(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
2024年1月4日(04.01.2024)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2024/005142 A1

(51) 国際特許分類:
C12Q 1/6895 (2018.01) *C12N 15/11* (2006.01)
A01H 6/14 (2018.01) *C12P 15/00* (2006.01)
A23L 33/105 (2016.01) *C12Q 1/686* (2018.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2023/024180

(22) 国際出願日： 2023年6月29日(29.06.2023)

(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 2022-106616 2022年6月30日(30.06.2022) JP

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

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

(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, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

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

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

(54) **Title:** METHOD FOR SCREENING STEVIA PLANT

(54) 発明の名称： ステビア植物のスクリーニング方法

(57) **Abstract:** The purpose of the present invention is to clarify genetic information of stevia. Provided are a method for screening a stevia plant having at least one of chemical features (a)-(r), etc., said method including a step for detecting the presence and/or absence of at least one of genetic features (1)-(3) from the genome of a test stevia plant.

(57) 要約：ステビアの遺伝情報を解明する。本発明は、被験ステビア植物体のゲノムから、遺伝的特徴(1)～(3)の少なくとも1つの存在及び/又は不在を検出する工程を含む、化学的特徴(a)～(r)の少なくとも1つを有するステビア植物体をスクリーニングする方法等を提供する。

WO 2024/005142 A1

明　細　書

発明の名称 ： ステビア植物のスクリーニング方法

技術分野

[0001] 本発明は、ステビア植物のスクリーニング方法等に関する。

背景技術

[0002] 多様化する消費者ニーズに対応すべく、様々な飲料が開発され、市販されている。ショ糖等の糖類は、甘味を与える等の目的で飲料にごく普通に配合される成分であるが、過剰摂取による健康への影響が指摘されてきており、より低カロリーであり、かつ天然由来の甘味料に対するニーズが高まりつつある。例えば特許文献1は、ビタミン、高甘味度甘味料、及び甘味改善組成物を含有する機能性甘味料組成物を開示している。

[0003] ステビオール配糖体は、ステビア抽出物に含まれる甘味成分として知られている。ステビア抽出物は、主にステビアの葉から抽出、精製される。ステビアは南米パラグアイを原産地とする菊科多年生植物で、学名をステビア・レバウディアナ・ベルトニー(Stevia Rebaudiana Bertoni)という。ステビアは砂糖の約300倍以上の甘味を持つ成分を含むので、この甘味成分を抽出して天然甘味料として用いる為に栽培されている。ステビオール配糖体としては、レバウジオシドA(Rebaudioside A、以下「レバウジオシド」(Rebaudioside)を「Reb」と略すことがある)、RebB、RebC、RebD、RebE、RebM等、様々な配糖体の存在が報告されている(特許文献2)。様々なステビオール配糖体の中で、例えばRebAは、高甘味度と良質甘味を有する甘味料として評価されており、広く用いられている。その他のステビオール配糖体についても、その独自の甘さ及び付随する味を有することが判明しつつある。

[0004] そのような状況において、ステビオール配糖体の含量等に特徴のあるステビア植物体を遺伝情報に基づいてスクリーニングする方法が知られている(特許文献3～6)。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：WO2007/070224

特許文献2：WO2010/038911

特許文献3：WO2016/049531

特許文献4：WO2019/074089

特許文献5：WO2021/230256

特許文献6：WO2021/230257

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0006] ステビアの遺伝情報のさらなる解明が求められている。

課題を解決するための手段

[0007] 一態様において、本発明は以下を提供する。

[1] 被験ステビア植物体のゲノムから、以下の遺伝的特徴(1)～(3)の少なくとも1つの存在及び/又は不在を検出する工程を含む、以下の化学的特徴(a)～(r)の少なくとも1つを有するステビア植物体をスクリーニングする方法。

(1)配列番号1の184位に相当する位置の塩基がGであるアレルについてヘテロ接合性又はホモ接合性である。

(2)配列番号2の170位に相当する位置の塩基がCであるアレルについてヘテロ接合性又はホモ接合性である。

(3)配列番号3の92位に相当する位置の塩基がCであるアレルについてヘテロ接合性又はホモ接合性である。

(a)遺伝的特徴(1)～(3)をいずれも有しないステビア植物体に比べ、レバウジオシド(Reb)Dに対するRebMの含有比が高い。

(b)遺伝的特徴(1)～(3)をいずれも有しないステビア植物体に比べ、RebEに対するRebBの含有比が高い。

(c)遺伝的特徴(1)～(3)をいずれも有しないステビア植物体に比べ、RebEに対するRebGの含有比が高い。

(d)遺伝的特徴(1)～(3)をいずれも有しないステビア植物体に比べ、ステビオシドに対するRebGの含有比が高い。

(e)遺伝的特徴(1)～(3)をいずれも有しないステビア植物体に比べ、RebAの含有量が多い。

(f)遺伝的特徴(1)～(3)をいずれも有しないステビア植物体に比べ、RebBの含有量が多い。

(g)遺伝的特徴(1)～(3)をいずれも有しないステビア植物体に比べ、RebFの含有量が多い。

(h)遺伝的特徴(1)～(3)をいずれも有しないステビア植物体に比べ、RebGの含有量が多い。

(i)遺伝的特徴(1)～(3)をいずれも有しないステビア植物体に比べ、RebMの含有量が多い。

(j)遺伝的特徴(1)～(3)をいずれも有しないステビア植物体に比べ、β-1,3-グルコシド結合を有するステビオール配糖体の含有量が多い。

(k)遺伝的特徴(1)～(3)をいずれも有しないステビア植物体に比べ、RebDの含有量が少ない。

(l)遺伝的特徴(1)～(3)をいずれも有しないステビア植物体に比べ、RebEの含有量が少ない。

(m)遺伝的特徴(1)～(3)をいずれも有しないステビア植物体に比べ、RebNの含有量が少ない。

(n)遺伝的特徴(1)～(3)をいずれも有しないステビア植物体に比べ、ステビオシドの含有量が少ない。

(o)遺伝的特徴(1)～(3)をいずれも有しないステビア植物体に比べ、β-1,3-グルコシド結合を有しないステビオール配糖体の含有量が少ない。

(p)遺伝的特徴(1)～(3)をいずれも有しないステビア植物体に比べ、RebD、RebE、RebN、ステビオシドのいずれか1つに対する、RebA、RebB、RebF、RebG、RebMのいずれか1つの含有比が高い。なお、化学的特徴(p)は、例えば、RebDに対するRebAの含有比が高く、且つ、RebEに対するRebBの含有比が高い、と

いった態様も包含するものである。

(q)遺伝的特徴(1)～(3)をいずれも有しないステビア植物体に比べ、β-1,3-グルコシド結合を有しないステビオール配糖体に対するβ-1,3-グルコシド結合を有するステビオール配糖体の含有比が高い。

(r)遺伝的特徴(1)～(3)をいずれも有しないステビア植物体に比べ、UGT76G1の基質ステビオール配糖体に対する、前記基質ステビオール配糖体からUGT76G1により生成されるステビオール配糖体の含有比が高い。

[0008] [2] 遺伝的特徴の存在及び/又は不在が検出された被験ステビア植物組織のRebA、RebB、RebD、RebE、RebF、RebG、RebM、RebN及び/又はステビオシドの含有量を測定する工程をさらに含む、[1]に記載の方法。

[3] 遺伝的特徴の存在及び/又は不在を検出する工程が、CAPS法、dCAPS法又はTaqMan PCR法を用いて行われる、[1]又は[2]に記載の方法。

[4] [1]に定義された遺伝的特徴(1)～(3)の少なくとも1つの存在及び/又は不在を検出するための試薬を含む、[1]に定義された化学的特徴(a)～(r)の少なくとも1つを有するステビア植物体のスクリーニングキット。

[5] 試薬が、CAPS法、dCAPS法又はTaqMan PCR法に使用するプライマー及び/又はプローブを含む、[4]に記載のキット。

[6] [1]に定義された遺伝的特徴(1)～(3)の少なくとも1つを有するステビア植物体。

[7] [1]に定義された化学的特徴(a)～(r)の少なくとも1つを有する、[6]に記載の植物体。

[8] 非遺伝子組換植物体である、[6]又は[7]に記載の植物体。

[9] 変異誘発処理を行ったステビア植物体及びその子孫植物体を含む、[6]～[8]のいずれか一項に記載の植物体。

[0009] [10] [6]～[9]のいずれか一項に記載の植物体の種子、組織、乾燥葉、組織培養物又は細胞。

[11] 胚、分裂組織細胞、花粉、葉、根、根端、花弁、プロトプラスト、葉の切片及びカルスから選択される、[10]に記載の組織、組織培養物又は細胞

。

[12] [6]～[9]のいずれか一項に記載のステビア植物体と第2のステビア植物体とを交雑させる工程を含む、[1]に定義された化学的特徴(a)～(r)の少なくとも1つを有するステビア植物体を作出する方法。

[13] 第2の植物体が[6]～[9]のいずれか一項に記載のステビア植物体である、[12]に記載の方法。

[14] ステビア植物体のゲノムに、前記ゲノムが[1]に定義された遺伝的特徴(1)～(3)の少なくとも1つを有するように改変を加える工程を含む、[1]に定義された化学的特徴(a)～(r)の少なくとも1つを有するステビア植物体を作出する方法。

[15] ゲノムの改変が、変異誘発処理によって行われる、[14]に記載の方法。

[0010] [16] 以下の化学的特徴(a')～(r')の少なくとも1つを有する、[6]～[9]のいずれか一項に記載の植物体、[10]又は[11]に記載の種子、組織、乾燥葉、組織培養物又は細胞の抽出物。

(a')[1]に定義された遺伝的特徴(1)～(3)をいずれも有しないステビア植物体の抽出物に比べ、レバウジオシド(Reb)Dに対するRebMの含有比が高い。

(b')[1]に定義された遺伝的特徴(1)～(3)をいずれも有しないステビア植物体の抽出物に比べ、RebEに対するRebBの含有比が高い。

(c')[1]に定義された遺伝的特徴(1)～(3)をいずれも有しないステビア植物体の抽出物に比べ、RebEに対するRebGの含有比が高い。

(d')[1]に定義された遺伝的特徴(1)～(3)をいずれも有しないステビア植物体の抽出物に比べ、ステビオシドに対するRebGの含有比が高い。

(e')[1]に定義された遺伝的特徴(1)～(3)をいずれも有しないステビア植物体の抽出物に比べ、RebAの含有量が多い。

(f')[1]に定義された遺伝的特徴(1)～(3)をいずれも有しないステビア植物体の抽出物に比べ、RebBの含有量が多い。

(g')[1]に定義された遺伝的特徴(1)～(3)をいずれも有しないステビア植物体

の抽出物に比べ、RebFの含有量が多い。

(h')[1]に定義された遺伝的特徴(1)～(3)をいずれも有しないステビア植物体の抽出物に比べ、RebGの含有量が多い。

(i')[1]に定義された遺伝的特徴(1)～(3)をいずれも有しないステビア植物体の抽出物に比べ、RebMの含有量が多い。

(j')[1]に定義された遺伝的特徴(1)～(3)をいずれも有しないステビア植物体の抽出物に比べ、β-1,3-グルコシド結合を有するステビオール配糖体の含有量が多い。

(k')[1]に定義された遺伝的特徴(1)～(3)をいずれも有しないステビア植物体の抽出物に比べ、RebDの含有量が少ない。

(l')[1]に定義された遺伝的特徴(1)～(3)をいずれも有しないステビア植物体の抽出物に比べ、RebEの含有量が少ない。

(m')[1]に定義された遺伝的特徴(1)～(3)をいずれも有しないステビア植物体の抽出物に比べ、RebNの含有量が少ない。

(n')[1]に定義された遺伝的特徴(1)～(3)をいずれも有しないステビア植物体の抽出物に比べ、ステビオシドの含有量が少ない。

(o')[1]に定義された遺伝的特徴(1)～(3)をいずれも有しないステビア植物体の抽出物に比べ、β-1,3-グルコシド結合を有しないステビオール配糖体の含有量が少ない。

(p')[1]に定義された遺伝的特徴(1)～(3)をいずれも有しないステビア植物体の抽出物に比べ、RebD、RebE、RebN、ステビオシドのいずれか1つに対する、RebA、RebB、RebF、RebG、RebMのいずれか1つの含有比が高い。なお、化学的特徴(p')は、例えば、RebDに対するRebAの含有比が高く、且つ、RebEに対するRebBの含有比が高い、といった態様も包含するものである。

(q')[1]に定義された遺伝的特徴(1)～(3)をいずれも有しないステビア植物体の抽出物に比べ、β-1,3-グルコシド結合を有しないステビオール配糖体に対するβ-1,3-グルコシド結合を有するステビオール配糖体の含有比が高い。

(r')[1]に定義された遺伝的特徴(1)～(3)をいずれも有しないステビア植物体

の抽出物に比べ、UGT76G1の基質ステビオール配糖体に対する、前記基質ステビオール配糖体からUGT76G1により生成されるステビオール配糖体の含有比が高い。

[0011] [17] [6]～[9]のいずれか一項に記載の植物体、[10]又は[11]に記載の種子、組織、乾燥葉、組織培養物又は細胞から抽出物を得る工程を含む、[16]に定義された化学的特徴(a')～(r')の少なくとも1つを有する抽出物の製造方法。

[18] [16]に記載の抽出物からβ-1,3-グルコシド結合を有するステビオール配糖体を精製する工程を含む、β-1,3-グルコシド結合を有するステビオール配糖体の製造方法。

[19] [6]～[9]のいずれか一項に記載の植物体の抽出物、[10]又は[11]に記載の種子、組織、乾燥葉、組織培養物又は細胞の抽出物、或いは、[16]に記載の抽出物を提供する工程、及び
前記抽出物を、食品、甘味料組成物、香料又は医薬品の原料に添加する工程を含む、食品、甘味料組成物、香料又は医薬品の製造方法。

[20] 遺伝的特徴(1)が、配列番号1の184位に相当する位置の塩基がGであるアレルについてヘテロ接合性である、[1]に記載の方法。

[21] 遺伝的特徴(2)が、配列番号2の170位に相当する位置の塩基がCであるアレルについてヘテロ接合性である、[1]に記載の方法。

[22] 遺伝的特徴(3)が、配列番号3の92位に相当する位置の塩基がCであるアレルについてホモ接合性である、[1]に記載の方法。

[0012] [10-2] [6]～[9]のいずれか一項に記載の植物体の死亡組織又は死亡細胞。

[11-2] 胚、分裂組織細胞、花粉、葉、根、根端、花弁、プロトプラスト、葉の切片及びカルスから選択される、[10-2]に記載の死亡組織又は死亡細胞。

[0013] [16-2] 以下の化学的特徴(a')～(r')の少なくとも1つを有する、[10-2]又は[11-2]に記載の死亡組織又は死亡細胞の抽出物。

(a')[1]に定義された遺伝的特徴(1)～(3)をいずれも有しないステビア植物体

の死亡組織又は死亡細胞の抽出物に比べ、レバウジオシド(Reb)Dに対するRebMの含有比が高い。

(b')[1]に定義された遺伝的特徴(1)～(3)をいずれも有しないステビア植物体の死亡組織又は死亡細胞の抽出物に比べ、RebEに対するRebBの含有比が高い。

(c')[1]に定義された遺伝的特徴(1)～(3)をいずれも有しないステビア植物体の死亡組織又は死亡細胞の抽出物に比べ、RebEに対するRebGの含有比が高い。

(d')[1]に定義された遺伝的特徴(1)～(3)をいずれも有しないステビア植物体の死亡組織又は死亡細胞の抽出物に比べ、ステビオシドに対するRebGの含有比が高い。

(e')[1]に定義された遺伝的特徴(1)～(3)をいずれも有しないステビア植物体の死亡組織又は死亡細胞の抽出物に比べ、RebAの含有量が多い。

(f')[1]に定義された遺伝的特徴(1)～(3)をいずれも有しないステビア植物体の死亡組織又は死亡細胞の抽出物に比べ、RebBの含有量が多い。

(g')[1]に定義された遺伝的特徴(1)～(3)をいずれも有しないステビア植物体の死亡組織又は死亡細胞の抽出物に比べ、RebFの含有量が多い。

(h')[1]に定義された遺伝的特徴(1)～(3)をいずれも有しないステビア植物体の死亡組織又は死亡細胞の抽出物に比べ、RebGの含有量が多い。

(i')[1]に定義された遺伝的特徴(1)～(3)をいずれも有しないステビア植物体の死亡組織又は死亡細胞の抽出物に比べ、RebMの含有量が多い。

(j')[1]に定義された遺伝的特徴(1)～(3)をいずれも有しないステビア植物体の死亡組織又は死亡細胞の抽出物に比べ、β-1,3-グルコシド結合を有するステビオール配糖体の含有量が多い。

(k')[1]に定義された遺伝的特徴(1)～(3)をいずれも有しないステビア植物体の死亡組織又は死亡細胞の抽出物に比べ、RebDの含有量が少ない。

(l')[1]に定義された遺伝的特徴(1)～(3)をいずれも有しないステビア植物体の死亡組織又は死亡細胞の抽出物に比べ、RebEの含有量が少ない。

(m')[1]に定義された遺伝的特徴(1)～(3)をいずれも有しないステビア植物体の死亡組織又は死亡細胞の抽出物に比べ、RebNの含有量が少ない。

(n')[1]に定義された遺伝的特徴(1)～(3)をいずれも有しないステビア植物体の死亡組織又は死亡細胞の抽出物に比べ、ステビオシドの含有量が少ない。

(o')[1]に定義された遺伝的特徴(1)～(3)をいずれも有しないステビア植物体の死亡組織又は死亡細胞の抽出物に比べ、β-1,3-グルコシド結合を有しないステビオール配糖体の含有量が少ない。

(p')[1]に定義された遺伝的特徴(1)～(3)をいずれも有しないステビア植物体の死亡組織又は死亡細胞の抽出物に比べ、RebD、RebE、RebN、ステビオシドのいずれか1つに対する、RebA、RebB、RebF、RebG、RebMのいずれか1つの含有比が高い。

(q')[1]に定義された遺伝的特徴(1)～(3)をいずれも有しないステビア植物体の死亡組織又は死亡細胞の抽出物に比べ、β-1,3-グルコシド結合を有しないステビオール配糖体に対するβ-1,3-グルコシド結合を有するステビオール配糖体の含有比が高い。

(r')[1]に定義された遺伝的特徴(1)～(3)をいずれも有しないステビア植物体の死亡組織又は死亡細胞の抽出物に比べ、UGT76G1の基質ステビオール配糖体に対する、前記基質ステビオール配糖体からUGT76G1により生成されるステビオール配糖体の含有比が高い。

[0014] [17-2] [10-2]又は[11-2]に記載の死亡組織又は死亡細胞から抽出物を得る工程を含む、[16-2]に定義された化学的特徴(a')～(r')の少なくとも1つを有する抽出物の製造方法。

[18-2] [16-2]に記載の抽出物からβ-1,3-グルコシド結合を有するステビオール配糖体を精製する工程を含む、β-1,3-グルコシド結合を有するステビオール配糖体の製造方法。

[19-2] [10-2]又は[11-2]に記載の死亡組織又は死亡細胞の抽出物、或いは、[16-2]に記載の抽出物を提供する工程、及び

前記抽出物を、食品、甘味料組成物、香料又は医薬品の原料に添加する工程

を含む、食品、甘味料組成物、香料又は医薬品の製造方法。

発明の効果

[0015] 本発明によって、RebDに対するRebMの含有比がより高いといった、本明細書に記載の種々の特性を有するステビア植物体の取得、そのような植物体を作出するための手段、そのような植物体より得られる葉、この葉より得られたステビオール配糖体を含む飲料等の提供が可能になる。

図面の簡単な説明

[0016] [図1]図1は、配列番号1の塩基配列における、遺伝的特徴(1)に係る塩基の位置を示した図である。枠で囲った塩基が遺伝的特徴(1)に係る塩基である。

[図2]図2は、配列番号2の塩基配列における、遺伝的特徴(2)に係る塩基の位置を示した図である。枠で囲った塩基が遺伝的特徴(2)に係る塩基である。

[図3]図3は、配列番号3の塩基配列における、遺伝的特徴(3)に係る塩基の位置を示した図である。枠で囲った塩基が遺伝的特徴(3)に係る塩基である。

発明を実施するための形態

[0017] 以下、本発明を詳細に説明する。以下の実施の形態は、本発明を説明するための例示であり、本発明をそのような実施の形態のみに限定する趣旨ではない。本発明は、その要旨を逸脱しない限り、様々な形態で実施をすることができる。

なお、本明細書において引用した全ての文献、及び公開公報、特許公報その他の特許文献は、参照として本明細書に組み込むものとする。

[0018] 1. ステビア植物体

本発明は、以下の遺伝的特徴(1)～(3)の少なくとも1つを有するステビア植物体(以下、「本発明の植物体」又は「本発明のステビア植物体」と総称する場合がある)を提供する。

(1)配列番号1の184位に相当する位置の塩基がGであるアレルについてヘテロ接合性又はホモ接合性であり、好適には、ヘテロ接合性である。

(2)配列番号2の170位に相当する位置の塩基がCであるアレルについてヘテロ接合性又はホモ接合性であり、好適には、ヘテロ接合性である。

(3)配列番号3の92位に相当する位置の塩基がCであるアレルについてヘテロ接合性又はホモ接合性であり、好適には、ホモ接合性である。

[0019] 本発明の植物体は、野生種のステビア植物体から派生したものであるが、上記遺伝的特徴(1)～(3)の少なくとも1つを有するものである(以下、遺伝的特徴(1)～(3)の少なくとも1つを「本発明の遺伝的特徴」と総称する場合がある)。

[0020] 本発明の植物体は、以下の化学的特徴の少なくとも1つを有し得る。

(a)本発明の遺伝的特徴を有しないステビア植物体に比べ、RebDに対するRebMの含有比が高い。

(b)本発明の遺伝的特徴を有しないステビア植物体に比べ、RebEに対するRebBの含有比が高い。

(c)本発明の遺伝的特徴を有しないステビア植物体に比べ、RebEに対するRebGの含有比が高い。

(d)本発明の遺伝的特徴を有しないステビア植物体に比べ、ステビオシドに対するRebGの含有比が高い。

(e)本発明の遺伝的特徴を有しないステビア植物体に比べ、RebAの含有量が多い。

(f)本発明の遺伝的特徴を有しないステビア植物体に比べ、RebBの含有量が多い。

(g)本発明の遺伝的特徴を有しないステビア植物体に比べ、RebFの含有量が多い。

(h)本発明の遺伝的特徴を有しないステビア植物体に比べ、RebGの含有量が多い。

(i)本発明の遺伝的特徴を有しないステビア植物体に比べ、RebMの含有量が多い。

(j)本発明の遺伝的特徴を有しないステビア植物体に比べ、β-1,3-グルコシド結合を有するステビオール配糖体の含有量が多い。

(k)本発明の遺伝的特徴を有しないステビア植物体に比べ、RebDの含有量が少

ない。

(l)本発明の遺伝的特徴を有しないステビア植物体に比べ、RebEの含有量が少ない。

(m)本発明の遺伝的特徴を有しないステビア植物体に比べ、RebNの含有量が少ない。

(n)本発明の遺伝的特徴を有しないステビア植物体に比べ、ステビオシドの含有量が少ない。

(o)本発明の遺伝的特徴を有しないステビア植物体に比べ、β-1,3-グルコシド結合を有しないステビオール配糖体の含有量が少ない。

(p)本発明の遺伝的特徴を有しないステビア植物体に比べ、RebD、RebE、RebN、ステビオシドのいずれか1つに対する、RebA、RebB、RebF、RebG、RebMのいずれか1つの含有比が高い。

(q)本発明の遺伝的特徴を有しないステビア植物体に比べ、β-1,3-グルコシド結合を有しないステビオール配糖体に対するβ-1,3-グルコシド結合を有するステビオール配糖体の含有比が高い。

(r)本発明の遺伝的特徴を有しないステビア植物体に比べ、UGT76G1の基質ステビオール配糖体に対する、前記基質ステビオール配糖体からUGT76G1により生成されるステビオール配糖体の含有比が高い。

[0021] 「～に相当する位置(又は部分)」とは、ゲノム中に基準配列(例えば、配列番号1～3等)と同一の配列が存在する場合は、ゲノム中に存在するその配列中の位置又は部分(例えば、184位、170位、92位等)を意味し、ゲノム中に基準配列と同一の配列が存在しない場合は、ゲノム中の基準配列に相当する配列中の、基準配列中の位置又は部分に相当する位置又は部分を意味する。ゲノム中に基準配列と同一又はそれに相当する配列が存在するかどうかは、例えば、基準配列をPCRで増幅し得るプライマーで、対象となるステビア植物のゲノムDNAを増幅し、増幅産物のシーケンシングを行い、得られた配列と基準配列とのアラインメント解析を行うことで決定することができる。基準配列に相当する配列の非限定例としては、例えば、基準配列に対し60%以上、70%

以上、75%以上、80%以上、81%以上、82%以上、83%以上、84%以上、85%以上、86%以上、87%以上、88%以上、89%以上、90%以上、91%以上、92%以上、93%以上、94%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、98．1%以上、98．4%以上、98．7%以上、99%以上、99．2%以上、99．5%以上又は99．8%以上の配列同一性を有する塩基配列が挙げられる。ゲノム中の基準配列に相当する配列中の、基準配列中の位置又は部分に相当する位置又は部分は、基準配列中の位置又は部分の前後の塩基配列等を考慮して決定することができる。例えば、基準配列とゲノム中の基準配列に相当する配列とのアライメント解析により、ゲノム中の基準配列に相当する配列中の、基準配列中の位置又は部分に相当する位置又は部分を決定することができる。

[0022] 例えば、本発明の遺伝的特徴(1)の「配列番号1の184位に相当する位置」を例にとると、ステビア植物体のゲノムが配列番号1と同一の塩基配列からなる部分を有している場合、「配列番号1の184位に相当する位置」はゲノム中の配列番号1と同一の塩基配列からなる部分の5’側から184位である。一方、ステビア植物体のゲノムが配列番号1と同一ではないがこれに相当する塩基配列からなる部分を有している場合、ゲノムは配列番号1と同一の塩基配列からなる部分を有しないため、「配列番号1の184位に相当する位置」は、必ずしも配列番号1に相当する部分の5’側から184位に該当するわけではないが、配列番号1の184位の前後の塩基配列等を考慮し、かかるステビア植物のゲノムにおける「配列番号1の184位に相当する位置」を特定することができる。例えば、ステビア植物のゲノムにおける配列番号1に相当する部分の塩基配列と、配列番号1の塩基配列とのアライメント解析により、ステビア植物のゲノムにおける「配列番号1の184位に相当する位置」を特定することができる。

[0023] 「配列番号1に相当する塩基配列からなる部分」は、例えば、配列番号1の塩基配列に対し、60%以上、70%以上、75%以上、80%以上、81%以上、82%以上、83%以上、84%以上、85%以上、86%以上、87%以上、88%以上、89%以上、90%以上、91%以上、92%以上、93%以上、94%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、98．1%以上、98．4%以上、98．7%以上、

99%以上、99．2%以上、99．5%以上又は99．8%以上の配列同一性を有する塩基配列からなる部分を意味する。

[0024] 一部の態様において、「配列番号1に相当する塩基配列からなる部分」には、配列番号1の5’末端から1～183位(すなわち、配列番号1の5’末端から、遺伝的特徴(1)に係る位置である184位の1塩基5’末端側の塩基まで)の部分の相補配列にハイブリダイズするフォワードプライマー(例えば、配列番号4の配列を有するもの)と、配列番号1の3’末端側から1～31位(すなわち、配列番号1の3’末端から、遺伝的特徴(1)に係る位置である184位の1塩基3’末端側の塩基まで)の部分にハイブリダイズするリバースプライマー(例えば、配列番号5の配列を有するもの)とを用いたPCRにより増幅され得るステビア植物体のゲノムの部分が含まれる。

[0025] 一部の態様において、「配列番号2に相当する塩基配列からなる部分」には、配列番号2の5’末端から1～169位(すなわち、配列番号2の5’末端から、遺伝的特徴(2)に係る位置である170位の1塩基5’末端側の塩基まで)の部分の相補配列にハイブリダイズするフォワードプライマー(例えば、配列番号6の配列を有するもの)と、配列番号2の3’末端側から1～34位(すなわち、配列番号2の3’末端から、遺伝的特徴(2)に係る位置である170位の1塩基3’末端側の塩基まで)の部分にハイブリダイズするリバースプライマー(例えば、配列番号7の配列を有するもの)とを用いたPCRにより増幅され得るステビア植物体のゲノムの部分が含まれる。

[0026] 一部の態様において、「配列番号3に相当する塩基配列からなる部分」には、配列番号3の5’末端から1～91位(すなわち、配列番号3の5’末端から、遺伝的特徴(3)に係る位置である92位の1塩基5’末端側の塩基まで)の部分の相補配列にハイブリダイズするフォワードプライマー(例えば、配列番号8の配列を有するもの)と、配列番号3の3’末端側から1～29位(すなわち、配列番号3の3’末端から、遺伝的特徴(3)に係る位置である92位の1塩基3’末端側の塩基まで)の部分にハイブリダイズするリバースプライマー(例えば、配列番号9の配列を有するもの)とを用いたPCRにより増幅され得るステビア植物体のゲ

ノムの部分が含まれる。

[0027] 特定の態様において、「配列番号1に相当する塩基配列からなる部分」には、例えば、配列番号4の塩基配列を含むフォワードプライマーと、配列番号5の塩基配列を含むリバースプライマーとを用いたPCRにより増幅され得るステビア植物のゲノムの部分が含まれる。

特定の態様において、「配列番号2に相当する塩基配列からなる部分」には、例えば、配列番号6の塩基配列を含むフォワードプライマーと、配列番号7の塩基配列を含むリバースプライマーとを用いたPCRにより増幅され得るステビア植物のゲノムの部分が含まれる。

特定の態様において、「配列番号3に相当する塩基配列からなる部分」には、例えば、配列番号8の塩基配列を含むフォワードプライマーと、配列番号9の塩基配列を含むリバースプライマーとを用いたPCRにより増幅され得るステビア植物のゲノムの部分が含まれる。

[0028] 特定の態様において、「配列番号1の184位に相当する位置の塩基がGであるアレル」(以下、「遺伝的特徴(1)に係るアレル」と称することがある)は、配列番号10～13の少なくとも1つの塩基配列を含む。

特定の態様において、「配列番号2の170位に相当する位置の塩基がCであるアレル」(以下、「遺伝的特徴(2)に係るアレル」と称することがある)は、配列番号14～17の少なくとも1つの塩基配列を含む。

特定の態様において、「配列番号3の92位に相当する位置の塩基がCであるアレル」(以下、「遺伝的特徴(3)に係るアレル」と称することがある)は、配列番号18～21の少なくとも1つの塩基配列を含む。

[0029] ここで、(1)配列番号1の184位に相当する位置、(2)配列番号2の170位に相当する位置、及び(3)配列番号3の92位に相当する位置を、「本発明の多型部位」又は「本発明の遺伝的特徴に係る部位」と総称することがある。

[0030] 上記の遺伝的特徴は、PCR法、TaqMan PCR法、シーケンス法、マイクロアレイ法、インベーダー法、TILLING法、RAD(random amplified polymorphic DNA)法、制限酵素断片長多型(RFLP)法、PCR－SSCP法、AFLP(amplified fragment

length polymorphism)法、SSLP(simple sequence length polymorphism)法、CAPS(cleaved amplified polymorphic sequence)法、dCAPS(derived cleaved amplified polymorphic sequence)法、アレル特異的オリゴヌクレオチド(ASO)法、ARMS法、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動(DGGE)法、CCM(chemical cleavage of mismatch)法、DOL法、MALDI－TOF/MS法、TDI法、パドロックプローブ法、分子ビーコン法、DASH(dynamic allele specific hybridization)法、UCAN法、ECA法、PINPOINT法、PROBE(primer oligo base extension)法、VSET(very short extension)法、Survivor assay、Sniper assay、Luminex assay、GOOD法、LCx法、SNaPshot法、Mass ARRAY法、パイロシーケンス法、SNP－IT法、融解曲線分析法等により検出することが可能であるが、検出方法はこれらに限定されるものではない。

[0031] 特定の態様において、本発明の遺伝的特徴は、以下のプライマーセット及び制限酵素の組合せによるdCAPS法等で検出することが可能である。

候補植物体が好適な態様の遺伝的特徴(1)(ヘテロ接合性)を有する場合、例えば、候補植物体のゲノムDNAに対し、配列番号22に示す塩基配列を有するフォワードプライマー及び配列番号23に示す塩基配列を有するリバースプライマーを用いてPCR増幅を行い、得られたPCR産物(約248bp長、例えば、配列番号24又は25)に対し制限酵素EcoRVによる処理を行うと、約248bp長のバンド(例えば、配列番号25)、約213bp長のバンド(例えば、配列番号26)及び約35bp長のバンド(例えば、配列番号27)が生じる。一方、候補植物体が遺伝的特徴(1)を有しない場合、上記と同様にPCR増幅を行うと約248bp長のPCR産物(例えば、配列番号24)が生じるが、制限酵素処理を行うと、約213bp長のバンド(例えば、配列番号26)及び約35bp長のバンド(例えば、配列番号27)が生じる。

[0032] 候補植物体が好適な態様の遺伝的特徴(2)(ヘテロ接合性)を有する場合、例えば、候補植物体のゲノムDNAに対し、配列番号28に示す塩基配列を有するフォワードプライマー及び配列番号29に示す塩基配列を有するリバースプライマーを用いてPCR増幅を行い、得られたPCR産物(約242bp長、例えば、配列番号30又は31)に対し制限酵素PvuIIによる処理を行うと、約242bp長のバンド(

例えば、配列番号30)、約207bp長のバンド(例えば、配列番号32)及び約35bp長のバンド(例えば、配列番号33)が生じる。一方、候補植物体が遺伝的特徴(2)を有しない場合、上記と同様にPCR増幅を行うと約242bp長のPCR産物(例えば、配列番号30)が生じるが、制限酵素処理を行っても、切断されていない約242bp長のPCR産物(例えば、配列番号30)のバンドしか得られない。

[0033] 候補植物体が好適な態様の遺伝的特徴(3)(ホモ接合性)を有する場合、例えば、候補植物体のゲノムDNAに対し、配列番号34に示す塩基配列を有するフォワードプライマー及び配列番号35に示す塩基配列を有するリバースプライマーを用いてPCR増幅を行い、得られたPCR産物(約284bp長、例えば、配列番号36)に制限酵素PvuIIによる処理を行うと、約249bp長のバンド(例えば、配列番号37)及び約35bp長のバンド(例えば、配列番号38)が生じる。一方、候補植物体が遺伝的特徴(3)を有しない場合、上記と同様にPCR増幅を行うと約284bp長のPCR産物(例えば、配列番号39)が生じるが、これに制限酵素PvuIIによる処理を行っても、切断されていない約284bp長のPCR産物(例えば、配列番号39)のバンドしか得られない。

上記bp長に関し、「約」とは、±5bpを意味する。制限酵素処理は、使用する各制限酵素の販売元が推奨する条件に従って行うことができる。

[0034] 一部の態様において、本発明の植物体は、遺伝的特徴(1)～(3)のいずれか1つを有する。一部の態様において、本発明の植物体は、遺伝的特徴(1)と(2)の組合せを有する。一部の態様において、本発明の植物体は、遺伝的特徴(1)と(3)の組合せを有する。一部の態様において、本発明の植物体は、遺伝的特徴(2)と(3)の組合せを有する。一部の態様において、本発明の植物体は、遺伝的特徴(1)～(3)のすべてを有する。

[0035] 本発明のステビア植物体は、野生種のステビア植物体から派生したものであり、化学的特徴(a)～(r)の少なくとも1つをもたらす前述の遺伝的特徴を有するものである。当該遺伝的特徴は、遺伝子組換的手法により生じたものであっても、非遺伝子組換的手法により生じたものであってもよい。したがって、本発明の植物体は、遺伝子組換的手法により得られたもの又はその子孫(

以下、「遺伝子組換植物体」と称することがある)であっても、非遺伝子組換的手法により得られたもの又はその子孫(以下、「非遺伝子組換植物体」と称することがある)であってもよい。

[0036] 本明細書中、「非遺伝子組換的手法」の例としては、外来遺伝子の導入を行わずに宿主細胞(又は宿主植物体)の遺伝子に変異を誘発する方法が挙げられる。そのような方法としては植物細胞に変異誘発剤を作用させる方法が挙げられる。そのような変異誘発剤としては、エチルメタンスルホン酸(EMS)及びアジ化ナトリウム等が挙げられる。例えば、EMSは、0．1%、0．2%、0．3%、0．4%、0．5%、0．6%、0．7%、0．8%、0．9%、1．0%等の濃度で植物細胞を処理することができる。処理時間は約1時間～約48時間、約2時間～約36時間、約3時間～約30時間、約4時間～約28時間、約5時間～約26時間、約6時間～約24時間である。処理の手順自体は公知であるが、吸水過程を経た吸水種子を上記濃度で変異誘発剤を含む処理液に、上記処理時間浸漬することで行うことができる。

[0037] 非遺伝子組換的手法の別の例として、X線、γ線、紫外線等の放射線や光線を植物細胞に照射する方法が挙げられる。紫外線を照射する場合、適当な紫外線の照射量(紫外線ランプ強さ、距離、時間)を用いて照射した細胞を、選択培地等で培養した後、目的の形質を有する細胞、カルス、植物体を選択できる。その際の照射強度は0．01～100Gr、0．03～75Gr、0．05～50Gr、0．07～25Gr、0．09～20Gr、0．1～15Gr、0．1～10Gr、0．5～10Gr、1～10Grであってよく、照射距離は1cm～200m、5cm～100m、7cm～75m、9cm～50m、10cm～30m、10cm～20m、10cm～10mであってよく、照射時間は1分～2年、2分～1年、3分～0．5年、4分～1か月、5分～2週間、10分～1週間であってよい。照射の強度、距離及び時間は、放射線や光線の種類や照射対象となる状態(細胞、カルス、植物体)により異なるが、当業者であれば適宜調整することができる。

[0038] 又、細胞融合、葯培養(半数体育成)、遠縁交雑(半数体育成)等の手法も公知である。

一般に、植物細胞は、培養の間に変異を伴うことがあるため、より安定し

た形質維持のために植物個体に戻すことが好ましい。

非遺伝子組換ステビア植物体を宿主として事後的に遺伝子組換(例えばゲノム編集等により)を行って得られた植物体(例えば、本発明の植物体を宿主として遺伝子組換を行って、さらに別の形質を付加した植物体)も、本発明の範囲から除外されるものではない。

[0039] 本発明の植物体は、上記の化学的特徴(a)～(r)の少なくとも1つを有し得る。ここで、「本発明の遺伝的特徴を有しないステビア植物体」は、例えば、本発明の遺伝的特徴(1)～(3)の少なくとも1つを有するステビア植物体に対しては、本発明の遺伝的特徴(1)～(3)のいずれをも有しないステビア植物体、遺伝的特徴(1)を有するステビア植物体に対しては、遺伝的特徴(1)を有するステビア植物体以外のステビア植物体、すなわち、遺伝的特徴(1)を有しないステビア植物体を意味し、遺伝的特徴(1)及び(2)を有するステビア植物体に対しては、遺伝的特徴(1)及び(2)を有するステビア植物体以外のステビア植物体、すなわち、(i)遺伝的特徴(1)及び(2)のいずれをも有しないステビア植物体、(ii)遺伝的特徴(1)を有するが、遺伝的特徴(2)は有しないステビア植物体、及び(iii)遺伝的特徴(2)を有するが、遺伝的特徴(1)は有しないステビア植物体を意味する。

[0040] あるステビオール配糖体に対する別のステビオール配糖体の含有比は、前者のステビオール配糖体(例えば、RebD)の含有量に対する後者のステビオール配糖体(例えば、RebM)の含有量の比(例えば、RebMの含有量/RebDの含有量)を意味する。含有量は、例えば、単位質量のステビア乾燥葉に含まれる対象配糖体の質量又はステビア乾燥葉中の対象配糖体の濃度であってもよい。乾燥葉とは、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。

[0041] 化学的特徴(a)に関し、一部の態様において、本発明の植物体におけるRebDに対するRebMの含有比は、本発明の遺伝的特徴を有しないステビア植物体に

おける前記比の、約1.2倍以上、約1.6倍以上、約2倍以上、約2.4倍以上、約2.8倍以上、約3.2倍以上、約3.6倍以上、約4倍以上、約4.4倍以上、約4.8倍以上、約5.2倍以上、約5.6倍以上、約6倍以上、約6.4倍以上、約6.8倍以上、約7.2倍以上、約7.6倍以上、約8倍以上、約8.4倍以上、約8.8倍以上、約9.2倍以上、約9.6倍以上、約10倍以上、約10.5倍以上、約11倍以上、約11.5倍以上又は約12倍以上である。

[0042] 化学的特徴(b)に関し、一部の態様において、本発明の植物体におけるRebEに対するRebBの含有比は、本発明の遺伝的特徴を有しないステビア植物体における前記比の、約1.5倍以上、約2倍以上、約2.5倍以上、約3倍以上、約3.5倍以上、約4倍以上、約4.5倍以上、約5倍以上、約10倍以上、約15倍以上、約20倍以上、約30倍以上、約40倍以上、約50倍以上、約60倍以上、約70倍以上、約80倍以上、約90倍以上、約100倍以上、約150倍以上、約200倍以上、約250倍以上、約300倍以上、約400倍以上、約500倍以上、約600倍以上又は約700倍以上である。

[0043] 化学的特徴(c)に関し、一部の態様において、本発明の植物体におけるRebEに対するRebGの含有比は、本発明の遺伝的特徴を有しないステビア植物体における前記比の、約2倍以上、約2.5倍以上、約3倍以上、約3.5倍以上、約4倍以上、約4.5倍以上、約5倍以上、約10倍以上、約15倍以上、約20倍以上、約25倍以上、約30倍以上、約40倍以上、約50倍以上、約60倍以上、約70倍以上、約80倍以上、約90倍以上、約100倍以上、約150倍以上、約200倍以上、約250倍以上、約300倍以上、約400倍以上、約500倍以上、約600倍以上又は約700倍以上である。

[0044] 化学的特徴(d)に関し、一部の態様において、本発明の植物体におけるステビオシドに対するRebGの含有比は、本発明の遺伝的特徴を有しないステビア植物体における前記比の、約1.5倍以上、約2倍以上、約2.5倍以上、約3倍以上、約3.5倍以上、約4倍以上、約4.5倍以上、約5倍以上、約10倍以上、約15倍以上、約20倍以上、約30倍以上、約40倍以上、約50倍以上、約60倍以上、約70倍以上、約80倍以上、約90倍以上、約100倍以上、約150倍以上、約200倍

以上、約250倍以上、約300倍以上、約400倍以上、約500倍以上、約600倍以上又は約700倍以上である。

[0045] 化学的特徴(e)に関し、一部の態様において、本発明の植物体におけるRebAの含有量は、本発明の遺伝的特徴を有しないステビア植物体におけるRebAの含有量の、約1.05倍以上、約1.1倍以上、約1.15倍以上、約1.2倍以上、約1.25倍以上、約1.3倍以上、約1.35倍以上、約1.5倍以上、約1.65倍以上、約1.8倍以上、約1.95倍以上、約2.1倍以上、約2.25倍以上、約2.4倍以上、約2.55倍以上、約2.7倍以上、約2.85倍以上、約3倍以上、約3.15倍以上、約3.3倍以上、約3.5倍以上、約3.7倍以上、約3.9倍以上、約4.1倍以上、約4.3倍以上、約4.5倍以上又は約4.7倍以上である。

[0046] 化学的特徴(f)に関し、一部の態様において、本発明の植物体におけるRebBの含有量は、本発明の遺伝的特徴を有しないステビア植物体におけるRebBの含有量の、約1.05倍以上、約1.15倍以上、約1.25倍以上、約1.35倍以上、約1.5倍以上、約1.65倍以上、約1.8倍以上、約2倍以上、約2.25倍以上、約2.5倍以上、約3倍以上、約3.5倍以上、約4倍以上、約4.5倍以上、約5倍以上、約5.5倍以上、約6倍以上、約7倍以上、約8倍以上、約9倍以上、約10倍以上、約11倍以上、約12倍以上、約13倍以上、約14倍以上、約15倍以上又は約16倍以上である。

[0047] 化学的特徴(g)に関し、一部の態様において、本発明の植物体におけるRebFの含有量は、本発明の遺伝的特徴を有しないステビア植物体におけるRebFの含有量の、約1.02倍以上、約1.03倍以上、約1.04倍以上、約1.05倍以上、約1.1倍以上、約1.15倍以上、約1.2倍以上、約1.25倍以上、約1.3倍以上、約1.35倍以上、約1.4倍以上、約1.45倍以上、約1.5倍以上、約1.6倍以上、約1.8倍以上、約2倍以上、約2.2倍以上、約2.4倍以上、約2.6倍以上、約2.8倍以上、約3倍以上、約3.2倍以上、約3.4倍以上、約3.6倍以上、約3.8倍以上、約4倍以上又は約4.2倍以上である。

[0048] 化学的特徴(h)に関し、一部の態様において、本発明の植物体におけるRebGの含有量は、本発明の遺伝的特徴を有しないステビア植物体におけるRebGの

含有量の、約1.2倍以上、約1.3倍以上、約1.4倍以上、約1.5倍以上、約2倍以上、約2.5倍以上、約3倍以上、約3.5倍以上、約4倍以上、約4.5倍以上、約5倍以上、約6倍以上、約7倍以上、約8倍以上、約9倍以上、約10倍以上、約12.5倍以上、約15倍以上、約17.5倍以上、約20倍以上、約22.5倍以上、約25倍以上、約30倍以上、約35倍以上、約40倍以上、約45倍以上又は約50倍以上である。

[0049] 化学的特徴(i)に関し、一部の態様において、本発明の植物体におけるRebMの含有量は、本発明の遺伝的特徴を有しないステビア植物体におけるRebMの含有量の、約1.05倍以上、約1.1倍以上、約1.15倍以上、約1.2倍以上、約1.3倍以上、約1.4倍以上、約1.5倍以上、約1.7倍以上、約2倍以上、約2.5倍以上、約3倍以上、約3.5倍以上、約4倍以上、約4.5倍以上、約5倍以上、約6倍以上、約7倍以上、約8倍以上、約9倍以上、約10倍以上、約12倍以上、約14倍以上、約16倍以上、約18倍以上、約20倍以上、約22倍以上又は約24倍以上である。

[0050] 化学的特徴(j)に関し、一部の態様において、本発明の植物体におけるβ-1,3-グルコシド結合を有するステビオール配糖体の含有量は、本発明の遺伝的特徴を有しないステビア植物体におけるβ-1,3-グルコシド結合を有するステビオール配糖体の含有量の、約1.02倍以上、約1.03倍以上、約1.04倍以上、約1.05倍以上、約1.1倍以上、約1.15倍以上、約1.2倍以上、約1.3倍以上、約1.4倍以上、約1.5倍以上、約2倍以上、約2.5倍以上、約3倍以上、約3.5倍以上、約4倍以上、約4.5倍以上、約5倍以上、約6倍以上、約7倍以上、約8倍以上、約9倍以上、約10倍以上、約12.5倍以上、約15倍以上、約17.5倍以上、約20倍以上、約22.5倍以上、約25倍以上、約30倍以上、約35倍以上、約40倍以上、約45倍以上、約50倍以上である。

[0051] 化学的特徴(k)に関し、一部の態様において、本発明の植物体におけるRebDの含有量は、本発明の遺伝的特徴を有しないステビア植物体におけるRebDの含有量の、約0.8倍以下、約0.76倍以下、約0.72倍以下、約0.68倍以下、約0.64倍以下、約0.6倍以下、約0.56倍以下、約0.52倍以下、約0.5倍以下、約0.4

8倍以下、約0.46倍以下、約0.44倍以下、約0.42倍以下、約0.4倍以下、約0.38倍以下、約0.36倍以下、約0.34倍以下、約0.32倍以下、約0.3倍以下、約0.28倍以下、約0.26倍以下、約0.24倍以下、約0.22倍以下、約0.2倍以下、約0.18倍以下、約0.16倍以下又は約0.14倍以下である。

[0052] 化学的特徴(l)に関し、一部の態様において、本発明の植物体におけるRebEの含有量は、本発明の遺伝的特徴を有しないステビア植物体におけるRebEの含有量の、約0.6倍以下、約0.56倍以下、約0.52倍以下、約0.48倍以下、約0.44倍以下、約0.4倍以下、約0.38倍以下、約0.36倍以下、約0.34倍以下、約0.32倍以下、約0.3倍以下、約0.28倍以下、約0.26倍以下、約0.24倍以下、約0.22倍以下、約0.2倍以下、約0.18倍以下、約0.16倍以下、約0.14倍以下、約0.12倍以下、約0.1倍以下、約0.08倍以下、約0.06倍以下、約0.04倍以下、約0.03倍以下、約0.02倍以下又は約0.01倍以下である。

[0053] 化学的特徴(m)に関し、一部の態様において、本発明の植物体におけるRebNの含有量は、本発明の遺伝的特徴を有しないステビア植物体におけるRebNの含有量の、約0.9倍以下、約0.86倍以下、約0.82倍以下、約0.78倍以下、約0.74倍以下、約0.7倍以下、約0.66倍以下、約0.62倍以下、約0.58倍以下、約0.54倍以下、約0.5倍以下、約0.48倍以下、約0.46倍以下、約0.44倍以下、約0.42倍以下、約0.4倍以下、約0.38倍以下、約0.36倍以下、約0.34倍以下、約0.32倍以下、約0.3倍以下、約0.28倍以下、約0.26倍以下、約0.24倍以下、約0.22倍以下、約0.2倍以下又は約0.18倍以下である。

[0054] 化学的特徴(n)に関し、一部の態様において、本発明の植物体におけるステビオシドの含有量は、本発明の遺伝的特徴を有しないステビア植物体におけるステビオシドの含有量の、約0.8倍以下、約0.75倍以下、約0.7倍以下、約0.65倍以下、約0.6倍以下、約0.55倍以下、約0.5倍以下、約0.45倍以下、約0.4倍以下、約0.35倍以下、約0.3倍以下、約0.28倍以下、約0.26倍以下、約0.24倍以下、約0.22倍以下、約0.2倍以下、約0.18倍以下、約0.16倍以下、約0.14倍以下、約0.12倍以下、約0.1倍以下、約0.08倍以下、約0.06倍以下、約0.05倍以下、約0.04倍以下、約0.03倍以下又は約0.02倍以下である。

[0055] 化学的特徴(o)に関し、一部の態様において、本発明の植物体におけるβ-1,3-グルコシド結合を有しないステビオール配糖体の含有量は、本発明の遺伝的特徴を有しないステビア植物体におけるβ-1,3-グルコシド結合を有しないステビオール配糖体の含有量の、約0.9倍以下、約0.86倍以下、約0.82倍以下、約0.78倍以下、約0.74倍以下、約0.7倍以下、約0.66倍以下、約0.62倍以下、約0.6倍以下、約0.56倍以下、約0.52倍以下、約0.48倍以下、約0.44倍以下、約0.4倍以下、約0.38倍以下、約0.36倍以下、約0.34倍以下、約0.32倍以下、約0.3倍以下、約0.28倍以下、約0.26倍以下、約0.24倍以下、約0.22倍以下、約0.2倍以下、約0.18倍以下、約0.16倍以下、約0.14倍以下、約0.12倍以下、約0.1倍以下、約0.08倍以下、約0.06倍以下、約0.04倍以下、約0.03倍以下、約0.02倍以下、約0.01倍以下である。

[0056] 化学的特徴(p)に関し、一部の態様において、本発明の植物体におけるRebD、RebE、RebN、ステビオシドのいずれか1つに対する、RebA、RebB、RebF、RebG、RebMのいずれか1つの含有比は、本発明の遺伝的特徴を有しないステビア植物体における前記比の、約1.2倍以上、約1.5倍以上、約2倍以上、約2.5倍以上、約3倍以上、約3.5倍以上、約4倍以上、約4.5倍以上、約5倍以上、約10倍以上、約15倍以上、約20倍以上、約30倍以上、約40倍以上、約50倍以上、約60倍以上、約70倍以上、約80倍以上、約90倍以上、約100倍以上、約150倍以上、約200倍以上、約250倍以上、約300倍以上、約400倍以上、約500倍以上、約600倍以上又は約700倍以上である。

[0057] 化学的特徴(q)に関し、一部の態様において、本発明の植物体におけるβ-1,3-グルコシド結合を有しないステビオール配糖体に対するβ-1,3-グルコシド結合を有するステビオール配糖体の含有比は、本発明の遺伝的特徴を有しないステビア植物体における前記比の、約1.2倍以上、約1.5倍以上、約2倍以上、約2.5倍以上、約3倍以上、約3.5倍以上、約4倍以上、約4.5倍以上、約5倍以上、約10倍以上、約15倍以上、約20倍以上、約30倍以上、約40倍以上、約50倍以上、約60倍以上、約70倍以上、約80倍以上、約90倍以上、約100倍以上、約150倍以上、約200倍以上、約250倍以上、約300倍以上、約400倍以上、

約500倍以上、約600倍以上又は約700倍以上である。

[0058] 化学的特徴(r)に関し、一部の態様において、本発明の植物体におけるUGT76G1の基質ステビオール配糖体に対する、前記基質ステビオール配糖体からUGT76G1により生成されるステビオール配糖体の含有比は、本発明の遺伝的特徴を有しないステビア植物体における前記比の、約1.2倍以上、約1.5倍以上、約2倍以上、約3倍以上、約4倍以上、約5倍以上、約6倍以上、約8倍以上、約10倍以上、約15倍以上、約20倍以上、約25倍以上、約30倍以上、約35倍以上、約40倍以上、約45倍以上、約50倍以上、約55倍以上、約60倍以上、約65倍以上、約70倍以上、約75倍以上、約80倍以上、約85倍以上、約90倍以上、約95倍以上又は約100倍以上である。

[0059] 化学的特徴(a)に関し、一部の態様において、本発明の植物体におけるRebDに対するRebMの含有比は、約0.12以上、約0.16以上、約0.2以上、約0.24以上、約0.28以上、約0.32以上、約0.36以上、約0.4以上、約0.44以上、約0.48以上、約0.5以上、約0.525以上、約0.55以上、約0.575以上、約0.6以上、約0.625以上、約0.65以上、約0.675以上、約0.7以上、約0.725以上、約0.75以上、約0.775以上、約0.8以上、約0.825以上、約0.85以上、約0.875以上、約0.9以上、約0.925以上、約0.95以上、約0.975以上又は約1以上である。

[0060] 化学的特徴(b)に関し、一部の態様において、本発明の植物体におけるRebEに対するRebBの含有比は、約0.17以上、約0.5以上、約1以上、約1.5以上、約2以上、約2.5以上、約3以上、約3.5以上、約4以上、約4.5以上、約5以上、約5.5以上、約6以上、約6.5以上、約7以上、約7.5以上、約8以上、約8.5以上、約9以上、約9.5以上、約10.1以上、約10.5以上、約11以上、約11.5以上、約12以上、約12.5以上、約13以上、約13.5以上、約14以上、約14.5以上又は約15以上である。

[0061] 化学的特徴(c)に関し、一部の態様において、本発明の植物体におけるRebEに対するRebGの含有比は、約0.004以上、約0.05以上、約0.1以上、約0.2以上、約0.3以上、約0.4以上、約0.5以上、約0.6以上、約0.7以上、約0.8以上、約0.9以上、約1.01以上、約1.02以上、約1.03以上、約1.04以上、約1.05以上

、約1.07以上、約1.1以上、約1.12以上、約1.13以上、約1.17以上、約1.2以上、約1.25以上、約1.3以上、約1.35以上、約1.37以上、約1.38以上、約1.4以上、約1.5以上、約1.6以上、約1.7以上、約1.72以上、約1.75以上、約1.8以上、約1.85以上、約1.9以上、約1.95以上又は約2以上である。

[0062] 化学的特徴(d)に関し、一部の態様において、本発明の植物体におけるステビオシドに対するRebGの含有比は、約0.0007以上、約0.004以上、約0.006以上、約0.008以上、約0.01以上、約0.012以上、約0.014以上、約0.016以上、約0.018以上、約0.02以上、約0.025以上、約0.03以上、約0.035以上、約0.04以上、約0.045以上、約0.05以上、約0.055以上、約0.06以上、約0.065以上、約0.07以上、約0.075以上、約0.08以上、約0.085以上、約0.09以上、約0.091以上、約0.092以上、約0.093以上、約0.094以上、約0.095以上、約0.096以上、約0.097以上、約0.098以上、約0.099以上又は約0.1以上である。

[0063] 化学的特徴(e)に関し、一部の態様において、本発明の植物体におけるRebAの含有量は、乾燥葉中の濃度として、約2重量%以上、約2.15重量%以上、約2.3重量%以上、約2.45重量%以上、約2.6重量%以上、約2.75重量%以上、約2.9重量%以上、約3.05重量%以上、約3.2重量%以上、約3.35重量%以上、約3.5重量%以上、約3.65重量%以上、約3.8重量%以上、約4重量%以上、約4.2重量%以上、約4.4重量%以上、約4.6重量%以上、約4.8重量%以上、約5重量%以上、約5.25重量%以上、約5.5重量%以上、約5.75重量%以上、約6重量%以上、約6.25重量%以上、約6.5重量%以上、約6.75重量%以上、約7重量%以上である。

[0064] 化学的特徴(f)に関し、一部の態様において、本発明の植物体におけるRebBの含有量は、乾燥葉中の濃度として、約0.04重量%以上、約0.044重量%以上、約0.048重量%以上、約0.052重量%以上、約0.056重量%以上、約0.06重量%以上、約0.064重量%以上、約0.068重量%以上、約0.072重量%以上、約0.076重量%以上、約0.08重量%以上、約0.084重量%以上、約0.088重量%以上、約0.092重量%以上、約0.096重量%以上、約0.1重量%以上、約0.105重量%以上、約0.11重量%以上、約0.115重量%以上、約0.12重量%以上、約0.12

5重量%以上、約0.13重量%以上、約0.135重量%以上、約0.14重量%以上、約0.145重量%以上、約0.15重量%以上又は約0.16重量%以上である。

[0065] 化学的特徴(g)に関し、一部の態様において、本発明の植物体におけるRebFの含有量は、乾燥葉中の濃度として、約0.06重量%以上、約0.064重量%以上、約0.068重量%以上、約0.072重量%以上、約0.076重量%以上、約0.08重量%以上、約0.084重量%以上、約0.088重量%以上、約0.092重量%以上、約0.096重量%以上、約0.1重量%以上、約0.105重量%以上、約0.11重量%以上、約0.115重量%以上、約0.12重量%以上、約0.125重量%以上、約0.13重量%以上、約0.135重量%以上、約0.14重量%以上、約0.145重量%以上、約0.15重量%以上、約0.155重量%以上、約0.16重量%以上、約0.17重量%以上、約0.18重量%以上、約0.19重量%以上又は約0.2重量%以上である。

[0066] 化学的特徴(h)に関し、一部の態様において、本発明の植物体におけるRebGの含有量は、乾燥葉中の濃度として、約0.001重量%以上、約0.002重量%以上、約0.003重量%以上、約0.004重量%以上、約0.005重量%以上、約0.006重量%以上、約0.007重量%以上、約0.008重量%以上、約0.009重量%以上、約0.01重量%以上、約0.011重量%以上、約0.012重量%以上、約0.013重量%以上、約0.014重量%以上、約0.016重量%以上、約0.018重量%以上、約0.02重量%以上、約0.022重量%以上、約0.024重量%以上、約0.026重量%以上、約0.028重量%以上、約0.03重量%以上、約0.032重量%以上、約0.034重量%以上、約0.036重量%以上、約0.038重量%以上又は約0.04重量%以上である。

[0067] 化学的特徴(i)に関し、一部の態様において、本発明の植物体におけるRebMの含有量は、乾燥葉中の濃度として、約0.15重量%以上、約0.17重量%以上、約0.19重量%以上、約0.21重量%以上、約0.23重量%以上、約0.25重量%以上、約0.27重量%以上、約0.29重量%以上、約0.31重量%以上、約0.33重量%以上、約0.35重量%以上、約0.37重量%以上、約0.39重量%以上、約0.41重量%以上、約0.43重量%以上、約0.45重量%以上、約0.47重量%以上、約0.49重量%以上、約0.51重量%以上、約0.54重量%以上、約0.57重量%以上

、約0.6重量％以上、約0.63重量％以上、約0.66重量％以上、約0.69重量％以上、約0.72重量％以上又は約0.75重量％以上である。

[0068] 化学的特徴(j)に関し、一部の態様において、本発明の植物体におけるβ-1,3-グルコシド結合を有するステビオール配糖体の含有量は、乾燥葉中の濃度として、約0.001重量％以上、約0.002重量％以上、約0.005重量％以上、約0.01重量％以上、約0.02重量％以上、約0.04重量％以上、約0.06重量％以上、約0.08重量％以上、約0.1重量％以上、約0.15重量％以上、約0.2重量％以上、約0.3重量％以上、約0.4重量％以上、約0.5重量％以上、約0.6重量％以上、約0.7重量％以上、約0.8重量％以上、約1重量％以上、約1.5重量％以上、約2重量％以上、約2.5重量％以上、約3重量％以上、約3.5重量％以上、約4重量％以上、約5重量％以上、約6重量％以上又は約7重量％以上である。

[0069] 化学的特徴(k)に関し、一部の態様において、本発明の植物体におけるRebDの含有量は、乾燥葉中の濃度として、約1.65重量％以下、約1.6重量％以下、約1.55重量％以下、約1.5重量％以下、約1.45重量％以下、約1.4重量％以下、約1.35重量％以下、約1.3重量％以下、約1.25重量％以下、約1.2重量％以下、約1.15重量％以下、約1.1重量％以下、約1.05重量％以下、約1重量％以下、約0.95重量％以下、約0.9重量％以下、約0.85重量％以下、約0.8重量％以下、約0.75重量％以下、約0.7重量％以下、約0.65重量％以下、約0.6重量％以下、約0.55重量％以下、約0.5重量％以下、約0.45重量％以下、約0.4重量％以下又は約0.35重量％以下である。

[0070] 化学的特徴(l)に関し、一部の態様において、本発明の植物体におけるRebEの含有量は、乾燥葉中の濃度として、約0.34重量％以下、約0.32重量％以下、約0.3重量％以下、約0.28重量％以下、約0.26重量％以下、約0.24重量％以下、約0.22重量％以下、約0.2重量％以下、約0.18重量％以下、約0.16重量％以下、約0.14重量％以下、約0.12重量％以下、約0.1重量％以下、約0.08重量％以下、約0.06重量％以下、約0.05重量％以下、約0.04重量％以下、約0.03重量％以下、約0.02重量％以下、約0.015重量％以下、約0.01重量％以下、約0.009重量％以下、約0.008重量％以下、約0.007重量％以下、約0.006重量％

以下、約0.005重量％以下又は約0.004重量％以下である。

[0071] 化学的特徴(m)に関し、一部の態様において、本発明の植物体におけるRebNの含有量は、乾燥葉中の濃度として、約0.35重量％以下、約0.33重量％以下、約0.31重量％以下、約0.29重量％以下、約0.27重量％以下、約0.25重量％以下、約0.24重量％以下、約0.23重量％以下、約0.22重量％以下、約0.21重量％以下、約0.2重量％以下、約0.19重量％以下、約0.18重量％以下、約0.17重量％以下、約0.16重量％以下、約0.15重量％以下、約0.14重量％以下、約0.13重量％以下、約0.12重量％以下、約0.11重量％以下、約0.1重量％以下、約0.09重量％以下、約0.08重量％以下、約0.07重量％以下、約0.06重量％以下、約0.055重量％以下又は約0.05重量％以下である。

[0072] 化学的特徴(n)に関し、一部の態様において、本発明の植物体におけるステビオシドの含有量は、乾燥葉中の濃度として、約2.5重量％以下、約2.4重量％以下、約2.3重量％以下、約2.2重量％以下、約2.1重量％以下、約2重量％以下、約1.9重量％以下、約1.8重量％以下、約1.7重量％以下、約1.6重量％以下、約1.5重量％以下、約1.4重量％以下、約1.3重量％以下、約1.2重量％以下、約1.1重量％以下、約1重量％以下、約0.9重量％以下、約0.8重量％以下、約0.7重量％以下、約0.6重量％以下、約0.5重量％以下、約0.45重量％以下、約0.4重量％以下、約0.35重量％以下、約0.3重量％以下、約0.25重量％以下又は約0.2重量％以下である。

[0073] 化学的特徴(o)に関し、一部の態様において、本発明の植物体におけるβ-1,3-グルコシド結合を有しないステビオール配糖体の含有量は、乾燥葉中の濃度として、約2.5重量％以下、約2.2重量％以下、約2重量％以下、約1.8重量％以下、約1.6重量％以下、約1.4重量％以下、約1.2重量％以下、約1重量％以下、約0.9重量％以下、約0.8重量％以下、約0.7重量％以下、約0.6重量％以下、約0.5重量％以下、約0.4重量％以下、約0.3重量％以下、約0.2重量％以下、約0.1重量％以下、約0.08重量％以下、約0.06重量％以下、約0.04重量％以下、約0.02重量％以下、約0.015重量％以下、約0.01重量％以下、約0.008重量％以下、約0.006重量％以下、約0.005重量％以下、約0.004重量％以下

である。

[0074] 化学的特徴(p)に関し、一部の態様において、本発明の植物体におけるRebD、RebE、RebN、ステビオシドのいずれか1つに対する、RebA、RebB、RebF、RebG、RebMのいずれか1つの含有比は、約0.0007以上、約0.004以上、約0.01以上、約0.02以上、約0.03以上、約0.05以上、約0.08以上、約0.091以上、約0.095以上、約0.1以上、約0.2以上、約0.3以上、約0.5以上、約0.8以上、約1以上、約1.05以上、約1.07以上、約1.1以上、約1.2以上、約1.5以上、約2以上、約3以上、約4以上、約5以上、約8以上、約10以上、約10.5以上、約11以上、約11.5以上、約12以上、約12.5以上、約13以上、約13.5以上、約14以上、約14.5以上又は約15以上である。

[0075] 化学的特徴(q)に関し、一部の態様において、本発明の植物体におけるβ-1,3-グルコシド結合を有しないステビオール配糖体に対するβ-1,3-グルコシド結合を有するステビオール配糖体の含有比は、約0.0007以上、約0.004以上、約0.01以上、約0.02以上、約0.03以上、約0.05以上、約0.08以上、約0.091以上、約0.095以上、約0.1以上、約0.2以上、約0.3以上、約0.5以上、約0.8以上、約1以上、約1.05以上、約1.07以上、約1.1以上、約1.2以上、約1.5以上、約2以上、約3以上、約4以上、約5以上、約8以上、約10以上、約10.5以上、約11以上、約11.5以上、約12以上、約12.5以上、約13以上、約13.5以上、約14以上、約14.5以上又は約15以上である。

[0076] 化学的特徴(r)に関し、一部の態様において、本発明の植物体におけるUGT76G1の基質ステビオール配糖体に対する、前記基質ステビオール配糖体からUGT76G1により生成されるステビオール配糖体の含有比は、約0.15以上、約0.3以上、約0.5以上、約0.7以上、約0.9以上、約1以上、約1.5以上、約2以上、約3以上、約5以上、約7以上、約10以上、約15以上、約16以上、約17以上、約20以上、約25以上、約30以上、約35以上、約40以上、約45以上、約50以上、約51以上、約55以上、約60以上、約65以上、約66以上、約70以上、約75以上又は約80以上である。

[0077] 一部の態様において、β-1,3-グルコシド結合を有するステビオール配糖体

は、RebD及びRebNを含まない。一部の態様において、β-1,3-グルコシド結合を有するステビオール配糖体は、β-1,3-グルコシド結合を2個有する。別の態様において、β-1,3-グルコシド結合を有するステビオール配糖体は、β-1,3-グルコシド結合を1個有する。好ましい態様において、β-1,3-グルコシド結合を有するステビオール配糖体は、RebA、RebB、RebF、RebH、RebG、RebI、RebJ、RebM、RebO、RebQ及びズルコシドBからなる群から選択される。特定の態様において、β-1,3-グルコシド結合を有するステビオール配糖体は、RebA、RebB、RebF、RebG及びRebMからなる群から選択される。

[0078] 一部の態様において、β-1,3-グルコシド結合を有しないステビオール配糖体は、ステビオールモノシド、ステビオールビオシド、ルブソシド、ステビオシド、RebE及びズルコシドAからなる群から選択される。特定の態様において、β-1,3-グルコシド結合を有しないステビオール配糖体は、ステビオシド及びRebEからなる群から選択される。

[0079] 一部の態様において、UGT76G1の基質ステビオール配糖体は、ステビオールモノシド、ルブソシド、ステビオールビオシド、ステビオシド、RebA、RebD、RebE及びRebGから選択される。この態様において、「基質ステビオール配糖体からUGT76G1により生成されるステビオール配糖体」は、ステビオールモノシドに対してはステビオール-1,3-ビオシド、ルブソシドに対してはRebG、ステビオールビオシドに対してはRebB、ステビオシドに対してはRebA、RebAに対してはRebI、RebDに対してはRebM、RebEに対してはRebD、RebGに対してはRebQである。

[0080] ステビオール配糖体は、本発明の植物体の新鮮葉又は乾燥葉に適切な溶媒(水等の水性溶媒又はアルコール、エーテル及びアセトン等の有機溶媒)を反応させることにより抽出液の状態で抽出することができる。抽出条件等はOhta et al., J. Appl. Glycosci., Vol. 57, No. 3, 199-209 (2010)又はWO2010/038911に記載の方法や、後述の実施例に記載の方法を参照することができる。

さらに、このようにして得られた抽出液に対し、酢酸エチルその他の有機

溶媒：水の勾配、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)、ガスクロマトグラフィー、飛行時間型質量分析(TOF-MS)、超高速液体クロマトグラフィー(UPLC)等の公知の方法を用いることにより個々のステビオール配糖体、例えば、β-1,3-グルコシド結合を有するステビオール配糖体、RebA、RebB、RebF、RebG、RebM等を精製することができる。

[0081] ステビオール配糖体の含量は、上記Ohta et al.又はWO2010/038911に記載の方法や、後述の実施例に記載の方法で測定することができる。具体的には、例えば、本発明のステビア植物体から新鮮葉をサンプリングし、LC－MS/MSを行うことなどにより測定することができる。

[0082] 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、種子等)、植物組織(例えば表皮、師部、柔組織、木部、維管束、柵状組織、海綿状組織等)或いは種々の形態の植物細胞(例えば、懸濁培養細胞)、プロトプラスト、葉の切片、カルス等が含まれ得る。また、葉は先に述べた乾燥葉であってもよい。

[0083] また、本発明の植物体には、組織培養物又は植物培養細胞も含まれ得る。このような組織培養物又は植物培養細胞を培養することにより、植物体を再生することができるからである。本発明の植物体の再生可能な形態の例としては、胚、分裂組織細胞、花粉、葉、根、根端、花弁、プロトプラスト、葉の切片及びカルス等が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

[0084] 2. 本発明の植物体の作出方法

本発明は、別の実施態様において、本発明のステビア植物体と第2のステビア植物体とを交雑させる工程を含む、化学的特徴(a)～(r)の少なくとも1つを有するステビア植物体を作出する方法(以下、「本発明の作出方法」と称する場合がある)を提供する。

当該方法により作出されるステビア植物体は、本発明の植物体と同じ表現型と遺伝的特徴を有し得る。本発明の作出方法によって得られる植物体における個々の化学的特徴の詳細は、本発明の植物体について上記したとおりである。

[0085] 本発明の作出方法において、「交雑させる」とは、本発明の植物体(第一代(S1))と、第2の植物体(S1)とを交配させることにより、その子植物体(本発明の作出方法により作出される植物体(第二代(S2))を得ることを意味する。交雑方法としては、戻し交雑が好ましい。「戻し交雑」とは、本発明の植物体と第2の植物体との間に生まれた子植物体(S2)を、さらに本発明の植物体(つまり、本発明の遺伝的特徴を有する植物体)(S1)と交雑させて、本発明の遺伝的特徴を有する植物体を作出する手法である。本発明の作出方法に用いられる第2の植物体(S1)が、本発明の植物体と同じ表現型と遺伝的特徴を有する場合には、実質的に戻し交雑となる。

或いは、本発明の植物体は自殖により作出することもできる。自殖は、本発明の植物体のおしべの花粉を本発明の植物体のめしべに自家受粉させることにより行うことができる。

[0086] 本発明の作出方法により作出される植物体の表現型及び遺伝的特徴が本発明の植物体と同じである場合、本発明の作出方法により作出される植物体をさらに第3のステビア植物体と交雑させることにより、本発明の植物体と同等の表現型を有するステビア植物体を作出することも可能である。

[0087] 別の態様として、本発明の植物体は、先に述べた組織培養物又は植物培養細胞を培養することにより植物体を再生することで作出することも可能である。培養条件については、野生型ステビア植物の組織培養物又は植物培養細胞を培養する条件と同じであり、公知である(Protocols for In Vitro cultures and secondary metabolite analysis of aromatic and medicinal plants, Method in molecular biology, vol. 1391, pp113-123)。

[0088] さらに別の態様として、本発明の植物体は、ステビア植物体のゲノムを改変し、本発明の遺伝的特徴を獲得させることで作出することも可能である。本発明の遺伝的特徴の獲得は、遺伝子組換的手法(例えばゲノム編集等)により行っても、上述のような非遺伝子組換的手法により行ってもよい。非遺伝子組換的手法は、本発明の植物体の項に記載した、変異誘発剤による処理や、放射線又は光線の照射による処理等の変異誘発処理を含む。具体的には、

例えば、配列番号1の184位に相当する位置の塩基がGではないアレル(例えば、前記位置の塩基がAであるアレル)を有する個体に対しては、前記位置の塩基のGへの置換、配列番号2の170位に相当する位置の塩基がCではないアレル(例えば、前記位置の塩基がTであるアレル)を有する個体に対しては、前記位置の塩基のCへの置換、配列番号3の92位に相当する位置の塩基がCではないアレル(例えば、前記位置の塩基がTであるアレル)を有する個体に対しては、前記位置の塩基のCへの置換により本発明の遺伝的特徴を獲得させることができる。

[0089] 3. 本発明の植物体のスクリーニング方法

本発明の植物体及び本発明の植物体と同じ表現型及び/又は遺伝的特徴を有する植物体は、当該植物体の組織から本発明の遺伝的特徴を検出することによりスクリーニングすることができる。ここで、「スクリーニング」とは、本発明の植物体とそれ以外の植物体とを識別し、本発明の植物体を選択することを意味する。

したがって、本発明は、別の側面において、被験植物のゲノムから遺伝的特徴(1)～(3)の少なくとも1つの存在及び/又は不在を検出する工程を含む、化学的特徴(a)～(r)の少なくとも1つを有するステビア植物体をスクリーニングする方法(以下、「本発明のスクリーニング方法」と称する場合がある)を提供する。

[0090] 一部の態様において、検出対象となる遺伝的特徴は遺伝的特徴(1)～(3)のいずれか1つである。一部の態様において、検出対象となる遺伝的特徴は遺伝的特徴(1)及び(2)である。一部の態様において、検出対象となる遺伝的特徴は遺伝的特徴(1)及び(3)である。一部の態様において、検出対象となる遺伝的特徴は遺伝的特徴(2)及び(3)である。一部の態様において、検出対象となる遺伝的特徴は遺伝的特徴(1)～(3)のすべてである。

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

[0091] 本発明の遺伝的特徴の存在は、例えば、

(I)配列番号1の184位に相当する位置の塩基がGであるアレル(例えば、配列番号10、11、12又は13の塩基配列を含むアレル)、

(II)配列番号2の170位に相当する位置の塩基がCであるアレル(例えば、配列番号14、15、16又は17の塩基配列を含むアレル)、及び

(III)配列番号3の92位に相当する位置の塩基がCであるアレル(例えば、配列番号18、19、20又は21の塩基配列を含むアレル)

からなる群から選択されるアレルの存在の検出、及び/又は、

(i)配列番号3の92位に相当する位置の塩基がTであるアレル(例えば、配列番号3、46、47又は48の塩基配列を含むアレル)の不在の検出

により決定することができる。

[0092] 本発明の遺伝的特徴の不在は、例えば、

(I)配列番号1の184位に相当する位置の塩基がGであるアレル(例えば、配列番号10、11、12又は13の塩基配列を含むアレル)、

(II)配列番号2の170位に相当する位置の塩基がCであるアレル(例えば、配列番号14、15、16又は17の塩基配列を含むアレル)、及び

(III)配列番号3の92位に相当する位置の塩基がCであるアレル(例えば、配列番号18、19、20又は21の塩基配列を含むアレル)からなる群から選択されるアレルの不在の検出、及び/又は、

(i)配列番号3の92位に相当する位置の塩基がTであるアレル(例えば、配列番号3、46、47又は48の塩基配列を含むアレル)の存在の検出

により決定することができる。

[0093] 本発明の遺伝的特徴の検出方法の具体例としては、PCR法、TaqMan PCR法、シーケンス法、マイクロアレイ法、インベーダー法、TILLING法、RAD法、RFLP法、PCR－SSCP法、AFLP法、SSLP法、CAPS法、dCAPS法、ASO法、ARMS法、DGGE法、CCM法、DOL法、MALDI－TOF/MS法、TDI法、パドロックプローブ法、分子ビーコン法、DASH法、UCAN法、ECA法、PINPOINT法、PROBE法、VSET法、Survivor assay、Sniper assay、Luminex assay、GOOD法、LCx法、SNaPshot法、Ma

ss ARRAY法、パイロシーケンス法、SNP－IT法、融解曲線分析法等が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

[0094] 一態様において、本発明の遺伝的特徴(1)は、例えば、以下のプライマーセットと制限酵素とを用いたdCAPS法により検出することができる。

・プライマーセット：

配列番号49又は50の1～211位に位置する任意の連続する15塩基以上の配列(例えば、配列番号22)を含むフォワードプライマーと、配列番号23の3’末端から15～36塩基長の連続する配列を含むリバースプライマーとを含む、プライマーセット。

・制限酵素：EcoRV。

[0095] 一態様において、本発明の遺伝的特徴(2)は、例えば、以下のプライマーセットと制限酵素とを用いたdCAPS法により検出することができる。

・プライマーセット：

配列番号51又は52の1～204位に位置する任意の連続する15塩基以上の配列(例えば、配列番号28)を含むフォワードプライマーと、配列番号29の3’末端から15～36塩基長の連続する配列を含むリバースプライマーとを含む、プライマーセット。

・制限酵素：PvuII。

[0096] 一態様において、本発明の遺伝的特徴(3)は、例えば、以下のプライマーセットと制限酵素とを用いたdCAPS法により検出することができる。

・プライマーセット：

配列番号53又は54の1～246位に位置する任意の連続する15塩基以上の配列(例えば、配列番号34)を含むフォワードプライマーと、配列番号35の3’末端から15～36塩基長の連続する配列を含むリバースプライマーとを含む、プライマーセット。

・制限酵素：PvuII。

[0097] プライマーの配列は、上記の条件を満たす範囲で最適化することができる。プライマー設計の最適化については、例えば、Sambrook and Russell, ”M

olecular Cloning: A Laboratory Manual" 3rd Edition (2001), Cold Spring Harbor Laboratory Press等を参照のこと。上記各プライマーは、15～50塩基長、18～48塩基長、20～45塩基長、30～40塩基長等であってよい。各プライマーセットに対応する制限酵素には、上記酵素と同じ配列を認識し、同じ個所を切断する他の酵素、又は上記酵素のアイソシゾマーも含まれる。また、本発明の遺伝的特徴に基づき、上記以外のプライマーセットを設計し、それに対応する制限酵素を選択することも可能である。

[0098] 特定の態様において、本発明の遺伝的特徴(1)～(3)は、例えば、以下の配列を有するプライマーセットと制限酵素とを用いたdCAPS法により検出することができる。

[表1]

表1 遺伝的特徴(1)～(3)を検出するためのプライマーセットと制限酵素との組合せの例

遺伝的特徴	フォワードプライマー	リバースプライマー	制限酵素
(1)	配列番号22	配列番号23	EcoRV
(2)	配列番号28	配列番号29	PvuII
(3)	配列番号34	配列番号35	PvuII

[0099] 本発明のスクリーニング方法は、本発明の遺伝的特徴が検出された被験ステビア植物の組織(例えば葉)のステビオール配糖体の含有量(例えば、RebA、RebB、RebD、RebE、RebF、RebG、RebM、RebN及び/又はステビオシドの含有量)を測定する工程をさらに含んでもよい。ステビオール配糖体含有量の測定は、１．ステビア植物体の項に記載したとおりである。又、この態様において、本発明の遺伝的特徴が検出された被験ステビア植物体のうち、化学的特徴(a)～(r)の少なくとも1つの程度が高い個体を選択して、これを他のステビア植物体と交配し、得られた子植物体について、本発明のスクリーニング方法を適用してもよい。したがって、本発明のスクリーニング方法は、以下の1以上の工程を含み得る。

(i)被験ステビア植物のゲノムから、本発明の遺伝的特徴を検出する工程、

(ii)本発明の遺伝的特徴が検出された被験ステビア植物組織のステビオール

配糖体の含有量を測定する工程、

(iii)本発明の遺伝的特徴が検出された被験ステビア植物体のうち、化学的特徴(a)～(r)の少なくとも1つの程度が高い個体を選択する工程、

(iv)選択した化学的特徴(a)～(r)の少なくとも1つの程度が高い個体を他のステビア植物体と交配する工程、

(v)交配により得られた子植物体のゲノムから、本発明の遺伝的特徴を検出する工程、

(vi)本発明の遺伝的特徴が検出された子植物組織のステビオール配糖体の含有量を測定する工程、

(vii)本発明の遺伝的特徴が検出された子植物体のうち、化学的特徴(a)～(r)の少なくとも1つの程度が高い個体を選択する工程。

化学的特徴の程度が高い個体とは、化学的特徴(a)～(d)、(p)及び(r)については対象となるステビオール配糖体の含有比が高い個体、化学的特徴(e)～(j)については対象となるステビオール配糖体の含有量が多い個体、化学的特徴(k)～(o)については対象となるステビオール配糖体の含有量が少ない個体をそれぞれ意味する。

[0100] 選択する化学的特徴の程度が高い個体は、例えば、本発明の遺伝的特徴が検出された被験ステビア植物体のうち、化学的特徴の程度の高さに関し上位50%まで、上位40%まで、上位30%まで、上位20%まで、上位10%まで、上位5%まで、上位4%まで、上位3%まで、上位2%まで又は上位1%までの個体等であってよい。又、交配する他のステビア植物体は、本発明の遺伝的特徴を含んでいても含んでいなくてもよい。上記態様において、工程(iv)～(vii)は、複数回繰り返すことができる。このようにして、化学的特徴の程度がより高いステビア植物体をスクリーニングすることができる。

[0101] 本発明のスクリーニング方法において、被験ステビア植物体は、天然植物体であっても、非遺伝子組換植物体であってもよい。非遺伝子組換植物体については、１．ステビア植物体の項に記載したとおりである。

本発明のスクリーニング方法において、被験ステビア植物体は、変異誘発

処理を行ったステビア植物及びその子孫植物を含んでもよい。変異誘発処理については、１．ステビア植物体の項に記載したとおりであり、変異誘発剤による処理や、放射線又は光線の照射による処理等を含む。

[0102] 又本発明は、上記に記載されたプライマーセット及びその組合せ、例えば、前記表1に記載のプライマーセット及びその組合せを提供する。本発明は、さらに、配列番号1～3、10、14及び18からなる群から選択される塩基配列を有する領域をPCRにより増幅し得るプライマーセット、例えば、配列番号4の塩基配列を含むフォワードプライマーと、配列番号5の塩基配列を含むリバースプライマーとのプライマーセット、配列番号6の塩基配列を含むフォワードプライマーと、配列番号7の塩基配列を含むリバースプライマーとのプライマーセット、配列番号8の塩基配列を含むフォワードプライマーと、配列番号9の塩基配列を含むリバースプライマーとのプライマーセット、及びこれらのプライマーセットの組合せを提供する。

[0103] さらに、本発明は、本発明の遺伝的特徴の存在及び/又は不在を検出し得るプローブ(以下、「本発明のプローブ」と称する場合がある)を提供する。本発明のプローブは、本発明の遺伝的特徴の存在及び/又は不在の各種検出方法(例えば、TaqMan PCR法等のリアルタイムPCR法)に適した構造を有し得る。例えば、本発明のプローブは、本発明の遺伝的特徴に係る部位を含むゲノムの部分に相補性を有する塩基配列を含み得る。かかるプローブの非限定例としては、配列番号11～13、15～17、19～21及び40～48から選択される塩基配列に相補的な配列を含むものが挙げられる。これらの配列のうち、配列番号11～13、15～17及び19～21は本発明の遺伝的特徴に係るアレルに特異的であり、配列番号40～48は、本発明の遺伝的特徴に係るアレルではないアレルに特異的である。

[0104] 又、配列番号11～13は本発明の遺伝的特徴(1)に係るアレルに特異的であり、配列番号15～17は本発明の遺伝的特徴(2)に係るアレルに特異的であり、配列番号19～21は本発明の遺伝的特徴(3)に係るアレルに特異的である。さらに、配列番号40～42は本発明の遺伝的特徴(1)に係るアレルではないアレルに特

異的であり、配列番号43～45は本発明の遺伝的特徴(2)に係るアレルではないアレルに特異的であり、配列番号46～48は本発明の遺伝的特徴(3)に係るアレルではないアレルに特異的である。

[0105] 本発明の遺伝的特徴の存在は、本発明の遺伝的特徴に係るアレルの検出により検出することができ、本発明の遺伝的特徴の不在は、本発明の遺伝的特徴に係るアレルの非検出により検出することができる。又、本発明の遺伝的特徴(3)の存在は、本発明の遺伝的特徴(3)に係るアレルではないアレルの非検出によっても検出することができ、本発明の遺伝的特徴(3)の不在は、本発明の遺伝的特徴(3)に係るアレルではないアレルの検出によっても検出することができる。

[0106] 本発明のプローブは、好ましくは標識を有する。かかる標識の非限定例としては、蛍光標識、発光標識、放射性標識、色素、酵素、クエンチャー、検出可能な標識との結合部分等が挙げられる。特定の態様において、本発明のプローブは、配列番号11～13、15～17、19～21及び40～48から選択される配列に相補的な塩基配列を含むポリヌクレオチドと、標識とを有する。

[0107] 本発明は又、上記のプライマーセットとこれに対応する制限酵素とを含むキットを提供する。特定の態様において、本発明のキットは前記表1に記載のフォワードプライマーとリバースプライマーとの組合せを含むプライマーセットと、これに対応する制限酵素とを含む。

本発明は又、配列番号1～3、10、14及び18からなる群から選択される塩基配列を有する領域をPCRにより増幅し得るプライマーセットと、それに対応する上記の本発明のプローブとを含むキットを提供する。

[0108] これらのプライマーセット、プローブ及びキットは、本発明の遺伝的特徴を検出するために用いること、本発明のスクリーニング方法に用いることなどが可能である。又、これらのプライマーセット及びキットには、本発明の遺伝的特徴の検出や、本発明のスクリーニング方法に関する説明を含む指示、例えば、使用説明書や、使用方法に関する情報を含むサイトの情報(例えば、URL、二次元コード)、使用方法に関する情報を記録した媒体(例えば、フレ

キシブルディスク、CD、DVD、ブルーレイディスク、メモリーカード、USBメモリー)等が含まれていてもよい。

[0109] 一部の態様において、本発明は、遺伝的特徴(1)～(3)の少なくとも1つの存在及び/又は不在を検出するための試薬を含む、化学的特徴(a)～(r)の少なくとも1つを有するステビア植物体のスクリーニングキットを提供する。試薬は、CAPS法、dCAPS法又はTaqMan PCR法に使用するプライマー及び/又はプローブを含み得る。特定の態様において、遺伝的特徴(1)～(3)の少なくとも1つの存在及び/又は不在を検出するための試薬は、上記の遺伝的特徴(1)～(3)の少なくとも1つをdCAPS法で検出するためのプライマーセットと制限酵素との組合せ、例えば前記表1に記載のプライマーセットと制限酵素との組合せ、又は、TaqMan PCR法等で使用することができる、遺伝的特徴(1)～(3)の少なくとも1つに係る部位(例えば、配列番号10～21から選択される配列を含む部位)を増幅するプライマーセットと、遺伝的特徴(1)～(3)の少なくとも1つに係る部位(例えば、配列番号11～13、15～17及び19～21から選択される配列を含む部位)に相補的な塩基配列を有するプローブとの組合せを含む。

[0110] 4. 植物体由来抽出物の製造方法及び当該抽出物を用いた製品

本発明のさらなる態様において、本発明の植物体、本発明のスクリーニング方法により選別されたステビア植物体若しくは本発明の作出方法により製造されたステビア植物体、又は当該植物体の種子、葉(例えば、乾燥葉又は新鮮葉)、組織、組織培養物若しくは細胞から抽出物を得る工程を含む、以下の化学的特徴(a')～(r')の少なくとも1つを有する抽出物の製造方法(以下、「本発明の抽出物の製造方法」と称する場合がある)が提供される。

(a')本発明の遺伝的特徴を有しないステビア植物体の抽出物に比べ、RebDに対するRebMの含有比が高い。

(b')本発明の遺伝的特徴を有しないステビア植物体の抽出物に比べ、RebEに対するRebBの含有比が高い。

(c')本発明の遺伝的特徴を有しないステビア植物体の抽出物に比べ、RebEに対するRebGの含有比が高い。

(d')本発明の遺伝的特徴を有しないステビア植物体の抽出物に比べ、ステビオシドに対するRebGの含有比が高い。

(e')本発明の遺伝的特徴を有しないステビア植物体の抽出物に比べ、RebAの含有量が多い。

(f')本発明の遺伝的特徴を有しないステビア植物体の抽出物に比べ、RebBの含有量が多い。

(g')本発明の遺伝的特徴を有しないステビア植物体の抽出物に比べ、RebFの含有量が多い。

(h')本発明の遺伝的特徴を有しないステビア植物体の抽出物に比べ、RebGの含有量が多い。

(i')本発明の遺伝的特徴を有しないステビア植物体の抽出物に比べ、RebMの含有量が多い。

(j')本発明の遺伝的特徴を有しないステビア植物体の抽出物に比べ、β-1,3-グルコシド結合を有するステビオール配糖体の含有量が多い。

(k')本発明の遺伝的特徴を有しないステビア植物体の抽出物に比べ、RebDの含有量が少ない。

(l')本発明の遺伝的特徴を有しないステビア植物体の抽出物に比べ、RebEの含有量が少ない。

(m')本発明の遺伝的特徴を有しないステビア植物体の抽出物に比べ、RebNの含有量が少ない。

(n')本発明の遺伝的特徴を有しないステビア植物体の抽出物に比べ、ステビオシドの含有量が少ない。

(o')本発明の遺伝的特徴を有しないステビア植物体の抽出物に比べ、β-1,3-グルコシド結合を有しないステビオール配糖体の含有量が少ない。

(p') 本発明の遺伝的特徴を有しないステビア植物体の抽出物に比べ、RebD、RebE、RebN、ステビオシドのいずれか1つに対する、RebA、RebB、RebF、RebG、RebMのいずれか1つの含有比が高い。

(q')本発明の遺伝的特徴を有しないステビア植物体の抽出物に比べ、β-1,3-

グルコシド結合を有しないステビオール配糖体に対するβ-1,3-グルコシド結合を有するステビオール配糖体の含有比が高い。

(r')本発明の遺伝的特徴を有しないステビア植物体の抽出物に比べ、UGT76G1の基質ステビオール配糖体に対する、前記基質ステビオール配糖体からUGT76G1により生成されるステビオール配糖体の含有比が高い。

[0111] さらに、本発明の植物体、本発明のスクリーニング方法により選別されたステビア植物体若しくは本発明の作出方法により製造されたステビア植物体、又は当該植物体の種子、葉(例えば、乾燥葉又は新鮮葉)、組織、組織培養物若しくは細胞からの化学的特徴(a')～(r')の少なくとも1つを有する抽出物(以下、「本発明の抽出物」と称する場合がある)が提供される。本発明の抽出物は、好適には、本発明の抽出物の製造方法により製造されたものである。本発明の抽出物は、未精製であっても(未精製抽出物又は粗抽出物)、精製されていてもよい(精製抽出物)。さらに又、本発明の抽出物からステビオール配糖体を精製する工程を含む、前記ステビオール配糖体の製造方法(以下、「本発明のステビオール配糖体の製造方法」と称する場合がある)が提供される。本発明のステビオール配糖体の製造方法は、本発明の植物体、本発明のスクリーニング方法により選別されたステビア植物体又は本発明の作出方法により製造されたステビア植物体から化学的特徴(a')～(r')の少なくとも1つを有する抽出物を得る工程をさらに含んでもよい。本発明のステビオール配糖体の製造方法により製造されるステビオール配糖体は特に限定されず、例えば、RebA、RebB、RebC、RebD、RebE、RebF、RebG、RebI、RebJ、RebM、RebN、RebO、RebQ、ステビオシド、ステビオールビオシド、ステビオールモノシド、ズルコシドA、ズルコシドB、ルブソシド等が挙げられる。好ましい態様において、前記ステビオール配糖体は、β-1,3-グルコシド結合を有するステビオール配糖体である。より好ましい態様において、前記ステビオール配糖体は、本発明の植物体において、本発明の遺伝的特徴を有しないステビア植物体におけるより含量又は含有比の高いものである。特に好ましい態様において、前記ステビオール配糖体は、RebA、RebB、RebF、RebG、RebM及びその

組合せから選択される。

[0112] 化学的特徴(a')～(r')の少なくとも1つを有する抽出物は、本発明の植物体の新鮮葉又は乾燥葉に適切な溶媒(水等の水性溶媒又はアルコール、エーテル及びアセトン等の有機溶媒)を反応させることにより得ることができる。抽出条件等は上記Ohta et al.又はWO2010/038911に記載の方法や、後述の実施例に記載の方法を参照することができる。

又、化学的特徴(a')～(r')の少なくとも1つを有する抽出物を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(HPLC)、ガスクロマトグラフィー、飛行時間型質量分析(TOF-MS)、超高速液体クロマトグラフィー(UPLC)等の公知の方法を用いることによりステビオール配糖体を精製することができる。

[0113] 化学的特徴(a')に関し、一部の態様において、本発明の抽出物におけるRebDに対するRebMの含有比は、本発明の遺伝的特徴を有しないステビア植物体から本発明の抽出物と同様の製造方法で得られた抽出物(以下、対照抽出物という)における前記比の、約1.2倍以上、約1.6倍以上、約2倍以上、約2.4倍以上、約2.8倍以上、約3.2倍以上、約3.6倍以上、約4倍以上、約4.4倍以上、約4.8倍以上、約5.2倍以上、約5.6倍以上、約6倍以上、約6.4倍以上、約6.8倍以上、約7.2倍以上、約7.6倍以上、約8倍以上、約8.4倍以上、約8.8倍以上、約9.2倍以上、約9.6倍以上、約10倍以上、約10.5倍以上、約11倍以上、約11.5倍以上又は約12倍以上である。

[0114] 化学的特徴(b')に関し、一部の態様において、本発明の抽出物におけるRebEに対するRebBの含有比は、対照抽出物における前記比の、約1.5倍以上、約2倍以上、約2.5倍以上、約3倍以上、約3.5倍以上、約4倍以上、約4.5倍以上、約5倍以上、約10倍以上、約15倍以上、約20倍以上、約30倍以上、約40倍以上、約50倍以上、約60倍以上、約70倍以上、約80倍以上、約90倍以上、約100倍以上、約150倍以上、約200倍以上、約250倍以上、約300倍以上、約400倍以上、約500倍以上、約600倍以上又は約700倍以上である。

[0115] 化学的特徴(c')に関し、一部の態様において、本発明の抽出物におけるReb

Eに対するRebGの含有比は、対照抽出物における前記比の、約2倍以上、約2.5倍以上、約3倍以上、約3.5倍以上、約4倍以上、約4.5倍以上、約5倍以上、約10倍以上、約15倍以上、約20倍以上、約25倍以上、約30倍以上、約40倍以上、約50倍以上、約60倍以上、約70倍以上、約80倍以上、約90倍以上、約100倍以上、約150倍以上、約200倍以上、約250倍以上、約300倍以上、約400倍以上、約500倍以上、約600倍以上又は約700倍以上である。

[0116] 化学的特徴(d')に関し、一部の態様において、本発明の抽出物におけるステビオシドに対するRebGの含有比は、対照抽出物における前記比の、約1.5倍以上、約2倍以上、約2.5倍以上、約3倍以上、約3.5倍以上、約4倍以上、約4.5倍以上、約5倍以上、約10倍以上、約15倍以上、約20倍以上、約30倍以上、約40倍以上、約50倍以上、約60倍以上、約70倍以上、約80倍以上、約90倍以上、約100倍以上、約150倍以上、約200倍以上、約250倍以上、約300倍以上、約400倍以上、約500倍以上、約600倍以上又は約700倍以上である。

[0117] 化学的特徴(e')に関し、一部の態様において、本発明の抽出物におけるRebAの含有量は、対照抽出物におけるRebAの含有量の、約1.05倍以上、約1.1倍以上、約1.15倍以上、約1.2倍以上、約1.25倍以上、約1.3倍以上、約1.35倍以上、約1.5倍以上、約1.65倍以上、約1.8倍以上、約1.95倍以上、約2.1倍以上、約2.25倍以上、約2.4倍以上、約2.55倍以上、約2.7倍以上、約2.85倍以上、約3倍以上、約3.15倍以上、約3.3倍以上、約3.5倍以上、約3.7倍以上、約3.9倍以上、約4.1倍以上、約4.3倍以上、約4.5倍以上又は約4.7倍以上である。

[0118] 化学的特徴(f')に関し、一部の態様において、本発明の抽出物におけるRebBの含有量は、対照抽出物におけるRebBの含有量の、約1.05倍以上、約1.15倍以上、約1.25倍以上、約1.35倍以上、約1.5倍以上、約1.65倍以上、約1.8倍以上、約2倍以上、約2.25倍以上、約2.5倍以上、約3倍以上、約3.5倍以上、約4倍以上、約4.5倍以上、約5倍以上、約5.5倍以上、約6倍以上、約7倍以上、約8倍以上、約9倍以上、約10倍以上、約11倍以上、約12倍以上、約13倍以上、約14倍以上、約15倍以上又は約16倍以上である。

[0119] 化学的特徴(g')に関し、一部の態様において、本発明の抽出物におけるRebFの含有量は、対照抽出物におけるRebFの含有量の、約1.02倍以上、約1.03倍以上、約1.04倍以上、約1.05倍以上、約1.1倍以上、約1.15倍以上、約1.2倍以上、約1.25倍以上、約1.3倍以上、約1.35倍以上、約1.4倍以上、約1.45倍以上、約1.5倍以上、約1.6倍以上、約1.8倍以上、約2倍以上、約2.2倍以上、約2.4倍以上、約2.6倍以上、約2.8倍以上、約3倍以上、約3.2倍以上、約3.4倍以上、約3.6倍以上、約3.8倍以上、約4倍以上又は約4.2倍以上である。

[0120] 化学的特徴(h')に関し、一部の態様において、本発明の抽出物におけるRebGの含有量は、対照抽出物におけるRebGの含有量の、約1.2倍以上、約1.3倍以上、約1.4倍以上、約1.5倍以上、約2倍以上、約2.5倍以上、約3倍以上、約3.5倍以上、約4倍以上、約4.5倍以上、約5倍以上、約6倍以上、約7倍以上、約8倍以上、約9倍以上、約10倍以上、約12.5倍以上、約15倍以上、約17.5倍以上、約20倍以上、約22.5倍以上、約25倍以上、約30倍以上、約35倍以上、約40倍以上、約45倍以上又は約50倍以上である。

[0121] 化学的特徴(i')に関し、一部の態様において、本発明の抽出物におけるRebMの含有量は、対照抽出物におけるRebMの含有量の、約1.05倍以上、約1.1倍以上、約1.15倍以上、約1.2倍以上、約1.3倍以上、約1.4倍以上、約1.5倍以上、約1.7倍以上、約2倍以上、約2.5倍以上、約3倍以上、約3.5倍以上、約4倍以上、約4.5倍以上、約5倍以上、約6倍以上、約7倍以上、約8倍以上、約9倍以上、約10倍以上、約12倍以上、約14倍以上、約16倍以上、約18倍以上、約20倍以上、約22倍以上又は約24倍以上である。

[0122] 化学的特徴(j')に関し、一部の態様において、本発明の抽出物におけるβ-1,3-グルコシド結合を有するステビオール配糖体の含有量は、対照抽出物におけるβ-1,3-グルコシド結合を有するステビオール配糖体の含有量の、約1.02倍以上、約1.03倍以上、約1.04倍以上、約1.05倍以上、約1.1倍以上、約1.15倍以上、約1.2倍以上、約1.3倍以上、約1.4倍以上、約1.5倍以上、約2倍以上、約2.5倍以上、約3倍以上、約3.5倍以上、約4倍以上、約4.5倍以上、約5倍以上、約6倍以上、約7倍以上、約8倍以上、約9倍以上、約10倍以上、約12.

5倍以上、約15倍以上、約17.5倍以上、約20倍以上、約22.5倍以上、約25倍以上、約30倍以上、約35倍以上、約40倍以上、約45倍以上、約50倍以上である。

[0123] 化学的特徴(k')に関し、一部の態様において、本発明の抽出物におけるRebDの含有量は、対照抽出物におけるRebDの含有量の、約0.8倍以下、約0.76倍以下、約0.72倍以下、約0.68倍以下、約0.64倍以下、約0.6倍以下、約0.56倍以下、約0.52倍以下、約0.5倍以下、約0.48倍以下、約0.46倍以下、約0.44倍以下、約0.42倍以下、約0.4倍以下、約0.38倍以下、約0.36倍以下、約0.34倍以下、約0.32倍以下、約0.3倍以下、約0.28倍以下、約0.26倍以下、約0.24倍以下、約0.22倍以下、約0.2倍以下、約0.18倍以下、約0.16倍以下又は約0.14倍以下である。

[0124] 化学的特徴(l')に関し、一部の態様において、本発明の抽出物におけるRebEの含有量は、対照抽出物におけるRebEの含有量の、約0.6倍以下、約0.56倍以下、約0.52倍以下、約0.48倍以下、約0.44倍以下、約0.4倍以下、約0.38倍以下、約0.36倍以下、約0.34倍以下、約0.32倍以下、約0.3倍以下、約0.28倍以下、約0.26倍以下、約0.24倍以下、約0.22倍以下、約0.2倍以下、約0.18倍以下、約0.16倍以下、約0.14倍以下、約0.12倍以下、約0.1倍以下、約0.08倍以下、約0.06倍以下、約0.04倍以下、約0.03倍以下、約0.02倍以下又は約0.01倍以下である。

[0125] 化学的特徴(m')に関し、一部の態様において、本発明の抽出物におけるRebNの含有量は、対照抽出物におけるRebNの含有量の、約0.9倍以下、約0.86倍以下、約0.82倍以下、約0.78倍以下、約0.74倍以下、約0.7倍以下、約0.66倍以下、約0.62倍以下、約0.58倍以下、約0.54倍以下、約0.5倍以下、約0.48倍以下、約0.46倍以下、約0.44倍以下、約0.42倍以下、約0.4倍以下、約0.38倍以下、約0.36倍以下、約0.34倍以下、約0.32倍以下、約0.3倍以下、約0.28倍以下、約0.26倍以下、約0.24倍以下、約0.22倍以下、約0.2倍以下又は約0.18倍以下である。

[0126] 化学的特徴(n')に関し、一部の態様において、本発明の抽出物におけるス

テビオシドの含有量は、対照抽出物におけるステビオシドの含有量の、約0.8倍以下、約0.75倍以下、約0.7倍以下、約0.65倍以下、約0.6倍以下、約0.55倍以下、約0.5倍以下、約0.45倍以下、約0.4倍以下、約0.35倍以下、約0.3倍以下、約0.28倍以下、約0.26倍以下、約0.24倍以下、約0.22倍以下、約0.2倍以下、約0.18倍以下、約0.16倍以下、約0.14倍以下、約0.12倍以下、約0.1倍以下、約0.08倍以下、約0.06倍以下、約0.05倍以下、約0.04倍以下、約0.03倍以下又は約0.02倍以下である。

[0127] 化学的特徴(o')に関し、一部の態様において、本発明の抽出物におけるβ-1,3-グルコシド結合を有しないステビオール配糖体の含有量は、対照抽出物におけるβ-1,3-グルコシド結合を有しないステビオール配糖体の含有量の、約0.9倍以下、約0.86倍以下、約0.82倍以下、約0.78倍以下、約0.74倍以下、約0.7倍以下、約0.66倍以下、約0.62倍以下、約0.6倍以下、約0.56倍以下、約0.52倍以下、約0.48倍以下、約0.44倍以下、約0.4倍以下、約0.38倍以下、約0.36倍以下、約0.34倍以下、約0.32倍以下、約0.3倍以下、約0.28倍以下、約0.26倍以下、約0.24倍以下、約0.22倍以下、約0.2倍以下、約0.18倍以下、約0.16倍以下、約0.14倍以下、約0.12倍以下、約0.1倍以下、約0.08倍以下、約0.06倍以下、約0.04倍以下、約0.03倍以下、約0.02倍以下、約0.01倍以下である。

[0128] 化学的特徴(p')に関し、一部の態様において、本発明の抽出物におけるRebD、RebE、RebN、ステビオシドのいずれか1つに対する、RebA、RebB、RebF、RebG、RebMのいずれか1つの含有比は、対照抽出物における前記比の、約1.2倍以上、約1.5倍以上、約2倍以上、約2.5倍以上、約3倍以上、約3.5倍以上、約4倍以上、約4.5倍以上、約5倍以上、約10倍以上、約15倍以上、約20倍以上、約30倍以上、約40倍以上、約50倍以上、約60倍以上、約70倍以上、約80倍以上、約90倍以上、約100倍以上、約150倍以上、約200倍以上、約250倍以上、約300倍以上、約400倍以上、約500倍以上、約600倍以上又は約700倍以上である。

[0129] 化学的特徴(q')に関し、一部の態様において、本発明の抽出物におけるβ-

1,3-グルコシド結合を有しないステビオール配糖体に対するβ-1,3-グルコシド結合を有するステビオール配糖体の含有比は、対照抽出物における前記比の、約1.2倍以上、約1.5倍以上、約2倍以上、約2.5倍以上、約3倍以上、約3.5倍以上、約4倍以上、約4.5倍以上、約5倍以上、約10倍以上、約15倍以上、約20倍以上、約30倍以上、約40倍以上、約50倍以上、約60倍以上、約70倍以上、約80倍以上、約90倍以上、約100倍以上、約150倍以上、約200倍以上、約250倍以上、約300倍以上、約400倍以上、約500倍以上、約600倍以上又は約700倍以上である。

[0130] 化学的特徴(r')に関し、一部の態様において、本発明の抽出物におけるUGT76G1の基質ステビオール配糖体に対する、前記基質ステビオール配糖体からUGT76G1により生成されるステビオール配糖体の含有比は、対照抽出物における前記比の、約1.2倍以上、約1.5倍以上、約2倍以上、約3倍以上、約4倍以上、約5倍以上、約6倍以上、約8倍以上、約10倍以上、約15倍以上、約20倍以上、約25倍以上、約30倍以上、約35倍以上、約40倍以上、約45倍以上、約50倍以上、約55倍以上、約60倍以上、約65倍以上、約70倍以上、約75倍以上、約80倍以上、約85倍以上、約90倍以上、約95倍以上又は約100倍以上である。

[0131] 化学的特徴(a')に関し、一部の態様において、本発明の抽出物におけるRebDに対するRebMの含有比は、約0.12以上、約0.16以上、約0.2以上、約0.24以上、約0.28以上、約0.32以上、約0.36以上、約0.4以上、約0.44以上、約0.48以上、約0.5以上、約0.525以上、約0.55以上、約0.575以上、約0.6以上、約0.625以上、約0.65以上、約0.675以上、約0.7以上、約0.725以上、約0.75以上、約0.775以上、約0.8以上、約0.825以上、約0.85以上、約0.875以上、約0.9以上、約0.925以上、約0.95以上、約0.975以上又は約1以上である。

[0132] 化学的特徴(b')に関し、一部の態様において、本発明の抽出物におけるRebEに対するRebBの含有比は、約0.17以上、約0.5以上、約1以上、約1.5以上、約2以上、約2.5以上、約3以上、約3.5以上、約4以上、約4.5以上、約5以上、約5.5以上、約6以上、約6.5以上、約7以上、約7.5以上、約8以上、約8.5以上、約9以上、約9.5以上、約10以上、約10.5以上、約11以上、約11.5以上、約1

2以上、約12.5以上、約13以上、約13.5以上、約14以上、約14.5以上又は約15以上である。

[0133] 化学的特徴(c')に関し、一部の態様において、本発明の抽出物におけるRebEに対するRebGの含有比は、約0.004以上、約0.05以上、約0.1以上、約0.2以上、約0.3以上、約0.4以上、約0.5以上、約0.6以上、約0.7以上、約0.8以上、約0.9以上、約1以上、約1.05以上、約1.07以上、約1.1以上、約1.12以上、約1.13以上、約1.17以上、約1.2以上、約1.25以上、約1.3以上、約1.35以上、約1.37以上、約1.38以上、約1.4以上、約1.5以上、約1.6以上、約1.7以上、約1.72以上、約1.75以上、約1.8以上、約1.85以上、約1.9以上、約1.95以上又は約2以上である。

[0134] 化学的特徴(d')に関し、一部の態様において、本発明の抽出物におけるステビオシドに対するRebGの含有比は、約0.0007以上、約0.004以上、約0.006以上、約0.008以上、約0.01以上、約0.012以上、約0.014以上、約0.016以上、約0.018以上、約0.02以上、約0.025以上、約0.03以上、約0.035以上、約0.04以上、約0.045以上、約0.05以上、約0.055以上、約0.06以上、約0.065以上、約0.07以上、約0.075以上、約0.08以上、約0.085以上、約0.09以上、約0.091以上、約0.092以上、約0.093以上、約0.094以上、約0.095以上、約0.096以上、約0.097以上、約0.098以上、約0.099以上又は約0.1以上である。

[0135] 化学的特徴(e')に関し、一部の態様において、本発明の抽出物におけるRebAの含有量は、約2重量%以上、約2.15重量%以上、約2.3重量%以上、約2.45重量%以上、約2.6重量%以上、約2.75重量%以上、約2.9重量%以上、約3.05重量%以上、約3.2重量%以上、約3.35重量%以上、約3.5重量%以上、約3.65重量%以上、約3.8重量%以上、約4重量%以上、約4.2重量%以上、約4.4重量%以上、約4.6重量%以上、約4.8重量%以上、約5重量%以上、約5.25重量%以上、約5.5重量%以上、約5.75重量%以上、約6重量%以上、約6.25重量%以上、約6.5重量%以上、約6.75重量%以上、約7重量%以上である。

[0136] 化学的特徴(f')に関し、一部の態様において、本発明の抽出物におけるRebBの含有量は、約0.04重量%以上、約0.044重量%以上、約0.048重量%以上、

約0.052重量％以上、約0.056重量％以上、約0.06重量％以上、約0.064重量％以上、約0.068重量％以上、約0.072重量％以上、約0.076重量％以上、約0.08重量％以上、約0.084重量％以上、約0.088重量％以上、約0.092重量％以上、約0.096重量％以上、約0.1重量％以上、約0.105重量％以上、約0.11重量％以上、約0.115重量％以上、約0.12重量％以上、約0.125重量％以上、約0.13重量％以上、約0.135重量％以上、約0.14重量％以上、約0.145重量％以上、約0.15重量％以上又は約0.16重量％以上である。

[0137] 化学的特徴(g')に関し、一部の態様において、本発明の抽出物におけるRebFの含有量は、約0.06重量％以上、約0.064重量％以上、約0.068重量％以上、約0.072重量％以上、約0.076重量％以上、約0.08重量％以上、約0.084重量％以上、約0.088重量％以上、約0.092重量％以上、約0.096重量％以上、約0.1重量％以上、約0.105重量％以上、約0.11重量％以上、約0.115重量％以上、約0.12重量％以上、約0.125重量％以上、約0.13重量％以上、約0.135重量％以上、約0.14重量％以上、約0.145重量％以上、約0.15重量％以上、約0.155重量％以上、約0.16重量％以上、約0.17重量％以上、約0.18重量％以上、約0.19重量％以上又は約0.2重量％以上である。

[0138] 化学的特徴(h')に関し、一部の態様において、本発明の抽出物におけるRebGの含有量は、約0.001重量％以上、約0.002重量％以上、約0.003重量％以上、約0.004重量％以上、約0.005重量％以上、約0.006重量％以上、約0.007重量％以上、約0.008重量％以上、約0.009重量％以上、約0.01重量％以上、約0.011重量％以上、約0.012重量％以上、約0.013重量％以上、約0.014重量％以上、約0.016重量％以上、約0.018重量％以上、約0.02重量％以上、約0.022重量％以上、約0.024重量％以上、約0.026重量％以上、約0.028重量％以上、約0.03重量％以上、約0.032重量％以上、約0.034重量％以上、約0.036重量％以上、約0.038重量％以上又は約0.04重量％以上である。

[0139] 化学的特徴(i')に関し、一部の態様において、本発明の抽出物におけるRebMの含有量は、約0.15重量％以上、約0.17重量％以上、約0.19重量％以上、約0.21重量％以上、約0.23重量％以上、約0.25重量％以上、約0.27重量％以上

、約0.29重量％以上、約0.31重量％以上、約0.33重量％以上、約0.35重量％以上、約0.37重量％以上、約0.39重量％以上、約0.41重量％以上、約0.43重量％以上、約0.45重量％以上、約0.47重量％以上、約0.49重量％以上、約0.51重量％以上、約0.54重量％以上、約0.57重量％以上、約0.6重量％以上、約0.63重量％以上、約0.66重量％以上、約0.69重量％以上、約0.72重量％以上又は約0.75重量％以上である。

[0140] 化学的特徴(j')に関し、一部の態様において、本発明の抽出物におけるβ-1,3-グルコシド結合を有するステビオール配糖体の含有量は、約0.001重量％以上、約0.002重量％以上、約0.005重量％以上、約0.01重量％以上、約0.02重量％以上、約0.04重量％以上、約0.06重量％以上、約0.08重量％以上、約0.1重量％以上、約0.15重量％以上、約0.2重量％以上、約0.3重量％以上、約0.4重量％以上、約0.5重量％以上、約0.6重量％以上、約0.7重量％以上、約0.8重量％以上、約1重量％以上、約1.5重量％以上、約2重量％以上、約2.5重量％以上、約3重量％以上、約3.5重量％以上、約4重量％以上、約5重量％以上、約6重量％以上又は約7重量％以上である。

[0141] 化学的特徴(k')に関し、一部の態様において、本発明の抽出物におけるRebDの含有量は、約1.65重量％以下、約1.6重量％以下、約1.55重量％以下、約1.5重量％以下、約1.45重量％以下、約1.4重量％以下、約1.35重量％以下、約1.3重量％以下、約1.25重量％以下、約1.2重量％以下、約1.15重量％以下、約1.1重量％以下、約1.05重量％以下、約1重量％以下、約0.95重量％以下、約0.9重量％以下、約0.85重量％以下、約0.8重量％以下、約0.75重量％以下、約0.7重量％以下、約0.65重量％以下、約0.6重量％以下、約0.55重量％以下、約0.5重量％以下、約0.45重量％以下、約0.4重量％以下又は約0.35重量％以下である。

[0142] 化学的特徴(l')に関し、一部の態様において、本発明の抽出物におけるRebEの含有量は、約0.34重量％以下、約0.32重量％以下、約0.3重量％以下、約0.28重量％以下、約0.26重量％以下、約0.24重量％以下、約0.22重量％以下、約0.2重量％以下、約0.18重量％以下、約0.16重量％以下、約0.14重量％以下

、約0.12重量％以下、約0.1重量％以下、約0.08重量％以下、約0.06重量％以下、約0.05重量％以下、約0.04重量％以下、約0.03重量％以下、約0.02重量％以下、約0.015重量％以下、約0.01重量％以下、約0.009重量％以下、約0.008重量％以下、約0.007重量％以下、約0.006重量％以下、約0.005重量％以下又は約0.004重量％以下である。

[0143] 化学的特徴(m')に関し、一部の態様において、本発明の抽出物におけるRebNの含有量は、約0.35重量％以下、約0.33重量％以下、約0.31重量％以下、約0.29重量％以下、約0.27重量％以下、約0.25重量％以下、約0.24重量％以下、約0.23重量％以下、約0.22重量％以下、約0.21重量％以下、約0.2重量％以下、約0.19重量％以下、約0.18重量％以下、約0.17重量％以下、約0.16重量％以下、約0.15重量％以下、約0.14重量％以下、約0.13重量％以下、約0.12重量％以下、約0.11重量％以下、約0.1重量％以下、約0.09重量％以下、約0.08重量％以下、約0.07重量％以下、約0.06重量％以下、約0.055重量％以下又は約0.05重量％以下である。

[0144] 化学的特徴(n')に関し、一部の態様において、本発明の抽出物におけるステビオシドの含有量は、約2.5重量％以下、約2.4重量％以下、約2.3重量％以下、約2.2重量％以下、約2.1重量％以下、約2重量％以下、約1.9重量％以下、約1.8重量％以下、約1.7重量％以下、約1.6重量％以下、約1.5重量％以下、約1.4重量％以下、約1.3重量％以下、約1.2重量％以下、約1.1重量％以下、約1重量％以下、約0.9重量％以下、約0.8重量％以下、約0.7重量％以下、約0.6重量％以下、約0.5重量％以下、約0.45重量％以下、約0.4重量％以下、約0.35重量％以下、約0.3重量％以下、約0.25重量％以下又は約0.2重量％以下である。

[0145] 化学的特徴(o')に関し、一部の態様において、本発明の抽出物におけるβ-1,3-グルコシド結合を有しないステビオール配糖体の含有量は、約2.5重量％以下、約2.2重量％以下、約2重量％以下、約1.8重量％以下、約1.6重量％以下、約1.4重量％以下、約1.2重量％以下、約1重量％以下、約0.9重量％以下、約0.8重量％以下、約0.7重量％以下、約0.6重量％以下、約0.5重量％以下

、約0.4重量％以下、約0.3重量％以下、約0.2重量％以下、約0.1重量％以下、約0.08重量％以下、約0.06重量％以下、約0.04重量％以下、約0.02重量％以下、約0.015重量％以下、約0.01重量％以下、約0.008重量％以下、約0.006重量％以下、約0.005重量％以下、約0.004重量％以下である。

[0146] 化学的特徴(p')に関し、一部の態様において、本発明の抽出物におけるRebD、RebE、RebN、ステビオシドのいずれか1つに対する、RebA、RebB、RebF、RebG、RebMのいずれか1つの含有比は、約0.0007以上、約0.004以上、約0.01以上、約0.02以上、約0.03以上、約0.05以上、約0.08以上、約0.091以上、約0.095以上、約0.1以上、約0.2以上、約0.3以上、約0.5以上、約0.8以上、約1以上、約1.05以上、約1.07以上、約1.1以上、約1.2以上、約1.5以上、約2以上、約3以上、約4以上、約5以上、約8以上、約10以上、約10.5以上、約11以上、約11.5以上、約12以上、約12.5以上、約13以上、約13.5以上、約14以上、約14.5以上又は約15以上である。

[0147] 化学的特徴(q')に関し、一部の態様において、本発明の抽出物におけるβ-1,3-グルコシド結合を有しないステビオール配糖体に対するβ-1,3-グルコシド結合を有するステビオール配糖体の含有比は、約0.0007以上、約0.004以上、約0.01以上、約0.02以上、約0.03以上、約0.05以上、約0.08以上、約0.091以上、約0.095以上、約0.1以上、約0.2以上、約0.3以上、約0.5以上、約0.8以上、約1以上、約1.05以上、約1.07以上、約1.1以上、約1.2以上、約1.5以上、約2以上、約3以上、約4以上、約5以上、約8以上、約10以上、約10.5以上、約11以上、約11.5以上、約12以上、約12.5以上、約13以上、約13.5以上、約14以上、約14.5以上又は約15以上である。

[0148] 化学的特徴(r')に関し、一部の態様において、本発明の抽出物におけるUGT76G1の基質ステビオール配糖体に対する、前記基質ステビオール配糖体からUGT76G1により生成されるステビオール配糖体の含有比は、約0.15以上、約0.3以上、約0.5以上、約0.7以上、約0.9以上、約1以上、約1.5以上、約2以上、約3以上、約5以上、約7以上、約10以上、約15以上、約16以上、約17以上、約20以上、約25以上、約30以上、約35以上、約40以上、約45以上、約50以上、

約51以上、約55以上、約60以上、約65以上、約66以上、約70以上、約75以上又は約80以上である。

好ましい態様において、上記の化学的特徴(a')～(r')に係るステビオール配糖体の含量又は含有比は、未精製の本発明の抽出物(粗抽出物)におけるものである。

[0149] このようにして得られた本発明の抽出物及び/又は本発明のステビオール配糖体の製造方法により得られるステビオール配糖体と他の成分とを混合することにより、ステビオール配糖体を含む食品、甘味料組成物、香料又は医薬品(以下、食品等と総称することがある)を製造することができる。そこで、本発明はさらに、本発明の抽出物及び/又は本発明のステビオール配糖体の製造方法により得られるステビオール配糖体と他の成分とを混合する工程を含む、食品等の製造方法を提供する。さらに、本発明は、前記製造方法により得られた、食品等を提供する。ここで食品は、飲料を含む。一部の態様において、前記食品等は、本発明の抽出物に含まれるステビオール配糖体及び/又は本発明のステビオール配糖体の製造方法により得られるステビオール配糖体以外のステビオール配糖体を含まない。

[0150] 前記食品等は、本発明の抽出物を含む場合、本発明の抽出物と同様の化学的特徴を有し得る。一部の態様において、前記食品等は、化学的特徴(a')～(d')、(p')及び(r')の少なくとも1つと同じステビオール配糖体の含有比を有する。例えば、化学的特徴(a')と同じステビオール配糖体の含有比を有する食品等は、本発明の抽出物に代えて本発明の遺伝的特徴を有しないステビア植物体の抽出物を含む以外は同じ成分で同様に製造された食品等に比べ、RebDに対するRebMの含有比が高く(例えば、約1.2倍以上、約1.6倍以上、約2倍以上、約2.4倍以上、約2.8倍以上、約3.2倍以上、約3.6倍以上、約4倍以上、約4.4倍以上、約4.8倍以上、約5.2倍以上、約5.6倍以上、約6倍以上、約6.4倍以上、約6.8倍以上、約7.2倍以上、約7.6倍以上、約8倍以上、約8.4倍以上、約8.8倍以上、約9.2倍以上、約9.6倍以上、約10倍以上、約10.5倍以上、約11倍以上、約11.5倍以上又は約12倍以上高く)、約0.12以上、約0.16以上、約0.

2以上、約0.24以上、約0.28以上、約0.32以上、約0.36以上、約0.4以上、約0.44以上、約0.48以上、約0.5以上、約0.525以上、約0.55以上、約0.575以上、約0.6以上、約0.625以上、約0.65以上、約0.675以上、約0.7以上、約0.725以上、約0.75以上、約0.775以上、約0.8以上、約0.825以上、約0.85以上、約0.875以上、約0.9以上、約0.925以上、約0.95以上、約0.975以上又は約1以上のRebDに対するRebMの含有比を有し得る。

[0151] 5. 本発明の植物体に係る塩基配列

本発明は、別の側面において、本発明のステビア植物体に係る塩基配列を提供する。本発明の遺伝的特徴(1)を有するステビア植物体に係る塩基配列の特定の態様は、配列番号10～13及び50から選択される塩基配列を含む、又はそれから、なる。本発明の遺伝的特徴(2)を有するステビア植物体に係る塩基配列の特定の態様は、配列番号14～17及び52から選択される塩基配列を含む、又はそれからなる。本発明の遺伝的特徴(3)を有するステビア植物体に係る塩基配列の特定の態様は、配列番号18～21及び54から選択される塩基配列を含む、又はそれからなる。

[0152] 6. 本発明の死亡組織又は死亡細胞

本発明のさらなる態様において、本発明のステビア植物体、本発明のスクリーニング方法により選別されたステビア植物体若しくは本発明の作出方法により製造されたステビア植物体の組織又は細胞であって死亡しているもの(以下、「本発明の死亡組織又は死亡細胞」と称することがある。)が提供される。「死亡」とは、繁殖、増殖、再生および成長する能力を有さない状態を意味し、人為的な操作によらず自然と死亡する場合も、切断、破砕、加熱(空気などの気体を介した加熱、水などの液体を介した加熱、水蒸気などの蒸気を介した加熱を含む)、凍結、乾燥、凍結乾燥等の人為的な操作によって死亡する場合も含む。死亡組織とは、含まれる細胞が全て死亡している組織を意味し、死亡植物体も含むものとする。本発明の死亡組織又は死亡細胞の具体例としては、種子以外の組織または細胞であって死亡しているものが挙げられる。より具体的には、胚、分裂組織細胞、花粉、葉、根、根端、花弁、プ

ロトプラスト、葉の切片またはカルスであって死亡しているものが挙げられる。好適には、乾燥葉が挙げられる。

本発明の死亡組織又は死亡細胞は、前述の抽出物、ステビオール配糖体精製品、医薬品、香料、飲食品等の原料とすることができる。

本態様においては、本発明の死亡組織又は死亡細胞から、本発明の抽出物の製造方法と同様の方法により抽出物を得る、死亡組織又は死亡細胞の抽出物の製造方法が提供される。さらに、得られた抽出物から、β-1,3-グルコシド結合を有するステビオール配糖体を精製する工程を含む、β-1,3-グルコシド結合を有するステビオール配糖体の製造方法が提供される。

また、本発明の死亡組織又は死亡細胞の抽出物、或いは、死亡組織又は死亡細胞抽出物の製造方法により得られた抽出物を提供する工程、及び、前記抽出物を、食品、甘味料組成物、香料又は医薬品の原料に添加する工程を含む、食品、甘味料組成物、香料又は医薬品の製造方法が提供される。

実施例

[0153] 以下に本発明に関する実施例を記載するが、本発明はこれらの具体的な態様に限定されるものではない。

[0154] (1)分離集団の創出

市販のステビア植物体を、RebD又はRebMの含量に着目して3世代にわたり選別交配を行い、高RebD含有集団A及び高RebM含有集団Bを得た。さらに集団A及びBを交配し、分離集団Cを得た。

[0155] (2)RebM含量の多い個体の遺伝子解析

集団Cの成長した各個体より適量の新鮮葉をサンプリングし、LC－MS/MS(島津LCMS8050)にてステビオール配糖体の濃度を定量した。具体的には、0．25gの新鮮葉をフリーズドライにより乾燥し、破砕乾物0．05gを100倍量(5mL)の純水中に投入した。超音波処理20分にて抽出し、遠心・濾過した後、32%アセトニトリルで60倍希釈したものをサンプル液とした。このサンプル液1mLをLCMS8050のMRMモードにてLC－MS/MS分析を行い、RebA、RebB、RebC、RebD、RebE、RebF、RebG、RebM、RebN及びステビオシドの濃度を定量した。さらに、

集団Cの一部の個体の新鮮葉からゲノムDNAを抽出し、シーケンサー(HiSeq 2500、Illumina)により遺伝子解析を行った。結果を表2～3に示す。表中、ステビオール配糖体の数値は、乾燥葉における重量%を示し、遺伝的特徴は、「＋」が陽性、「-」が陰性を示す。又、「STV」はステビオシド、「TSG」は総ステビオール配糖体をそれぞれ示す。なお、TSGの数値は測定した全てのステビオール配糖体（すなわち、RebA、RebB、RebC、RebD、RebE、RebF、RebG、RebM、RebN及びステビオシド）の合計値である。

[0156] [表2]

表２：集団Ｃの各個体における遺伝的特徴とステビオール配糖体含量(1)

	RebA	RebB	RebC	RebD	STV	RebF	RebM
C1	3.786502	0.077078	0.24346	1.522212	2.209915	0.139107	0.219286
C2	3.924214	0.081276	0.194904	0.774268	0.715449	0.120277	0.304381
C3	4.770307	0.1019	0.224913	0.96954	0.824279	0.14032	0.38172
C4	3.356523	0.060404	0.200702	1.069825	1.638942	0.116546	0.167597
C5	3.513728	0.083856	0.240683	1.162947	1.974361	0.126278	0.195132
C6	4.251365	0.088944	0.192123	0.787532	0.455366	0.128627	0.4412
C7	4.583756	0.069368	0.192163	0.536089	0.403402	0.120166	0.289563
C8	4.721994	0.097663	0.205402	0.743849	0.479511	0.126674	0.401899
C9	3.095679	0.064023	0.180796	1.113914	1.266811	0.100967	0.168674
C10	2.140972	0.035659	0.090451	0.686378	0.273428	0.061744	0.339339
C11	3.15986	0.041142	0.158603	0.584393	0.300795	0.090574	0.290687
C12	3.190831	0.071139	0.233477	1.670157	1.98177	0.125778	0.242854
C13	3.393655	0.049451	0.155243	0.420731	0.374815	0.1022	0.207204
C14	2.860136	0.051874	0.191115	1.578658	1.410705	0.123791	0.25605
C15	5.691578	0.12385	0.298395	1.248008	0.887889	0.168764	0.537598
C16	3.125041	0.053355	0.209145	1.275028	1.647713	0.105982	0.225176
C17	3.347205	0.063993	0.16953	0.485618	0.52877	0.084103	0.242361
C18	3.386862	0.068342	0.219082	1.037035	1.367305	0.097393	0.228556
C19	3.648149	0.05497	0.173458	0.574277	0.341452	0.09063	0.414205
C20	5.606061	0.09929	0.250488	0.789457	0.612033	0.13986	0.46294
C21	3.853469	0.084685	0.234509	1.165485	1.430984	0.115418	0.270798
C22	4.849616	0.081854	0.225445	0.694839	0.437815	0.142207	0.453284
C23	3.269713	0.066312	0.231276	1.576212	1.510977	0.114518	0.30946
C24	4.068609	0.083358	0.202366	0.517413	0.573708	0.10204	0.231902
C25	4.322262	0.09	0.297221	1.457857	2.649429	0.144606	0.235975

C26	4.515948	0.098495	0.246144	0.729312	0.522954	0.12011	0.321522
C27	5.341681	0.093281	0.272263	0.800119	0.509819	0.142317	0.554986
C28	3.407892	0.076799	0.232522	1.456796	1.97655	0.116423	0.228018
C29	4.966603	0.113808	0.253573	0.820092	0.826504	0.140586	0.376179
C30	4.387438	0.080235	0.205713	0.599781	0.448643	0.119357	0.388255
C31	4.890419	0.091546	0.209689	0.490388	0.40576	0.130309	0.338561
C32	4.743861	0.102853	0.210933	0.685307	0.46309	0.1275	0.371053
C33	4.545896	0.078394	0.23639	0.706687	0.376478	0.128223	0.417527
C34	4.879338	0.087853	0.24584	0.845795	0.802228	0.141971	0.354091
C35	5.592855	0.143739	0.255895	0.59918	0.5216	0.156387	0.32664
C36	3.168368	0.043542	0.156003	1.175999	0.821022	0.0948	0.30673
C37	1.904159	0.03823	0.137382	0.913192	1.297416	0.059077	0.130488
C38	5.133794	0.082412	0.250259	0.405698	0.306324	0.143895	0.307596
C39	5.481245	0.100455	0.25799	1.21262	0.673192	0.153115	0.650402
C40	5.066884	0.081058	0.206212	0.524986	0.374035	0.127949	0.46705
C41	5.733472	0.105152	0.256386	0.812518	0.657904	0.156026	0.483332
C42	3.174622	0.065422	0.192212	1.423082	1.330391	0.092209	0.263748
C43	3.540378	0.08557	0.219788	0.724522	1.351046	0.101648	0.188128
C44	4.867403	0.077836	0.211533	0.556858	0.341042	0.125475	0.404274
C45	5.758942	0.139825	0.274267	0.661077	0.715905	0.143437	0.343581
C46	5.12749	0.103567	0.241835	0.635045	0.6217	0.134999	0.363671
C47	4.052743	0.088096	0.287635	1.530246	2.44845	0.142975	0.267871
C48	3.538097	0.068013	0.207355	1.501998	1.46343	0.099127	0.271568
C49	3.963864	0.068498	0.2028	0.783147	1.011967	0.113073	0.243063
C50	4.674483	0.093736	0.234343	0.504228	0.601327	0.12437	0.29513

C51	5.10744	0.071939	0.260123	0.718617	0.487414	0.136544	0.383833
C52	3.797152	0.08301	0.21197	1.257977	1.652317	0.121383	0.276324
C53	3.666904	0.063608	0.212532	1.409882	1.397907	0.107528	0.27645
C54	3.669759	0.060201	0.219733	1.160462	1.415053	0.119362	0.224945
C55	5.577688	0.112842	0.297384	0.809138	0.944736	0.157022	0.40664
C56	4.80013	0.112746	0.229434	0.484375	0.515209	0.130517	0.305638
C57	3.996053	0.085922	0.226203	0.915829	1.325603	0.120302	0.218727
C58	5.593568	0.106037	0.228564	0.922949	0.354298	0.137352	0.597271
C59	4.183011	0.067032	0.215281	1.067118	0.510745	0.123266	0.563432
C60	2.669424	0.043427	0.168425	1.377414	1.013359	0.094749	0.262207
C61	3.933939	0.066949	0.187806	0.710891	0.430617	0.121007	0.397428
C62	4.833593	0.109983	0.247826	1.007724	0.8055	0.158285	0.441962
C63	3.82124	0.059047	0.183803	0.917524	0.423899	0.111269	0.388877
C64	3.862166	0.078471	0.248281	1.103914	1.883512	0.136175	0.19022
C65	4.246599	0.06329	0.198156	0.759043	0.394781	0.12433	0.424996
C66	4.584282	0.068858	0.235684	0.827704	0.58921	0.139088	0.391183
C67	2.873662	0.060177	0.187538	1.116132	1.351725	0.11568	0.225934
C68	4.172895	0.068775	0.201496	0.955609	0.481429	0.135002	0.504855
C69	3.372318	0.087526	0.249412	1.482401	1.949959	0.136829	0.226052
C70	3.676624	0.084233	0.217029	1.020657	0.678275	0.133234	0.355831

[表3]

表３：集団Ｃの各個体における遺伝的特徴とステビオール配糖体含量(2)

	RebN	RebE	RebG	TSG	遺伝的特徴		
					(1)	(2)	(3)
C1	0.228456	0.27365	0.003213	8.702877	−	−	−
C2	0.138086	0.039957	0.005633	6.298446	+	+	+
C3	0.150392	0.039384	0.007065	7.609819	+	−	+
C4	0.167489	0.176834	0.002733	6.957595	−	−	−
C5	0.205748	0.195461	0.003001	7.701196	−	−	+
C6	0.132129	0.025115	0.004761	6.507162	+	+	+
C7	0.096153	0.01339	0.009211	6.313261	+	+	+
C8	0.124732	0.017249	0.007279	6.926252	−	+	+
C9	0.184852	0.204638	0.001756	6.38211	+	+	+
C10	0.111264	0.029722	0.001124	3.770082	−	−	−
C11	0.105507	0.017192	0.006355	4.755108	+	+	+
C12	0.24091	0.275256	0.0022	8.034372	−	−	−
C13	0.071695	0.011068	0.01103	4.797092	+	+	+
C14	0.21104	0.278472	0.001721	6.963562	−	−	−
C15	0.202025	0.058673	0.007464	9.224244	+	−	+
C16	0.264633	0.332799	0.001698	7.240569	−	−	−
C17	0.108421	0.026491	0.006455	5.062948	+	+	+
C18	0.280548	0.188736	0.00212	6.87598	−	−	−
C19	0.139254	0.024973	0.005035	5.466403	+	+	+
C20	0.13661	0.025303	0.01139	8.133431	−	+	+
C21	0.250121	0.189804	0.002614	7.597886	+	+	+
C22	0.13745	0.021934	0.011681	7.056125	+	+	+
C23	0.318027	0.268562	0.001995	7.667053	+	+	+
C24	0.10826	0.023734	0.007658	5.919048	+	+	+
C25	0.263485	0.273632	0.002991	9.737456	−	−	−

C26	0.144086	0.040809	0.006838	6.746219	+	+	+
C27	0.195335	0.030094	0.00878	7.948674	−	−	−
C28	0.266032	0.350049	0.001959	8.113041	−	−	−
C29	0.146029	0.032115	0.00979	7.68528	+	+	+
C30	0.123321	0.0187	0.008294	6.379737	−	−	−
C31	0.079295	0.008707	0.015033	6.659706	+	+	+
C32	0.094777	0.01785	0.008453	6.825676	+	+	+
C33	0.160262	0.020189	0.007269	6.677315	+	+	+
C34	0.146252	0.050114	0.007846	7.561328	+	+	+
C35	0.098413	0.016337	0.018335	7.729382	+	−	−
C36	0.195196	0.133655	0.00226	6.097576	−	+	−
C37	0.175185	0.21796	0.0008	4.873889	−	−	−
C38	0.10137	0.006095	0.011555	6.748997	+	+	+
C39	0.227988	0.056694	0.007533	8.821234	−	−	−
C40	0.106625	0.010004	0.013767	6.97857	+	+	+
C41	0.139247	0.027188	0.013292	8.384517	+	+	+
C42	0.275835	0.234386	0.001411	7.053319	−	+	−
C43	0.157451	0.093047	0.00451	6.46609	+	+	+
C44	0.114905	0.012597	0.010822	6.722744	+	+	+
C45	0.130342	0.02425	0.013713	8.205338	+	+	+
C46	0.114691	0.025839	0.010649	7.379486	−	−	−
C47	0.289655	0.318794	0.002821	9.429286	−	−	−
C48	0.255329	0.254696	0.002065	7.661676	−	−	−
C49	0.176121	0.090631	0.004167	6.65733	−	−	−
C50	0.108261	0.019991	0.009729	6.665599	−	+	+

C51	0.173806	0.026506	0.007625	7.373848	+	−	−
C52	0.197111	0.172749	0.002785	7.772778	−	−	−
C53	0.262506	0.231025	0.002202	7.630546	−	−	−
C54	0.206893	0.206534	0.002746	7.285688	−	−	−
C55	0.170517	0.044699	0.01054	8.531205	+	+	+
C56	0.109131	0.018136	0.013236	6.718551	+	+	+
C57	0.156643	0.122276	0.003832	7.171391	+	−	+
C58	0.164649	0.01842	0.008692	8.1318	−	−	−
C59	0.200304	0.068025	0.005011	7.003224	−	−	−
C60	0.220661	0.242012	0.001343	6.093021	−	−	−
C61	0.114278	0.027849	0.006841	5.997605	+	+	+
C62	0.145284	0.04541	0.009551	7.805119	+	+	+
C63	0.166812	0.041461	0.005605	6.119538	−	+	−
C64	0.194819	0.160685	0.003623	7.861866	+	+	+
C65	0.179344	0.02184	0.007307	6.419685	−	−	−
C66	0.146706	0.029441	0.008129	7.020285	−	+	+
C67	0.17041	0.170815	0.002762	6.274834	−	−	−
C68	0.136598	0.034811	0.006346	6.697816	+	+	+
C69	0.233747	0.266194	0.002587	8.007026	−	+	+
C70	0.140362	0.042173	0.004972	6.353391	+	+	+

[0157] 上記結果より、本発明の遺伝的特徴を有する個体群のRebDに対するRebMの含有比が、本発明の遺伝的特徴を有しない個体のものより高い傾向が認められた。この結果が集団Cに特有のものでないかどうかを確認するため、他の集団(集団D及びE)についても同様の検討を行った。結果を表4～7に示す。

[表4]

表４：集団Ｄの各個体における遺伝的特徴とステビオール配糖体含量(1)

	RebA	RebB	RebC	RebD	STV	RebF	RebM
D1	3.89314	0.056342	0.164304	0.56455	0.372864	0.121861	0.428764
D2	1.429229	0.009044	0.332385	0.350715	8.326024	0.07054	0.031711
D3	3.257867	0.034415	0.134642	0.708697	0.667679	0.086724	0.364196
D4	4.16083	0.057925	0.175296	0.768336	0.655982	0.128367	0.42375
D5	4.862509	0.053678	0.189697	0.618975	0.424163	0.123839	0.50201
D6	4.866456	0.082855	0.25248	0.745	1.341955	0.143528	0.307506
D7	4.191666	0.056862	0.168254	0.803681	0.505517	0.106343	0.430655
D8	5.510896	0.070326	0.226055	0.60834	0.556508	0.149612	0.434224
D9	4.56941	0.07079	0.214111	0.566472	0.592127	0.127374	0.407254
D10	3.929294	0.043877	0.180003	0.790708	0.488609	0.109947	0.384154
D11	5.268176	0.061944	0.253697	0.85194	0.631778	0.152267	0.56649
D12	4.615484	0.057754	0.223051	0.538789	0.422727	0.140787	0.385013
D13	4.464815	0.045141	0.17158	0.675008	0.296502	0.121954	0.501594
D14	4.845151	0.056555	0.205676	0.640739	0.643056	0.138647	0.393458
D15	4.785345	0.04606	0.213606	0.841651	0.519816	0.122997	0.487678
D16	3.493794	0.060527	0.405769	1.640592	5.682108	0.136524	0.210585
D17	3.500033	0.058823	0.187613	0.698962	0.674841	0.100846	0.2903
D18	6.558848	0.075871	0.283718	0.882798	0.748198	0.170148	0.60458
D19	5.883144	0.072871	0.202255	0.647267	0.538715	0.129045	0.563109

[表5]

表５：集団Ｄの各個体における遺伝的特徴とステビオール配糖体含量(2)

	RebN	RebE	RebG	TSG	遺伝的特徴		
					(1)	(2)	(3)
D1	0.195551	0.029291	0.022924	5.849592	+	+	+
D2	0.222554	0.407336	0.001212	11.18075	+	−	−
D3	0.204749	0.062075	0.014429	5.535473	+	−	−
D4	0.213538	0.067643	0.021041	6.672708	−	−	−
D5	0.227532	0.029941	0.027726	7.060069	+	−	+
D6	0.218615	0.097505	0.017094	8.072995	−	−	−
D7	0.204151	0.059816	0.018816	6.545763	−	−	−
D8	0.184117	0.038801	0.029304	7.808183	+	+	+
D9	0.219927	0.036621	0.026802	6.830889	−	+	−
D10	0.222371	0.074409	0.018621	6.241992	−	−	−
D11	0.239466	0.041327	0.028073	8.095157	+	+	+
D12	0.188742	0.024114	0.027363	6.623824	+	+	+
D13	0.192024	0.02501	0.026856	6.520484	+	+	+
D14	0.196012	0.041175	0.025163	7.185632	−	−	−
D15	0.277432	0.072566	0.023764	7.390915	−	−	−
D16	0.914819	0.805707	0.009424	13.35985	−	+	−
D17	0.181951	0.090016	0.014099	5.797483	−	+	−
D18	0.292307	0.049884	0.034963	9.701315	+	+	+
D19	0.189892	0.027548	0.032505	8.28635	+	+	+

[表6]

表６：集団Ｅの各個体における遺伝的特徴とステビオール配糖体含量(1)

	RebA	RebB	RebC	RebD	STV	RebF	RebM
E1	6.212014	0.08345	0.353489	1.527452	0.580656	0.179668	0.699396
E2	5.494182	0.069253	0.293227	1.03409	0.336375	0.16077	0.525671
E3	5.328516	0.081557	0.339177	1.370539	0.611505	0.155067	0.595811
E4	5.062766	0.115883	0.273386	0.841787	0.558974	0.163897	0.497085
E5	4.942109	0.114826	0.296842	1.543154	0.895254	0.167892	0.543025
E6	4.804184	0.066037	0.308115	1.38401	0.633898	0.132978	0.580827
E7	4.714854	0.100245	0.323253	1.258979	0.7609	0.168677	0.627197
E8	4.536913	0.102653	0.333878	1.523125	1.172038	0.152576	0.496633
E9	4.359091	0.058133	0.251408	1.215211	0.457543	0.131297	0.380999
E10	4.320248	0.091127	0.333971	1.65393	1.266273	0.156107	0.431699
E11	4.273264	0.077975	0.261763	0.957788	0.587064	0.136029	0.457316
E12	4.192727	0.059748	0.25654	0.967966	0.412565	0.131087	0.56032
E13	4.097659	0.070991	0.279959	1.267255	0.753104	0.133434	0.392471
E14	4.047772	0.065048	0.264484	1.475195	0.653541	0.126641	0.37178
E15	3.900042	0.056164	0.239808	1.203235	0.675194	0.11243	0.351592
E16	3.757846	0.04953	0.235004	1.122951	0.566276	0.121198	0.38443
E17	3.65434	0.058824	0.236257	0.802084	0.3828	0.106982	0.439652
E18	2.958756	0.050949	0.193802	0.980468	0.664142	0.092961	0.23725
E19	1.637071	0.021774	0.110002	0.580188	0.235393	0.045445	0.179728

[表7]

表７：集団Ｅの各個体における遺伝的特徴とステビオール配糖体含量(2)

	RebN	RebE	RebG	TSG	遺伝的特徴		
					(1)	(2)	(3)
E1	0.435594	0.040229	0.028475	10.14042	+	−	+
E2	0.247463	0.022732	0.031447	8.215209	+	+	+
E3	0.327764	0.040688	0.025262	8.875887	+	+	+
E4	0.245377	0.024755	0.031007	7.814917	+	+	+
E5	0.298146	0.086386	0.018561	8.906195	−	+	−
E6	0.364529	0.043525	0.021901	8.340002	−	−	−
E7	0.307969	0.036533	0.020437	8.319044	+	+	+
E8	0.305352	0.077788	0.014755	8.71571	−	−	−
E9	0.243684	0.063472	0.019652	7.180491	−	+	−
E10	0.319594	0.091746	0.012276	8.676971	−	−	−
E11	0.282583	0.037514	0.02473	7.096026	+	−	+
E12	0.260861	0.021816	0.023504	6.887134	+	−	+
E13	0.261667	0.062925	0.014538	7.334003	−	−	−
E14	0.320524	0.088621	0.012988	7.426595	−	−	−
E15	0.230327	0.062189	0.015318	6.846298	−	−	−
E16	0.23222	0.048419	0.013996	6.531871	−	+	−
E17	0.207458	0.018175	0.020077	5.92665	+	+	+
E18	0.18784	0.061801	0.010027	5.437996	−	−	−
E19	0.123416	0.026538	0.006378	2.965934	−	+	−

[0158] 上記結果より、集団D及びEにおいても同様の傾向が認められることが明らかとなった。

次に、測定した各ステビオール配糖体の含量と本発明の遺伝的特徴との関連性について検討した。具体的には、集団C～Eを合わせた集団において、本発明の遺伝的特徴を有する個体群とそれ以外の個体群とで、各ステビオール配糖体の含量について統計学的な有意差があるかをウェルチのt検定で評価した。結果を表8に示す。表中、例えば「遺伝的特徴1」の結果は、遺伝的特徴(1)を有する個体群とそれ以外の個体群(すなわち、遺伝的特徴(1)を有する個体以外の個体群)における各ステビオール配糖体の含量を分析した結果であり、「遺伝的特徴1+2」の結果は、遺伝的特徴(1)と(2)を両方有する個体群とそ

れ以外の個体群(すなわち、遺伝的特徴(1)と(2)を両方有する個体以外の個体群)における各ステビオール配糖体の含量を分析した結果であり、「遺伝的特徴1/2/3」の結果は、遺伝的特徴(1)、(2)及び(3)の少なくとも1つを有する個体群とそれ以外の個体群(すなわち、遺伝的特徴(1)、(2)及び(3)のいずれも有しない個体群)における各ステビオール配糖体の含量を分析した結果である。又、「+」はP<0.05、「++」はP<0.01で遺伝的特徴を有する個体群の方が、それ以外の個体の個体群より含量が多いこと、「-」はP<0.05、「--」はP<0.01で遺伝的特徴を有する個体群の方が、それ以外の個体の個体群より含量が少ないこと、「±」は、両個体群の含量が有意水準0.05で有意差が認められなかったことをそれぞれ示す。

[0159] [表8]

表8：遺伝的特徴とステビオール配糖体含量との関連性

	遺伝的特徴							
	1	2	3	1+2	2+3	1+3	1+2+3	1/2/3
RebA	++	±	++	++	++	++	++	+
RebB	+	±	++	+	++	++	+	+
RebC	±	±	±	±	±	±	±	±
RebD	−−	−−	−−	−−	−−	−−	−−	−−
RebE	−−	−−	−−	−−	−−	−−	−−	−−
RebF	+	±	++	±	+	++	±	±
RebG	++	±	+	+	±	++	+	++
RebM	+	±	+	±	±	++	±	±
RebN	−−	−	−−	−−	−−	−−	−−	−
STV	±	−	−−	−−	−−	−−	−−	±
TSG	±	±	±	±	±	±	±	±

[0160] 上記結果より、本発明の遺伝的特徴を有する個体は、本発明の遺伝的特徴を有しない個体に比べ、RebA、RebB、RebF、RebG及び/又はRebMの含量が多い傾向、及び/又は、RebD、RebE、RebN及び/又はステビオシドの含量が少ない傾向を有することが明らかとなった。又、遺伝的特徴(1)と(3)の組合せに着目することにより、前記傾向をより低い有意水準で最も多く検出することができることも明らかとなった。検出できる傾向の数は、多い順に、遺伝的特徴(3)及び遺伝的特徴(1)と(3)の組合せ(傾向数：9)、遺伝的特徴(1)(傾向数：8)、遺伝的特徴(1)と(2)の組合せ、遺伝的特徴(2)と(3)の組合せ及び遺伝

的特徴(1)～(3)の組合せ(傾向数：7)、遺伝的特徴(1)～(3)の少なくとも1つ(傾向数：6)、遺伝的特徴(2)(傾向数：4)であった。

[0161] 多数の様々な改変が、本発明の精神から逸脱せずになされ得ることを当業者は理解する。したがって、本明細書に記載された本発明の形態は例示にすぎず、本発明の範囲を制限する意図がないことを理解すべきである。

[0162]

SEQUENCE LISTING

<110> SUNTORY HOLDINGS LIMITED

<120> Method of screening stevia plant

<130> P3089

<150> JP 2022-106616
<151> 2022-06-30

<160> 54

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 215
<212> DNA
<213> Stevia rebaudiana

<400> 1
aatggcaagc agaaatcgcc agcttataga atcaaatgcc tttttaaaat caaccttaaa
60

tagcataagt ttatgtttat ctttttggc ccaatttaca cctcattaat catgatgtgc
120

ccatcaaaga tgcttcgacc ttgaatgtag gttgattgtt taggaacaat tacgttatga
180

atgatctttt gaatccgaat tgccaacaac tttcc
215

<210> 2
<211> 204

<212> DNA
<213> Stevia rebaudiana

<400> 2
aaaggaccca gtggtggttg ttcgtgacgg ccagaacccc gtcttagggc catagcgacg
60

gcggctaggg tttacagccg tgaactctgg tcccaactca gttcatttgc gattttcggc
120

tgaaataggt aagctctgac tccctttttgt tgcgaaatcg ctcccgatct tgcttccttt
180

tcctcaatct agcttaatgt cggt
204

<210> 3
<211> 121
<212> DNA
<213> Stevia rebaudiana

<400> 3
tggtcctttg tcatggtcga ttctttagtt tgcatgatta agtattctca gcaagcagtt
60

tttataaaaa gtgactggaa caatgtctaa ctaggggtga tattctagat ggtaagtaac
120

a
121

<210> 4
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic DNA

<400> 4
aatggcaagc agaaatcgcc
20

<210> 5
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic DNA

<400> 5
ggaaagttgt tggcaattcg ga
22

<210> 6
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic DNA

<400> 6
aaaggaccca gtggtggttg
20

<210> 7
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic DNA

<400> 7
accgacatta agctagattg aggaa
25

<210> 8
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic DNA

<400> 8
tggtcctttg tcatggtcga t
21

<210> 9
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic DNA

<400> 9
tgttacttac catctagaat atcaccc
27

<210> 10
<211> 215
<212> DNA
<213> Stevia rebaudiana

<400> 10
aatggcaagc agaaatcgcc agcttataga atcaaatgcc tttttaaaat caaccttaaa
60

tagcataagt ttatgtttat ctttttggc ccaatttaca cctcattaat catgatgtgc
120

ccatcaaaga tgcttcgacc ttgaatgtag gttgattgtt taggaacaat tacgttatga
180

atggtctttt gaatccgaat tgccaacaac tttcc
215

<210> 11
<211> 21
<212> DNA
<213> Stevia rebaudiana

<400> 11
gttatgaatg gtcttttgaa t
21

<210> 12
<211> 41
<212> DNA
<213> Stevia rebaudiana

<400> 12
gaacaattac gttatgaatg gtcttttgaa tccgaattgc c
41

<210> 13
<211> 61
<212> DNA
<213> Stevia rebaudiana

<400> 13
gattgtttag gaacaattac gttatgaatg gtcttttgaa tccgaattgc caacaacttt
60

c
61

<210> 14
<211> 204
<212> DNA
<213> Stevia rebaudiana

<400> 14
aaaggaccca gtggtggttg ttcgtgacgg ccagaacccc gtcttagggc catagcgacg
60

gcggctaggg tttacagccg tgaactctgg tcccaactca gttcatttgc gattttcggc
120

tgaaataggt aagctctgac tccctttttgt tgcgaaatcg ctcccgatcc tgcttccttt
180

tcctcaatct agcttaatgt cggt
204

<210> 15
<211> 21
<212> DNA
<213> Stevia rebaudiana

<400> 15
gctcccgatc ctgcttcctt t
21

<210> 16
<211> 41
<212> DNA
<213> Stevia rebaudiana

<400> 16

ttgcgaaatc gctcccgatc ctgcttcctt ttcctcaatc t
41

<210> 17
<211> 61
<212> DNA
<213> Stevia rebaudiana

<400> 17
ctccctttg ttgcgaaatc gctcccgatc ctgcttcctt ttcctcaatc tagcttaatg
60

t
61

<210> 18
<211> 121
<212> DNA
<213> Stevia rebaudiana

<400> 18
tggtcctttg tcatggtcga ttctttagtt tgcatgatta agtattctca gcaagcagtt
60

tttataaaaa gtgactggaa caatgtctaa ccaggggtga tattctagat ggtaagtaac
120

a
121

<210> 19
<211> 21
<212> DNA
<213> Stevia rebaudiana

<400> 19

aatgtctaac caggggtgat a
21

<210> 20
<211> 41
<212> DNA
<213> Stevia rebaudiana

<400> 20
tgactggaac aatgtctaac caggggtgat attctagatg g
41

<210> 21
<211> 61
<212> DNA
<213> Stevia rebaudiana

<400> 21
ttataaaaag tgactggaac aatgtctaac caggggtgat attctagatg gtaagtaaca
60

t
61

<210> 22
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic DNA

<400> 22
attttcttcc aaaccccttt
20

<210> 23
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic DNA

<400> 23
ttattggaaa gttgttggca attcggattc aagata
36

<210> 24
<211> 248
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic DNA

<400> 24
attttcttcc aaaccccttt tgatccataa tggcaagcag aaatcgccag cttatagaat
60

caaatgcctt tttaaaatca accttaaata gcataagttt atgtttatct tttttggccc
120

aatttacacc tcattaatca tgatgtgccc atcaaagatg cttcgacctt gaatgtaggt
180

tgattgttta ggaacaatta cgttatgaat gatatcttga atccgaattg ccaacaactt
240

tccaataa
248

<210> 25
<211> 248

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic DNA

<400> 25
attttcttcc aaaccccttt tgatccataa tggcaagcag aaatcgccag cttatagaat
60

caaatgcctt tttaaaatca accttaaata gcataagttt atgtttatct tttttggccc
120

aatttacacc tcattaatca tgatgtgccc atcaaagatg cttcgacctt gaatgtaggt
180

tgattgttta ggaacaatta cgttatgaat ggtatcttga atccgaattg ccaacaactt
240

tccaataa
248

<210> 26
<211> 213
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic DNA

<400> 26
attttcttcc aaaccccttt tgatccataa tggcaagcag aaatcgccag cttatagaat
60

caaatgcctt tttaaaatca accttaaata gcataagttt atgtttatct tttttggccc
120

aatttacacc tcattaatca tgatgtgccc atcaaagatg cttcgacctt gaatgtaggt
180

tgattgttta ggaacaatta cgttatgaat gat
213

<210> 27
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic DNA

<400> 27
atcttgaatc cgaattgcca acaactttcc aataa
35

<210> 28
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic DNA

<400> 28
gagcctcctg ttactgattg
20

<210> 29
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic DNA

<400> 29

tataccgaca ttaagctaga ttgaggaaaa ggcagct
37

<210> 30
<211> 242
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic DNA

<400> 30
gagcctcctg ttactgattg gggctcagtt tgagtaaagg acccagtggt ggttgttcgt
60

gacggccaga accccgtctt agggccatag cgacggcggc tagggtttac agccgtgaac
120

tctggtccca actcagttca tttgcgattt tcggctgaaa taggtaagct ctgactccct
180

tttgttgcga aatcgctccc gatctagctg ccttttcctc aatctagctt aatgtcggta
240

ta
242

<210> 31
<211> 242
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic DNA

<400> 31
gagcctcctg ttactgattg gggctcagtt tgagtaaagg acccagtggt ggttgttcgt
60

gacggccaga accccgtctt agggccatag cgacggcggc tagggtttac agccgtgaac
120

tctggtccca actcagttca tttgcgattt tcggctgaaa taggtaagct ctgactccct
180

tttgttgcga aatcgctccc gatccagctg ccttttcctc aatctagctt aatgtcggta
240

ta
242

<210> 32
<211> 207
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic DNA

<400> 32
gagcctcctg ttactgattg gggctcagtt tgagtaaagg acccagtggt ggttgttcgt
60

gacggccaga accccgtctt agggccatag cgacggcggc tagggtttac agccgtgaac
120

tctggtccca actcagttca tttgcgattt tcggctgaaa taggtaagct ctgactccct
180

tttgttgcga aatcgctccc gatccag
207

<210> 33
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic DNA

<400> 33
ctgccttttc ctcaatctag cttaatgtcg gtata
35

<210> 34
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic DNA

<400> 34
ggatggggaa tagatgaac
19

<210> 35
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic DNA

<400> 35
tgcatatatg ttacttacca tctagaatat cacagct
37

<210> 36
<211> 284
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic DNA

<400> 36
ggatggggaa tagatgaaca aagttaatgt aaaaagctaa attttaagca actttgaaat
60

ttttggaaaa tgccttaagg cgagttcaaa tgcagttaaa agtcagattt ttcagtttaa
120

atcaccaact tcttacctgc tagcgaattg gtttttggtc ctttgtcatg gtcgattctt
180

tagtttgcat gattaagtat tctcagcaag cagtttttat aaaaagtgac tggaacaatg
240

tctaaccagc tgtgatattc tagatggtaa gtaacatata tgca
284

<210> 37
<211> 249
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic DNA

<400> 37
ggatggggaa tagatgaaca aagttaatgt aaaaagctaa attttaagca actttgaaat
60

ttttggaaaa tgccttaagg cgagttcaaa tgcagttaaa agtcagattt ttcagtttaa
120

atcaccaact tcttacctgc tagcgaattg gtttttggtc ctttgtcatg gtcgattctt
180

tagtttgcat gattaagtat tctcagcaag cagtttttat aaaaagtgac tggaacaatg
240

tctaaccag
249

<210> 38
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic DNA

<400> 38
ctgtgatatt ctagatggta agtaacatat atgca
35

<210> 39
<211> 284
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic DNA

<400> 39
ggatggggaa tagatgaaca aagttaatgt aaaaagctaa attttaagca actttgaaat
60

ttttggaaaa tgccttaagg cgagttcaaa tgcagttaaa agtcagattt ttcagtttaa
120

atcaccaact tcttacctgc tagcgaattg gtttttggtc ctttgtcatg gtcgattctt
180

tagtttgcat gattaagtat tctcagcaag cagtttttat aaaaagtgac tggaacaatg
240

tctaactagc tgtgatattc tagatggtaa gtaacatata tgca
284

<210> 40
<211> 21
<212> DNA
<213> Stevia rebaudiana

<400> 40
gttatgaatg atcttttgaa t
21

<210> 41
<211> 41
<212> DNA
<213> Stevia rebaudiana

<400> 41
gaacaattac gttatgaatg atcttttgaa tccgaattgc c
41

<210> 42
<211> 61
<212> DNA
<213> Stevia rebaudiana

<400> 42
gattgtttag gaacaattac gttatgaatg atcttttgaa tccgaattgc caacaacttt
60

c
61

<210> 43
<211> 21
<212> DNA

<213> Stevia rebaudiana

<400> 43
gctcccgatc ttgcttcctt t
21

<210> 44
<211> 41
<212> DNA
<213> Stevia rebaudiana

<400> 44
ttgcgaaatc gctcccgatc ttgcttcctt ttcctcaatc t
41

<210> 45
<211> 61
<212> DNA
<213> Stevia rebaudiana

<400> 45
ctccctttg ttgcgaaatc gctcccgatc ttgcttcctt ttcctcaatc tagcttaatg
60

t
61

<210> 46
<211> 21
<212> DNA
<213> Stevia rebaudiana

<400> 46
aatgtctaac taggggtgat a
21

<210> 47
<211> 41
<212> DNA
<213> Stevia rebaudiana

<400> 47
tgactggaac aatgtctaac taggggtgat attctagatg g
41

<210> 48
<211> 61
<212> DNA
<213> Stevia rebaudiana

<400> 48
ttataaaaag tgactggaac aatgtctaac taggggtgat attctagatg gtaagtaaca
60

t
61

<210> 49
<211> 248
<212> DNA
<213> Stevia rebaudiana

<400> 49
attttcttcc aaacccctttt tgatccataa tggcaagcag aaatcgccag cttatagaat
60

caaatgcctt tttaaaatca accttaaata gcataagttt atgtttatct tttttggccc
120

aatttacacc tcattaatca tgatgtgccc atcaaagatg cttcgacctt gaatgtaggt
180

tgattgttta ggaacaatta cgttatgaat gatcttttga atccgaattg ccaacaactt
240

tccaataa
248

<210> 50
<211> 248
<212> DNA
<213> Stevia rebaudiana

<400> 50
attttcttcc aaaccccttt tgatccataa tggcaagcag aaatcgccag cttatagaat
60

caaatgcctt tttaaaatca accttaaata gcataagttt atgtttatct tttttggccc
120

aatttacacc tcattaatca tgatgtgccc atcaaagatg cttcgacctt gaatgtaggt
180

tgattgttta ggaacaatta cgttatgaat ggtcttttga atccgaattg ccaacaactt
240

tccaataa
248

<210> 51
<211> 242
<212> DNA
<213> Stevia rebaudiana

<400> 51
gagcctcctg ttactgattg gggctcagtt tgagtaaagg acccagtggt ggttgttcgt
60

gacggccaga accccgtctt agggccatag cgacggcggc tagggtttac agccgtgaac
120

tctggtccca actcagttca tttgcgattt tcggctgaaa taggtaagct ctgactccct
180

tttgttgcga aatcgctccc gatcttgctt ccttttcctc aatctagctt aatgtcggta
240

ta
242

<210> 52
<211> 242
<212> DNA
<213> Stevia rebaudiana

<400> 52
gagcctcctg ttactgattg gggctcagtt tgagtaaagg acccagtggt ggttgttcgt
60

gacggccaga accccgtctt agggccatag cgacggcggc tagggtttac agccgtgaac
120

tctggtccca actcagttca tttgcgattt tcggctgaaa taggtaagct ctgactccct
180

tttgttgcga aatcgctccc gatcctgctt ccttttcctc aatctagctt aatgtcggta
240

ta
242

<210> 53
<211> 284
<212> DNA
<213> Stevia rebaudiana

<400> 53
ggatggggaa tagatgaaca aagttaatgt aaaaagctaa attttaagca actttgaaat
60

ttttggaaaa tgccttaagg cgagttcaaa tgcagttaaa agtcagattt ttcagtttaa
120

atcaccaact tcttacctgc tagcgaattg gtttttggtc ctttgtcatg gtcgattctt
180

tagtttgcat gattaagtat tctcagcaag cagtttttat aaaaagtgac tggaacaatg
240

tctaactagg ggtgatattc tagatggtaa gtaacatata tgca
284

<210> 54
<211> 284
<212> DNA
<213> Stevia rebaudiana

<400> 54
ggatggggaa tagatgaaca aagttaatgt aaaaagctaa attttaagca actttgaaat
60

ttttggaaaa tgccttaagg cgagttcaaa tgcagttaaa agtcagattt ttcagtttaa
120

atcaccaact tcttacctgc tagcgaattg gtttttggtc ctttgtcatg gtcgattctt
180

tagtttgcat gattaagtat tctcagcaag cagtttttat aaaaagtgac tggaacaatg
240

tctaaccagg ggtgatattc tagatggtaa gtaacatata tgca
284

請求の範囲

[請求項1] 被験ステビア植物体のゲノムから、以下の遺伝的特徴(1)～(3)の少なくとも1つの存在及び/又は不在を検出する工程を含む、以下の化学的特徴(a)～(r)の少なくとも1つを有するステビア植物体をスクリーニングする方法。

(1)配列番号1の184位に相当する位置の塩基がGであるアレルについてヘテロ接合性又はホモ接合性である。

(2)配列番号2の170位に相当する位置の塩基がCであるアレルについてヘテロ接合性又はホモ接合性である。

(3)配列番号3の92位に相当する位置の塩基がCであるアレルについてヘテロ接合性又はホモ接合性である。

(a)遺伝的特徴(1)～(3)をいずれも有しないステビア植物体に比べ、レバウジオシド(Reb)Dに対するRebMの含有比が高い。

(b)遺伝的特徴(1)～(3)をいずれも有しないステビア植物体に比べ、RebEに対するRebBの含有比が高い。

(c)遺伝的特徴(1)～(3)をいずれも有しないステビア植物体に比べ、RebEに対するRebGの含有比が高い。

(d)遺伝的特徴(1)～(3)をいずれも有しないステビア植物体に比べ、ステビオシドに対するRebGの含有比が高い。

(e)遺伝的特徴(1)～(3)をいずれも有しないステビア植物体に比べ、RebAの含有量が多い。

(f)遺伝的特徴(1)～(3)をいずれも有しないステビア植物体に比べ、RebBの含有量が多い。

(g)遺伝的特徴(1)～(3)をいずれも有しないステビア植物体に比べ、RebFの含有量が多い。

(h)遺伝的特徴(1)～(3)をいずれも有しないステビア植物体に比べ、RebGの含有量が多い。

(i)遺伝的特徴(1)～(3)をいずれも有しないステビア植物体に比べ、R

ebMの含有量が多い。

(j)遺伝的特徴(1)～(3)をいずれも有しないステビア植物体に比べ、β-1,3-グルコシド結合を有するステビオール配糖体の含有量が多い。

(k)遺伝的特徴(1)～(3)をいずれも有しないステビア植物体に比べ、RebDの含有量が少ない。

(l)遺伝的特徴(1)～(3)をいずれも有しないステビア植物体に比べ、RebEの含有量が少ない。

(m)遺伝的特徴(1)～(3)をいずれも有しないステビア植物体に比べ、RebNの含有量が少ない。

(n)遺伝的特徴(1)～(3)をいずれも有しないステビア植物体に比べ、ステビオシドの含有量が少ない。

(o)遺伝的特徴(1)～(3)をいずれも有しないステビア植物体に比べ、β-1,3-グルコシド結合を有しないステビオール配糖体の含有量が少ない。

(p)遺伝的特徴(1)～(3)をいずれも有しないステビア植物体に比べ、RebD、RebE、RebN、ステビオシドのいずれか1つに対する、RebA、RebB、RebF、RebG、RebMのいずれか1つの含有比が高い。

(q)遺伝的特徴(1)～(3)をいずれも有しないステビア植物体に比べ、β-1,3-グルコシド結合を有しないステビオール配糖体に対するβ-1,3-グルコシド結合を有するステビオール配糖体の含有比が高い。

(r)遺伝的特徴(1)～(3)をいずれも有しないステビア植物体に比べ、UGT76G1の基質ステビオール配糖体に対する、前記基質ステビオール配糖体からUGT76G1により生成されるステビオール配糖体の含有比が高い。

[請求項2] 遺伝的特徴の存在及び/又は不在が検出された被験ステビア植物組織のRebA、RebB、RebD、RebE、RebF、RebG、RebM、RebN及び/又はステビオシドの含有量を測定する工程をさらに含む、請求項1に記載の

方法。

[請求項3] 遺伝的特徴の存在及び/又は不在を検出する工程が、CAPS法、dCAPS法又はTaqMan PCR法を用いて行われる、請求項1又は2に記載の方法。

[請求項4] 請求項1に定義された遺伝的特徴(1)～(3)の少なくとも1つの存在及び/又は不在を検出するための試薬を含む、請求項1に定義された化学的特徴(a)～(r)の少なくとも1つを有するステビア植物体のスクリーニングキット。

[請求項5] 試薬が、CAPS法、dCAPS法又はTaqMan PCR法に使用するプライマー及び/又はプローブを含む、請求項4に記載のキット。

[請求項6] 請求項1に定義された遺伝的特徴(1)～(3)の少なくとも1つを有するステビア植物体。

[請求項7] 請求項1に定義された化学的特徴(a)～(r)の少なくとも1つを有する、請求項6に記載の植物体。

[請求項8] 非遺伝子組換植物体である、請求項6又は7に記載の植物体。

[請求項9] 変異誘発処理を行ったステビア植物体及びその子孫植物体を含む、請求項6～8のいずれか一項に記載の植物体。

[請求項10] 請求項6～9のいずれか一項に記載の植物体の種子、組織、乾燥葉、組織培養物又は細胞。

[請求項11] 胚、分裂組織細胞、花粉、葉、根、根端、花弁、プロトプラスト、葉の切片及びカルスから選択される、請求項10に記載の組織、組織培養物又は細胞。

[請求項12] 請求項6～9のいずれか一項に記載のステビア植物体と第2のステビア植物体とを交雑させる工程を含む、請求項1に定義された化学的特徴(a)～(r)の少なくとも1つを有するステビア植物体を作出する方法。

[請求項13] 第2の植物体が請求項6～9のいずれか一項に記載のステビア植物体である、請求項12に記載の方法。

[請求項14] ステビア植物体のゲノムに、前記ゲノムが請求項1に定義された遺伝的特徴(1)～(3)の少なくとも1つを有するように改変を加える工程を含む、請求項1に定義された化学的特徴(a)～(r)の少なくとも1つを有するステビア植物体を作出する方法。

[請求項15] ゲノムの改変が、変異誘発処理によって行われる、請求項14に記載の方法。

[請求項16] 以下の化学的特徴(a')～(r')の少なくとも1つを有する、請求項6～9のいずれか一項に記載の植物体、請求項10又は11に記載の種子、組織、乾燥葉、組織培養物又は細胞の抽出物。

(a')請求項1に定義された遺伝的特徴(1)～(3)をいずれも有しないステビア植物体の抽出物に比べ、レバウジオシド(Reb)Dに対するRebMの含有比が高い。

(b')請求項1に定義された遺伝的特徴(1)～(3)をいずれも有しないステビア植物体の抽出物に比べ、RebEに対するRebBの含有比が高い。

(c')請求項1に定義された遺伝的特徴(1)～(3)をいずれも有しないステビア植物体の抽出物に比べ、RebEに対するRebGの含有比が高い。

(d')請求項1に定義された遺伝的特徴(1)～(3)をいずれも有しないステビア植物体の抽出物に比べ、ステビオシドに対するRebGの含有比が高い。

(e')請求項1に定義された遺伝的特徴(1)～(3)をいずれも有しないステビア植物体の抽出物に比べ、RebAの含有量が多い。

(f')請求項1に定義された遺伝的特徴(1)～(3)をいずれも有しないステビア植物体の抽出物に比べ、RebBの含有量が多い。

(g')請求項1に定義された遺伝的特徴(1)～(3)をいずれも有しないステビア植物体の抽出物に比べ、RebFの含有量が多い。

(h')請求項1に定義された遺伝的特徴(1)～(3)をいずれも有しないステビア植物体の抽出物に比べ、RebGの含有量が多い。

(i')請求項1に定義された遺伝的特徴(1)～(3)をいずれも有しないス

テビア植物体の抽出物に比べ、RebMの含有量が多い。

(j')請求項1に定義された遺伝的特徴(1)～(3)をいずれも有しないステビア植物体の抽出物に比べ、β-1,3-グルコシド結合を有するステビオール配糖体の含有量が多い。

(k')請求項1に定義された遺伝的特徴(1)～(3)をいずれも有しないステビア植物体の抽出物に比べ、RebDの含有量が少ない。

(l')請求項1に定義された遺伝的特徴(1)～(3)をいずれも有しないステビア植物体の抽出物に比べ、RebEの含有量が少ない。

(m')請求項1に定義された遺伝的特徴(1)～(3)をいずれも有しないステビア植物体の抽出物に比べ、RebNの含有量が少ない。

(n')請求項1に定義された遺伝的特徴(1)～(3)をいずれも有しないステビア植物体の抽出物に比べ、ステビオシドの含有量が少ない。

(o')請求項1に定義された遺伝的特徴(1)～(3)をいずれも有しないステビア植物体の抽出物に比べ、β-1,3-グルコシド結合を有しないステビオール配糖体の含有量が少ない。

(p')請求項1に定義された遺伝的特徴(1)～(3)をいずれも有しないステビア植物体の抽出物に比べ、RebD、RebE、RebN、ステビオシドのいずれか1つに対する、RebA、RebB、RebF、RebG、RebMのいずれか1つの含有比が高い。

(q')請求項1に定義された遺伝的特徴(1)～(3)をいずれも有しないステビア植物体の抽出物に比べ、β-1,3-グルコシド結合を有しないステビオール配糖体に対するβ-1,3-グルコシド結合を有するステビオール配糖体の含有比が高い。

(r')請求項1に定義された遺伝的特徴(1)～(3)をいずれも有しないステビア植物体の抽出物に比べ、UGT76G1の基質ステビオール配糖体に対する、前記基質ステビオール配糖体からUGT76G1により生成されるステビオール配糖体の含有比が高い。

[請求項17] 請求項6～9のいずれか一項に記載の植物体、請求項10又は11に記載

の種子、組織、乾燥葉、組織培養物又は細胞から抽出物を得る工程を含む、請求項16に定義された化学的特徴(a')～(r')の少なくとも1つを有する抽出物の製造方法。

[請求項18] 請求項16に記載の抽出物からβ-1,3-グルコシド結合を有するステビオール配糖体を精製する工程を含む、β-1,3-グルコシド結合を有するステビオール配糖体の製造方法。

[請求項19] 請求項6～9のいずれか一項に記載の植物体の抽出物、請求項10又は11に記載の種子、組織、乾燥葉、組織培養物又は細胞の抽出物、或いは、請求項16に記載の抽出物を提供する工程、及び
前記抽出物を、食品、甘味料組成物、香料又は医薬品の原料に添加する工程
を含む、食品、甘味料組成物、香料又は医薬品の製造方法。

[図1]

AATGGCAAGCAGAAATCGCCAGCTTATAGAATCAAATGCCTTTTTAAAATCAA
CCTTAAATAGCATAAGTTTATGTTTATCTTTTTTGGCCCAATTTACACCTCATT
AATCATGATGTGCCCATCAAAGATGCTTCGACCTTGAATGTAGGTTGATTGT
TTAGGAACAATTACGTTATGAATGATCTTTTGAATCCGAATTGCCAACAACTT
TCC
(SEQ ID NO:1)

[図2]

AAAGGACCCAGTGGTGGTTGTTCGTGACGGCCAGAACCCCGTCTTAGGGC
CATAGCGACGGCGGCTAGGGTTTACAGCCGTGAACTCTGGTCCCAACTCA
GTTCATTTGCGATTTTCGGCTGAAATAGGTAAGCTCTGACTCCCTTTTGTTG
CGAAATCGCTCCCGATCTTGCTTCCTTTTCCTCAATCTAGCTTAATGTCGGT
(SEQ ID NO:2)

[図3]

TGGTCCTTTGTCATGGTCGATTCTTTAGTTTGCATGATTAAGTATTCTCAGCA
AGCAGTTTTTATAAAAAGTGACTGGAACAATGTCTAACTAGGGGTGATATTC
TAGATGGTAAGTAACA
(SEQ ID NO:3)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2023/024180

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q 1/6895(2018.01)i; ***A01H 6/14***(2018.01)i; ***A23L 33/105***(2016.01)i; ***C12N 15/11***(2006.01)i; ***C12P 15/00***(2006.01)i; ***C12Q 1/686***(2018.01)i
FI: C12Q1/6895 Z; A01H6/14; C12P15/00; C12N15/11 Z; A23L33/105; C12Q1/686 Z ZNA

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q1/6895; A01H6/14; A23L33/105; C12N15/11; C12P15/00; C12Q1/686

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

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2023
Registered utility model specifications of Japan 1996-2023
Published registered utility model applications of Japan 1994-2023

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2021/230257 A1 (SUNTORY HOLDINGS LTD.) 18 November 2021 (2021-11-18) claims, examples	16, 19
A		1-15, 17, 18
X	WO 2019/074089 A1 (SUNTORY HOLDINGS LTD.) 18 April 2019 (2019-04-18) claims, examples	16, 19
A		1-15, 17, 18
X	WO 2018/124142 A1 (SUNTORY HOLDINGS LTD.) 05 July 2018 (2018-07-05) claims, examples	16, 19
X	JP 2014-502505 A (GLG LIFE TECH CORP.) 03 February 2014 (2014-02-03) claims, examples	16, 19
A		1-15, 17, 18

☐ 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	Date of mailing of the international search report
12 September 2023	**19 September 2023**
Name and mailing address of the ISA/JP **Japan Patent Office (ISA/JP)** **3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915** **Japan**	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2023/024180

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
   a. ☑ forming part of the international application as filed:
      ☑ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
      ☐ on paper or in the form of an image file.
   b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
   c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
      ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
      ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

In the form of an Annex C/ST.25 text file" above should be understood as "in ST.26 format".

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2023/024180

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
WO 2021/230257 A1	18 November 2021	EP 4151743 A1 claims, examples CN 115552039 A	
WO 2019/074089 A1	18 April 2019	US 2020/0281141 A1 claims, examples EP 3695714 A1 CN 111163631 A	
WO 2018/124142 A1	05 July 2018	US 2020/0170209 A1 claims, examples EP 3569707 A1 CN 110114459 A	
JP 2014-502505 A	03 February 2014	US 2013/0347140 A1 claims, examples WO 2012/088612 A1	

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2023/024180

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

C12Q 1/6895(2018.01)i; A01H 6/14(2018.01)i; A23L 33/105(2016.01)i; C12N 15/11(2006.01)i; C12P 15/00(2006.01)i; C12Q 1/686(2018.01)i
FI: C12Q1/6895 Z; A01H6/14; C12P15/00; C12N15/11 Z; A23L33/105; C12Q1/686 Z ZNA

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

C12Q1/6895; A01H6/14; A23L33/105; C12N15/11; C12P15/00; C12Q1/686

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０２３年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０２３年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０２３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/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X	WO 2021/230257 A1 (サントリーホールディングス株式会社) 18.11.2021 (2021-11-18) 特許請求の範囲、実施例	16,19
A		1-15,17,18
X	WO 2019/074089 A1 (サントリーホールディングス株式会社) 18.04.2019 (2019-04-18) 特許請求の範囲、実施例	16,19
A		1-15,17,18
X	WO 2018/124142 A1 (サントリーホールディングス株式会社) 05.07.2018 (2018-07-05) 特許請求の範囲、実施例	16,19
X	JP 2014-502505 A (ジー エル ジー ライフ テック コーポレーション) 03.02.2014 (2014-02-03) 特許請求の範囲、実施例	16,19
A		1-15,17,18

☐ 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抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
“X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
“Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
“&” 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
12.09.2023	19.09.2023

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

権限のある職員（特許庁審査官）
山本　匡子 4B 3038

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2023/024180

第Ⅰ欄　　ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第１ページの１．ｃの続き）

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

a. ☑ 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
　☑ 附属書C/ST.25テキストファイル形式
　☐ 紙形式又はイメージファイル形式

b. ☐ 国際出願とともに、ＰＣＴ規則13の3.1(a)に基づき国際調査のためにのみ提出された、附属書C/ST.25テキストファイル形式の配列表

c. ☐ 国際出願日後に、国際調査のためにのみ提出された配列表
　☐ 附属書C/ST.25テキストファイル形式(ＰＣＴ規則13の3.1(a))
　☐ 紙形式又はイメージファイル形式（ＰＣＴ規則13の3.1(b)及びＰＣＴ実施細則第713号）

2. ☐ さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しが提出され、変更後の配列表又は追加の写しに記載された情報が、出願時における配列表と同一である旨、又は出願時における国際出願の開示の範囲を超えない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見:

上記「附属書C/ST.25テキストファイル形式」は「ST.26形式」と読み替える。

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
PCT/JP2023/024180

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
WO 2021/230257 A1	18.11.2021	EP 4151743 A1 CLAIMS, EXAMPLES CN 115552039 A	
WO 2019/074089 A1	18.04.2019	US 2020/0281141 A1 CLAIMS, EXAMPLES EP 3695714 A1 CN 111163631 A	
WO 2018/124142 A1	05.07.2018	US 2020/0170209 A1 CLAIMS, EXAMPLES EP 3569707 A1 CN 110114459 A	
JP 2014-502505 A	03.02.2014	US 2013/0347140 A1 CLAIMS, EXAMPLES WO 2012/088612 A1	