(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
2018年10月4日(04.10.2018)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2018/181515 A1

(51) 国際特許分類:
C07H 15/256 (2006.01)　*A23L 27/20* (2016.01)
A01H 5/00 (2018.01)　*C12N 15/29* (2006.01)
A23L 2/60 (2006.01)　*C12P 19/44* (2006.01)
A23L 27/00 (2016.01)　*C12N 1/19* (2006.01)

(21) 国際出願番号：　PCT/JP2018/012845

(22) 国際出願日：　2018年3月28日(28.03.2018)

(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 2017-071457　2017年3月31日(31.03.2017)　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).

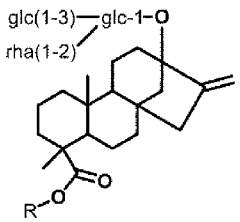
(72) 発明者: 岩城 一考(**IWAKI Kazunari**); 〒6190284 京都府相楽郡精華町精華台８－１－１ サントリーワールドリサーチセンター内 Kyoto (JP). 宮川 克郎(**MIYAGAWA Katsuro**); 〒6190284 京都府相楽郡精華町精華台８－１－１ サントリーワールドリサーチセンター内 Kyoto (JP). 小埜 栄一郎(**ONO Eiichiro**); 〒6190284 京都府相楽郡精華町精華台８－１－１ サントリーワールドリサーチセンター内 Kyoto (JP). 平井 正良(**HIRAI Tadayoshi**); 〒6190284 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). 落合 美佐(**OCHIAI Misa**); 〒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). 長尾 浩二(**NAGAO Koji**); 〒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). 浦井 聡一郎(**URAI Soichiro**); 〒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). 渡辺 健宏(**WATANABE Takehiro**); 〒6190284 京都府相楽郡精華町精華台８－１－１ 公益財団法人サントリー生命科学財団生物有機科学研究所内 Kyoto (JP). 藤川 紘樹(**FUJIKAWA Kohki**); 〒6190284 京都府相楽郡精華町精華台８－１－１ 公益財団法人サントリー生命科学財団生物有機科学研究所内 Kyoto (JP).

(74) 代理人: 小林 浩, 外 (**KOBAYASHI Hiroshi** et al.); 〒1040028 東京都中央区八重洲二丁目８番７号 福岡ビル９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,

(54) **Title:** NOVEL STEVIOL GLYCOSIDE AND PRODUCTION METHOD THEREFOR, AND SWEETENER COMPOSITION CONTAINING SAME

(54) 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



(1)

(57) **Abstract:** The purpose of the present invention is to: determine the structure of a novel steviol glycoside which is detected from species containing a large amount of Reb. C (also referred to as dulcoside B), and a trace amount of which is capable of influencing the quality of taste; and understand the taste characteristics of said steviol glycoside. The present invention provides a compound represented by formula (1) or a salt thereof, or a hydrate thereof.

(57) 要約：本発明は、Reb.C（ズルコサイドBともいう）を多く含む品種から検出される、味質に影響を与える微量の新規ステビオール配糖体の構造を決定し、その味質特性を把握することを目的とする。本発明によれば、式（１）：で示される化合物、またはその塩、もしくは水和物が提供される。

WO 2018/181515 A1

［続葉有］

BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, 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, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, 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, 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))

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、植物およびその抽出物、ならびに風味増強剤にも関する。

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）。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：特許第３４３６３１７号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 一方で、品種改良を行ったステビア品種の中には、未だ構造が特定されていないステビオール配糖体が微量含まれている場合があり、その微量のステビオール配糖体の存在によってステビア抽出物に特徴的な風味が付与されている可能性がある。また、これまで、Reb.Aにさらにグルコースを付加させたステビオール配糖体およびそれを含む品種の研究は進んでいるが、Reb.Cのようにラムノースを含むステビオール配糖体を多く含む品種や、それに含まれるステビオール配糖体については現時点においてあまり研究が行われていない。

[0007] したがって、本発明の目的は、味質に影響を与える微量の新規ステビオール配糖体の構造を決定し、その味質特性を把握することにある。また、本発明の更なる目的は、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を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0008] 本発明者らは上記課題を解決するために鋭意研究を遂行した結果、味質に影響を与える微量の新規ステビオール配糖体の構造を決定することに成功した。本発明は、上記知見に基づくものである。

発明の効果

[0009] 本発明によれば、味質に影響を与える微量の新規ステビオール配糖体を提供することができる。さらに本発明によれば、新規ステビオール配糖体の製造方法、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、ならびに風味増強剤を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0010] [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]サンプル１のm/z 1095.4の選択イオンクロマトグラムを示す図である。

[図3]サンプル１のm/z 1257.5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１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２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]（ａ）は化合物１５の^{1}H-NMRスペクトル(800MHz, Pyr-d5)を示す図であり、（ｂ）は化合物１５の^{13}C-NMRスペクトル(200MHz, Pyr-d5)を示す図である。

[図7]（ａ）は化合物１５の^{1}H-^{1}H cosyスペクトル(800MHz, Pyr-d5)を示す図であり、（ｂ）は化合物１５のHSQCスペクトル(800MHz, Pyr-d5)を示す図である。

[図8]（ａ）は化合物１５のHMBCスペクトル(800MHz, Pyr-d5)を示す図であり、（ｂ）は化合物１５のTOCSYスペクトル(800MHz, Pyr-d5)を示す図である。

[図9]化合物１５のNOESYスペクトル(800MHz, Pyr-d5)を示す図である。

[図10]（ａ）は化合物１７の^{1}H-NMRスペクトル(800MHz, Pyr-d5)を示す図であり、（ｂ）は化合物１７の^{13}C-NMRスペクトル(200MHz, Pyr-d5)を示す図である。

[図11]（ａ）は化合物１７の^{1}H-^{1}H cosyスペクトル(800MHz, Pyr-d5)を示す図であり、（ｂ）は化合物１７のHSQCスペクトル(800MHz, Pyr-d5)を示す図である。

[図12]（ａ）は化合物１７のHMBCスペクトル(800MHz, Pyr-d5)を示す図であり、（ｂ）は化合物１７のTOCSYスペクトル(800MHz, Pyr-d5)を示す図である。

[図13]化合物１７のNOESYスペクトル(800MHz, Pyr-d5)を示す図である。

[図14]新規ステビオール配糖体１（ステビア葉抽出物）と化学合成品（化合物１５のβ体）の抽出イオンクロマトグラムを示す図である。

[図15]新規ステビオール配糖体１（ステビア葉抽出物）と化学合成品（化合物１５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16]新規ステビオール配糖体２（ステビア葉抽出物）と化学合成品（化合物１７のβ体）の抽出イオンクロマトグラムを示す図である。

[図17]新規ステビオール配糖体２（ステビア葉抽出物）と化学合成品（化合物１７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18]生合成により得られたサンプルのm/z 1095.4の選択イオンクロマトグラム示す図である。

[図19]生合成により得られたサンプルのm/z 1257.5の選択イオンクロマトグラム示す図である。

[図20]新規ステビオール配糖体とレバウディオサイドＡおよびレバウディオサイドＤとを比較した官能評価の結果を示す図である。

発明を実施するための形態

[0011] 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。

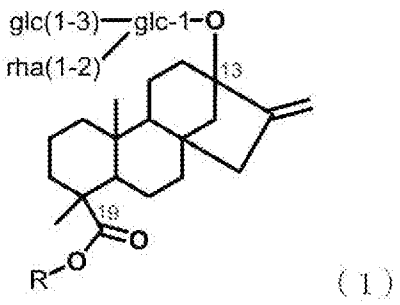
[0012] 本明細書において、「レバウディオサイド」、「レバウディオシド」およ

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「ズルコシド」と同じ意味を表すものであり、いずれも「dulcoside」を意味するものである。

[0013] 1. 新規ステビオール配糖体

本発明者らは、味質に影響を与える微量の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（以下、「本発明の配糖体」ともいう）は、式（１）：

[化1]

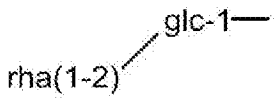


（１）

（式中、

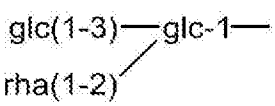
Ｒは、式（２）または式（３）：

[化2]



（２）

[化3]



（３）

の糖鎖を表し、

glcはグルコースを表し、rhaはラムノースを表す）

で示される化合物、またはその誘導体、塩、もしくは水和物である。

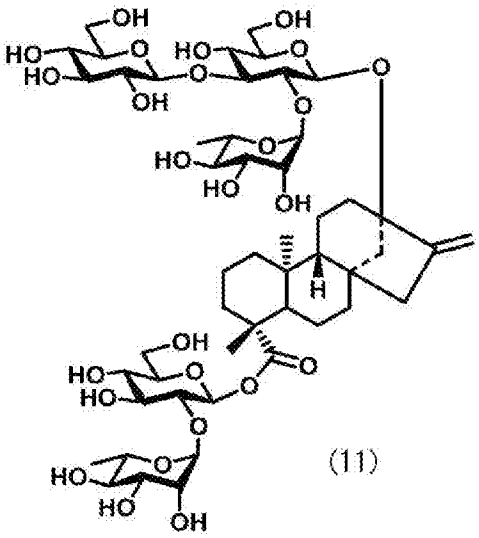
[0014] 本発明の配糖体は、上記のとおり、ステビオールの第13位に2分子のグルコースと1分子のラムノースを含む糖鎖を有し、第19位に１分子のグルコースと1分子のラムノースまたは２分子のグルコースと1分子のラムノースを含む糖鎖を有している。

[0015] また、上記のとおり、glcはグルコースを表し、rhaはラムノースを表す。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、rhaはα-ラムノースまたはβ-ラムノースであってよい。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、rhaはα-ラムノースおよびβ-ラムノースであってよい。そして、「glc-1-」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)-glc-1-」は「glc-1-」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、「rha(1-2)-glc-1-」は「glc-1-」で示されるグルコースの２位の炭素原子にラムノースの１位の炭素原子がグリコシド結合していることを示す。

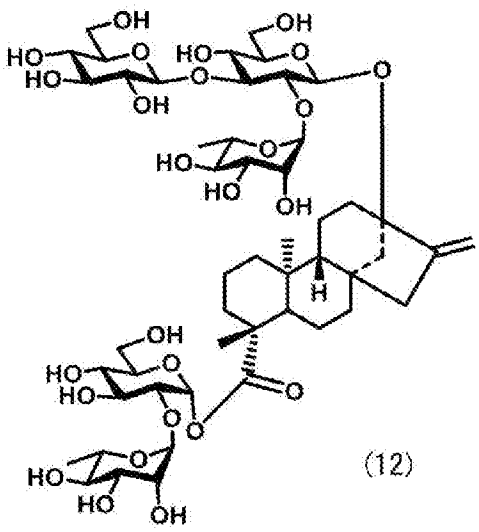
[0016] 本明細書において、式（１）で示される化合物のうち、Ｒが式（２）の糖鎖を有するものを「配糖体Ａ」とし、Ｒが式（３）の糖鎖を有するものを「配糖体Ｂ」とする。

[0017] 配糖体Ａとしては例えば、式（１１）および式（１２）で示される構造を有する配糖体が含まれる。

[化4]



(11)

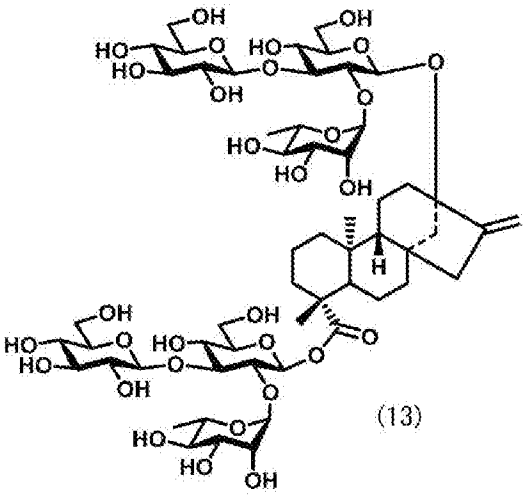


(12)

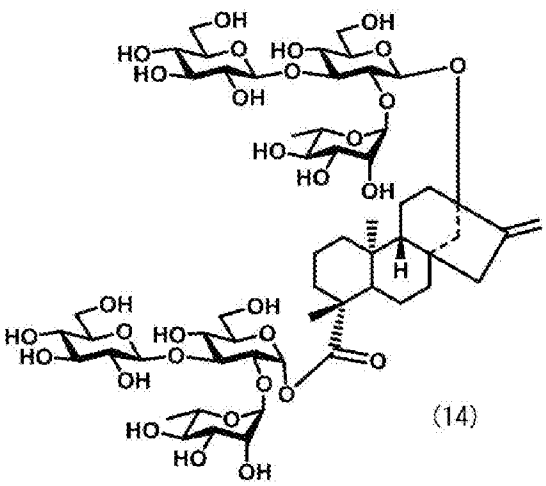
式（１１）で示される配糖体Ａは、ステビオールの１９位のカルボキシル基にグルコースがβグルコシド結合しており、式（１２）で示される配糖体Ａは、ステビオールの１９位のカルボキシル基にグルコースがαグルコシド結合している。

[0018] 配糖体Ｂとしては例えば、式（１３）および式（１４）で示される構造を有する配糖体が含まれる。

[化5]



(13)



(14)

式（１３）で示される配糖体Ｂ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、式（１４）で示される配糖体Ｂ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αグルコシド結合している。

[0019] 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。

[0020] 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ってできる化合物をいい、例えば、水酸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水酸基の一部が、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。

[0021] 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、Reb.C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。

[0022] 本発明の配糖体は、砂糖（ショ糖）よりも高い甘味を有し、かつ、甘味の立ち上がりが早く、後引きは砂糖と同程度に良いという味質を有し、飲食品等に少量含まれるだけで味質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。

[0023] 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Ｂは砂糖（ショ糖）よりも高い甘味を有し、かつ、甘味の立ち上がりが早く、後引きは砂糖と同程度に甘味後引きが良く、水溶性も高い。したがって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。配糖体Ａは配糖体Ｂよりも甘味は弱いものの、砂糖（ショ糖）よりも高い甘味を有し、かつ、甘味の立ち上がりが早く、後引きは砂糖と同程度に甘味後引きが良い。配糖体Ａも配糖体Ｂと同様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が、配糖体Ｂよりも水溶性が低いため、乳酸菌飲料、懸濁荷重飲料、および濁りを有する飲料に特に好適に使用することができる。また、医薬品等の甘味調整にも好適に使用することができる。理論に拘束されるものではないが、水溶性が低いことで、舌で感じられる苦味を抑えつつ、のどでの刺激感を高めることができ、飲料の飲みごたえ向上に有利である。

[0024] 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（以下、「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。

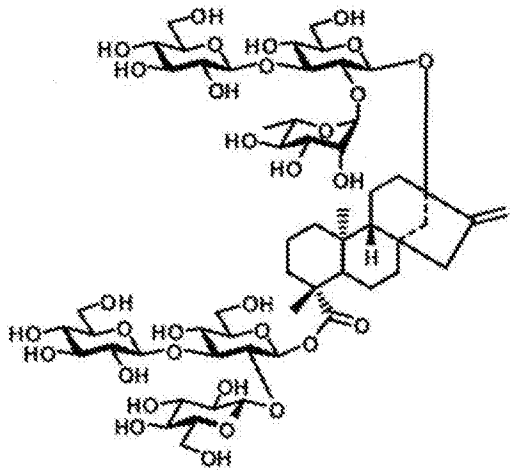
[0025] 本発明の甘味料組成物に含まれる本発明の配糖体の量は、特に限定されない。

[0026] あるいは、本発明の甘味料組成物は、野生型のステビアまたはステビア抽出物に存在する量よりも少なくとも0.01％多い量の本発明の配糖体を含む組

成物であることが好ましい。なお、上記のとおり、本発明の配糖体はReb.Cを多く含む品種から初めて検出されたものであり、野生型のステビアまたはその抽出物には、全く含まれていないか、含まれていたとしても検出限界値以下の量である。

[0027] 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、ステビオールビオシド及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。なお、本明細書において「ズルコサイドC」とは、下記の構造を有する化合物をいう。

[化6]



[0028] 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０．０１：９．９９～６：４が好ましい

。

[0029] 本発明の甘味料組成物は、さらに一般的な甘味料を含んでいてもよい。そのような一般的な甘味料としては、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。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。

[0030] ３．新規ステビオール配糖体を含む飲食品

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、もしくは水和物を含む飲食品（以下、「本発明の飲食品」ともいう）が提供される。本発明の飲食品は、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であってもよい。ここで飲食品とは、飲料及び食品を意味する。したがって、ある実施態様では、本発明は新規な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。

[0031] 本発明の飲食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、おおむね０．０００４％～０．８％であるのが好ましく、０．０４％～０．４％であることが特に好ましい。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。

[0032] 本発明の飲食品は、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及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。

[0033] 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０．０１：９．９９～６：４が好ましい。

[0034] 本発明の飲食品は、さらに一般的な甘味料を含んでいてもよい。そのような一般的な甘味料としては、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。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。

[0035] 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。

[0036] 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。

[0037] 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殺菌及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。

[0038] ４．新規ステビオール配糖体を含む植物及びその抽出物

本発明の一態様によれば、新規ステビオール配糖体を含む植物体およびその抽出物が提供される。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植物体の抽出物を含む、飲食品、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、0.001％～1.000％であるのが好ましく、0.01％～0.80％であることがより好ましい。

[0039] 本発明の植物体は、野生型ステビア種と比べ本発明の配糖体を0．01％以上高い含量で含む植物体であることが好ましい。上述のとおり、本発明のステビオール配糖体は、野生型のステビアには、全く含まれていないか、含まれていたとしても検出限界値以下の量である。

[0040] 「野生型ステビア種と比べ本発明の配糖体を0.01％以上高い含量で含む」とは、野生型ステビア植物体の新鮮葉（非乾燥葉）から得られた抽出液の単位量（例えば10ml）あたりに含まれる本発明の配糖体の量を基準（濃度）とした場合、本発明の植物体の新鮮葉（非乾燥葉）から得られた抽出液の同一単位量（前記野生型ステビア植物体の葉から得られた抽出液と同一量）あたりに含まれる本発明の配糖体の量（濃度）が0.01％以上高いことを意味する。ここで、本発明の植物体は、野生型ステビア種と比べ本発明の配糖体を0.02％以上、0.03％以上、0.04％以上、0.05％以上、0.07％以上、0.09％以上、

0.10%以上、0.15%以上、0.20%以上、0.40%以上、0.60%以上、0.80%以上、1.0%以上、1.50%以上、2.00%以上、4.00%以上、6.00%以上、8.00%以上、10.00%以上高い含量で含んでいてもよい。

[0041] また、「総ステビオール配糖体に占める本発明の配糖体の割合が0.01%以上である」とは本発明のステビア植物体の新鮮葉（非乾燥葉）から得られた抽出液に存在する総ステビオール配糖体量に対して本発明の配糖体が0.01%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及びステビオシドからなる。

[0042] 本発明の植物体に占める本発明の配糖体の含有量は以上のとおりであるが、本発明の植物体から乾燥葉を得た場合、当該乾燥葉の重量に対し本発明の配糖体は0.01重量%以上、0.02重量%以上、0.03重量%以上、0.04重量%以上、0.05重量%以上、0.07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%以上の量で存在していてもよい。

[0043] 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。

[0044] 本発明の植物体の例としては、例えば、Reb.Cを多く含む植物体が挙げられる。上述のとおり、本発明のステビオール配糖体は、野生型のステビアには、全く含まれていないか、含まれていたとしても検出限界値以下の量である。一方で、本発明者らは本発明のステビオール配糖体が、Reb.Cを多く含む植物体により多く含まれていることを知得した。したがって、新規ステビオール配糖体およびその抽出物には、このようなReb.Cを多く含む植物体およびその抽出物が含まれる。

[0045] そのようなReb.Cを多く含む植物体としては、特に限定されないが、例えば、野生型ステビア種と比べレバウディオサイドＣを２０％以上高い含量で含む高レバウディオサイドＣ含有型非遺伝子組み換えステビア植物体であって、かつ総ステビオール配糖体に占めるレバウディオサイドＣの割合が４０％以上である植物体（以下、「高Reb.C植物体」ともいう）が挙げられる。

[0046] そのような高Reb.C植物体としては、例えば、野生型ステビア種と比べレバウディオサイドＣを２０％以上高い含量で含む高レバウディオサイドＣ含有型非遺伝子組み換えステビア植物体であって、かつ総ステビオール配糖体に占めるレバウディオサイドＣの割合が４０％以上である植物体が挙げられる。

[0047] 高Reb.C植物体は、野生種のステビア植物体から派生した種であり、レバウディオサイドＣが高くなるように遺伝子に変異が生じたものである。また、当該遺伝子の変異は、特に限定されるものではないが、例えば、天然条件下で生じるか、非遺伝子組換え的手法により生じるものか、あるいは遺伝子組み換えによって生じるものが挙げられる。

[0048] 高Reb.C植物体は、例えば、当該植物体の組織から遺伝子多型を検出することによりスクリーニングすることができる。ここで、「スクリーニング」とは、高Reb.C植物体とそれ以外の植物体とを識別し、高Reb.C植物体を選択することを意味する。

[0049] 高Reb.C植物体は、被験植物のゲノムに配列番号１１に示す塩基配列の第６０番目の塩基配列が野生型のＡからＴに変異した多型を同定する工程を含む

、スクリーニング方法によってもスクリーニングすることができる。

[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、花弁、茎、根、種子など）、植物組織（例えば表皮、師部、柔組織、木部、維管束、柵状組織、海綿状組織など）あるいは種々の形態の植物細胞（例えば、懸濁培養細胞）、プロトプラスト、葉の切片、カルスなどが含まれ得る。

[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、花弁、プロトプラスト、葉の切片およびカルス等が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

[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ＷＯ２０１６／０９０４６０に記載の方法や、後述の実施例に記載の方法を参照することができる。

[0053] 本発明の植物体の抽出物は、好ましくは、野生型ステビア種と比べ本発明の配糖体を0.01％以上高い含量で含み、かつ総ステビオール配糖体に占める本発明の配糖体の割合が0.01％以上である。ここで、「野生型ステビア種と比べ本発明の配糖体を0.01％以上高い含量で含む」とは前述のとおりである。また、「総ステビオール配糖体に占める本発明の配糖体の割合が0.01％以上である」とは前述のとおりである。

[0054] ５．新規ステビオール配糖体を含む風味調整剤

本発明の新規ステビオール配糖体は、ステビア抽出物の中に微量しか含まれていないものの、該ステビア抽出物の風味に影響を与えているものと考えられる。理論に拘束されるものではないが、本発明のステビオール配糖体を少量添加することで、飲食品の風味を調整できるものと考えられる。したがって、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。

[0055] 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甘味の後引きが良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甘味の後引きを調整することができる。

[0056] 本発明の風味増強剤は、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。

[0057] 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。

[0058] （Ａ）植物体からの単離・精製

本発明の植物体は本発明の新規ステビオール配糖体を含むものであるため、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、エーテル及びアセトン等の有機溶媒）を反応させることにより抽出液の状態で抽出することができる。抽出条件等はＷＯ２０１６／０９０４６０に記載の方法や、後述の実施例に記載の方法を参照することができる。

[0059] 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。

[0060] 植物体中の新規ステビオール配糖体含有量は、ＷＯ２０１６／０９０４６０に記載の方法や、後述の実施例に記載の方法で測定することができる。具体的には本発明の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。

[0061] （２）化学合成

本発明のステビオール配糖体の化学合成による製造方法について、以下に詳細に説明する。

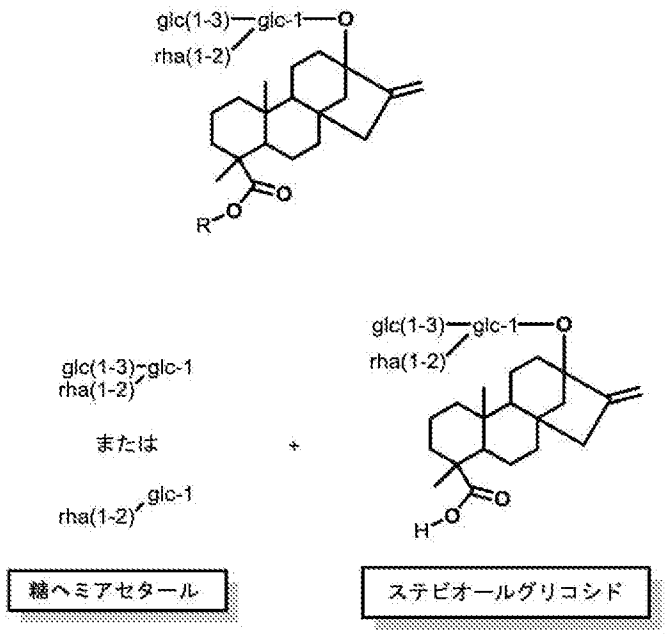
[0062] ステビオール配糖体は、アグリコンのステビオールに各種の糖（グルコース、ラムノース、キシロースなど）が、様々な結合様式（結合位置や立体）で付加した構造を有する。したがって、選択する出発原料によって、様々な合成経路を経て目的とするステビオール配糖体を得ることができる。しかし、合成経路によって目的とする化合物を得るための時間や収率などが大きく変わってくることは、本発明の技術分野における当業者が理解しているものである。

[0063] 本発明者らは、今般、特定の合成経路によって、本発明のステビオール配

糖体を高選択性、かつ、高収率で得られる新規な製造方法を知得した。本発明のステビオール配糖体の製造方法では、ステビオール配糖体の化学合成を行う際、スキーム１に示したように、ステビオール配糖体を「ステビオールグリコシド」と「糖ヘミアセタール体」に分割して合成を進める。

[化7]

スキーム１　ステビオール配糖体の新規合成法

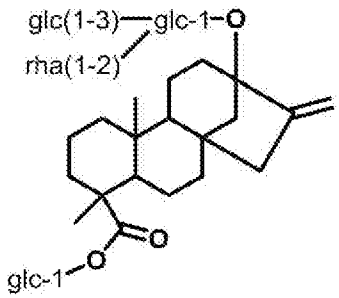


[0064]　ステビオールグリコシドは、既存の天然物（レバウディオサイド、ズルコサイド、ステビオサイド、ステビオールビオサイド、ルブソサイドなど）から誘導することで調製することができる。一方、糖ヘミアセタール体は、既存の天然物から調製するか、あるいは化学合成によって調製することができる。本発明者らは、ステビオールグリコシドと糖ヘミアセタール体を、光延反応を用いて縮合すると、良好な収率かつ極めて高いβ選択性で、目的のステビオール配糖体が得られる事を知得した。

[0065]　本発明の一態様によれば、式（１）で示される化合物の製造方法であって、

（Ａ）下記式（４）：

[化8]

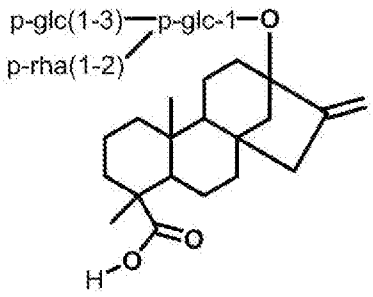


(4)

（式中、glcはグルコースを表し、rhaはラムノースを表す）

で示されるレバウディオサイドＣから、下記式（５）：

[化9]



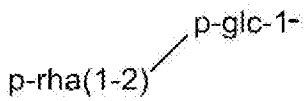
(5)

（式中、p-glcは少なくとも一つのヒドロキシル基が保護基で保護されているグルコースを表し、p-rhaは少なくとも一つのヒドロキシル基が保護基で保護されているラムノースを表す。）

で示される中間体１を調製する工程と

（Ｂ）グルコピラノシド誘導体から式（６）：

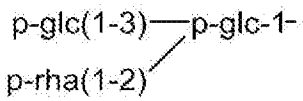
[化10]



(6)

で示される中間体２、または式（７）：

[化11]



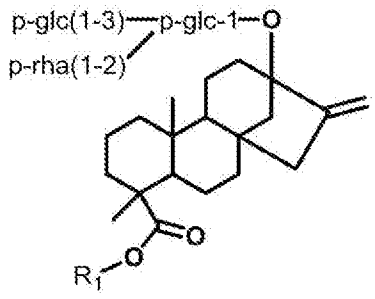
（7）

（式中、p-glcは少なくとも一つのヒドロキシル基が保護基で保護されているグルコースを表し、p-rhaは少なくとも一つのヒドロキシル基が保護基で保護されているラムノースを表す）

で示される中間体３を調製する工程と、

（Ｃ）前記中間体１と、前記中間体２または３とを、ホスフィン試薬及びアゾ化合物の存在下で反応させ、下記式（８）：

[化12]

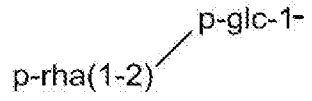


（8）

（式中、

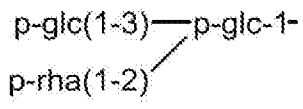
R_1は、式（９）または式（１０）：

[化13]



（9）

[化14]



（１０）

の糖鎖を表し、

p-glcは少なくとも一つのヒドロキシル基が保護基で保護されているグルコースを表し、p-rhaは少なくとも一つのヒドロキシル基が保護基で保護されているラムノースを表す）

で示される中間体４を得る工程を含む、方法が提供される。

[0066] 本明細書において、保護基としては、アシル系保護基、３置換されたシリル基、アセタール系保護基、エーテル系保護基などが挙げられる。好ましくは３置換されたシリル基（トリメチルシリル基、トリエチルシリル基、およびｔ－ブチルジメチルシリル基など）またはアシル系保護基（アセチル基、およびベンゾイル基など）が挙げられる。

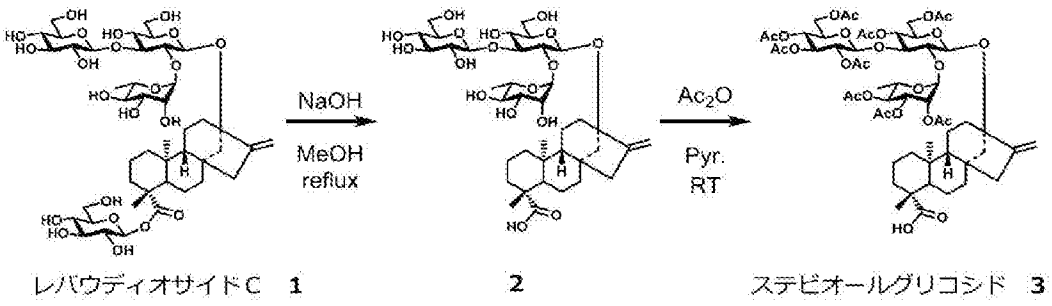
[0067] 以下に本発明のステビオール配糖体の製造方法の具体的な一態様を示すが、本発明の配糖体の製造方法がこの態様に限定されるものではない。

[0068] （Ａ）第１工程（ステビオールグリコシドの合成）

ステビオールグリコシドは、例えば、天然に存在するレバウディオサイドC（ズルコサイドB）を原料として、下記スキーム２に従って得ることができる。

[化15]

スキーム２　ステビオールグリコシドの合成



[0069] まず、レバウディオサイド Cをメタノールなどの溶媒と水に溶解し、水酸化ナトリウムなどの強塩基を加え、６０℃～１２０℃で２時間以上還流することで、レバウディオサイド Cの第１９位からグルコース分子が脱離し、上記化合物２が得られる。その際、反応液を陽イオン交換樹脂等で中和した上で溶媒を蒸発させてもよい。

[0070] 化合物２はさらにピリジン等の溶媒に溶解し、無水酢酸などを加えて化合物２に含まれる水酸基を保護することで化合物３（中間体１）を得ることができる。

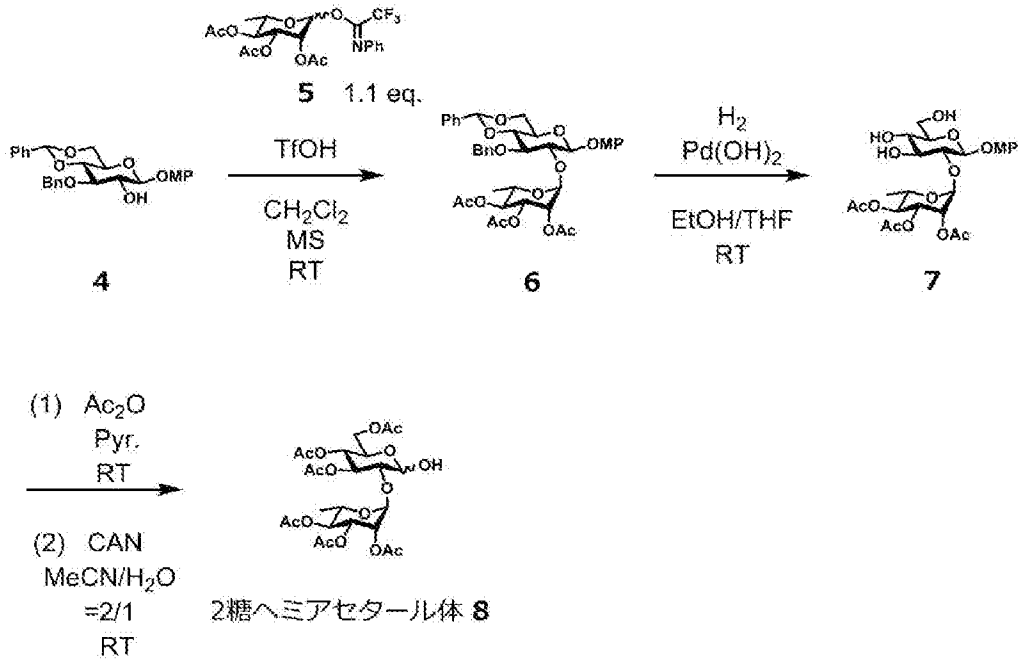
[0071] （Ｂ）第２工程（２糖または３糖ヘミアセタールの合成）

２糖ヘミアセタールと３糖ヘミアセタールは、例えば、市販されているグルコピラノシド誘導体を原料として得ることができる。２糖ヘミアセタール体の合成（第２ａ工程）をスキーム３に示し、３糖ヘミアセタール体の合成（第２ｂ工程）をスキーム４に示す。

[0072] ２糖ヘミアセタール体の合成（第２ａ工程）を示すスキーム３は下記のとおりである。

[化16]

スキーム３　2糖ヘミアセタール体の合成



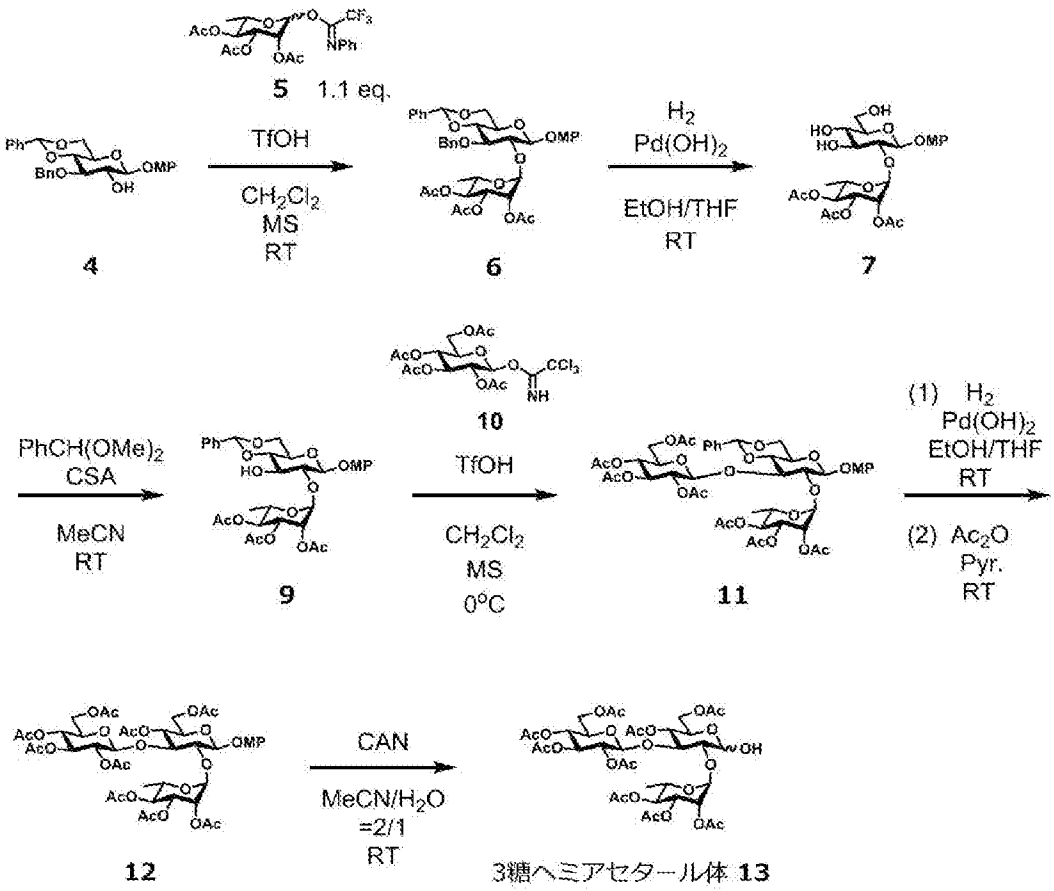
[0073]　まず、4-Methoxyphenyl 3-O-Benzyl-4,6-O-benzylidine-β-D-glucopyranoside（化合物４）、化合物５、およびモレキュラーシーブス（ＭＳ）をジクロロメタン等の溶媒に溶解し、トリフルオロメタンスルホン酸（酸触媒)を加え、２５℃～８０℃にて２時間以上撹拌することで、化合物６が得られる。

[0074]　次いで化合物６をエタノールやＴＨＦ等の溶媒に溶解させ、水酸化パラジウム等の触媒を室温で加え、水素雰囲気下、室温で２時間以上撹拌して反応を完了させた後、触媒を濾別することで化合物７が得られる。化合物７をピリジン等の溶媒に溶解し、無水酢酸を室温で加え、室温で１２～３６時間撹拌する。その後、溶液を減圧濃縮し、アセトニトリルと水を加え、セリウムアンモニウムナイトレイト等の酸化剤を加えて５分～２時間撹拌することで、化合物８（中間体２）が得られる。

[0075]　３糖ヘミアセタール体の合成（第２ｂ工程）を示すスキーム４は下記のとおりである。

[化17]

スキーム４　3糖ヘミアセタール体の合成



[0076]　まず、4-Methoxyphenyl 3-O-Benzyl-4,6-O-benzylidine-β-D-glucopyranoside（化合物４）、化合物５、およびモレキュラーシーブス（ＭＳ）をジクロロメタン等の溶媒に溶解し、トリフルオロメタンスルホン酸（酸触媒)を加え、２５℃～８０℃にて２時間以上撹拌することで、化合物６が得られる。

[0077]　次いで化合物６をエタノールやＴＨＦ等の溶媒に溶解させ、水酸化パラジウム等の触媒を室温で加え、水素雰囲気下、室温で２時間以上撹拌して反応を完了させた後、触媒を濾別することで化合物７が得られる。化合物７をアセトニトリルに溶解させ、ベンズアルデヒドジメチルアセタールを室温で加えて２時間以上撹拌することで化合物９が得られる。

[0078]　化合物９、化合物１０、およびモレキュラーシーブス（ＭＳ）をジクロロ

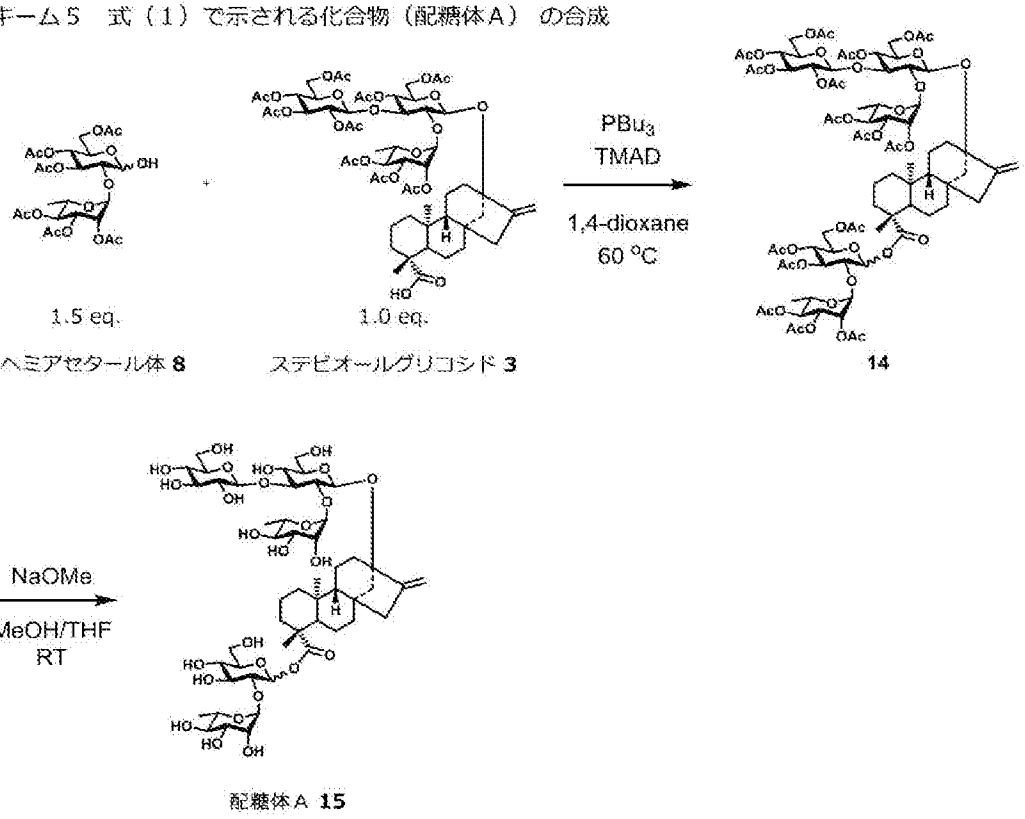
メタン等の溶媒に溶解させ、トリフルオロメタンスルホン酸を室温で加えて、０度にて３～９時間撹拌することで化合物１１が得られる。得られた化合物１１をエタノールやＴＨＦ等の溶媒に溶解させ、水酸化パラジウム等の触媒を室温で加え、水素雰囲気下、室温で２時間以上撹拌して反応を完了させた後、ピリジン等の溶媒に溶解し、無水酢酸を室温で加え、室温で１２～３６時間撹拌することで化合物１２が得られる。その後、溶液を減圧濃縮し、アセトニトリルと水を加え、セリウムアンモニウムナイトレイト等の酸化剤を加えて５分～２時間撹拌することで、化合物１３（中間体３）が得られる。

[0079] （Ｃ）第３工程（式（１）で示される化合物の合成）

式（１）で示される化合物の合成は、例えば、上記工程１および２（２ａまたは２ｂ）から得られた化合物３（中間体１）および化合物８または１３（中間体２または３）を用いて、下記スキーム５または６に従って得ることができる。

[化18]

スキーム５　式（１）で示される化合物（配糖体Ａ）の合成



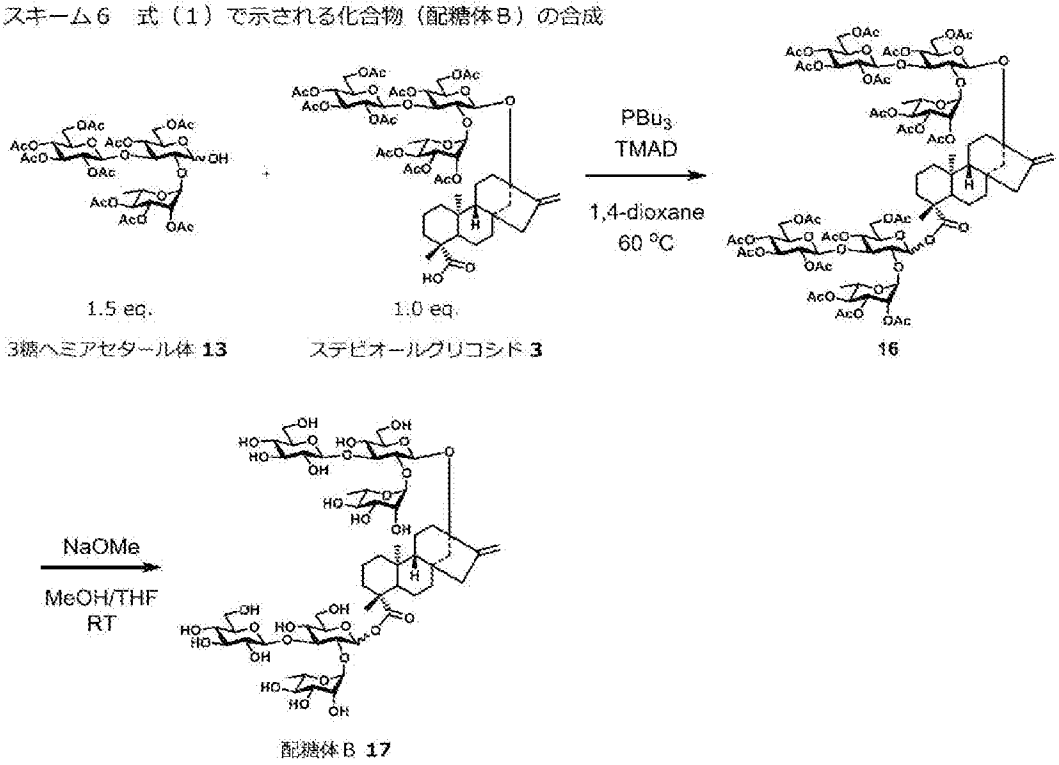
1.5 eq.　1.0 eq.

2糖ヘミアセタール体 8　ステビオールグリコシド 3　14

配糖体Ａ 15

[化19]

スキーム６　式（１）で示される化合物（配糖体Ｂ）の合成



[0080]　まず、工程１および２（２ａまたは２ｂ）で得られた２糖ヘミアセタール体または３糖ヘミアセタール体とステビオールグリコシドとを、光延反応によって反応させることで、ステビオールの１９位のカルボキシル基に２糖ヘミアセタール体または３糖ヘミアセタール体が選択的に結合した配糖体を得ることができる。具体的には、これらの化合物を1,4-ジオキサンに溶解させ、トリブチルホスフィンあるいはトリフェニルホスフィン等のホスフィン試薬、1,1’-Azobis（N,N’-dimethylformamide）（TMAD）等のアゾ化合物を室温で加え、５０℃～８０℃で２時間以上撹拌することで化合物１４または１６が得られる。最後に、化合物１４または１６の保護基を脱保護することにより、式（１）で示される化合物（配糖体ＡまたはＢ）が得られる。

[0081]（３）生合成

本発明のステビオール配糖体は、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-ラムノ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-ラムノースは、与えてもよいし、細胞内で生合成させてもよい。所定のタンパク質の例としては、ステビア由来のUGT85C2（アミノ酸配列は配列番号２）、UGT74G1（アミノ酸配列は配列番号４）、UGT91D2（アミノ酸配列は配列番号６）、UGT76G1（アミノ酸配列は配列番号８）、及びシロイヌナズナ由来のUDP-ラムノース合成酵素AtRHM2（アミノ酸配列は配列番号１０）、が挙げられるが同等の活性を有するものであればこれに限定されない。

[0082] 上記タンパク質は、シロイヌナズナまたはステビアに由来する酵素であり、シロイヌナズナやステビアといった植物細胞外の環境（例えば、細胞外、ステビア以外の宿主細胞内）においても高い活性を有することが期待される。この場合、上記タンパク質をコードするポリヌクレオチド（例えば、UGT85C2遺伝子は配列番号１、UGT74G1遺伝子は配列番号３、UGT91D2遺伝子は配列番号５、UGT76G1遺伝子は配列番号７、及びAtRHM2遺伝子は配列番号９）を、細菌、真菌類、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本発明のタンパク質を発現させ、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-ラムノースを与えることにより本発明の化合物を生成することができる。あるいは、宿主によっては、上記タンパク質を宿主細胞内で発現させ、適切な基質を与えることにより本発明の化合物を生成することもできる。

[0083] 本発明の一態様によれば、本発明の新規ステビオール配糖体を製造する方法であって、下記の（ａ）～（ｇ）の少なくとも１つのポリヌクレオチドを導入した非ヒト形質転換体を用いることを特徴とする方法が提供される。

（ａ）配列番号２のアミノ酸配列に対して９０％以上の同一性を有し、かつ、ステビオール配糖体の13位の水酸基にグルコースを付加する活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド

（ｂ）配列番号４のアミノ酸配列に対して９０％以上の同一性を有し、かつ、ステビオール配糖体の19位のカルボン酸にグルコースを付加する活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド

（ｃ）配列番号６のアミノ酸配列に対して９０％以上の同一性を有し、かつ、ステビオール配糖体の13位に結合したグルコースに1→2結合でラムノースを付加する活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド

（ｄ）配列番号８のアミノ酸配列に対して９０％以上の同一性を有し、かつ、ステビオール配糖体の13位のグルコースの3位に1→3結合でグルコースを付加する活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド

（ｅ）配列番号６のアミノ酸配列に対して９０％以上の同一性を有し、かつ、ステビオール配糖体の19位のグルコースに、1→2結合でグルコースを付加する活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド

（ｆ）配列番号８のアミノ酸配列に対して９０％以上の同一性を有し、かつ、ステビオール配糖体の19位のグルコースに、1→3結合でグルコースを付加する活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド

（ｇ）配列番号１０のアミノ酸配列に対して９０％以上の同一性を有し、かつ、UDP-グルコースからUDP-ラムノースを生成する活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド

[0084] 本発明の好ましい態様によれば、上記（ａ）～（ｇ）に記載された各配列番号の塩基配列に対して、独立に、９１％以上、９２％以上、９３％以上、９４％以上、９５％以上、９６％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、９９．１％以上、９９．２％以上、９９．３％以上、９９．４％以上、９９．５％以上、９９．６％以上、９９．７％以上、９９．８％以上、又は９９．９％以上の配列同一性を有するポリヌクレオチドを用いてもよい。

[0085] 本発明の他の好ましい態様によれば、上記（ａ）～（ｇ）に記載された各配列番号のアミノ酸配列に対して、独立に、９１％以上、９２％以上、９３％以上、９４％以上、９５％以上、９６％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、９９．１％以上、９９．２％以上、９９．３％以上、９９．４

％以上、９９．５％以上、９９．６％以上、９９．７％以上、９９．８％以上、又は９９．９％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつ上記（ａ）～（ｇ）に記載された所定の活性を有するタンパク質を用いてもよい。

[0086] 上記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。上記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。

[0087] 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デニル化に関し、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。

[0088] 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。

[0089] 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。

[0090] 本発明の発現ベクターは、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、ｔｒｃプロモーター、ｔａｃプロモーター、ｌａｃ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、ＰＨ０５プロモーター、GAL1/10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、ｔｒｐＣ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、ｒｄ２９Ａ遺伝子プロモーター、ｒｂｃＳ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ンノピン合成酵素プロモーター配列の５’側に付加したｍａｃ－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及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、TRP1、ｕｒａ５、ｎｉａＤ）、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（Ｇ４１８ｒ）、銅耐性遺伝子（ＣＵＰ１）（Ｍａｒｉｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．　ＵＳＡ，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。

[0091] 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（Mackenxie, 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。

[0092] 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。

[0093] 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

[0094] ［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、４系統の新規ステビア植物体(サンプル1(EM3-4)、サンプル2(EM2-27-8)、サンプル3(EM2-27-15)、およびサンプル4(EM2-11))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）、L-ラムノピラノシル（Rha）、キシロピラノシル（Xyl）が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、サンプル１はゲノムに配列番号１１に示す塩基配列の第６０番目の塩基配列が野生型のＡからＴに変異した多型を有する高Reb.C植物体である。なお、高Reb.C濃度の表現型と配列番号１１の多型との相関関係について統計解析を行ったところ、当該多型は高Reb.C濃度の表現型と統計学上の相関関係を有することが明らかになった。

[0095] 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° 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。

[0096] 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 x 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 μL注入した。

[0097] 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) , L-ラムノピラノシル (Rha) , キシロピラノシル (Xyl) が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 = 641.2 (Glc(2)), 773.2 (Glc (2), Xyl (1)), 787.2 (Glc (2), Rha (1)), 803.2 (Glc (3)), 935.3 (Glc (3), Xyl (1)), 949.3 (Glc (3), Rha (1)), 965.3 (Glc (4)), 1095.4 (Glc (3), Rha (2)), 1097.4 (Glc (4), Xyl (1)), 1111.4 (Glc (4), Rha (1)), 1127.4 (Glc (5)), 1257.5 (Glc (4), Rha (2)), 1259.5 (Glc (5), Xyl (1)), 1273.5 (Glc (5), Rha (1)), 1289.5 (Glc (6)), 1435.6 (Glc (6), Rha (1))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、B、D、F、 M、N、O、ステビオサイド、ズルコサイドA、 B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。

[0098]

[表1]

表 1. HPLC - MS の SIM 測定で観測されたピーク面積値 (arbitrary unit)

化合物名	ﾚﾊﾞｳﾃﾞｨｵｻｲﾄﾞ A	ﾚﾊﾞｳﾃﾞｨｵｻｲﾄﾞ C	ﾚﾊﾞｳﾃﾞｨｵｻｲﾄﾞ D	ﾚﾊﾞｳﾃﾞｨｵｻｲﾄﾞ M	ｽﾞﾙｺｻｲﾄﾞ C	新規ステビオール配糖体 1 m/z 1095.4	新規ステビオール配糖体 2 m/z 1257.5	ﾚﾊﾞｳﾃﾞｨｵｻｲﾄﾞ N
保持時間 (分)	29.60	29.96	28.00	28.66	27.70	28.73	28.50	28.18
ピーク面積値	29,669,582	30,122,062	1,428,384	1,030,603	140,947	76,369	242,070	772,570
(ｻﾝﾌﾟﾙ 1)	46.92%	47.63%	2.26%	1.63%	0.22%	0.12%	0.38%	1.22%
ピーク面積値	23,762,676	24,201,473	2,253,735	1,029,837	97,388	94,330	292,157	1,211,504
(ｻﾝﾌﾟﾙ 2)	45.13%	45.97%	4.28%	1.96%	0.18%	0.18%	0.55%	2.30%
ピーク面積値	15,386,726	5,872,656	3,585,775	3,296,579	89,988	0	86,845	896,549
(ｻﾝﾌﾟﾙ 3)	52.82%	20.16%	12.31%	11.32%	0.31%	0.00%	0.30%	3.08%
ピーク面積値	16,070,017	10,339,094	1,404,429	74,413	0	17,634	0	308,709
(ｻﾝﾌﾟﾙ 4)	56.96%	36.64%	4.98%	0.26%	0.00%	0.06%	0.00%	1.09%

[0099] 図２にサンプル1(EM3-4)のm/z 1095.4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3個のグルコース(Glc)と２個のラムノース(Rha)を含むステビオール配糖体（m/z 1095.4）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、Rt 28.73分のピークについては未知の物質である。レバウディオサイドCの含有率がレバウディオサイド Aと比べて低く、かつ糖鎖の伸長も他のサンプルよりも低いサンプル3からは Rt 28.73分のピーク値は検出限界以下であった。

[0100] 図３にサンプル1(EM3-4)のm/z 1257.5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４個のグルコース(Glc)と２個のラムノース(Rha)を含むステビオール配糖体（m/z 1257.5）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、Rt 28.50分のピークについては未知の物質である。レバウディオサイドCの含有率がレバウディオサイド Aと比べて低く、かつ糖鎖の伸長も他のサンプルよりも低いサンプル４からは Rt 28.50分のピーク値は検出限界以下であった。

[0101] ［新規ステビオール配糖体の構造解析］

本発明において、レバウディオサイドＣ高含有率品種から検出された新規ステビオール配糖体１および２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、

（ｉｉ）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、

（ｉｉｉ）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

[0102] 上記（ｉ）～（ｉｉｉ）の工程のそれぞれについて、以下に詳細に説明する。

[0103] （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10.0mg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。

[0104] 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 x 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。MS^3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。

[0105] 新規ステビオール配糖体１および２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MS^3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おり、糖鎖の分子量の合計を示している。

[0106] 図４に新規ステビオール配糖体１（m/z 1095.4, Rt:28.73に相当する）のMS/MSおよびMS^{3}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Rha１個分の脱離に相当するm/z 787.38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Glc 1個分とRha１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 787.4を断片化するMS^{3}スペクトルを取得した。その結果、レバウディオサイド CのMS^{3}スペクトル（949.4 → 787.4 → ）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 C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。

[0107] 図５に新規ステビオール配糖体２（m/z 1257.5, Rt:28.50に相当する）のMS/MSおよびMS^{3}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 ２個分とRha１個分の脱離に相当するm/z 787.38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Glc ２個分とRha１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 787.4を断片化するMS^{3}スペクトルを取得した。その結果、レバウディオサイド CのMS^{3}スペクトル（949.4 → 787.4 → ）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 C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。

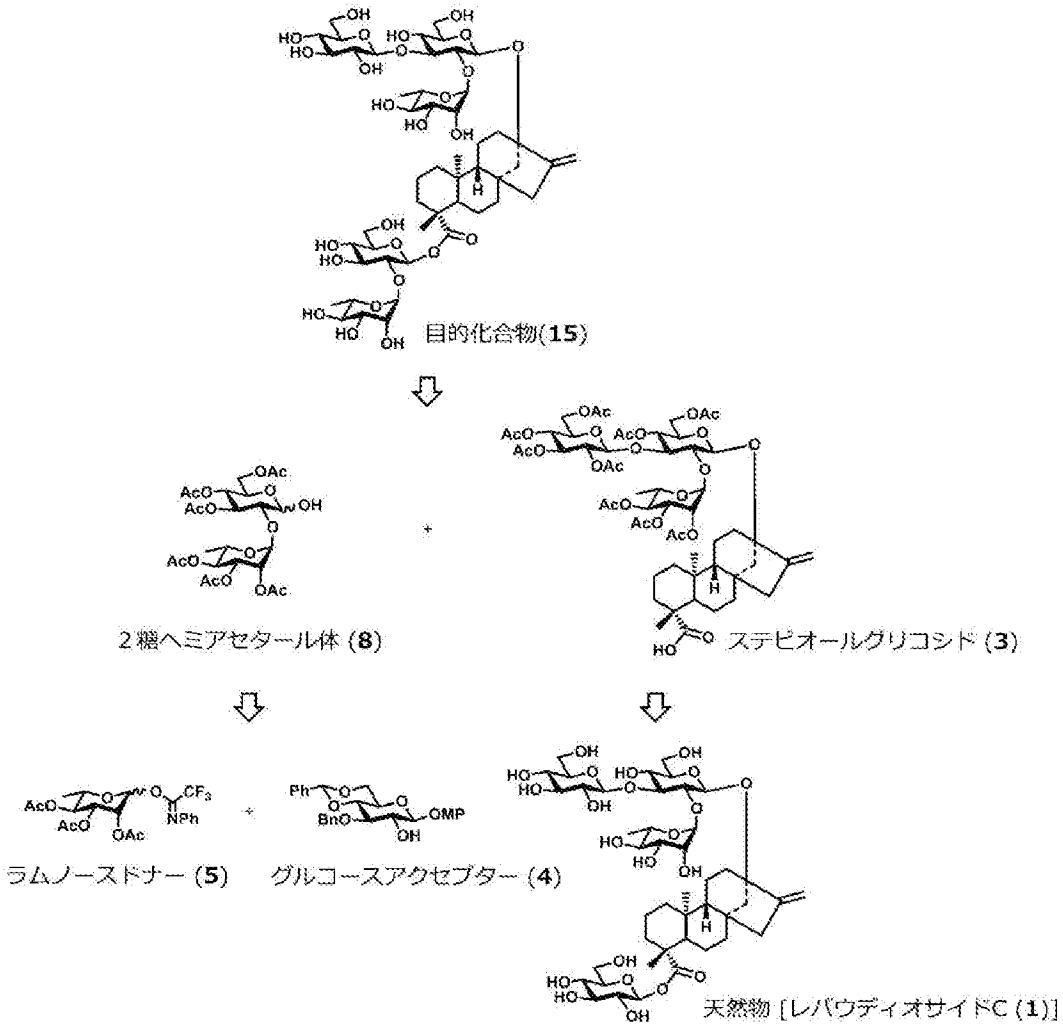
[0108] （ｉｉ）化学反応による推定ステビオール配糖体標準品の化学合成

［新規ステビオール配糖体１の合成］

（１）合成経路の概要

[化20]

スキーム７　新規ステビオール配糖体１の合成戦略



スキーム７に示したように、新規ステビオール配糖体１（化合物15）の合成では、ステビオールグリコシド（化合物3）と2糖ヘミアセタール体（化合物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（化合物15）の骨格を得る事とした。ステビオールグリコシドの合成では、既知の天然物であるレバウディオサイドC（化合物1）をArk Pharm社から購入し、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、ステビオールグリコシドを得た。2糖ヘミアセタール体 の合成では、適切に保護されたグルコースアクセプター（化合物4）

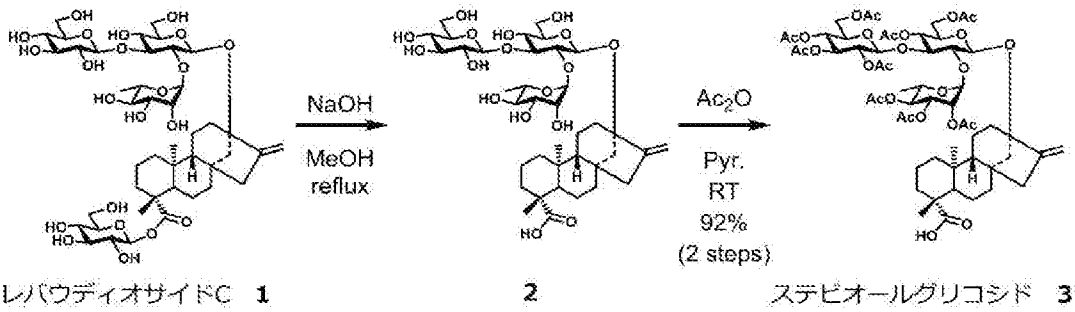
とラムノースドナー（化合物5）の縮合反応によって、2糖骨格を作り、還元末端1位の保護基を脱保護することで、2糖ヘミアセタール体を得た。得られたステビオールグリコシドと2糖ヘミアセタール体を、光延反応で縮合したところ、75%（α／β= 1/20）と良好な収率且つ高いβ選択性で反応が進行した。得られた化合物の保護基を脱保護することで、新規ステビオール配糖体１（15）を得た。

次に、各合成工程について説明する。

[0109] （２）ステビオールグリコシドの合成

[化21]

スキーム８　ステビオールグリコシドの合成



レバウディオサイドC　1　　2　　ステビオールグリコシド　3

スキーム８に示したように、ステビオールグリコシド（化合物3）の合成では、Ark Pharm社から購入したレバウディオサイドC（化合物1）（1.0g、1.05 mmol）を、メタノール（10mL）と水（10mL）に溶解させ、4 mol/L水酸化ナトリウム（2.6mL、10.5mmol）を室温で加え、100 ℃にて20時間還流した。反応終了をTLC（クロロホルム/メタノール/水 = 5/4/0.1、Rf値 = 0.9）で確認後、反応液を陽イオン交換樹脂Dowex MAC-3水素フォーム（SIGMA-ALDRICH社）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真空ポンプで18時間乾燥させ、化合物2（828mg、quant.)を得た。

[0110] 化合物2（828mg、1.05mmol）をピリジン（20mL）に溶解させ、無水酢酸（5 mL）を室温で加え、室温にて48時間攪拌した。反応終了をTLC（酢酸エチル/ヘキサン = 2/1、Rf値 = 0.5）にて確認後、飽和の炭酸水素ナトリウム水溶

液（5 mL）を加え、反応液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（酢酸エチル/ヘキサン = 2/1）にて化合物3（1.1 g、92%）を得た。

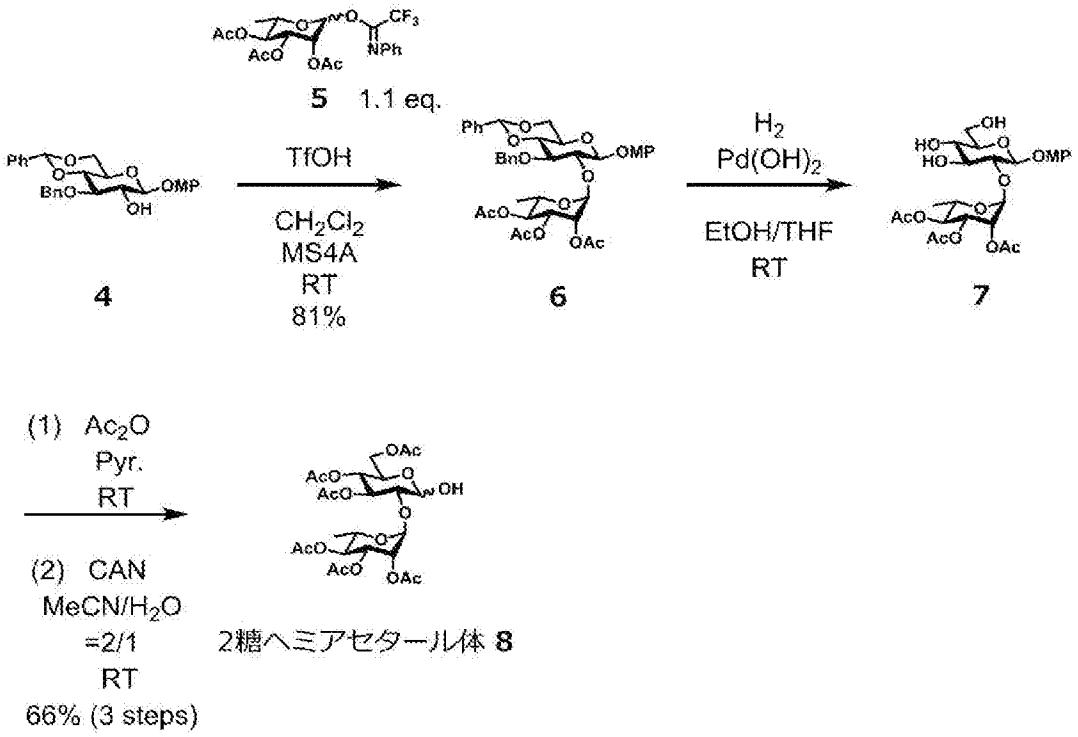
[化合物3]

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 0.81 (m, 2H), 0.83-1.45 (complex, 19H), 1.39-1.91 (complex, 24H), 1.91-2.35 (s, 30H), 3.58 (m, 1H), 3.71-3.81 (complex, 4H), 3.95-4.12 (complex, 7H), 4.34-4.46 (complex, 3H), 4.56-4.66 (complex, 4H), 4.69-4.92 (complex, 7H), 5.05-5.14 (complex, 5H), 5.23-5.38 (complex, 6H), 5.45 (s, 1H); ^{13}C-NMR ($CDCl_3$, 100 MHz) δ 15.9, 17.3, 19.1, 20.5, 20.7, 20.8, 20.9, 21.1, 21.5, 21.7, 29.1, 37.8, 38.0, 39.5, 40.7, 41.4, 42.2, 43.8, 48.4, 53.8, 56.8, 61.6, 63.0, 65.5, 66.8, 68.0, 68.6, 69.3, 69.6, 69.8, 70.5, 70.9, 71.6, 71.9, 72.4, 72.8, 73.9, 74.9, 81.3, 87.3, 96.6, 96.8, 99.2, 99.4, 125.4, 128.3, 129.1, 137.9, 151.9, 168.9, 169.2, 169.5, 169.6, 169.8, 170.1, 170.2, 170.3, 170.6, 170.9, 176.8, 183.4.

[0111] （３）2糖ヘミアセタール体の合成

[化22]

スキーム９　2糖ヘミアセタール体の合成



スキーム９に示したように、2糖ヘミアセタール体（化合物8）の合成では、東京化成から購入した4-Methoxyphenyl 3-O-Benzyl-4,6-O-benzylidine-β-D-glucopyranoside（化合物4）（3.0g、6.46mmol）と化合物5（3.3g、7.10mmol)、モレキュラーシーブス4Å（6.0g）をジクロロメタン(136mL）に溶解させ、トリフルオロメタンスルホン酸（114μL、1.29mmol）を室温で加え、室温にて18時間攪拌した。反応終了をTLC（酢酸エチル/ヘキサン = 1/2、Rf値 = 0.5）にて確認後、トリエチルアミン（100μL）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 = 1/1.5）にて化合物6（3.9g、81%）を得た。

[化合物6]

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 1.18 (d, J = 6.4 Hz, 3H, H-6 of Rha), 1.96

(s, 3H, OAc), 1.98 (s, 3H, OAc), 2.07 (s, 3H, OAc), 3.51 (m, 1H, H-5), 3.73-3.81 (complex, 5H, H-4, H-6, OMe), 3.83-3.96 (complex, 2H, H-2, H-3), 4.28 (m, 1H, H-5 of Rha), 4.36 (m, 1H, H-6'), 4.70 (d, 1H, CH_2Ph), 4.95 (d, 1H, CH_2Ph), 4.99 (d, J = 7.2 Hz, 1H, H-1), 5.03 (t, 1H, H-4 of Rha), 5.20 (dd, 1H, H-3 of Rha), 5.32 (s, 1H, H-1 of Rha), 5.34 (m, 1H, H-2 of Rha), 5.57 (s, 1H, CHPh), 6.90 (dd, 4H, OMePh), 7.21-7.49 (complex, 10H, Ph); ^{13}C-NMR ($CDCl_3$, 100 MHz) δ 14.2, 17.4, 20.8, 20.9, 21.0, 22.8, 31.7, 55.8, 66.2, 66.7, 68.8, 69.4, 69.5, 71.0, 75.2, 76.7, 77.5, 81.7, 81.8, 98.4, 100.8, 101.4, 114.8, 118.3, 126.1, 127.9, 128.4, 128.5×2, 129.2, 137.2, 137.9, 150.8, 155.7, 169.9, 170.1, 170.2.

[0112] 化合物6 (3.9g、5.29mmol) をエタノール (27mL) とTHF (27mL) に溶解させ、水酸化パラジウム (2.0g) を室温で加え、水素雰囲気下、室温にて18時間攪拌した。反応終了をTLC (クロロホルム/メタノール = 10/1、Rf値 = 0.2) にて確認後、水酸化パラジウムを濾別し、濾液を減圧濃縮した化合物7 (2.9g、quant.)を得た。

[0113] 化合物7 (1.1g, 1.97mmol) をピリジン (20mL)に溶解させ、無水酢酸 (740 μL、7.88mmol) を室温で加え、室温にて24時間攪拌した。反応終了をTLC (酢酸エチル/ヘキサン = 1/1, Rf値 = 0.6) にて確認後、トルエン (30mL) を加えた共沸を3回繰り返した。その後、減圧濃縮して得られたシラップをアセトリトリル (14mL) と水 (7.0mL) に溶解し、セリウムアンモニウムナイトレイト (3.2g、5.91mmol) を室温で加え、室温にて30分攪拌した。反応終了をTLC (酢酸エチル/ヘキサン = 1.5/1, Rf値 = 0.5) 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 / ヘキサン = 1 / 1) および (トルエン/酢酸エチル = 3/1) にて化合物8 (721 mg、66%、3 steps) を得た。

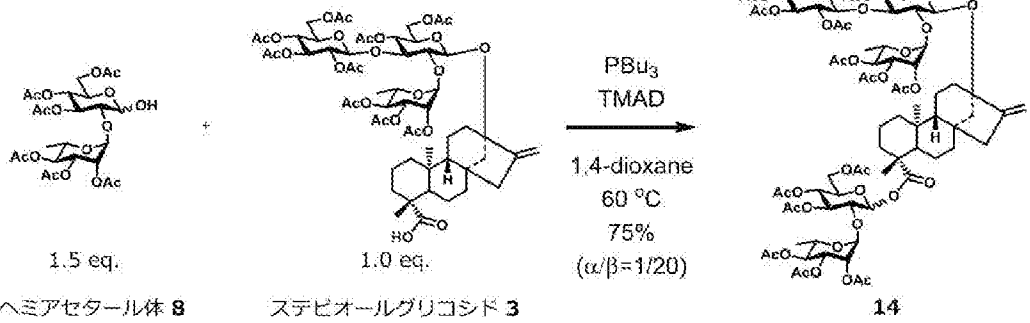
[化合物8]

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 1.16-1.19 (complex, 4.5H, H-6α of Rha, H-6β of Rha), 1.97-2.34 (complex, 27 H, OAc), 3.58 (t, 0.5H, H-2β), 3.72-3.75 (complex, 1.5H, H-2α, H-5β), 4.00 (m, 1H, H-4α of Rha), 4.05-4.16 (complex, 1.5H), 4.21-4.27 (complex, 3H), 4.76 (d, J = 7.6 Hz, 0.5H, H-1β), 4.86 (s, 1H, H-1α of Rha), 4.91 (s, 0.5H, H-1β of Rha), 4.98-5.08 (complex, 4.6H), 5.23-5.26 (complex, 2H), 5.34 (d, J = 3.2 Hz, 1H, H-1α), 5.48 (t, 1H, H-3α); ^{13}C-NMR ($CDCl_3$, 100 MHz) δ 17.2, 17.5, 20.7×2, 20.8×3, 20.9×2, 21.0, 21.6, 62.1, 62.2, 67.2, 67.3, 67.5, 68.5, 68.6, 68.7, 70.0, 70.4, 71.0, 74.2, 77.4, 77.9, 79.3, 92.0, 75.7, 98.4, 99.2, 125.4, 128.3, 129.1, 137.9, 169.8, 169.9×2, 170.0, 170.1×2, 170.2, 170.4, 170.9×2.

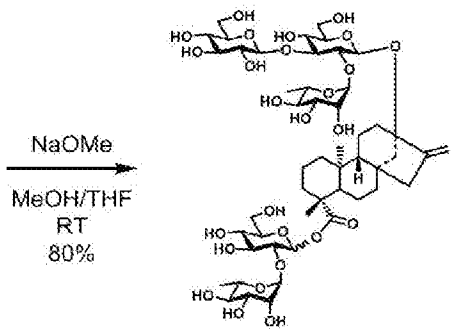
[0114] （４）化合物１５の合成

[化23]

スキーム１０　新規ステビオール配糖体１（目的化合物１５）の合成



2糖ヘミアセタール体 **8**　　ステビオールグリコシド **3**　　**14**



目的化合物 **15**

スキーム１０に示したように、化合物15の合成では、化合物8(291mg、0.503mmol)と化合物3(391mg、0.335mmol）を1,4-ジオキサン（17mL）に溶解させ、トリブチルホスフィン（252 μL、1.01 mmol)、1,1’-Azobis (N,N’-dimethylformamide)（TMAD)（173 mg、1.01 mmol）を室温で加え、60℃にて6時間攪拌した。反応終了をTLC（トルエン/酢酸エチル = 1/1、Rf値 = 0.4）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 = 1.5/1）にて化合物14（435mg、75%、α／β= 1/20）を得た。

[化合物14]

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 0.50-1.18 (complex, 7H), 1.15 (d, 3H, H-6 of Rham), 1.24 (s, 3H), 1.40-2.32 (complex, 70H), 3.60 (m, 1H), 3.73 (m, 2H), 3.82-4.28 (complex, 10H), 4.40-4.48 (complex, 2H), 4.63 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 4.72 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 4.75-4.88 (complex, 3H), 4.98 (s, 1H), 5.01-5.18 (complex, 8H), 5.24-5.31 (complex, 4H), 5.32 (s, 1H), 5.71 (d, J = 7.6 Hz, 1H, H-1β), 6.31 (d, J = 3.0 Hz, 0.05H, H-1α); ^{13}C-NMR ($CDCl_3$, 100 MHz) δ 16.6, 17.4, 17.6, 20.5, 20.7×2, 20.8×3, 20.9×3, 21.6, 29.0, 39.5, 42.5, 44.1, 53.8, 57.9, 61.7, 66.6, 67.4, 68.0, 68.3, 68.5, 68.7, 69.7, 69.8, 70.8, 71.1, 71.4, 71.9×2, 72.4, 72.9, 74.2, 75.1, 86.6, 92.2, 96.4, 96.9, 97.7, 99.3, 125.4, 128.3, 129.1, 152.9, 169.0, 169.5, 169.8×2, 169.9, 170.0, 170.1, 170.2×2, 170.3, 170.5, 170.6, 170.9×2, 174.6.

[0115] 化合物14（435mg、0.252mmol）をメタノール（2.0mL)、THF（2.0mL）に溶解させ、ナトリウムメトキサイド（0.5M in MeOH）(0.5mL、0.252mmol）を室温で加え、室温にて18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、Rf値 = 0.4）にて確認後、減圧濃縮して得られたシラップ

をゲルろ過カラム(GE Healthcare、Sephadex LH-20、エタノール)に供し、化合物15 (220mg、80%、α／β= 1/20)を得た。その後、分取HPLC(C18 YMC HPLCカラム、20mM 酢酸アンモニウム水溶液/90%アセトニトリル・10%水 = 70/30 ～ 10/90、45分)で、化合物15のβ体を単離し、凍結乾燥を行った。化合物１５の核磁気共鳴(NMR)法による構造解析データを図６～９に示す。

[化合物15（β体）]

^{1}H-NMR (pyridine-d5, 800 MHz) δ 0.68 (m, 1H), 0.86 (m, 1H), 0.98 (m, 1H), 1.11-1.15 (complex, 4H), 1.24 (m, 2H), 1.39 (m, 2H), 1.49 (s, 3H), 1.62 (m, 3H), 1.71 (d, 3H), 1.75 (d, 3H), 1.88 (m, 1H), 1.93 (m, 1H), 2.00 (m, 2H), 2.11 (m, 2H), 2.19 (m, 2H), 2.46 (m, 1H), 2.66 (m, 1H), 3.62 (m, 1H), 3.91 (m, 1H), 3.97-4.10 (complex, 5H), 4.17-4.42 (complex, 11H), 4.49 (m, 1H), 4.51-4.59 (complex, 3H), 4.73 (m, 1H), 4.82 (m, 1H), 4.87 (m, 1H), 4.98 (d, J = 8.0 Hz,1H), 5.08 (s, 1H), 5.10 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 5.66 (s, 1H), 6.26 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 6.41 (s, 1H), 6.47 (s, 1H); ^{13}C-NMR (pyridine-d5, 200 MHz) δ 17.1, 19.2×2, 20.1, 20.9, 22.3, 29.6, 37.9, 38.2, 39.9, 40.9, 41.9, 42.8, 43.7, 44.5, 48.4, 54.1, 58.3, 62.3, 62.4, 62.5, 69.8×2, 70.2, 71.2, 71.6, 72.4, 72.5, 72.6, 74.0, 74.1, 75.2, 76.4, 76.8, 77.4, 78.5, 78.8, 79.0, 79.5, 86.9, 89.8, 94.0, 98.4, 101.8, 101.9, 104.4, 105.3, 154.5, 176.2.

$[\alpha]_D$ = -46.3° (c 0.05, MeOH)

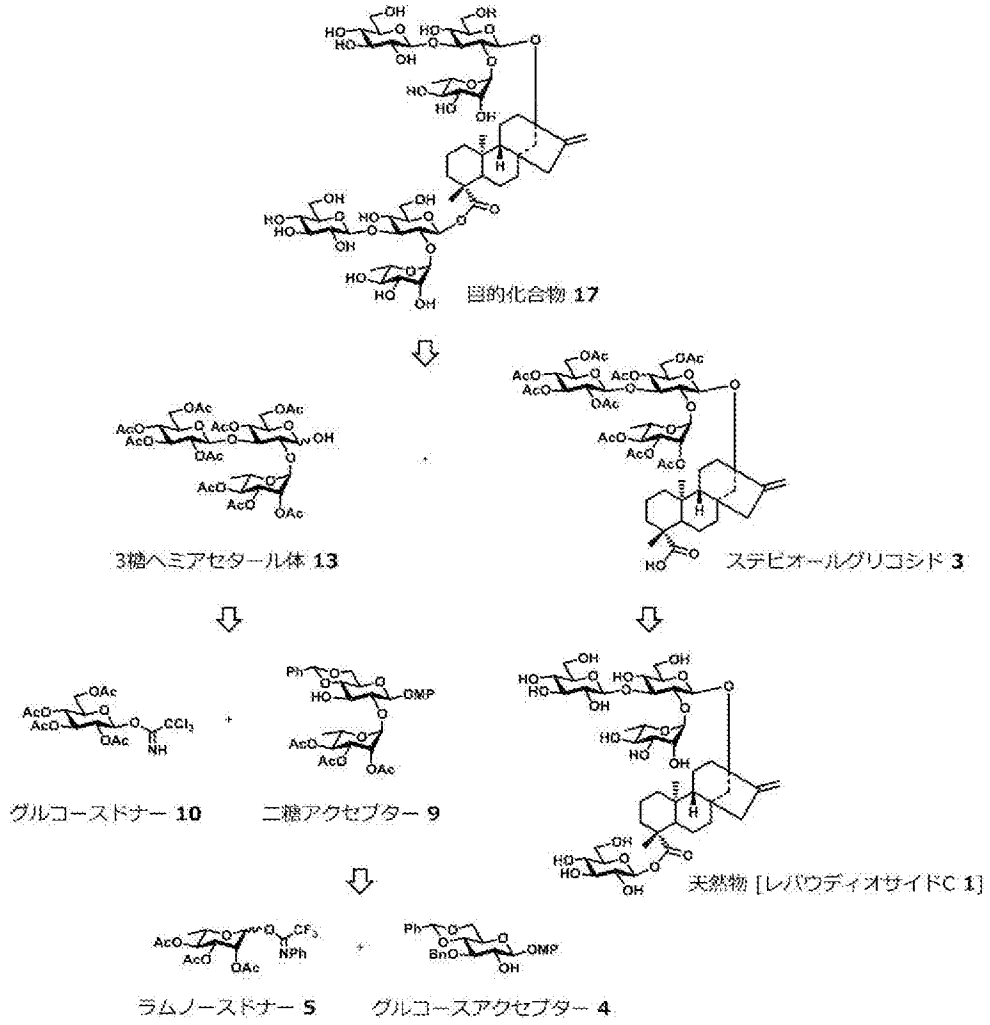
MALDI-TOF-MS m/z found $[M + Na]^+$1119.5, $C_{50}H_{80}O_{26}$calcd for $[M + Na]^+$1119.5.

[0116] [新規ステビオール配糖体２の合成]

（１）合成経路の概要

[化24]

スキーム１１　新規ステビオール配糖体２の合成戦略



スキーム１１に示したように、新規ステビオール配糖体２(化合物17)の合成では、ステビオールグリコシド（化合物3）と3糖ヘミアセタール体（化合物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の骨格を得る事とした。ステビオールグリコシド　の合成では、既知の天然物であるレバウディオサイドC（化合物1）をArk Pharm社から購入し、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、ステビオールグリコシドを得た。3糖ヘミアセタール体の合成では、適切に保護されたグルコースアクセプター（化合物4）とラムノースドナー（化合物5）の縮合反応から2糖アクセプター(化合物9)を合成し、グ

ルコースドナー(化合物10)との縮合反応によって、3糖骨格とした。得られた3糖の還元末端1位の保護基を脱保護することで、3糖ヘミアセタール体を得た。ステビオールグリコシドと3糖ヘミアセタール体を、光延反応で縮合したところ、44%（α／β＝ 1/10）と良好な収率且つ高い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を得た。

次に、各合成工程について説明する。

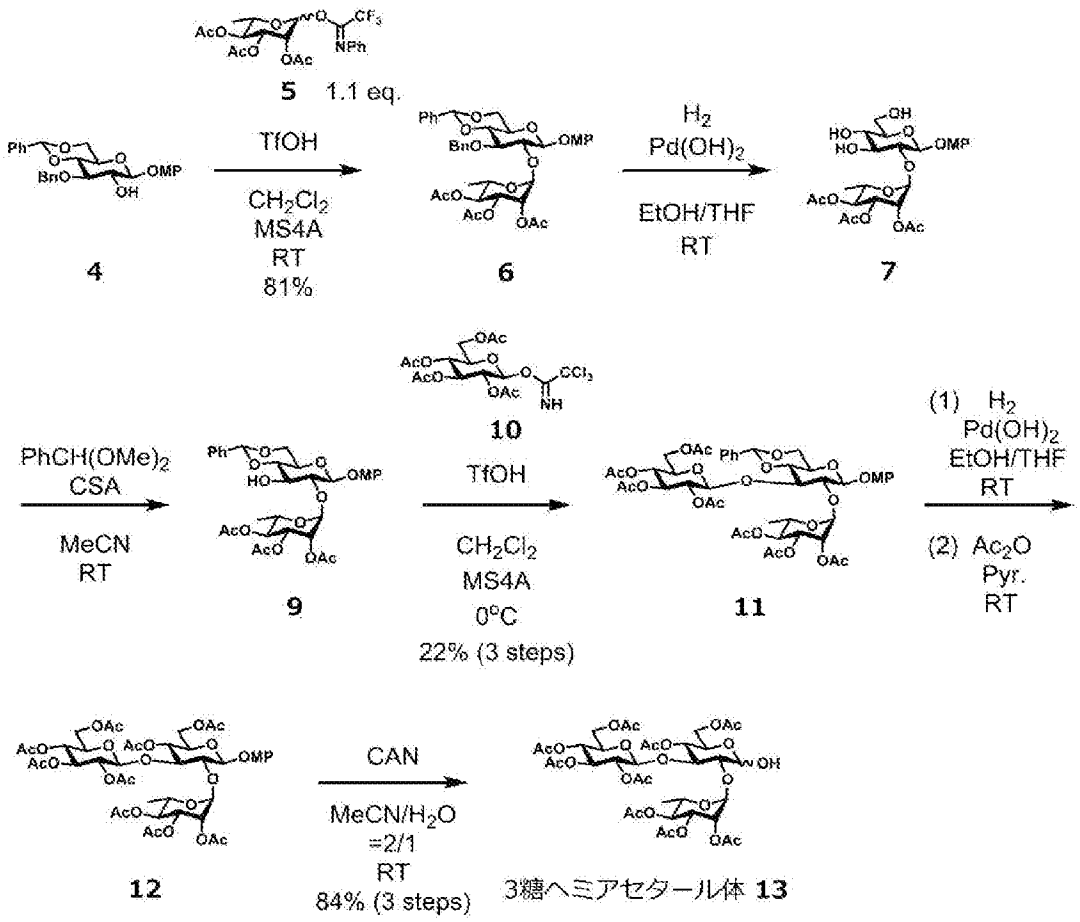
[0117] （２）ステビオールグリコシドの合成

ステビオールグリコシドの合成は、「新規ステビオール配糖体１の合成」の場合と同様の方法で行った。

[0118] （３）3糖ヘミアセタール体の合成

[化25]

スキーム１２　3糖ヘミアセタール体の合成



スキーム１２に示したように、「新規ステビオール配糖体１の合成」の場合と同様の方法で化合物６および化合物７を得た。

[0119] 化合物7（1.7g, 3.04mmol）をアセトニトリル（30mL)に溶解させ、ベンズアルデヒドジメチルアセタール（681μL、4.57mmol）を室温で加え、室温にて2時間攪拌した。反応終了をTLC（酢酸エチル/ヘキサン = 1/1, Rf値 = 0.7）にて確認した。トリエチルアミン（2mL）で中和(pH 8）後、減圧濃縮し、化合物9（2.0g）を得た。

[0120] 化合物9（2.0g、3.04mmol）と化合物10（1.6g、3.34mmol)、モレキュラーシーブス4Å（4.0g）をジクロロメタン(64mL）に溶解させ、トリフルオロメタンスルホン酸（114μL、1.29mmol）を室温で加え、0度にて6時間攪拌した。反応終了をTLC（酢酸エチル/ヘキサン = 1/1、Rf値 = 0.4）にて確認後、トリエチルアミン（100μL）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 = 1/2）にて化合物11（650mg、22%、3 steps）を得た。

[化合物11]

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 1.16 (d, J = 6.0 Hz, 1H, H-6 of Rha), 1.94-2.19 (complex, 21H, OAc), 3.43-3.52 (complex, 2H), 3.62-3.81 (complex, 5H, OMe), 3.96-4.04 (complex, 2H), 4.07-4.18 (complex, 3H), 4.28-4.35 (complex, 2H), 4.86 (d, J = 8.0 Hz, 1H, H-1), 4.94-4.98 (complex, 2H, H-1), 5.01-5.11 (complex, 2H), 5.16-5.21 (complex, 2H), 5.28 (s, 2H, H-1 of Rha), 5.52 (s, 1H, PhCH), 6.90 (dd, 4H, PhOMe), 7.31-7.49 (complex, 5H, Ph); ^{13}C-NMR ($CDCl_3$, 100 MHz) δ 14.3, 17.3, 20.4, 20.7, 20.9×3, 21.0, 21.1, 55.8, 60.5, 62.0, 66.3, 66.9, 68.3, 68.7, 69.3, 69.4, 70.7, 71.6, 71.9, 72.9, 78.9, 81.0, 97.7, 99.3, 100.7, 101.6, 114.8, 118.4, 126.2, 128.4, 129.4, 137.1, 150.7, 155.8, 169.4, 169.5, 170.0, 170.2, 170.4, 170.5, 170.8, 171.2.

[0121] 化合物11（627mg、0.642mmol）をエタノール（3mL）とTHF（3mL）に溶解させ、水酸化パラジウム（1.0g）を室温で加え、水素雰囲気下、室温にて2時間攪拌した。反応終了をTLC（酢酸エチル/ヘキサン = 2/1、Rf値 = 0.2）にて確認後、水酸化パラジウムを濾別し、濾液を減圧濃縮した。その後、ピリジン（6.4mL)に溶解させ、無水酢酸（182μL、1.93mmol）を室温で加え、室温にて18時間攪拌した。反応終了をTLC（酢酸エチル/ヘキサン = 2/1, Rf値 = 0.7）にて確認後、トルエン（20mL）を加えた共沸を3回繰り返した。その後、減圧濃縮して得られたシラップをアセトリトリル（4mL）と水（2mL）に溶解し、セリウムアンモニウムナイトレイト（1.0g、1.87mmol）を室温で加え、室温にて30分攪拌した。反応終了をTLC（トルエン/酢酸エチル = 1/1, Rf値 = 0.3）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 = 1/1)にて化合物13（468mg、84%、3 steps）を得た。

[化合物13]

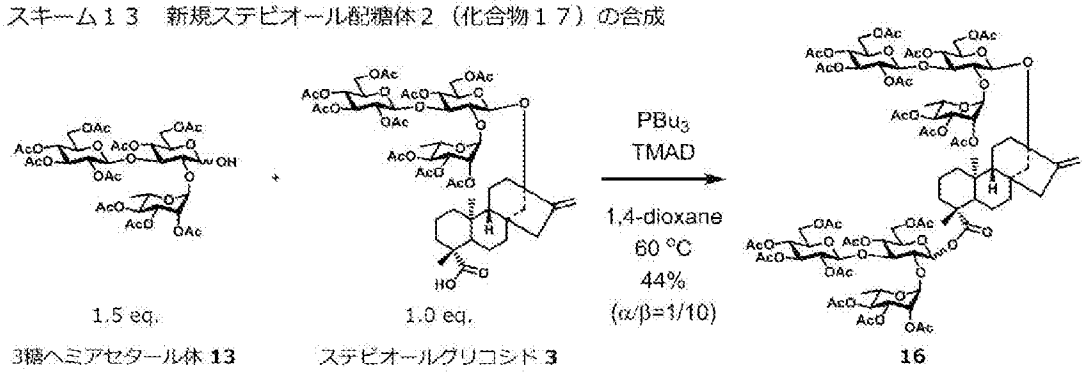
^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 1.18 (d, J = 6.4 Hz, 1H, H-6 of Rha), 1.93-2.19 (complex, 27H, OAc), 3.60 (t, 1.6H, H-2β), 3.68 (m, 1.2H, H-5β), 3.78 (m, 1.4H, H-5' β), 3.97 (t, 1H, H-3β), 4.03 (dd, 1H, H-6' β), 4.15 (m, 2.3H, H-6β, H-6β), 4.22 (m, 1.2H, H-5β of Rha), 4.43 (dd, 1.2H, H-6' β), 4.67 (d, J = 7.6 Hz, 1H, H-1β), 4.77 (d, J = 8.0 Hz, 1H, H-1' β), 4.82-4.91 (complex, 2.4H, H-4β, H-2' β), 5.06-5.14 (complex, 2.3H, H-4' β, H-4β of Rha), 5.16 (s, 1H, H-1 of Rha), 5.26-5.33 (complex, 2.4H, H-3' β, H-3β of Rha), 5.39 (m, 1.1H, H-2β of Rha); ^{13}C-NMR ($CDCl_3$, 100 MHz) δ 17.3, 17.5, 20.6, 20.7×2, 20.8×3, 20.9×2, 21.6, 29.8, 31.1, 61.7, 61.8, 62.4, 67.4, 67.6, 67.9, 68.0, 68.1×2, 68.3, 68.8×2, 69.5, 69.9, 70.6×2, 71.5, 71.8, 71.9, 72.1, 72.3, 72.8, 73.0, 75.5, 79.9, 80.1, 80.5, 91.9, 95.8, 98.1, 98.

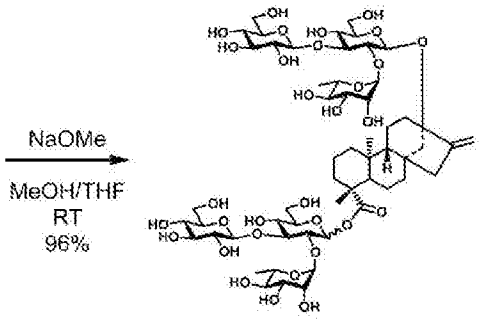
9, 99.6, 99.8, 125.4, 128.4, 129.2, 169.1, 169.4, 169.5, 169.6, 169.7, 170.0×3, 170.1, 170.4, 170.5×2, 170.7.

[0122] （４）化合物１７の合成

[化26]

スキーム１３　新規ステビオール配糖体２（化合物１７）の合成





目的化合物 17

スキーム１３に示したように、化合物17の合成では、化合物13（468mg、0.540mmol)と化合物3(420mg、0.360mmol）を1,4-ジオキサン（18mL）に溶解させ、トリブチルホスフィン（270μL、1.08mmol)、1,1’-Azobis (N,N’-dimethylformamide)（TMAD)（186mg、1.08mmol）を室温で加え、60℃にて6時間攪拌した。反応終了をTLC（トルエン/酢酸エチル = 1/1、Rf値 = 0.4）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 = 1.5/1）および（トルエン/アセトン = 3/1)にて化合物16(320mg、44%、α／β= 1/10）を得た。

[化合物16]

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 0.45-1.18 (complex, 8H), 1.28 (d, 3H, H-6 of Rham), 1.40-1.81 (complex, 20H), 1.81-2.35 (complex, 54H, OAc), 3.60 (m, 1.2H), 3.71-3.78 (complex, 3H), 3.81-3.91 (complex, 2.4H), 3.98-4.20 (complex, 10H), 4.40-4.50 (complex, 3.4H), 4.62 (d, J = 8.0 Hz, 1.1H, H-1), 4.73 (d, J = 8.0 Hz, 1H, H-1), 4.75-4.91 (complex, 7H), 4.96-5.12 (complex, 7H), 5.17 (s, 1H, H-1 of Rha), 5.21-5.31 (complex, 6H), 5.32 (s, 1H, H-1 of Rha), 5.38 (t, 1.1H), 5.60 (d, J = 8.0 Hz, 1H, H-1β), 6.22 (d, J = 3.0 Hz, 0.1H, H-1α); ^{13}C-NMR ($CDCl_3$, 100 MHz) δ 16.7, 17.5, 20.5, 20.7×2, 20.8×2, 20.9×2, 21.0, 21.6, 29.0, 39.6, 42.5, 44.0, 53.9, 58.1, 61.7, 66.7, 67.6, 68.0, 68.1, 68.3, 68.5, 69.8, 70.2, 70.7, 71.2, 71.4, 71.8, 71.9, 72.2, 72.4, 72.8, 72.9, 75.2, 80.3, 81.4, 86.6, 92.2, 96.4, 96.9, 99.3, 99.8, 125.4, 128.4, 129. 2, 138.0, 152.9, 169.0, 169.3, 169.5×2, 169.6×2, 169.8, 170.1×3, 170.2, 170.5, 170.6, 170.9×2, 174.7.

[0123] 化合物16 (300mg、0.149mmol) をメタノール (2.0mL)、THF (2.0mL) に溶解させ、ナトリウムメトキサイド (0.5 M in MeOH) (0.3mL、0.149mmol) を室温で加え、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、Rf値 = 0.5) にて確認後、減圧濃縮して得られたシラップをゲルろ過カラム(GE Healthcare、Sephadex LH-20、エタノール)に供し、化合物17 (188mg、96%、α／β= 1/10)を得た。その後、分取HPLC(C18 YMC HPLCカラム、20mM 酢酸アンモニウム水溶液/90%アセトニトリル・10%水 = 70/30 ～ 10/90、45分)で、化合物17のβ体を単離し、凍結乾燥を行った。化合物１７の核磁気共鳴(NMR)法による構造解析データを図１０～１３に示す。

[化合物17 (β体)]

^{1}H-NMR (pyridine-d5, 800 MHz) δ 0.67 (m, 1H), 0.86 (m, 1H), 0.96 (m, 1H), 1.07 (m, 1H), 1.14 (s, 3H), 1.26 (m, 1H), 1.36 (m, 1H), 1.41 (m, 1H), 1.48 (s, 3H), 1.61 (m, 3H), 1.70 (m, 6H), 1.87-2.21 (complex, 1

1H), 2.46 (m, 1H), 2.57 (m, 1H), 3.63 (m, 1H), 3.85 (m, 1H), 3.95-4.09 (complex, 8H), 4.14-4.31 (complex, 14H), 4.33 (m, 1H), 4.45 (m, 2H), 4.55 (m, 3H), 4.78 (m, 1H), 4.82 (m, 1H), 4.86 (m, 1H), 4.98 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 5.05-5.11 (complex, 3H), 5.66 (s, 1H), 6.17 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 6.24 (s, 1H), 6.46 (s, 1H); ^{13}C-NMR (pyridine-d5, 200 MHz) δ 17.0, 19.2, 20.1, 20.9, 22.3, 29.6, 37.8, 38.3, 39.9, 40.8, 41.9, 42.7, 43.7, 44.5, 48.4, 54.2, 58.4, 61.9, 62.4, 62.5, 69.1, 69.8×2, 70.5, 71.6, 71.7, 72.3, 72.4, 72.5×2, 73.9, 74.1, 75.2, 76.4, 76.5, 77.5, 78.3, 78.4, 78.5, 78.8×2, 86.9, 88.8, 89.8, 93.8, 98.4, 101.8, 101.9, 104.4, 104.5, 105.3, 154.4, 176.0.

$[\alpha]_D$ = -44.5° (c 0.1, MeOH)

MALDI-TOF-MS m/z found $[M + Na]^+$1281.4, $C_{56}H_{90}O_{31}$calcd for $[M + Na]^+$1281.5.

[0124] （ｉｉｉ）化学合成標準品のＨＰＬＣ－ 高分解能MS/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決定

（ｉ）と同条件で、ＨＰＬＣ－ 高分解能MS/MSおよびMS^{3}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29.1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１４）。また、それぞれのMS/MSおよびMS^{3}断片化マススペクトル（図１５）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１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。

[0125] さらに、（ｉ）と同条件で、ＨＰＬＣ－ 高分解能MS/MSおよびMS^{3}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28.9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１６）。また、それぞれのMS/MSおよびMS^{3}断片化マススペクトル（図１７）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２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。

[0126] ［新規ステビオール配糖体の生合成］

酵母において、ステビオールから新規ステビオール配糖体を生成させた。まず、ステビア由来の配糖化酵素遺伝子UGT85C2、UGT91D2、UGT74G1、UGT76G1の4種と、シロイヌナズナ由来UDP-ラムノース合成酵素遺伝子AtRHM2を同時に発現させる酵母を育種した。

[0127] 本実施例において用いる分子生物学的手法は、他で詳述しない限り、Molecular Cloning (Sambrookら, Cold Spring Harbour Laboratory Press, 2001) に記載の方法に従った。

[0128] ステビア由来の4つの配糖化酵素遺伝子をクローニングするために、下記のプライマーセットを合成し、ステビア葉から調製したcDNAを鋳型にPCRを行った。

UGT85C2遺伝子増幅用プライマーセット

CACC-NdeI-SrUGT85C2-Fw（下線部NdeI認識部位）：

5’-CACCCATATGGATGCAATGGCTACAACTGAGAA-3’（配列番号１２）

BglII-SrUGT85C2-Rv（下線部BglII認識部位）：

5’-AGATCTCTAGTTTCTTGCTAGCACGGTGATTT-3’（配列番号１３）

UGT91D2遺伝子増幅用プライマーセット

SrUGT91D2-pET15b-FW

5’-TGCCGCGCGGCAGCCATATGTACAACGTTACTTATCATC-3’（配列番号３５）

SrUGT91D2-pET15b-RV

5’-GTTAGCAGCCGGATCCTTAACTCTCATGATCGATGGCAA-3’（配列番号３６）

UGT74G1遺伝子増幅用プライマーセット

CACC-NdeI-SrUGT74G1-Fw（下線部NdeI認識部位）：

5’-CACCCATATGGCGGAACAACAAAAGATCAAGAAAT-3’　（配列番号１４）

BamHI-SrUGT74G1-Rv（下線部BamHI認識部位）：

5’-GGATCCTTAAGCCTTAATTAGCTCACTTACAAATT-3’　（配列番号１５）

UGT76G1遺伝子増幅用プライマーセット

CACC-NdeI-SrUGT76G1-Fw（下線部NdeI認識部位）：

5’-CACCCATATGGAAAATAAAACGGAGACCA-3’　（配列番号１６）

BamHI-SrUGT76G1-Rv（下線部BamHI認識部位）：

5’-GGATCCTTACAACGATGAAATGTAAGAAACTA-3’　（配列番号１７）

[0129] ステビア葉cDNAについてはステビア葉からRNeasy Plant Miniキット（QIAGEN）を用いて総RNAを抽出し、そのうち0.5μgをRandom Oligo-dTプライマーで逆転写（RT）反応することによって得た。

[0130] PCR反応液（50μl）は、ステビア葉由来cDNA 1μl、1×KOD plus buffer（TOYOBO）、0.2mM dNTPs、プライマー各0.4pmol/μl、1mM $MgSO_4$, 1U 耐熱性 KOD plus polymeraseからなる組成とした。PCR反応は、95℃で5分間反応させた後、94℃で0.5分間、50℃で0.5分間、68℃で2分間の反応を計30サイクルの増幅を行った。各PCR産物を0.8%アガロースゲルによる電気泳動し、エチジウムブロマイド染色した結果、それぞれの鋳型DNAから推定された約1.4kbのサイズに増幅バンドが得られた。

このPCR産物はpENTR-TOPO Directionalベクター（Invitrogen）に製造業者が推奨する方法でサブクローニングした。DNA Sequencer model 3100（Applied Biosystems）を用い、合成オリゴヌクレオチドプライマーによるプライマーウォーキング法によって配列を決定し、目的のUGT遺伝子、すなわちUGT85C

2、UGT91D2、UGT74G1、UGT76G1の全てのUGT遺伝子がクローニングできたことを確認した。

[0131] 酵母用発現ベクターの構築

これらのUGT遺伝子、およびシロイヌナズナ由来のUDP-ラムノース合成酵素遺伝子AtRHM2（J Biol Chem 2007 Oka et. al）を酵母発現ベクターに組み込むために下記のプライマーセットを設計した。

SrUGT85C2セット

Bgl2-UGT85C2-F（下線部BglII認識部位）：

5’-ACAGATCTATGGATGCAATGGCTACAACTGAGA-3’ （配列番号１８）

Sal-UGT85C2-R（下線部SalI認識部位）：

5’-TAGTCGACTAGTTTCTTGCTAGCACGGTGATTTC-3’ （配列番号１９）

SrUGT91D2セット

NotI-UGT91DIL3-F（下線部NotI認識部位）：

5’-AAGCGGCCGCATGTACAACGTTACTTATCATCAAAATTCAAA-3’ （配列番号２０）

Pac-UGT91D1L3-R（下線部PacI認識部位）：

5’-CGTTAATTAACTCTCATGATCGATGGCAACC-3’ （配列番号２１）

SrUGT74G1セット

Not-UGT74G1-F（下線部NotI認識部位）：

5’-AAGCGGCCGCATGGCGGAACAACAAAAGATCAAG-3’ （配列番号２２）

Pac-UGT74G1-R（下線部PacI認識部位）：

5’-CGTTAATTAAGCCTTAATTAGCTCACTTACAAATTCG-3’ （配列番号２３）

SrUGT76G1セット

Bam-UGT76G1-F(下線部BamHI認識部位）：

5’-AAGGATCCATGGAAAATAAAACGGAGACCACCG-3’ （配列番号２４）

Sal-UGT76G1-R(下線部SalI認識部位）：

5’-GCGTCGACTTACAACGATGAAATGTAAGAAACTAGAGACTCTAA-3’ （配列番号２５）

AtRHM2セット

Bam-AtRHM2-F（下線部BamHI認識部位）：

5’-GGATCCATGGATGATACTACGTATAAGCCAAAG-3’ （配列番号２６）

Xho-AtRHM2-R（下線部XhoI認識部位）：

5’-CTCGAGTTAGGTTCTCTTGTTTGGTTCAAAGA-3’ （配列番号２７）

[0132] UGT85C2を鋳型としてSrUGT85C2セット、UGT91D2を鋳型としてSrUGT91D2セット、UGT74G1を鋳型としてSrUGT74G1セット、UGT76G1を鋳型としてSrUGT76G1セット、AtAHM2を鋳型としてAtAHM2セットの鋳型とプライマーの組み合わせで、耐熱性KOD DNAポリメラーゼ（東洋紡）を用いて、PCRにより増幅し、それぞれのORFの両端に制限酵素サイトを付加した。得られたDNA断片を、ゼロBlunt-TOPO PCRクローニングキット（インビトロジェン）を用いてサブクローニングし、DNA Sequencer model 3100 (Applied Biosystems) を用い、合成オリゴヌクレオチドプライマーによるプライマーウォーキング法によって配列を決定し、目的のUGT遺伝子がそれぞれクローン化されていることを確認した。

[0133] pESC酵母発現システム（ストラタジーン）を用いて、上記遺伝子を酵母で発現させるために、次の発現ベクターを構築した。

（1）プラスミドpESC-URA-UGT56の構築

UGT85C2を制限酵素BglIIと制限酵素SalIで切り出し、ベクターpESC-URA（ストラタジーン）を制限酵素BamHIと制限酵素SalIで切断したものと連結して、プラスミドpESC-URA-UGT-5を得た。このプラスミドpESC-URA-UGT-5を制限酵素NotIと制限酵素PacIで切断したものと、UGT91D2を制限酵素NotIと制限酵

素PacIで切り出したものを連結し、pESC-URA-UGT56を得た。

（2）プラスミドpESC-HIS-UGT78の構築

UGT76G1を制限酵素BamHIと制限酵素SalIで切り出し、ベクターpESC-HIS（ストラタジーン）を同じ制限酵素で切断したものを連結し、プラスミドpESC-HIS-UGT-8を得た。このプラスミドpESC-HIS-UGT-8を制限酵素NotIと制限酵素PacIで切断したものと、UGT74G1をNotIとPacIで切り出したものを連結し、pESC-HIS-UGT78を得た。

（3）プラスミドpESC-TRP-AtRHM2の構築

AtAHM2を制限酵素BamHIと制限酵素XhoIで切り出し、ベクターpESC-TRP（ストラタジーン）を同じ制限酵素で切断したものを連結し、プラスミドpESC-TRP-AtAHM2を得た。

[0134] 酵母の形質転換

Saccharomyces cerevisiae YPH499株（ura3-52 lys2-801^{amber}ade2-101^{ochre} trp1-Δ63 his3-Δ200 leu2-Δ1 a）を宿主として、酢酸リチウム法で、表２のプラスミドを導入した。形質転換株として、SC-Trp&Ura&His寒天培地（1Lあたり、Yeast nitrogen baase without amino acids 6.7g、グルコース 20g、アミノ酸ミックスパウダー-Trp&Ura&His 1.3g、Bacto agar 20g）で生育するものを選抜した。

[表2]

表２

形質転換株	導入したプラスミド	導入された遺伝子
A-5678	pESC-URA-UGT-56 pESC-HIS-UGT-78 pESC-TRP-AtAHM2	SrUGT85C2、SrUGT91D2 SrUGT74G1、SrUGT76G1 AtAHM2

[0135] なお、アミノ酸ミックスパウダー-Trp&Ura&Hisは、アデニン硫酸塩 2.5g、L-アルギニン塩酸塩 1.2g、L-アスパラギン酸 6.0g、L-グルタミン酸 6.0g、L-ロイシン3.6g、L-リジン 1.8g、L-メチオニン 1.2g、L-フェニルアラニン 3.0g、L-セリン 22.5g、L-スレオニン12g、L-チロシン 1.8g、L-

バリン　9.0gを混ぜて調製した。

[0136] 導入遺伝子の発現誘導と発現解析

得られた形質転換株を以下の通り培養した。

まず、前培養としてSC-Trp&Ura&His液体培地（SC- Trp&Ura&His寒天培地のBacto agarを除く）10 mlに、それぞれの形質転換株を植菌し、30℃で1日間振とう培養した。次に、本培養として前培養液のうち、1 mlを10 mlのSG-Trp&Ura&His液体培地（1Lあたり、Yeast nitrogen baase without amino acids 6.7g、ガラクトース　20g、アミノ酸ミックスパウダー-Trp&Ura&His　1.3g）に植菌し、30℃で2日間振とう培養した。

[0137] 形質転換株で導入した遺伝子が発現したかどうかを確認するため、培養液から菌体を集め、RNeasy Mini Kitを用いて、トータルRNAを精製した。

[0138] トータルRNA　1μgをとり、スーパースクリプトII逆転写酵素（サーモフィッシャーサイエンティフィック）、ランダムヘキサマーをプライマーとして、cDNAを合成した。

[0139] 導入遺伝子の発現を確認するために、以下のプライマーを作製した。

UGT85C2発現確認用

UGT85C2-r1：

5’-CAAGTCCCCAACCAAATTCCGT-3’　（配列番号２８）

UGT91D2発現確認用

UGT91D1L3-r1：

5’-CACGAACCCGTCTGGCAACTC-3’　（配列番号２９）

UGT74G1発現確認用

UGT74G1-r1：

5’-CCCGTGTGATTTCTTCCACTTGTTC-3’　（配列番号３０）

UGT76G1発現確認用

UGT76G1-r1：

5’-CAAGAACCCATCTGGCAACGG-3’ （配列番号３１）

AtAHM2 発現確認用

AtAHM2-r1

5’-GCTTTGTCACCAGAATCACCATT-3’ （配列番号３２）

GAL10p領域 （プロモーター領域）

PGAL10-f3：

5’-GATTATTAAACTTCTTTGCGTCCATCCA-3’ （配列番号３３）

GAL1p領域（プロモーター領域）

PGAL1-f3：

5’-CCTCTATACTTTAACGTCAAGGAGAAAAAACC-3’ （配列番号３４）

[0140] 各導入遺伝子が発現していることは、以下のプライマーの組み合わせで、先に合成したcDNAを鋳型として、ExTaq（タカラバイオ）を用いてPCRを行い、その産物をアガロースゲル電気泳動により確認した。

UGT85C2：UGT85C2-r1（配列番号２８）とPGAL1-f3（配列番号３４）

UGT91D2またはUGT91D2L3：UGT91D1L3-r1（配列番号２９）とPGAL10-f3（配列番号３３）

UGT74G1：UGT74G1-r1（配列番号３０）とPGAL1-f3（配列番号３４）

UGT76G1：UGT76G1-r1（配列番号３１）とPGAL10-f3（配列番号３３）

AtAHM2：AtAHM2-r1（配列番号３２）とPGAL10-f3（配列番号３３）

これにより、形質転換株で、導入した遺伝子が発現していることが確認できた。

[0141] 新規ステビオール配糖体の生産

培養は、本培養用の液体培地に培地1 mlあたり0.5μgまたは2μｇのステビオール（ChromaDex Inc.）を添加した以外は、上記実施例と同様の条件で行った。培養終了後、培養液を遠心分離により、上清と菌体に分離した。培養上清を、アセトニトリルで洗浄後、水で平衡化したSep-Pak C18カラムに供し、20% アセトニトリルで洗浄後、80%アセトニトリルで溶出し、乾固後、少量の80% アセトニトリルに溶解して配糖体サンプルを調製した。この配糖体サンプルを以下の分析に供した。

[0142] LC-MSによる分析

LC-MSによる分析は、「新規ステビオール配糖体の単離」についての実施例に記載のとおり分析した。

[0143] 結果を図１８および１９に示した。A-5678株で新規ステビオール配糖体１および２が生成していることが確認できた。この結果は、上記の化学合成によって得られたステビオール配糖体と一致していた。

[0144] 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の甘味度を評価するため、Brix０．５から３まで０．５刻となるようショ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２と同じ構造を有する化合物１７を１，７００ｐｐｍとなるように純水に添加してサンプルを調製した。ここで、化合物１７中に含まれるα体とβ体との比率（α：β、モル比）は１：１０であった。

[0145] 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ショ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（５名）がパネラーとなって官能評価を行った。その結果、新規配糖体２を添加した調製サンプルがＢｒｉｘ１のショ糖添加サンプルと同等の甘味を持つことがわかった。したがって、本新規ステビオール配糖体はショ糖に対し１４．７の甘味度を持つことがわかった。新規ステビオール配糖体１については、水に十分に溶解しなかったため正確な甘味度は得られなかったが、後述のとおり、新規ステビオール配糖体１も甘味を有することが確認された。

[0146] 新規ステビオール配糖体（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、図２０に示した添加量となるようにＲｅｂ．Ａと、Ｒｅｂ．Ｄと、新規ステビオール配糖体２と同じ構造を有する化合物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３００、Ｒｅｂ．Ｄについては２５０、新規配糖体２（化合物１７）については１４．７として、ショ糖（スクロース）換算のＢｒｉｘが最終的に２となるように調整した。

[0147] 得られた飲料サンプルについて、甘味立ち上がり、甘味の後引き、甘味総量、雑味、および雑味の後引きの指標で官能評価を行った。なお、雑味とは本明細書において苦味を含む、渋味など甘味以外の好ましくない香味を意味する。甘味料の官能に関して訓練を受けた者（７名：サントリー食品インターナショナル株式会社）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。とても弱い（－３）、弱い（－２）、やや弱い（－１）、普通（０）、やや強い（＋１）、強い（＋２）、およびとても強い（＋３）。結果を図２０に示す。図中に示す評点は７名のパネラーによる評点の平均値である。

[0148] 官能評価の結果、新規ステビオール配糖体２と同じ構造を有する化合物１７は従来の甘味料であるＲｅｂ．ＡやＲｅｂ．Ｄよりも甘味の立ち上がりが早く、後引きは砂糖と同程度に良かった。また、Ｒｅｂ．Ｄと同程度の甘味総量を有することが分かった。

[0149] 新規ステビオール配糖体（化合物１５および１７）の粉体の香味評価

新規ステビオール配糖体１および２それぞれの粉体における香味を評価した。具体的には、化学合成によって得られた化合物１５（新規ステビオール配糖体１に対応）と化合物１７（新規ステビオール配糖体２に対応）を高速液体クロマトグラフィー（High Performance Liquid Chromatography：HPLC）を用いてβ体のみを単離し、粉体状としたものについて香味を評価した。甘味料の官能に関して訓練を受けた者（３名：サントリー食品インターナシ

ョナル株式会社）がパネラーとなって評価を行った。結果を表３に示す。

[表3]

表３：新規ステビオール配糖体（β体のみ）の粉体の香味評価結果

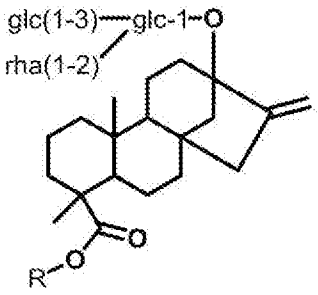
	甘味の有無	香味の特徴
新規ステビオール配糖体１（化合物１５）	有り	・甘味度は新規ステビオール配糖体２よりも弱い ・後引きはステビオール配糖体２よりもあるが、キレは良好である。
新規ステビオール配糖体２（化合物１７）	有り	・混合物と類似した香味 ・苦味はない

[0150] 上記の結果から、新規ステビオール配糖体１および２はいずれも甘味を有しており、甘味料として有用であることが分かる。またいずれの配糖体も、苦味のような望ましくない香味が弱いという特徴があることが分かる。なお、化合物１７については、甘味度評価に用いたα体とβ体の混合物と類似した香味を有していた。

請求の範囲

[請求項1] 式（１）：

[化1]

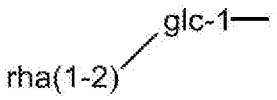


（１）

（式中、

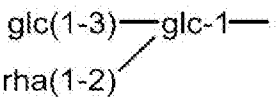
Ｒは、式（２）または式（３）：

[化2]



（２）

[化3]



（３）

の糖鎖を表し、

ｇｌｃはグルコースを表し、ｒｈａはラムノースを表す）

で示される化合物、またはその塩、もしくは水和物。

[請求項2] 植物由来物、化学合成物、または生合成物である、請求項1に記載の化合物。

[請求項3] 請求項１または２に記載の化合物を含む、飲食品。

[請求項4] 請求項１または２に記載の化合物を含む、甘味料組成物。

[請求項5] 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む、請求項４に記載の甘味料組成物。

[請求項6] 請求項４または５に記載の甘味料組成物を含む飲食品。

[請求項7] 飲料である、請求項６に記載の飲食品。

[請求項8] 請求項１に記載の化合物を含む植物体。

[請求項9] 請求項８に記載の植物体の、請求項１に記載の化合物を含む抽出物。

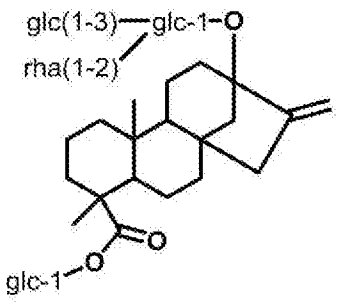
[請求項10] 請求項８に記載の植物体または請求項９に記載の植物体の抽出物を含む飲食品。

[請求項11] 飲料である請求項１０に記載の飲食品。

[請求項12] 請求項１に記載の化合物の製造方法であって、

（Ａ）下記式（４）：

[化4]

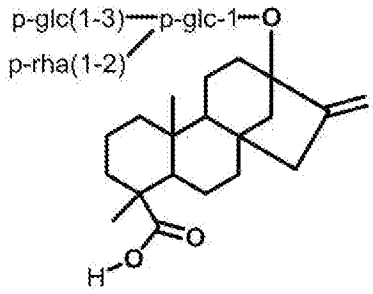


（４）

（式中、glcはグルコースを表し、rhaはラムノースを表す）

で示されるレバウディオサイドＣから、下記式（５）：

[化5]



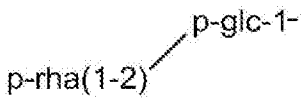
（５）

（式中、p-glcは少なくとも一つのヒドロキシル基が保護基で保護されているグルコースを表し、p-rhaは少なくとも一つのヒドロキシル基が保護基で保護されているラムノースを表す。）

で示される中間体１を調製する工程と

（Ｂ）グルコピラノシド誘導体から式（６）：

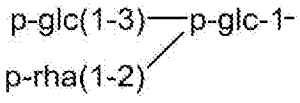
[化6]



（６）

で示される中間体２、または式（７）：

[化7]



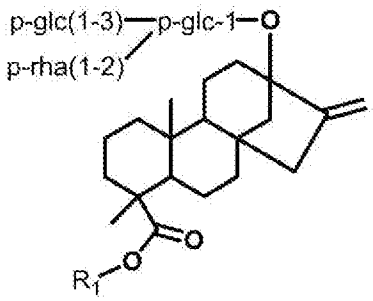
（７）

（式中、p-glcは少なくとも一つのヒドロキシル基が保護基で保護されているグルコースを表し、p-rhaは少なくとも一つのヒドロキシル基が保護基で保護されているラムノースを表す）

で示される中間体３を調製する工程と、

（Ｃ）前記中間体１と、前記中間体２または３とを、ホスフィン試薬およびアゾ化合物の存在下で反応させ、下記式（８）：

[化8]

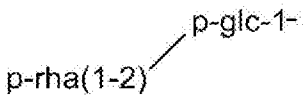


（８）

（式中、

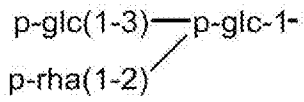
R_1は、式（９）または式（１０）：

[化9]



（９）

[化10]



（１０）

の糖鎖を表し、

p-glcは少なくとも一つのヒドロキシル基が保護基で保護されているグルコースを表し、p-rhaは少なくとも一つのヒドロキシル基が保護基で保護されているラムノースを表す）

で示される中間体４を得る工程を含む、方法。

[請求項13] 請求項１または２に記載の化合物の甘味料としての使用。

[請求項14] 請求項１に記載の化合物の製造方法であって、下記（ａ）～（ｇ）：

（ａ）配列番号２のアミノ酸配列に対して９０％以上の同一性を有し、かつ、ステビオール配糖体の13位の水酸基にグルコースを付加する活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

（ｂ）配列番号４のアミノ酸配列に対して９０％以上の同一性を有し、かつ、ステビオール配糖体の19位のカルボン酸にグルコースを付加する活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

（ｃ）配列番号６のアミノ酸配列に対して９０％以上の同一性を有し、かつ、ステビオール配糖体の13位に結合したグルコースに1→2結合でラムノースを付加する活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

（ｄ）配列番号８のアミノ酸配列に対して９０％以上の同一性を有し、かつ、ステビオール配糖体の13位のグルコースの3位に1→3結合でグルコースを付加する活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

（ｅ）配列番号６のアミノ酸配列に対して９０％以上の同一性を有し、かつ、ステビオール配糖体の19位のグルコースに、1→2結合でグルコースを付加する活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

（ｆ）配列番号８のアミノ酸配列に対して９０％以上の同一性を有し、かつ、ステビオール配糖体の19位のグルコースに、1→3結合でグル

コースを付加する活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；および

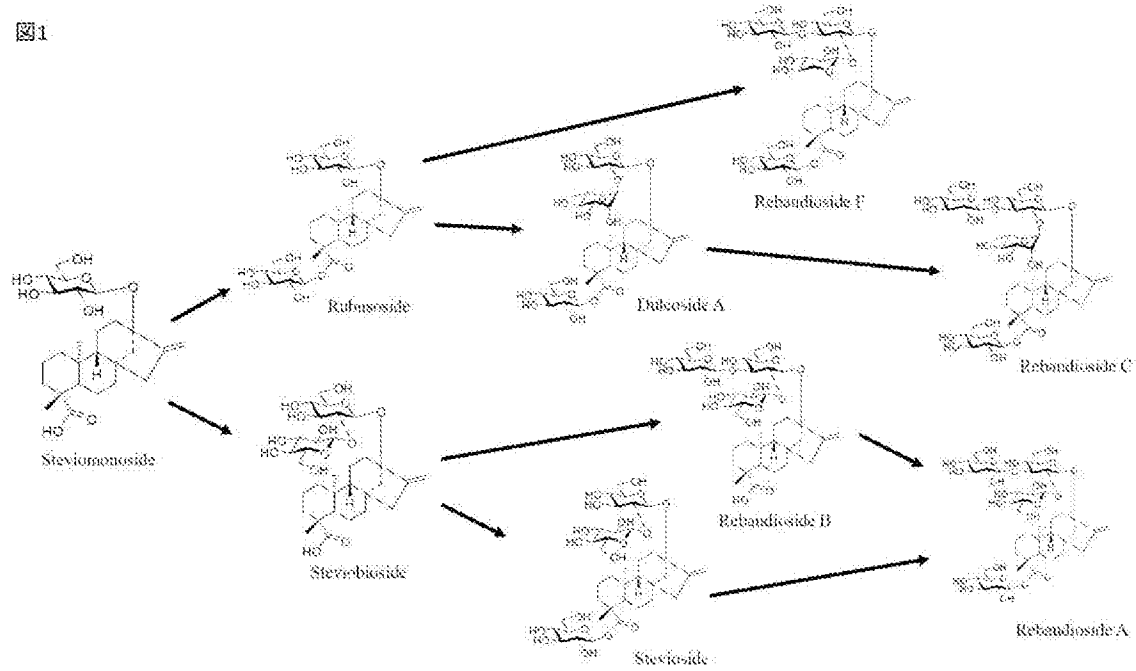
（ｇ）配列番号１０のアミノ酸配列に対して９０％以上の同一性を有し、かつ、UDP-グルコースからUDP-ラムノースを生成する活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド

の少なくとも１つのポリヌクレオチドを導入した非ヒト形質転換体を用いることを特徴とする方法。

[請求項15] 前記非ヒト形質転換体が酵母である、請求項１４に記載の方法。

[請求項16] ステビオールを含む培地で前記非ヒト形質転換体の培養を行うことを特徴とする、請求項１４又は１５に記載の方法。

[図1]



[図2]

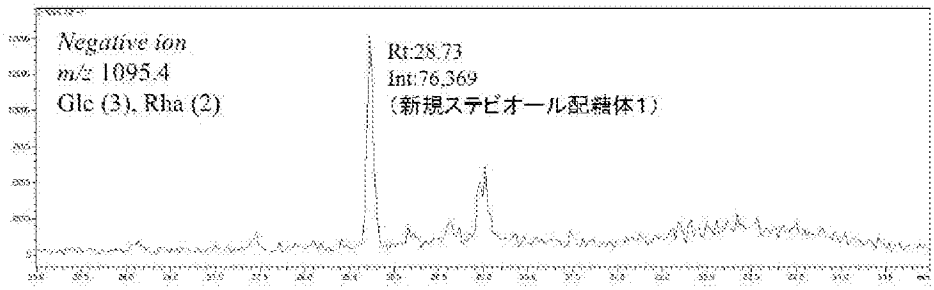


図2. SIC開発新規ステビア植物体(サンプル1)の*m/z* 1095.4の選択イオンクロマトグラム

[図3]

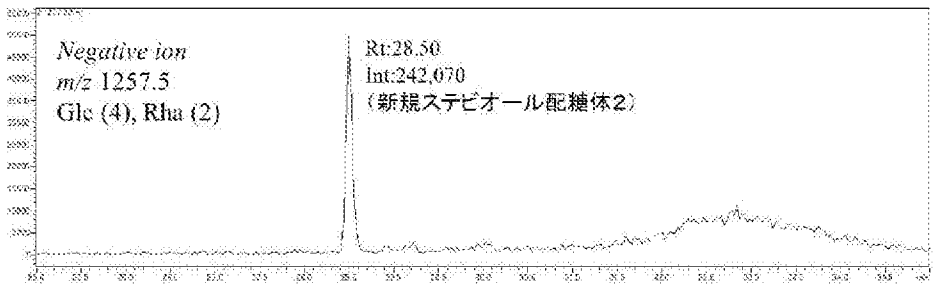


図3. SIC開発新規ステビア植物体(サンプル1)のm/z 1257.5の選択イオンクロマトグラム

[図4]

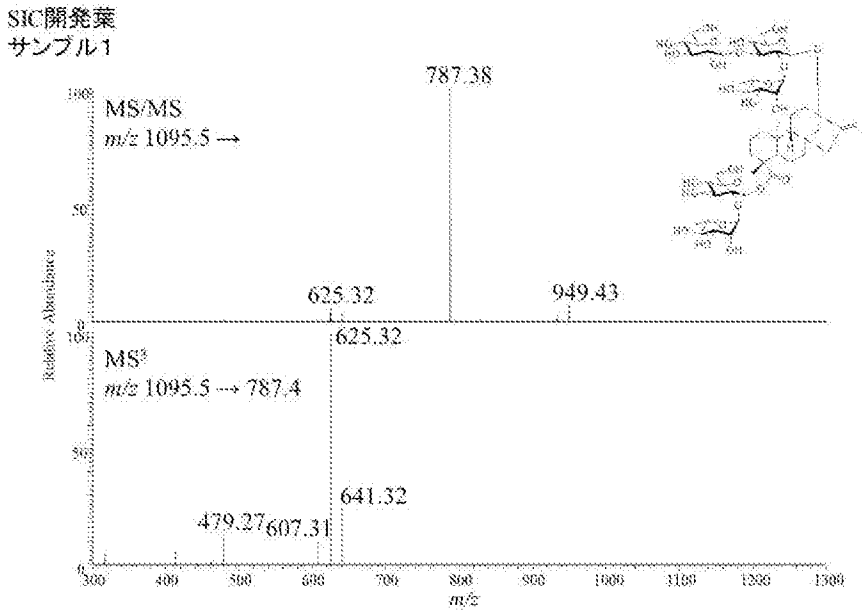


図4. 新規ステビオール配糖体1 (m/z 1095.4, Rt:28.73に相当する)のMS/MSおよびMS3断片化マススペクトル

[図5]

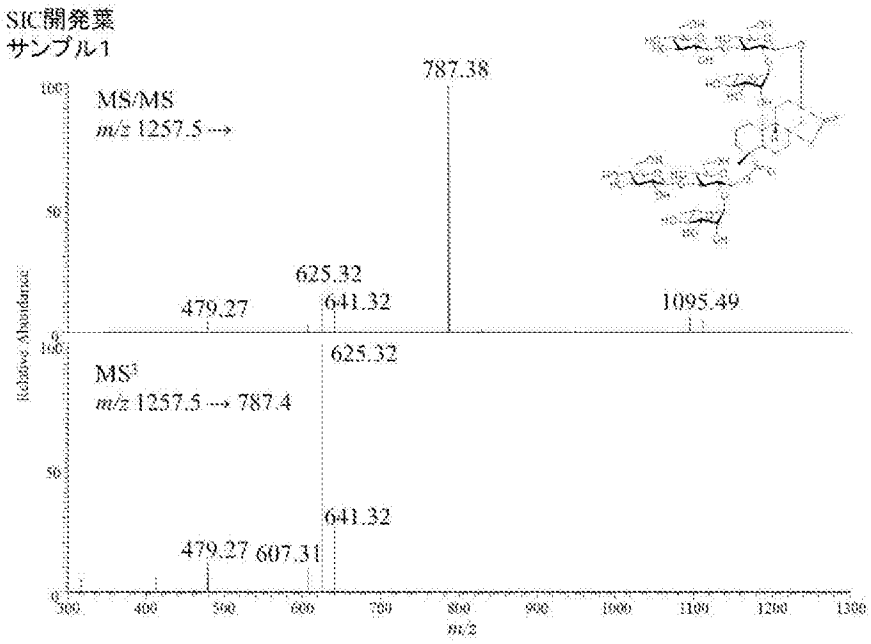
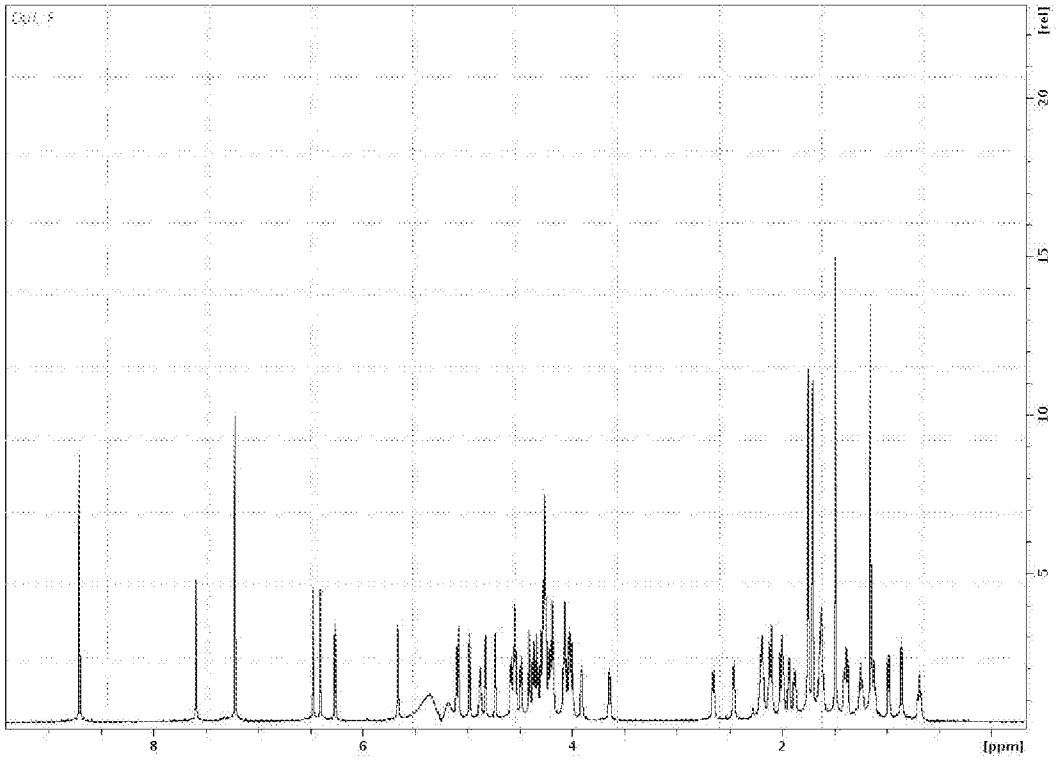


図5. 新規ステビオール配糖体2 (m/z 1257.5, Rt:28.50に相当する)のMS/MSおよびMS3断片化マススペクトル

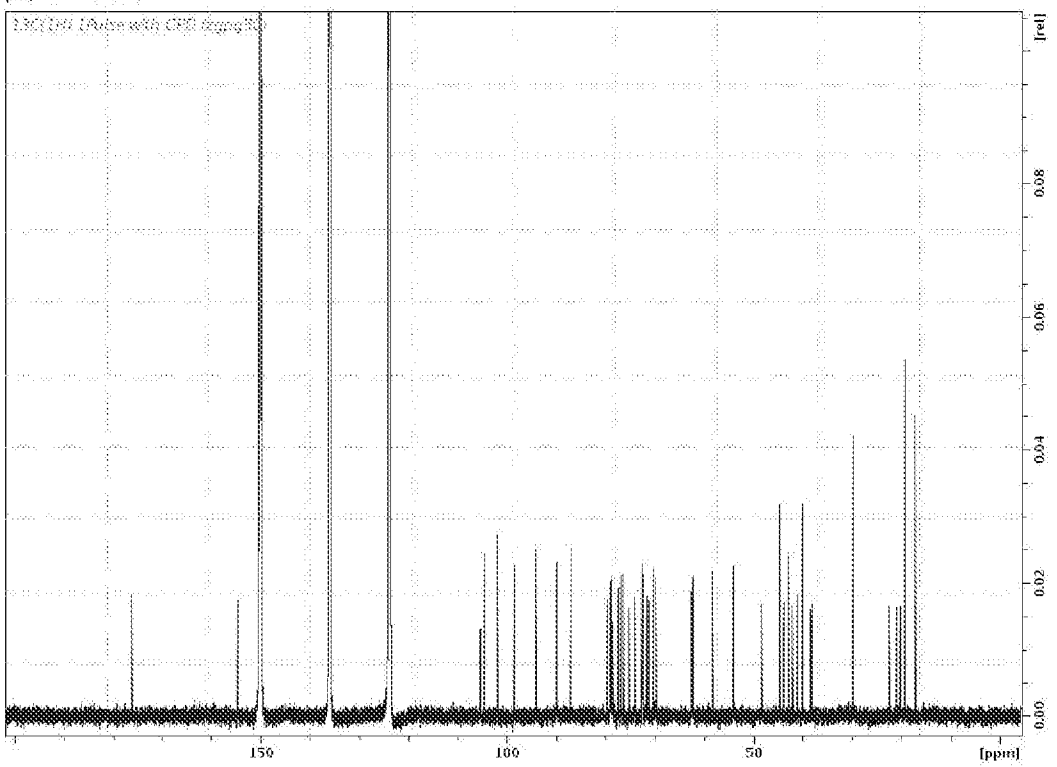
[図6]

図6 (a)



^{1}H-NMR of compound 15 (800MHz, Pyr-d5)

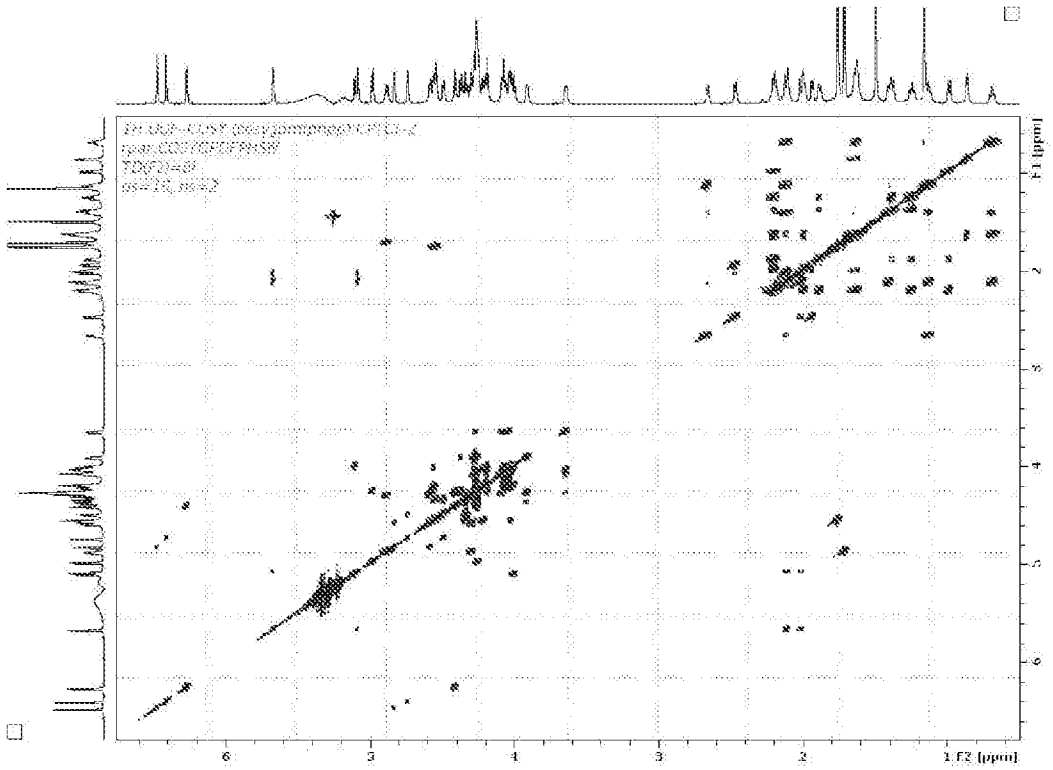
図6 (b)



^{13}C-NMR of compound 15 (200MHz, Pyr-d5)

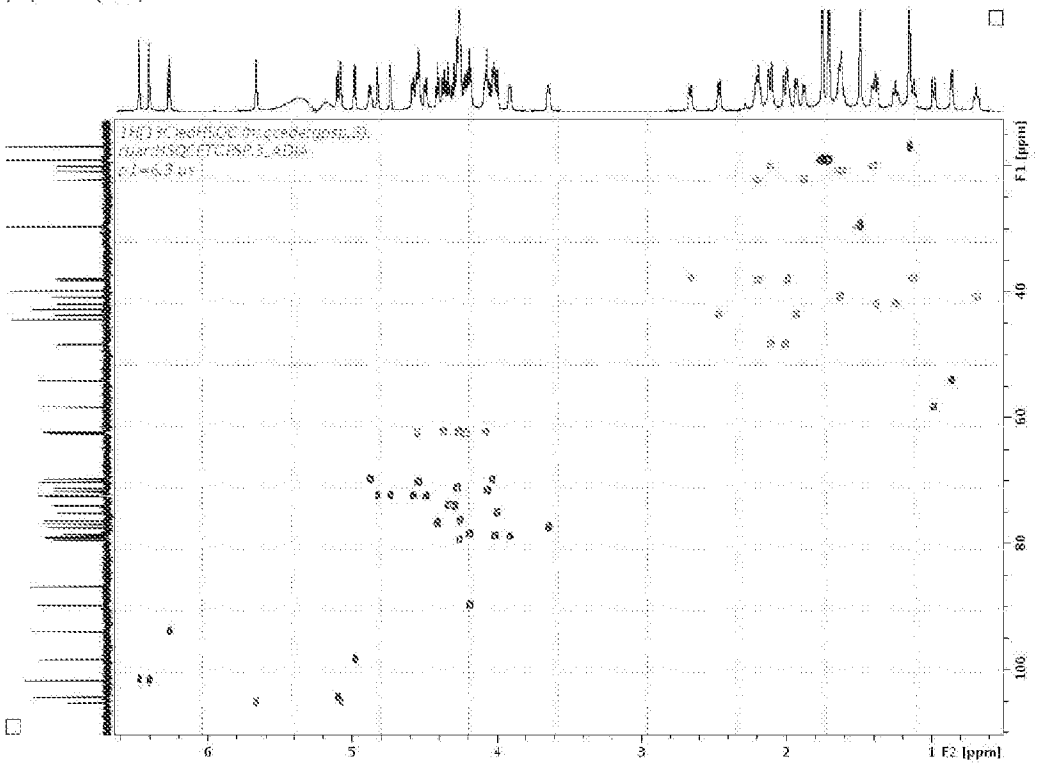
[図7]

図７（ａ）



^{1}H-^{1}H cosy of compound 15 (800Mhz, Pyr-d5)

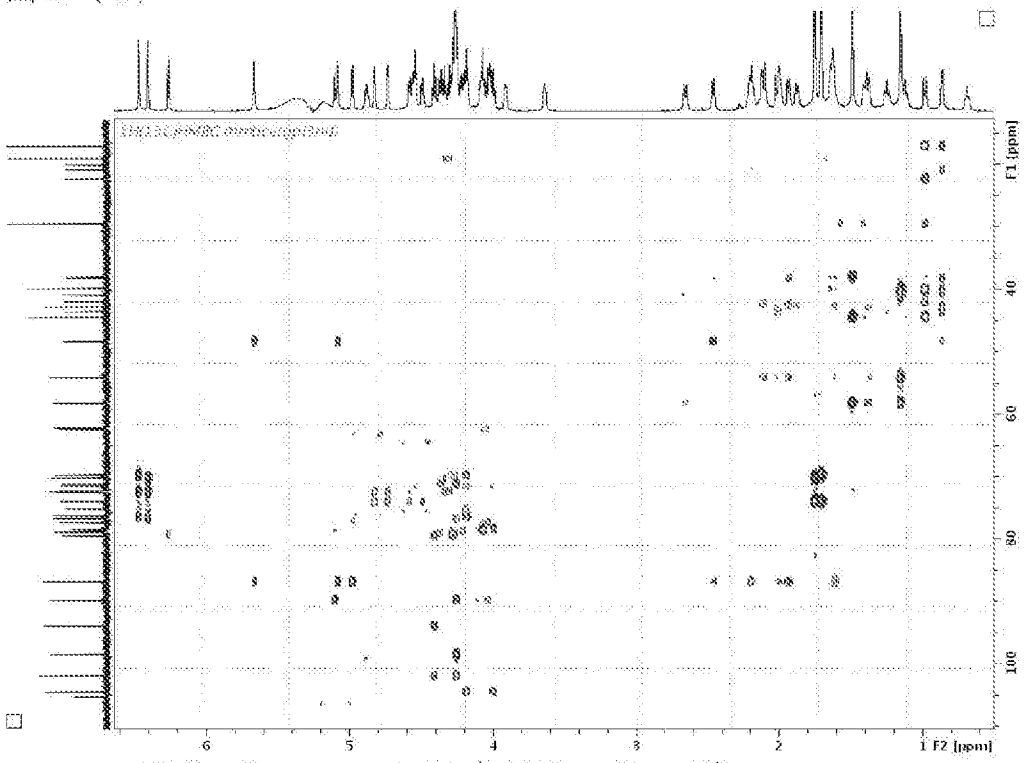
図７（ｂ）



HSQC of compound 15 (800Mhz, Pyr-d5)

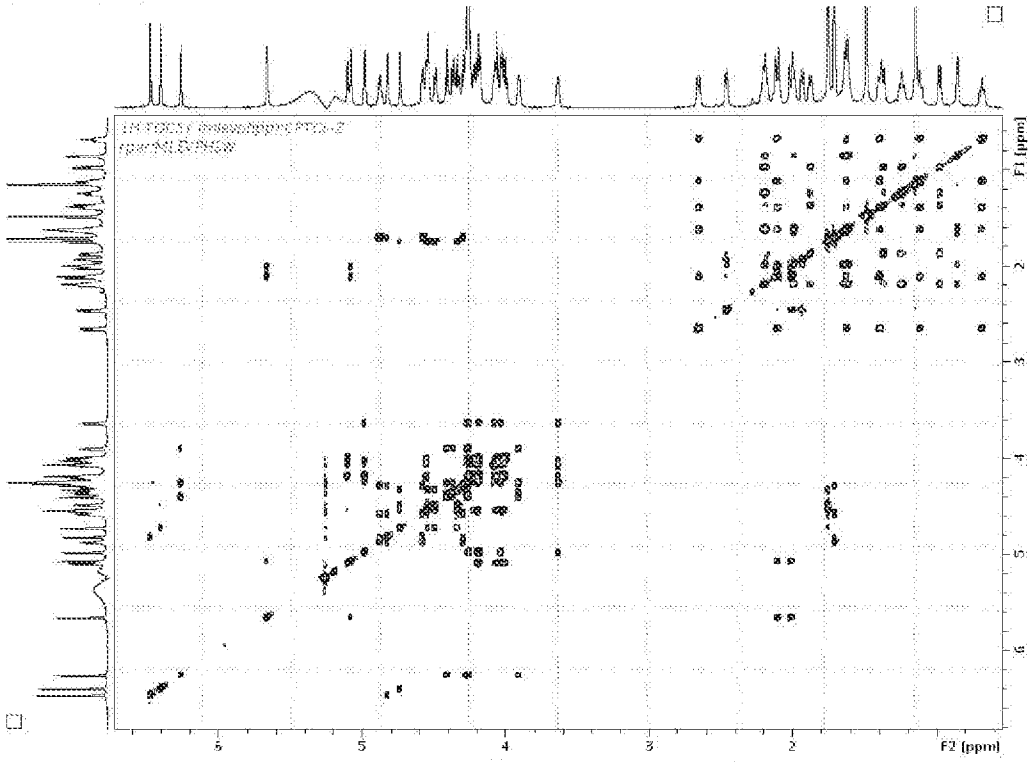
[図8]

図８（ａ）



HMBC of compound 15 (800MHz, Pyr-d5)

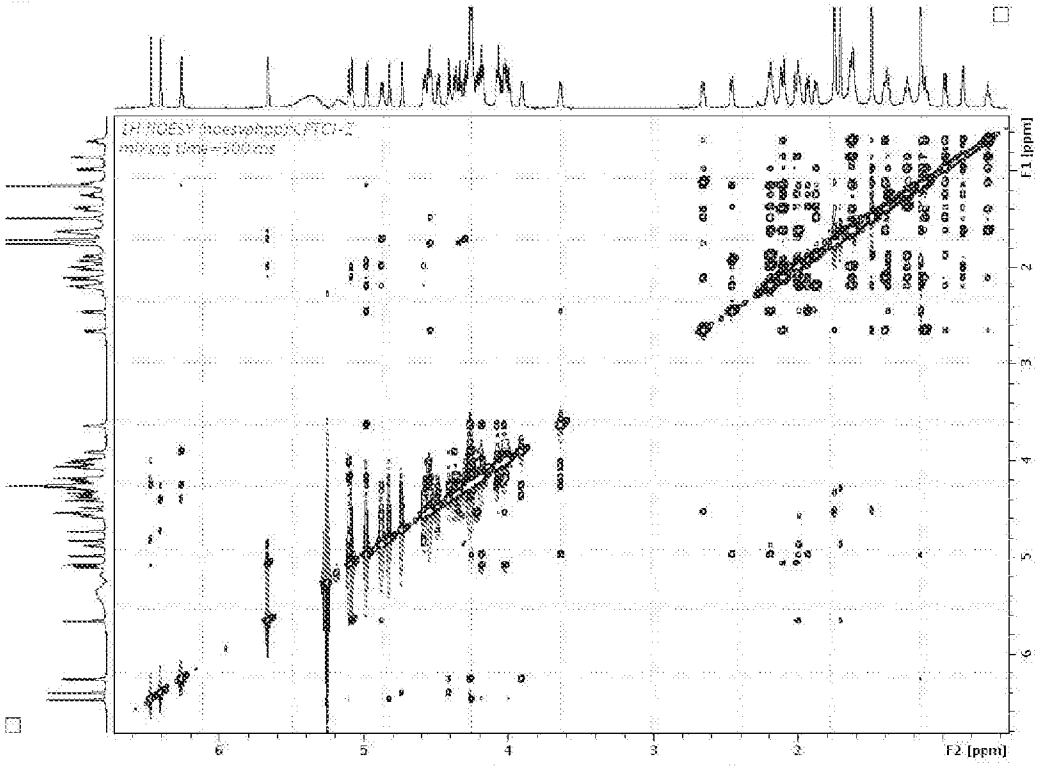
図８（ｂ）



TOCSY of compound 15 (800MHz, Pyr-d5)

[図9]

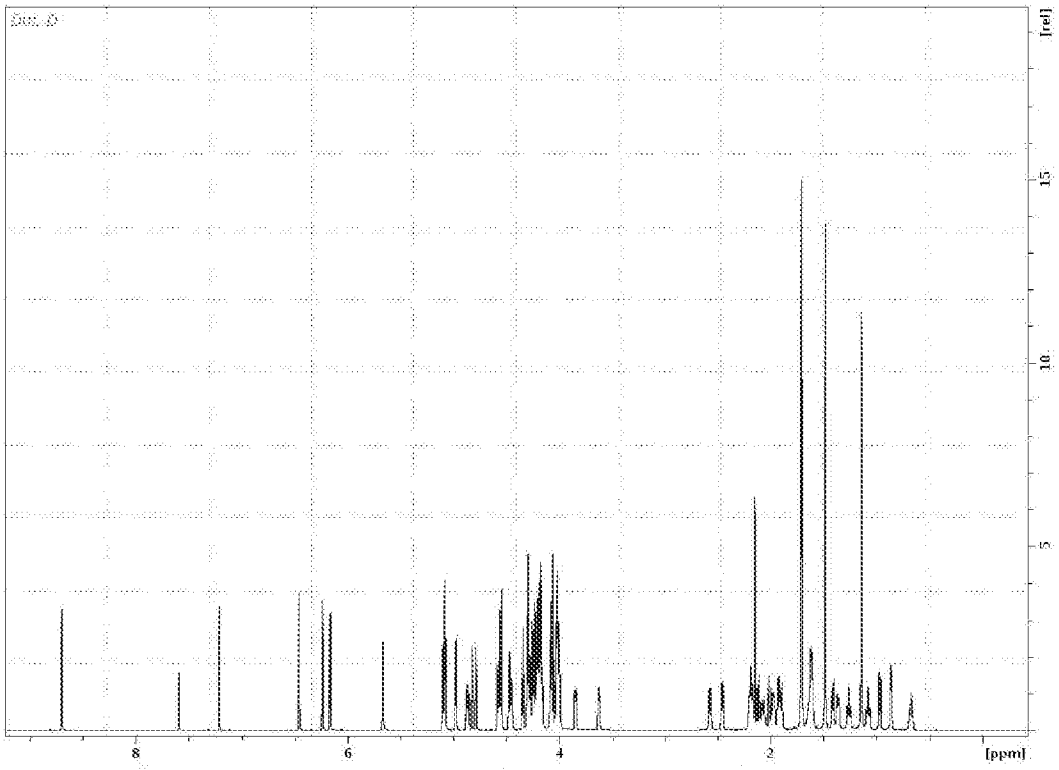
図 9



NOESY of compound 15 (800MHz, Pyr-d5)

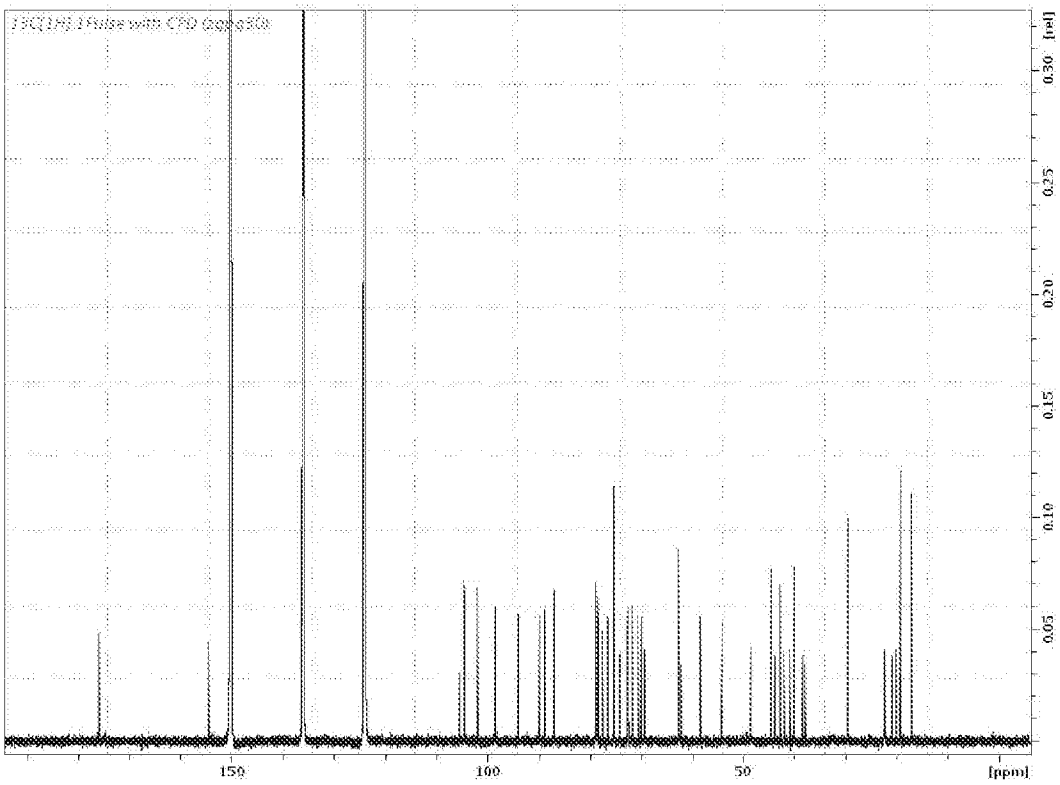
[図10]

図１０（ａ）



^{1}H-NMR of compound 17 (800MHz, Pyr-d5)

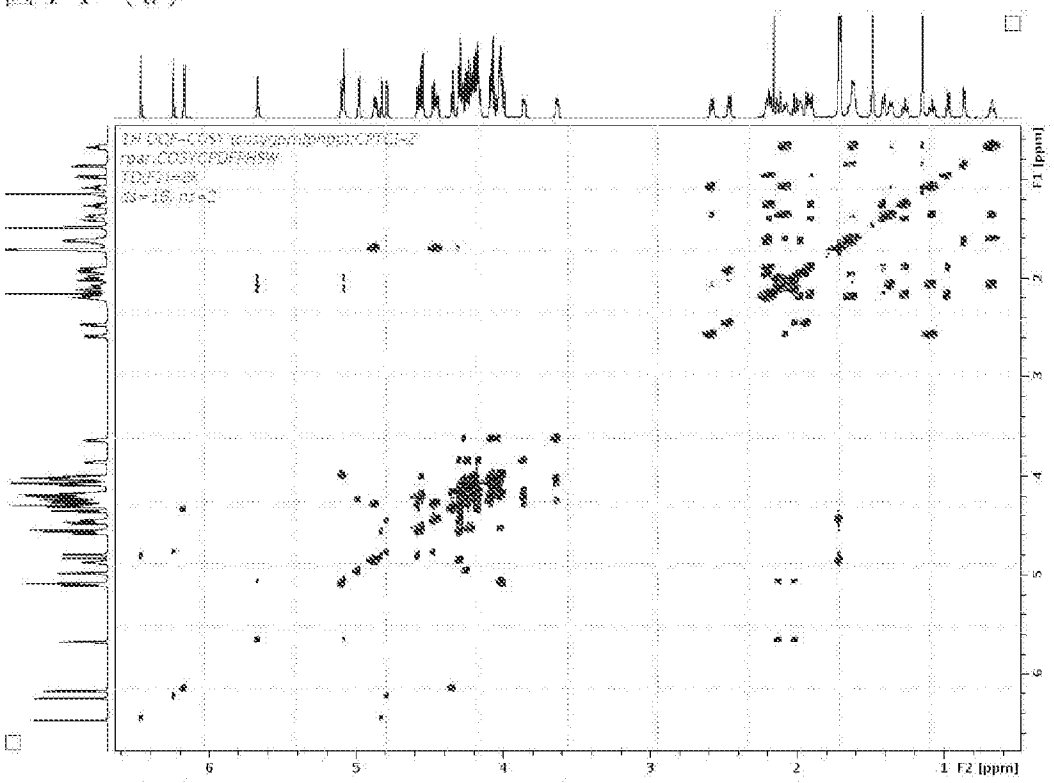
図１０（ｂ）



^{13}C-NMR of compound 17 (200MHz, Pyr-d5)

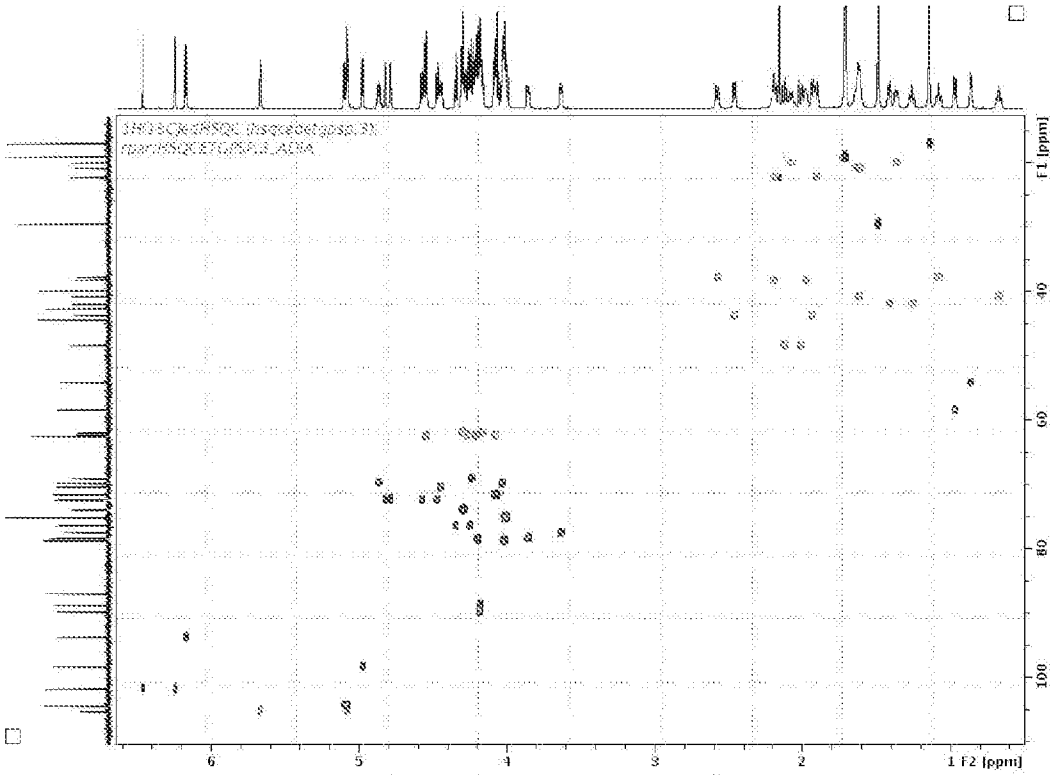
[図11]

図１１（ａ）



^{1}H-^{1}H cosy of compound 17 (800MHz, Pyr-d5)

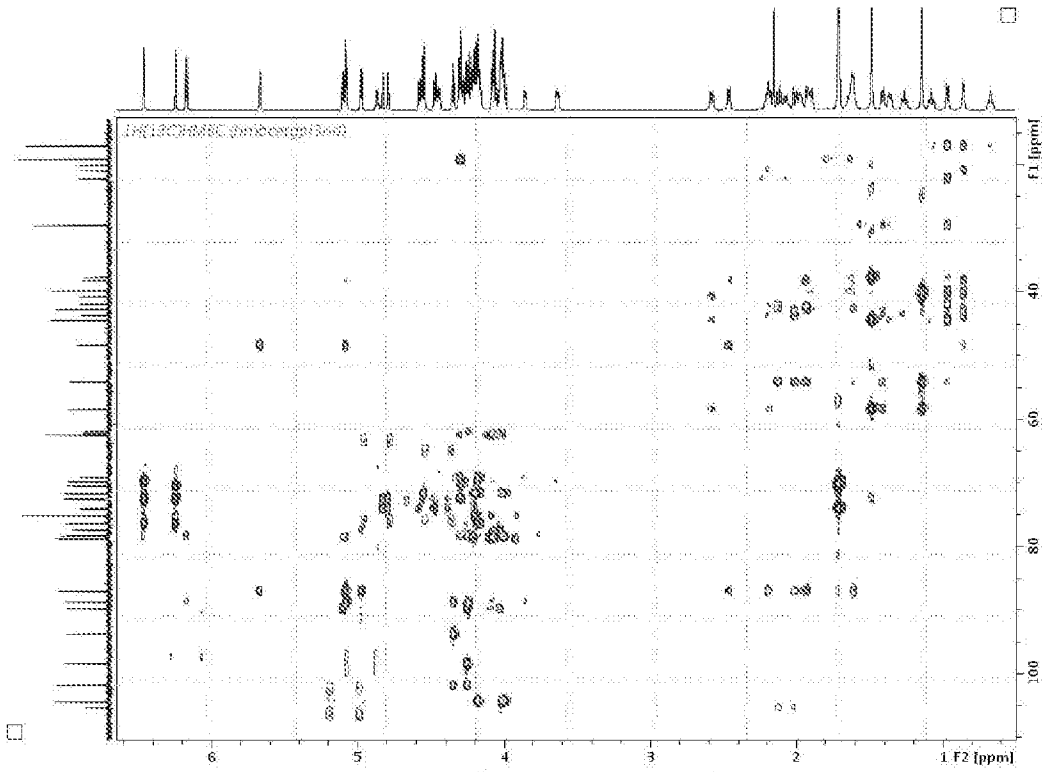
図１１（ｂ）



HSQC of compound 17 (800MHz, Pyr-d5)

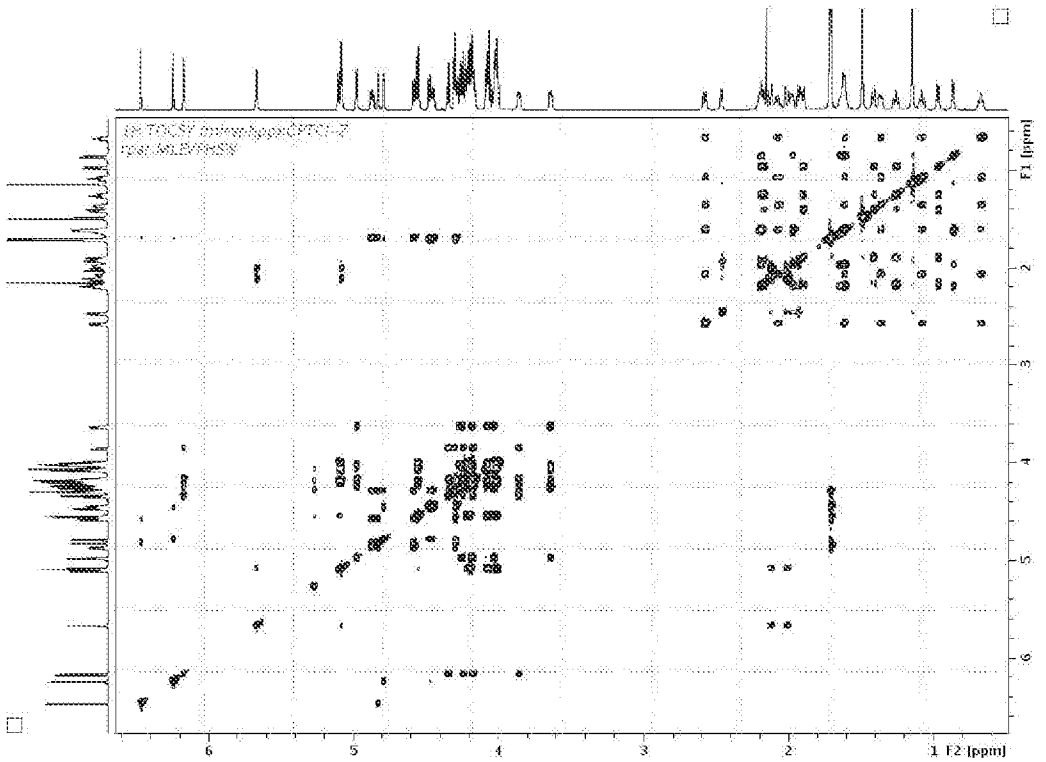
[図12]

図１２（ａ）



HMBC of compound 17 (800MHz, Pyr-d5)

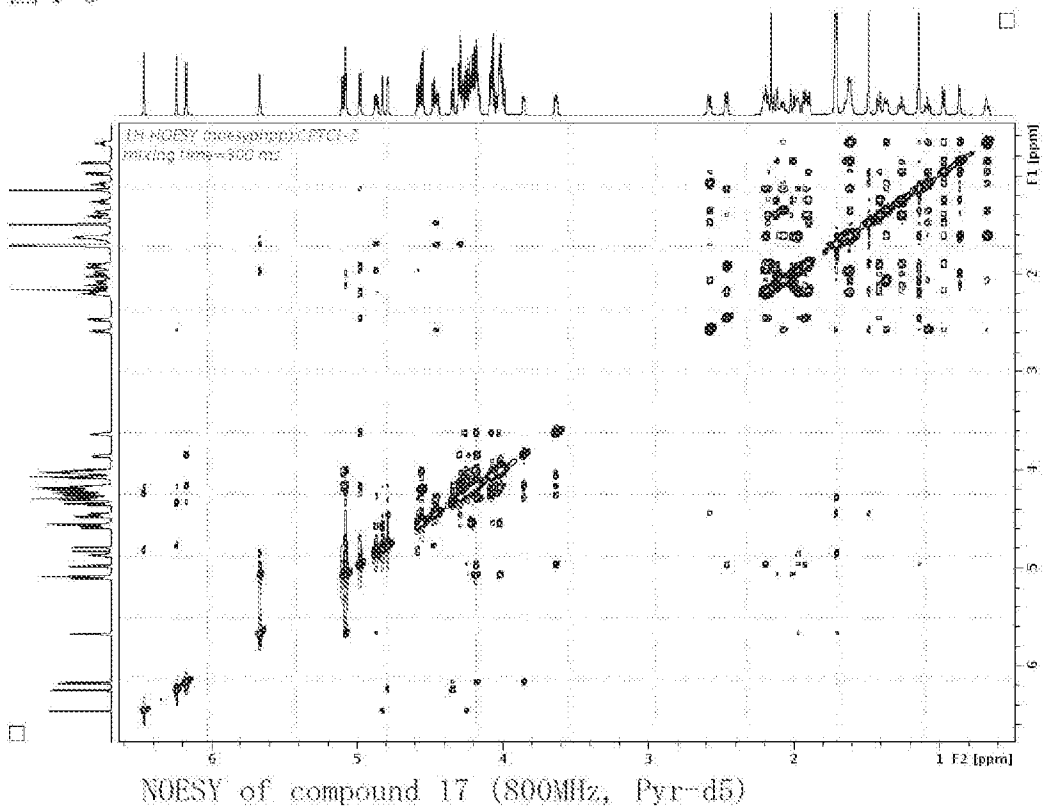
図１２（ｂ）



TOCSY of compound 17 (800MHz, Pyr-d5)

[図13]

図１３



[図14]

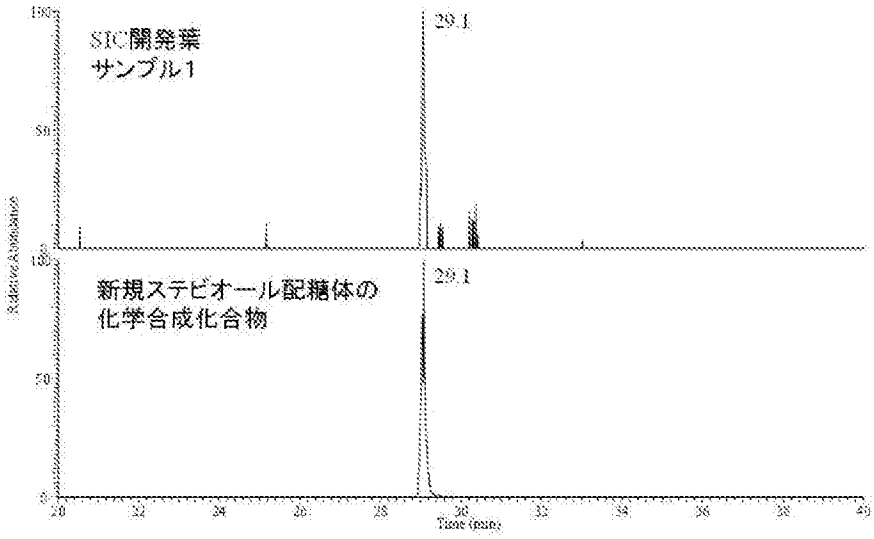


図14. 新規ステビオール配糖体1（ステビア葉抽出物）と化学合成品（化合物15のβ体）の抽出イオンクロマトグラム

[図15]

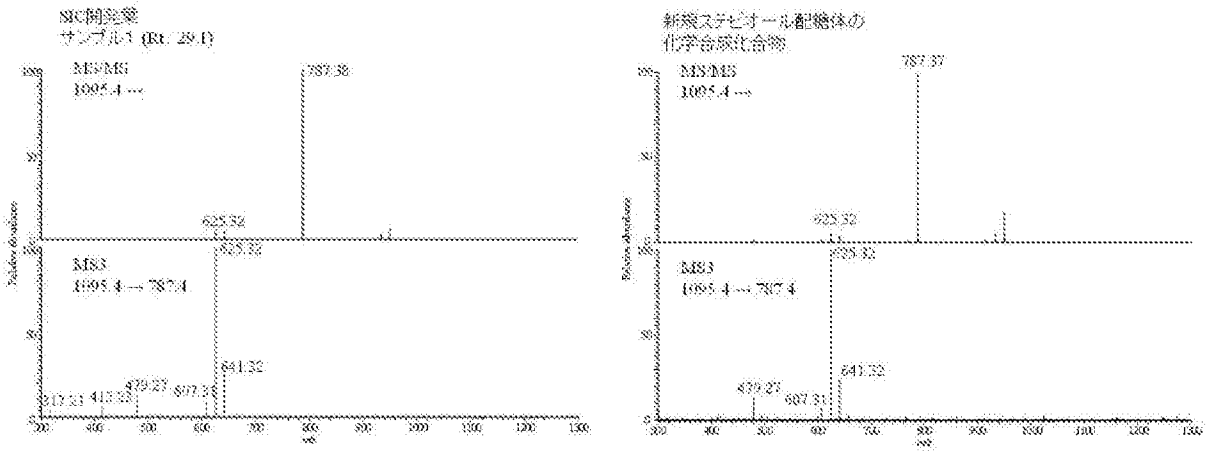


図15. 新規ステビオール配糖体1（ステビア葉抽出物）と化学合成品（化合物15のβ体）の MS/MSおよびMS3断片化マススペクトル

[図16]

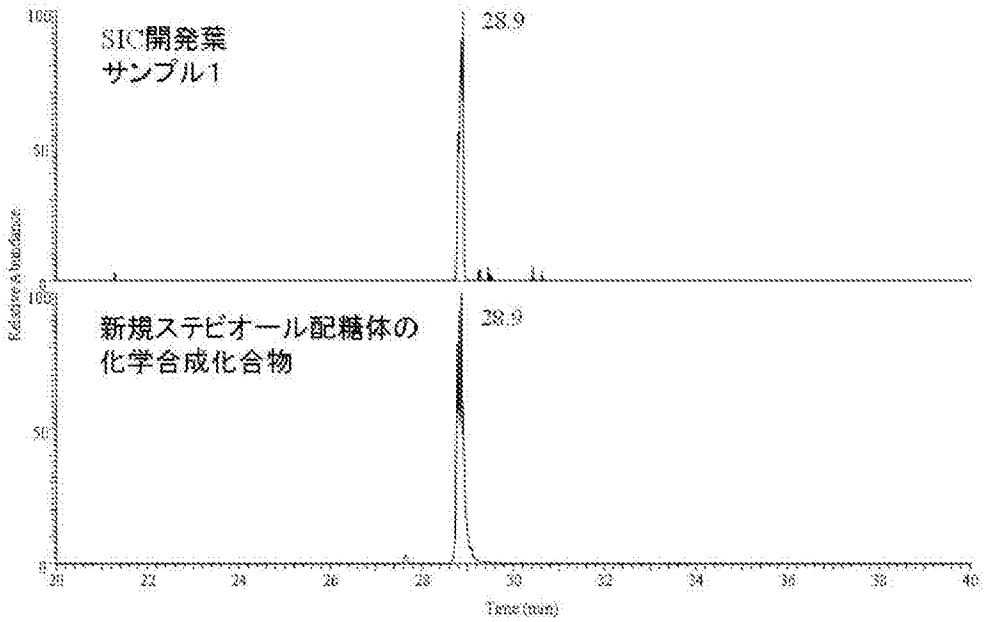


図１６. 新規ステビオール配糖体２（ステビア葉抽出物）と化学合成品（化合物１７のβ体）の 抽出イオンクロマトグラム

[図17]

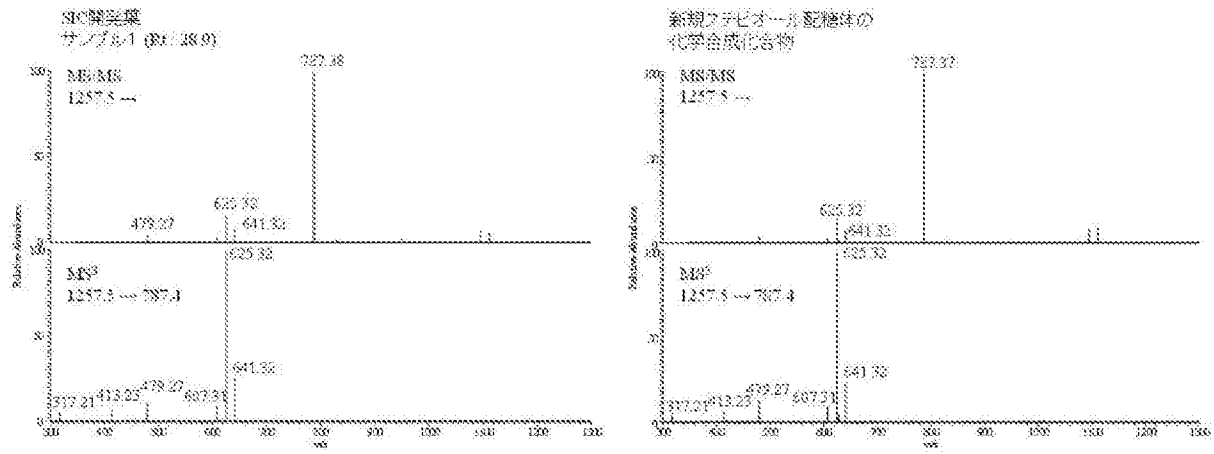


図１７. 新規ステビオール配糖体２（ステビア葉抽出物）と化学合成品（化合物１７のβ体）の MS/MSおよびMS3断片化マススペクトル

[図18]

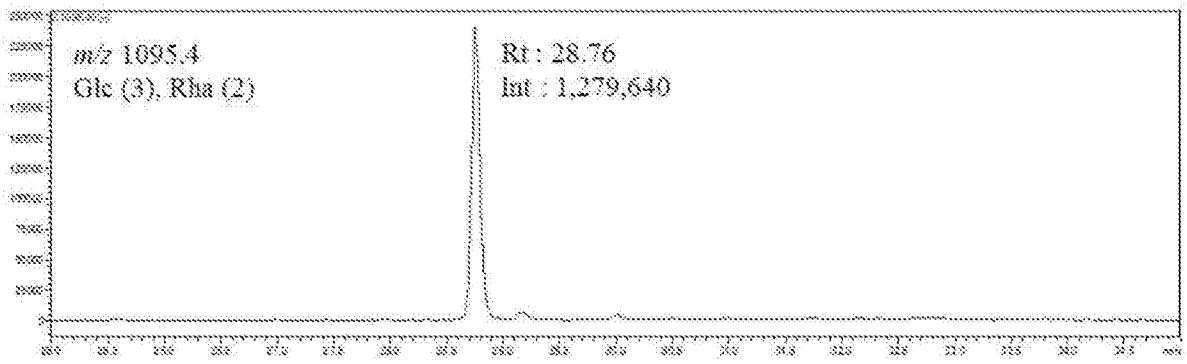


図18 生合成により得られたサンプルのm/z 1095.4の選択イオンクロマトグラム

[図19]

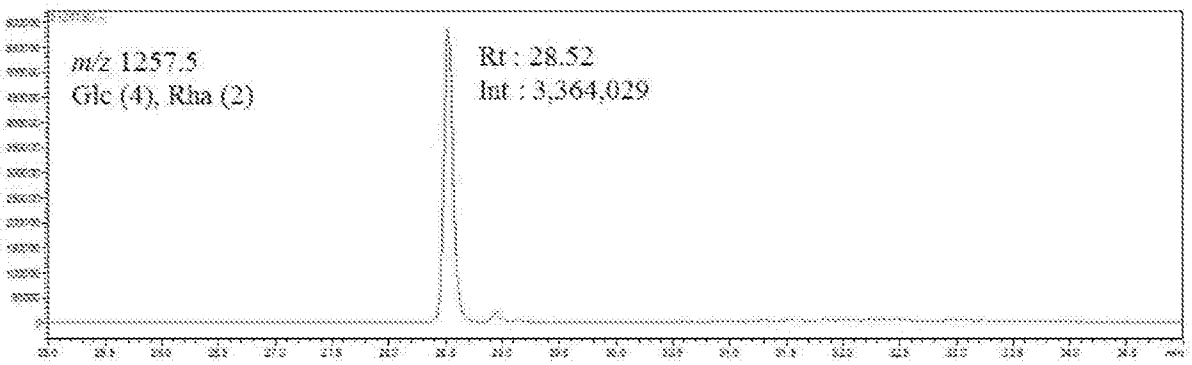


図19 生合成により得られたサンプルのm/z 1257.5の選択イオンクロマトグラム

[図20]

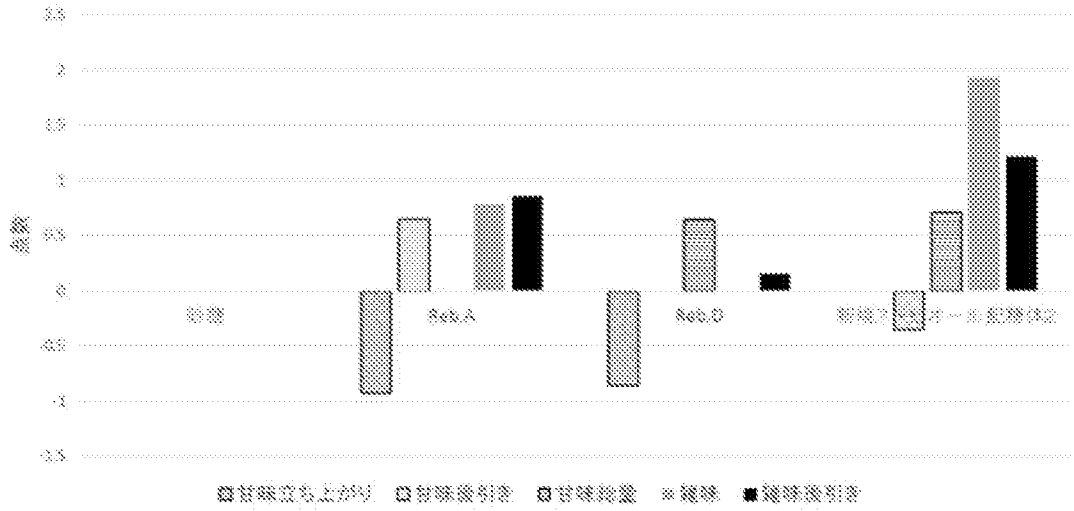
図２０

(a)

N=7

	砂糖	Reb.A	Reb.D	新規ステビオール配糖体2
Brix	2	2	2	2
甘味度	1	300	250	14.7
添加量 (g/100ml)	2	0.0067	0.008	0.136

(b)



(c)

新規ステビオール配糖体2の香味特徴

甘味立ち上がり	砂糖と同程度。Reb.AやReb.Dよりも甘味立ち上がり早い。
甘味後引き	後引きは砂糖と同程度に良い。
甘味総量	Reb.Dと同程度の甘味総量。
雑味	Reb.Aよりも少し雑味があり、草っぽい香りがする。
雑味後引き	Reb.Aよりも雑味は後残りする。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2018/012845

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl. C07H15/256(2006.01)i, A01H5/00(2018.01)i, A23L2/60(2006.01)i, A23L27/00(2016.01)i, A23L27/20(2016.01)i, C12N15/29(2006.01)i, C12P19/44(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)n

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl. C07H15/256, A01H5/00, A23L2/60, A23L27/00, A23L27/20, C12N15/29, C12P19/44, C12N1/19

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	1971-2018
Registered utility model specifications of Japan	1996-2018
Published registered utility model applications of Japan	1994-2018

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAplus/REGISTRY (STN), MEDLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	BRANDLE, J., "Genetic control of rebaudioside A and C concentration in leaves of the sweet herb, Stevia rebaudiana.", CAN. J. PLANT SCI., 1999, vol. 79, pp. 85-92, in particular, table 2	3-11 1-2,12-16
X A	STARRATT, A. N. et al., "Rebaudioside F, a di terpene glycoside from Stevia rebaudiana.", PHYTOCHEMISTRY, 2002, vol. 59, pp. 367-370, in particular, page 367, lower left column, line 20 to lower right column, line 5	3-11 1-2,12-16

☒ 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
"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 18 June 2018 (18.06.2018)	Date of mailing of the international search report 26 June 2018 (26.06.2018)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2018/012845

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	GARDANA, C. et al., "Evaluation of steviol and its glycosides in Stevia rebaudiana leaves and commercial sweetener by ultra-high-performance liquid chromatography-mass spectrometry.", JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A, 2010, vol. 1217, pp. 1463-1470, in particular, fig. 1, table 2	3-11 1-2,12-16
A	WO 2010/038911 A1 (MORITA KAGAKU KOGYO CO., LTD.) 08 April 2010, claims 1-7 & JP 2012-504552 A & US 2011/0183056 A1 & EP 2350110 A1	1-16
A	OHTA, M. et al., "Characterization of novel steviol glycosides from leaves of Stevia rebaudiana Morita.", APPL. GLYCOSCI., 2010, vol. 57, pp. 199-209, in particular, table 4	1-16
A	CEUNEN, S. et al., "Steviol glycosides: chemical diversity, metabolism, and function.", JOURNAL OF NATURAL PRODUCTS, 2013, vol. 76, pp. 1201-1228, in particular, table 3	1-16

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１８／０１２８４５

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C07H15/256(2006.01)i, A01H5/00(2018.01)i, A23L2/60(2006.01)i, A23L27/00(2016.01)i, A23L27/20(2016.01)i, C12N15/29(2006.01)i, C12P19/44(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)n

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））

Int.Cl.　C07H15/256, A01H5/00, A23L2/60, A23L27/00, A23L27/20, C12N15/29, C12P19/44, C12N1/19

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	１９７１－２０１８年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０１８年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０１８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/REGISTRY (STN), MEDLINE

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 A	BRANDLE, J., "Genetic control of rebaudioside A and C concentration in leaves of the sweet herb, Stevia rebaudiana.", CAN. J. PLANT SCI., 1999, Vol.79, P.85-92, 特に表２	3-11 1-2,12-16
X A	STARRATT, A.N. et al., "Rebaudioside F, a diterpene glycoside from Stevia rebaudiana.", PHYTOCHEMISTRY, 2002, Vol.59, P.367-370, 特に367頁左下欄20行-右下欄５行	3-11 1-2,12-16

☑　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
「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矛盾するものではなく、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
１８．０６．２０１８	２６．０６．２０１８

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ）
郵便番号１００－８９１５
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

特許庁審査官（権限のある職員）　４Ｂ　４１５５
野村　英雄
電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４４８

Ｃ（続き）．　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 A	GARDANA, C. et al., "Evaluation of steviol and its glycosides in Stevia rebaudiana leaves and commercial sweetener by ultra-high-performance liquid chromatography-mass spectrometry.", JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A, 2010, Vol.1217, P.1463-1470, 特に図1,表2	3-11 1-2,12-16
A	WO 2010/038911 A1 (Morita Kagaku Kogyo Co., Ltd.) 2010.04.08, 請求項1-7 & JP 2012-504552 A & US 2011/0183056 A1 & EP 2350110 A1	1-16
A	OHTA, M. et al., "Characterization of novel steviol glycosides from leaves of Stevia rebaudiana Morita.", APPL. GLYCOSCI., 2010, Vol.57, P.199-209, 特に表4	1-16
A	CEUNEN, S. et al., "Steviol glycosides: chemical diversity, metabolism, and function.", JOURNAL OF NATURAL PRODUCTS, 2013, Vol.76, P.1201-1228, 特に表3	1-16