

【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16日(2017.3.16)

【公表番号】特表2016-506743(P2016-506743A)

【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2015-556536(P2015-556536)

【国際特許分類】

C 1 2 N	1/19	(2006.01)
C 1 2 N	1/15	(2006.01)
C 1 2 N	1/21	(2006.01)
C 1 2 P	19/46	(2006.01)
C 1 2 N	15/09	(2006.01)
C 1 2 R	1/865	(2006.01)

【F I】

C 1 2 N	1/19	Z N A
C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N	1/21	
C 1 2 P	19/46	
C 1 2 N	15/00	A
C 1 2 P	19/46	
C 1 2 R	1:865	

【手続補正書】

【提出日】平成29年2月13日(2017.2.13)

【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】

少なくとも1つの輸送体遺伝子、および、少なくとも1つの輸送体遺伝子の発現を制御する少なくとも1つの転写因子遺伝子を含む、細胞培養液中でステビオールグリコシドを生産する組み換え微生物であって、

前記組み換え微生物が、少なくとも1つの輸送体遺伝子、少なくとも1つの輸送体遺伝子の発現を制御する転写因子遺伝子、またはその両方、を過剰発現するかまたはその減少した発現を有し、

前記組み換え微生物が、さらに以下：

(a) スクロース輸送体(SUC1)ポリペプチドおよびスクロースシンターゼ(SUS1)ポリペプチドをコードする1つまたは2つ以上の遺伝子；

(b) ファルネシルニリン酸(FPP)およびイソベンテニルニリン酸(IPP)からゲラニルゲラニルピロリン酸(GGPP)を合成できるポリペプチドをコードする遺伝子；

(c) GGPPからent-コパリルニリン酸を合成できるポリペプチドをコードする遺伝子；

(d) ent-コパリルピロリン酸からent-カウレンを合成できるポリペプチドをコードする遺伝子；

(e) ent-カウレンからent-カウレン酸を合成できるポリペプチドをコードす

る遺伝子；

(f) ent - カウレン酸からステビオールを合成できるポリペプチドをコードする遺伝子；および／または

(g) シトクロムP450複合体を還元できるポリペプチドをコードする遺伝子；を含み、および、さらに以下：

(h) 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のヒドロキシル基でグリコシル化できるポリペプチドをコードする遺伝子；

(i) ステビオールグリコシドの13-O-グルコース、19-O-グルコースまたはその両方をそのC3'でベータ1,3-グリコシル化できるポリペプチドをコードする遺伝子；

(j) 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カルボキシル基でグリコシル化できるポリペプチドをコードする遺伝子；および／または

(k) ステビオールグリコシドの13-O-グルコース、19-O-グルコースまたはその両方をそのC2'でベータ1,2-グリコシル化できるポリペプチドをコードする遺伝子

の1つまたは2つ以上を含み、

前記遺伝子の少なくとも1つが、組み換え遺伝子であり、

ステビオールグリコシドが、レバウジオシドA、レバウジオシドB、レバウジオシドD、レバウジオシドEもしくはレバウジオシドMまたはそれらの組み合わせである、前記組み換え微生物。

【請求項2】

輸送体遺伝子が、内在性の輸送体遺伝子または異種輸送体遺伝子であり、ここで異種輸送体遺伝子が、ステビア輸送体遺伝子である、請求項1に記載の組み換え微生物。

【請求項3】

輸送体遺伝子が、ATP結合力セット(ABC)輸送体またはMajor Facilitatorスーパーファミリー(MFS)輸送体をコードする、請求項1または2に記載の組み換え微生物。

【請求項4】

輸送体遺伝子または転写因子遺伝子が、配列番号104で示されるアミノ酸配列を有するYGL013C、配列番号105で示されるアミノ酸配列を有するYBL005W、配列番号106で示されるアミノ酸配列を有するYLR266C、配列番号107で示されるアミノ酸配列を有するYOR153W、配列番号108で示されるアミノ酸配列を有するYOR328、配列番号109で示されるアミノ酸配列を有するYIL013、配列番号110で示されるアミノ酸配列を有するYPL058、配列番号111で示されるアミノ酸配列を有するYDR406、配列番号112で示されるアミノ酸配列を有するYNR070W、配列番号113で示されるアミノ酸配列を有するYOR328、配列番号114で示されるアミノ酸配列を有するYKL209C、配列番号115で示されるアミノ酸配列を有するYGR281、配列番号116で示されるアミノ酸配列を有するYOR011W、配列番号117で示されるアミノ酸配列を有するYOL075C、配列番号118で示されるアミノ酸配列を有するYIL166C、配列番号119で示されるアミノ酸配列を有するYLR004C、配列番号120で示されるアミノ酸配列を有するYKR103W、配列番号121で示されるアミノ酸配列を有するYCR011C、配列番号122で示されるアミノ酸配列を有するYBR008C、配列番号123で示されるアミノ酸配列を有するYIL120W、配列番号124で示されるアミノ酸配列を有するYBR043C、配列番号126で示されるアミノ酸配列を有するYLR028W、配列番号127で示されるアミノ酸配列を有するYGR138C、配列番号128で示されるアミノ酸配列を有するYOR273C、配列番号130で示されるアミノ酸配列を有するYNL065W、配列番号131で示されるアミノ酸配列を有するYGR224W、配列番号132で示されるアミノ酸配列を有するYPR19

8 W、配列番号 1 3 3 で示されるアミノ酸配列を有する Y H R 0 4 8 W、配列番号 1 3 4 で示されるアミノ酸配列を有する Y M L 1 1 6 W、配列番号 1 3 5 で示されるアミノ酸配列を有する Y K R 1 0 6 W、配列番号 1 3 6 で示されるアミノ酸配列を有する Y N R 0 5 5 C、配列番号 1 3 7 で示されるアミノ酸配列を有する Y O R 3 7 8 W、配列番号 1 3 8 で示されるアミノ酸配列を有する Y M R 2 7 9 C、配列番号 1 3 9 で示されるアミノ酸配列を有する Y O L 1 5 8 C、配列番号 1 4 0 で示されるアミノ酸配列を有する Y H L 0 4 0 C、配列番号 1 4 1 で示されるアミノ酸配列を有する Y H L 0 4 7 C、配列番号 1 4 2 で示されるアミノ酸配列を有する Y P L 0 9 2 W、配列番号 1 4 3 で示されるアミノ酸配列を有する Y L R 2 3 7 W、配列番号 1 4 4 で示されるアミノ酸配列を有する Y G L 1 8 6 C、配列番号 1 4 5 で示されるアミノ酸配列を有する Y A L 0 6 7 C、配列番号 1 4 6 で示されるアミノ酸配列を有する Y E L 0 6 5 W または配列番号 1 4 7 で示されるアミノ酸配列を有する Y B R 1 8 0 W であるポリペプチドをコードする、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の組み換え微生物。

【請求項 5】

過剰発現が、Y G R 2 8 1、Y O R 3 2 8、Y G L 0 1 3 C または Y B R 0 0 8 C の過剰発現を含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の組み換え微生物。

【請求項 6】

減少した発現が、各遺伝子座を破壊することによる、Y G L 0 1 3 C、Y B L 0 0 5 W、Y O R 1 5 3 W、Y O R 3 2 8、Y D R 4 0 6、Y O R 3 2 8 および / または Y L L 0 2 8 W の減少した発現を含む、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の組み換え微生物。

【請求項 7】

以下：

(a) S U S 1 ポリペプチドが、配列番号 7 8 または配列番号 8 0 で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドを含み；

(b) ファルネシルニリン酸 (F P P) およびイソペンテニルニリン酸 (I P P) から ゲラニルゲラニルピロリン酸 (G G P P) を合成できるポリペプチドが、配列番号 4 3 、配列番号 4 4 、配列番号 4 5 、配列番号 4 6 、配列番号 4 7 、配列番号 4 8 、配列番号 4 9 または配列番号 5 0 に示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドを含み；

(c) G G P P から e n t - コパリルニリン酸を合成できるポリペプチドが、配列番号 3 3 、配列番号 3 4 、配列番号 3 5 、配列番号 3 6 、配列番号 3 7 、配列番号 3 8 または配列番号 3 9 で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドを含み；

(d) e n t - コパリルピロリン酸から e n t - カウレンを合成できるポリペプチドが、配列番号 1 、配列番号 2 、配列番号 3 、配列番号 4 、配列番号 5 または配列番号 6 で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドを含み；

(e) e n t - カウレンから e n t - カウレン酸を合成できるポリペプチドが、配列番号 7 、配列番号 8 、配列番号 9 または配列番号 1 0 で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドを含み；

(f) e n t - カウレン酸からステビオールを合成できるポリペプチドが、配列番号 1 1 、配列番号 1 2 、配列番号 1 3 、配列番号 1 4 、配列番号 1 5 、配列番号 1 6 、配列番号 1 7 または配列番号 1 9 で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドを含み；

(g) シトクロム P 4 5 0 複合体を還元できるポリペプチドが、配列番号 2 0 、配列番号 2 1 、配列番号 2 2 、配列番号 2 7 または配列番号 2 8 で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドを含み；

(h) ステビオールまたはステビオールグリコシドをその C - 1 3 ヒドロキシル基でグリコシル化できるポリペプチドが、配列番号 3 0 または配列番号 9 1 で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドを含み；

(i) ステビオールグリコシドの 1 3 - O - グルコース、1 9 - O - グルコース、または、1 3 - O - グルコースおよび 1 9 - O - グルコースの両方をその C 3 ' でベータ 1 , 3 グリコシル化できるポリペプチドが、配列番号 8 5 または配列番号 8 9 で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドを含み；

(j) ステビオールまたはステビオールグリコシドをその C - 1 9 カルボキシル基でグリコシル化できるポリペプチドが、配列番号 2 9 または配列番号 8 8 で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドを含み；および／または

(k) ステビオールグリコシドの 1 3 - 0 - グルコース、1 9 - 0 - グルコース、または、1 3 - 0 - グルコースおよび 1 9 - 0 - グルコースの両方をその C 2 ' でベータ 1 , 2 グリコシル化できるポリペプチドが、配列番号 5 1 、配列番号 5 4 、配列番号 5 5 、配列番号 8 6 または配列番号 9 0 で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む、請求項 1 に記載の組み換え微生物。

【請求項 8】

遺伝子が、微生物における発現のためにコドン最適化されており、および、*Saccharomyces cerevisiae*における発現のためにコドン最適化されていてもよい、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の組み換え微生物。

【請求項 9】

以下：

(a) ステビオールまたはステビオールグリコシドをその C - 1 3 ヒドロキシル基でグリコシル化できるポリペプチド；ステビオールグリコシドの 1 3 - 0 - グルコース、1 9 - 0 - グルコース、または、1 3 - 0 - グルコースおよび 1 9 - 0 - グルコースの両方をその C 3 ' でベータ 1 , 3 グリコシル化できるポリペプチド；ならびに、ステビオールグリコシドの 1 3 - 0 - グルコース、1 9 - 0 - グルコース、または、1 3 - 0 - グルコースおよび 1 9 - 0 - グルコースの両方をその C 2 ' でベータ 1 , 2 グリコシル化できるポリペプチド；

(b) ステビオールまたはステビオールグリコシドをその C - 1 3 ヒドロキシル基でグリコシル化できるポリペプチド；ステビオールグリコシドの 1 3 - 0 - グルコース、1 9 - 0 - グルコース、または、1 3 - 0 - グルコースおよび 1 9 - 0 - グルコースの両方をその C 3 ' でベータ 1 , 3 グリコシル化できるポリペプチド；ステビオールまたはステビオールグリコシドをその C - 1 9 カルボキシル基でグリコシル化できるポリペプチド；ならびに、ステビオールグリコシドの 1 3 - 0 - グルコース、1 9 - 0 - グルコース、または、1 3 - 0 - グルコースおよび 1 9 - 0 - グルコースの両方をその C 2 ' でベータ 1 , 2 グリコシル化できるポリペプチド；

(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 - 1 3 ヒドロキシル基でグリコシル化できるポリペプチド；ステビオールグリコシドの 1 3 - 0 - グルコース、1 9 - 0 - グルコース、または、1 3 - 0 - グルコースおよび 1 9 - 0 - グルコースの両方をその C 3 ' でベータ 1 , 3 グリコシル化できるポリペプチド；ステビオールまたはステビオールグリコシドをその C - 1 9 カルボキシル基でグリコシル化できるポリペプチド；ならびに、ステビオールグリコシドの 1 3 - 0 - グルコース、1 9 - 0 - グルコース、または、1 3 - 0 - グルコースおよび 1 9 - 0 - グルコースの両方をその C 2 ' でベータ 1 , 2 グリコシル化できるポリペプチド；あるいは、

(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 - 1 3 ヒドロキシル基でグリコシル化できるポリペプチド；ステビオールグリコシドの 1 3 - 0 - グルコース、1 9 - 0 - グルコース、または、1 3 - 0 - グルコースおよび 1 9 - 0 - グルコースの両方をその C 3 ' でベータ 1 , 3 グリコシル化できるポリペプチド；ステビオールまたはステビオールグリコシドをその C - 1 9 カルボキシル基でグリコシル化できるポリペプチド；ならびに、ステビオールグリコシドの 1 3 - 0 - グルコース、1 9 - 0 - グルコース、または、1 3 - 0 - グルコースおよび 1 9 - 0 - グルコースの両方をその C 2 ' でベータ 1 , 2 グリコシル化できるポリペプチド

をコードする 1 つまたは 2 つ以上の遺伝子をさらに含み、ここで遺伝子の少なくとも 1 つのが、組み換え遺伝子である、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の組み換え微生物。

【請求項 10】

遺伝子の 1 つまたは 2 つ以上が発現される条件下で、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の組み換え微生物を増殖させることを含む、細胞培養液からステビオールグリコシドの

排出を変化させる方法であって、

輸送体遺伝子、少なくとも1つの輸送体遺伝子の発現を制御する転写因子遺伝子、またはその両方である少なくとも1つの遺伝子が、発現され；

ステビオールグリコシドが、組み換え微生物によって生産され；

ステビオールグリコシドが、レバウジオシドA、レバウジオシドB、レバウジオシドD、レバウジオシドEまたはレバウジオシドMである、前記方法。

【請求項11】

1つまたは2つ以上の遺伝子が発現される条件下で、請求項1～9のいずれか一項に記載の組み換え微生物を増殖させることを含む、細胞培養物においてステビオールグリコシドを產生する方法であって、

輸送体遺伝子、少なくとも1つの輸送体遺伝子の発現を制御する転写因子遺伝子、またはその両方である少なくとも1つの遺伝子が、発現され；

増殖されることが、遺伝子の1つまたは2つ以上の発現を誘導すること、または、遺伝子の1つまたは2つ以上を構成的に発現することを含み得；

ステビオールグリコシドが、組み換え微生物によって生産され；

ステビオールグリコシドが、レバウジオシドA、レバウジオシドB、レバウジオシドD、レバウジオシドEまたはレバウジオシドMである、前記方法。

【請求項12】

(a) レバウジオシドAが、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ヒドロキシル基でグリコシル化できるポリペプチド；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-グルコースの両方をそのC3'でベータ1,3グリコシル化できるポリペプチド；ステビオールまたはステビオールグリコシドをC-19カルボキシル基でグリコシル化できるポリペプチド；ならびに、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-グルコースの両方をそのC2'でベータ1,2グリコシル化できるポリペプチドを発現する組み換え微生物において合成され；

(b) レバウジオシドBが、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ヒドロキシル基でグリコシル化できるポリペプチド；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-グルコースの両方をそのC3'でベータ1,3グリコシル化できるポリペプチド；ならびに、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-グルコースの両方をそのC2'でベータ1,2グリコシル化できるポリペプチドを発現する組み換え微生物において合成され；

(c) レバウジオシドDが、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ヒドロキシル基でグリコシル化できるポリペプチド；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-グルコースの両方をそのC3'でベータ1,3グリコシル化できるポリペプチド；ステビオールまたはステビオールグリコシドをC-19カルボキシル基でグリコシル化できるポリペプチド；ならびに、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-グルコースの両方をそのC2'でベータ1,2グリコシル化できるポリペプチドを発現する組み換え微生物において合成され；

(d) レバウジオシドEが、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ヒドロキシル基でグリコシル化できるポリペプチド；ステビオールまたはステビオールグリコシドをC-19カルボキシル基でグリコシル化できるポリペプチド；ならびに、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-グルコースの両方をそのC2'でベータ1,2グリコシル化できるポリペプチドを発現する組み換え微生物において合成され；および/または

(e) レバウジオシドMが、ステビオールまたはステビオールグリコシドをそのC-1

3ヒドロキシル基でグリコシル化できるポリペプチド；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-グルコースの両方をそのC3'でベータ1,3グリコシル化できるポリペプチド；ステビオールまたはステビオールグリコシドをC-19カルボキシル基でグリコシル化できるポリペプチド；ならびに、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-グルコースの両方をそのC2'でベータ1,2グリコシル化できるポリペプチドを発現する組み換え微生物において合成される、

請求項11に記載の方法。

【請求項13】

組み換え微生物が、配列番号115で示されるアミノ酸配列を有するYGR281、配列番号113で示されるアミノ酸配列を有するYOR328、配列番号104で示されるアミノ酸配列有するYGL013C、または、配列番号122で示されるアミノ酸配列を有するYBR008Cを過剰発現する、請求項10～12のいずれか一項に記載の方法。

【請求項14】

ステビオールグリコシドが、細胞培養物中に、少なくとも500mg/Lの濃度で生産される、請求項10～13のいずれか一項に記載の方法。

【請求項15】

細胞培養物からレバウジオシド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一緒に単離することをさらに含み、単離するステップが、以下：

(a) レバウジオシド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一緒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、レバウジオシド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一緒に含む上清を得ること；

(c) 充填カラム中の1つまたは2つ以上の吸着レジンを提供することを含む、前記吸着レジンを提供すること；ならびに、

(d) 少なくとも一部のレバウジオシド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一緒に得るために、ステップ(b)の上清を、1つまたは2つ以上の吸着レジンに接触させること、それによって、レバウジオシド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一緒に単離することを含むか、あるいは、

(a) レバウジオシド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一緒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、レバウジオシド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一緒に含む上清を得ること；

(c) 1つまたは2つ以上のイオン交換またはイオン交換または逆相クロマトグラフィーカラムを提供すること；ならびに

(d) 少なくとも一部のレバウジオシド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一緒に得るために、ステップ(b)の上清を、1つまたは2つ以上のイオン交換またはイオン交換または逆相クロマトグラフィーカラムに接触させること、それによって、レバウジオシド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一緒に単離することを含むか、あるいは、

(a) レバウジオシド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一緒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、レバウジオシド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一緒に含む上清を得ること；ならびに、

(c) レバウジオシド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一緒に結晶化または抽出すること、それによって、レバウジオシド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一緒に単離することを含む、請求項 1 0 ~ 1 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 6】

細胞培養物からレバウジオシド 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一緒に回収することをさらに含み；

ここで回収されたレバウジオシド M が、ステビア草由来ステビア抽出物から得られたレバウジオシド M と比較して、ステビア草由来成分の減少したレベルを有する、請求項 1 0 ~ 1 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 7】

組み換え宿主細胞が、発酵槽内においてある温度である期間増殖させられ、ここで温度および期間が、ステビオールグリコシド組成物の産生を容易にする、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 8】

以下：

(a) ステビオールグリコシドの 1 3 - O - グルコース、1 9 - O - グルコース、または、1 3 - O - グルコースおよび 1 9 - O - グルコースの両方の C 2 ' でのベータ 1 , 2 グリコシル化；

(b) ステビオールグリコシドの 1 3 - O - グルコース、1 9 - O - グルコース、または、1 3 - O - グルコースおよび 1 9 - O - グルコースの両方の C 3 ' でのベータ 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のその C - 1 3 ヒドロキシル基でのグリコシル化；ならびに

(d) ステビオールまたはステビオールグリコシドのその C - 1 9 カルボキシル基でのグリコシル化

を可能とする 1 つまたは 2 つ以上のポリペプチドを使用して、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の組み換え微生物を含む細胞培養物中で、草由来もしくは合成のステビオールまたはステビオールグリコシドの全細胞のバイオコンバージョンを含む、レバウジオシド M を产生する方法であって、

ポリペプチドの少なくとも 1 つが、組み換え微生物によって產生される組み換えポリペプチドであり；

ステビオールグリコシドが、ステビオール - 1 3 - O - グルコシド、ステビオール - 1 9 - O - グルコシド、ルブソシド、ステビオシド、1 , 2 - ビオシド、レバウジオシド A 、レバウジオシド B 、レバウジオシド D もしくはレバウジオシド E またはこれらの混合物を含む、前記方法。

【請求項 1 9】

以下：

(a) 草由来もしくは合成のステビオールまたはステビオールグリコシドおよび 1 つまたは 2 つ以上のポリペプチドを、反応混合物へ加えること、

ここでポリペプチドの少なくとも 1 つが、組み換えポリペプチドであり、ならびに、1 つまたは 2 つ以上のポリペプチドが、ステビオールグリコシドの 1 3 - O - グルコース、1 9 - O - グルコース、または、1 3 - O - グルコースおよび 1 9 - O - グルコースの両方を C 2 ' でベータ 1 , 2 グリコシル化でき；ステビオールグリコシドの 1 3 - O - グルコース、1 9 - O - グルコース、または、1 3 - O - グルコースおよび 1 9 - O - グルコースの両方を C 3 ' でベータ 1 , 3 グリコシル化でき；ステビオールまたはステビオールグリコシドをその C - 1 3 ヒドロキシル基でグリコシル化でき；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 - 1 9 カルボキシル基でグリコシル化でき；ならびに

(b) 反応混合物中でレバウジオシド M を合成することを含む、レバウジオシド M を產生する *in vitro* での方法。

【請求項 2 0】

組み換え微生物が、酵母細胞、植物細胞、哺乳動物細胞、昆虫細胞、真菌細胞、藻細胞または細菌細胞であり；

細菌細胞が、Escherichia細菌細胞、Lactobacillus細菌細胞、Lactococcus細菌細胞、C ornebacterium細菌細胞、Acetobacter細菌細胞、Acinetobacter細菌細胞またはPseudomon as細菌細胞を含み；

真菌細胞が、酵母細胞を含み；

酵母細胞が、Saccharomyces cerevisiae、Schizosaccharomyces pombe、Yarrowia lipolytica、Candida glabrata、Ashbya gossypii、Cyberlindnera jadinii、Pichia pastoris、Kluyveromyces lactis、Hansenula polymorpha、Candida boidinii、Arxula adeninivorans、Xanthophyllomyces dendrorhousまたはCandida albicans種の細胞であり；あるいは

酵母細胞が、Saccharomyceteである；あるいは

酵母細胞が、Saccharomyces cerevisiae種の細胞である、

請求項1～9のいずれか一項に記載の組み換え微生物または請求項10～19のいずれか一項に記載の方法。

【請求項21】

以下：

(a) 請求項1～9のいずれか一項に記載の組み換え微生物；

(b) 組み換え微生物によって產生された1つまたは2つ以上のステビオールグリコシドの1つ；および

(c) グルコース、ウリジンニリン酸(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/または酵母窒素原礎培地(YNB)

を含み、

ここで1つまたは2つ以上のステビオールグリコシドが、レバウジオシドA、レバウジオシドB、レバウジオシドD、レバウジオシドEもしくはレバウジオシドMまたはこれらの組み合わせであり；

1つまたは2つ以上のステビオールグリコシドの少なくとも1つが、培養培地の少なくとも1mg/リットルの濃度で細胞培養物中に存在する、細胞培養物。

【請求項22】

以下：

(a) 請求項1～9のいずれか一項に記載の組み換え微生物によって產生された1つまたは2つ以上のステビオールグリコシド、ここで1つまたは2つ以上のステビオールグリコシドが、レバウジオシドA、レバウジオシドB、レバウジオシドD、レバウジオシドEまたはレバウジオシドMであり；ならびに、

(b) グルコース、ウリジンニリン酸(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/または酵母窒素原礎培地(YNB)

を含む、細胞培養溶解物。

【請求項23】

以下：

(a) 反応混合物中で產生されたレバウジオシドM、ここでレバウジオシドMが、反応混合物中少なくとも500mg/Lの濃度で存在し；

(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-グルコースの両方をそのC2'でベータ1,2グリコシル化できるポリペプチド；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-グルコースの両方をそのC3'でベータ1,3グリコシル化できるポリペプチド；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ヒドロキシル基でグリコシル化できるポリペプチド；ならびに、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

でグリコシル化できるポリペプチド、のうち1つまたは2つ以上；

(c) ウリジンニリン酸(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。

【請求項24】

請求項1～9のいずれか一項に記載の組み換え微生物によってか、または請求項10～19のいずれか一項に記載の方法によって生産された、ステビオールグリコシド。

【請求項25】

請求項24に記載のステビオールグリコシドを含む、甘味料組成物。

【請求項26】

請求項25に記載の甘味料組成物を含む、食品。

【請求項27】

請求項25に記載の甘味料組成物を含む、飲料または飲料濃縮物。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0113

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0113】

スクロースシンターゼはあらゆる好適な生物に由来し得る。例えば限定なしに、Arabidopsis thaliana(例えば配列番号78)またはCoffea arabica(例えば配列番号80)由来のスクロースシンターゼのコード配列(例えばPCT/US2012/050021の配列番号178、179および180参照)が、好適なプロモーターの制御下にある発現プラスミドにクローニングされて、宿主(例えば微生物または植物)によって発現され得る。SUSコード配列はSUC2(スクロース加水分解酵素)欠損S.cerevisiae株によって発現されて、酵母による細胞外のスクロースの分解を回避し得る。スクロースシンターゼは、かかる株によって、スクロース輸送体(例えば、A.thaliana SUC1輸送体またはその機能的なホモログ)および1つまたは2つ以上のUGT(例えばUGT85C2、UGT74G1、UGT76G1、EUGT11およびUGT91D2eまたはそれらの機能的なホモログの1つまたは2つ以上)と組み合わせて発現され得る。スクロースを含有する培地によって宿主を培養することは、UDP-グルコースおよび1つまたは2つ以上のグルコシド(例えばステビオールグルコシド)の生産を促進し得る。尚、場合によっては、スクロースシンターゼおよびスクロース輸送体が、特定の化合物(例えばステビオール)の生産用の組み換え体である宿主細胞によってUGTと一緒に発現され得る。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】変更

【補正の内容】

【配列表】

2016506743000001.app