

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】第 1 部門第 1 区分

【発行日】平成29年3月9日(2017.3.9)

【公表番号】特表2016-506739(P2016-506739A)

【公表日】平成28年3月7日(2016.3.7)

【年通号数】公開・登録公報2016-014

【出願番号】特願2015-556497(P2015-556497)

【国際特許分類】

A 2 3 L 27/00 (2016.01)

C 1 2 N 1/15 (2006.01)

C 1 2 N 1/19 (2006.01)

C 1 2 N 1/21 (2006.01)

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 P 19/00 (2006.01)

A 2 3 L 2/00 (2006.01)

【F I】

A 2 3 L 1/22 1 0 1 A

C 1 2 N 1/15 Z N A

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 1/21

C 1 2 N 5/10

C 1 2 N 15/00 A

C 1 2 P 19/00

A 2 3 L 1/22 Z

A 2 3 L 2/00 B

【手続補正書】

【提出日】平成29年2月2日(2017.2.2)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) ステビオールグリコシドの 13 - O - グルコース、19 - O - グルコース、または 13 - O - グルコースおよび 19 - O - グルコースの両方の C 2 ' の 1, 2 グリコシル化が可能なポリペプチドをコードする遺伝子；

(b) ステビオールグリコシドの 13 - O - グルコース、19 - O - グルコース、または 13 - O - グルコースおよび 19 - O - グルコースの両方の C 3 ' の 1, 3 グリコシル化が可能なポリペプチドをコードする遺伝子；

(c) ステビオールまたはステビオールグリコシドをその C - 13 ヒドロキシル基においてグリコシル化することが可能なポリペプチドをコードする遺伝子；および

(d) ステビオールまたはステビオールグリコシドをその C - 19 カルボキシル基においてグリコシル化することが可能なポリペプチドをコードする遺伝子

を 1 または 2 以上の遺伝子が発現される条件下で含む組換え宿主細胞を増殖させることを含む、細胞培養物においてレバウディオサイド M を産生する方法であって、

ここで、少なくとも 1 つの遺伝子が組換え遺伝子であり；

ここで、レバウディオサイドMが宿主細胞によって産生され；

ここで、ステビオールグリコシドが、ステビオール - 13 - O - グルコシド、ステビオール - 19 - O - グルコシド、ルブソシド、ステビオシド、1,2 - ビオシド、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DまたはレバウディオサイドEまたはその混合物を含む、

前記方法。

【請求項2】

1または2以上の遺伝子が構成的に発現され、および/または1または2以上の遺伝子の発現が誘導される、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

(a)ステビオールグリコシドの13 - O - グルコース、19 - O - グルコース、または13 - O - グルコースおよび19 - O - グルコースの両方のC2'の1,2グリコシル化；

(b)ステビオールグリコシドの13 - O - グルコース、19 - O - グルコース、または13 - O - グルコースおよび19 - O - グルコースの両方のC3'の1,3グリコシル化；

(c)ステビオールまたはステビオールグリコシドをそのC - 13ヒドロキシル基においてグリコシル化すること；および

(d)ステビオールまたはステビオールグリコシドをそのC - 19カルボキシル基においてグリコシル化すること

が可能な1または2以上のポリペプチドを使用する、植物由来もしくは合成ステビオールまたはステビオールグリコシドの細胞培養物における全細胞生物変換を含む、レバウディオサイドMを産生する方法であって、

ここで、少なくとも1つのポリペプチドが、細胞によって産生された組換えポリペプチドであり；

ここで、ステビオールグリコシドが、ステビオール - 13 - O - グルコシド、ステビオール - 19 - O - グルコシド、ルブソシド、ステビオシド、1,2 - ビオシド、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DまたはレバウディオサイドEまたはその混合物を含む、

前記方法。

【請求項4】

全細胞が組換え細胞である、請求項3に記載の方法。

【請求項5】

(a)植物由来もしくは合成ステビオールまたはステビオールグリコシドおよび1または2以上のポリペプチドを反応混合物に添加すること、ここで少なくとも1つのポリペプチドが組換えポリペプチドであり、および1または2以上のポリペプチドが、ステビオールグリコシドの13 - O - グルコース、19 - O - グルコース、または13 - O - グルコースおよび19 - O - グルコースの両方のC2'の1,2グリコシル化が可能であり；ステビオールグリコシドの13 - O - グルコース、19 - O - グルコース、または13 - O - グルコースおよび19 - O - グルコースの両方のC3'の1,3グリコシル化が可能であり；ステビオールまたはステビオールグリコシドをそのC - 13ヒドロキシル基においてグリコシル化することが可能であり；およびステビオールまたはステビオールグリコシドをそのC - 19カルボキシル基においてグリコシル化することが可能である；および

(b)反応混合物においてレバウディオサイドMを合成することを含む、レバウディオサイドMを産生するためのin vitroの方法。

【請求項6】

(a)ステビオールグリコシドの13 - O - グルコース、19 - O - グルコース、または13 - O - グルコースおよび19 - O - グルコースの両方のC2'の1,2グリコシル化が可能なポリペプチドをコードする遺伝子；

(b) ステビオールグリコシドの 13 - O - グルコース、19 - O - グルコース、または 13 - O - グルコースおよび 19 - O - グルコースの両方の C 3' の 1, 3 グリコシル化が可能なポリペプチドをコードする遺伝子；

(c) ステビオールまたはステビオールグリコシドをその C - 13 ヒドロキシル基においてグリコシル化することが可能なポリペプチドをコードする遺伝子；および

(d) ステビオールまたはステビオールグリコシドをその C - 19 カルボキシル基においてグリコシル化することが可能なポリペプチドをコードする遺伝子

を含む、細胞培養物においてレバウディオサイド M を産生するための組換え宿主細胞であって、

ここで、少なくとも 1 つの遺伝子が組換え遺伝子であり；

ここで、ステビオールグリコシドが、ステビオール - 13 - O - グルコシド、ステビオール - 19 - O - グルコシド、ルブソシド、ステビオシド、1, 2 - ビオシド、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 D またはレバウディオサイド E またはその混合物を含む、

前記組換え宿主細胞。

【請求項 7】

組換え宿主細胞が、

(e) ファルネシルニリン酸 (FPP) およびイソペンテニルニリン酸 (IPP) からゲラニルゲラニルピロリン酸 (GGPP) を合成することが可能なポリペプチドをコードする遺伝子；

ここで、ファルネシルニリン酸 (FPP) およびイソペンテニルニリン酸 (IPP) からゲラニルゲラニルピロリン酸 (GGPP) を合成することが可能なポリペプチドが、配列番号 24 に記載のアミノ酸配列に対して少なくとも 70 % の配列同一性を有するポリペプチドを含む；

(f) GGPP から ent - コパリルニリン酸を合成することが可能なポリペプチドをコードする遺伝子；

ここで、GGPP から ent - コパリルニリン酸を合成することが可能なポリペプチドが、配列番号 13 に記載のアミノ酸配列に対して少なくとも 80 % の配列同一性を有するポリペプチドを含む；

(g) ent - コパリルピロリン酸から ent - カウレンを合成することが可能なポリペプチドをコードする遺伝子；

ここで、ent - コパリルピロリン酸から ent - カウレンを合成することが可能なポリペプチドが、配列番号 21 に記載のアミノ酸配列に対して少なくとも 40 % の配列同一性を有するポリペプチドを含む；

(h) ent - カウレンから ent - カウレン酸を合成することが可能なポリペプチドをコードする遺伝子；

ここで、ent - カウレンから ent - カウレン酸を合成することが可能なポリペプチドが、配列番号 25 に記載のアミノ酸配列に対して少なくとも 70 % の配列同一性を有するポリペプチドを含む；

(i) ent - カウレン酸からステビオールを合成することが可能なポリペプチドをコードする遺伝子；

ここで、ent - カウレン酸からステビオールを合成することが可能なポリペプチドが、配列番号 11 に記載のアミノ酸配列に対して少なくとも 60 % の配列同一性を有するポリペプチドを含む；および / または

(j) シトクロム P450 複合体を還元することが可能なポリペプチドをコードする遺伝子；

ここで、シトクロム P450 複合体を還元することが可能なポリペプチドが、配列番号 4 または 9 に記載のアミノ酸配列に対して少なくとも 65 % の配列同一性を有するポリペプチドを含む、

ここで、(e) ~ (j) における遺伝子の少なくとも 1 つが組換え遺伝子である、

をさらに含む、請求項 1 に記載の方法または請求項 6 に記載の組換え宿主細胞。

【請求項 8】

(a) ステビオールグリコシドの 13 - O - グルコース、19 - O - グルコース、または 13 - O - グルコースおよび 19 - O - グルコースの両方の C 2 ' の 1, 2 グリコシル化が可能なポリペプチドが、配列番号 16 に記載のアミノ酸配列に対して 65 % 以上の同一性を有するポリペプチド；配列番号 15 または 86 に記載のアミノ酸配列に対して 90 % 以上の同一性を有するポリペプチド、または配列番号 15 の残基 211 および 286 において置換を有するポリペプチド；またはそれらの組み合わせを含み、

(b) ステビオールグリコシドの 13 - O - グルコース、19 - O - グルコース、または 13 - O - グルコースおよび 19 - O - グルコースの両方の C 3 ' の 1, 3 グリコシル化が可能なポリペプチドが、配列番号 2 に記載のアミノ酸配列に対して 50 % 以上の同一性を有するポリペプチドを含み；

(c) ステビオールまたはステビオールグリコシドをその C - 13 ヒドロキシル基においてグリコシル化することが可能なポリペプチドが、配列番号 26 に記載のアミノ酸配列に対して 55 % 以上の同一性を有するポリペプチドを含み；および

(d) ステビオールまたはステビオールグリコシドをその C - 19 カルボキシル基においてグリコシル化することが可能なポリペプチドが、配列番号 1 に記載のアミノ酸配列に対して 55 % 以上の同一性を有するポリペプチドを含み；

ここで、少なくとも 1 つのポリペプチドが組換えポリペプチドである、

請求項 1、3 もしくは 5 に記載の方法または請求項 6 に記載の組換え宿主細胞。

【請求項 9】

ステビオールグリコシドの 13 - O - グルコース、19 - O - グルコース、または 13 - O - グルコースおよび 19 - O - グルコースの両方の C 3 ' の 1, 3 グリコシル化が可能なポリペプチドが、配列番号 2 の Q 23 G、Q 23 H、T 55 K、T 55 E、S 56 A、I 26 F、I 26 W、Y 128 S、Y 128 E、T 146 A、T 146 G、T 146 P、H 155 L、H 155 R、Q 198 R、S 285 R、S 285 T、S 253 W、S 253 G、L 257 P、L 257 W、L 257 T、L 257 G、L 257 A、L 257 R、L 257 E、S 283 N、T 284 R、T 284 G、S 285 G、K 337 E、K 337 P または L 379 V を含む 1 または 2 以上のポリペプチドバリエーションを含む、請求項 1、3 もしくは 5 に記載の方法または請求項 6 に記載の組換え宿主細胞。

【請求項 10】

レバウディオサイド M を細胞培養物から単独で、または少なくとも 1 つの他のステビオールグリコシドとともに単離することをさらに含む、請求項 1、3 もしくは 5 に記載の方法であって、ここで、単離する工程が：

(a) レバウディオサイド M を単独で、または少なくとも 1 つの他のステビオールグリコシドとともに含む細胞培養物を提供すること；

(b) 細胞培養物の固相から細胞培養物の液相を分離してレバウディオサイド M を単独で、または少なくとも 1 つの他のステビオールグリコシドとともに含む上澄みを得ること；

(c) 充填カラムにおいて吸着樹脂を提供することを含む、1 または 2 以上の吸着樹脂を提供すること、および

(d) 工程 (b) の上澄みを 1 または 2 以上の吸着樹脂に接触させてレバウディオサイド M の少なくとも一部を単独で、または少なくとも 1 つの他のステビオールグリコシドとともに得、それによってレバウディオサイド M を単独で、または少なくとも 1 つの他のステビオールグリコシドとともに単離すること；または

(a) レバウディオサイド M を単独で、または少なくとも 1 つの他のステビオールグリコシドとともに含む細胞培養物を提供すること；

(b) 細胞培養物の固相から細胞培養物の液相を分離してレバウディオサイド M を単独で、または少なくとも 1 つの他のステビオールグリコシドとともに含む上澄みを得ること；

(c) 1 または 2 以上のイオン交換もしくはイオン交換もしくは逆相クロマトグラフィーカラムを提供すること；および

(d) 工程 (b) の上澄みを 1 または 2 以上のイオン交換もしくはイオン交換もしくは逆相クロマトグラフィーカラムに接触させてレバウディオサイド M の少なくとも一部を単独で、または少なくとも 1 つの他のステビオールグリコシドとともに得ること；または

(a) レバウディオサイド M を単独で、または少なくとも 1 つの他のステビオールグリコシドとともに含む細胞培養物を提供すること；

(b) 細胞培養物の固相から細胞培養物の液相を分離してレバウディオサイド M を単独で、または少なくとも 1 つの他のステビオールグリコシドとともに含む上澄みを得ること；

(c) レバウディオサイド M を単独で、または少なくとも 1 つの他のステビオールグリコシドとともに結晶化または抽出し、それによってレバウディオサイド M を単独で、または少なくとも 1 つの他のステビオールグリコシドとともに単離すること

を含む、前記方法。

【請求項 1 1】

レバウディオサイド M を細胞培養物から単独で、または少なくとも 1 つの他のステビオールグリコシドとともに回収することをさらに含む、請求項 1、3 もしくは 5 に記載の方法であって、

ここで回収されたレバウディオサイド M が、植物由来のステビア抽出物から得られたレバウディオサイド M に対して、ステビア植物由来の成分の減少したレベルを有する、前記方法。

【請求項 1 2】

組換え宿主細胞が、レバウディオサイド M を細胞培養物の少なくとも約 600 mg / L の濃度において産生するか；または

組換え宿主細胞が、レバウディオサイド M を細胞培養物の少なくとも約 600 mg / L の濃度において産生し、および細胞培養物が、グルコース、ウリジン二リン酸 (UDP) グルコース、UDP ラムノース、UDP キシロース、N - アセチル - グルコサミン、および / または酵母窒素ベース (YNB) をさらに含む、

請求項 1、3 もしくは 5 に記載の方法または請求項 6 に記載の組換え宿主細胞。

【請求項 1 3】

細胞培養物が、

(a) 組換え宿主細胞によって産生されたレバウディオサイド M、

ここで、レバウディオサイド M が細胞培養物の少なくとも 600 mg / ml の濃度において存在する；

(b) グルコース、ウリジン二リン酸 (UDP) グルコース、UDP ラムノース、UDP キシロース、および / または N - アセチル - グルコサミン；および / または

(c) 微量の金属、ビタミン、塩、酵母窒素ベース (YNB) および / またはアミノ酸を含む補助栄養

を含む、請求項 1 もしくは 3 に記載の方法または請求項 6 に記載の組換え宿主細胞。

【請求項 1 4】

組換え宿主細胞が、植物細胞、哺乳動物細胞、昆虫細胞、真菌細胞、藻類細胞または細菌細胞を含む、請求項 1 もしくは 4 に記載の方法または請求項 6 に記載の組換え宿主細胞であって；

ここで、真菌細胞が酵母細胞を含み；

ここで、酵母細胞が、サッカロマイセス・セレビスエ、シゾサッカロミセス・ボンベ、ヤロウィア・リポリティカ、カンジダ・グラブラタ、アシュビア・ゴシビー、サイバリンドネラ・ジャディニ、ピキア・パストリス、クルイペロミセス・ラクチス、ハンゼヌラ・ポリモルファ、カンジダ・ボイジニイ、アークスラ・アデニニボランス、キサントフィロミセス・デンドロロウス、またはカンジダ・アルピカンス種由来の細胞であるか；または

ここで、酵母細胞がサッカロミセス属であるか、または

ここで、酵母細胞がサッカロマイセス・セレビスエ種由来の細胞である、

前記方法または前記組換え宿主細胞。

【請求項 1 5】

所定の温度で所定の時間、発酵槽において組換え宿主細胞を増殖させる、ここで温度および時間は、レバウディオサイドMの産生を促進する、請求項1に記載の方法。

【請求項16】

ステピオールグリコシドの13-O-グルコース、19-O-グルコース、または13-O-グルコースおよび19-O-グルコースの両方のC2'の1,2グリコシル化が可能なポリペプチドをコードする遺伝子が、2以上のコピー数を有する、請求項1、3もしくは5に記載の方法または請求項6に記載の組換え宿主細胞。

【請求項17】

反応混合物が、

(a) 反応混合物において産生されたレバウディオサイドM、
ここで、レバウディオサイドMが、反応混合物の少なくとも約600mg/Lの濃度において存在する；

(b) ステピオールグリコシドの13-O-グルコース、19-O-グルコース、または13-O-グルコースおよび19-O-グルコースの両方のC2'の1,2グリコシル化が可能なポリペプチド；ステピオールグリコシドの13-O-グルコース、19-O-グルコース、または13-O-グルコースおよび19-O-グルコースの両方のC3'の1,3グリコシル化が可能なポリペプチド；ステピオールまたはステピオールグリコシドをそのC-13ヒドロキシル基においてグリコシル化することが可能なポリペプチド；およびステピオールまたはステピオールグリコシドをそのC-19カルボキシル基においてグリコシル化することが可能なポリペプチドの1または2以上

(c) ウリジン二リン酸(UDP)グルコース、UDPラムノース、UDPキシロース、および/またはN-アセチル-グルコサミン；および/または

(d) 反応緩衝液および/または塩
を含む、請求項5に記載の方法。

【請求項18】

(a) 約1%~約99%w/wのレバウディオサイドM；
ここで、組成物が、ステビア抽出物に対して、非ステピオールグリコシドのステビア植物由来成分の減少したレベルを有する；または

(a) 約1%~約99%w/wのレバウディオサイドM；
ここで、レバウディオサイドMが、請求項3に記載の全細胞生物変換方法によって産生される；または

(a) 約1%~約99%w/wのレバウディオサイドM；
ここで、レバウディオサイドMが、植物由来のステビア抽出物から得られたレバウディオサイドMに対して、ステビア植物由来成分の減少したレベルを有する；
ここで、レバウディオサイドMが、請求項5に記載のin vitroの方法によって産生される；または

(a) 約1%~約99%w/wのレバウディオサイドM；
ここで、レバウディオサイドMが、植物由来のステビア抽出物から得られたレバウディオサイドMに対して、ステビア植物由来成分の減少したレベルを有する；
ここで、レバウディオサイドMが、請求項6に記載の組換え宿主細胞によって産生される；

ここで、少なくとも1つのステビア植物由来成分が異臭に寄与する植物由来の化合物であり；およびここで、組成物が、ステビア抽出物に対して、0.1%未満のステビア植物由来成分を有する、
を含む、組成物。

【請求項19】

請求項18に記載の組成物を含む、食品。

【請求項20】

請求項18に記載の組成物を含む、飲料または飲料濃縮物。

【請求項21】

(a) 組換え宿主細胞によって産生されたレバウディオサイドM、
ここで、レバウディオサイドMが、細胞培養物の少なくとも600mg/mlの濃度において存在する；

(b) グルコース、フルクトースおよび/またはスクロース；および/または

(c) 微量の金属、ビタミン、塩、酵母窒素ベース(YNB)および/またはアミノ酸を含む、補助栄養を含む、細胞培養物。

【請求項22】

(a) 組換え宿主細胞によって産生されたレバウディオサイドM、
ここで、レバウディオサイドMが、細胞培養物の可溶化液の少なくとも600mg/mlの濃度において存在する；

(b) グルコース、フルクトース、スクロース、ウリジン二リン酸(UDP)グルコース、UDPラムノース、UDPキシロース、および/またはN-アセチル-グルコサミン；および/または

(c) 微量の金属、ビタミン、塩、酵母窒素ベース(YNB)および/またはアミノ酸を含む、補助栄養を含む、細胞培養物の可溶化液。

【請求項23】

(a) 反応混合物において産生されたレバウディオサイドM、
ここで、レバウディオサイドMが、反応混合物の少なくとも約600mg/Lの濃度において存在する；

(b) ステビオールグリコシドの13-O-グルコース、19-O-グルコース、または13-O-グルコースおよび19-O-グルコースの両方のC2'の1,2グリコシル化が可能なポリペプチド；ステビオールグリコシドの13-O-グルコース、19-O-グルコース、または13-O-グルコースおよび19-O-グルコースの両方のC3'の1,3グリコシル化が可能なポリペプチド；ステビオールまたはステビオールグリコシドをそのC-13ヒドロキシル基においてグリコシル化することが可能なポリペプチド；およびステビオールまたはステビオールグリコシドをそのC-19カルボキシル基においてグリコシル化することが可能なポリペプチドの1または2以上；

(c) ウリジン二リン酸(UDP)グルコース、UDPラムノース、UDPキシロース、および/またはN-アセチル-グルコサミン；および/または

(d) 反応緩衝液および/または塩を含む、反応混合物。