[0061] 一態様において、本発明の遺伝的特徴(9)は、例えば、以下のプライマーセットと制限酵素とを用いたdCAPS法により検出することができる。

・プライマーセット：

配列番号83の3’末端から15～39塩基長の連続する配列を含むフォワードプライマーと、配列番号853又は88の40位より3’側に位置する任意の連続する15塩基以上の配列に相補的な配列(例えば、配列番号84)を含むリバースプライマーとを含むプライマーセット。

・制限酵素：SnaBI又はそのアイソシゾマー

[0062] プライマーの配列は、上記の条件を満たす範囲で最適化することができる。プライマー設計の最適化については、例えば、Sambrook and Russell, ”Molecular Cloning: A Laboratory Manual” 3rd Edition (2001), Cold Spring Harbor Laboratory Press等を参照のこと。上記各プライマーは、15～50塩基長、18～48塩基長、20～45塩基長、30～40塩基長等であってよい。また、本発明の遺伝的特徴に基づき、上記以外のプライマーセットを設計し、それに対応する制限酵素を選択することも可能である。

[0063] 特定の態様において、本発明の遺伝的特徴(4)、(7)又は(9)は、例えば、以下の配列を有するプライマーセットと制限酵素とを用いたdCAPS法により検出することができる。

[表1]

表1 遺伝的特徴(4)、(7)又は(9)を検出するためのプライマーセットと制限酵素との組合せの例

遺伝的特徴	フォワードプライマー	リバースプライマー	制限酵素
(4)	配列番号71	配列番号72	NdeI
(7)	配列番号77	配列番号78	SspI
(9)	配列番号83	配列番号84	SnaBI

なお、上記プライマーセットと制限酵素との組合せは一例にすぎず、当業者であれば、本発明の遺伝的特徴を検出し得る他のプライマーセットと制限酵素との組合せを見出すことができる。

[0064] 本発明のスクリーニング方法は、本発明の遺伝的特徴(1)～(10)の少なくとも1つが検出された被験ステビア植物の組織(例えば葉)のRebD、RebE、RebM及び/又はRebNの含有量を測定する工程をさらに含んでもよい。RebD、RebE、RebM又はRebN含有量の測定は、本発明の植物体の項に記載したとおりである。また、この態様において、本発明の遺伝的特徴(1)～(10)の少なくとも1つが検出された被験ステビア植物体のうち、RebD、RebE、RebM及び/又はRebNの含有量が高い個体を選択して、これを他のステビア植物体と交配し、得られた子植物体について、本発明のスクリーニング方法を適用してもよい。したがって、本発明のスクリーニング方法は、以下の1以上の工程を含み得る。

(i)被験ステビア植物のゲノムから、本発明の遺伝的特徴(1)～(10)の少なくとも1つを検出する工程、

(ii)本発明の遺伝的特徴(1)～(10)の少なくとも1つが検出された被験ステビア植物組織のRebD、RebE、RebM及び/又はRebNの含有量を測定する工程、

(iii)本発明の遺伝的特徴(1)～(10)の少なくとも1つが検出された被験ステビア植物体のうち、RebD、RebE、RebM及び/又はRebNの含有量が高い個体を選択する工程、

(iv)選択したRebD、RebE、RebM及び/又はRebNの含有量が高い個体を他のステビア植物体と交配する工程、

(v)交配により得られた子植物体のゲノムから、本発明の遺伝的特徴(1)～(10)の少なくとも1つを検出する工程、

(vi)本発明の遺伝的特徴(1)～(10)の少なくとも1つが検出された子植物組織のRebD、RebE、RebM及び/又はRebNの含有量を測定する工程、

(vii)本発明の遺伝的特徴(1)～(10)の少なくとも1つが検出された子植物体のうち、RebD、RebE、RebM及び/又はRebNの含有量が高い個体を選択する工程。

[0065] 選択するRebD、RebE、RebM及び/又はRebNの含有量が高い個体は、例えば、

本発明の遺伝的特徴(1)～(10)の少なくとも1つが検出された被験ステビア植物体のうち、RebD、RebE、RebM及び/又はRebNの含有量の高さに関し上位50%まで、上位40%まで、上位30%まで、上位20%まで、上位10%まで、上位5%まで、上位4%まで、上位3%まで、上位2%まで又は上位1%までの個体等であってよい。また、交配する他のステビア植物体は、本発明の遺伝的特徴(1)～(10)を含んでいても含んでいなくてもよい。上記態様において、工程(iv)～(vii)は、複数回繰り返すことができる。このようにして、RebD、RebE、RebM及び/又はRebNの含有量がより高いステビア植物体をスクリーニングすることができる。

[0066] 本発明のスクリーニング方法において、被験ステビア植物体は、天然植物体であっても、非遺伝子組換え植物体であってもよい。非遺伝子組換え植物体については、本発明の植物体の項に記載したとおりである。

本発明のスクリーニング方法において、被験ステビア植物体は、変異誘発処理を行ったステビア植物及びその子孫植物を含んでもよい。変異の誘発については、本発明の植物体の項に記載したとおりであり、変異誘発剤による処理や、放射線又は光線の照射による処理等を含む。

[0067] また、本発明は、上記に記載されたプライマーセット及びその組合せ、例えば、上記表1に記載のプライマーセット、及び、これらのプライマーセット同士の組合せを提供する。本発明は、さらに、配列番号31～70及び89～118から選択される塩基配列を有する領域をPCRにより増幅し得るプライマーセット、例えば、配列番号11の塩基配列を含むフォワードプライマーと、配列番号12の塩基配列を含むリバースプライマーとのプライマーセット、配列番号13の塩基配列を含むフォワードプライマーと、配列番号14の塩基配列を含むリバースプライマーとのプライマーセット、配列番号15の塩基配列を含むフォワードプライマーと、配列番号16の塩基配列を含むリバースプライマーとのプライマーセット、配列番号17の塩基配列を含むフォワードプライマーと、配列番号18の塩基配列を含むリバースプライマーとのプライマーセット、配列番号19の塩基配列を含むフォワードプライマーと、配列番号20の塩基配列を

含むリバースプライマーとのプライマーセット、配列番号21の塩基配列を含むフォワードプライマーと、配列番号22の塩基配列を含むリバースプライマーとのプライマーセット、配列番号23の塩基配列を含むフォワードプライマーと、配列番号24の塩基配列を含むリバースプライマーとのプライマーセット、配列番号25の塩基配列を含むフォワードプライマーと、配列番号26の塩基配列を含むリバースプライマーとのプライマーセット、配列番号27の塩基配列を含むフォワードプライマーと、配列番号28の塩基配列を含むリバースプライマーとのプライマーセット、配列番号29の塩基配列を含むフォワードプライマーと、配列番号30の塩基配列を含むリバースプライマーとのプライマーセット等を提供する。

[0068] さらに、本発明は、本発明の遺伝的特徴の存在及び/又は不在を検出し得るプローブ(以下、「本発明のプローブ」と称する場合がある)を提供する。本発明のプローブは、本発明の遺伝的特徴の存在及び/又は不在の各種検出方法(例えば、リアルタイムPCR法(TaqMan PCRなどのハイブリダイゼーション法など)に適した構造を有し得る。例えば、本発明のプローブは、本発明の変異部位を含むゲノムの部分に相補性を有する塩基配列を含み得る。かかるプローブの非限定例としては、配列番号31～33、35～37、39～41、43～45、47～49、51～53、55～57、59～61、63～65、67～69、89～118から選択される塩基配列に相補的な配列を含むものが挙げられる。これらの配列のうち、配列番号31～33、35～37、39～41、43～45、47～49、51～53、55～57、59～61、63～65、67～69は本発明の変異を含むアレルに特異的であり、配列番号89～118は、本発明の変異を含まないアレルに特異的である。本発明の遺伝的特徴の存在は、本発明の変異を含むアレルと本発明の変異を含まないアレルの両方の検出により検出することができ、本発明の遺伝的特徴の不在は、本発明の変異を含むアレルのみの検出又は本発明の変異を含まないアレルのみの検出により検出することができる。本発明のプローブは、好ましくは標識を有する。かかる標識の非限定例としては、蛍光標識、発光標識、放射性標識、色素、酵素、クエンチャー、検出可能な標識との結合部分等が挙げられる。特定の

態様において、本発明のプローブは、配列番号31～33、35～37、39～41、43～45、47～49、51～53、55～57、59～61、63～65、67～69、89～118から選択される塩基配列に相補的な塩基配列を含むポリヌクレオチドと、標識とを有する。

[0069] 本発明はさらに、上記のプライマーセットとこれに対応する制限酵素とを含むキットを提供する。特定の態様において、本発明のキットは前記表1に記載のプライマーセットと、これに対応する制限酵素とを含む。

本発明はまた、上記の配列番号31～70及び89～118からなる群から選択される塩基配列を有する領域をPCRにより増幅し得るプライマーセットと、それに対応する上記の本発明のプローブとを含むキットを提供する。

[0070] これらのプライマーセット、プローブ及びキットは、本発明の遺伝的特徴(1)～(10)を検出するために用いること、本発明のスクリーニング方法に用いることなどが可能である。また、これらのプライマーセット及びキットには、本発明の遺伝的特徴(1)～(10)の検出や、本発明のスクリーニング方法に関する説明を含む指示、例えば、使用説明書や、使用方法に関する情報を含むサイトの情報(例えば、URL、二次元コード)、使用方法に関する情報を記録した媒体(例えば、フレキシブルディスク、CD、DVD、ブルーレイディスク、メモリーカード、USBメモリー)等が含まれていてもよい。

[0071] 一部の態様において、本発明は、遺伝的特徴(1)～(10)の少なくとも1つの存在及び/又は不在を検出するための試薬を含む、本発明のステビア植物体のスクリーニングキットを提供する。試薬は、CAPS法、dCAPS法又はリアルタイムPCR法(例えば、TaqMan PCRなどのハイブリダイゼーション法、インターカレーション法など)に使用するプライマー及び/又はプローブを含み得る。特定の態様において、遺伝的特徴(1)～(10)の少なくとも1つの存在及び/又は不在を検出するための試薬は、上記の遺伝的特徴(1)～(10)の少なくとも1つをdCAPS法で検出するためのプライマーセットと制限酵素との組合せ、例えば表1に記載のプライマーセットと制限酵素との組合せ、又は、リアルタイムPCR法(例えば、TaqMan PCRなどのハイブリダイゼーション法)等で使用することが

できる、本発明の変異部位(例えば、配列番号31～70から選択される配列を含む部位)を増幅するプライマーセットと、遺伝的特徴(1)～(10)の少なくとも1つに係る部位(例えば、配列番号31～33、35～37、39～41、43～45、47～49、51～53、55～57、59～61、63～65、67～69から選択される配列を含む部位)に相補的な塩基配列を有するプローブとの組合せを含む。

[0072] 4.本発明の死亡組織又は死亡細胞

本発明のさらなる態様において、本発明のステビア植物体、本発明のスクリーニング方法により選別されたステビア植物体若しくは本発明の作出方法により製造されたステビア植物体の組織又は細胞であって死亡しているもの(以下、「本発明の死亡組織又は死亡細胞」と称することがある。)が提供される。「死亡」とは、繁殖、増殖、再生及び成長する能力を有さない状態を意味し、人為的な操作によらず自然と死亡する場合も、切断、破砕、加熱(空気などの気体を介した加熱、水などの液体を介した加熱、水蒸気などの蒸気を介した加熱を含む)、凍結、乾燥、凍結乾燥等の人為的な操作によって死亡する場合も含む。死亡組織とは、含まれる細胞が全て死亡している組織を意味し、死亡植物体(含まれる細胞が全て死亡している植物体)も含むものとする。本発明の死亡組織又は死亡細胞の具体例としては、種子以外の組織又は細胞であって死亡しているものが挙げられる。より具体的には、胚、分裂組織細胞、花粉、葉、根、根端、花弁、プロトプラスト、葉の切片又はカルスであって死亡しているものが挙げられる。好適には、乾燥葉が挙げられる。本発明の死亡組織又は死亡細胞は、後述の抽出物、ステビオール配糖体、医薬品、香料、飲食品等の原料とすることができる。

[0073] 5.植物体由来抽出物の製造方法及び当該抽出物を用いた製品

本発明のさらなる態様において、本発明の植物体、本発明のスクリーニング方法により選別されたステビア植物体若しくは本発明の作出方法により製造されたステビア植物体、又は当該植物体の種子、葉(例えば、乾燥葉又は新鮮葉)、組織、組織培養物若しくは細胞から抽出物を得る工程を含む、ステビオール配糖体を含有する抽出物の製造方法(以下、「本発明の抽出物の製造方

法」と称する場合がある)が提供される。

[0074] さらに、本発明の植物体、本発明のスクリーニング方法により選別されたステビア植物体若しくは本発明の作出方法により製造されたステビア植物体、当該植物体の種子、葉(例えば、乾燥葉又は新鮮葉)、組織、組織培養物若しくは細胞、又は本発明の死亡組織又は死亡細胞からのステビオール配糖体を含有する抽出物(以下、「本発明の抽出物」と称する場合がある)が提供される。本発明の抽出物は、好適には、本発明の抽出物の製造方法により製造されたものである。さらにまた、本発明の抽出物からステビオール配糖体を精製する工程を含む、ステビオール配糖体の製造方法(以下、「本発明のステビオール配糖体の製造方法」と称する場合がある)が提供される。本発明のステビオール配糖体の製造方法は、本発明の植物体、本発明のスクリーニング方法により選別されたステビア植物体又は本発明の作出方法により製造されたステビア植物体、又は本発明の死亡組織又は死亡細胞からステビオール配糖体を含む抽出物を得る工程をさらに含んでもよい。

[0075] ステビオール配糖体を含む抽出物は、例えば、本発明の植物体の新鮮葉又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。抽出条件等は上記Ohta et al.又はWO2010/038911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、ステビオール配糖体を含む抽出物を酢酸エチルその他の有機溶媒：水の勾配、クロマトグラフィー（例えば、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)、ガスクロマトグラフィー等）、飛行時間型質量分析(Time-of-Flight mass spectrometry:TOF-MS)等の公知の方法を用いることによりステビオール配糖体を精製することができる。

[0076] ステビオール配糖体の種類は特に限定されず、RebA、RebB、RebC、RebD、RebE、RebF、RebG、RebI、RebJ、RebK、RebM、RebN、RebO、RebQ、RebR、ズル

コシドA、ルブソシド、ステビオールモノシド、ステビオールビオシド、ST等を包含する。好ましい態様において、ステビオール配糖体は、RebD、RebE、RebM、RebN、ST又はこれらの組合せを含む。

[0077] 一部の態様において、本発明の抽出物におけるRebCに対するRebNの質量比(RebN/RebC)は3.8以上である。この態様におけるRebN/RebCの値は、限定されずに、例えば、3.8以上、3.9以上、4以上、4.1以上、4.2以上、4.3以上、4.4以上、4.5以上、4.6以上、4.7以上、4.8以上、4.9以上、5以上、5.1以上、5.2以上、5.3以上、5.4以上、5.5以上、5.6以上、5.7以上、5.8以上、5.9以上、6以上、6.1以上、6.2以上、6.3以上、6.4以上、6.5以上等であってよい。RebN/RebCの上限は特に限定されないが、例えば、15、12、10、8等であってよい。

[0078] 一部の態様において、本発明の抽出物は、本発明の遺伝的特徴(4')、(7')及び(9)のいずれをも有しないステビア種と比べRebN含量、RebD含量、RebE含量、ST含量、TSG含量、RebNとRebDの合計含量、RebNとRebMの合計含量、RebDとRebEの合計含量、RebNとRebDとRebMの合計含量、及び/又はRebNとRebDとRebEの合計含量が高い。

本発明の抽出物は、本発明の遺伝的特徴(4')、(7')及び(9)のいずれをも有しないステビア植物体から得られた抽出物と比べRebN含量、RebD含量、RebNとRebDの合計含量、RebNとRebMの合計含量、RebDとRebEの合計含量、RebNとRebDとRebMの合計含量、及び/又はRebNとRebDとRebEの合計含量が約5%以上、約10%以上、約20%以上、約30%以上、約40%以上、約50%以上、約100%以上、約150%以上、約200%以上、約250%以上、約300%以上、約350%以上、約400%以上、約450%以上、約500%以上、約550%以上、約600%以上、約650%以上、約700%以上、約750%以上、約800%以上、約850%以上、約900%以上、約950%以上、約1000%以上、約1050%以上、約1100%以上、約1150%以上、約1200%以上、約1250%以上、約1300%以上、約1350%以上、約1400%以上、約1450%以上、約1500%以上、約1550%以上、約1600%以上、約1650%以上、約1700%以上、約1750%以上、約1800%以上、約1850%以上、約19

00%以上、約1950%以上、約2000%以上、約2050%以上、約2100%以上高くてもよい。ここで、本発明の抽出物と、本発明の遺伝的特徴(4')、(7')及び(9)のいずれをも有しないステビア植物体から得られた抽出物は、同じ方法で得られたものであってよい。

[0079] このようにして得られた本発明の抽出物及び/又は本発明のステビオール配糖体の製造方法により得られるステビオール配糖体と他の成分とを混合することにより、ステビオール配糖体の含量を高めた新規な飲食品、甘味料組成物、香料又は医薬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/又は本発明のステビオール配糖体の製造方法により得られるステビオール配糖体と他の成分とを混合する工程を含む、飲食品、甘味料組成物、香料又は医薬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、ステビオール配糖体の含量を高めた新規な飲食品、甘味料組成物、香料又は医薬品を提供する。ここで飲食品とは、飲料及び食品を含む。したがって、ある実施態様では、本発明は新規な飲料、食品、甘味料組成物、香料又は医薬品を提供し、また、当該飲料、食品、甘味料組成物、香料又は医薬品の製造方法を提供する。

さらに、本発明は、本発明の抽出物及び/又は本発明のステビオール配糖体の製造方法により得られるステビオール配糖体と他の成分とを混合する工程を含む、ステビオール配糖体含有組成物の製造方法を提供する。さらに、本発明は、ステビオール配糖体と他の成分とを含む、前記製造方法により得られたステビオール配糖体含有組成物を提供する。上記の「他の成分」は、天然のステビア植物体に存在しない成分や、非天然成分を含み得る。したがって、上記組成物は非天然組成物であり得る。前記組成物は、例えば、医薬組成物、香料組成物、飲料組成物又は食品組成物であってよい。

[0080] 6.本発明の植物体に係る塩基配列

本発明は、別の態様において、本発明の植物体に係る塩基配列を提供する。

遺伝的特徴(1)を有するステビア植物体に係る塩基配列は、配列番号31～34

から選択される塩基配列を含む、又はそれからなる。遺伝的特徴(2)を有するステビア植物体に係る塩基配列は、配列番号35～38から選択される塩基配列を含む、又はそれからなる。遺伝的特徴(3)を有するステビア植物体に係る塩基配列は、配列番号39～42から選択される塩基配列を含む、又はそれからなる。遺伝的特徴(4)を有するステビア植物体に係る塩基配列は、配列番号43～46から選択される塩基配列を含む、又はそれからなる。遺伝的特徴(5)を有するステビア植物体に係る塩基配列は、配列番号47～50から選択される塩基配列を含む、又はそれからなる。遺伝的特徴(6)を有するステビア植物体に係る塩基配列は、配列番号51～54から選択される塩基配列を含む、又はそれからなる。遺伝的特徴(7)を有するステビア植物体に係る塩基配列は、配列番号55～58から選択される塩基配列を含む、又はそれからなる。遺伝的特徴(8)を有するステビア植物体に係る塩基配列は、配列番号59～62から選択される塩基配列を含む、又はそれからなる。遺伝的特徴(9)を有するステビア植物体に係る塩基配列は、配列番号63～66から選択される塩基配列を含む、又はそれからなる。遺伝的特徴(10)を有するステビア植物体に係る塩基配列は、配列番号67～70から選択される塩基配列を含む、又はそれからなる。

実施例

[0081] 以下に本発明に関する実施例を記載するが、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。

[0082] [例1]高RebN表現型に係る変異の同定

サントリー ワールド リサーチセンターで育成されたステビア系統のステビオール配糖体含量を測定し、ゲノムシーケンスを行った。具体的には、各系統の個体より0.25gの新鮮葉をサンプリングし、フリーズドライにより乾燥し、破砕乾物0.05gを100倍量(5mL)の純水中に投入した。超音波処理20分にて抽出し、遠心・濾過した後、32%アセトニトリルで60倍希釈したものをサンプル液とした。このサンプル液1mLをLCMS8050(Shimadzu)のMRMモードにてLC-MS/MS分析を行い、RebA、RebB、RebC、RebD、RebE、RebF、RebI、RebJ、RebM、RebN及びSTの濃度を定量した。さらに、サンプリングした新鮮葉からゲノ

ムDNAを抽出し、シーケンサー(HiSeq 2500、Illumina)によりシーケンスを行った。

[0083] ステビオール配糖体含量のデータを解析したところ、RebN含量の特に高い系統群があることが判明した。高RebN群とRebN含量が比較的低い低RebN群の代表的な系統のステビオール配糖体含量を表2～3に示す。なお、表中、TSGは総ステビオール配糖体を示す。また、各ステビオール配糖体の数値は乾燥葉中の重量%であり、TSGの数値は測定した全てのステビオール配糖体(すなわち、RebA、RebB、RebC、RebD、RebE、RebF、RebI、RebJ、RebM、RebN及びST)の数値の合計値である。

[0084] [表2]

表2 各系統のステビオール配糖体含量(1)

	系統名	RebA	RebB	RebC	RebD	RebE	RebF
高RebN	A	1.6358	0.0462	0.5921	6.7162	0.0462	0.1130
	B	6.4646	0.1084	0.5878	6.3744	0.1084	0.2404
	C	1.8513	0.0466	0.5435	6.7681	0.0466	0.1121
	D	5.8362	0.0997	0.7947	5.3401	0.0997	0.2787
	E	2.2111	0.0611	0.4461	6.0842	0.0611	0.1317
	F	3.7490	0.0616	0.4791	6.2889	0.0616	0.1716
	G	1.4289	0.0201	0.6238	4.5409	0.0201	0.1054
低RebN	H	5.8203	0.1324	0.8110	4.6496	0.1324	0.2627
	I	5.8522	0.1743	0.6302	3.6932	0.1743	0.2024
	J	3.1090	0.0544	0.3416	3.5032	0.0544	0.1164
	K	3.8519	0.0863	0.4513	4.0164	0.0863	0.1516
	L	5.8705	0.1052	0.4913	3.0450	0.1052	0.2214

[0085]

[表3]

表３　各系統のステビオール配糖体含量(2)

	系統名	RebI	RebJ	RebM	RebN	ST	TSG
高RebN	A	0.0046	0.1021	0.4906	3.3647	2.3795	18.1979
	B	0.0184	0.3097	1.4969	3.0197	1.2537	20.3844
	C	0.0061	0.0718	0.5889	2.9468	2.2816	17.6744
	D	0.0220	0.1221	1.2393	2.8826	1.8512	18.9772
	E	0.0095	0.0917	0.6601	2.5930	2.1171	15.9800
	F	0.0077	0.2163	0.5972	2.5315	2.5999	18.4303
	G	0.0035	0.1257	0.2656	2.4893	2.4831	15.3896
低RebN	H	0.0369	0.1792	1.1610	1.8728	1.0594	16.3467
	I	0.0552	0.0948	1.3184	1.3980	1.0772	14.6845
	J	0.0191	0.0438	1.0909	1.1507	0.8045	10.4596
	K	0.0167	0.2621	1.1486	1.0776	0.7028	12.0299
	L	0.0361	0.0902	1.0525	1.0602	0.7493	12.8898

[0086]　高RebN群と低RebN群とで、各ステビオール配糖体の含量について統計学的な有意差があるかをWelchのt検定(両側)で評価したところ、前者では後者よりRebD、RebE、RebN、ST、TSG、RebD+N(RebDとRebNの合計。以下同様)、RebD+M+N、RebN+M、RebD+E、及びRebD+E+Nの含量、並びにRebC含量に対するRebN含量の比(RebN/RebC)が有意に高く、RebIの含量が有意に低かった(表4)。表中、数値は平均値、「++」はP<0.01で高RebN群の方が低RebN群より含量が多いこと、「-」はP<0.05で高RebN群の方が、低RebN群より含量が少ないこと、「±」は、両集団の含量が有意水準0.05で有意差が認められなかったことをそれぞれ示す。

[表4]

表４　各群におけるステビオール配糖体含量

ステビオール配糖体	高RebN群	低RebN群	有意差
RebA	3.3110	4.9008	±
RebB	0.0634	0.1105	±
RebC	0.5810	0.5451	±
RebD	6.0161	3.7815	++
RebE	1.8339	0.2417	++
RebF	0.1647	0.1909	±
RebI	0.0103	0.0328	-
RebJ	0.1485	0.1340	±
RebM	0.7627	1.1543	±
RebN	2.8325	1.3119	++
ST	2.1380	0.8786	++
TSG	17.8620	13.2821	++
RebD+N	8.8486	5.0933	++
RebD+M+N	9.6113	6.2476	++
RebN+M	3.5952	2.4662	++
RebD+E	7.8500	4.0232	++
RebD+E+N	10.6825	5.3351	++
RebN/RebC	4.9937	2.4884	++

[0087]　高RebN系統と低RebN系統とでゲノム配列の相違を解析したところ、以下の遺伝的特徴が高RebN系統のみに見出された。

(1)配列番号1の151～152位に相当する部分の配列がCCAであるアレル(配列番号34)についてホモ接合性。

(2')配列番号2の151位に相当する位置の塩基がGであるアレル(配列番号38)についてヘテロ接合性。

(3)配列番号3の151位に相当する位置の塩基がTであるアレル(配列番号42)についてホモ接合性。

(4')配列番号4の151位に相当する位置の塩基がGであるアレル(配列番号46)についてヘテロ接合性。

(5')配列番号5の151位に相当する位置の塩基がGであるアレル(配列番号50)についてヘテロ接合性。

(6')配列番号6の151位に相当する位置の塩基がAであるアレル(配列番号54)についてヘテロ接合性。

(7')配列番号7の151位に相当する位置の塩基がAであるアレル(配列番号58)についてヘテロ接合性。

(8)配列番号8の151位に相当する位置の塩基がGであるアレル(配列番号62)についてホモ接合性。

(9)配列番号9の103位に相当する位置の塩基がGであるアレル(配列番号66)についてホモ接合性。

(10)配列番号10の151位に相当する位置の塩基がAであるアレル(配列番号70)についてホモ接合性。

(11)配列番号119の151位に相当する部分の配列がAであるアレル(配列番号120)についてホモ接合性。

(12)配列番号121の151位に相当する位置の塩基がAであるアレル(配列番号122)についてホモ接合性。

(13)配列番号123の151位に相当する位置の塩基がGであるアレル(配列番号124)についてホモ接合性。

(14)配列番号125の151位に相当する位置の塩基がTであるアレル(配列番号126)についてホモ接合性。

(15)配列番号127の151～152位に相当する部分の配列がCATGであるアレル(配列番号128)についてホモ接合性。

(16)配列番号129の151～154位に相当する部分の配列がTAAAACCTACCAATATCTAAAであるアレル(配列番号130)についてホモ接合性。

(17)配列番号131の151位に相当する位置の塩基がGであるアレル(配列番号132)についてホモ接合性。

(18)配列番号133の151位に相当する位置の塩基がAであるアレル(配列番号134)についてホモ接合性。

(19)配列番号135の151位に相当する位置の塩基がGであるアレル(配列番号136)についてホモ接合性。

(20)配列番号137の143～154位に相当する部分の配列がCTTTTTTTTであるアレル(配列番号138)についてホモ接合性。

[0088] ［実施例2］高RebN個体検出マーカーの開発

高RebN系統に特有の遺伝的特徴の検出を効率化すべく、遺伝的特徴(4')、(7')及び(9)を検出するためのdCAPSプライマーを作製し、各個体についてこれらの遺伝的特徴の有無をdCAPS法により検出し得るかを検討した。

[0089] dCAPSプライマー及び制限酵素は、以下のものを使用した。

[表5]

表５ dCAPSプライマーの配列及び制限酵素

遺伝的特徴	フォワードプライマー	リバースプライマー	制限酵素
(4')	AAAAACGGGGTATGGTTTTGTTGGGGATC GACCACATAT(配列番号71)	TCTTTTGAAGTCTATATGGCCCACC(配列番号72)	NdeI
(7')	GGTTATAACGGATACCTGGGAATCA(配列番号77)	CCGACAATTAAGTTGTAACTTAGTGCTATT TAATTCAAA(配列番号78)	SspI
(9)	AACTTGTCATATTGTTATTGATCATGGTG GCAATGTTAC(配列番号83)	ACTGTATGTTCAAAAGACCAACTGA(配列番号84)	SnaBI

[0090] dCAPS法による各遺伝的特徴の検出は以下のように行った。まず、実施例1で試験した各個体の新鮮葉からゲノムDNAを抽出し、各遺伝的特徴に対応する上記dCAPSプライマーを用いてPCRを行い、PCR産物に各遺伝的特徴に対応する上記制限酵素を添加し、37℃で酵素反応を行った。マイクロチップ型電気泳動装置LabChip GX Touch HT(PerkinElmer)により制限酵素処理物の電気泳動を行い、得られたバンドパターンに基づいて遺伝的特徴の有無を判定した。各マーカーのバンドパターンを図21に示す。

遺伝的特徴(4')及び(7')はヘテロ接合性であり、dCAPSプライマーは変異を有する場合に切断されるよう設計してあるため、分解産物と非分解物の両方のバンドが認められた個体を遺伝的特徴あり(○)、非分解物のバンドしか認められなかった個体を遺伝的特徴なし(×)と判定した。遺伝的特徴(9)はホモ接合性であり、dCAPSプライマーは変異を有する場合に切断されるよう設計してあるため、分解産物のバンドが認められた個体を遺伝的特徴あり(○)、非分解物のみか、分解産物と非分解物の両方のバンドが認められた個体を遺伝的特徴なし(×)と判定した。

[0091] 下表に示すとおり、高RebN系統の全てにおいて遺伝的特徴(4')、(7')及び(9)を検出することができた。一方、低RebN系統の全てにおいて、遺伝的特徴(4')、(7')及び(9)は検出されなかった。

[表6]

表6 各系統における遺伝的特徴の保有状況

種別	系統名	遺伝的特徴		
		(4')	(7')	(9)
高RebN	A	○	○	○
	B	○	○	○
	C	○	○	○
	D	○	○	○
	E	○	○	○
	F	○	○	○
	G	○	○	○
低RebN	H	×	×	×
	I	×	×	×
	J	×	×	×
	K	×	×	×
	L	×	×	×

請求の範囲

[請求項1] 以下の遺伝的特徴(1)～(10)の少なくとも1つを有するステビア植物体。

(1)配列番号1の151～152位に相当する部分の配列がCCAであるアレルについてホモ接合性。

(2)配列番号2の151位に相当する位置の塩基がGであるアレルについてホモ接合性又はヘテロ接合性。

(3)配列番号3の151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。

(4)配列番号4の151位に相当する位置の塩基がGであるアレルについてホモ接合性又はヘテロ接合性。

(5)配列番号5の151位に相当する位置の塩基がGであるアレルについてホモ接合性又はヘテロ接合性。

(6)配列番号6の151位に相当する位置の塩基がAであるアレルについてホモ接合性又はヘテロ接合性。

(7)配列番号7の151位に相当する位置の塩基がAであるアレルについてホモ接合性又はヘテロ接合性。

(8)配列番号8の151位に相当する位置の塩基がGであるアレルについてホモ接合性。

(9)配列番号9の103位に相当する位置の塩基がGであるアレルについてホモ接合性。

(10)配列番号10の151位に相当する位置の塩基がAであるアレルについてホモ接合性。

[請求項2] 以下の化学的特徴(i)～(viii)の少なくとも1つを有するステビア植物体。

(i)レバウジオシド(Reb)Nの含量が乾燥葉の単位質量当たり2.2%以上。

(ii)RebDの含量が乾燥葉の単位質量当たり6.3%以上。

(iii)RebNとRebDの合計含量が乾燥葉の単位質量当たり7.4%以上。

(iv)RebNとRebMの合計含量が乾燥葉の単位質量当たり2.9%以上。

(v)RebDとRebEの合計含量が乾燥葉の単位質量当たり5.8%以上。

(vi)RebNとRebDとRebMの合計含量が乾燥葉の単位質量当たり9%以上。

(vii)RebNとRebDとRebEの合計含量が乾燥葉の単位質量当たり5.9%以上。

(viii)RebCに対するRebNの質量比が3.8以上。

[請求項3] 請求項1又は2に記載の植物体の死亡組織又は死亡細胞。

[請求項4] 請求項1又は2に記載の植物体と第2のステビア植物体とを交雑させる工程を含む、請求項1又は2に記載のステビア植物体を作出する方法。

[請求項5] ステビア植物体のゲノムに以下の少なくとも1つの変異を導入する工程を含む、請求項1又は2に記載のステビア植物体を作出する方法。

(1)配列番号1の151～152位に相当する部分の配列をCCAにする変異。

(2)配列番号2の151位に相当する位置の塩基をGにする変異。

(3)配列番号3の151位に相当する位置の塩基をTにする変異。

(4)配列番号4の151位に相当する位置の塩基をGにする変異。

(5)配列番号5の151位に相当する位置の塩基をGにする変異。

(6)配列番号6の151位に相当する位置の塩基をAにする変異。

(7)配列番号7の151位に相当する位置の塩基をAにする変異。

(8)配列番号8の151位に相当する位置の塩基をGにする変異。

(9)配列番号9の103位に相当する位置の塩基をGにする変異。

(10)配列番号10の151位に相当する位置の塩基をAにする変異。

[請求項6] 請求項1若しくは2に記載の植物体、又は請求項3に記載の死亡組織若しくは死亡細胞の抽出物。

[請求項7] 請求項1若しくは2に記載の植物体、又は請求項3に記載の死亡組織若しくは死亡細胞から抽出物を得る工程を含む、ステビオール配糖体

含有抽出物の製造方法。

[請求項8] 請求項6に記載の抽出物からステビオール配糖体を精製する工程を含む、ステビオール配糖体の製造方法。

[請求項9] 請求項1若しくは2に記載の植物体の抽出物、請求項3に記載の死亡組織若しくは死亡細胞の抽出物、或いは、請求項6に記載の抽出物を提供する工程、及び

前記抽出物を、飲食品、甘味料組成物、香料又は医薬品の原料に添加する工程

を含む、飲食品、甘味料組成物、香料又は医薬品の製造方法。

[請求項10] 請求項1若しくは2に記載の植物体の抽出物、請求項3に記載の死亡組織若しくは死亡細胞の抽出物、或いは、請求項6に記載の抽出物を含む飲食品、甘味料組成物、香料又は医薬品。

[請求項11] 請求項6に記載の抽出物からステビオール配糖体を精製する工程、及び

精製されたステビオール配糖体を、飲食品、甘味料組成物、香料又は医薬品の原料に添加する工程

を含む、飲食品、甘味料組成物、香料又は医薬品の製造方法。

[請求項12] 被験ステビア植物体から、請求項1に記載の遺伝的特徴(1)～(10)の少なくとも1つの存在及び/又は不在を検出する工程を含む、請求項2に記載の化学的特徴(i)～(viii)の少なくとも1つを有するステビア植物体をスクリーニングする方法。

[請求項13] 請求項1に記載の遺伝的特徴(1)～(10)の少なくとも1つの存在及び/又は不在を検出するための試薬を含む、請求項2に記載の化学的特徴(i)～(viii)の少なくとも1つを有するステビア植物体のスクリーニングキット。

[図1]

ATCTTTATATCATTCATGTCTTGAATATGTTTAGATTTGTTGAAGCTAATTGCTAAGTCAGAAATAT
TCTACTGTGAAAAGTCAAAATTAACCAGAAAAAAGTCATATATGACATACCAAACAACCAATCTTGC
TTGCATGAAGCTTTTT[CA/CCA]GTCTCAATTTGCATAAATAGCAACTTATATTTTTTTTGTTAAT
AAACATCATCTTAGTTCTAGCTTGTTTGATTTAGGCAGTTTAGTAGAATTAGGTTGTTGTTTTCTAA
ATATATAAGAAGTAAATTGTATAAGATATTAAGATGAG

[図2]

TGAATAAACAAAAATATAATGATAAATGTATTAAAAAATATTATTTAATTAAAAAAATACAAATAAA
GATAAAAAAACTATTGTGAAAGCTCTTAAACCACAAGTTTCAAACTTTTTATATTAAAATAAAAGGT
AAACTGATAACAAGTT[A/G]CGTCTCTACTCCCTAGTTAATGTTGCATGAAATTCACATAAAAACG
CCATTTCATCTTACTATGTATATCCTTATAAAATAAAATCAAATAAAAAATCGTGCGAAGTGCATAT
AAATAAAGACGAAAACCAATCATTCGTCCAAAACCCA

[図3]

AGAACCTCCCCTAGTATCCTAACGTTGTGTTCCCAAGTTGACTTAAGGAGAGAAAAGAAAGGAACTG
GAAAGAATGGGAAAATTATTTATGTTCCCGAGTTTCATTTAACGAAGGAACTGGAAGGAAAATAAAA
TATGTTGTGATCCCGA[G/T]TTTCACTTACGGAGGGAAAGGAAAGGAAACGAAAGGAAAATCAGGC
AAAATTCTTTAAGTTTCATTTCCTTCCGATTTGGAAGGAATTGGAAGGAAAGCTTTCCATTCTTTTC
CTTTCTTTTCTTTTCATTTCCTTTCCTCCTCTCTCTT

[図4]

TGAGTTAATATTAACAACAATGAGTCATATTTAACAATCTTCTTTCTTAAGTAGGAAGCACAAATGT
ACATTCAAAATGAACCAAGTCAGCAAGCTAAAAATTTCAAAACGAAAAACGGGGTATGGTTTTGTTG
GGGATCGACCATATAT[A/G]CCAATATTATGGCCCATTCTAAAGAGTAAAGACTCAATGTTTTAGA
ATGTGAATTGCTCTCAAGATACACTTTGACTAAACCACAAAAACACAAATCATTGTTTAATCTAACT
TATATTAAAATGTTTTAGAAAATTTAAGCAGGTAAAA

[図5]

AGTGGAAACACCGGAAAGGATTAGAAGCTACGTGGGAAACGGAAGAAGAAATGGTGAGACATTATCC
TCGACTTTTCTTGTAAAGGTTTCGGGGACGAAACCTCTTTAAGGGGGTAGACTTGTAACACCCTGAA
TTTTATGTGTTGATAA[A/G]ACGAGAACTAGAGGAAATCTTCCGTCTGTTAGTGTTATGCTTACGA
TCAAGTTTCGGTGTTAGGACTGTTGTAAAACTAACGGTACCCTAGTGTAATCCAATTATAATATGAA
ATAAACATGTTAGTTATATTCATATAAGCATGTAGAA

[図6]

GTTTGTGTACGAGGTCTCTACCTCACATGTTAAAGAGCATAGGTATATTATTGTAAGGATATACTCC
AAACTCTATCTTGGAATATTATATATCGATATATGAATTATCTTAGTCAACGTTAACATGAGTCAAA
TTCATCAAGATTAGAA[T/A]AAAAAATTTCCAACAATATATTAATTAATTCGGCTTGTATTTTATT
AATAAATATATATAATACACTACCCTTCGAATAGTTTTGCTCTAGAGTTTCCTGTGTTTTGGATGAC
TCTCTTAATTGTATACAATTATTTTATAAAATTAAGG

[図7]

TCTAATTTGGTACGAGAACGGGATTAGCCAAACTTGTCCCATTACCATCCCTAGCTACATCTAACAA
ACTAGTTTTATACCCCGATAGTTTAGTATCATAATGACACAATTGTATTCTTTTGCAGGAATTGAGG
ACAATCATGAAAAAAT[G/A]ATTGAATTAAATAGCACTAAGTTACAACTTAATTGTCGGTGATCAT
GATCAAAATGCTATTATTAATCAAAGAGAATGATGATCGATCATTCGATCAGAAGGCACACTTTCGT
TTTATTGATTGCATAAATAAAAACAAGAAACACATGA

[図8]

TCTAGGGCTTGTAACTTTCAAATTAGGGAAGAACAGCAACCAACCATAAAACAAATTAAATCCAGGT
TCCCTTTTAGTAAGTCACCCTAGCCGAGATGGTTAGGGTGCACCACACACGAATCTGAGGTCGCGGG
TTCGAACCCCCCCCTGC[C/G]CCCCATTTTTCTGATTTGAATTCTTTTTCAACTTTTAAATCCAATA
AATTCTAATAAATCATAACTAATTCATTTGAAATCCATTTTCTACCAACTTTATATCAAAATTCATC
TTTTAAAGAATCTGGTTTTATAAAAATATAAAACTAA

[図9]

GGAGCCATATACTGCAACCATTGTTTCTGTTGAAAGAGTTGTGGGCCCCAAAGCTCCCGGAGAAACT
TGTCATATTGTTATTGATCATGGTGGCAATGTTCC[A/G]TATTGGGAAGGTCAAAGTTATGGTGTT
ATTCCTCCCGTAAGTCAAATCTTGAACATTTCTCGTTTTATGATTTTGAAAAGTGAGAAATTATAGT
TTCAACTGTTATATTTGTTATCAGTTGGTCTTTTGAACATACAGTTACTCACTAAAGTTTGCAACAT
CTTGTTTTTTACCATAAGGTTATGAATTATGATGTTTGAT

[図10]

GTATACAACATTAGACGGGTGACCTTACGGAGTTACGGGCATTGCATCGGTGAAGGTCTAAATATAA
GTAAATGATTTTAATATTATTAGTAAATAGTAACTAAATAAATAAGCGACTAAACTCTTTTAGATTA
AAGTAATTAAGTAAAT[T/A]TAATCGTATTTACACGTATATTCTTATGTGTTTTTCATGTTTTTTG
TTTCTTCTTCGGAGTGTCTTCATCTTTATCTTTATAAATATCTCAGAGTAATGCACTAGGCTTCCAC
GAGTTTTACTTCCATCGGTCTTCCGTTGGATAAGAAA

[図11]

ATTAGCTTACGACTTCAACATGATATACATTCAGCAGAGTACACTTGAAACTAGGAAGTTTCGTCCA
GAATGTACAAAAATAGAAGACCATATTTGTAACAATTTTGTTACACATATATAATCGATGTATACTT
ATCGAGACTTCAGTTT[G/A]GCTTTCGATGCCTAAAAAGTATATTTAAGAATGTGCATTTACTTGA
AAAAACTGACTAAAAGTATTTCTTATGTTTTTAATGTATTGGTTATTTTTCTACCATACATGTGATA
ATTCATATTTATATATTAAATGTTTTGTTTCACCTTG

[図12]

ACCTGTGATCAGGTTATCATCAATTGAAGGTAAGGGAAGAGGACATACCAAAGACTGCATTTCGAAC
TCGATATGGTCATTATGAGTTTTTGGTTATGTCATTTGGTTTGACCAATGCTCCTGCAGCCTTCATG
GATTTAATGAATAGAG[T/A]ATGCCGACCGATGTTAGATCGATCAGTAATTGTCTTCATTGATGAC
ATTTTAATATACTCTAAGAATGAAGGTGACCATGCATGTCATTTGAGAGAAGTGTTGGAAACCCTTC
AACGGGAGAAGCTGTATGCTAAATTTTCCAAGTGTGC

[図13]

GTTTTCACCTTTCCGGCAAAAGAAATCCAAACCCTAAATTTTCCTTGCTTCGACGCCGATTTTGCTG
CAACCTTCTAGTAATATTAAGAAGATCTTGACGCAATGGATCCAGGAGATCATGACGCAATGGATAC
AGGAGATCATGACGCA[A/G]TGGATACAGGAGATCATGACCATTTCCTCAAAGTGATCGAAAAATT
GCTTAGTTGGATCGAGCGAATGATGAAAGGTCAAACATTCTTACTTAACTCTCTAGTTAACGATTTG
ATCGCGGTGTTGAATACAGTAGAATCCGCAGAACTTC

[図14]

GTTCCGTTCGATCTTAAAGTGGTTGGCTAGAGGGTTGCAAAGCTTTCTTAGAAATCCTCAAATTATG
TTGCTAGTTCATAACATTAAATCTCTAGAACCATTTTTAGGTATTAGGGATGGTTTGCAGCTACTTT
ACCTTTTGTTGGAATG[C/T]AGAAATAACAGAAAGTCTAAGTTTAGGAAATATATAAAAGATGTTA
TCAACCCATTGGAGAACTTGATTCTTAAACTTCGTCTTGATAAAGAAGCTGATTACCAATGGATAGA
TGCAATTAAAGATCTGTTAGGTTTTGAGTGTAAGAAA

[図15]

TCAGCTTACGAATTTATGGTCAGCACCAATTAAAAGTTGTCATGCACCCTCTTCGTAGGCTAAGCTG
TGGCCTCTTAGCCGACAGTTTTTTTAGGTTGAAAACCAGTTTAACTACCTGGTCTCACATGCTTACC
AATAAGAAATTGACAC[GT/ATGT]CTTTTTTTGGTAGATTTAAGGCCTTTATTTAGCCGACTGTTT
AAAGCGTATGCTAAATCACCCAATTCACAGGCTTAGCCAACACTCTTCAGCAGTCCACATCTATTTG
GCTTCAAGCCTAGCCATATGTTCGAGCCACCTATTTAGC

[図16]

TCCCAACCCAGTGAATCATCAACCAAAAGAGGCCTTGAAGGTAACGGACCAAAACACACTTTAATTT
CCATTCAACCTAACAAAAAACTTTATCCATTTGGAAGACAGAGACTAGAAACCGAAATAACCAAACA
TGGGCAAAAACTTTTG[TAAA/TAAAACCTACCAATATCTAAA]GTTGAGATAATTTGTTAAACTAT
GTGCATAGACCAAATATTGACATTTTTGGCACACTGCATAGTAGGCTAAGTAGATGCATGCTATGGT
TCAAAGAATTTAAATGCTTTTGATACTCAAAACATCCCGTAACAATATAGCTTAAG

[図17]

AAAGCAGAGTTTGGAAATAGGGTTTTTCACACATATATTAATTTTAATTTATTGCTAACGAATCATA
GTTTACGTTTTGTTTGAGGGGATAAAAAAAACAATTGAATCTATCTAGATCAATTGTAACTAGAGAA
TAAGATAATGCTCAAA[A/G]CATTGTGAGTTTTTTGGTTTCTGAAATTCGCTCAATGATTAGGGTA
TTATACATTGCATAGGAAAGTTTTATACTCCTAATGTACTATACAATATATATAAATTAAATTTGAT
TTTGATTTGCTTCGGTAAATTTTTGTAGGGACATAGA

[図18]

GATCCAGCTAAGATCGAGTCGGTGACAAAATGGACTCCACCTAAGACACCTACTGAGATCCGTAGTT
TCTTGGGTTTAGCTGGATATTATAGAAGATTCATTCAAGATTTCTCAAAGATAGCCTCACCGTTAAC
CAATTTAACAAAGAAA[G/A]ATGAGAAGTTTGAATGGAACTCCAAACAACAGGATGCATTTGAGGA
ACTGAAGAGAAGACTGACCCGAGCCCCAGTTTTGTCACTTCCTGATGGAACTGAGGATATGGTAATC
TACGCGGATGCATCTTATCAAGGTTTAGGTTGCGTGT

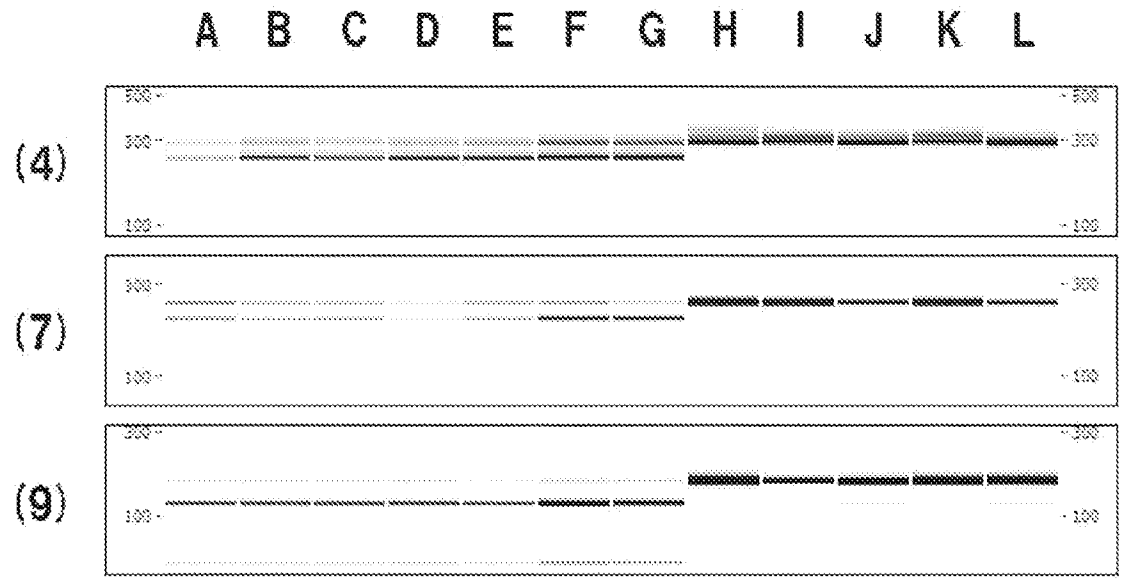
[図19]

AAAATAAAATACGCAAGTTTATCAGTATCACATCCTGCAAAACCAACGGTTACCATCGAGGTACCAA
TCCTCACTGCATCAGTTTGCAGATTCAATGGAACCAGCGGTGGTGAAATTAAAGCCGATCGAAGCAA
CACCGGAGACTTTCAA[A/G]GAATTTGGACAAGTGATCGAGGCGTCGCCGGACGGCGACGAGTTCG
GCCCTCACGATGCTCAACTCGACCTCTCACAGGGCATTCCTAGGTGCGCATCTTAATTATCTCTCTC
TGTTGATTCTAGGGTTTTATTTATGTCATTGTTTCGT

[図20]

CTTTCTGAGAACCACAAGCGGTCTTTTTTTATTGGCAATTTCTGCTAATGAAAAAGATACTATGTCA
ATTTCTAGTTTTTGACGCGAGTCAAAATGTCAGGTGGATTTAGGTCGAATTCAATCCAAAAAGAACT
ATAATATT[CTTTTTTTTTTA/CTTTTTTTT]TATATATATAATTGGTATGTCAAATAACACAAATT
AGAATTTGAATACACTTAAGATGACTTGCAATCCATTCAACCCTTATGTCTAATATCATTGTCAGTT
TTGAATCTTCAAGCTTAAACCATTTGACCCGTTAGACCAAAGACATAAC

[図21]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2024/023454

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A01H 6/14(2018.01)i; ***A01H 1/02***(2006.01)i; ***A01H 5/00***(2018.01)i; ***A23L 33/11***(2016.01)i; ***C12N 5/04***(2006.01)i; ***C12N 5/10***(2006.01)i; ***C12P 33/00***(2006.01)i; ***C12Q 1/686***(2018.01)i
FI: A01H6/14; A01H5/00 A; A01H1/02 Z; C12P33/00; A23L33/11; C12N5/04; C12Q1/686 Z; C12N5/10 ZNA

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A01H6/14; A01H1/02; A01H5/00; A23L33/11; C12N5/04; C12N5/10; C12P33/00; C12Q1/686

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2024
Registered utility model specifications of Japan 1996-2024
Published registered utility model applications of Japan 1994-2024

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN); GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2021/230256 A1 (SUNTORY HOLDINGS LTD.) 18 November 2021 (2021-11-18) claims 1, 7, 9, 12-14, example 1	2-4, 6-11
A	claims 1, 7, 9, 12-14, example 1	1, 5, 12-13
A	WO 2021/039944 A1 (SUNTORY HOLDINGS LTD.) 04 March 2021 (2021-03-04) entire text	1-13
A	WO 2020/138364 A1 (SUNTORY HOLDINGS LTD.) 02 July 2020 (2020-07-02) entire text	1-13
A	US 2021/0259184 A1 (PURE CIRCLE USA INC.) 26 August 2021 (2021-08-26) entire text	1-13

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"D" document cited by the applicant in the international application
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
07 August 2024	**20 August 2024**

Name and mailing address of the ISA/JP	Authorized officer
Japan Patent Office (ISA/JP) **3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915** **Japan**	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2024/023454

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
   a. ☑ forming part of the international application as filed.
   b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13*ter*.1(a)),
      ☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2024/023454

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
WO 2021/230256 A1	18 November 2021	US 2023/0172136 A1 claims 1, 7, 9, 12-14, example 1 EP 4166153 A1 CN 115551348 A	
WO 2021/039944 A1	04 March 2021	US 2022/0273003 A1 entire text EP 4023075 A1 CN 114340404 A	
WO 2020/138364 A1	02 July 2020	US 2022/0087124 A1 entire text EP 3903574 A1 CN 113226017 A	
US 2021/0259184 A1	26 August 2021	WO 2020/061456 A1	

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2024/023454

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

A01H 6/14(2018.01)i; A01H 1/02(2006.01)i; A01H 5/00(2018.01)i; A23L 33/11(2016.01)i; C12N 5/04(2006.01)i; C12N 5/10(2006.01)i; C12P 33/00(2006.01)i; C12Q 1/686(2018.01)i
FI: A01H6/14; A01H5/00 A; A01H1/02 Z; C12P33/00; A23L33/11; C12N5/04; C12Q1/686 Z; C12N5/10 ZNA

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

A01H6/14; A01H1/02; A01H5/00; A23L33/11; C12N5/04; C12N5/10; C12P33/00; C12Q1/686

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０２４年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０２４年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０２４年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN); GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X	WO 2021/230256 A1 (サントリーホールディングス株式会社) 18.11.2021 (2021-11-18) 請求項１，７，９，１２－１４，実施例１	2-4,6-11
A	請求項１，７，９，１２－１４，実施例１	1,5,12-13
A	WO 2021/039944 A1 (サントリーホールディングス株式会社) 04.03.2021 (2021-03-04) 全文	1-13
A	WO 2020/138364 A1 (サントリーホールディング株式会社) 02.07.2020 (2020-07-02) 全文	1-13
A	US 2021/0259184 A1 (PURE CIRCLE USA INC.) 26.08.2021 (2021-08-26) 全文	1-13

☐ Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。

☑ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー
“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
“D” 国際出願で出願人が先行技術文献として記載した文献
“E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
“L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
“P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
“X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
“Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
“&” 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
07.08.2024	20.08.2024

名称及びあて先
日本国特許庁(ISA/JP)
〒100-8915
日本国
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

権限のある職員（特許庁審査官）
▲高▼　美葉子 4N 9839

電話番号 03-3581-1101 内線 3891

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2024/023454

第Ⅰ欄　　ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第１ページの１．ｃの続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。

a. ☑ 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
b. ☐ 国際出願日後に、国際調査のために提出された配列表（ＰＣＴ規則13の3.1(a)）
☐ 配列表が出願時の国際出願の開示の範囲を超えるものではない旨の陳述書が添付されていた。

2. ☐ この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、この国際調査報告は、WIPO標準ST.26に準拠する配列表なしで有意義な国際調査をすることができる限度において作成された。

3. 補足意見:

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
PCT/JP2024/023454

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
WO 2021/230256 A1	18.11.2021	US 2023/0172136 A1 請求項１，７，９，１２－１４，実施例１ EP 4166153 A1 CN 115551348 A	
WO 2021/039944 A1	04.03.2021	US 2022/0273003 A1 全文 EP 4023075 A1 CN 114340404 A	
WO 2020/138364 A1	02.07.2020	US 2022/0087124 A1 全文 EP 3903574 A1 CN 113226017 A	
US 2021/0259184 A1	26.08.2021	WO 2020/061456 A1	