

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6842800号
(P6842800)

(45) 発行日 令和3年3月17日 (2021.3.17)

(24) 登録日 令和3年2月25日 (2021.2.25)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/54 (2006.01)

C 1 2 N 15/54 Z N A

C 1 2 P 19/56 (2006.01)

C 1 2 P 19/56

請求項の数 11 (全 8 頁)

(21) 出願番号	特願2019-521072 (P2019-521072)	(73) 特許権者	591235706
(86) (22) 出願日	平成28年10月21日 (2016.10.21)		ペプシコ・インク
(65) 公表番号	特表2019-536444 (P2019-536444A)		アメリカ合衆国・ニューヨーク・パーチェス・アンダーソン・ヒル・ロード・700
(43) 公表日	令和1年12月19日 (2019.12.19)	(74) 代理人	100106518
(86) 国際出願番号	PCT/CN2016/102942		弁理士 松谷 道子
(87) 国際公開番号	W02018/072211	(74) 代理人	100156144
(87) 国際公開日	平成30年4月26日 (2018.4.26)		弁理士 落合 康
審査請求日	令和1年9月27日 (2019.9.27)	(72) 発明者	陶 軍華
			中華人民共和国215600江蘇省蘇州市張家港市港城大道603号
		(72) 発明者	李 国慶
			中華人民共和国215600江蘇省蘇州市張家港市港城大道603号

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 酵素的方法を使用してレバウディオサイドJを調製するための方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

酵素的方法を使用してレバウディオサイドJを調製するための方法であって、反応系においてレバウディオサイドAを、グリコシル供与体と、レバウディオサイドJを産生するための、i) UDP - グリコシルトランスフェラーゼまたはii) UDP - グリコシルトランスフェラーゼを含有する組み換え細胞存在下で反応させることを含み、ここで、i) またはii) のUDP - グリコシルトランスフェラーゼは配列2のアミノ酸配列を有し、グリコシル供与体がラムノシル供与体である、方法。

【請求項2】

ラムノシル供与体がUDP - ラムノースである、請求項1に記載の方法。

10

【請求項3】

UDP - グリコシルトランスフェラーゼがO r y z a s a t i v a由来のUGT - Bである、請求項1に記載の方法。

【請求項4】

反応系が35 ~ 45 の温度及び7.5 ~ 8.5のpHを有する水相を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項5】

水相がリン酸緩衝液である、請求項4に記載の方法。

【請求項6】

反応系が細胞透過剤をさらに含有する、請求項4に記載の方法。

20

【請求項 7】

細胞透過剤がトルエンであり、トルエンが 1 ~ 3 % の体積比濃度を有する、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

組み換え細胞が微生物細胞である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

微生物が大腸菌 (*Escherichia coli*)、出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 又はピチア・パストリス (*Pichia pastoris*) である、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

樹脂単離によりレバウディオサイド J を精製することをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 11】

樹脂単離により精製されたレバウディオサイド J が 95 % を超える純度を有する、請求項 10 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、レバウディオサイド J を調製するための方法に関し、具体的には、レバウディオサイド J を調製するための生物学的方法に関する。

【背景技術】

20

【0002】

甘味剤は、食品、例えば、飲料及びキャンディーの製造において広範な用途を有する食品添加剤の部類である。それらは、食品製造プロセスにおいて添加されてもよく、あるいは家庭でのベーキングにおいてスクロースの代用物として適切な希釈を通して使用されてもよい。甘味剤としては、天然甘味剤、例えば、スクロース、高果糖コーンシロップ、ハチミツ等、及び人工甘味剤、例えば、アスパルテーム、サッカリン等が挙げられる。ステビオサイドは、植物 *Stevia rebaudiana* から抽出された天然甘味剤の部類であり、存在する食品及び飲料において広く使用されている。*Stevia rebaudiana* の抽出物は、レバウディオサイドを含む様々なステビオサイドを含有する。天然に抽出されたステビオサイドは、異なるバッチにわたって成分の大きな違いを有し、その後の精製を必要とする。

30

【0003】

ステビア葉のステビオサイドに見られるレバウディオサイド J の含有量は、0.5 % を超えない。したがって、従来的方法を使用して、高い純度を有するレバウディオサイド J の抽出物を得ることは極めて困難である。したがって、レバウディオサイド J の詳細な研究は限られ、またレバウディオサイド J の商業用途が妨げられている。

【発明の概要】

【0004】

本発明によって解決される技術的問題は、先行技術における欠陥を克服することである。本発明は、酵素的方法を使用してレバウディオサイド J を調製するための方法を提供することによってそれを達成する。そのような方法では、高い純度を有するレバウディオサイド J 製品を、より低いコストで、かつより短い製造サイクルで製造することができる。

40

【0005】

本発明では、上記の技術的問題を解決するために、以下の技術的解決策が用いられる。

【0006】

酵素的方法を使用してレバウディオサイド J を調製するため提供され、この方法において、レバウディオサイド A が、基質として使用され、グリコシル供与体の存在下で、レバウディオサイド J が、UDP - グリコシルトランスフェラーゼを含有する組み換え細胞及び / 又はそこから調製された UDP - グリコシルトランスフェラーゼの触媒作用下での反応によって産生される。UGT と呼ばれる UDP - グリコシルトランスフェラーゼ (

50

すなわち、ウリジンジホスホグリコシルトランスフェラーゼ)は、既に周知である。

【0007】

好ましくは、グリコシル供与体は、ラムノシル供与体である。

【0008】

より好ましくは、ラムノシル供与体は、UDP-ラムノースである。

【0009】

好ましくは、UDP-グリコシルトランスフェラーゼは、*Oryza sativa* (米)由来のUGT-Bである。

【0010】

好ましくは、*Oryza sativa*由来のUGT-Bのアミノ酸配列は、配列表に示される配列2と少なくとも60%一致している。 10

【0011】

より好ましくは、*Oryza sativa*由来のUGT-Bのアミノ酸配列は、配列表に示される配列2と少なくとも70%一致している。

【0012】

更に、*Oryza sativa*由来のUGT-Bのアミノ酸配列は、配列表に示される配列2と少なくとも80%一致している。

【0013】

更に*Oryza sativa*由来のUGT-Bのアミノ酸配列は、配列表に示される配列2と少なくとも90%一致している。 20

【0014】

一実施例によると、*Oryza sativa*由来のUGT-Bのアミノ酸配列は、配列表に示される配列2と完全に同一である。

【0015】

本発明によると、反応は、水性系中4~50の温度及び5.0~9.0のpHで実行される。好ましくは、反応は、水性系中35~45の温度及び7.5~8.5のpHで実行される。より好ましくは、反応は、40未満の温度及び8.0未満のpHで実行される。

【0016】

より好ましくは、反応は、リン酸緩衝液中で実行される。 30

【0017】

より好ましくは、反応系は、UDP-グリコシルトランスフェラーゼの組み換え細胞及び細胞透過剤を含有し、反応は、細胞透過剤の存在下で実行される。更に、細胞透過剤は、トルエンであり、反応系中のトルエンの体積比濃度は、1~3%である。更に、トルエンの体積比濃度は、2%である。

【0018】

より好ましくは、反応において使用される全ての原料をリアクターに添加して均一に混合した後、攪拌しながら反応のために設定温度で配置する。反応が完了した後、使用要件を満たすことができるレバウディオサイドJ産物を精製処理を通して得ることができる。特定の精製方法は、樹脂単離を含む後処理によるものであり、95%もの高い純度を有するレバウディオサイドJ産物を得ることができる。 40

【0019】

好ましくは、組み換え細胞は、微生物細胞である。

【0020】

より好ましくは、微生物は、大腸菌(*Escherichia coli*)、出芽酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)又はピチア・パストリス(*Pichia pastoris*)である。

【0021】

前述の技術的解決策により、本発明は、先行技術と比較して以下の利点を有する。

【0022】

本発明によって提供される酵素的方法を使用するレバウディオサイドJを調製する方法 50

は、重要な適用価値を有する。基質レバウディオサイドAは、酵素的方法を使用することにより大量に得ることができるため、レバウディオサイドJの産生は、原料の量によって制限されない。このため、製造コストが大幅に削減される。また植物におけるステビオサイドの含有量が低いため、及び異なる構造を有する多くのステビオサイドが存在するため、高い純度を有する産生物を抽出することはむしろ困難である。ステビア葉からレバウディオサイドJを抽出するための先行技術と比較すると、本発明は、新規のステビオサイドレバウディオサイドJの研究及び適用を促進する酵素合成方法を採用することによって、より高い純度を有する産生物を提供する。

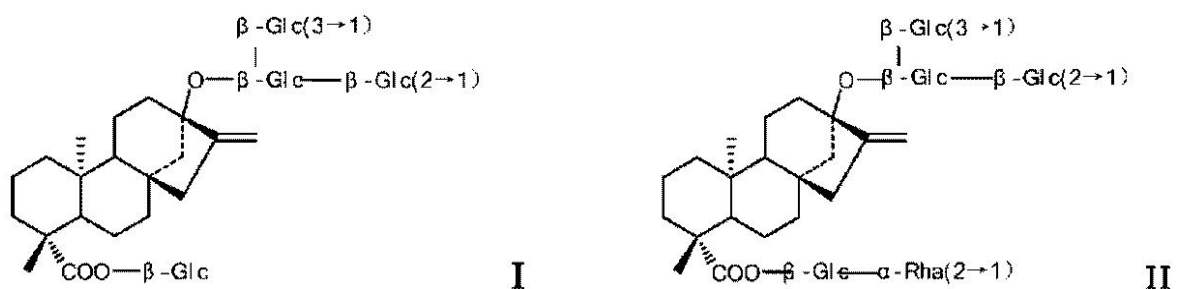
【発明を実施するための最良の形態】

【0023】

レバウディオサイドA及びレバウディオサイドJの構造式については、それぞれ式I及びIIを参照されたい。

【0024】

【化1】



【0025】

本発明により提供されるレバウディオサイドJの主要合成経路は、以下のとおりである。

【0026】

【化2】



【0027】

本発明において採用されるUGT-Bは、凍結乾燥酵素粉末の形態で、又は組み換え細胞中に存在し得る。

【0028】

UGT-Bを得るための方法は、以下のとおりである。

UGT-Bの組み換え大腸菌（又は他の微生物）発現株は、分子クローニング技法及び遺伝子工学技法を利用することによって得られる。次いで、組み換え大腸菌を発酵させて、UGT-Bを含有する組み換え細胞を得るか、又は上記組み換え細胞由来のUGT-Bの凍結乾燥粉末を調製し、取得する。

【0029】

本発明において記載される分子クローニング技法及び遺伝子工学技法の両方は、既に周知されている。分子クローニング技法は、Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3rd Edition) (J. Sambrook, 2005)に見出すことができる。

【0030】

遺伝子工学技法を用いることによって構築された本明細書における組み換え株の発現ステップは、以下のとおりである。

(1) (配列表に示される配列1及び配列2に従って) 必要な遺伝子断片を遺伝的に合成し、pUC57ベクターにライゲーションする一方で、2つの末端にNdeI及びBamHI酵素切断部位をそれぞれ付加する。

(2) 各遺伝子断片を、発現ベクターpET30aの対応する酵素切断部位に二重消化

10

20

30

40

50

及びライゲーションにより挿入し、それにより各遺伝子を、T7プロモーターの制御下で配置する。

(3) 組み換えプラスミドを、大腸菌BL21(DE3)に形質転換する。標的タンパク質の発現は、IPTGを利用することによって誘導され、次いでUGT-Bの組み換え大腸菌の発現株が得られる。

【0031】

UGT-Bを含有する組み換え大腸菌の発現株を利用することによって、UGT-Bを含有する組み換え細胞及びUGT-Bの凍結乾燥粉末を調製するためのステップは、以下のとおりである。

UGT-Bを含有する組み換え大腸菌発現株を、1%の割合に従って4mLの液体LB培地に接種する。振盪培養を、37℃で(200rpmで)一晚実行する。一晚培養した物質を採取し、1%の割合に従って50mLのLB液体培地に接種する。OD₆₀₀値が0.6~0.8に達するまで、振盪培養を、37℃で(200rpmで)一晚実行する。次いで、0.4mMの最終濃度を有するIPTGを、一晚の振盪培養にわたって20℃で添加する。誘導が完了した後、細胞を遠心分離(8,000rpm、10分)によって回収する。次いで、細胞を5mLの2mol/Lリン酸緩衝液(pH7.0)で再懸濁して、組み換え細胞を得る。次いで、細胞を氷浴中で超音波的に破壊した。ホモジネートを遠心分離する(8,000rpm、10分)。また上清を回収し、凍結乾燥粉末を得るために24時間凍結乾燥させる。

【0032】

本発明は、以下の特定の実施例と組み合わせて更に詳述される。

【0033】

実施例1：UGT-Bを含有する組み換え大腸菌細胞の調製

配列3及び配列4に従って、UGT-B遺伝子断片を遺伝的に合成し、一方で2つの末端にNdeI及びBamHI酵素切断部位をそれぞれ付加し、pUC57ベクター(Suzhou Genewiz Biotech. Co., Ltd. 製)にライゲーションした。UGT遺伝子セグメントを、制限エンドヌクレアーゼNdeI及びBamHIで酵素消化した後、セグメントを回収し、精製した。BL21(DE3)株を形質転換するために、T4リガーゼを付加して、セグメントをpET30aの対応する酵素切断部位にライゲーションした。

【0034】

UGT株を、1%の割合に従って4mLの液体LB培地に接種した。振盪培養を、37℃で(200rpmで)一晚実行した。一晚培養した物質を採取し、1%の割合に従って50mLの液体LB培地に接種した。OD₆₀₀値が0.6~0.8に達するまで、振盪培養を、37℃で(200rpmで)一晚実行した。次いで、0.4mMの最終濃度を有するIPTGを、一晚の振盪培養にわたって20℃で添加した。誘導が完了した後、細胞を遠心分離(8,000rpm、10分)によって回収した。回収した細胞を、5mLの2mol/Lリン酸緩衝液(pH7.0)で再懸濁して、触媒作用のためにUGT-Bを含有する組み換え細胞を得た。

【0035】

実施例2：UGT-Bの凍結乾燥粉末の調製

実施例1で調製したUGT-Bを含有する組み換え細胞を、氷浴中で超音波的に破壊した。ホモジネートを遠心分離した(8,000rpm、10分)。また上澄みを回収し、24時間凍結乾燥して、UGT-Bの凍結乾燥粉末を得た。

【0036】

実施例3：基質としてのレバウディオサイドAによるUDP-グリコシルトランスフェラーゼの触媒作用下でのレバウディオサイドJの合成

この実施例では、実施例2の方法に従って調製したUGT-Bの凍結乾燥粉末を、レバウディオサイドJの触媒作用及び合成に使用した。

【0037】

1 Lの0.05 mol/Lのリン酸緩衝液(pH 8.0)、2 gのUDPラムノース、1 gのレバウディオサイドA、10 gのUGT-Bの凍結乾燥粉末を反応系に順次添加し、均一に混合した後40 の水浴に入れ、300 rpmで撹拌しながら24時間にわたって反応させた。反応が完了した後、500 µLの反応液を等量の無水メタノールに添加し、均一に混合した。次いで、それを8,000 rpmで10分間遠心分離し、濾過膜で濾過した後、高性能液体クロマトグラフィを使用して上清を検出した(クロマトグラフ条件：カラム：Agilent eclipse sb-C18 4.6×150 mm、検出波長：210 nm、移動相：アセトニトリル：脱イオン水=24%：76%、流速：1.0 mL/分、カラム温度：30)。レバウディオサイドAの変換率は、90%を超えた。シリカ樹脂による単離及び結晶化などの後処理によって上清を精製した後、0.52 g

10

【0038】

実施例4：基質としてのレバウディオサイドAによるUDP-グリコシルトランスフェラーゼの組み換え細胞の触媒作用下でのレバウディオサイドJの合成

この実施例では、実施例1の方法に従って調製したUGT-Bを含有する組み換え細胞を、レバウディオサイドJの触媒作用及び合成に使用した。

【0039】

1 Lの0.05 mol/Lのリン酸緩衝液(pH 8.0)、2 gのUDPラムノース、1 gのレバウディオサイドA、20 mLのトルエン、40 gのUGT-B全細胞を反応系に順次添加し、均一に混合した後40 の水浴に入れ、300 rpmで撹拌しながら24時間

20

にわたって反応させた。反応が完了した後、500 µLの反応液を取り、遠心分離した。上清を等量の無水メタノールと共に添加し、均一に混合した。次いで、それを8,000 rpmで10分間遠心分離し、濾過膜で濾過した後、高性能液体クロマトグラフィを使用して上清を検出した(クロマトグラフ条件：カラム：Agilent eclipse sb-C18 4.6×150 mm、検出波長：210 nm、移動相：アセトニトリル：脱イオン水=24%：76%、流速：1.0 mL/分、カラム温度：30)。レバウディオサイドAの変換率は、90%を超えた。シリカ樹脂による単離及び結晶化などの後処理によって上清を精製した後、0.49 gのレバウディオサイドJを得て、その純度は95%を超えた。

【0040】

30

上述の実施例は、単に、本発明の技術的概念及び特徴の説明のためのものである。実施例を提供する目的は、当業者が本発明を理解し、それを適宜実施することを可能にすることだけである。本発明の範囲は、これに限定されない。本発明の本質から誘導されるいかなる同等の変更又は修正も、本発明の保護範囲内に包含されるものとする。

さらに、本発明は次の態様を包含する。

1. 酵素的方法を使用してレバウディオサイドJを調製するための方法であって、前記方法において、レバウディオサイドAが、基質として使用され、グリコシル供与体の存在下で、レバウディオサイドJが、UDP-グリコシルトランスフェラーゼを含有する組み換え細胞及び/又はそこから調製されたUDP-グリコシルトランスフェラーゼの触媒作用下での反応によって産生される、方法。

40

2. 前記グリコシル供与体が、ラムノシル供与体である、項1に記載の方法。

3. 前記ラムノシル供与体が、UDP-ラムノースである、項2に記載の方法。

4. 前記UDP-グリコシルトランスフェラーゼが、Oryza sativa由来のUGT-Bである、項1に記載の方法。

5. Oryza sativa由来のUGT-Bのアミノ酸配列が、配列表に示される配列2と少なくとも60%一致している、項4に記載の方法。

6. Oryza sativa由来のUGT-Bの前記アミノ酸配列が、配列表に示される配列2と少なくとも70%一致している、項5に記載の方法。

7. Oryza sativa由来のUGT-Bの前記アミノ酸配列が、配列表に示される配列2と少なくとも80%一致している、項6に記載の方法。

50

8. *Oryza sativa* 由来の UGT - B の前記アミノ酸配列が、配列表に示される配列 2 と少なくとも 90 % 一致している、項 7 に記載の方法。

9. 前記反応が、水性系中 35 ~ 45 の温度及び 7.5 ~ 8.5 の pH で実行される、項 1 に記載の方法。

10. 前記反応が、リン酸緩衝液中で実行される、項 9 に記載の方法。

11. 前記反応系が、UDP - グリコシルトランスフェラーゼの組み換え細胞及び細胞透過剤を含有する、項 9 に記載の方法。

12. 前記細胞透過剤が、トルエンであり、前記反応系中のトルエンの体積比濃度が、1 ~ 3 % である、項 11 に記載の方法。

13. 前記反応に使用される全ての原料を反応ケトルに添加して均一に混合した後、撹拌しながら反応のために設定温度で配置する、項 9 に記載の方法。

14. 前記組み換え細胞が、微生物細胞である、項 1 に記載の方法。

15. 前記微生物が、大腸菌 (*Escherichia coli*)、出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 又はピチア・パストリス (*Pichia pastoris*) である、項 14 に記載の方法。

【配列表】

0006842800000001.app

フロントページの続き

- (72)発明者 王 文霞
中華人民共和国 2 1 5 6 0 0 江蘇省蘇州市張家港市港城大道 6 0 3 号
- (72)発明者 鄭 雷雷
中華人民共和国 2 1 5 6 0 0 江蘇省蘇州市張家港市港城大道 6 0 3 号
- (72)発明者 朱 春磊
中華人民共和国 2 1 5 6 0 0 江蘇省蘇州市張家港市港城大道 6 0 3 号
- (72)発明者 梁 曉亮
中華人民共和国 2 1 5 6 0 0 江蘇省蘇州市張家港市港城大道 6 0 3 号
- (72)発明者 陳 車翹
中華人民共和国 2 1 5 6 0 0 江蘇省蘇州市張家港市港城大道 6 0 3 号

審査官 井関 めぐみ

- (56)参考文献 国際公開第 2 0 1 4 / 1 9 3 8 8 8 (W O , A 1)
特表 2 0 1 5 - 5 1 9 0 5 9 (J P , A)
特表 2 0 1 4 - 5 2 4 2 4 7 (J P , A)
国際公開第 2 0 1 6 / 0 5 4 5 3 4 (W O , A 1)
中国特許出願公開第 1 0 3 7 5 7 0 7 4 (C N , A)
米国特許出願公開第 2 0 1 4 / 0 2 7 1 9 9 6 (U S , A 1)
特表 2 0 1 2 - 5 0 4 5 5 2 (J P , A)

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C 1 2 N 1 5 / 5 4

C 1 2 P 1 9 / 5 6

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S / W P I D S
(S T N)

U n i P r o t / G e n e S e q