

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2017-529857

(P2017-529857A)

(43) 公表日 平成29年10月12日(2017.10.12)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 P 19/44 (2006.01)</b>	C 1 2 P 19/44 Z N A	4 B O 5 0
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B O 6 4
C O 7 K 14/415 (2006.01)	C O 7 K 14/415	4 H O 4 5
C 1 2 N 9/00 (2006.01)	C 1 2 N 9/00	
C 1 2 N 9/10 (2006.01)	C 1 2 N 9/10	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 79 頁)

(21) 出願番号 特願2017-516928 (P2017-516928)  
 (86) (22) 出願日 平成27年10月2日 (2015.10.2)  
 (85) 翻訳文提出日 平成29年3月27日 (2017.3.27)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2015/053767  
 (87) 国際公開番号 W02016/054534  
 (87) 国際公開日 平成28年4月7日 (2016.4.7)  
 (31) 優先権主張番号 62/059,498  
 (32) 優先日 平成26年10月3日 (2014.10.3)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)  
 (31) 優先権主張番号 62/098,929  
 (32) 優先日 平成26年12月31日 (2014.12.31)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 516131979  
 コナゲン インコーポレイテッド  
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ O 1  
 7 3 0 ベッドフォード、ディアンジェロ  
 ドライブ 1 5  
 (74) 代理人 100114775  
 弁理士 高岡 亮一  
 (74) 代理人 100121511  
 弁理士 小田 直  
 (74) 代理人 100202751  
 弁理士 岩堀 明代  
 (74) 代理人 100191086  
 弁理士 高橋 香元

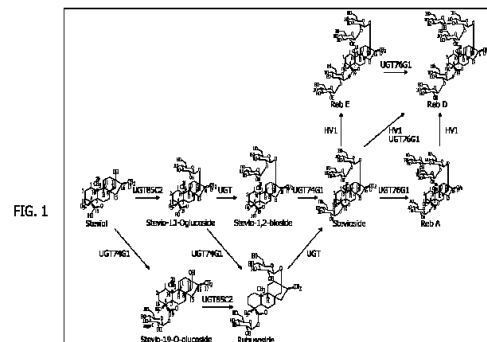
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ノンカロリー甘味料および合成するための方法

(57) 【要約】

レバウジオシドVおよびレバウジオシドWと呼ばれるステビオール配糖体が開示される。レバウジオシドM (Reb M)、レバウジオシド(rebausoside)G (Reb G)、レバウジオシドKA (Reb KA)、レバウジオシドV (Reb V) およびレバウジオシド (Reb W) を生成させるための方法もまた開示される。

【選択図】 図 1



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

ルブソシドからステビオシドおよびレバウジオシド K A の混合物を合成するための方法であって、

ルブソシドと、スクロース、ウリジンニリン酸 (UDP) およびウリジンニリン酸 - グルコース (UDP - グルコース) からなる群より選択される基質と、EUGT 11 および UDP - グリコシルトランスフェラーゼ融合酵素からなる群から選択される UDP - グリコシルトランスフェラーゼとを含む反応混合物を調製することと、

前記反応混合物を、ステビオシドおよびレバウジオシド K A の混合物を生成させるのに十分な時間の間インキュベートすることと

を含み、

グルコースが共有結合によりルブソシドの C 2' - 19 - O - グルコースにカップリングされ、グルコースが共有結合によりルブソシドの C 2' - 13 - O - グルコースにカップリングされ、ステビオシドが生成される、方法。

**【請求項 2】**

スクロースシンターゼを前記反応混合物に添加することをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 3】**

前記スクロースシンターゼが、シロイヌナズナ属スクロースシンターゼ 1 ; シロイヌナズナ属スクロースシンターゼ 3 ; ならびにリョクトウスクロースシンターゼからなる群より選択される、請求項 2 に記載の方法。

**【請求項 4】**

前記スクロースシンターゼがシロイヌナズナススクロースシンターゼ 1 である、請求項 3 に記載の方法。

**【請求項 5】**

前記 UDP - グリコシルトランスフェラーゼ融合酵素が、スクロースシンターゼドメインに結合された EUGT 11 ウリジンジホスホグリコシルトランスフェラーゼドメインからなる群から選択される、請求項 1 に記載の方法

**【請求項 6】**

前記スクロースシンターゼドメインが、シロイヌナズナ属スクロースシンターゼ 1 ; シロイヌナズナ属スクロースシンターゼ 3 ; ならびにリョクトウスクロースシンターゼからなる群より選択される、請求項 5 に記載の方法。

**【請求項 7】**

前記スクロースシンターゼドメインがシロイヌナズナススクロースシンターゼ 1 である、請求項 6 に記載の方法。

**【請求項 8】**

ルブソシドからレバウジオシド K A を合成するための方法であって、

ルブソシドと、スクロース、ウリジンニリン酸 (UDP) およびウリジンニリン酸 - グルコース (UDP - グルコース)、および H V 1 からなる群より選択される基質とを含む反応混合物を調製することと、

前記反応混合物を、レバウジオシド K A を生成させるのに十分な時間の間インキュベートすることと

を含み、

グルコースが共有結合によりルブソシドの C 2' - 19 - O - グルコースにカップリングされ、レバウジオシド K A が生成される、方法。

**【請求項 9】**

スクロースシンターゼを前記反応混合物に添加することをさらに含む、請求項 8 に記載の方法。

**【請求項 10】**

前記スクロースシンターゼが、シロイヌナズナ属スクロースシンターゼ 1 ; シロイヌナ

10

20

30

40

50

ズナ属スクロースシターゼ3；ならびにリョクトウスクロースシターゼからなる群より選択される、請求項9に記載の方法。

【請求項11】

前記スクロースシターゼがシロイヌナズナスクロースシターゼ1である、請求項10に記載の方法。

【請求項12】

ルブソシドからレバウジオシドGを合成するための方法であって、  
 ルブソシドと、スクロース、ウリジンニリン酸(UDP)およびウリジンニリン酸-グルコース(UDP-グルコース)からなる群より選択される基質と、UGT76G1およびUDP-グリコシルトランスフェラーゼシターゼ融合酵素から選択されるUDP-グリコシルトランスフェラーゼとを含む反応混合物を調製することと、  
 前記反応混合物を、レバウジオシドGを生成させるのに十分な時間の間インキュベートすることと

10

を含み、

グルコースが共有結合によりルブソシドのC3'-13-O-グルコースにカップリングされ、レバウジオシドGが生成される、方法。

【請求項13】

スクロースシターゼを前記反応混合物に添加することをさらに含む、請求項12に記載の方法。

【請求項14】

前記スクロースシターゼが、シロイヌナズナ属スクロースシターゼ1；シロイヌナズナ属スクロースシターゼ3；ならびにリョクトウスクロースシターゼからなる群より選択される、請求項13に記載の方法。

20

【請求項15】

前記スクロースシターゼがシロイヌナズナスクロースシターゼ1である、請求項14に記載の方法。

【請求項16】

前記UDP-グリコシルトランスフェラーゼ融合酵素が、スクロースシターゼドメインに結合されたUGT76G1ウリジンジホスホグリコシルトランスフェラーゼドメインからなる群から選択される、請求項12に記載の方法。

30

【請求項17】

前記スクロースシターゼドメインが、シロイヌナズナ属スクロースシターゼ1；シロイヌナズナ属スクロースシターゼ3；ならびにリョクトウスクロースシターゼからなる群より選択される、請求項16に記載の方法。

【請求項18】

前記スクロースシターゼドメインがシロイヌナズナスクロースシターゼ1である、請求項17に記載の方法。

【請求項19】

レバウジオシドDからレバウジオシドMを合成するための方法であって、  
 レバウジオシドDと、スクロース、ウリジンニリン酸(UDP)、ウリジンニリン酸-グルコース(UDP-グルコース)、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される基質と、UGT76G1、UDP-グリコシルトランスフェラーゼ融合酵素、およびそれらの組み合わせからなる群より選択されるウリジンジホスホ(diphospho)グリコシルトランスフェラーゼ(UDP-グリコシルトランスフェラーゼ)とを含む反応混合物を調製することと、

40

前記反応混合物を、レバウジオシドMを生成させるのに十分な時間の間インキュベートすることと

を含み、

グルコースが共有結合によりレバウジオシドDにカップリングされ、レバウジオシドMが生成される、

50

方法。

【請求項 20】

スクロースシターゼを前記反応混合物に添加することをさらに含む、請求 19 に記載の方法。

【請求項 21】

前記スクロースシターゼが、シロイヌナズナ属スクロースシターゼ 1 ; シロイヌナズナ属スクロースシターゼ 3 ; ならびにリョクトウスクロースシターゼからなる群より選択される、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

前記スクロースシターゼがシロイヌナズナススクロースシターゼ 1 である、請求項 21 に記載の方法。

10

【請求項 23】

前記 UDP - グリコシルトランスフェラーゼ融合酵素が、スクロースシターゼドメインに結合された UGT76G1 ウリジンジホスホグリコシルトランスフェラーゼドメインである、請求 19 に記載の方法。

【請求項 24】

前記スクロースシターゼドメインが、シロイヌナズナ属スクロースシターゼ 1 ; シロイヌナズナ属スクロースシターゼ 3 ; ならびにリョクトウスクロースシターゼからなる群より選択される、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 25】

前記スクロースシターゼドメインがシロイヌナズナススクロースシターゼ 1 である、請求項 24 に記載の方法。

20

【請求項 26】

レバウジオシド E からレバウジオシド M を合成するための方法であって、

レバウジオシド E と、スクロース、ウリジンニリン酸 (UDP) およびウリジンニリン酸 - グルコース (UDP - グルコース)、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される基質と、UGT76G1、UDP - グリコシルトランスフェラーゼ融合酵素、およびそれらの組み合わせからなる群より選択されるウリジンジホスホ (d i p o s p h o) グリコシルトランスフェラーゼ (UDP - グリコシルトランスフェラーゼ) とを含む反応混合物を調製することと、

30

前記反応混合物を、レバウジオシド M を生成させるのに十分な時間の間インキュベートすることと

を含み、

グルコースが共有結合によりレバウジオシド E にカップリングされレバウジオシド D が生成され、グルコースが共有結合によりレバウジオシド D にカップリングされレバウジオシド M が生成される、

方法。

【請求項 27】

スクロースシターゼを前記反応混合物に添加することをさらに含む、請求項 26 に記載の方法。

40

【請求項 28】

前記スクロースシターゼが、シロイヌナズナ属スクロースシターゼ 1 ; シロイヌナズナ属スクロースシターゼ 3 ; ならびにリョクトウスクロースシターゼからなる群より選択される、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 29】

前記スクロースシターゼがシロイヌナズナススクロースシターゼ 1 である、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 30】

前記 UDP - グリコシルトランスフェラーゼ融合酵素が、スクロースシターゼドメインに結合された UGT76G1 ウリジンジホスホグリコシルトランスフェラーゼドメイン

50

である、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 31】

前記スクロースシターゼドメインが、シロイヌナズナ属スクロースシターゼ 1；シロイヌナズナ属スクロースシターゼ 3；ならびにリョクトウスクロースシターゼからなる群より選択される、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 32】

前記スクロースシターゼドメインがシロイヌナズナススクロースシターゼ 1 である、請求項 31 に記載の方法。

【請求項 33】

ステビオシドからレバウジオシド M を生成するための方法であって、

10

ステビオシドと、スクロース、ウリジン二リン酸 (UDP)、ウリジン二リン酸 - グルコース (UDP - グルコース)、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される基質と、UGT76G1、HV1、UDP - グリコシルトランスフェラーゼ融合酵素、およびそれらの組み合わせからなる群より選択されるウリジンジホスホ (diphospho) グリコシルトランスフェラーゼ (UDP - グリコシルトランスフェラーゼ) とを含む反応混合物を調製することと、

前記反応混合物を、レバウジオシド M を生成させるのに十分な時間の間インキュベートすることと

を含み、

20

UGT76G1 または前記融合酵素によりグルコースが共有結合によりステビオシドにカップリングされ、レバウジオシド A が生成され、HV1 によりグルコースが共有結合によりレバウジオシド A にカップリングされ、レバウジオシド D が生成され、UGT76G1 または前記融合酵素によりグルコースが共有結合によりレバウジオシド D にカップリングされ、レバウジオシド M が生成される、

方法。

【請求項 34】

スクロースシターゼを前記反応混合物に添加することをさらに含む、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 35】

前記スクロースシターゼが、シロイヌナズナ属スクロースシターゼ 1；シロイヌナズナ属スクロースシターゼ 3；ならびにリョクトウスクロースシターゼからなる群より選択される、請求項 34 に記載の方法。

30

【請求項 36】

前記スクロースシターゼがシロイヌナズナススクロースシターゼ 1 である、請求項 35 に記載の方法。

【請求項 37】

前記 UDP - グリコシルトランスフェラーゼ融合酵素が、スクロースシターゼドメインに結合された UGT76G1 ウリジンジホスホグリコシルトランスフェラーゼドメインである、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 38】

40

前記スクロースシターゼドメインが、シロイヌナズナ属スクロースシターゼ 1；シロイヌナズナ属スクロースシターゼ 3；ならびにリョクトウスクロースシターゼからなる群より選択される、請求項 37 に記載の方法。

【請求項 39】

前記スクロースシターゼドメインがシロイヌナズナススクロースシターゼ 1 である、請求項 38 に記載の方法。

【請求項 40】

レバウジオシド A からレバウジオシド M を生成するための方法であって、

レバウジオシド A と、スクロース、ウリジン二リン酸 (UDP)、ウリジン二リン酸 - グルコース (UDP - グルコース)、およびそれらの組み合わせからなる群より選択され

50

る基質と；UGT76G1、HV1、UDP-グリコシルトランスフェラーゼ融合酵素およびそれらの組み合わせからなる群より選択されるウリジンジホスホ(diphospho)グリコシルトランスフェラーゼ(UDP-グリコシルトランスフェラーゼ)を含む反応混合物を調製することと、

前記反応混合物を、レバウジオシドMを生成させるのに十分な時間の間インキュベートすることと

を含み、

HV1により、グルコースが共有結合により前記レバウジオシドAにカップリングされ、レバウジオシドDが生成され、ならびに、UGT76G1または前記融合酵素によりグルコースが共有結合により前記レバウジオシドDにカップリングされ、レバウジオシドMが生成される、

方法。

【請求項41】

スクロースシンターゼを前記反応混合物に添加することをさらに含む、請求項40に記載の方法。

【請求項42】

前記スクロースシンターゼが、シロイヌナズナ属スクロースシンターゼ1；シロイヌナズナ属スクロースシンターゼ3；ならびにリョクトウスクロースシンターゼからなる群より選択される、請求項41に記載の方法。

【請求項43】

前記スクロースシンターゼがシロイヌナズナスクロースシンターゼ1である、請求項42に記載の方法。

【請求項44】

前記UDP-グリコシルトランスフェラーゼ融合酵素が、スクロースシンターゼドメインに結合されたUGT76G1ウリジンジホスホグリコシルトランスフェラーゼドメインである、請求項40に記載の方法。

【請求項45】

前記スクロースシンターゼドメインが、シロイヌナズナ属スクロースシンターゼ1；シロイヌナズナ属スクロースシンターゼ3；ならびにリョクトウスクロースシンターゼからなる群より選択される、請求項44に記載の方法。

【請求項46】

前記スクロースシンターゼドメインがシロイヌナズナスクロースシンターゼ1である、請求項45に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2014年10月3日に出願され、「NON-CALORIC SWEETENERS AND METHODS FOR SYNTHESIZING」と題する米国仮特許出願第62/059,498号、および2014年12月31日に出願され、「NON-CALORIC SWEETENERS AND METHODS FOR SYNTHESIZING」と題する米国仮特許出願第62/098,929号(その開示は、これによりその全体が参照により組み込まれる)の優先権を主張する。

【0002】

配列表の提出のためのサポートにおける陳述

配列表のハードコピーおよび「19452382\_\_1.txt」という名のファイル(60,601バイトのサイズである(MICROSOFT WINDOWS(登録商標)EXPLORERにおいて測定))を含む配列表のコンピュータ可読形態が本明細書で提供され、本明細書で参照により組み込まれる。この配列表はSEQ ID NO:1~

10

20

30

40

50

12から構成される。

【0003】

本開示は、一般に天然甘味料に関する。より特定的には、本開示はノンカロリー甘味料およびノンカロリー甘味料を合成するための方法に関する。

【背景技術】

【0004】

ステビオール配糖体はステビア・レバウディアナの葉から単離される天然産物である。ステビオール配糖体は、高甘味度、低カロリー甘味料として広く使用されており、スクロースより著しく甘い。天然甘味料として、異なるステビオール配糖体は異なる程度の甘味および後味を有する。ステビオール配糖体の甘味は、スクロースより著しく高い。例えば、ステビオシドは、より苦い後味を有するスクロースよりも100～150倍甘い。レバウジオシドCはスクロースよりも40～60倍甘い。ズルコシドAはスクロースよりも約30倍甘い。

10

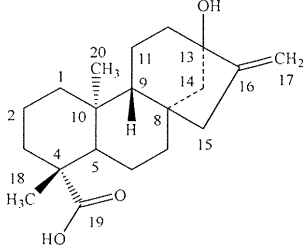
【0005】

天然起源のステビオール配糖体は同じ基本ステビオール構造を共有するが、C13およびC19位での炭水化物残基（例えば、グルコース、ラムノースおよびキシロース残基）の含量が異なる。公知の構造を有するステビオール配糖体としては、ステビオール、ステビオシド、レバウジオシドA、レバウジオシドB、レバウジオシドC、レバウジオシドD、レバウジオシドE、レバウジオシドFおよびズルコシドAが挙げられる（例えば、表1を参照されたい）。他のステビオール配糖体はレバウジオシドM、レバウジオシドNおよびレバウジオシドOである。

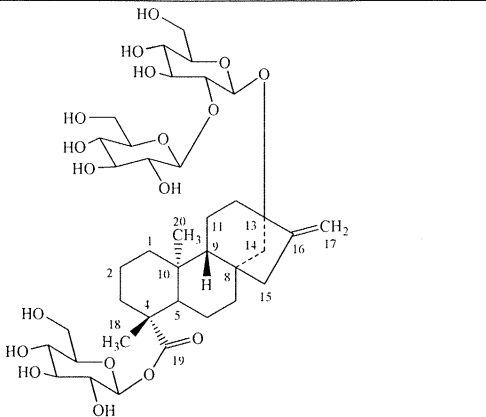
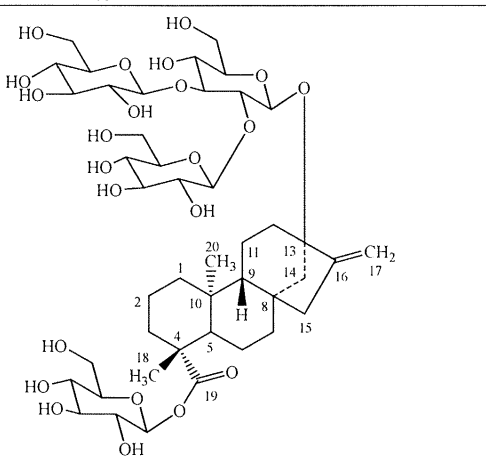
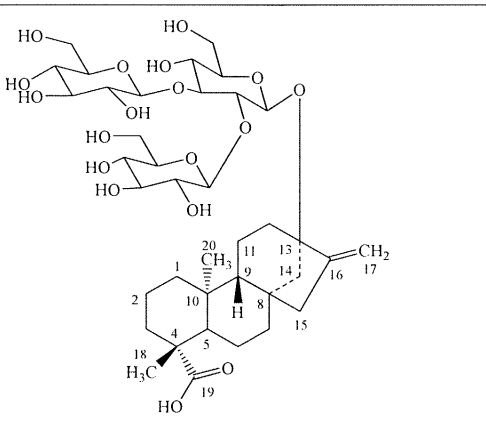
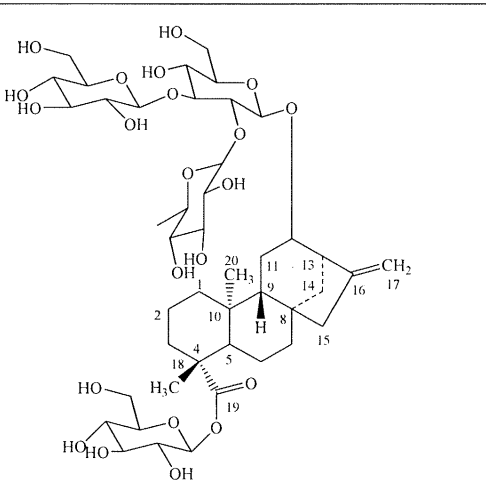
20

【表1】

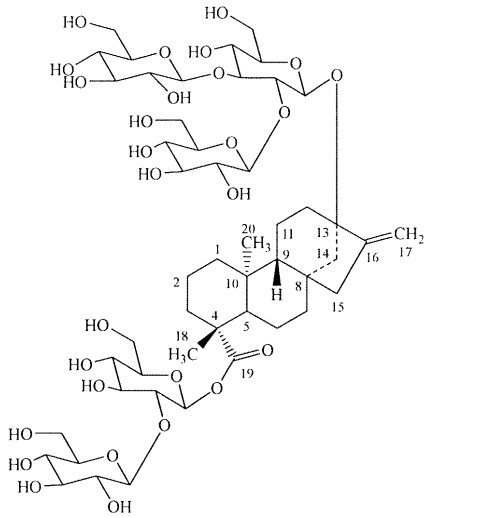
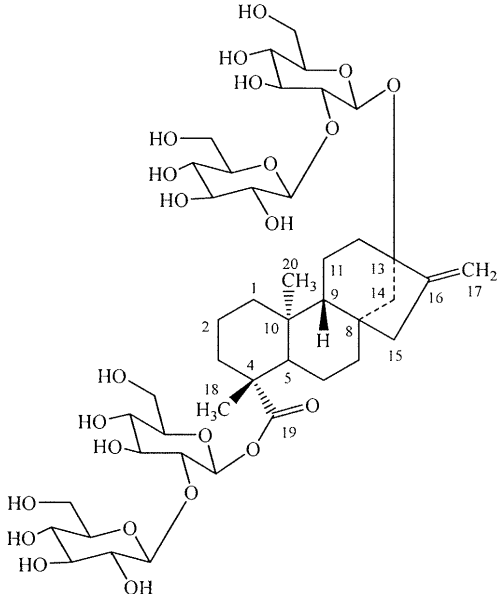
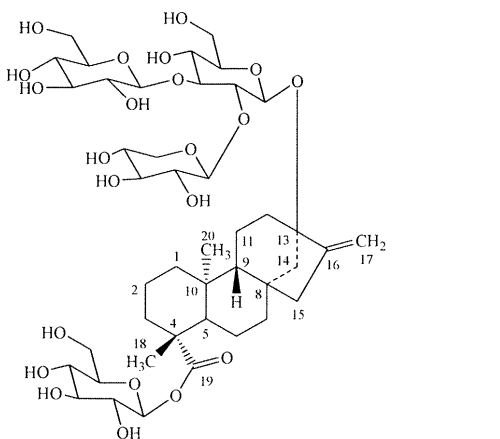
表1. ステビオール配糖体

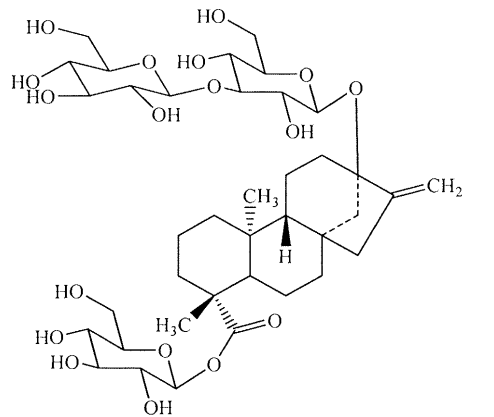
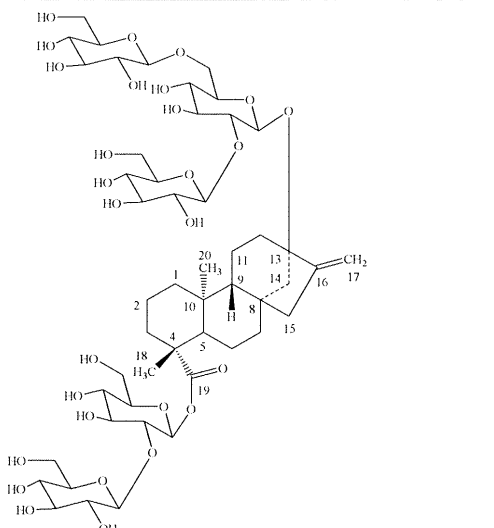
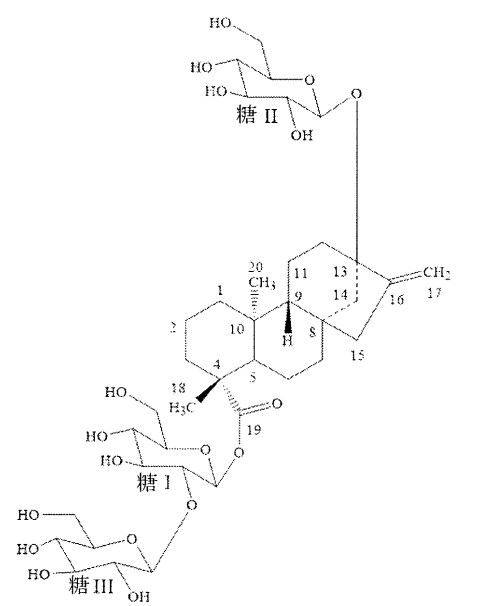
名称	構造	分子式	分子量
ステビオール		$C_{20}H_{30}O_3$	318

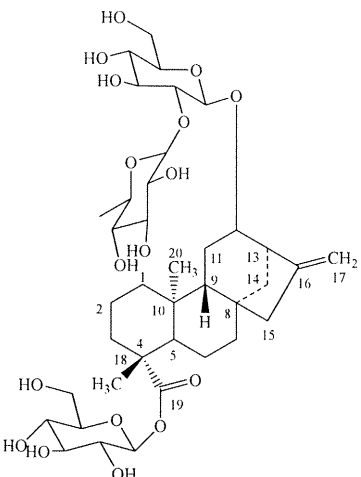
30

ステビオシド		C <sub>38</sub> H <sub>60</sub> O <sub>18</sub>	804	10
レバウジオシド A		C <sub>44</sub> H <sub>70</sub> O <sub>23</sub>	966	20
レバウジオシド B		C <sub>38</sub> H <sub>60</sub> O <sub>18</sub>	804	30
レバウジオシド C		C <sub>44</sub> H <sub>70</sub> O <sub>22</sub>	950	40



レバウジオシド D		$C_{50}H_{80}O_{28}$	1128	10
レバウジオシド E		$C_{44}H_{70}O_{23}$	966	20
レバウジオシド F		$C_{43}H_{68}O_{22}$	936	40

レバウジオシド G		$C_{38}H_{60}O_{18}$	804	10
レバウジオシド D2		$C_{50}H_{80}O_{28}$	1128	20
レバウジオシド KA		$C_{38}H_{60}O_{18}$	804	30
				40

ズルコシド A		$C_{38}H_{60}O_{17}$	788
---------	---	----------------------	-----

10

## 【0006】

乾燥重量に基づき、ステビオシド、レバウジオシド A、レバウジオシド C、およびズルコシド A は、それぞれ、葉に含まれるステビオール配糖体の総重量の 9.1、3.8、0.6、および 0.3% を占め、一方、他のステビオール配糖体はずっと低い量で存在する。ステビア・レバウディアナ植物からの抽出物は市販されており、これは典型的には、ステビオシドおよびレバウジオシド A を第一化合物として含む。他のステビオール配糖体は典型的には、ステビア抽出物中に微量成分として存在する。例えば、市販の調製物中のレバウジオシド A の量は総ステビオール配糖体含量の約 20% ~ 90% 超で変動し得るが、レバウジオシド B の量は総ステビオール配糖体の約 1 ~ 2% であり、レバウジオシド C の量は約 7 ~ 15% であり、ならびにレバウジオシド D の量は約 2% である可能性がある。

20

## 【0007】

ステビオール配糖体の大半はステビオールのいくつかのグリコシル化反応により形成され、それらの反応は典型的には、UDP-グリコシルトランスフェラーゼ (UGT) により、ウリジン 5'-ジホスホグルコース (UDP-グルコース) を糖部分の供与体として使用して触媒される。植物中の UGT は、グルコース残基を UDP-グルコースからステビオールに転移させる酵素の非常に多様な群を構成する。例えば、ステビオシドの C-13-O-グルコースの C-3' のグリコシル化によりレバウジオシド A が得られ；ステビオシドの 19-O-グルコースの C-2' のグリコシル化によりレバウジオシド E が得られる。レバウジオシド A (C-2'-19-O-グルコース) またはレバウジオシド E (C-3'-13-O-グルコース) のさらなるグリコシル化によりレバウジオシド D が生成される。(図 1)。

30

## 【0008】

代替甘味料は、糖分の多い食品および飲料の消費と関連する多くの疾患への関心のために、ますます注目を集めている。人工甘味料が使用可能であるが、ズルチン、サイクラミン酸ナトリウムおよびサッカリンなどの多くの人工甘味料は、それらの安全性に関する懸念のために、いくつかの国により禁止されまたは制限されている。よって、天然起源のノンカロリー甘味料がますます好まれている。ステビア甘味料の使用の普及に対する主な障害の 1 つは、それらの望ましくない味覚特質である。したがって、甘味効力と香味プロファイルの最良の組み合わせを提供するための、代替甘味料およびそれらの製造方法を開発することが必要である。

40

## 【発明の概要】

## 【0009】

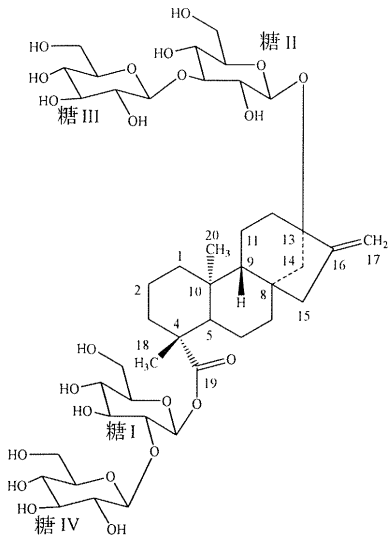
本開示は、一般に、天然甘味料に関する。より特定的には、本開示は、ノンカロリー甘味料およびノンカロリー甘味料を合成するための方法に関する。

## 【0010】

50

合成レバウジオシド V . 1つの態様では、本開示は、下記化学構造から構成される合成レバウジオシド（レバウジオシド V）に向けられる：

【化 1】



10

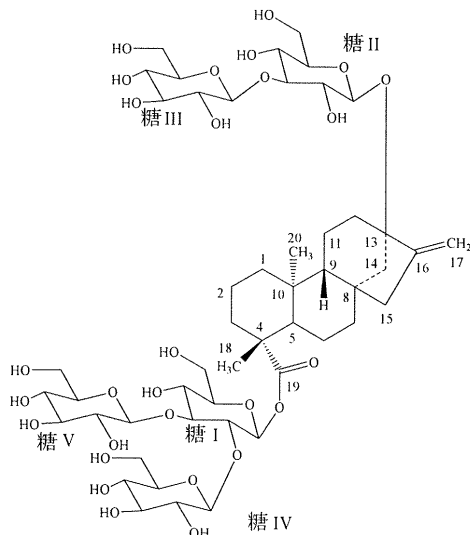
Reb V

【 0 0 1 1】

20

合成レバウジオシド W . 1つの態様では、本開示は、下記化学構造から構成される合成レバウジオシド（レバウジオシド W）に向けられる：

【化 2】



30

Reb W

【 0 0 1 2】

40

レバウジオシド G からレバウジオシド V を生成させる方法 . 別の態様では、本開示は、レバウジオシド G からレバウジオシド V を合成するための方法に向けられる。該方法は、レバウジオシド G と、スクロース、ウリジンニリン酸（UDP）およびウリジンニリン酸 - グルコース（UDP - グルコース）からなる群より選択される基質と、HV1 UDP - グリコシルトランスフェラーゼとを含み、スクロースシンターゼ（SUS）を含むまたは含まない、反応混合物を調製すること；ならびに、反応混合物を、レバウジオシド V を生成させるのに十分な時間の間インキュベートすることを含み、グルコースが共有結合によりレバウジオシド G にカップリングされ、レバウジオシド V が生成される。

【 0 0 1 3】

レバウジオシド G からレバウジオシド V を生成させる方法 . 別の態様では、本開示は、

50

レバウジオシド G からレバウジオシド V を合成するための方法に向けられる。該方法は、レバウジオシド G と、スクロース、ウリジンニリン酸 (UDP) およびウリジンニリン酸 - グルコース (UDP - グルコース) からなる群より選択される基質と、ウリジンジホスホグリコシルトランスフェラーゼ (UGT 11)、UDP - グリコシルトランスフェラーゼ - スクロースシンターゼ (SUS) 融合酵素からなる群より選択されるウリジンジホスホ (diphospho) グリコシルトランスフェラーゼ (UDP - グリコシルトランスフェラーゼ) とを含み、スクロースシンターゼ (SUS) を含むまたは含まない反応混合物を調製すること；ならびに、反応混合物を、レバウジオシド V を生成させるのに十分な時間の間インキュベートすることを含み、グルコースが共有結合によりレバウジオシド G にカップリングされ、レバウジオシド V が生成される。

10

**【0014】**

レバウジオシド KA からレバウジオシド V を生成させる方法。別の態様では、本開示は、レバウジオシド KA からレバウジオシド V を合成するための方法に向けられる。該方法は、レバウジオシド KA と、スクロース、ウリジンニリン酸 (UDP) およびウリジンニリン酸 - グルコース (UDP - グルコース) からなる群より選択される基質と、UDP - グリコシルトランスフェラーゼ (UGT 76G1; SEQ ID NO: 1) および UDP - グリコシルトランスフェラーゼ - スクロースシンターゼ融合酵素からなる群より選択されるウリジンジホスホ (diphospho) グリコシルトランスフェラーゼ (UDP - グリコシルトランスフェラーゼ) とを含み、スクロースシンターゼ (SUS) を含むまたは含まない反応混合物を調製すること；ならびに、反応混合物を、レバウジオシド V を生成させるのに十分な時間の間インキュベートすることを含み、グルコースが共有結合によりレバウジオシド KA にカップリングされ、レバウジオシド V が生成される。

20

**【0015】**

ルブソシドからレバウジオシド V を生成させる方法。別の態様では、本開示は、ルブソシドからレバウジオシド V を合成するための方法に向けられる。該方法は、ルブソシドと、スクロース、ウリジンニリン酸 (UDP) およびウリジンニリン酸 - グルコース (UDP - グルコース) からなる群より選択される基質と、UDP - グリコシルトランスフェラーゼ (UGT 76G1)、HV1 および UDP - グリコシルトランスフェラーゼ - スクロースシンターゼ融合酵素からなる群より選択されるウリジンジホスホ (diphospho) グリコシルトランスフェラーゼ (UDP - グリコシルトランスフェラーゼ) とを含み、スクロースシンターゼ (SUS) を含むまたは含まない反応混合物を調製すること；ならびに、反応混合物を、レバウジオシド V を生成させるのに十分な時間の間インキュベートすることを含み、グルコースが共有結合によりルブソシドにカップリングされ、レバウジオシド KA が生成される。連続して、グルコースが共有結合によりレバウジオシド KA にカップリングされ、レバウジオシド V が生成される。グルコースが共有結合によりルブソシドにカップリングされ、レバウジオシド G が生成される。連続して、グルコースが共有結合によりレバウジオシド G にカップリングされ、レバウジオシド V が生成される。

30

**【0016】**

ルブソシドからレバウジオシド V を生成させる方法。別の態様では、本開示は、ルブソシドからレバウジオシド V を合成するための方法に向けられる。該方法は、ルブソシドと、スクロース、ウリジンニリン酸 (UDP) およびウリジンニリン酸 - グルコース (UDP - グルコース) からなる群より選択される基質と、UDP - グリコシルトランスフェラーゼ (UGT 76G1)、UGT 11 および UDP - グリコシルトランスフェラーゼ - スクロースシンターゼ融合酵素からなる群より選択されるウリジンジホスホ (diphospho) グリコシルトランスフェラーゼ (UDP - グリコシルトランスフェラーゼ) とを含み、スクロースシンターゼを含むまたは含まない反応混合物を調製すること；ならびに、反応混合物を、レバウジオシド V を生成させるのに十分な時間の間インキュベートすることを含み、グルコースが共有結合によりルブソシドにカップリングされ、レバウジオシド KA が生成され、グルコースが共有結合によりレバウジオシド KA にカップリングされ、レバウジオシド V が生成される。グルコースが共有結合によりルブソシドにカップリン

40

50

グされ、レバウジオシド G が生成され、グルコースが共有結合によりレバウジオシド G にカップリングされ、レバウジオシド V が生成される。

【0017】

レバウジオシド V からレバウジオシド W を生成させる方法。別の態様では、本開示は、レバウジオシド V からレバウジオシド W を合成するための方法に向けられる。該方法は、レバウジオシド V と、スクロース、ウリジンニリン酸 (UDP) およびウリジンニリン酸 - グルコース (UDP - グルコース) からなる群より選択される基質と、UDP - グリコシルトランスフェラーゼ (UGT76G1) および UDP - グリコシルトランスフェラーゼ - スクロースシンターゼ融合酵素からなる群より選択されるウリジンジホスホ (diphospho) グリコシルトランスフェラーゼ (UDP - グリコシルトランスフェラーゼ) とを含み、スクロースシンターゼを含むまたは含まない反応混合物を調製すること；ならびに反応混合物を、レバウジオシド W を生成させるのに十分な時間の間インキュベートすることを含み、グルコースが共有結合によりレバウジオシド V にカップリングされ、レバウジオシド W が生成される。

10

【0018】

レバウジオシド G からレバウジオシド W を生成させる方法。別の態様では、本開示は、レバウジオシド G からレバウジオシド W を合成するための方法に向けられる。該方法は、レバウジオシド G と、スクロース、ウリジンニリン酸 (UDP) およびウリジンニリン酸 - グルコース (UDP - グルコース) からなる群より選択される基質と、UDP - グリコシルトランスフェラーゼ (UGT76G1)、UDP - グリコシルトランスフェラーゼ - スクロースシンターゼ融合酵素および HV1 からなる群より選択されるウリジンジホスホ (diphospho) グリコシルトランスフェラーゼ (UDP - グリコシルトランスフェラーゼ) とを含み；スクロースシンターゼを含むまたは含まない反応混合物を調製すること；ならびに反応混合物を、レバウジオシド W を生成させるのに十分な時間の間インキュベートすることを含み、HV1 により、グルコースが、共有結合によりレバウジオシド G にカップリングされ、レバウジオシド V が生成される。連続して、UGT76G1 により、グルコースが共有結合によりレバウジオシド V にカップリングされ、レバウジオシド W が生成される。

20

【0019】

レバウジオシド G からレバウジオシド W を生成させる方法。別の態様では、本開示は、レバウジオシド G からレバウジオシド W を合成するための方法に向けられる。該方法は、レバウジオシド G と、スクロース、ウリジンニリン酸 (UDP) およびウリジンニリン酸 - グルコース (UDP - グルコース) からなる群より選択される基質と、UGT76G1、EUGT11、および UDP - グリコシルトランスフェラーゼ - スクロースシンターゼ融合酵素からなる群より選択されるウリジンジホスホグリコシルトランスフェラーゼ (UDP - グリコシルトランスフェラーゼ) とを含む反応混合物を調製すること；ならびに反応混合物を、レバウジオシド W を生成させるのに十分な時間の間インキュベートすることを含み、EUGT11 により、グルコースが共有結合によりレバウジオシド G にカップリングされ、レバウジオシド V が生成される。連続して、UGT76G1 により、グルコースが共有結合によりレバウジオシド V にカップリングされ、レバウジオシド W が生成される。

30

40

【0020】

レバウジオシド KA からレバウジオシド W を生成させる方法。別の態様では、本開示は、レバウジオシド KA からレバウジオシド W を合成するための方法に向けられる。該方法は、レバウジオシド KA と；スクロース、ウリジンニリン酸 (UDP) およびウリジンニリン酸 - グルコース (UDP - グルコース) からなる群より選択される基質と；UDP - グリコシルトランスフェラーゼ (UGT76G1)、および UDP - グリコシルトランスフェラーゼ - スクロースシンターゼ融合酵素からなる群より選択されるウリジンジホスホ (diphospho) グリコシルトランスフェラーゼ (UDP - グリコシルトランスフェラーゼ) とを含み、スクロースシンターゼを含むまたは含まない反応混合物を調製するこ

50

と；ならびに反応混合物を、レバウジオシドWを生成させるのに十分な時間の間インキュベートすることを含み、グルコースが共有結合によりレバウジオシドKAにカップリングされ、レバウジオシドVが生成される。連続して、グルコースが共有結合によりレバウジオシドVにカップリングされ、レバウジオシドWが生成される。

【0021】

ルブソシドからレバウジオシドWを生成させる方法。別の態様では、本開示は、ルブソシドからレバウジオシドDを合成するための方法に向けられる。該方法は、ルブソシドと、スクロース、ウリジン二リン酸(UDP)およびウリジン二リン酸-グルコース(UDP-グルコース)からなる群より選択される基質と、UGT76G1、HV1、およびUDP-グリコシルトランスフェラーゼ-スクロースシンターゼ融合酵素からなる群より選択されるウリジンジホスホグリコシルトランスフェラーゼ(UDP-グリコシルトランスフェラーゼ)とを含み、スクロースシンターゼを含むまたは含まない反応混合物を調製すること；ならびに反応混合物を、レバウジオシドWを生成させるのに十分な時間の間インキュベートすることを含む。

10

【0022】

ルブソシドからレバウジオシドWを生成させる方法。別の態様では、本開示は、ルブソシドからレバウジオシドWを合成するための方法に向けられる。該方法は、ルブソシドと、スクロース、ウリジン二リン酸(UDP)およびウリジン二リン酸-グルコース(UDP-グルコース)からなる群より選択される基質と、UGT76G1、EUGT11、およびUDP-グリコシルトランスフェラーゼ-スクロースシンターゼ融合酵素からなる群より選択されるウリジンジホスホグリコシルトランスフェラーゼ(UDP-グリコシルトランスフェラーゼ)とを含み、スクロースシンターゼを含むまたは含まない反応混合物を調製すること；ならびに反応混合物を、レバウジオシドWを生成させるのに十分な時間の間インキュベートすることを含む。

20

【0023】

ルブソシドからステビオシドおよびレバウジオシドKAの混合物を生成させる方法。別の態様では、本開示は、ルブソシドからステビオシドおよびレバウジオシドKAの混合物を合成するための方法に向けられる。該方法は、ルブソシドと、スクロース、ウリジン二リン酸(UDP)およびウリジン二リン酸-グルコース(UDP-グルコース)からなる群より選択される基質と、EUGT11およびUDP-グリコシルトランスフェラーゼ-スクロースシンターゼ融合酵素からなる群より選択されるUDP-グリコシルトランスフェラーゼとを含み、スクロースシンターゼを含むまたは含まない反応混合物を調製すること；ならびに反応混合物を、ステビオシドおよびレバウジオシドKAの混合物を生成させるのに十分な時間の間インキュベートすることを含み、グルコースが共有結合によりルブソシドのC2'-19-O-グルコースにカップリングされ、レバウジオシドKAが生成され；グルコースが共有結合により、ルブソシドのC2'-13-O-グルコースにカップリングされ、ステビオシドが生成される。

30

【0024】

ルブソシドからレバウジオシドKAを生成させる方法。別の態様では、本開示は、ルブソシドからレバウジオシドKAを合成するための方法に向けられる。該方法は、ルブソシドと、スクロース、ウリジン二リン酸(UDP)およびウリジン二リン酸-グルコース(UDP-グルコース)からなる群より選択される基質と、HV1とを含み、スクロースシンターゼを含むまたは含まない反応混合物を調製すること；ならびに反応混合物を、レバウジオシドKAを生成させるのに十分な時間の間インキュベートすることを含み、グルコースが共有結合により、ルブソシドのC2'-19-O-グルコースにカップリングされ、レバウジオシドKAが生成される。

40

【0025】

ルブソシドからレバウジオシドGを生成させる方法。別の態様では、本開示は、ルブソシドからレバウジオシドGを合成するための方法に向けられる。該方法はルブソシドと、スクロース、ウリジン二リン酸(UDP)およびウリジン二リン酸-グルコース(UDP

50

- グルコース) からなる群より選択される基質と、UGT76G1 およびUDP-グリコシルトランスフェラーゼ-スクロースシンターゼ融合酵素からなる群より選択されるUDP-グリコシルトランスフェラーゼとを含み、スクロースシンターゼを含むまたは含まない反応混合物を調製すること；ならびに反応混合物を、レバウジオシドGを生成させるのに十分な時間の間インキュベートすることを含み、グルコースが共有結合によりルブソシドのC3'-13-O-グルコースにカップリングされ、レバウジオシドGが生成される。

【0026】

レバウジオシドKAからレバウジオシドEを生成させる方法。別の態様では、本開示は、レバウジオシドKAからレバウジオシドEを合成するための方法に向けられる。該方法は、レバウジオシドKAと、スクロース、ウリジンニリン酸(UDP)およびウリジンニリン酸-グルコース(UDP-グルコース)からなる群より選択される基質と、HV1 UDP-グリコシルトランスフェラーゼとを含み、スクロースシンターゼを含むまたは含まない反応混合物を調製すること；ならびに反応混合物を、レバウジオシドEを生成させるのに十分な時間の間インキュベートすることを含み、グルコースが共有結合によりレバウジオシドKAのC2'-13-O-グルコースにカップリングされ、レバウジオシドEが生成される。

10

【0027】

レバウジオシドKAからレバウジオシドEを生成させる方法。別の態様では、本開示は、レバウジオシドKAからレバウジオシドEを合成するための方法に向けられる。該方法は、レバウジオシドKAと、スクロース、ウリジンニリン酸(UDP)およびウリジンニリン酸-グルコース(UDP-グルコース)からなる群より選択される基質と、EUGT11およびUDP-グリコシルトランスフェラーゼ-スクロースシンターゼ融合酵素からなる群より選択されるUDP-グリコシルトランスフェラーゼとを含み、スクロースシンターゼを含むまたは含まない反応混合物を調製すること；ならびに反応混合物を、レバウジオシドEを生成させるのに十分な時間の間インキュベートすることを含み、グルコースが共有結合によりレバウジオシドKAのC2'-13-O-グルコースにカップリングされ、レバウジオシドEが生成される。

20

【0028】

ルブソシドからレバウジオシドEを生成させる方法。別の態様では、本開示は、ルブソシドからレバウジオシドEを合成するための方法に向けられる。該方法は、ルブソシドと、スクロース、ウリジンニリン酸(UDP)およびウリジンニリン酸-グルコース(UDP-グルコース)からなる群より選択される基質と、EUGT11およびUDP-グリコシルトランスフェラーゼ-スクロース合成融合酵素の群からのUDP-グリコシルトランスフェラーゼとを含み、スクロースシンターゼを含むまたは含まない反応混合物を調製すること；ならびに反応混合物を、レバウジオシドEを生成させるのに十分な時間の間インキュベートすることを含み、グルコースが共有結合によりルブソシドにカップリングされ、レバウジオシドKAおよびステビオシドの混合物が生成される。連続して、グルコースが共有結合によりレバウジオシドKAおよびステビオシドにカップリングされ、レバウジオシドEが生成される。

30

40

【0029】

ルブソシドからレバウジオシドEを生成させる方法。別の態様では、本開示は、ルブソシドからレバウジオシドEを合成するための方法に向けられる。該方法は、ルブソシドと、スクロース、ウリジンニリン酸(UDP)およびウリジンニリン酸-グルコース(UDP-グルコース)からなる群より選択される基質と、HV1 UDP-グリコシルトランスフェラーゼとを含み、スクロースシンターゼを含むまたは含まない反応混合物を調製すること；反応混合物を、レバウジオシドEを生成させるのに十分な時間の間インキュベートすることであって、グルコースが共有結合によりルブソシドにカップリングされ、レバウジオシドKAが生成されること；ならびにさらに、レバウジオシドKAをHV1と共にインキュベートし、レバウジオシドEを生成させることを含む。

50



## 【0030】

ルブソシドからレバウジオシドD2を生成させる方法。別の態様では、本開示は、ルブソシドからレバウジオシドD2を合成するための方法に向けられる。該方法は、ルブソシドと、スクロース、ウリジンニリン酸(UDP)およびウリジンニリン酸-グルコース(UDP-グルコース)からなる群より選択される基質と、EUGT11およびUDP-グリコシルトランスフェラーゼ-スクロースシンターゼ融合酵素の群からのUDP-グリコシルトランスフェラーゼとを含み、スクロースシンターゼを含むまたは含まない反応混合物を調製すること；反応混合物を、ステビオシドおよびレバウジオシドD2の混合物を生成させるのに十分な時間の間インキュベートすることであって、グルコースが共有結合によりルブソシドにカップリングされ、ステビオシドおよびレバウジオシドKAの混合物が生成されること；さらに、ステビオシドおよびレバウジオシドKAの混合物をEUGT11と共にインキュベートし、レバウジオシドEを生成させることであって、グルコースが共有結合によりステビオシドおよびレバウジオシドKAにカップリングされ、レバウジオシドEが生成されること；ならびにさらに、レバウジオシドEをEUGT11と共にインキュベートし、レバウジオシドD2を生成させることであって、グルコースが共有結合によりレバウジオシドEにカップリングされ、レバウジオシドD2が生成されることを含む。

10

## 【0031】

レバウジオシドKAからレバウジオシドD2を生成させる方法。別の態様では、本開示は、レバウジオシドKAからレバウジオシドD2を合成するための方法に向けられる。該方法は、レバウジオシドKAと、スクロース、ウリジンニリン酸(UDP)およびウリジンニリン酸-グルコース(UDP-グルコース)からなる群より選択される基質と、EUGT11およびUDP-グリコシルトランスフェラーゼ-スクロースシンターゼ融合酵素からなる群より選択されるUDP-グリコシルトランスフェラーゼとを含み、スクロースシンターゼを含むまたは含まない反応混合物を調製すること；反応混合物を、レバウジオシドD2を生成させるのに十分な時間の間インキュベートすることであって、グルコースが共有結合によりレバウジオシドKAにカップリングされ、レバウジオシドEが生成されること；さらに、レバウジオシドEの混合物をEUGT11と共にインキュベートし、レバウジオシドD2を生成させることであって、グルコースが共有結合によりレバウジオシドEにカップリングされ、レバウジオシドD2が生成されることを含む。

20

30

## 【0032】

レバウジオシドEからレバウジオシドZを生成させる方法。別の態様では、本開示は、レバウジオシドEからレバウジオシドZを合成するための方法に向けられる。該方法は、レバウジオシドEと、スクロース、ウリジンニリン酸(UDP)およびウリジンニリン酸-グルコース(UDP-グルコース)からなる群より選択される基質と、HV1およびスクロースシンターゼとを含む反応混合物を調製すること；反応混合物を、レバウジオシドZを生成させるのに十分な時間の間インキュベートすることを含み、グルコースが共有結合によりレバウジオシドEのC2'-13-O-グルコースにカップリングされ、レバウジオシドZ1が生成される。グルコースが共有結合によりレバウジオシドEのC2'-19-O-グルコースにカップリングされ、レバウジオシドZ2が生成される。

40

## 【0033】

レバウジオシドDからレバウジオシドMを生成させる方法。別の態様では、本開示は、レバウジオシドDからレバウジオシドMを合成するための方法に向けられる。該方法は、レバウジオシドDと、スクロース、ウリジンニリン酸(UDP)、ウリジンニリン酸-グルコース(UDP-グルコース)、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される基質と、UGT76G1、UDP-グリコシルトランスフェラーゼ-スクロースシンターゼ融合酵素、およびそれらの組み合わせからなる群より選択されるUDP-グリコシルトランスフェラーゼとを含み、スクロースシンターゼを含むまたは含まない反応混合物を調製すること；ならびに反応混合物を、レバウジオシドMを生成させるのに十分な時間の間インキュベートすることを含み、グルコースが共有結合によりレバウジオシドDにカップ

50

リングされ、レバウジオシドMが生成される。

【0034】

ステビオシドからレバウジオシドDおよびレバウジオシドMを生成させる方法。別の態様では、本開示は、ステビオシドからレバウジオシドDおよびレバウジオシドMを合成するための方法に向けられる。該方法は、ステビオシドと、スクロース、ウリジンニリン酸(UDP)、ウリジンニリン酸-グルコース(UDP-グルコース)、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される基質と、HV1、UGT76G1、UDP-グリコシルトランスフェラーゼ-スクロースシンターゼ融合酵素、およびそれらの組み合わせからなる群より選択されるUDP-グリコシルトランスフェラーゼとを含み、スクロースシンターゼを含むまたは含まない反応混合物を調製すること；ならびに反応混合物を、レバウジオシドMを生成させるのに十分な時間の間インキュベートすることを含む。ある一定の実施形態では、グルコースが共有結合によりステビオシドにカップリングされ、レバウジオシドAおよび/またはレバウジオシドEが生成される。連続して、グルコースが共有結合によりレバウジオシドAおよび/またはレバウジオシドEにカップリングされ、レバウジオシドDが生成され、ならびにグルコースが共有結合によりレバウジオシドDにカップリングされ、レバウジオシドMが生成される。

10

【0035】

レバウジオシドAからレバウジオシドDおよびレバウジオシドMを生成させる方法。別の態様では、本開示は、レバウジオシドAからレバウジオシドDおよびレバウジオシドMを合成するための方法に向けられる。該方法は、レバウジオシドAと、スクロース、ウリジンニリン酸(UDP)、ウリジンニリン酸-グルコース(UDP-グルコース)、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される基質と、HV1、UGT76G1、UDP-グリコシルトランスフェラーゼ-スクロースシンターゼ融合酵素、およびそれらの組み合わせからなる群より選択されるUDP-グリコシルトランスフェラーゼとを含み、スクロースシンターゼを含むまたは含まない反応混合物を調製すること；ならびに反応混合物を、レバウジオシドMを生成させるのに十分な時間の間インキュベートすることを含み、グルコースが共有結合によりレバウジオシドAにカップリングされ、レバウジオシドDが生成され、ならびにグルコースが共有結合によりレバウジオシドDにカップリングされ、レバウジオシドMが生成される。

20

【0036】

レバウジオシドEからレバウジオシドDおよびレバウジオシドMを生成させる方法。別の態様では、本開示は、レバウジオシドEからレバウジオシドDおよびレバウジオシドMを合成するための方法に向けられる。該方法は、レバウジオシドEと、スクロース、ウリジンニリン酸(UDP)、ウリジンニリン酸-グルコース(UDP-グルコース)、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される基質と、UGT76G1、UDP-グリコシルトランスフェラーゼ-スクロースシンターゼ融合酵素、およびそれらの組み合わせからなる群より選択されるUDP-グリコシルトランスフェラーゼとを含み、スクロースシンターゼを含むまたは含まない反応混合物を調製すること；ならびに反応混合物を、レバウジオシドMを生成させるのに十分な時間の間インキュベートすることを含み、グルコースが共有結合によりレバウジオシドEにカップリングされ、レバウジオシドDが生成され、ならびにグルコースが共有結合によりレバウジオシドDにカップリングされ、レバウジオシドMが生成される。

30

40

【0037】

別の態様では、本開示は、甘味量の、レバウジオシドV、レバウジオシドW、レバウジオシドG、レバウジオシドKA、レバウジオシドM、およびそれらの組み合わせから選択されるレバウジオシドを含む経口摂取可能製品に向けられ、ここで、経口摂取可能製品は、飲料製品および摂取可能製品からなる群より選択される。

【0038】

別の態様では、本開示は、甘味量の、レバウジオシドV、レバウジオシドW、レバウジオシドG、レバウジオシドKA、レバウジオシドM、およびそれらの組み合わせから選択

50

されるレバウジオシドを含む飲料製品に向けられる。レバウジオシドは、飲料製品中に、約 5 ppm ~ 約 100 ppm の濃度で存在する。いくつかの実施形態では、低濃度、例えば、100 ppm 未満のレバウジオシドは、10,000 ~ 30,000 ppm の濃度を有するスクロース溶液に等しい甘味を有する。

【0039】

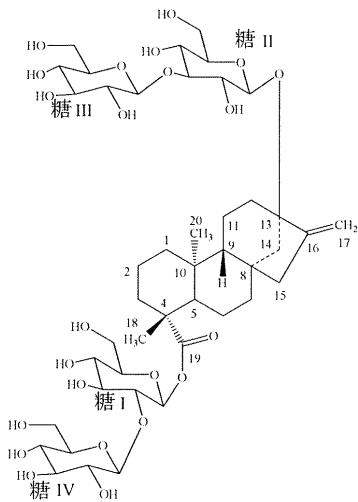
別の態様では、本開示は、甘味量の、レバウジオシドV、レバウジオシドW、レバウジオシドG、レバウジオシドKA、レバウジオシドM、およびそれらの組み合わせから選択されるレバウジオシドを含む摂取可能製品に向けられる。レバウジオシドは摂取可能製品中に、約 5 ppm ~ 約 100 ppm の濃度で存在する。いくつかの実施形態では、低濃度、例えば、100 ppm 未満のレバウジオシドは、10,000 ~ 30,000 ppm の濃度を有するスクロース溶液に等しい甘味を有する。

10

【0040】

別の態様では、本開示は、下記化学構造から構成される甘味料に向けられる：

【化3】



Reb V

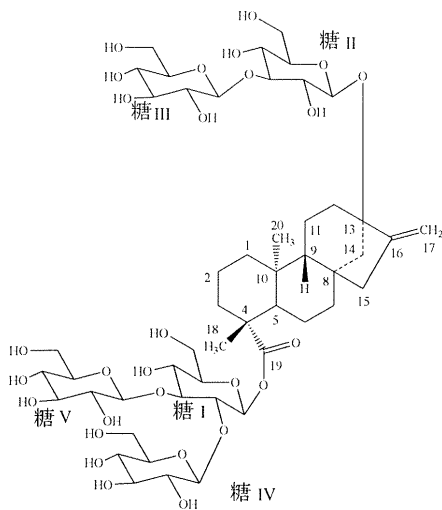
20

30

【0041】

別の態様では、本開示は、下記化学構造から構成される甘味料に向けられる：

【化4】



Reb W

40

50

## 【 0 0 4 2 】

前記実施形態のいずれかと組み合わせることができるある一定の実施形態では、レバウジオシドVまたはレバウジオシドWまたはレバウジオシドGまたはレバウジオシドKAまたはレバウジオシドMは唯一の甘味料とすることができ、製品は、約1%～約4%(w/v-%)スクロース溶液に等しい甘味度を有する。前記実施形態のいずれかと組み合わせることができるある一定の実施形態では、経口摂取可能製品はさらに、追加の甘味料を含むことができ、ここで、製品は約1%～約10%(w/v-%)スクロース溶液に等しい甘味度を有する。前記実施形態のいずれかと組み合わせることができるある一定の実施形態では、製品中の全ての甘味成分は高甘味度甘味料とすることができ、前記実施形態のいずれかと組み合わせることができるある一定の実施形態では、製品中の全ての甘味成分は、天然高甘味度甘味料とすることができ、前記実施形態のいずれかと組み合わせることができるある一定の実施形態では、追加の甘味料は、下記から選択される1つ以上の甘味料とすることができ、ステビア抽出物、ステビオール配糖体、ステビオシド、レバウジオシドA、レバウジオシドB、レバウジオシドC、レバウジオシドD、レバウジオシドD2、レバウジオシドE、レバウジオシドF、レバウジオシドG、レバウジオシドKA、レバウジオシドM、ズルコシドA、ルブソシド、ステビオールピオシド、スクロース、高フルクトースコーンシロップ、フルクトース、グルコース、キシロース、アラビノース、ラムノース、エリスリトール、キシリトール、マンニトール、ソルビトール、イノシトール、AceK、アスパルテム、ネオテム、スクラロース、サッカリン、ナリンギンジヒドロカルコン(NarDHC)、ネオヘスペリジンジヒドロカルコン(NDHC)、ルブソシド、モグロシドIV、シアメノシドI、モグロシドV、モナチン、タウマチン、モネリン、ブラゼイン、L-アラニン、グリシン、羅漢果、ヘルナンズルチン、フィロズルチン、トリロブタイン、およびそれらの組み合わせ。前記実施形態のいずれかと組み合わせることができるある一定の実施形態では、飲料製品および摂取可能製品はさらに、下記から選択される1つ以上の添加物を含むことができる：炭水化物、ポリオール、アミノ酸またはその塩、ポリアミノ酸またはその塩、糖酸またはその塩、ヌクレオチド、有機酸、無機酸、有機塩、有機酸塩、有機塩基塩、無機塩、苦味化合物、着香剤、香味成分、収斂化合物、タンパク質、タンパク質加水分解物、界面活性剤、乳化剤、フラボノイド、アルコール、ポリマー、およびそれらの組み合わせ。前記実施形態のいずれかと組み合わせることができるある一定の実施形態では、レバウジオシドVは製品中に添加される前には約50重量%～約100重量%の純度を有する。前記実施形態のいずれかと組み合わせることができるある一定の実施形態では、Wは、製品中に添加される前には、約50重量%～約100重量%の純度を有する。前記実施形態のいずれかと組み合わせることができるある一定の実施形態では、製品中のレバウジオシドVはレバウジオシドV多形またはアモルファスレバウジオシドVである。前記実施形態のいずれかと組み合わせることができるある一定の実施形態では、製品中のレバウジオシドWはレバウジオシドW多形またはアモルファスレバウジオシドWである。前記実施形態のいずれかと組み合わせることができるある一定の実施形態では、製品中のレバウジオシドWはレバウジオシドW立体異性体である。

10

20

30

40

## 【 0 0 4 3 】

本開示の他の態様は、レバウジオシドV、レバウジオシドW、レバウジオシドKA、レバウジオシドM、およびレバウジオシドGから選択される合成レバウジオシドを製品中に、または飲料製品および摂取可能製品を製造するための成分中に含有させることにより、飲料製品および摂取可能製品を調製する方法に関し、ここで、レバウジオシドV、レバウジオシドW、レバウジオシドKA、レバウジオシドM、およびレバウジオシドGから選択されるレバウジオシドは製品中に、約5ppm～約100ppmの濃度で存在する。本開示の他の態様は、約5ppm～約100ppmの、レバウジオシドV、レバウジオシドW、レバウジオシドKA、レバウジオシドM、およびレバウジオシドGから選択される合成レバウジオシドを飲料製品および摂取可能製品中に添加することにより飲料製品および摂

50

取可能製品の甘味を増強させるための方法に関し、ここで、レバウジオシドV、レバウジオシドW、レバウジオシドKA、レバウジオシドM、およびレバウジオシドGから選択される、添加される合成レバウジオシドは、レバウジオシドV、レバウジオシドW、レバウジオシドKA、レバウジオシドM、およびレバウジオシドGから選択される合成レバウジオシドを含まない対応する飲料製品および摂取可能製品と比べて、飲料製品および摂取可能製品の甘味を増強させる。

#### 【0044】

前記実施形態のいずれかと組み合わせることができるある一定の実施形態では、レバウジオシドVは唯一の甘味料であり、製品は、約1%～約4%(w/v-%)スクロース溶液に等しい甘味度を有する。前記実施形態のいずれかと組み合わせることができるある一定の実施形態では、レバウジオシドKAは唯一の甘味料であり、製品は、約1%～約4%(w/v-%)スクロース溶液に等しい甘味度を有する。前記実施形態のいずれかと組み合わせることができるある一定の実施形態では、レバウジオシドGは唯一の甘味料であり、製品は、約1%～約4%(w/v-%)スクロース溶液に等しい甘味度を有する。前記実施形態のいずれかと組み合わせることができるある一定の実施形態では、レバウジオシドWは唯一の甘味料であり、製品は、約1%～約4%(w/v-%)スクロース溶液に等しい甘味度を有する。前記実施形態のいずれかと組み合わせることができるある一定の実施形態では、レバウジオシドMは唯一の甘味料であり、製品は、約1%～約4%(w/v-%)スクロース溶液に等しい甘味度を有する。前記実施形態のいずれかと組み合わせることができるある一定の実施形態では、前記方法はさらに、追加の甘味料を添加することを含み、ここで、製品は約1%～約10%(w/v-%)スクロース溶液に等しい甘味度を有する。

10

20

#### 【0045】

本開示の他の態様は、下記により甘味飲料製品または甘味摂取可能製品を調製するための方法に関する：a) 1つ以上の甘味料を含む飲料製品または摂取可能製品を提供すること；ならびにb) 約5ppm～約100ppmの、レバウジオシドV、レバウジオシドW、レバウジオシドKA、レバウジオシドM、およびレバウジオシドG、およびそれらの組み合わせから選択される合成レバウジオシドを飲料製品または摂取可能製品中に添加すること。

#### 【0046】

前記実施形態のいずれかと組み合わせることができるある一定の実施形態では、方法は、1つ以上の添加物を飲料製品または摂取可能製品に添加することをさらに含む。前記実施形態のいずれかと組み合わせることができるある一定の実施形態では、経口摂取可能製品は、1つ以上の添加物をさらに含む。前記実施形態のいずれかと組み合わせることができるある一定の実施形態では、1つ以上の添加物は下記から選択される：炭水化物、ポリオール、アミノ酸またはその塩、ポリアミノ酸またはその塩、糖酸またはその塩、ヌクレオチド、有機酸、無機酸、有機塩、有機酸塩、有機塩基塩、無機塩、苦味化合物、着香剤、香味成分、収斂化合物、タンパク質、タンパク質加水分解物、界面活性剤、乳化剤、フラボノイド、アルコール、ポリマー、およびそれらの組み合わせ。前記実施形態のいずれかと組み合わせることができるある一定の実施形態では、製品中の全ての甘味成分は高甘味度甘味料である。前記実施形態のいずれかと組み合わせることができるある一定の実施形態では、製品中の全ての甘味成分は天然高甘味度甘味料である。前記実施形態のいずれかと組み合わせることができるある一定の実施形態では、甘味料は下記から選択される：ステビア抽出物、ステビオール配糖体、ステビオシド、レバウジオシドA、レバウジオシドB、レバウジオシドC、レバウジオシドD、レバウジオシドD2、レバウジオシドE、レバウジオシドF、レバウジオシドG、レバウジオシドKA、レバウジオシドM、ズルコシドA、ルブソシド、ステビオールピオシド、スクロース、高フルクトースコーンシロップ、フルクトース、グルコース、キシロース、アラビノース、ラムノース、エリスリトール、キシリトール、マンニトール、ソルビトール、イノシトール、AceK、アスパルテーム、ネオテーム、スクラロース、サッカリン、ナリンギンジヒドロカルコン(NarD

30

40

50

H C )、ネオヘスペリジンジヒドロカルコン ( N D H C )、ルブソシド、モグロシド I V、シアメノシド I、モグロシド V、モナチン、タウマチン、モネリン、ブラゼイン、L - アラニン、グリシン、羅漢果、ヘルナンズルチン、フィロズルチン、トリロブタイン、およびそれらの組み合わせ。前記実施形態のいずれかと組み合わせることができるある一定の実施形態では、レバウジオシド V は製品中に添加される前には約 50 重量% ~ 約 100 重量%の純度を有する。前記実施形態のいずれかと組み合わせることができるある一定の実施形態では、製品中のレバウジオシド V はレバウジオシド V 多形またはアモルファスレバウジオシド V である。前記実施形態のいずれかと組み合わせることができるある一定の実施形態では、レバウジオシド W は、製品中に添加される前には、約 50 重量% ~ 約 100 重量%の純度を有する。前記実施形態のいずれかと組み合わせることができるある一定の実施形態では、製品中のレバウジオシド W はレバウジオシド W 多形またはアモルファスレバウジオシド W である。

10

## 【0047】

下記詳細な説明を考慮すれば、本開示はよりよく理解され、上記で明記されたもの以外の特徴、態様および利点が明らかになるであろう。そのような詳細な説明は、下記図面を参照する。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0048】

【図1】ステビオールからのステビオール配糖体生合成経路を示す。

【図2】矢印で示される SDS - PAGE 分析精製組換えタンパク質を示す：A : H V 1、B : U G T 7 6 G 1、C : E U G T 1 1、D : A t S U S 1、E : U G T 7 6 G 1 - S U S 1 ( G S )、F : E U G T 1 1 - S U S 1 ( E U S )。

20

【図3】ルブソシドからレバウジオシド K A (「R e b K A」) およびレバウジオシド E (「R e b E」) を生成させる H V 1 触媒反応を示す。A - C : ルブソシド (「R u b」)、ステビオシド (「S t e」) およびレバウジオシド E (「R e b E」) 標準の H P L C 保持時間を示す。H V 1 単独により、6 時間 ( D )、12 時間 ( F ) および 24 時間 ( H ) で酵素的に生成された R e b K A ; U G T - S U S ( H V 1 - A t S U S 1 ) カップリング系により 6 時間 ( E )、12 時間 ( G ) および 24 時間 ( I ) で酵素的に生成された R e b K A および R e b E。

【図4】H V 1 による R e b E のレバウジオシド Z への変換を示す。( A ) : レバウジオシド E (「R e b E」) の H P L C 保持時間を示す。H V 1 - A t S U S 1 カップリング系における H V 1 により、3 時間 ( B )、7 時間 ( C )、24 時間 ( D ) および 44 時間 ( E ) で酵素的に生成されたレバウジオシド Z (「R e b Z」)。

30

【図5】H V 1 による R e b K A の R e b E への変換を示す。( A - B ) : レバウジオシド K A (「R e b K A」) およびレバウジオシド E (「R e b E」) 標準の H P L C 保持時間を示す。H V 1 単独により 12 時間で酵素的に生成された R e b E ( C ) ; U G T - S U S ( H V 1 - A t S U S 1 ) カップリング系により 12 時間で酵素的に生成された R e b E ( D )。

【図6】ルブソシドから R e b K A およびステビオシドを生成させる E U G T 1 1 触媒反応を示す。( A - F ) : ルブソシド (「R u b」)、ステビオシド (「S t e」)、レバウジオシド G (「R e b G」)、レバウジオシド E (「R e b E」)、レバウジオシド D (「R e b D」) およびレバウジオシド D 2 (「R e b D 2」) 標準の H P L C 保持時間を示す。E U G T 1 1 単独による、12 時間 ( G ) および 48 時間 ( J ) での酵素反応 ; U G T - S U S ( E U G T 1 1 - A t S U S 1 ) カップリング系による 12 時間 ( H ) および 48 時間 ( K ) での酵素反応 ; E U S 融合タンパク質による 12 時間 ( I ) および 48 時間 ( L ) での酵素反応。

40

【図7】E U G T 1 1 および E U S 融合タンパク質による、R e b K A の R e b E および R e b D 2 への変換を示す。( A - C ) : レバウジオシド K A (「R e b K A」)、レバウジオシド E (「R e b E」)、およびレバウジオシド D 2 (「R e b D 2」) 標準の H P L C 保持時間を示す。E U G T 1 1 単独による 12 時間 ( D ) および 48

50

時間 (G) での酵素反応 ; UGT - SUS (EUGT 11 - AtSUS 1) カップリング系による 12 時間 (E) および 48 時間 (H) での酵素反応 ; EUS 融合タンパク質による 12 時間 (F) および 48 時間 (I) での酵素反応。

【図 8】インビトロでのレバウジオシド G の UGT 76G1 生成を示す。(A - B) : ルブソシド (「Rub」) およびレバウジオシド G (「Reb G」) 標準の HPLC 保持時間を示す。UGT 76G1 単独による 12 時間 (C) および 24 時間 (F) での酵素反応 ; UGT - SUS (EUGT 11 - AtSUS 1) カップリング系による 12 時間 (D) および 24 時間 (G) での酵素反応 ; GS 融合タンパク質による 12 時間 (E) および 48 時間 (H) での酵素反応。

【図 9】レバウジオシド KA からステピオール配糖体 Reb V および Reb W を生成させる UGT 76G1 触媒反応を示す。(A - D) : ルブソシド (「Rub」)、レバウジオシド D (「Reb D」)、レバウジオシド E (「Reb E」) およびレバウジオシド KA (「Reb KA」) 標準の HPLC 保持時間を示す。UGT 76G1 単独による 6 時間 (E) および 12 時間 (H) での酵素反応 ; UGT - SUS (UGT 76G1 - AtSUS 1) カップリング系による 6 時間 (F) および 12 時間 (I) での酵素反応 ; GS 融合タンパク質による 6 時間 (G) および 12 時間 (J) での酵素反応。

【図 10】インビトロでの Reb V の Reb W への UGT 76G1 変換を示す。(A - B) : Reb V および Reb W の HPLC 保持時間を示す。(C) : UGT 76G1 - AtSUS 1 カップリング系による 6 時間での酵素反応。

【図 11】Reb G の Reb V への HV 1 変換を示す。(A - C) : レバウジオシド G (「Reb G」)、レバウジオシド A (「Reb A」) およびレバウジオシド E (「Reb E」) 標準の HPLC 保持時間を示す。HV 1 単独による 12 時間 (D) および 24 時間 (F) での酵素反応 ; UGT - SUS (HV 1 - AtSUS 1) カップリング系による 12 時間 (E) および 24 時間 (G) での酵素反応。

【図 12】Reb G の Reb V への EUGT 11 変換を示す。(A - D) : レバウジオシド G (「Reb G」)、レバウジオシド A (「Reb A」)、レバウジオシド E (「Reb E」) およびレバウジオシド D (「Reb D」) 標準の HPLC 保持時間を示す。EUGT 11 単独による 12 時間 (E) および 24 時間 (H) での酵素反応 ; UGT - SUS (EUGT 11 - AtSUS 1) カップリング系による 12 時間 (F) および 24 時間 (I) での酵素反応 ; EUS 融合酵素による 12 時間 (G) および 24 時間 (J) での酵素反応。

【図 13】組換え HV 1 ポリペプチド、組換え UGT 76G1、GS 融合酵素、および組換え AtSUS 1 の組み合わせにより触媒される、ルブソシドからの Reb W のインビトロ生成を示す。(A - F) : ルブソシド (「Rub」)、ステピオシド (「Ste」)、レバウジオシド G (「Reb G」)、レバウジオシド A (「Reb A」)、レバウジオシド D (「Reb D」) およびレバウジオシド E (「Reb E」) の標準を示す。HV 1、UGT 76G1 および AtSUS 1 により、6 時間 (G)、12 時間 (I) および 24 時間 (K) で酵素的に生成された Reb W ; HV 1 および GS 融合タンパク質により、6 時間 (H)、12 時間 (J) および 24 時間 (L) で酵素的に生成された Reb W。

【図 14】組換え EUGT 11 ポリペプチド、組換え UGT 76G1、GS 融合酵素、および組換え AtSUS 1 の組み合わせにより触媒される、ルブソシドからの Reb W のインビトロ生成を示す。(A - E) : ルブソシド (「Rub」)、ステピオシド (「Ste」)、レバウジオシド G (「Reb G」)、レバウジオシド E (「Reb E」) およびレバウジオシド D (「Reb D」) の標準を示す。EUGT 11、UGT 76G1 および AtSUS 1 により 12 時間 (F) および 48 時間 (H) で酵素的に生成された Reb W ; EUGT 11 および GS 融合タンパク質により 12 時間 (G) および 48 時間 (I) で酵素的に生成された Reb W。

【図 15】組換え HV 1 ポリペプチド、組換え UGT 76G1、GS 融合酵素および組換え AtSUS 1 の組み合わせにより触媒される、Reb G からの Reb W のインビト

10

20

30

40

50

口生成を示す。A - Dは、レバウジオシドG (「Reb G」)、レバウジオシドA (「Reb A」)、レバウジオシドD (「Reb D」)、レバウジオシドおよびレバウジオシドE (「Reb E」)の標準を示す。HV1、UGT76G1およびAtSUS1により、6時間(E)、12時間(G)および36時間(I)で酵素的に生成されたReb VおよびReb W; HV1およびGS融合タンパク質により、6時間(F)、12時間(H)および36時間(J)で酵素的に生成されたReb VおよびReb W。

【図16】組換えEUGT11ポリペプチド、組換えUGT76G1、GS融合酵素、および組換えAtSUS1の組み合わせにより触媒される、Reb GからのReb Wのインピトロ生成を示す。(A - D):レバウジオシドG (「Reb G」)、レバウジオシドA (「Reb A」)、レバウジオシドE (「Reb E」)およびレバウジオシドD (「Reb D」)の標準を示す。EUGT11、UGT76G1およびAtSUS1により12時間(E)および48時間(G)で酵素的に生成されたReb W; EUGT11およびGS融合タンパク質により12時間(F)および48時間(H)で酵素的に生成されたReb W。

【図17】Reb VおよびReb Gの構造を示す。

【図18】Reb Vの重要なTOCSYおよびHMBC相関を示す。

【図19】Reb WおよびReb Vの構造を示す。

【図20】Reb Wの重要なTOCSYおよびHMBC相関を示す。

【図21】ステビオール配糖体の生合成経路を示す。

【図22】UGT76G1およびGS融合酵素により触媒される、Reb DからReb Mのインピトロ生成を示す。(A - B):レバウジオシドD (「Reb D」)およびレバウジオシドM (「Reb M」)標準のHPLC保持時間を示す。UGT76G1単独による3時間(C)および6時間(F)での酵素反応; UGT-SUS (UGT76G1 - AtSUS1)カップリング系による3時間(D)および6時間(G)での酵素反応; GS融合酵素による3時間(E)および6時間(H)での酵素反応。

【図23】UGT76G1およびGS融合酵素により触媒される、Reb EからReb DおよびReb Mのインピトロ生成を示す。(A - C):レバウジオシドE (「Reb E」)、レバウジオシドD (「Reb D」)およびレバウジオシドM (「Reb M」)標準のHPLC保持時間を示す。UGT76G1単独による3時間(D)、12時間(G)および24時間(J)での酵素反応; UGT-SUS (UGT76G1 - AtSUS1)カップリング系による3時間(E)、12時間(H)および24時間(K)での酵素反応; GS融合酵素による3時間(F)、12時間(I)および24時間(L)での酵素反応。

【図24】組換えHV1、組換えUGT76G1、GS融合酵素、および/または組換えAtSUS1の組み合わせにより触媒される、ステビオシドからReb DおよびReb Mのインピトロ生成を示す。(A - D):ステビオシド (「Ste」)、レバウジオシドA (「Reb A」)、レバウジオシドD (「Reb D」)およびレバウジオシドM (「Reb M」)標準のHPLC保持時間を示す。HV1およびUGT76G1による、UGT-SUSカップリング系における6時間(E)、12時間(H)および24時間(K)での酵素反応; HV1およびGS融合酵素による6時間(F)、12時間(I)および24時間(L)での酵素反応。UGT76G1およびHV1による6時間(G)、12時間(J)および24時間(M)での酵素反応。

【図25】組換えHV1、組換えUGT76G1、GS融合酵素、および/または組換えAtSUS1の組み合わせにより触媒される、レバウジオシドAからReb DおよびReb Mのインピトロ生成を示す。(A - C):レバウジオシドA (「Reb A」)、レバウジオシドD (「Reb D」)およびレバウジオシドM (「Reb M」)標準のHPLC保持時間を示す。HV1およびUGT76G1による、UGT-SUSカップリング系における、6時間(D)、12時間(G)および24時間(J)での酵素反応; HV1およびGS融合酵素による、6時間(E)、12時間(H)および24時間(K)での酵素反応。UGT76G1およびHV1による6時間(F)、12時間(I)および2

10

20

30

40

50



4時間（J）での酵素反応。

【図26】Reb Mの構造を示す。

【図27】Reb Mの重要なTOCSYおよびHMBC相関を示す。

【発明を実施するための形態】

【0049】

本開示は、様々な改変および別の形態を許容可能であるが、その特定の実施形態が図面において例として示されており、本明細書において以下詳細に記載される。しかしながら、特定の実施形態の記載は、添付の特許請求の範囲により規定される本開示の精神および範囲内に包含される全ての改変、等価物および代替案に及ぶように、本開示を制限することを意図しないことが理解されるべきである。

10

【0050】

別に規定されない限り、本明細書で使用される全ての技術および科学用語は、本開示が属する分野の当業者により普通に理解されるものと同じ意味を有する。本明細書に記載されるものに類似する、またはこれに等価な任意の方法および材料が本開示の実施または試験において使用され得るが、好ましい材料および方法が以下で記載される。

【0051】

「相補的」という用語は、当業者により理解されるその通常のかつ習慣的な意味に従い使用され、限定はされないが、互いにハイブリダイズすることができるヌクレオチド塩基間の関係を説明するために使用される。例えば、DNAに関しては、アデノシンはチミンに相補的であり、シトシンはグアニンに相補的である。したがって、対象技術はまた、添付の配列表において報告されている全配列に相補的な単離された核酸断片ならびにそれらの実質的に同様の核酸配列を含む。

20

【0052】

「核酸」および「ヌクレオチド」という用語は、当業者により理解されるそれらの個々の通常のかつ習慣的な意味に従い使用され、限定はされないが、デオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドおよび一本鎖または二本鎖形態のいずれかのそのポリマーを示すために使用される。具体的に制限されない限り、その用語は、参照核酸と同様の結合特性を有し、天然起源のヌクレオチドと同様に代謝される天然ヌクレオチドの公知の類似体を含む核酸を包含する。別記されない限り、特定の核酸配列はまた、暗に、その保存的に改変されたまたは縮重パリアント（例えば、縮重コドン置換）および相補的配列、ならび

30

【0053】

「単離された」という用語は、当業者により理解されるその通常のかつ習慣的な意味に従い使用され、単離された核酸または単離されたポリペプチドとの関連で使用される場合、限定はされないが、人の手により、その自然の環境から離れて存在し、よって、自然の産物ではない核酸またはポリペプチドを示すために使用される。単離された核酸またはポリペプチドは精製形態で存在することができ、または、例えば、トランスジェニック宿主細胞内などの非天然環境において存在することができる。

【0054】

「インキュベートする」および「インキュベーション」という用語は、本明細書では、2つ以上の化学的または生物学的実体（例えば、化学化合物および酵素）を混合し、それらを、ステピオール配糖体組成物を生成させるのに有利な条件下で相互作用させるプロセスを示す。

40

【0055】

「縮重パリアント」という用語は、参照核酸配列から、1つ以上の縮重コドン置換により異なっている残基配列を有する核酸配列を示す。縮重コドン置換は、1つ以上の選択された（または全ての）コドンの第3の位置が混合塩基および/またはデオキシイノシン残基で置換された配列を生成させることにより、達成することができる。核酸配列およびその縮重パリアントの全ては同じアミノ酸またはポリペプチドを発現する。

【0056】

50

「ポリペプチド」「タンパク質」および「ペプチド」という用語は、当業者により理解されるそれらの個々の通常のかつ習慣的な意味に従い使用され；3つの用語は時として同じ意味で使用され、限定はされないが、そのサイズまたは機能に関係なく、アミノ酸、またはアミノ酸類似体のポリマーを示すために使用される。「タンパク質」はしばしば、比較的大きなポリペプチドに関して使用され、「ペプチド」はしばしば、小さなポリペプチドに関して使用されるが、当技術分野におけるこれらの用語の使用は重なっており、変化する。「ポリペプチド」という用語は本明細書では、別記されない限り、ペプチド、ポリペプチド、およびタンパク質を示す。「タンパク質」、「ポリペプチド」および「ペプチド」という用語は本明細書では、ポリヌクレオチド産物に言及する場合同じ意味で使用される。よって、例示的なポリペプチドは、ポリヌクレオチド産物、天然起源のタンパク質、相同体、オルソログ、パラログ、断片および前記の他の等価物、バリエーション、および類似体を含む。

10

**【0057】**

「ポリペプチド断片」および「断片」という用語は、参照ポリペプチドに関連して使用される場合、当業者にとってそれらの通常のかつ習慣的な意味に従い使用され、限定はされないが、アミノ酸残基が参照ポリペプチド自体と比べて欠失しているが、残りのアミノ酸配列は参照ポリペプチドにおける対応する位置と通常同一であるポリペプチドを示すために使用される。そのような欠失は、参照ポリペプチドのアミノ末端またはカルボキシ末端、あるいは両方で起こり得る。

**【0058】**

20

ポリペプチドまたはタンパク質の「機能的断片」という用語は、全長ポリペプチドまたはタンパク質の一部であり、および全長ポリペプチドまたはタンパク質と、実質的に同じ生物活性を有し、または実質的に同じ機能を実行する（例えば、同じ酵素反応を実行する）ペプチド断片を示す。

**【0059】**

「バリエーションポリペプチド」「改変アミノ酸配列」または「改変ポリペプチド」という用語は、同じ意味で使用され、参照ポリペプチドと、1つ以上のアミノ酸だけ、例えば、1つ以上のアミノ酸置換、欠失、および/または付加により異なるアミノ酸配列を示す。一態様では、バリエーションは参照ポリペプチドの能力のいくつかまたは全てを保持する「機能的バリエーション」である。

30

**【0060】**

「機能的バリエーション」という用語はさらに保存的に置換されたバリエーションを含む。「保存的に置換されたバリエーション」という用語は、参照ペプチドと1つ以上の保存的アミノ酸置換により異なり、参照ペプチドの活性のいくつかまたは全てを維持するアミノ酸配列を有するペプチドを示す。「保存的アミノ酸置換」はアミノ酸残基の機能的に同様の残基との置換である。保存的置換の例としては、1つの非極性（疎水性）残基、例えばイソロイシン、バリン、ロイシンまたはメチオニンの、別のものとの置換；1つの荷電または極性（親水性）残基の別のものとの、例えばアルギニンとリジン間、グルタミンとアスパラギン間、スレオニンとセリン間の置換；1つの塩基性残基、例えばリジンまたはアルギニンの別のものとの置換；または1つの酸性残基、例えばアスパラギン酸またはグルタミン酸の別のものとの置換；あるいは、1つの芳香族残基、例えばフェニルアラニン、チロシン、またはトリプトファンの別のものとの置換が挙げられる。そのような置換は、タンパク質またはポリペプチドのみかけの分子量または等電点にほとんど、または全く影響しないと予想される。「保存的に置換されたバリエーション」という句はまた、残基が、化学的誘導体化残基と置き換えられたペプチドを含み、ただし、得られたペプチドが参照ペプチドの本明細書に記載される活性をある程度または全て維持することを条件とする。

40

**【0061】**

「バリエーション」という用語は、対象技術のポリペプチドとの関連で、参照ポリペプチドのアミノ酸配列に対して少なくとも75%、少なくとも76%、少なくとも77%、少なくとも78%、少なくとも79%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも8

50

2%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、およびさらに100%同一なアミノ酸配列を有する機能的に活性なポリペプチドをさらに含む。

#### 【0062】

「相同」という用語は、その文法的形態およびスペリングバリエーションの全てにおいては、「共通の進化的起源」を有するポリヌクレオチドまたはポリペプチド間の関係を示し、スーパーファミリー由来のポリヌクレオチドまたはポリペプチドおよび異なる種由来の相同ポリヌクレオチドまたはタンパク質が含まれる (Reeck et al., Cell 50:667, 1987)。そのようなポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、パーセント同一性または保存された位置での特異的アミノ酸もしくはモチーフの存在の観点に関係なく、それらの配列類似性により反映される配列同一性を有する。例えば、2つの相同ポリペプチドは、少なくとも75%、少なくとも76%、少なくとも77%、少なくとも78%、少なくとも79%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、およびさらに100%同一なアミノ酸配列を有することができる。

10

20

#### 【0063】

対象技術のバリエーションポリペプチド配列に関する「パーセント(%)アミノ酸配列同一性」は、配列をアライメントし、必要に応じて、最大パーセント配列同一性を達成するためにギャップを導入した後、配列同一性の部分として保存的置換を考慮せずに、参照ポリペプチドのアミノ酸残基と同一である、候補配列におけるアミノ酸残基のパーセンテージを示す。

#### 【0064】

パーセントアミノ酸配列同一性を決定する目的でのアライメントは、当技術分野における技術の範囲内にある様々な方法で、例えば、公的に入手可能なコンピュータソフトウェア、例えばBLAST、BLAST-2、ALIGN、ALIGN-2またはMegaAlign(DNASTAR)ソフトウェアを使用して達成することができる。当業者は、アライメントを測定するための適切なパラメータを決定することができ、比較される配列の全長にわたって最大アライメントを達成するために必要とされる任意のアルゴリズムが挙げられる。例えば、%アミノ酸配列同一性は、配列比較プログラムNCBI-BLAST2を使用することにより決定され得る。NCBI-BLAST2配列比較プログラムはncbi.nlm.nih.govからダウンロードされ得る。NCBI-BLAST2は、いくつかの検索パラメータを使用し、ここで、それらの検索パラメータの全てがデフォルト値に設定され、例えば、アンマスキyes、ストランド=全て、予想発生10、最小低複雑長さ(minimum low complexity length)=15/5、マルチパス値=0.01、マルチパスに対する定数=25、最終ギャップアライメントに対するドロップオフ=25およびスコアリング行列=BLOSUM62が含まれる。NCBI-BLAST2がアミノ酸配列比較のために使用される状況では、あるアミノ酸配列Bに対する、これとの、これに対抗するあるアミノ酸配列Aの%アミノ酸配列同一性(あるいは、あるアミノ酸配列Bに対する、これとの、またはこれに対抗するある一定の%アミノ酸配列同一性を有する、または含むあるアミノ酸配列Aと呼ぶことができる)は下記の通り計算され: 分数X/Yの100倍

30

40

ここで、Xは、AおよびBのそのプログラムのアライメントにおいて、配列アライメントプログラムNCBI-BLAST2により同一マッチとしてスコア化されたアミノ酸残基の数であり、YはBのアミノ酸残基の総数である。アミノ酸配列Aの長さがアミノ酸配列Bの長さに等しくない場合、AのBに対する%アミノ酸配列同一性は、BのAに対する%

50

アミノ酸配列同一性に等しくないことが認識されるであろう。

【0065】

この意味で、アミノ酸配列「類似性」を決定するための技術は当技術分野でよく知られている。一般に、「類似性」は、適切な場所での2つ以上のポリペプチドの正確なアミノ酸対アミノ酸比較を示し、ここで、アミノ酸は同一であり、または同様の化学的および/または物理的性質、例えば電荷または疎水性を有する。そのように呼ばれる「パーセント類似性」はその後、比較されたポリペプチド配列間で決定され得る。核酸およびアミノ酸配列同一性を決定するための技術はまた、当技術分野でよく知られており、その遺伝子に対するmRNAのヌクレオチド配列を決定すること(通常、cDNA中間体を介する)およびその中でコードされるアミノ酸配列を決定すること、およびこれを第2のアミノ酸配列と比較することを含む。一般に、「同一性」は、それぞれ、2つのポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列の正確なヌクレオチド対ヌクレオチドまたはアミノ酸対アミノ酸対応を示す。2つ以上のアミノ酸配列のように、2つ以上のポリヌクレオチド配列は、それらの「パーセント同一性」を決定することにより比較することができる。Wisconsin配列解析パッケージ、バージョン8(Genetics Computer Group, マディソン, Wis. から入手可能)において使用可能なプログラム、例えば、GAPプログラムは、それぞれ、2つのポリヌクレオチド間の同一性ならびに2つのポリペプチド配列間の同一性および類似性の両方を計算することができる。配列間の同一性または類似性を計算するための他のプログラムは当業者により知られている。

10

【0066】

参照位置「に対応する」アミノ酸位置は、アミノ酸配列をアライメントすることにより同定される、参照配列とアライメントする位置を示す。そのようなアライメントは、手作業で、またはよく知られた配列アライメントプログラム、例えばClustalW2、Blast2、などを使用することにより実施することができる。

20

【0067】

特に指定がない限り、2つのポリペプチドまたはポリヌクレオチド配列のパーセント同一性は、2つの配列より短い方の全長にわたる、同一アミノ酸残基またはヌクレオチドのパーセンテージを示す。

【0068】

「コード配列」は、当業者により理解されるその通常のかつ習慣的な意味に従い使用され、限定はされないが、特異的アミノ酸配列をコードするDNA配列を示すために使用される。

30

【0069】

「好適な調節配列」は、当業者により理解されるその通常のかつ習慣的な意味に従い使用され、限定はされないが、コード配列の上流(5'非コード配列)、その中、または下流(3'非コード配列)に位置し、関連するコード配列の転写、RNAプロセッシングまたは安定性、または翻訳に影響するヌクレオチド配列を示すために使用される。調節配列はプロモーター、翻訳リーダー配列、イントロン、およびポリアデニル化認識配列を含み得る。

【0070】

「プロモーター」は、当業者により理解されるその通常のかつ習慣的な意味に従い使用され、限定はされないが、コード配列または機能的RNAの発現を制御することができるDNA配列を示すために使用される。一般に、コード配列はプロモーター配列に対し3'に位置する。プロモーターは、その全体が天然遺伝子から誘導され得、または自然で見出される異なるプロモーターから誘導される異なるエレメントから構成され得、またはさらには合成DNAセグメントを含み得る。異なるプロモーターは、異なる細胞型において、または発達の異なる段階で、または異なる環境条件に応じて、遺伝子の発現を調整することができることが、当業者により理解される。ほとんどの細胞型において、ほとんどの時間で遺伝子を発現させるプロモーターは普通、「構成的プロモーター」と呼ばれる。ほとんどの場合、調節配列の正確な境界は完全には規定されていないので、異なる長さのDN

40

50

A断片は同一プロモーター活性を有し得ることが、さらに認識される。

【0071】

「作動可能に連結された」という用語は、1つの機能が他のものに影響されるような単一核酸断片上の核酸配列の関連を示す。例えば、プロモーターは、そのコード配列の発現に影響を与えることができる場合、コード配列と作動可能に連結されている（すなわち、コード配列は、プロモーターの転写制御下にある）。コード配列は、センスまたはアンチセンス配向で調節配列に作動可能に連結させることができる。

【0072】

「発現」という用語は、本明細書では、当業者により理解されるその通常のかつ習慣的な意味に従い使用され、限定はされないが、対象技術の核酸断片に由来するセンス（mRNA）またはアンチセンスRNAの転写および安定な蓄積を示すために使用される。「過剰発現」は、正常または非形質転換生物における生成のレベルを超える、トランスジェニックまたは組換え生物における遺伝子産物の生成を示す。

10

【0073】

「形質転換」は、当業者により理解されるその通常のかつ習慣的な意味に従い使用され、限定はされないが、ポリヌクレオチドの標的細胞中への導入を示すために使用される。導入されたポリヌクレオチドは、標的細胞のゲノムまたは染色体DNA中に組み込むことができ、遺伝学的に安定な遺伝が得られ、またはこれは宿主染色体と関係なく複製することができる。形質転換された核酸断片を含む宿主生物は「トランスジェニック」または「組換え」または「形質転換」生物と呼ばれる。

20

【0074】

「形質転換」「トランスジェニック」および「組換え」という用語は、本明細書で宿主細胞に関連して使用される場合、当業者により理解されるそれらの通常のかつ習慣的な意味に従い使用され、限定はされないが、異種核酸分子が導入された宿主生物の細胞、例えば植物または微生物細胞を示すために使用される。核酸分子は安定に、宿主細胞のゲノム中に組み込むことができ、または核酸分子は染色体外分子として存在することができる。そのような染色体外分子は自己複製可能である。形質転換細胞、組織、または被験体は、形質転換プロセスの最終生成物だけでなく、そのトランスジェニック後代を包含することが理解される。

30

【0075】

「組換え」「異種」および「外因性」という用語は、本明細書でポリヌクレオチドに関連して使用される場合、当業者により理解されるそれらの通常のかつ習慣的な意味に従い使用され、限定はされないが、特定の宿主細胞に対し外来性である起源に由来する、あるいは、同じ起源由来である場合、その元の形態から改変されたポリヌクレオチド（例えば、DNA配列または遺伝子）を示すために使用される。よって、宿主細胞中の異種遺伝子は、特定の宿主細胞にとって内在性であるが、例えば、部位特異的突然変異誘発または他の組換え技術の使用により改変されている遺伝子を含む。用語はまた、天然起源のDNA配列の非天然起源の複数のコピーを含む。よって、用語は細胞に対し外来性または異種である、またはエレメントが通常見出されない宿主細胞内の位置または形態以外において細胞に対し相同であるDNAセグメントを示す。

40

【0076】

同様に、「組換え」「異種」および「外因性」という用語は、本明細書でポリペプチドまたはアミノ酸配列に関連して使用される場合、特定の宿主細胞に対して外来性である起源に由来する、あるいは、同じ起源由来である場合、その元の形態から改変されたポリペプチドまたはアミノ酸配列を意味する。よって、組換えDNAセグメントは宿主細胞において発現され、組換えポリペプチドが生成され得る。

【0077】

「プラスミド」「ベクター」および「カセット」という用語は、当業者により理解されるそれらの通常のかつ習慣的な意味に従い使用され、限定はされないが、しばしば、細胞の中央代謝の一部ではなく、通常環状二本鎖DNA分子の形態である遺伝子を運搬する染

50

色体外エレメントを示すために使用される。そのようなエレメントは、任意の起源に由来する、自己複製配列、ゲノム組み込み配列、ファージまたはヌクレオチド配列、直鎖または環状の一本または二本鎖DNAまたはRNAであってもよく、この場合、多くのヌクレオチド配列が、選択された遺伝子産物のためのプロモーター断片およびDNA配列を、適切な3'非翻訳配列と共に細胞中に挿入することができる、特有の構成中に連結または組み換えられている。「形質転換カセット」は、外来遺伝子を含み、外来遺伝子に加えて特定の宿主細胞の形質転換を促進するエレメントを有する特異ベクターを示す。「発現カセット」は、外来遺伝子を含み、外来遺伝子に加えて、外来性宿主においてその遺伝子の増強された発現を可能にするエレメントを有する特異ベクターを示す。

**【0078】**

本明細書で使用される標準組換えDNAおよび分子クローニング技術は当技術分野でよく知られており、例えば、Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第2版; Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, N.Y., 1989 (以後、「Maniatis」); ならびにSilhavy, T. J., Bennan, M. L. and Enquist, L. W. *Experiments with Gene Fusions*; Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, N.Y., 1984; ならびにAusubel, F. M. et al., *In Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley-Interscienceにより出版, 1987により記載され; その各々の全体は、これにより、参照により本明細書に、それらがこれと一致する程度まで組み込まれる。

**【0079】**

本明細書では、「合成の」または「有機合成された」または「化学的に合成された」または「有機合成すること」または「化学的に合成すること」または「有機合成」または「化学合成」は、一連の化学反応により化合物を調製することを示すために使用され; これは、化合物を、例えば、自然源から抽出することを含まない。

**【0080】**

「経口摂取可能製品」という用語は、本明細書では、人または動物の口と接触する任意の飲料、食品、健康補助食品、栄養補助食品、医薬組成物、歯科用衛生学的組成物および化粧品を示し、口内に取り入れられ、その後、口から排出される物質、および飲まれ、食され、嚥下され、または別様に消化される物質; ならびに一般に許容される範囲の濃度で使用された場合、ヒトまたは動物が消費するのに安全である物質が含まれる。

**【0081】**

「食品」という用語は、本明細書では、下記を示す: 果実、野菜、ジュース、肉製品、例えばハム、ベーコンおよびソーセージ; 卵製品、果実濃縮物、ゼラチンおよびゼラチン様製品、例えばジャム、ゼリー、貯蔵食料、など; 乳製品、例えばアイスクリーム、サワークリーム、ヨーグルト、およびシャーベット; アイシング、糖蜜を含むシロップ; トウモロコシ、コムギ、ライ麦、ダイズ、カラスムギ、コメおよびオオムギ製品、穀類製品、ナッツミートおよびナッツ製品、ケーキ、クッキー、菓子類、例えばキャンディ、ガム、果物風味ドロップ、およびチョコレート、チューインガム、ミント、クリーム、アイシング、アイスクリーム、パイおよびパン。「食品」はまた、香辛料、例えばハーブ、スパイスおよび調味料、うま味調味料、例えばグルタミン酸ナトリウムを示す。「食品」はさらに、下記を示し、これらをも含む: 調製されたパッケージ製品、例えばダイエット用甘味料、液体甘味料、卓上用香味料、水で再構成されると、非炭酸飲料を提供する粒状香味ミックス、インスタントプリン用ミックス、インスタントコーヒーおよびティー、コーヒー用クリーム、麦芽乳ミックス、ペット用食品、家畜用食品、タバコ、およびベーキング用途用の材料、例えばパン、クッキー、ケーキ、パンケーキ、ドーナツなどの調製のための

10

20

30

40

50

粉末ベーキングミックス。「食品」はまた、スクロースをほとんど、または全く含まないダイエット用または低カロリー食品および飲料を示す。

【0082】

本明細書では、「立体異性体」という用語は、それらの原子の空間における配向のみが異なる個々の分子の全ての異性体に対する一般用語である。「立体異性体」は鏡像異性体およびお互いの鏡像ではない1を超えるキラル中心を有する化合物の異性体（ジアステレオマー）を含む。

【0083】

本明細書では、「アモルファスレバウジオシドV」という用語は、レバウジオシドVの非晶質固体形態を示す。本明細書では、「アモルファスレバウジオシドW」という用語は、レバウジオシドWの非晶質固体形態を示す。

10

【0084】

本明細書では、「甘味度」という用語は、個体、例えば、ヒトにより観察または経験される甘味感覚の相対強度、または、例えばBr ixスケールでの、テイスターにより検出される甘味の程度または量を示す。

【0085】

本明細書では、「甘味を増強させる」という用語は、レバウジオシドVおよび/またはレバウジオシドWを含まない対応する経口摂取可能製品と比べて、本開示の飲料製品または摂取可能製品の1つ以上の甘味特性の知覚を、その性質および品質を変化させずに、増加させ、増大させ、強化し、強調し、強め、かつ/または増強する、レバウジオシドVおよび/またはレバウジオシドWの効果を示す。

20

【0086】

本明細書では、「異味（複数可）」という用語は、本開示の飲料製品または摂取可能製品において、特質上または通常、見出されない味覚の量または程度を示す。例えば、異味は、消費者に対する甘味摂取可能製品の望ましくない味覚、例えば、苦味、甘草様味覚、金属味、嫌悪味、渋味、遅延した甘味発生、長引く甘い後味、等々、などである。

【0087】

本明細書では、「w/v-%」という用語は、そのような化合物を含む本開示の液体経口摂取可能製品100ml毎の化合物、例えば糖、（グラムで表される）の重量を示す。本明細書では、「w/w-%」という用語は、そのような化合物を含む本開示の経口摂取可能製品の1グラム毎の化合物、例えば糖（グラムで表される）の重量を示す。

30

【0088】

本明細書では、「ppm」という用語は、パート（パーツ）パーミليونを示し、重量によると、例えば、そのような化合物を含む本開示の経口摂取可能製品1キログラムあたりの化合物、例えばレバウジオシドVおよび/またはレバウジオシドW（ミリグラムで表される）の重量（すなわち、mg/kg）、またはそのような化合物を含む本開示の経口摂取可能製品1リットルあたりの化合物、例えばレバウジオシドVおよび/またはレバウジオシドW（ミリグラムで表される）の重量（すなわち、mg/L）であり；または体積によると、例えば、そのような化合物を含む本開示の経口摂取可能製品1リットルあたりの化合物、例えばレバウジオシドVおよび/またはレバウジオシドW（ミリリットルで表される）の体積（すなわち、ml/L）である。

40

【0089】

本開示によれば、ノンカロリー甘味料およびノンカロリー甘味料を合成するための方法が開示される。また、本開示によれば、酵素および酵素を使用してノンカロリー甘味料を調製する方法が開示される。

【0090】

合成ノンカロリー甘味料：合成レバウジオシドV

1つの態様では、本開示は、合成ノンカロリー甘味料に向けられる。合成ノンカロリー甘味料は合成レバウジオシド型ステピオール配糖体であり、「レバウジオシドV」という名称が与えられている。レバウジオシドV（「Reb V」）は、アグリコンステピオー

50

ルに連結されたその構造内に4つの  $\beta$ -D-グルコシル単位を有するステビオール配糖体であり、ステビオールアグリコン部分は、エーテル結合の形態のC-13のGlc 1-3-Glc 1単位およびエステル結合の形態のC-19位の別のGlc 1-2-Glc 1単位を有する。

【0091】

レバウジオシドVは、大規模1Dおよび2D NMRならびに高分解能質量スペクトルデータおよび加水分解研究に基づいて、分子式が $C_{44}H_{70}O_{23}$ であり、IUPAC名が13-[(3-O- $\beta$ -D-グルコピラノシル)- $\beta$ -D-グルコピラノシル]オキシ]エント-カウル-16-エン-19-オイック酸-(2-O- $\beta$ -D-グルコピラノシル)- $\beta$ -D-グルコピラノシル)エステルである。

10

【0092】

合成ノンカロリー甘味料：合成レバウジオシドW

1つの態様では、本開示は、合成ノンカロリー甘味料に向けられる。合成ノンカロリー甘味料は、合成レバウジオシド型ステビオール配糖体であり、「レバウジオシドW」という名称が与えられている。レバウジオシドW(「Reb W」)はアグリコンステビオールに連結されたその構造内に5つの  $\beta$ -D-グルコシル単位を有するステビオール配糖体であり、ステビオールアグリコン部分は、エーテル結合の形態のC-13のGlc 1-3-Glc 1単位を有し、かつエステル結合の形態のC-19位のGlc 1-2(Glc 1-3)-Glc 1単位を有する。

20

【0093】

レバウジオシドWは分子式が $C_{50}H_{80}O_{28}$ であり、IUPAC名が13-[(3-O- $\beta$ -D-グルコピラノシル)- $\beta$ -D-グルコピラノシル]オキシ]エント-カウル-16-エン-19-オイック酸-[(2-O- $\beta$ -D-グルコピラノシル-3-O- $\beta$ -D-グルコピラノシル)- $\beta$ -D-グルコピラノシル)エステルである。

【0094】

合成ノンカロリー甘味料：合成レバウジオシドKA

1つの態様では、本開示は、合成ノンカロリー甘味料に向けられる。合成ノンカロリー甘味料は合成レバウジオシド型ステビオール配糖体であり、「レバウジオシドKA」という名称が与えられている。レバウジオシドKA(「Reb KA」)はアグリコンステビオールに連結されたその構造内に3つの  $\beta$ -D-グルコシル単位を有するステビオール配糖体であり、ステビオールアグリコン部分は、エーテル結合の形態のC-13のGlc 1単位を有し、エーテル結合の形態のC-19のGlc 1-2-Glc 1単位を有する。レバウジオシドKAは、大規模1Dおよび2D NMRならびに高分解能質量スペクトルデータおよび加水分解研究に基づいて、分子式が $C_{38}H_{60}O_{18}$ であり、IUPAC名が13- $\beta$ -D-グルコピラノシルオキシ]エント-カウル-16-エン-19-オイック酸-(2-O- $\beta$ -D-グルコピラノシル)- $\beta$ -D-グルコピラノシル)エステルである。

30

【0095】

合成ノンカロリー甘味料：合成レバウジオシドG

1つの態様では、本開示は、合成ノンカロリー甘味料に向けられる。合成ノンカロリー甘味料は合成レバウジオシド型ステビオール配糖体であり、「レバウジオシドG」という名称が与えられている。レバウジオシドG(「Reb G」)はアグリコンステビオールに連結されたその構造内に3つの  $\beta$ -D-グルコシル単位を有するステビオール配糖体であり、ステビオールアグリコン部分はエーテル結合の形態のC-13のGlc 1-3-Glc 1単位およびエーテル結合の形態のC-19のGlc 1単位を有する。

40

【0096】

レバウジオシドGは、大規模1Dおよび2D NMRならびに高分解能質量スペクトルデータおよび加水分解研究に基づいて、分子式が $C_{38}H_{60}O_{18}$ であり、IUPAC名が13-[(3-O- $\beta$ -D-グルコピラノシル)- $\beta$ -D-グルコピラノシル]オキシ]エント-カウル-16-エン-19-オイック酸- $\beta$ -D-グルコピラノシル)エステ

50



ルである。

【0097】

合成ノンカロリー甘味料：合成レバウジオシドM

1つの態様では、本開示は、合成ノンカロリー甘味料に向けられる。合成ノンカロリー甘味料は合成レバウジオシド型ステビオール配糖体であり、「レバウジオシドM」という名称が与えられている。レバウジオシドM(「Reb M」)はアグリコンステビオールに連結されたその構造内に6つの-D-グルコシル単位を有するステビオール配糖体であり、ステビオールアグリコン部分は、エーテル結合の形態のC-13位のGlc 1-2(Glc 1-3)-Glc 1単位およびエステル結合の形態のC-19位のGlc 1-2(Glc 1-3)-Glc 1単位を有する。

10

【0098】

レバウジオシドMは、大規模1Dおよび2D NMRならびに高分解能質量スペクトルデータおよび加水分解研究に基づいて、分子式が $C_{56}H_{90}O_{33}$ であり、IUPACが13-[ (2-O- -D-グルコピラノシル-3-O- -D-グルコピラノシル- -D-グルコピラノシル) オキシ ] エント-カウル-16-エン-19-オイック酸-[ (2-O- -D-グルコピラノシル-3-O- -D-グルコピラノシル- -D-グルコピラノシル) エステル] である。

【0099】

ステビオール配糖体を合成する方法

レバウジオシドGからレバウジオシドVを生成させる方法。別の態様では、本開示は、レバウジオシドGからレバウジオシドVを合成するための方法に向けられる。該方法は、レバウジオシドGと；スクロース、ウリジンニリン酸(UDP)およびウリジンニリン酸-グルコース(UDP-グルコース)からなる群より選択される基質と；HV1 UDP-グリコシルトランスフェラーゼとを含み；スクロースシンターゼ(SUS)を含むまたは含まない反応混合物を調製すること、ならびに反応混合物を、レバウジオシドVを生成させるのに十分な時間の間インキュベートすることを含み、グルコースが共有結合によりレバウジオシドGにカップリングされ、レバウジオシドVが生成される。

20

【0100】

レバウジオシドGからレバウジオシドVを生成させる方法。別の態様では、本開示は、レバウジオシドGからレバウジオシドVを合成するための方法に向けられる。該方法は、レバウジオシドGと；スクロース、ウリジンニリン酸(UDP)およびウリジンニリン酸-グルコース(UDP-グルコース)からなる群より選択される基質と；EUGT11、UDP-グリコシルトランスフェラーゼ-スクロースシンターゼ(SUS)融合酵素からなる群より選択されるウリジンジホスホ(diphospho)グリコシルトランスフェラーゼ(UDP-グリコシルトランスフェラーゼ)とを含み；スクロースシンターゼ(SUS)を含むまたは含まない反応混合物を調製すること、ならびに反応混合物を、レバウジオシドVを生成させるのに十分な時間の間インキュベートすることを含み、グルコースが共有結合によりレバウジオシドGにカップリングされ、レバウジオシドVが生成される。

30

【0101】

レバウジオシドKAからレバウジオシドVを生成させる方法。別の態様では、本開示は、レバウジオシドKAからレバウジオシドVを合成するための方法に向けられる。該方法は、レバウジオシドKAと；スクロース、ウリジンニリン酸(UDP)およびウリジンニリン酸-グルコース(UDP-グルコース)からなる群より選択される基質と；UDP-グリコシルトランスフェラーゼ(UGT76G1)およびUDP-グリコシルトランスフェラーゼ-スクロースシンターゼ融合酵素からなる群より選択されるウリジンジホスホ(diphospho)グリコシルトランスフェラーゼ(UDP-グリコシルトランスフェラーゼ)とを含み；スクロースシンターゼ(SUS)を含むまたは含まない反応混合物を調製すること、ならびに反応混合物を、レバウジオシドVを生成させるのに十分な時間の間インキュベートすることを含み、グルコースが共有結合によりレバウジオシドKAにカップリングされ、レバウジオシドVが生成される。

40

50

## 【0102】

ルブソシドからレバウジオシドVを生成させる方法。別の態様では、本開示は、ルブソシドからレバウジオシドVを合成するための方法に向けられる。該方法は、ルブソシドと；スクロース、ウリジンニリン酸（UDP）およびウリジンニリン酸-グルコース（UDP-グルコース）からなる群より選択される基質と；UDP-グリコシルトランスフェラーゼ（UGT76G1）、HV1およびUDP-グリコシルトランスフェラーゼ-スクロースシターゼ融合酵素からなる群より選択されるウリジンジホスホ（diphospho）グリコシルトランスフェラーゼ（複数可）（UDP-グリコシルトランスフェラーゼ）とを含み；スクロースシターゼ（SS）を含むまたは含まない反応混合物を調製すること、ならびに反応混合物を、レバウジオシドVを生成させるのに十分な時間の間インキュベートすることを含み、グルコースが共有結合によりルブソシドにカップリングされ、レバウジオシドKAが生成される。連続して、グルコースが共有結合によりレバウジオシドKAにカップリングされ、レバウジオシドVが生成される。

10

## 【0103】

ルブソシドからレバウジオシドVを生成させる方法。別の態様では、本開示は、ルブソシドからレバウジオシドAおよびレバウジオシドVの混合物を合成するための方法に向けられる。該方法は、ルブソシドと；スクロース、ウリジンニリン酸（UDP）およびウリジンニリン酸-グルコース（UDP-グルコース）からなる群より選択される基質と；UDP-グリコシルトランスフェラーゼ（UGT76G1）、EUGT11およびUDP-グリコシルトランスフェラーゼ-スクロースシターゼ融合酵素からなる群より選択されるウリジンジホスホ（diphospho）グリコシルトランスフェラーゼ（複数可）（UDP-グリコシルトランスフェラーゼ）とを含み；スクロースシターゼを含むまたは含まない反応混合物を調製すること；ならびに、反応混合物を、レバウジオシドVを生成させるのに十分な時間の間インキュベートすることを含み、グルコースが共有結合によりルブソシドにカップリングされ、レバウジオシドKAが生成され、グルコースが共有結合によりレバウジオシドKAにカップリングされ、レバウジオシドVが生成される。グルコースが共有結合によりルブソシドにカップリングされ、レバウジオシドGが生成される。連続して、グルコースが共有結合によりレバウジオシドGにカップリングされ、レバウジオシドVが生成される。

20

## 【0104】

レバウジオシドVからレバウジオシドWを生成させる方法。別の態様では、本開示は、レバウジオシドVからレバウジオシドWを合成するための方法に向けられる。該方法は、レバウジオシドVと；スクロース、ウリジンニリン酸（UDP）およびウリジンニリン酸-グルコース（UDP-グルコース）からなる群より選択される基質と；UDP-グリコシルトランスフェラーゼ（UGT76G1）およびUDP-グリコシルトランスフェラーゼ-スクロースシターゼ融合酵素からなる群より選択されるウリジンジホスホ（diphospho）グリコシルトランスフェラーゼ（UDP-グリコシルトランスフェラーゼ）とを含み；スクロースシターゼを含むまたは含まない反応混合物を調製すること、ならびに反応混合物を、レバウジオシドWを生成させるのに十分な時間の間インキュベートすることを含み、グルコースが共有結合によりレバウジオシドVにカップリングされ、レバウジオシドWが生成される。

30

40

## 【0105】

レバウジオシドGからレバウジオシドWを生成させる方法。別の態様では、本開示は、レバウジオシドGからレバウジオシドWを合成するための方法に向けられる。該方法は、レバウジオシドGと；スクロース、ウリジンニリン酸（UDP）およびウリジンニリン酸-グルコース（UDP-グルコース）からなる群より選択される基質と；ウリジンジホスホグリコシルトランスフェラーゼ（UGT76G1）、UDP-グリコシルトランスフェラーゼ-スクロースシターゼ融合酵素およびHV1からなる群より選択されるウリジンジホスホ（diphospho）グリコシルトランスフェラーゼ（UDP-グリコシルトランスフェラーゼ）とを含み；スクロースシターゼを含むまたは含まない反応混合物を調

50

製すること；ならびに反応混合物を、レバウジオシドWを生成させるのに十分な時間の間インキュベートすることを含み、HV1により、グルコースが共有結合によりレバウジオシドGにカップリングされ、レバウジオシドVが生成される。連続して、UGT76G1により、グルコースが共有結合によりレバウジオシドVにカップリングされ、レバウジオシドWが生成される。

**【0106】**

レバウジオシドGからレバウジオシドWを生成させる方法。別の態様では、本開示は、レバウジオシドGからレバウジオシドWを合成するための方法に向けられる。該方法は、レバウジオシドGと；スクロース、ウリジンニリン酸(UDP)およびウリジンニリン酸-グルコース(UDP-グルコース)からなる群より選択される基質と；UGT76G1、EUGT11、およびUDP-グリコシルトランスフェラーゼ-スクロースシンターゼ融合酵素からなる群より選択されるウリジンジホスホグリコシルトランスフェラーゼ(UDP-グリコシルトランスフェラーゼ)とを含む反応混合物を調製すること；ならびに反応混合物を、レバウジオシドWを生成させるのに十分な時間の間インキュベートすることを含み、EUGT11により、グルコースが共有結合によりレバウジオシドGにカップリングされ、レバウジオシドVが生成される。連続して、UGT76G1により、グルコースが共有結合によりレバウジオシドVにカップリングされ、レバウジオシドWが生成される。

10

**【0107】**

レバウジオシドKAからレバウジオシドWを生成させる方法。別の態様では、本開示は、レバウジオシドKAからレバウジオシドWを合成するための方法に向けられる。該方法は、レバウジオシドKAと；スクロース、ウリジンニリン酸(UDP)およびウリジンニリン酸-グルコース(UDP-グルコース)からなる群より選択される基質と；ウリジンジホスホグリコシルトランスフェラーゼ(UGT76G1)、およびUDP-グリコシルトランスフェラーゼ-スクロースシンターゼ融合酵素からなる群より選択されるウリジンジホスホ(diphospho)グリコシルトランスフェラーゼ(UDP-グリコシルトランスフェラーゼ)とを含み；スクロースシンターゼを含むまたは含まない反応混合物を調製すること；ならびに反応混合物を、レバウジオシドWを生成させるのに十分な時間の間インキュベートすることを含み、グルコースが共有結合によりレバウジオシドKAにカップリングされ、レバウジオシドVが生成される。連続して、グルコースが共有結合によりレバウジオシドVにカップリングされ、レバウジオシドWが生成される。

20

30

**【0108】**

ルブソシドからレバウジオシドWを生成させる方法。別の態様では、本開示は、ルブソシドからレバウジオシドWを合成するための方法に向けられる。該方法は、ルブソシドと；スクロース、ウリジンニリン酸(UDP)およびウリジンニリン酸-グルコース(UDP-グルコース)からなる群より選択される基質と；UGT76G1、HV1、およびUDP-グリコシルトランスフェラーゼ-スクロースシンターゼ融合酵素からなる群より選択されるウリジンジホスホグリコシルトランスフェラーゼとを含み；スクロースシンターゼを含むまたは含まない反応混合物を調製すること、ならびに反応混合物を、レバウジオシドWの混合物を生成させるのに十分な時間の間インキュベートすることを含む。

40

**【0109】**

ルブソシドからレバウジオシドWを生成させる方法。別の態様では、本開示は、ルブソシドからレバウジオシドを合成するための方法に向けられる。該方法は、ルブソシドと；スクロース、ウリジンニリン酸(UDP)およびウリジンニリン酸-グルコース(UDP-グルコース)からなる群より選択される基質と；UGT76G1、EUGT11、およびUDP-グリコシルトランスフェラーゼ-スクロースシンターゼ融合酵素からなる群より選択されるウリジンジホスホグリコシルトランスフェラーゼとを含み；スクロースシンターゼを含むまたは含まない反応混合物を調製すること、ならびに反応混合物を、レバウジオシドWを生成させるのに十分な時間の間インキュベートすることを含む。

**【0110】**

50

ルブソシドからステビオシドおよびレバウジオシド K A の混合物を生成させる方法。別の態様では、本開示は、ルブソシドからステビオシドおよびレバウジオシド K A の混合物を合成するための方法に向けられる。該方法は、ルブソシドと；スクロース、ウリジンニリン酸 (UDP) およびウリジンニリン酸 - グルコース (UDP - グルコース) からなる群より選択される基質と；EUGT 11 および UDP - グリコシルトランスフェラーゼ - スクロースシターゼ融合酵素からなる群より選択される UDP - グリコシルトランスフェラーゼとを含み；スクロースシターゼを含むまたは含まない反応混合物を調製すること；ならびに反応混合物を、ステビオシドおよびレバウジオシド K A の混合物を生成させるのに十分な時間の間インキュベートすることを含み、グルコースが共有結合によりルブソシドの C 2' - 19 - O - グルコースにカップリングされレバウジオシド K A が生成され；グルコースが共有結合により、ルブソシドの C 2' - 13 - O - グルコースにカップリングされ、ステビオシドが生成される。

10

## 【0111】

ルブソシドからレバウジオシド K A を生成させる方法。別の態様では、本開示は、ルブソシドからレバウジオシド K A を合成するための方法に向けられる。該方法は、ルブソシドと；スクロース、ウリジンニリン酸 (UDP) およびウリジンニリン酸 - グルコース (UDP - グルコース) からなる群より選択される基質と；HV1 UDP - グリコシルトランスフェラーゼとを含み；スクロースシターゼを含むまたは含まない反応混合物を調製すること；ならびに反応混合物を、レバウジオシド K A を生成させるのに十分な時間の間インキュベートすることを含み、グルコースが共有結合によりルブソシドの C 2' - 19 - O - グルコースにカップリングされレバウジオシド K A が生成される。

20

## 【0112】

ルブソシドからレバウジオシド G を生成させる方法。別の態様では、本開示は、ルブソシドからレバウジオシド G を合成するための方法に向けられる。該方法は、ルブソシドと；スクロース、ウリジンニリン酸 (UDP) およびウリジンニリン酸 - グルコース (UDP - グルコース) からなる群より選択される基質と；UGT 76G1 および UDP - グリコシルトランスフェラーゼ - スクロースシターゼ融合酵素からなる群より選択される UDP - グリコシルトランスフェラーゼとを含み；スクロースシターゼを含むまたは含まない反応混合物を調製すること；ならびに反応混合物を、レバウジオシド G を生成させるのに十分な時間の間インキュベートすることを含み、グルコースが共有結合によりルブソシドの C 3' - 13 - O - グルコースにカップリングされ、レバウジオシド G が生成される。

30

## 【0113】

レバウジオシド K A からレバウジオシド E を生成させる方法。別の態様では、本開示は、レバウジオシド K A からレバウジオシド E を合成するための方法に向けられる。該方法は、レバウジオシド K A と；スクロース、ウリジンニリン酸 (UDP) およびウリジンニリン酸 - グルコース (UDP - グルコース) からなる群より選択される基質と；HV1 UDP - グリコシルトランスフェラーゼとを含み；スクロースシターゼを含むまたは含まない反応混合物を調製すること；ならびに反応混合物を、レバウジオシド E を生成させるのに十分な時間の間インキュベートすることを含み、グルコースが共有結合によりレバウジオシド K A の C 2' - 13 - O - グルコースにカップリングされ、レバウジオシド E が生成される。

40

## 【0114】

レバウジオシド K A からレバウジオシド E を生成させる方法。別の態様では、本開示は、レバウジオシド K A からレバウジオシド E を合成するための方法に向けられる。該方法は、レバウジオシド K A と；スクロース、ウリジンニリン酸 (UDP) およびウリジンニリン酸 - グルコース (UDP - グルコース) からなる群より選択される基質と；EUGT 11 および UDP - グリコシルトランスフェラーゼ - スクロースシターゼ融合酵素の群からの UDP - グリコシルトランスフェラーゼとを含み；スクロースシターゼを含むまたは含まない反応混合物を調製すること；ならびに反応混合物を、レバウジオシド E を生

50

成させるのに十分な時間の間インキュベートすることを含み、グルコースが共有結合によりレバウジオシド K A の C 2 ' 1 3 - O - グルコースにカップリングされ、レバウジオシド E が生成される。

【 0 1 1 5 】

ルブソシドからレバウジオシド E を生成させる方法。別の態様では、本開示は、ルブソシドからレバウジオシド E を合成するための方法に向けられる。該方法は、ルブソシドと；スクロース、ウリジンニリン酸 ( U D P ) およびウリジンニリン酸 - グルコース ( U D P - グルコース ) からなる群より選択される基質と； E U G T 1 1 および U D P - グリコシルトランスフェラーゼ - スクロース合成融合酵素の群からの U D P - グリコシルトランスフェラーゼとを含み；スクロースシンターゼを含むまたは含まない反応混合物を調製すること；反応混合物を、レバウジオシド E を生成させるのに十分な時間の間インキュベートすることを含み、グルコースが共有結合によりルブソシドにカップリングされ、レバウジオシド K A およびステビオシドの混合物が生成される。連続して、グルコースが共有結合によりレバウジオシド K A およびステビオシドにカップリングされ、レバウジオシド E が生成される。

10

【 0 1 1 6 】

ルブソシドからレバウジオシド E を生成させる方法。別の態様では、本開示は、ルブソシドからレバウジオシド E を合成するための方法に向けられる。該方法は、ルブソシドと；スクロース、ウリジンニリン酸 ( U D P ) およびウリジンニリン酸 - グルコース ( U D P - グルコース ) からなる群より選択される基質と； H V 1 U D P - グリコシルトランスフェラーゼとを含み；スクロースシンターゼを含むまたは含まない反応混合物を調製すること；反応混合物を、レバウジオシド E を生成させるのに十分な時間の間インキュベートすることであって、グルコースが共有結合によりルブソシドにカップリングされ、レバウジオシド K A が生成されること；ならびに、さらに、レバウジオシド K A を H V 1 と共にインキュベートし、レバウジオシド E を生成させることを含む。

20

【 0 1 1 7 】

ルブソシドからレバウジオシド D 2 を生成させる方法。別の態様では、本開示は、ルブソシドからレバウジオシド D 2 を合成するための方法に向けられる。該方法は、ルブソシドと；スクロース、ウリジンニリン酸 ( U D P ) およびウリジンニリン酸 - グルコース ( U D P - グルコース ) からなる群より選択される基質と； E U G T 1 1 および U D P - グリコシルトランスフェラーゼ - スクロース合成融合酵素の群からの U D P - グリコシルトランスフェラーゼとを含み；スクロースシンターゼを含むまたは含まない反応混合物を調製すること；反応混合物を、レバウジオシド D 2 を生成させるのに十分な時間の間インキュベートすることであって、グルコースが共有結合によりルブソシドにカップリングされ、ステビオシドおよびレバウジオシド K A の混合物が生成されること；さらにステビオシドおよびレバウジオシド K A の混合物を E U G T 1 1 と共にインキュベートし、レバウジオシド E を生成させることであって、グルコースが共有結合によりステビオシドおよびレバウジオシド K A にカップリングされ、レバウジオシド E が生成されること；ならびにさらに、レバウジオシド E を E U G T 1 1 と共にインキュベートし、レバウジオシド D 2 を生成させることであって、グルコースが共有結合によりレバウジオシド E にカップリングされレバウジオシド D 2 が生成されることを含む。

30

40

【 0 1 1 8 】

レバウジオシド K A からレバウジオシド D 2 を生成させる方法。別の態様では、本開示は、レバウジオシド K A からレバウジオシド D 2 を合成するための方法に向けられる。該方法は、レバウジオシド K A と、スクロース、ウリジンニリン酸 ( U D P ) およびウリジンニリン酸 - グルコース ( U D P - グルコース ) からなる群より選択される基質と、 E U G T 1 1 および U D P - グリコシルトランスフェラーゼ - スクロースシンターゼ融合酵素からなる群より選択される U D P - グリコシルトランスフェラーゼとを含み、スクロースシンターゼを含むまたは含まない反応混合物を調製すること；反応混合物を、レバウジオシド D 2 を生成させるのに十分な時間の間インキュベートすることであって、グルコース

50

が共有結合によりレバウジオシド K A にカップリングされ、レバウジオシド E が生成されること；さらに、レバウジオシド E の混合物を E U G T 1 1 と共にインキュベートし、レバウジオシド D 2 を生成させることであって、グルコースが共有結合によりレバウジオシド E にカップリングされレバウジオシド D 2 が生成されることを含む。

【 0 1 1 9 】

レバウジオシド E からレバウジオシド Z を生成させる方法。別の態様では、本開示は、レバウジオシド E からレバウジオシド Z を合成するための方法に向けられる。該方法は、レバウジオシド E ；スクロース、ウリジンニリン酸 ( U D P ) およびウリジンニリン酸 - グルコース ( U D P - グルコース ) からなる群より選択される基質；ならびに H V 1 U D P - グリコシルトランスフェラーゼ；ならびにスクロースシンターゼを含む反応混合物を調製すること、反応混合物を、レバウジオシド Z を生成させるのに十分な時間の間インキュベートすることを含み、グルコースが共有結合によりレバウジオシド E にカップリングされ、レバウジオシド Z が生成され、グルコースが共有結合によりレバウジオシド E の C 2 ' - 1 3 - O - グルコースにカップリングされ、レバウジオシド Z 1 が生成される。グルコースが共有結合により、レバウジオシド E の C 2 ' - 1 9 - O - グルコースにカップリングされ、レバウジオシド Z 2 が生成される。

10

【 0 1 2 0 】

レバウジオシド D からレバウジオシド M を生成させる方法。別の態様では、本開示は、レバウジオシド D からレバウジオシド M を合成するための方法に向けられる。該方法は、レバウジオシド D と、スクロース、ウリジンニリン酸 ( U D P ) 、ウリジンニリン酸 - グルコース ( U D P - グルコース ) 、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される基質と、 U G T 7 6 G 1 、 U D P - グリコシルトランスフェラーゼ - スクロースシンターゼ融合酵素、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される U D P - グリコシルトランスフェラーゼとを含み、スクロースシンターゼを含むまたは含まない反応混合物を調製すること；ならびに反応混合物を、レバウジオシド M を生成させるのに十分な時間の間インキュベートすることを含み、グルコースが共有結合によりレバウジオシド D にカップリングされ、レバウジオシド M が生成される。

20

【 0 1 2 1 】

ステビオシドからレバウジオシド D およびレバウジオシド M を生成させる方法。別の態様では、本開示は、ステビオシドからレバウジオシド D およびレバウジオシド M を合成するための方法に向けられる。該方法は、ステビオシドと、スクロース、ウリジンニリン酸 ( U D P ) 、ウリジンニリン酸 - グルコース ( U D P - グルコース ) 、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される基質と、 H V 1 、 U G T 7 6 G 1 、 U D P - グリコシルトランスフェラーゼ - スクロースシンターゼ融合酵素、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される U D P - グリコシルトランスフェラーゼとを含み、スクロースシンターゼを含むまたは含まない反応混合物を調製すること；ならびに反応混合物を、レバウジオシド D および / またはレバウジオシド M を生成させるのに十分な時間の間インキュベートすることを含む。例えば、実施形態では、反応混合物はレバウジオシド D を生成させるのに十分な時間の間インキュベートされ得、レバウジオシド D を含む反応混合物がさらにインキュベートされ ( 例えば、 U G T 7 6 G 1 および / または融合酵素と共に ) 、レバウジオシド M が生成される。ある一定の実施形態では、反応混合物は H V 1 および U G T 7 6 G 1 を含む。他の実施形態では、反応混合物は H V 1 および融合酵素を含む。

30

40

【 0 1 2 2 】

ある一定の実施形態では、グルコースが共有結合によりステビオシドにカップリングされ、レバウジオシド A および / またはレバウジオシド E が生成される。例えば、 U G T 7 6 G 1 または融合酵素により、グルコースは、共有結合でステビオシドにカップリングされ得、レバウジオシド A が生成され、かつ / または H V 1 により、グルコースは、共有結合でステビオシドにカップリングされ得、レバウジオシド E が生成される。連続して、 H V 1 により、グルコースは、共有結合でレバウジオシド A にカップリングされ得、レバウジオシド D が生成され、かつ / または U G T 7 6 G 1 または融合酵素により、グルコース

50

は、共有結合でレバウジオシド E にカップリングされ得、レバウジオシド D が生成される。U G T 7 6 G 1 または融合酵素により、グルコースはさらに、共有結合によりレバウジオシド D にカップリングされ得、レバウジオシド M が生成される。

【 0 1 2 3 】

レバウジオシド A からレバウジオシド D およびレバウジオシド M を生成させる方法。別の態様では、本開示は、レバウジオシド A からレバウジオシド D およびレバウジオシド M を合成するための方法に向けられる。該方法は、レバウジオシド A、スクロース、ウリジンニリン酸 (UDP)、ウリジンニリン酸 - グルコース (UDP - グルコース)、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される基質、ならびに H V 1、U G T 7 6 G 1、UDP - グリコシルトランスフェラーゼ - スクロースシンターゼ融合酵素、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される UDP - グリコシルトランスフェラーゼを、スクロースシンターゼありまたはなしで含む反応混合物を調製すること；ならびに反応混合物を、レバウジオシド D および / またはレバウジオシド M を生成させるのに十分な時間の間インキュベートすることを含む。例えば、実施形態では、反応混合物 (例えば、H V 1 を含む) は、レバウジオシド D を生成させるのに十分な時間の間インキュベートされ得、レバウジオシド D を含む反応混合物はさらにインキュベートされ (例えば、U G T 7 6 G 1 および / または融合酵素と共に)、レバウジオシド M が生成される。ある一定の実施形態では、反応混合物は、H V 1 および U G T 7 6 G 1 を含む。他の実施形態では、反応混合物は H V 1 および融合酵素を含む。

10

【 0 1 2 4 】

グルコースが共有結合によりレバウジオシド A にカップリングされ、レバウジオシド D が生成される。例えば、H V 1 により、グルコースは、共有結合でレバウジオシド A にカップリングされ得、レバウジオシド D が生成される。連続して、U G T 7 6 G 1 または融合酵素により、グルコースは、共有結合でレバウジオシド D にカップリングされ得、レバウジオシド M が生成される。

20

【 0 1 2 5 】

レバウジオシド E からレバウジオシド D およびレバウジオシド M を生成させる方法。別の態様では、本開示は、レバウジオシド E からレバウジオシド D およびレバウジオシド M を合成するための方法に向けられる。方法は、レバウジオシド E、スクロース、ウリジンニリン酸 (UDP)、ウリジンニリン酸 - グルコース (UDP - グルコース)、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される基質、ならびに U G T 7 6 G 1、UDP - グリコシルトランスフェラーゼ - スクロースシンターゼ融合酵素、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される UDP - グリコシルトランスフェラーゼを、スクロースシンターゼありまたはなしで含む反応混合物を調製すること；ならびに反応混合物を、レバウジオシド D および / またはレバウジオシド M を生成させるのに十分な時間の間インキュベートすることを含む。例えば、実施形態では、反応混合物 (例えば、U G T 7 6 G 1 および / または融合酵素を含む) は、レバウジオシド D を生成させるのに十分な時間の間インキュベートされ得、レバウジオシド D を含む反応混合物はさらにインキュベートされ得、レバウジオシド M が生成される。

30

【 0 1 2 6 】

グルコースが共有結合によりレバウジオシド E にカップリングされ、レバウジオシド D が生成される。例えば、U G T 7 6 G 1 または融合酵素により、グルコースは、共有結合でレバウジオシド E にカップリングされ得、レバウジオシド D が生成される。連続して、U G T 7 6 G 1 または融合酵素により、グルコースは、共有結合でレバウジオシド D にカップリングされ得、レバウジオシド M が生成される。

40

【 0 1 2 7 】

ステビオール配糖体の大半はステビオールのいくつかのグリコシル化反応により形成され、これらの反応は典型的には、UDP - グリコシルトランスフェラーゼ (UGT) により、ウリジン 5' - ジホスホグルコース (UDP - グルコース) を糖部分の供与体として使用して触媒される。植物中、UGT はグルコース残基を UDP - グルコースからステビ

50

オールに転移させる酵素の非常に多様な群である。

【0128】

ウリジンジホスホグリコシルトランスフェラーゼ (UGT76G1) は、1,3-13-O-グルコースグリコシル化活性を有するUGTであり、関連する配糖体 (レバウジオシドAおよびD) を生成させる。驚いたことに、かつ予想外に、UGT76G1はまた1,3-19-O-グルコースグリコシル化活性を有し、ルブソシドからレバウジオシドGを生成させ、レバウジオシドDからレバウジオシドMを生成させることが発見された。UGT76G1は、レバウジオシドKAをReb Vに変換させることができ、続けて、Reb Wを形成させることができる。特に好適なUGT76G1はSEQ ID NO: 1のアミノ酸配列を有する。

10

【0129】

EUGT11 (WO2013022989号において記載) は、1,2-19-O-グルコースおよび1,2-13-O-グルコースグリコシル化活性を有するUGTである。EUGT11は、ステビオシドからレバウジオシドEおよびレバウジオシドAからレバウジオシドDの生成を触媒することが知られている。驚いたことに、かつ予想外に、EUGT11をインビトロで使用して、新しい酵素活性 (1,6-13-O-グルコースグリコシル化活性) により、レバウジオシドEからレバウジオシドD2を合成することができることが発見された (米国特許出願番号第14/269,435号、Conagen, Inc. に譲渡)。EUGT11は1,2-19-O-グルコースグリコシル化活性を有し、ルブソシドからレバウジオシドKAを生成させる。特に好適なEUGT11はSEQ ID NO: 3のアミノ酸配列を有する。

20

【0130】

HV1は、1,2-19-O-グルコースグリコシル化活性を有するUGTであり、関連するステビオール配糖体 (レバウジオシドE、DおよびZ) を生成させる。驚いたことに、かつ予想外に、HV1はまた、1,2-19-O-グルコースグリコシル化活性を有し、ルブソシドからレバウジオシドKAを生成させることが発見された。HV1はまた、Reb GからReb VおよびReb KAからReb Eに変換させることができる。特に好適なHV1はSEQ ID NO: 5のアミノ酸配列を有する。

【0131】

前記方法はさらに、スクロースシンターゼをウリジンジホスホ (UDP) グリコシルトランスフェラーゼを含む反応混合物に添加することを含むことができる。スクロースシンターゼは、NDP-グルコースとD-フルクトースの間の化学反応を触媒し、NDPおよびスクロースを生成させる。スクロースシンターゼはグリコシルトランスフェラーゼである。この酵素クラスの系統名はNDP-グルコース: D-フルクトース2-D-グルコシルトランスフェラーゼである。普通に使用される他の名称としては、UDPグルコース-フルクトースグリコシルトランスフェラーゼ、スクロースシンターゼ、スクロース-UDPグリコシルトランスフェラーゼ、スクロース-ウリジンニリン酸グリコシルトランスフェラーゼ、およびウリジンジホスホグルコース-フルクトースグリコシルトランスフェラーゼが挙げられる。スクロースシンターゼのウリジンジホスホグリコシルトランスフェラーゼを含む反応混合物への添加により「UGT-SUSカップリング系」が生成される。UGT-SUSカップリング系では、UDP-グルコースはUDPおよびスクロースから再生させることができ、これにより余分のUDP-グルコースの反応混合物への添加を省く、または反応混合物中のUDPを使用することが可能になる。好適なスクロースシンターゼは、例えば、シロイヌナズナ属スクロースシンターゼ1; シロイヌナズナ属スクロースシンターゼ3; ならびにリョクトウスクロースシンターゼとすることができる。特に好適なスクロースシンターゼは、例えば、シロイヌナズナ属スクロースシンターゼ1とすることができる。特に好適なシロイヌナズナ属スクロースシンターゼ1は、シロイヌナズナスクロースシンターゼ1 (AtSUS1) であり、SEQ ID NO: 7のアミノ酸配列を有する。

30

40

【0132】

50



別の態様では、ウリジンジホスホ ( d i p o s p h o ) グリコシルトランスフェラーゼ融合酵素は前記方法において使用され得る。特に好適なウリジンジホスホ ( d i p o s p h o ) グリコシルトランスフェラーゼ融合酵素は U G T - S U S 1 融合酵素とすることができる。UDP - グリコシルトランスフェラーゼは、スクロースシンターゼドメインに結合されたウリジンジホスホグリコシルトランスフェラーゼドメインを含むUDP - グリコシルトランスフェラーゼ融合酵素とすることができる。特に、UDP - グリコシルトランスフェラーゼ融合酵素はスクロースシンターゼドメインに結合されたウリジンジホスホグリコシルトランスフェラーゼドメインを含む。加えて、U G T - S U S 1 融合酵素はスクロースシンターゼ活性を有し、よって、UDP およびスクロースからUDP - グルコースを再生させることができる。特に好適な U G T - S U S 1 融合酵素は、例えば、SEQ ID NO : 9 のアミノ酸配列を有する U G T 7 6 G 1 - A t S U S 1 融合酵素 ( 「 G S 」 と命名 ) とすることができる。別の特に好適な U G T - S U S 1 融合酵素は、例えば、SEQ ID NO : 1 1 のアミノ酸配列を有する E U G T 1 1 - S U S 1 ( 「 E U S 」 と命名 ) とすることができる。

#### 【 0 1 3 3 】

好適なスクロースシンターゼドメインは、例えば、シロイヌナズナ属スクロースシンターゼ 1 ; シロイヌナズナ属スクロースシンターゼ 3 ; ならびにリョクトウスクロースシンターゼとすることができる。特に好適なスクロースシンターゼドメインは、例えば、シロイヌナズナ属スクロースシンターゼ 1 とすることができる。特に好適なシロイヌナズナ属スクロースシンターゼ 1 は、SEQ ID NO : 7 のアミノ酸配列を有する、シロイヌナズナスクロースシンターゼ 1 ( A t S U S 1 ) である。

#### 【 0 1 3 4 】

U G T 7 6 G 1 - A t S U S 1 ( 「 G S 」 ) 融合酵素は、SEQ ID NO : 9 で明記されるアミノ酸配列に対して少なくとも 7 0 % 、少なくとも 8 0 % 、少なくとも 8 5 % 、少なくとも 9 0 % 、少なくとも 9 1 % 、少なくとも 9 2 % 、少なくとも 9 3 % 、少なくとも 9 4 % 、少なくとも 9 5 % 、少なくとも 9 6 % 、少なくとも 9 7 % 、少なくとも 9 8 % 、少なくとも 9 9 % およびさらに 1 0 0 % 同一なポリペプチド配列を有することができる。好適なことに、U G T - A t S U S 1 融合酵素のアミノ酸配列はSEQ ID NO : 9 に対して少なくとも 8 0 % の同一性を有する。より好適なことに、U G T - A t S U S 1 融合酵素のアミノ酸配列はSEQ ID NO : 9 で明記されるアミノ酸配列に対して少なくとも 8 5 % 、少なくとも 9 0 % 、少なくとも 9 1 % 、少なくとも 9 2 % 、少なくとも 9 3 % 、少なくとも 9 4 % 、少なくとも 9 5 % 、少なくとも 9 6 % 、少なくとも 9 7 % 、少なくとも 9 8 % 、少なくとも 9 9 % 、およびさらに 1 0 0 % のアミノ酸配列同一性を有する。

#### 【 0 1 3 5 】

単離された核酸は、SEQ ID NO : 1 0 で明記される核酸配列に対して少なくとも 7 0 % 、少なくとも 7 5 % 、少なくとも 8 0 % 、少なくとも 8 5 % 、少なくとも 9 0 % 、少なくとも 9 1 % 、少なくとも 9 2 % 、少なくとも 9 3 % 、少なくとも 9 4 % 、少なくとも 9 5 % 、少なくとも 9 6 % 、少なくとも 9 7 % 、少なくとも 9 8 % 、少なくとも 9 9 % 、およびさらに 1 0 0 % の配列同一性を有する核酸配列を有する、U G T - A t S U S 1 融合酵素のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むことができる。好適なことに、単離された核酸は、SEQ ID NO : 9 で明記されるアミノ酸配列に対して少なくとも 8 0 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する、UDP - グリコシルトランスフェラーゼ融合酵素のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む。より好適なことに、単離された核酸は、SEQ ID NO : 9 で明記されるアミノ酸配列に対して、少なくとも 8 5 % 、少なくとも 9 0 % 、少なくとも 9 1 % 、少なくとも 9 2 % 、少なくとも 9 3 % 、少なくとも 9 4 % 、少なくとも 9 5 % 、少なくとも 9 6 % 、少なくとも 9 7 % 、少なくとも 9 8 % 、少なくとも 9 9 % 、およびさらに 1 0 0 % の配列同一性を有する、アミノ酸配列を有するUDP - グリコシルトランスフェラーゼ融合酵素のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む。よって、単離された核酸は、SEQ ID NO

：10の機能的断片、SEQ ID NO：9の機能的バリエーション、またはSEQ ID NO：9に対して、例えば、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、およびさらに100%の配列同一性を有する他の相同ポリペプチドをコードするそれらのヌクレオチド配列を含む。当業者により知られているように、UDP-グリコシルトランスフェラーゼをコードする核酸配列は、例えば、細菌および酵母などの好適な宿主生物における発現のためにコドン最適化され得る。

【0136】

EUGT11-SUS1(「EUS」)融合酵素は、SEQ ID NO：11で明記されたアミノ酸配列に対して少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%およびさらに100%同一なポリペプチド配列を有することができる。好適なことに、EUGT11-SUS1融合酵素のアミノ酸配列は、SEQ ID NO：11に対して少なくとも80%の同一性を有する。より好適なことに、EUGT11-SUS1融合酵素のアミノ酸配列は、SEQ ID NO：11で明記されたアミノ酸配列に対して、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、およびさらに100%のアミノ酸配列同一性を有する。

10

20

【0137】

単離された核酸は、SEQ ID NO：12で明記された核酸配列に対して、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、およびさらに100%の配列同一性を有する核酸配列を有する、EUGT11-SUS1融合酵素のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むことができる。好適なことに、単離された核酸は、SEQ ID NO：11で明記されたアミノ酸配列に対して、少なくとも80%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有するEUGT11-SUS1融合酵素のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む。より好適なことに、単離された核酸は、SEQ ID NO：11で明記されたアミノ酸配列に対して、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、およびさらに100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有するEUGT11-SUS1融合酵素のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む。よって、単離された核酸は、SEQ ID NO：11の機能的断片、SEQ ID NO：11の機能的バリエーション、または、例えば、SEQ ID NO：11に対して、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、およびさらに100%の配列同一性を有する他の相同ポリペプチドをコードするそれらのヌクレオチド配列を含む。当業者により知られているように、EUGT11-SUS1をコードする核酸配列は、例えば、細菌および酵母などの好適な宿主生物における発現のためにコドン最適化され得る。

30

40

【0138】

経口摂取可能製品

別の態様では、本開示は、飲料製品および摂取可能製品からなる群より選択される、甘味量のレバウジオシドVを有する経口摂取可能製品に向けられる。別の態様では、本開示は、飲料製品および摂取可能製品からなる群より選択される、甘味量のレバウジオシドW

50

を有する経口摂取可能製品に向けられる。別の態様では、本開示は、飲料製品および摂取可能製品からなる群より選択される、甘味量のレバウジオシドK Aを有する経口摂取可能製品に向けられる。別の態様では、本開示は、飲料製品および摂取可能製品からなる群より選択される、甘味量のレバウジオシドGを有する経口摂取可能製品に向けられる。別の態様では、本開示は、飲料製品および摂取可能製品からなる群より選択される、甘味量のレバウジオシドMを有する経口摂取可能製品に向けられる。

【0139】

経口摂取可能製品は約1% (w/v-%) ~ 約4% (w/v-%) スクロース溶液に等しい甘味度を有することができる。

【0140】

経口摂取可能製品は約5 ppm ~ 約100 ppmのレバウジオシドVを有することができる。経口摂取可能製品は約5 ppm ~ 約100 ppmのレバウジオシドWを有することができる。経口摂取可能製品は約5 ppm ~ 約100 ppmのレバウジオシドK Aを有することができる。経口摂取可能製品は約5 ppm ~ 約100 ppmのレバウジオシドGを有することができる。経口摂取可能製品は約5 ppm ~ 約100 ppmのレバウジオシドMを有することができる。

【0141】

レバウジオシドVは経口摂取可能製品中の唯一の甘味料とすることができる。レバウジオシドWは経口摂取可能製品中の唯一の甘味料とすることができる。レバウジオシドK Aは経口摂取可能製品中の唯一の甘味料とすることができる。レバウジオシドGは経口摂取可能製品中の唯一の甘味料とすることができる。レバウジオシドMは経口摂取可能製品中の唯一の甘味料とすることができる。

【0142】

経口摂取可能製品はまた、少なくとも1つの追加の甘味料を有することができる。少なくとも1つの追加の甘味料は、例えば、天然高甘味度甘味料とすることができる。追加の甘味料は下記から選択することができる：ステビア抽出物、ステビオール配糖体、ステビオシド、レバウジオシドA、レバウジオシドB、レバウジオシドC、レバウジオシドD、レバウジオシドD2、レバウジオシドE、レバウジオシドF、ズルコシドA、ルブソシド、ステビオールピオシド、スクロース、高フルクトースコーンシロップ、フルクトース、グルコース、キシロース、アラビノース、ラムノース、エリスリトール、キシリトール、マンニトール、ソルビトール、イノシトール、Ace K、アスパルテム、ネオテム、スクラロース、サッカリン、ナリングジヒドロカルコン (NardHC)、ネオヘスペリジンジヒドロカルコン (NDHC)、ルブソシド、モグロシドIV、シアメノシドI、モグロシドV、モナチン、タウマチン、モネリン、ブラゼイン、L-アラニン、グリシン、羅漢果、ヘルナンズルチン、フィロズルチン、トリロブタイン、およびそれらの組み合わせ。

【0143】

経口摂取可能製品はまた、少なくとも1つの添加物を有することができる。添加物は、例えば、炭水化物、ポリオール、アミノ酸またはその塩、ポリアミノ酸またはその塩、糖酸またはその塩、ヌクレオチド、有機酸、無機酸、有機塩、有機酸塩、有機塩基塩、無機塩、苦味化合物、着香剤、香味成分、収斂化合物、タンパク質、タンパク質加水分解物、界面活性剤、乳化剤、フラボノイド、アルコール、ポリマー、およびそれらの組み合わせとすることができる。

【0144】

1つの態様では、本開示は、甘味量のレバウジオシドVを含む飲料製品に向けられる。1つの態様では、本開示は、甘味量のレバウジオシドWを含む飲料製品に向けられる。1つの態様では、本開示は、甘味量のレバウジオシドK Aを含む飲料製品に向けられる。1つの態様では、本開示は、甘味量のレバウジオシドGを含む飲料製品に向けられる。1つの態様では、本開示は、甘味量のレバウジオシドMを含む飲料製品に向けられる。

【0145】

10

20

30

40

50

飲料製品は、例えば、炭酸飲料製品および非炭酸飲料製品とすることができる。飲料製品はまた、例えば、ソフトドリンク、ファウンテン飲料、フロースン飲料；レディ・トゥ・ドリンク飲料；フロースンおよびレディ・トゥ・ドリンク飲料、コーヒー、紅茶、乳飲料、粉末ソフトドリンク、液体濃縮物、フレーバー・ウォーター、強化水、フルーツジュース、フルーツジュースフレーバードリンク、スポーツドリンク、およびエネルギードリンクとすることができる。

【0146】

いくつかの実施形態では、本開示の飲料製品は、例えば、酸味料、フルーツジュースおよび/または野菜ジュース、パルプ、など、香味料、着色剤、保存剤、ビタミン、ミネラル、電解質、エリスリトール、タガトース、グリセリン、および二酸化炭素などの1つ以上の飲料成分を含むことができる。そのような飲料製品は、任意の好適な形態、例えば飲料濃縮物および炭酸、レディ・トゥ・ドリンク飲料で提供され得る。

10

【0147】

ある一定の実施形態では、本開示の飲料製品は、多くの異なる特定の製剤または構成物のいずれかを有することができる。本開示の飲料製品の製剤は、製品の意図される市場区分、その所望の栄養特性、香味プロファイル、などの因子によって、ある程度まで変動し得る。例えば、ある一定の実施形態では、一般に、さらなる成分を特定の飲料製品の製剤に添加することが選択肢となり得る。例えば、追加の(すなわち、より多くのおよび/または他の)甘味料を添加することができ、香味料、電解質、ビタミン、フルーツジュースまたは他のフルーツ製品、味物質、マスキング剤など、うま味調味料、および/または炭酸化は、典型的には味覚、食感、栄養特性、などを変えるために、任意のそのような製剤に添加され得る。実施形態では、飲料製品は、水、約5ppm~約100ppmのレバウジオシドV、酸味料、および香味料を含むコーラ飲料とすることができる。実施形態では、飲料製品は、水、約5ppm~約100ppmのレバウジオシドW、酸味料、および香味料を含むコーラ飲料とすることができる。実施形態では、飲料製品は、水、約5ppm~約100ppmのレバウジオシドM、酸味料、および香味料を含むコーラ飲料とすることができる。例示的な香味料は、例えば、コーラ香味料、柑橘類香味料、およびスパイス香味料とすることができる。いくつかの実施形態では、二酸化炭素の形態での炭酸化が泡立ちのために添加され得る。他の実施形態では、保存剤は、他の成分、生成技術、所望の保存可能期間、などによって添加することができる。ある一定の実施形態では、カフェインは添加することができる。いくつかの実施形態では、飲料製品は特質上、炭酸水、甘味料、コーラ・ナッツ抽出物および/または他の香味料、カラメル着色剤、1つ以上の酸、および任意で他の成分を含む、コーラ風味の炭酸飲料とすることができる。

20

30

【0148】

飲料製品中に存在するレバウジオシドV、レバウジオシドW、レバウジオシドKA、レバウジオシドM、またはレバウジオシドGの好適な量は、例えば、約5ppm~約100ppmとすることができる。いくつかの実施形態では、低濃度、例えば、100ppm未満のレバウジオシドV、レバウジオシドW、レバウジオシドKA、レバウジオシドM、またはレバウジオシドGは10,000ppm~30,000ppmの濃度を有するスクロース溶液に等しい甘味を有する。最終濃度は、約5ppm~約100ppm、約5ppm~約95ppm、約5ppm~約90ppm、約5ppm~約85ppm、約5ppm~約80ppm、約5ppm~約75ppm、約5ppm~約70ppm、約5ppm~約65ppm、約5ppm~約60ppm、約5ppm~約55ppm、約5ppm~約50ppm、約5ppm~約45ppm、約5ppm~約40ppm、約5ppm~約35ppm、約5ppm~約30ppm、約5ppm~約25ppm、約5ppm~約20ppm、約5ppm~約15ppm、または約5ppm~約10ppmの範囲である。あるいは、レバウジオシドVまたはレバウジオシドWは、本開示の飲料製品中に約5ppm~約100ppm、約10ppm~約100ppm、約15ppm~約100ppm、約20ppm~約100ppm、約25ppm~約100ppm、約30ppm~約100ppm、約35ppm~約100ppm、約40ppm~約100ppm、約45ppm~

40

50

約100ppm、約50ppm～約100ppm、約55ppm～約100ppm、約60ppm～約100ppm、約65ppm～約100ppm、約70ppm～約100ppm、約75ppm～約100ppm、約80ppm～約100ppm、約85ppm～約100ppm、約90ppm～約100ppm、または約95ppm～約100ppmの範囲の最終濃度で存在することができる。

【0149】

別の態様では、本開示は、甘味量のレバウジオシドVを含む摂取可能品に向けられる。別の態様では、本開示は、甘味量のレバウジオシドWを含む摂取可能品に向けられる。別の態様では、本開示は、甘味量のレバウジオシドKAを含む摂取可能品に向けられる。別の態様では、本開示は、甘味量のレバウジオシドGを含む摂取可能品に向けられる。別の態様では、本開示は、甘味量のレバウジオシドMを含む摂取可能品に向けられる。摂取可能品は、例えば、食品、栄養補助食品、医薬品、健康補助食品、歯科用衛生学的組成物、可食ゲル組成物、化粧品および卓上用香料とすることができる。

10

【0150】

本明細書では、「健康補助食品（複数可）」は、食事を補充し、および、食事において欠如しているまたは十分な量で消費することができない栄養分、例えばビタミン、ミネラル、繊維、脂肪酸、アミノ酸、などを提供することが意図される化合物を示す。当技術分野で知られている任意の好適な健康補助食品が使用され得る。好適な健康補助食品の例は、例えば、栄養分、ビタミン、ミネラル、繊維、脂肪酸、ハーブ、植物、アミノ酸、および代謝産物とすることができる。

20

【0151】

本明細書では、「栄養補助食品（複数可）」は、薬用または健康効果を提供し得る任意の食品または食品の一部を含む化合物を示し、薬用または健康効果は疾患または障害（例えば、疲労、不眠、老化作用、記憶喪失、気分障害、心血管疾患および血液中の高レベルのコレステロール、糖尿病、骨粗鬆症、炎症、自己免疫障害、など）の防止および/または治療が挙げられる。当技術分野で知られている任意の好適な栄養補助食品が使用され得る。いくつかの実施形態では、栄養補助食品は食品および飲料に対するサプリメントとして、および、固体製剤、例えばカプセルまたは錠剤、液体製剤、例えば溶液または懸濁液であり得る、経腸または非経口用途のための医薬製剤として使用することができる。

30

【0152】

いくつかの実施形態では、健康補助食品および栄養補助食品は、保護親水コロイド（例えばガム、タンパク質、加工デンプン）、バインダ、膜形成剤、カプセル化剤/材料、壁/シェル材料、マトリクス化合物、コーティング、乳化剤、表面活性剤、可溶化剤（油、脂肪、ワックス、レシチン、など）、吸着剤、担体、フィラー、共化合物、分散剤、湿潤剤、加工助剤（溶媒）、流動化剤、味覚-マスキング剤、増量剤、ゼリー化剤、ゲル形成剤、抗酸化剤および抗菌薬をさらに含むことができる。

【0153】

本明細書では、「ゲル」は、粒子のネットワークが液体媒体の体積に及ぶコロイド系を示す。ゲルは主に液体から構成され、よって、液体と同様の密度を示すが、ゲルは液体媒体に及ぶ粒子のネットワークのために、固体の構造コヒーレンスを有する。この理由のために、ゲル一般に、固体、ゼリー様材料であるように見える。ゲルは、多くの用途で使用することができる。例えば、ゲルは食品、塗料、および接着剤中で使用することができる。食することができるゲルは「可食ゲル組成物」と呼ぶことができる。可食ゲル組成物は典型的には、軽食として、デザートとして、主食の一部として、または主食と共に食される。好適な可食ゲル組成物の例は、例えば、ゲルデザート、プディング、ジャム、ゼリー、ペースト、トライフル、アスピック、マシュマロ、グミ、などとすることができる。いくつかの実施形態では、可食ゲルミックスは一般に、粉末または顆粒状固体であり、これに流体が添加され、可食ゲル組成物が形成され得る。好適な流体の例は、例えば、水、乳製品流体、乳製品類似流体、ジュース、アルコール、アルコール飲料、およびそれらの組み合わせとすることができる。好適な乳製品流体の例は、例えば、乳、発酵乳、クリーム

40

50

、流体乳清、およびそれらの混合物とすることができる。好適な乳製品類似流体の例は、例えば、大豆乳および乳成分を含まないコーヒー用クリームとすることができる。

【0154】

本明細書では、「ゲル化成分」という用語は、液体媒体内でコロイド系を形成することができる任意の材料を示す。好適なゲル化成分の例は、例えば、ゼラチン、アルギン酸塩、カラゲナン (carageenan)、ガム、ペクチン、コンニャク、寒天、食品酢 (food acid)、レンネット、デンプン、デンプン誘導体、およびそれらの組み合わせとすることができる。可食ゲルミックスまたは可食ゲル組成物中で使用されるゲル化成分の量は、例えば、使用される特定のゲル化成分、使用される特定の流体塩基、およびゲルの所望の特性などの多くの因子によって、かなり変動し得ることは、当業者によく知られている。

10

【0155】

本開示のゲルミックスおよびゲル組成物は、当技術分野で知られている任意の好適な方法により調製することができる。いくつかの実施形態では、本開示の可食ゲルミックスおよび可食ゲル組成物は、ゲル化剤に加えて他の成分を使用して調製することができる。他の好適な成分の例は、例えば、食品酢、食品酢の塩、緩衝系、増量剤、捕捉剤、架橋剤、1つ以上の香味、1つ以上の色、およびそれらの組み合わせとすることができる。

【0156】

当技術分野で知られている任意の好適な医薬組成物が使用され得る。ある一定の実施形態では、本開示の医薬組成物は、約5 ppm ~ 約100 ppmのレバウジオシドV、および1つ以上の薬学的に許容される賦形剤を含むことができる。ある一定の実施形態では、本開示の医薬組成物は、約5 ppm ~ 約100 ppmのレバウジオシドW、および1つ以上の薬学的に許容される賦形剤を含むことができる。ある一定の実施形態では、本開示の医薬組成物は、約5 ppm ~ 約100 ppmのレバウジオシドKA、および1つ以上の薬学的に許容される賦形剤を含むことができる。ある一定の実施形態では、本開示の医薬組成物は、約5 ppm ~ 約100 ppmのレバウジオシドG、および1つ以上の薬学的に許容される賦形剤を含むことができる。ある一定の実施形態では、本開示の医薬組成物は、約5 ppm ~ 約100 ppmのレバウジオシドM、および1つ以上の薬学的に許容される賦形剤を含むことができる。いくつかの実施形態では、本開示の医薬組成物は、生物学的効果を発揮する1つ以上の活性剤を含む医薬品を製剤化するために使用することができる。したがって、いくつかの実施形態では、本開示の医薬組成物は、生物学的効果を発揮する1つ以上の活性剤を含むことができる。好適な活性剤は当技術分野でよく知られている (例えば、The Physician's Desk Reference)。そのような組成物は、例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa., USAに記載されるように、当技術分野でよく知られた手順に従い調製することができる。

20

30

【0157】

レバウジオシドV、レバウジオシドW、レバウジオシドKA、レバウジオシドM、またはレバウジオシドGは、当技術分野で知られている任意の好適な歯科用および経口衛生組成物と共に使用することができる。好適な歯科用および経口衛生組成物の例は、例えば、練り歯磨き、トゥースポリッシュ、デンタルフロス、口腔洗浄薬、マウスリンス、歯磨剤 (dentifrice)、マウスブレー、マウスリフレッシャー、ブランクリンス、歯科用鎮静薬、などとすることができる。

40

【0158】

摂取可能品中に存在するレバウジオシドV、レバウジオシドW、レバウジオシドKA、レバウジオシドM、またはレバウジオシドGの好適な量は、例えば、約5 パーツ・パー・ミリオン (ppm) ~ 約100 パーツ・パー・ミリオン (ppm) とすることができる。いくつかの実施形態では、低濃度、例えば、100 ppm未滿のレバウジオシドV、レバウジオシドW、レバウジオシドKA、レバウジオシドM、またはレバウジオシドGは、1

50

0,000ppm～30,000ppmの濃度を有するスクロース溶液に等しい甘味を有する。最終濃度は約5ppm～約100ppm、約5ppm～約95ppm、約5ppm～約90ppm、約5ppm～約85ppm、約5ppm～約80ppm、約5ppm～約75ppm、約5ppm～約70ppm、約5ppm～約65ppm、約5ppm～約60ppm、約5ppm～約55ppm、約5ppm～約50ppm、約5ppm～約45ppm、約5ppm～約40ppm、約5ppm～約35ppm、約5ppm～約30ppm、約5ppm～約25ppm、約5ppm～約20ppm、約5ppm～約15ppm、または約5ppm～約10ppmの範囲である。あるいは、レバウジオシドVまたはレバウジオシドWは、本開示の摂取可能製品中に、約5ppm～約100ppm、約10ppm～約100ppm、約15ppm～約100ppm、約20ppm～約100ppm、約25ppm～約100ppm、約30ppm～約100ppm、約35ppm～約100ppm、約40ppm～約100ppm、約45ppm～約100ppm、約50ppm～約100ppm、約55ppm～約100ppm、約60ppm～約100ppm、約65ppm～約100ppm、約70ppm～約100ppm、約75ppm～約100ppm、約80ppm～約100ppm、約85ppm～約100ppm、約90ppm～約100ppm、または約95ppm～約100ppmの範囲の最終濃度で存在することができる。

10

20

30

40

50

#### 【0159】

ある一定の実施形態では、約5ppm～約100ppmのレバウジオシドV、レバウジオシドW、レバウジオシドKA、レバウジオシドM、またはレバウジオシドGが食品組成物中に存在する。本明細書では、「食品組成物（複数可）」は、栄養価を有することができるが、その必要はなく、ヒトおよび動物による消費を目的とした任意の固体または液体の摂取可能な材料を示す。

#### 【0160】

好適な食品組成物の例は、例えば、下記とすることができる：菓子組成物、例えばキャンディ、ミント、果物風味ドロップ、ココア製品、チョコレート、など；香辛料、例えばケチャップ、マスタード、マヨネーズ、など；チューインガム；穀類組成物；焼いた食品、例えばパン、ケーキ、パイ、クッキー、など；乳製品、例えば乳、チーズ、クリーム、アイスクリーム、サワークリーム、ヨーグルト、シャーベット、など；卓上用甘味料組成物；スープ；シチュー；インスタント食品；食肉、例えばハム、ベーコン、ソーセージ、ジャーキー、など；ゼラチンおよびゼラチン様製品、例えばジャム、ゼリー、貯蔵食料、など；果実；野菜；卵製品；アイシング；糖蜜を含むシロップ；軽食；ナッツミートおよびナッツ製品；ならびに動物飼料。

#### 【0161】

食品組成物はまた、ハーブ、スパイスおよび調味料、天然および合成香味、ならびにうま味調味料、例えばグルタミン酸ナトリウムとすることができる。いくつかの実施形態では、食品組成物は、例えば、調製されたパッケージ製品、例えばダイエット用甘味料、液体甘味料、粒状香味ミックス、ペット用食品、家畜用食品、タバコ、およびベーキング用途用の材料、例えばパン、クッキー、ケーキ、パンケーキ、ドーナツなどの調製のための粉末ベーキングミックスとすることができる。他の実施形態では、食品組成物はまた、スクロースをほとんど、または全く含まないダイエット用および低カロリー食品および飲料とすることができる。

#### 【0162】

前記実施形態のいずれかと組み合わせることができるある一定の実施形態では、レバウジオシドV、レバウジオシドW、レバウジオシドKA、レバウジオシドM、またはレバウジオシドGは唯一の甘味料であり、前記製品は、約1%～約4%（w/v-%）スクロース溶液に等しい甘味度を有する。前記実施形態のいずれかと組み合わせることができるある一定の実施形態では、摂取可能製品および飲料製品はさらに、追加の甘味料を含むことができ、ここで、製品は約1%～約10%（w/v-%）スクロース溶液に等しい甘味度を有する。前記実施形態のいずれかと組み合わせることができるある一定の実施形態では

、製品中の全ての甘味成分は高甘味度甘味料である。前記実施形態のいずれかと組み合わせることができるある一定の実施形態では、製品中の全ての甘味成分は天然高甘味度甘味料とすることができる。前記実施形態のいずれかと組み合わせることができるある一定の実施形態では、追加の甘味料は、下記から選択される1つ以上の甘味料を含む：ステビア抽出物、ステビオール配糖体、ステビオシド、レバウジオシドA、レバウジオシドB、レバウジオシドC、レバウジオシドD、レバウジオシドD2、レバウジオシドF、ズルコシドA、ルブソシド、ステビオールピオシド、スクロース、高フルクトースコーンシロップ、フルクトース、グルコース、キシロース、アラビノース、ラムノース、エリスリトール、キシリトール、マンニトール、ソルビトール、イノシトール、AceK、アスパルテーム、ネオテーム、スクラロース、サッカリン、ナリンギンジヒドロカルコン(NarDH C)、ネオヘスペリジンジヒドロカルコン(NDHC)、ルブソシドモグロシドIV、シアメノシドI、モグロシドV、モナチン、タウマチン、モネリン、ブラゼイン、L-アラニン、グリシン、羅漢果、ヘルナンズルチン、フィロズルチン、トリロブタイン、およびそれらの組み合わせ。前記実施形態のいずれかと組み合わせることができるある一定の実施形態では、摂取可能製品および飲料製品はさらに、下記から選択される1つ以上の添加物を含むことができる：炭水化物、ポリオール、アミノ酸またはその塩、ポリアミノ酸またはその塩、糖酸またはその塩、ヌクレオチド、有機酸、無機酸、有機塩、有機酸塩、有機塩基塩、無機塩、苦味化合物、着香剤、香味成分、収斂化合物、タンパク質、タンパク質加水分解物、界面活性剤、乳化剤、フラボノイド、アルコール、ポリマー、およびそれらの組み合わせ。前記実施形態のいずれかと組み合わせることができるある一定の実施形態では、レバウジオシドD2は、製品中に添加される前には、約50重量%~約100重量%の純度を有する。

10

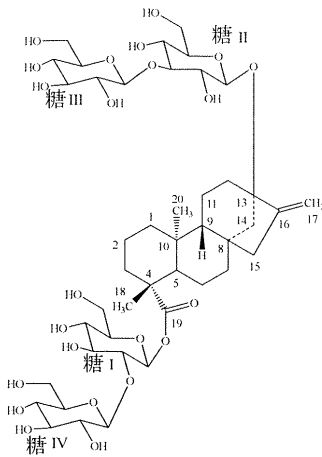
20

## 【0163】

甘味料

別の態様では、本開示は、下記化学構造から構成される甘味料に向けられる：

## 【化5】



Reb V

30

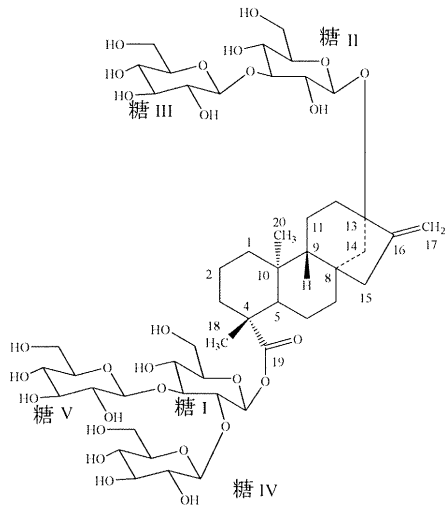
40

## 【0164】

別の態様では、本開示は、下記化学構造から構成される甘味料に向けられる：



【化6】



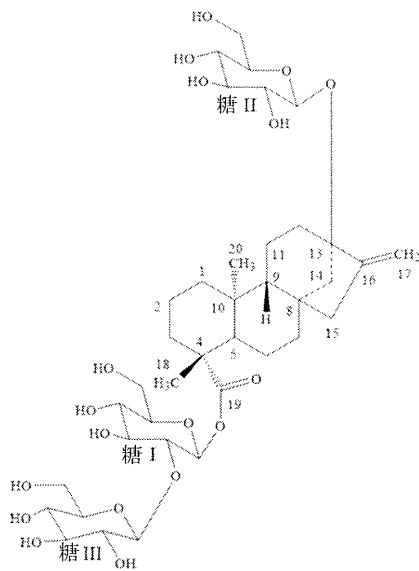
Reb W

10

【0165】

別の態様では、本開示は、下記化学構造から構成される甘味料に向けられる：

【化7】



Reb KA

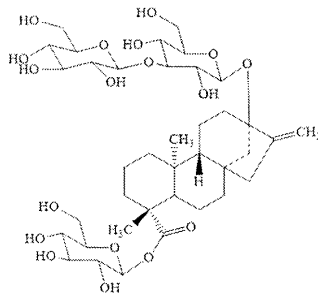
20

30

【0166】

別の態様では、本開示は、下記化学構造から構成される甘味料に向けられる：

## 【化 8】



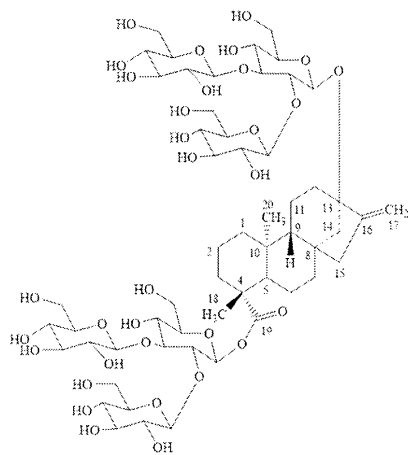
Reb G

10

## 【 0 1 6 7 】

別の態様では、本開示は、下記化学構造から構成される甘味料に向けられる：

## 【化 9】



Reb M

20

## 【 0 1 6 8 】

30

ある一定の実施形態では、甘味料はさらに、フィラー、増量剤および固化防止剤の少なくとも1つを含むことができる。好適なフィラー、増量剤および固化防止剤は当技術分野で知られている。

## 【 0 1 6 9 】

ある一定の実施形態では、レバウジオシドV、レバウジオシドW、レバウジオシドK A、レバウジオシドM、またはレバウジオシドG甘味料は、摂取可能製品および飲料製品を甘くする、かつ/またはその甘味を増強させるのに十分な最終濃度で含められ、および/または添加され得る。レバウジオシドV、レバウジオシドW、レバウジオシドK A、レバウジオシドM、またはレバウジオシドGの「最終濃度」は、最終摂取可能製品および飲料製品中に（すなわち、全ての成分および/または化合物が添加され、摂取可能製品および飲料製品が生成された後）存在するレバウジオシドV、レバウジオシドW、レバウジオシドK A、レバウジオシドM、またはレバウジオシドGの濃度を示す。したがって、ある一定の実施形態では、レバウジオシドV、レバウジオシドW、レバウジオシドK A、レバウジオシドM、またはレバウジオシドGは、摂取可能製品および飲料製品を調製するために使用される化合物または成分に含まれる、かつ/または添加される。レバウジオシドV、レバウジオシドW、レバウジオシドK A、レバウジオシドM、またはレバウジオシドGは単一化合物もしくは成分、または複数の化合物および成分中に存在し得る。他の実施形態では、レバウジオシドV、レバウジオシドW、レバウジオシドK A、レバウジオシドM、またはレバウジオシドGは摂取可能製品および飲料製品に含まれる、かつ/または添加される。ある一定の好ましい実施形態では、レバウジオシドV、レバウジオシドW、レバウ

40

50

ジオシドK A、レバウジオシドM、またはレバウジオシドGは約5 ppm～約100 ppm、約5 ppm～約95 ppm、約5 ppm～約90 ppm、約5 ppm～約85 ppm、約5 ppm～約80 ppm、約5 ppm～約75 ppm、約5 ppm～約70 ppm、約5 ppm～約65 ppm、約5 ppm～約60 ppm、約5 ppm～約55 ppm、約5 ppm～約50 ppm、約5 ppm～約45 ppm、約5 ppm～約40 ppm、約5 ppm～約35 ppm、約5 ppm～約30 ppm、約5 ppm～約25 ppm、約5 ppm～約20 ppm、約5 ppm～約15 ppm、または約5 ppm～約10 ppmの範囲の最終濃度で含まれる、かつ/または添加される。あるいは、レバウジオシドVまたはレバウジオシドWは、約5 ppm～約100 ppm、約10 ppm～約100 ppm、約15 ppm～約100 ppm、約20 ppm～約100 ppm、約25 ppm～約100 ppm、約30 ppm～約100 ppm、約35 ppm～約100 ppm、約40 ppm～約100 ppm、約45 ppm～約100 ppm、約50 ppm～約100 ppm、約55 ppm～約100 ppm、約60 ppm～約100 ppm、約65 ppm～約100 ppm、約70 ppm～約100 ppm、約75 ppm～約100 ppm、約80 ppm～約100 ppm、約85 ppm～約100 ppm、約90 ppm～約100 ppm、または約95 ppm～約100 ppmの範囲の最終濃度で含まれる、かつ/または添加される。例えば、レバウジオシドVまたはレバウジオシドWは約5 ppm、約10 ppm、約15 ppm、約20 ppm、約25 ppm、約30 ppm、約35 ppm、約40 ppm、約45 ppm、約50 ppm、約55 ppm、約60 ppm、約65 ppm、約70 ppm、約75 ppm、約80 ppm、約85 ppm、約90 ppm、約95 ppm、または約100 ppm（これらの値の間の任意の範囲を含む）の最終濃度で含まれる、かつ/または添加され得る。

#### 【0170】

ある一定の実施形態では、レバウジオシドV、レバウジオシドW、レバウジオシドK A、レバウジオシドM、またはレバウジオシドGは摂取可能製品および飲料製品に含まれる、かつ/または添加される唯一の甘味料である。そのような実施形態では、摂取可能製品および飲料製品は、約1%～約4% (w/v-%)スクロース溶液、約1%～約3% (w/v-%)スクロース溶液、または約1%～約2% (w/v-%)スクロース溶液に等しい甘味度を有する。あるいは、摂取可能製品および飲料製品は、約1%～約4% (w/v-%)スクロース溶液、約2%～約4% (w/v-%)スクロース溶液、約3%～約4% (w/v-%)スクロース溶液、または約4%に等しい甘味度を有する。例えば、摂取可能製品および飲料製品は、約1%、約2%、約3%、または約4% (w/v-%)スクロース溶液（これらの値の間の任意の範囲を含む）に等しい甘味度を有し得る。

#### 【0171】

本開示の摂取可能製品および飲料製品は、レバウジオシドV、レバウジオシドW、レバウジオシドK A、レバウジオシドM、またはレバウジオシドGの混合物および1つ以上の本開示の甘味料を、望ましい甘味度、栄養的特性、味覚プロファイル、食感、または他の官能因子を達成するのに十分な比で含むことができる。

#### 【0172】

下記非限定的な実施例を考慮すると、本開示はより完全に理解されるであろう。

#### 【0173】

実施例

実施例1

この実施例では、全ての候補UGT遺伝子の全長DNA断片を合成した。

#### 【0174】

具体的に、cDNAを大腸菌発現のためにコドン最適化させた(Genscript, Piscataway, NJ)。合成されたDNAを細菌発現ベクターであるpETite N-His SUMO Kan ベクターにクローン化した(Lucigen)。UDP-グリコシルトランスフェラーゼ融合酵素(UGT76G1-AtSUS1およびEUGT11-AtSUS1)をコードするヌクレオチド配列のために、GSG-リン

カー（ヌクレオチド配列：g g t t c t g g tによりコードされる）を、ウリジンジホスホグリコシルトランスフェラーゼドメインをコードするヌクレオチド配列とシロイヌナズナ由来のスクロースシンターゼ1（AtSUS1）をコードするヌクレオチド配列の間のフレームに挿入した。表2はタンパク質および配列識別子番号の概要を示す。

【表2】

表2. 配列同定番号

名称	SEQ ID NO	説明
UGT76G1	SEQ ID NO: 1	アミノ酸
UGT76G1	SEQ ID NO: 2	核酸
EUGT11	SEQ ID NO: 3	アミノ酸
EUGT11	SEQ ID NO: 4	核酸
HV1	SEQ ID NO: 5	アミノ酸
HV1	SEQ ID NO: 6	核酸
AtSUS1	SEQ ID NO: 7	アミノ酸
AtSUS1	SEQ ID NO: 8	核酸
GS 融合酵素	SEQ ID NO: 9	アミノ酸
GS 融合酵素	SEQ ID NO: 10	核酸
EUS 融合酵素	SEQ ID NO: 11	アミノ酸
EUS 融合酵素	SEQ ID NO: 12	核酸

10

20

【0175】

各発現コンストラクトを大腸菌BL21（DE3）に形質転換させ、これをその後、50 μg/mLカナマイシンを含むLB培地中、37 °Cで、0.8~1.0のOD<sub>600</sub>に到達するまで増殖させた。タンパク質発現を、1 mMイソプロピル β-D-1-チオガラクトピラノシド（IPTG）の添加により誘導し、培養物をさらに16 °Cで22時間の間増殖させた。細胞を遠心分離により回収した（3,000 × g；10分；4 °C）。細胞ペレットを収集し、直ちに使用するか、または-80 °Cで貯蔵した。

【0176】

細胞ペレットを溶解緩衝液（50 mMリン酸カリウム緩衝液、pH 7.2、25 μg/mLリゾチーム、5 μg/mL DNase I、20 mMイミダゾール、500 mM NaCl、10%グリセロール、および0.4%トリトンX-100）中に再懸濁させた。細胞を超音波処理により4 °Cで破壊し、細胞デブリを遠心分離により浄化した（18,000 × g；30分）。上清を平衡化（平衡化緩衝液：50 mMリン酸カリウム緩衝液、pH 7.2、20 mMイミダゾール、500 mM NaCl、10%グリセロール）Ni-NTA（Qiagen）アフィニティーカラムにロードした。タンパク質試料のローディング後、カラムを、平衡化緩衝液で洗浄し、非結合汚染物質タンパク質を除去した。HisタグUGT組換えポリペプチドを、250 mMイミダゾールを含む平衡化緩衝液により溶離させた。精製HV1（61.4 kD）、UGT76G1（65.4 kD）、AtSUS1（106.3 kD）、EUGT11（62 kD）、UGT76G1-SUS1（GS）（157.25 kD）およびEUGT11-AtSUS1（155 kD）融合タンパク質を、図2に示した。

30

40

【0177】

実施例2

この実施例では、候補UGT組換えポリペプチドを、グリコシルトランスフェラーゼ活性について、基質として試験されるステビオール配糖体を使用することによりアッセイした。

【0178】

典型的には、組換えポリペプチド（10 μg）を、200 μLのインビトロ反応系において試験した。反応系は50 mMリン酸カリウム緩衝液、pH 7.2、3 mM MgCl<sub>2</sub>、1 mg/mLステビオール配糖体基質、1 mM UDP-グルコースを含む。反応を

50

30 で実施し、200  $\mu$ Lの1-ブタノールを添加することにより終結させた。試料を3回200  $\mu$ Lの1-ブタノールで抽出した。プールした画分を乾燥させ、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)分析のために70  $\mu$ Lの80%メタノールに溶解した。ルブソシド(99%、Blue California、CA)、精製Reb G(98.8%)、Reb KA(98.4%)およびReb V(80%)を、インビトロ反応において基質として使用した。

#### 【0179】

UGTに触媒されたグリコシル化反応を、スクロースシンターゼ(例えばAtSUS1)により触媒されるUDP-グルコース生成反応にカップリングさせた。この方法では、UDP-グルコースがスクロースおよびUDPから生成され、そのため、余分のUDP-グルコースの添加が省略され得る。アッセイでは、組換えAtSUS1をUGT反応系に添加し、UDP-グルコースはUDPから再生させることができる。AtSUS1配列(Bieniaszka et al., Plant J. 2007, 49: 810-828)を合成し、細菌発現ベクターに挿入した。組換えAtSUS1タンパク質を発現させ、アフィニティークロマトグラフィーにより精製した。

10

#### 【0180】

HPLC分析を、クォータナリポンプ、温度制御カラムコンパートメント、オートサンプラーおよびUV吸光度検出器を含むDionex UPLC ultimate 3000システム(Sunnyvale、CA)を用いて実施した。Phenomenex Luna NH<sub>2</sub>、Luna C18またはSynergi Hydro-RPカラム(ガードカラムを有する)を、ステビオール配糖体のキャラクタリゼーションのために使用した。アセトニトリルを含む水またはNa<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>緩衝液を、HPLC分析における定組成溶離のために使用した。検出波長を210 nmとした。

20

#### 【0181】

##### 実施例3

この実施例では、AtSUS1を用いたまたは用いない全ての反応条件において、組換えHV1ポリペプチドを、糖部分をルブソシドに転移させ、レバウジオシドKAが生成させることについて分析した("Minor diterpene glycosides from the leaves of Stevia rebaudiana". Journal of Natural Products (2014), 77(5), 1231-1235)。

30

#### 【0182】

図3に示されるように、AtSUS1を用いたまたは用いない全ての反応条件において、組換えHV1ポリペプチドは糖部分をルブソシドに転移させ、Reb KAを生成させた。ルブソシドはReb KAおよびReb Eに、組換えHV1によりUGT-SUSカップリング反応系において、完全に変換された(G、I)。しかしながら、組換えHV1ポリペプチド単独で、AtSUS1へのカップリングなしでは、一部のルブソシド(rubososide)のみがReb KAに、24時間後に(H)変換され、AtSUS1はUGT-SUSカップリング系において変換効率を増強させたことが示された。HV1-AtSUS1カップリング反応系では、生成されたReb KAは、連続してReb Eに変換され得る。

40

#### 【0183】

##### 実施例4

この実施例では、HV1活性を、Reb Eを基質として用いて分析した。

#### 【0184】

Reb E基質(0.5 mg/ml)を、組換えHV1ポリペプチド(20  $\mu$ g)およびAtSUS1(20  $\mu$ g)と共に、UGT-SUSカップリング反応系(200  $\mu$ L)において、上記実施例で使用されるものと同様の条件下でインキュベートした。図4に示されるように、Reb Zが、組換えHV1ポリペプチドおよびAtSUS1の組み合わせにより生成された。これらの結果から、HV1は、グルコース部分をReb Eに転移さ

50

せ、R Zを形成させることができることが示された。図4は、レバウジオシドZ(「Re b Z」)は、組換えHV1ポリペプチドおよび組換えAtSUS1により、HV1-AtSUS1カップリング反応系において触媒され、レバウジオシドE(「Re b E」)から生成させることができることを示す。HV1はグルコースをRe b Eに転移させRe b Z、60:40~70:30の比のRe b Z1およびRe b Z2の混合物を生成させることができる(米国仮特許出願第61/898,571号、Conagen Inc.に譲渡)。

#### 【0185】

##### 実施例5

この実施例では、Re b KAのRe b Eへの変換を確認するために、精製Re b KA基質を、組換えHV1と共に、AtSUS1ありまたはなしでインキュベートした。図5に示されるように、Re b Eは組換えHV1ポリペプチドにより、両方の反応条件において生成された。しかしながら、UGT-SUSカップリング反応系におけるAtSUS1ポリペプチドは反応効率を増強することができる。全てのRe b KA基質は、UGT-SUSカップリング系においてRe b Eに完全に変換され得る(D)。

10

#### 【0186】

##### 実施例6

この実施例では、EUGT11活性を、ルブソシドを基質として用いて分析した。

#### 【0187】

図6に示されるように、EUGT11は、AtSUS1を用いたまたは用いない全ての反応条件において、糖部分をルブソシドに転移させ、Re b KAおよびステビオシドを生成させることができる。AtSUS1はUGT-SUSカップリング系において変換効率を増強させた。HV1-AtSUS1カップリング反応系では、Re b Eは、EUGT11により連続して変換され得る。EUS融合タンパク質は同じ反応条件下でより高い活性を示した。生成されたRe b KAおよびステビオシドは全て、EUSにより48時間で、Re b Eに完全に変換された。Re b Eは、連続してRe b D2に変換され得る。

20

#### 【0188】

##### 実施例7

この実施例では、EUGT11活性を、Re b KAを基質として用いて分析した。

30

#### 【0189】

EUGT11は1,2-19-O-グルコースグリコシル化活性を有するUGTであり、関連するステビオール配糖体を生成させる(UCT公開出願WO2013/022989号、Evolva SAに譲渡)。例えば、EUGT11は、ステビオシドからRe b Eを生成させる反応を触媒することができる。EUGT11はまた、1,6-13-O-グルコースグリコシル化活性を有し、グルコース分子をレバウジオシドEに転移させ、レバウジオシドD2を形成させることができる(US特許出願番号第14/269,435号、Conagen, Inc.に譲渡)。実験では、我々は、EUGT11はグルコース残基をRe b KAに転移させ、Re b Eを形成させることができることを見出した。図7に示されるように、EUGT11は、AtSUS1用いた(E、H)、または用いない(D、G)全ての反応条件において、糖部分をRe b KAに転移させ、Re b Eを生成させることができる。AtSUS1はUGT-SUSカップリング系において変換効率を増強させた(E、H)。EUGT11-AtSUS1カップリング反応系(E、H)およびEUS融合反応系(F、I)では、全てのRe b KAが完全に変換され、生成されたRe b Eは、連続してRe b D2に変換され得る。

40

#### 【0190】

##### 実施例8

この実施例では、UGT76G1活性を、ルブソシドを基質として用いて分析した。

#### 【0191】

UGT76G1は1,3-13-O-グルコースグリコシル化活性を有し、グルコース

50

分子をステビオシドに転移させ、レバウジオシドAを形成させ、およびReb Eに転移させ、レバウジオシドDを形成させることができる。実施例では、我々はUGT76G1はグルコース残基をルブソシドに転移させレバウジオシドGを形成させることができることを見出した。

【0192】

図8に示されるように、UGT76G1は、全ての反応条件において、AtSUS1(D、G)を用いて、または(C、F)用いずに、糖部分をルブソシドに転移させ、Reb Gを生成させることができる。AtSUS1はUGT-SUSカップリング系において変換効率を増強させた。GS融合タンパク質は、同じ反応条件下でより高い活性を示した(E、H)。全てのルブソシドが、GSにより12時間でReb Gに完全に変換された(E)。

10

【0193】

実施例9

この実施例では、UGT76G1活性を、レバウジオシドKAを基質として用いて分析した。

【0194】

UGT76G1の酵素活性をさらに同定するために、インビトロアッセイを、レバウジオシドKAを基質として用いて実施した。驚いたことに、新規ステビオール配糖体(レバウジオシドV「Reb V」)が早期に生成された。より遅い時間点で、反応において生成されたReb Vが別の新規ステビオール配糖体に変換された(レバウジオシドW「Reb W」)。

20

【0195】

図9に示されるように、UGT76G1は、AtSUS1を用いた(F、I)または用いない(E、H)全ての反応条件において、糖部分をReb KAに転移させ、Reb Vを生成させることができる。AtSUS1はUGT-SUSカップリング系において変換効率を増強させた(F、I)。UGT76G1-AtSUS1カップリング反応系(I)およびGS融合反応系(J)において、生成されたReb Vは、12時間でReb Wに完全に変換された。

【0196】

実施例10

この実施例では、UGT76G1活性を、Reb Vを基質として用いて分析した。

30

【0197】

基質としての精製Reb Vを反応系に導入した。図10に示されるようにC、Reb Vは驚いたことにUGT76G1組換えポリペプチドによりUGT-SUS1カップリング系において6時間で、Reb Wに完全に変換された。

【0198】

実施例11

この実施例では、HV1活性を、Reb Gを基質として用いて分析した。

【0199】

図11に示されるように、組換えHV1ポリペプチドは、AtSUS1を用いたまたは用いない全ての反応条件において、糖部分をレバウジオシドGに転移させ、Reb Vを生成させた。Reb Gは、組換えHV1によりUGT-SUS1カップリング反応系において、Reb Vに完全に変換された(E、G)。しかしながら、組換えHV1ポリペプチド単独で、AtSUS1へのカップリングなしでは、24時間後に、Reb Gの一部のみがReb Vに変換され(F)、AtSUS1はUGT-SUS1カップリング系において変換効率を増強させたことが示された。

40

【0200】

実施例12

この実施例では、EUGT11活性を、Reb Gを基質として用いて分析した。

【0201】

50

図12に示されるように、組換えEUGT11ポリペプチドは、AtSUS1を用いた(F、I)または用いない(E、H)全ての反応条件において、糖部分をレバウジオシドGに転移させ、Reb Vを生成させた。より多くのReb Gが、組換えEUGT11によりUGT-SUSカップリング反応系において、Reb Vに変換された(F、I)。しかしながら、組換えEUGT11ポリペプチド単独で、AtSUS1へのカップリングなしでは、Reb Gの一部のみがReb Vに変換され(E、H)、AtSUS1はUGT-SUSカップリング系において変換効率を増強させたことが示された。EUS融合タンパク質は、同じ反応条件下でより高い活性を示した(G、J)。反応系内の全てのReb Gは、EUSにより24時間でReb Vに完全に変換された(J)。

#### 【0202】

##### 実施例13

この実施例では、UGT76G1と組み合わせたHV1の活性を、ルブソシドを基質として用いて分析した。

#### 【0203】

ルブソシド(Rebusoside)基質を、組換えHV1ポリペプチド、UGT76G1、およびAtSUS1と共に、UGT-SUSカップリング反応系において、上記実施例で使用されるものと同様の条件下でインキュベートした。生成物をHPLCにより分析した。図13に示されるように、Reb VおよびReb Wが、組換えHV1ポリペプチド、UGT76G1、およびAtSUS1の組み合わせにより生成された。よって、組換えHV1ポリペプチドは、1,2-19-O-グルコースおよび1,2-13-O-グルコースグリコシル化活性を示したが、これは、他のUGT酵素(例えばUGT76G1、これは1,3-13-O-グルコースおよび1,3-19-O-グルコースグリコシル化活性を示した)と組み合わせて、ステビオール配糖体の複雑な、多段階生合成のために使用することができる。HV1組換えタンパク質をGS融合タンパク質と反応系において組み合わせた場合、Reb VおよびReb Wはまた、これらのUGT酵素により生成され、UGT-SUSカップリング反応はGS融合タンパク質により生じ得ることが示された。

#### 【0204】

##### 実施例14

この実施例では、UGT76G1と組み合わせたEUGT11の活性を、ルブソシドを基質として用いて分析した。

#### 【0205】

ルブソシド(Rebusoside)基質を、組換えEUGT11ポリペプチド、UGT76G1、およびAtSUS1と共にUGT-SUSカップリング反応系において上記実施例で使用されるものと同様の条件下でインキュベートした。生成物をHPLCにより分析した。図14に示されるように、Reb Wが、組換えEUGT11ポリペプチド、UGT76G1、およびAtSUS1の組み合わせにより生成された。よって、組換えEUGT11ポリペプチドは、1,2-19-O-グルコースおよび1,2-13-O-グルコースグリコシル化活性を示したが、これは、他のUGT酵素(例えばUGT76G1、これは1,3-13-O-グルコースおよび1,3-19-O-グルコースグリコシル化活性を示した)と組み合わせて、ステビオール配糖体の複雑な、多段階生合成のために使用することができる。EUGT11組換えタンパク質をGS融合タンパク質と反応系において組み合わせた場合、Reb Wはまた、これらのUGT酵素により生成され、UGT-SUSカップリング反応はGS融合タンパク質により生じ得ることが示された。

#### 【0206】

##### 実施例15

この実施例では、UGT76G1と組み合わせたHV1の活性を、Reb Gを基質として使用して分析した。

#### 【0207】

Reb G基質を、組換えHV1ポリペプチド、UGT76G1、およびAtSUS1

10

20

30

40

50



と共にUGT-SUSカップリング反応系において、上記実施例で使用されるものと同様の条件下でインキュベートした。生成物をHPLCにより分析した。図15に示されるように、Reb VおよびReb Wが、組換えHV1ポリペプチド、UGT76G1、およびAtSUS1の組み合わせにより生成された。12時間後、全てのルブソシド基質がReb Vに変換され、36時間後、全ての生成されたReb VがReb Wに変換された。よって、組換えHV1ポリペプチドは1,2-19-O-グルコースおよび1,2-13-O-グルコースグリコシル化活性を示したが、これは、他のUGT酵素(例えばUGT76G1、これは1,3-13-O-グルコースおよび1,3-19-O-グルコースグリコシル化活性を示した)と組み合わせ、ステピオール配糖体の複雑な、多段階生合成のために使用することができる。HV1組換えタンパク質をGS融合タンパク質と反応系において組み合わせた場合、Reb VおよびReb Wはまた、これらのUGT酵素により生成され、UGT-SUSカップリング反応はGS融合タンパク質により生じ得ることが示された。

10

## 【0208】

## 実施例16

この実施例では、UGT76G1と組み合わせたEUGT11の活性を、Reb Gを基質として使用して分析した。

## 【0209】

Reb G基質を、組換えEUGT11ポリペプチド、UGT76G1、およびAtSUS1と共にUGT-SUSカップリング反応系において、上記実施例で使用されるものと同様の条件下でインキュベートした。生成物をHPLCにより分析した。図16に示されるように、Reb Wが、組換えEUGT11ポリペプチド、UGT76G1、およびAtSUS1の組み合わせにより生成された。よって、組換えEUGT11ポリペプチドは、1,2-19-O-グルコースおよび1,2-13-O-グルコースグリコシル化活性を示したが、これは、他のUGT酵素(例えばUGT76G1、これは1,3-13-O-グルコースおよび1,3-19-O-グルコースグリコシル化活性を示した)と組み合わせ、ステピオール配糖体の複雑な、多段階生合成のために使用することができる。EUGT11組換えタンパク質をGS融合タンパク質と反応系において組み合わせた場合、Reb Wはまた、これらのUGT酵素により生成され、UGT-SUSカップリング反応はGS融合タンパク質により生じ得ることが示された。

20

30

## 【0210】

## 実施例17

この実施例では、UGT76G1およびGS融合酵素活性を、Reb Dを基質として用いて分析した。

## 【0211】

Reb D基質を、組換えUGT76G1と共に、上記実施例で使用されるものと同様の条件下でインキュベートした。生成物をHPLCにより分析した。図22に示されるように、Reb Mが、反応において、UGT76G1によりAtSUS1を用いて(図22DおよびG)または用いずに生成された(図22CおよびF)。よって、組換えUGT76G1ポリペプチドは1,3-19-O-グルコースグリコシル化活性を示したが、これはレバウジオシドMの生合成において使用することができる。Reb Dは、組換えUGT76G1によりUGT-SUSカップリング反応系において、Reb Mに完全に変換された(図22G)。しかしながら、組換えUGT76G1ポリペプチド単独で、AtSUS1へのカップリングなしでは、6時間後に、Reb Dの一部のみがReb Mに変換され(F)、AtSUS1はUGT-SUSカップリング系において変換効率を増強させたことが示された。GS融合タンパク質は、同じ反応条件下で、UGT76G1-AtSUS1カップリング反応と同様の活性を示した(E、H)。全てのReb Dが、GSにより6時間で、Reb Mに完全に変換され(H)、UGT-SUSカップリング反応はGS融合タンパク質により生じ得ることが示された。

40

## 【0212】

50

## 実施例 18

この実施例では、UGT76G1およびGS融合酵素の活性を、Reb Eを基質として用いて分析した。

## 【0213】

Reb E基質を、組換えUGT76G1またはGS融合酵素と共に、上記実施例で使用されるものと同様の条件下でインキュベートした。生成物をHPLCにより分析した。図23に示されるように、Reb Dが、UGT76G1によりAtSUS1を用いて(図23E、HおよびK)または用いずに(図22D、GおよびJ)、またGS融合酵素により(図23F、IおよびL)反応において生成された。さらに、Reb Mが反応において生成されたReb Dから形成された。よって、組換えUGT76G1ポリペプチドは1,3-13-O-グルコースおよび1,3-19-O-グルコースグリコシル化活性を示したが、これはレバウジオシドDおよびレバウジオシドMの生合成において使用することができる。Reb Eは、組換えUGT76G1によりUGT-SUSカップリング反応系において24時間後、Reb Mに完全に変換された(図23K)。しかしながら、組換えUGT76G1ポリペプチド単独でAtSUS1へのカップリングなしでは、24時間後に、Reb DのみがReb Eから完全に変換され(J)、AtSUS1は、連続するUDPG生成を通して、UGT-SUSカップリング系において変換効率を増強させたことが示された。GS融合タンパク質は、同じ反応条件下で、UGT76G1-AtSUS1カップリング反応と同様の活性を示し(図23F、IおよびL)、UGT-SUSカップリング反応はGS融合タンパク質により生成され得ることが示された。

10

20

## 【0214】

## 実施例 19

この実施例では、UGT76G1と組み合わせたHV1の活性を、ステビオシドを基質として使用して分析した。

## 【0215】

ステビオシド基質を、組換えHV1ポリペプチドおよびUGT76G1またはGS融合酵素と共に、上記実施例で使用されるものと同様の条件下でインキュベートした。生成物をHPLCにより分析した。図24に示されるように、Reb Aが、全ての反応において、組換えHV1ポリペプチドおよびUGT76G1の組み合わせにより生成された。さらに、Reb DおよびReb Mが、組換えHV1ポリペプチド、UGT76G1ポリペプチドおよびAtSUS1の組み合わせ(図24E、HおよびK)または組換えGS融合酵素およびHV1ポリペプチドの組み合わせ(図24F、IおよびL)を用いる反応において検出された。組換えHV1ポリペプチドは1,2-19-O-グルコースグリコシル化活性を示したが、これは、他のUGT酵素(例えばUGT76G1、これは1,3-13-O-グルコースおよび1,3-19-O-グルコースグリコシル化活性を示した)と組み合わせて、レバウジオシドDおよびレバウジオシドMの複雑な、多段階生合成のために使用することができる。結果から、AtSUS1は、連続するUDPG生成を通して、UGT-SUSカップリング系において変換効率を増強させたことも示された(図24E、HおよびK)。GS融合タンパク質は、同じ反応条件下で、UGT76G1-AtSUS1カップリング反応と同様の活性を示し(図24F、IおよびL)、UGT-SUSカップリング反応はGS融合タンパク質により生じ得ることが示された。

30

40

## 【0216】

## 実施例 20

この実施例では、UGT76G1と組み合わせたHV1の活性をReb Aを基質として使用して分析した。

## 【0217】

Reb A基質を、組換えHV1ポリペプチドおよびUGT76G1またはGS融合酵素と共に、上記実施例で使用されるものと同様の条件下でインキュベートした。生成物をHPLCにより分析した。図25に示されるように、Reb Dが、全ての反応において、組換えHV1ポリペプチドおよびUGT76G1の組み合わせにより生成された。さら

50

に、Reb Mが、組換えHV1ポリペプチド、UGT76G1ポリペプチドおよびAtSUS1の組み合わせ(図25D、GおよびJ)または組換えGS融合酵素およびHV1ポリペプチドの組み合わせ(図25E、HおよびK)を用いる反応において検出された。組換えHV1ポリペプチドは、1,2-19-O-グルコースグリコシル化活性を示したが、これは、他のUGT酵素(例えばUGT76G1、これは1,3-19-O-グルコースグリコシル化活性を示した)と組み合わせ、レバウジオシドDおよびレバウジオシドMの複雑な、多段階生合成のために使用することができる。結果から、AtSUS1は、連続するUDPG生成を通して、UGT-SUSカップリング系において変換効率を増強させたことも示された(図25D、GおよびJ)。GS融合タンパク質は、同じ反応条件下で、UGT76G1-AtSUS1カップリング反応と同様の活性を示し(図25E、HおよびK)、UGT-SUSカップリング反応はGS融合タンパク質により生じ得ることが示された。

10

## 【0218】

## 実施例21

この実施例では、Reb Vの構造をNMRにより分析した。

## 【0219】

Reb Vのキャラクタリゼーションのために使用する材料を、Reb Gの酵素変換により生成させ、HPLCにより精製した。LTQ Orbitrap Discovery HRMS機器を用い、その分解能を30kに設定して、HRMSデータを生成させた。データを、ポジティブイオンエレクトロスプレーモードで、 $m/z$ 150~1500にて走査した。ニードル電圧を4kVに設定し;他の源条件は、シースガス=25、補助ガス=0、スイープガス=5(全てのガスは任意単位で流れる)、キャピラリー電圧=30V、キャピラリー温度=300、およびチューブレンズ電圧=75とした。試料を2:2:1アセトニトリル:メタノール:水(注入溶離液と同じ)で希釈し、50マイクロリットルで射出させた。NMRスペクトルをBruker Avance DRX500 MHzまたはVarian INOVA600 MHz機器で標準パルスシーケンスを用いて取得した。1D( $^1\text{H}$ および $^{13}\text{C}$ )および2D(TOCSY、HMQC、およびHMB C)NMRスペクトルは、 $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ において実施した。

20

## 【0220】

Reb Vの分子式を、そのポジティブ高分解能(HR)質量スペクトルに基づいて $\text{C}_{44}\text{H}_{70}\text{O}_{23}$ と推定した。そのスペクトルは $m/z$ 989.4198で $[\text{M}+\text{Na}]^+$ に対応する付加イオンを示し;この組成は、 $^{13}\text{C}$  NMRスペクトルデータにより支持された。Reb Vの $^1\text{H}$  NMRスペクトルデータは、0.97および1.40の2つのメチル-重線、環外二重結合の5.06および5.71の一重線としての2つのオレフィン性プロトン、0.74-2.72の間の9つのsp<sup>3</sup>メチレンおよび2つのsp<sup>3</sup>メチンプロトンの存在を示し、ステビア属から前に単離されたエント-カウランジテルペノイドに特徴的であった。エント-カウランジテルペノイドの基本骨格は、COSYおよびTOCSY研究により支持された。その研究は重要な相関を示した:H-1/H-2;H-2/H-3;H-5/H-6;H-6/H-7;H-9/H-11;H-11/H-12。Reb Vの $^1\text{H}$  NMRスペクトルはまた、5.08、5.38、5.57、および6.23で共鳴する4つのアノマープロトンの存在を示し;その構造内の4つの糖単位を示唆した。5% $\text{H}_2\text{SO}_4$ によるReb Vの酸加水分解により、D-グルコースが得られ、これは、TLCによる標準品との直接比較により同定された。Reb Vの酵素加水分解はアグリコンを提供し、これは、 $^1\text{H}$  NMRおよびco-TLCの標準化合物との比較によりステビオールとして同定された。5.08(d、 $J=7.8\text{Hz}$ )、5.38(d、 $J=8.1\text{Hz}$ )、5.57(d、 $J=8.0\text{Hz}$ )、および6.23(d、 $J=7.8\text{Hz}$ )の、グルコース部分の4つのアノマープロトンについて観察された大きなカップリング定数はステビオール配糖体で報告されるそれらの配向を示唆した。Reb Vについての $^1\text{H}$ および $^{13}\text{C}$  NMR値を、TOCSY、HMQCおよびHMB Cデータに基づいて割当て、表3に示す。

30

40

50

## 【表 3】

表 3. Reb V および Reb G に対する  $^1\text{H}$  および  $^{13}\text{C}$  NMR スペクトルデータ (化学シフトおよびカップリング定数) <sup>a~c</sup>

位置	Reb V		Reb G	
	$^1\text{H}$ NMR	$^{13}\text{C}$ NMR	$^1\text{H}$ NMR	$^{13}\text{C}$ NMR
1	0.74 m、1.66 m	41.1	0.78 m、1.69 m	41.3
2	1.43 m、2.18 m	20.4	1.44 m、2.20 m	20.0
3	1.06 m、2.72 d (12.8)	38.4	1.05 m、2.70 d (11.6)	38.8
4	---	44.8	---	44.9
5	1.32 m	57.9	1.32 m	57.8
6	1.84 m、2.20 m	22.7	1.87 m、2.24 m	22.6
7	1.06 m、1.70 m	42.2	1.07 m、1.72 m	42.2

8	---	42.5	---	43.1
9	0.91 d (7.8)	54.5	0.92 d (7.6)	54.4
10	---	40.2	---	40.4
11	1.72 m	21.0	1.75 m	21.2
12	2.18 m、2.38 m	38.3	2.26 m、2.38 m	37.7
13	---	87.6	---	86.4
14	1.68 m、2.43 m	44.8	1.78 m、2.50 m	44.6
15	1.96 m、2.24 m	48.9	2.06 m、2.32 m	48.2
16	---	153.7	---	155.0
17	5.06 s、5.71 s	105.7	5.00 s、5.49 s	104.8
18	1.40 s	29.6	1.32 s	28.8
19	---	176.4	---	177.4
20	0.97 s	16.7	1.25 s	16.2
1'	6.23 d (7.8)	94.2	6.16 d (7.6)	96.4
2'	3.98 m	74.5	4.01 m	74.5
3'	4.14 m	79.3	4.09 m	79.3
4'	4.36 m	71.6	4.34 m	71.6
5'	4.24 m	79.9	4.22 m	79.9
6'	4.06 m、4.48 m	62.6	4.04 m、4.44 dd (3.2、7.6)	62.6
1''	5.08 d (7.8)	99.6	5.06 d (7.4)	99.9
2''	3.94 m	74.7	3.92 m	74.5
3''	4.04 m	89.3	4.06 m	89.5
4''	4.28 m	71.2	4.23 m	71.0
5''	4.00 m	78.2	4.02 m	78.1
6''	4.24 m、4.58 m	63.0	4.27 m、4.56 dd (2.8、8.4)	63.1
1'''	5.38 d (8.1)	106.4	5.27 d (8.4)	106.5
2'''	4.16 m	76.1	4.14 m	76.0
3'''	4.34 m	79.2	4.37 m	79.3
4'''	4.26 m	72.2	4.28 m	72.2
5'''	3.78 m	78.8	3.89 m	78.8
6'''	4.14 m、4.44 m	63.2	4.18 m、4.48 m	63.2
1''''	5.57 d (8.0)	105.7		
2''''	3.96 m	76.5		
3''''	4.32 m	79.6		
4''''	4.20 m	72.5		
5''''	3.87 m	79.0		
6''''	4.12 m、4.46 m	63.5		

<sup>a</sup> TOCSY、HMQCおよびHMBC相関に基づいて行った割当；<sup>b</sup>化学シフト値は $\delta$  (ppm) で表す；<sup>c</sup>カップリング定数はHzで表す。

#### 【0221】

Reb VのNMRスペクトルデータおよび加水分解実験からの結果に基づき、その構造内に、アグリコンステピオールに連結された4つの-D-グルコシル単位が存在すると結論づけた。Reb VのReb Gとの<sup>1</sup>Hおよび<sup>13</sup>C NMR値の厳密な比較により、エーテル結合の形態のC-13の3-O-D-グルコピオシル単位および、第4の-D-グルコシル部分が割り当てられる、エステル結合の形態のC-19位の別の-D-グルコシル単位を有するステピオールアグリコン部分の存在が示唆される(図17)。

-D-グルコシル部分の糖Iの2-位での<sup>1</sup>Hおよび<sup>13</sup>C化学シフトの両方で

10

20

30

40

50

の低磁場シフトは、この位置での  $\beta$ -D-グルコシル単位の存在を支持した。構造は、図 18 に示される重要な TOCSY および HMB C 相関によりさらに支持された。NMR および質量スペクトルデータならびに加水分解研究の結果に基づき、Reb G の酵素変換により生成された Reb V の構造を 13 - [ ( 3 - O -  $\beta$ -D-グルコピラノシル -  $\beta$ -D-グルコピラノシル ) オキシ ] エント - カウル - 16 - エン - 19 - オイック酸 - ( 2 - O -  $\beta$ -D-グルコピラノシル -  $\beta$ -D-グルコピラノシル ) エステルと推定した。

#### 【0222】

Reb V の酸加水分解 . Reb V ( 5 mg ) を含む MeOH ( 10 ml ) の溶液に、3 ml の 5 %  $H_2SO_4$  を添加し、混合物を 24 時間還流させた。反応混合物をその後、飽和炭酸ナトリウムで中和し、酢酸エチル ( EtOAc ) ( 2 x 25 ml ) で抽出し、糖を含む水性画分およびアグリコン部分を含む EtOAc 画分を得た。水相を濃縮し、標準糖と TLC 系 EtOAc / n - ブタノール / 水 ( 2 : 7 : 1 ) および  $CH_2Cl_2$  / MeOH / 水 ( 10 : 6 : 1 ) を用いて比較し ; 糖を D - グルコースと同定した。

10

#### 【0223】

Reb V の酵素加水分解 . Reb V ( 1 mg ) を 10 ml の 0 . 1 M 酢酸ナトリウム緩衝液、pH 4 . 5 に溶解し、クロコウジカビ由来の粗ペクチナーゼ ( 50  $\mu$ L、Sigma - Aldrich、P2736 ) を添加した。混合物を 50 °C で 96 時間攪拌した。1 の加水分解から反応中に沈殿した生成物を、その co - TLC の標準化合物との比較および  $^1H$  NMR スペクトルデータによりステビオールと同定した。大規模 1D および 2D NMR ならびに高分解能質量スペクトルデータおよび加水分解研究に基づいて、Reb V という名の化合物を、13 - [ ( 3 - O -  $\beta$ -D-グルコピラノシル -  $\beta$ -D-グルコピラノシル ) オキシ ] エント - カウル - 16 - エン - 19 - オイック酸 - ( 2 - O -  $\beta$ -D-グルコピラノシル -  $\beta$ -D-グルコピラノシル ) エステルと確認した。

20

#### 【0224】

##### 実施例 22

この実施例では、Reb W の構造を NMR により分析した。

#### 【0225】

Reb W のキャラクタリゼーションのために使用する材料を Reb V の酵素変換を使用して生成させ、HPLC により精製した。HRMS データを LTQ Orbitrap Discovery HRMS 機器を用い、その分解能を 30 k に設定して生成させた。データを、ポジティブイオンエレクトロスプレーモードで、 $m/z$  150 ~ 1500 にて走査した。ニードル電圧を 4 kV に設定し ; 他の源条件は、シースガス = 25、補助ガス = 0、スweepガス = 5 ( 全てのガスは任意単位で流れる )、キャピラリー電圧 = 30 V、キャピラリー温度 = 300 °C、およびチューブレンズ電圧 = 75 とした。試料を 2 : 2 : 1 アセトニトリル : メタノール : 水 ( 注入溶離液と同じ ) で希釈し、50 マイクロリットルで射出させた。NMR スペクトルを Bruker Avance DRX 500 MHz または Varian INOVA 600 MHz 機器で標準パルスシーケンスを用いて獲得した。1D (  $^1H$  および  $^{13}C$  ) および 2D ( TOCSY、HMQC、および HMB C ) NMR スペクトルは、 $C_5D_5N$  において実施した。

30

#### 【0226】

Reb W の分子式を、そのポジティブ高分解能 ( HR ) 質量スペクトルに基づいて  $C_{50}H_{80}O_{28}$  と推定した。そのスペクトルは  $m/z$  1151 . 4708 で [ M + Na ]  $^+$  に対応する付加イオンを示し ; この組成は、 $^{13}C$  NMR スペクトルデータにより支持された。Reb W の  $^1H$  NMR スペクトルデータは、0 . 92 および 1 . 39 の 2 つのメチル - 重線、環外二重結合の 5 . 10 および 5 . 73 の一重線としての 2 つのオレフィン性プロトン、0 . 72 - 2 . 72 の間の 9 つの sp<sup>3</sup> メチレンおよび 2 つの sp<sup>3</sup> メチンプロトンの存在を示し、ステビア属から前に単離された エント - カウランジテルペノイドに特徴的であった。エント - カウランジテルペノイドの基本骨格は、TOCSY 研究により支持された。その研究は重要な相関を示した : H - 1 / H - 2 ; H - 2 / H - 3 ; H - 5 / H - 6 ; H - 6 / H - 7 ; H - 9 / H - 11 ; H - 11 / H - 12。

40

50

Reb Wの $^1\text{H}$  NMRスペクトルはまた、5.10、5.34、5.41、5.81、および6.14で共鳴する5つのアノマープロトンの存在を示し；その構造内の5つの糖単位が示唆された。5%  $\text{H}_2\text{SO}_4$ によるReb Wの酸加水分解によりD-グルコースが得られ、これは、TLCによる標準品との直接比較により同定された。Reb Wの酵素加水分解はアグリコンを提供し、これは、 $^1\text{H}$  NMRおよびco-TLCの標準化合物との比較によりステビオールとして同定された。5.10 (d、 $J = 7.4 \text{ Hz}$ )、5.34 (d、 $J = 7.9 \text{ Hz}$ )、5.41 (d、 $J = 7.9 \text{ Hz}$ )、5.89 (d、 $J = 7.9 \text{ Hz}$ )、および6.14 (d、 $J = 7.9 \text{ Hz}$ )のグルコース部分の5つのアノマープロトンについて観察された大きなカップリング定数はステビオール配糖体で報告されるそれらの $\beta$ -配向を示唆した[1-5、9-13]。Reb Wについての $^1\text{H}$  および $^{13}\text{C}$  NMR値を、TOCSY、HMQCおよびHMBCデータに基づいて割当て、表4に示す。

## 【表4】

表4. Reb WおよびReb Vに対する $^1\text{H}$ および $^{13}\text{C}$  NMRスペクトルデータ(化学シフトおよびカップリング定数)<sup>a~c</sup>

位置	Reb W		Reb V	
	$^1\text{H}$ NMR	$^{13}\text{C}$ NMR	$^1\text{H}$ NMR	$^{13}\text{C}$ NMR
1	0.72 m、1.67 m	41.0	0.78 m、1.69 m	41.1
2	1.42 m、2.18 m	20.4	1.44 m、2.20 m	20.4
3	1.06 m、2.72 d (13.4)	38.6	1.05 m、2.70 d (11.6)	38.4
4	---	44.8	---	44.8
5	1.34 m	57.9	1.32 m	57.9
6	1.84 m、2.18 m	22.8	1.87 m、2.24 m	22.7
7	1.07 m、1.69 m	42.3	1.07 m、1.72 m	42.2
8	---	42.4	---	42.5
9	0.90 d (5.8)	54.5	0.92 d (7.6)	54.5
10	---	40.1	---	40.2
11	1.66 m	21.0	1.75 m	21.0
12	2.20 m、2.39 m	38.3	2.26 m、2.38 m	38.3
13	---	87.8	---	87.6
14	1.63 m、2.06 m	44.8	1.78 m、2.50 m	44.8
15	2.06 m、2.04 m	48.8	2.06 m、2.32 m	48.9
16	---	153.5	---	153.7
17	5.10 s、5.73 s	105.9	5.00 s、5.49 s	105.7
18	1.39 s	29.4	1.32 s	29.6
19	---	176.5	---	176.4
20	0.92 s	16.6	1.25 s	16.7
1'	6.14 d (7.9)	94.1	6.16 d (7.6)	94.2
2'	3.98 m	79.6	4.01 m	80.7
3'	4.20 m	88.9	4.09 m	79.3
4'	4.34 m	70.0	4.34 m	71.2

10

20

30

40

5'	4.24 m	79.4	4.22 m	79.9
6'	4.02 m、4.39	62.6	4.04 m、4.44 dd (3.2、7.6)	62.6
1' '	5.10 d (7.4)	99.5	5.06 d (7.4)	99.6
2' '	3.90 m	74.7	3.92 m	74.7
3' '	4.04 m	89.3	4.06 m	89.3
4' '	4.25 m	70.4	4.23 m	70.3
5' '	3.98 m	78.6	4.02 m	78.2
6' '	4.27 m、4.54 m	62.9	4.27 m、4.56 dd (2.8、8.4)	63.0
1' ' '	5.34 d (7.9)	106.3	5.27 d (8.4)	106.4
2' ' '	4.12 m	76.1	4.14 m	76.1
3' ' '	4.33 m	79.2	4.37 m	79.2
4' ' '	4.25 m	72.1	4.28 m	72.2
5' ' '	3.88 m	78.8	3.89 m	78.8
6' ' '	4.16 m、4.53 m	63.0	4.18 m、4.48 m	63.2
1' ' ' '	5.41 d (7.9)	105.3	5.27 d (8.4)	105.7
2' ' ' '	4.12 m	73.4	4.14 m	76.5
3' ' ' '	4.28 m	88.9	4.37 m	79.6
4' ' ' '	4.20 m	72.1	4.28 m	72.5
5' ' ' '	3.78 m	79.0	3.89 m	79.0
6' ' ' '	4.08 m、4.42 m	62.9	4.18 m、4.48 m	63.5
1' ' ' ' '	5.81 d (7.9)	104.0		
2' ' ' ' '	4.09 m	77.2		
3' ' ' ' '	4.24 m	79.3		
4' ' ' ' '	4.14 m	72.0		
5' ' ' ' '	3.76 m	79.2		
6' ' ' ' '	4.04 m、4.36 m	62.3		

<sup>a</sup> TOCSY、HMQCおよびHMB C 相関に基づいて行った割当；<sup>b</sup> 化学シフト値は  $\delta$  (ppm) で表す；<sup>c</sup> カップリング定数は Hz で表す。

10

20

30

40

50

## 【0227】

Reb W の NMR スペクトルデータおよび加水分解実験からの結果に基づき、その構造内に、アグリコンステピオールに連結された5つの -D-グルコシル単位が存在すると結論づけた。Reb W の Reb V との <sup>1</sup>H および <sup>13</sup>C NMR 値の厳密な比較により、エーテル結合の形態の C-13 の 3-O- -D-グルコピオシル単位および、第5の -D-グルコシル部分が割り当てられる、エステル結合の形態の C-19 位の 2-O- -D-グルコピオシル単位を有するステピオールアグリコン部分の存在が示唆された (図19)。 -D-グルコシル部分の糖 I の 3-位での <sup>1</sup>H および <sup>13</sup>C 化学シフトの両方での低磁場シフトは、この位置での -D-グルコシル単位の存在を支持した。構造は、図20に示される重要な TOCSY および HMB C 相関によりさらに支持された。NMR および質量スペクトルデータならびに加水分解研究の結果に基づき、Reb V の酵素変換により生成された Reb W の構造を 13-[(3-O- -D-グルコピラノシル)-D-グルコピラノシル)オキシ]エント-カウル-16-エン-19-オイック酸-[(2-O- -D-グルコピラノシル-3-O- -D-グルコピラノシル)-D-グルコピラノシル)エステルと推定した。

## 【0228】

Reb W の酸加水分解。Reb W (5 mg) を含む MeOH (10 ml) の溶液に、3 ml の 5% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を添加し、混合物を24時間還流させた。反応混合物をその後、飽和炭酸ナトリウムで中和し、酢酸エチル (EtOAc) (2 × 25 ml) で抽出し、糖を含む水性画分およびアグリコン部分を含む EtOAc 画分を得た。水相を濃縮し、標準糖と TLC 系 EtOAc/n-ブタノール/水 (2:7:1) および CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/M



eOH/水(10:6:1)を用いて比較し;糖をD-グルコースと同定した。

【0229】

Reb Wの酵素加水分解。Reb W(1mg)を10mlの0.1M酢酸ナトリウム緩衝液、pH4.5に溶解し、クロコウジカビ由来の粗ペクチナーゼ(50 $\mu$ L、Sigma-Aldrich、P2736)を添加した。混合物を50 $^{\circ}$ Cで96時間攪拌した。生成物が反応中に沈殿し、これを濾過し、その後、結晶化させた。Reb Wの加水分解から得られた生成物を、そのco-TLCの標準化合物との比較および<sup>1</sup>H NMRスペクトルデータによりステピオールと同定した。Reb Wという名の化合物を、大規模1Dおよび2D NMRならびに高分解能質量スペクトルデータおよび加水分解研究に基づいて、13-[ (3-O- $\beta$ -D-グルコピラノシル)- $\beta$ -D-グルコピラノシル)オキシ]エント-カウル-16-エン-19-オイック酸-[ (2-O- $\beta$ -D-グルコピラノシル-3-O- $\beta$ -D-グルコピラノシル)- $\beta$ -D-グルコピラノシル)エステルと確認した。

10

【0230】

NMR分析後、Reb VおよびReb Wの構造を新規ステピオール配糖体として同定した。上記結果から、UGT76G1は1,3-13-O-グルコースグリコシル化活性だけでなく、1,3-19-O-グルコースグリコシル化活性を有することがさらに証明された。

【0231】

実施例23

この実施例では、Reb Mの構造をNMRにより分析した。

20

【0232】

Reb Mのキャラクタリゼーションのために使用する材料をReb Dの酵素変換から生成させ、HPLCにより精製した。HRMSデータをLTQ Orbitrap Discovery HRMS機器を用い、その分解能を30kに設定して生成させた。データを、ポジティブイオンエレクトロスプレーモードで、m/z150~1500にて走査した。ニードル電圧を4kVに設定し;他の源条件は、シースガス=25、補助ガス=0、スweepガス=5(全てのガスは任意単位で流れる)、キャピラリー電圧=30V、キャピラリー温度=300 $^{\circ}$ C、およびチューブレンズ電圧=75とした。試料を2:2:1アセトニトリル:メタノール:水(注入溶離液と同じ)で希釈し、50マイクロリットルで射出させた。

30

【0233】

NMRスペクトルをBruker Avance DRX500MHzまたはVarian INOVA600MHz機器で標準パルスシーケンスを用いて獲得した。1D(<sup>1</sup>Hおよび<sup>13</sup>C)および2D(COSY、HMQC、およびHMBC)NMRスペクトルは、C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>Nにおいて実施した。

【0234】

化合物Reb Mの分子式をそのポジティブ高分解能(HR)質量スペクトルに基づいて、C<sub>56</sub>H<sub>90</sub>O<sub>33</sub>と推定した。そのスペクトルは、m/z1349.5964で[M+NH<sub>4</sub>+CH<sub>3</sub>CN]<sup>+</sup>イオンを示し;この組成は、<sup>13</sup>C NMRスペクトルデータにより支持された。Reb Mの<sup>1</sup>H NMRスペクトルは、1.35および1.42の2つのメチル-重線、環外二重結合の4.92および5.65の一重線としての2つのオレフィン性プロトン、0.77-2.77の間の9つのメチレンおよび2つのメチンプロトンの存在を示し、ステビア属から前に単離されたエント-カウランジテルペノイドに特徴的であった。エント-カウランジテルペノイドの基本骨格は、COSY(H-1/H-2;H-2/H-3;H-5/H-6;H-6/H-7;H-9/H-11;H-11/H-12)およびHMBC(H-1/C-2、C-10;H-3/C-1、C-2、C-4、C-5、C-18、C-19;H-5/C-4、C-6、C-7、C-9、C-10、C-18、C-19、C-20;H-9/C-8、C-10、C-11、C-12、C-14、C-15;H-14/C-8、C-9、C-13、C-15、C-16

40

50

および H - 17 / C - 13、C - 15、C - 16) 相関により支持された。Reb M の  $^1\text{H}$  NMR スペクトルはまた、5.33、5.47、5.50、5.52、5.85、および 6.43 で共鳴するアノマープロトンの存在を示し；その構造内の 6 つの糖単位が示唆された。Reb M の酵素加水分解はアグリコンを提供し、これは、標準化合物との co-TLC の比較によりステピオールとして同定された。5%  $\text{H}_2\text{SO}_4$  による Reb M の酸加水分解はグルコースを提供し、これを、TLC による標準品との直接比較により同定した。Reb M における選択したプロトンおよび炭素についての  $^1\text{H}$  および  $^{13}\text{C}$  NMR 値を、TOCSY、HMQC および HMB C 相関に基づいて割り当てた (表 5)。

#### 【0235】

Reb M の NMR スペクトルデータからの結果に基づき、その構造内に 6 つのグルコシル単位が存在すると結論づけた (図 26)。Reb M のレバウジオシド D との  $^1\text{H}$  および  $^{13}\text{C}$  NMR スペクトルの厳密な比較により、Reb M もまたステピオール配糖体であることが示唆され、これは、C - 13 ヒドロキシルで、2, 3 - 分枝グルコトリオシル置換基として結合した 3 つのグルコース残基および、追加のグルコシル部分が割り当てられる、C - 19 のエステルの形態の 2 - 置換されたグルコピオシル部分を有する。図 27 で示される重要な TOCSY および HMB C 相関は、糖 I の C - 3 位での第 6 のグルコシル部分の配置を示唆した。5.33 (d、 $J = 8.4 \text{ Hz}$ )、5.47 (d、 $J = 7.8 \text{ Hz}$ )、5.50 (d、 $J = 7.4 \text{ Hz}$ )、5.52 (d、 $J = 7.4 \text{ Hz}$ )、5.85 (d、 $J = 7.4 \text{ Hz}$ ) および 6.43 (d、 $J = 7.8 \text{ Hz}$ ) のグルコース部分の 6 つのアノマープロトンについて観察された大きなカップリング定数は、ステピオール配糖体で報告されるそれらの  $\beta$  - 配向を示唆した。NMR および質量スペクトル研究の結果に基づき、文献から報告されたレバウジオシド M のスペクトル値と比較して、酵素反応により生成された Reb M の構造に、13 - [(2 - O -  $\beta$  - D - グルコピラノシル - 3 - O -  $\beta$  - D - グルコピラノシル -  $\beta$  - D - グルコピラノシル) オキシ] エント - カウル - 16 - エン - 19 - オイック酸 - [(2 - O -  $\beta$  - D - グルコピラノシル - 3 - O -  $\beta$  - D - グルコピラノシル -  $\beta$  - D - グルコピラノシル) エステル] を割り当てた。

#### 【表 5】

表 5. 酵素反応により生成された Reb M に対する  $^1\text{H}$  および  $^{13}\text{C}$  NMR スペクトルデータ (化学シフトおよびカップリング定数) <sup>a-c</sup>

位置	$^1\text{H}$ NMR	$^{13}\text{C}$ NMR
1	0.77 t (12.4)、1.78 m	40.7
2	1.35 m、2.24 m	20.0
3	1.01 m、2.32 m	38.8
4	---	44.7
5	1.08 d (12.4)	57.8
6	2.23 m、2.45 q (12.8)	23.9
7	1.44 m、1.83 m	43.0
8	---	41.6
9	0.93 d (7.4)	54.7
10	---	40.1
11	1.68 m、1.82 m	20.7
12	1.86 m、2.28 m	38.8

13	---	88.0
14	2.04 m、2.77 m	43.7
15	1.91 m、2.03 m	46.8
16	---	153.8
17	4.92 s、5.65 s	105.2
18	1.35 s	28.7
19	---	177.4
20	1.42 s	17.2
1'	6.43 d (7.8)	95.4
2'	4.54 m	77.3
3'	4.58 m	89.1
4'	4.22 m	70.5
5'	4.16 m	78.8
6'	4.18 m、4.35 m	62.1
1' '	5.50 d (7.4)	96.7
2' '	4.19 m	81.9
3' '	5.03 m	88.4
4' '	4.12 m	70.8
5' '	3.98 m	78.1
6' '	4.22 m、4.36 m	62.9
1' ' '	5.52 d (7.4)	105.4
2' ' '	4.24 m	76.0
3' ' '	4.16 m	78.9
4' ' '	4.02 m	73.6
5' ' '	3.78 ddd (2.8、6.4、9.4)	78.0
6' ' '	4.32 m、4.54 m	64.4
1' ' ' '	5.47 d (7.8)	104.4
2' ' ' '	4.00 m	75.9
3' ' ' '	4.40 m	78.2
4' ' ' '	4.12 m	71.6
5' ' ' '	3.96 m	78.4
6' ' ' '	4.20 m、4.32 m	62.5
1' ' ' ' '	5.85 d (7.4)	104.7
2' ' ' ' '	4.20 m	75.9
3' ' ' ' '	4.30 m	78.9
4' ' ' ' '	4.14 m	73.7
5' ' ' ' '	3.94 ddd (2.8、6.4、9.9)	78.3
6' ' ' ' '	4.32 m、4.67 d (10.6)	64.4
1' ' ' ' ' '	5.33 d (8.4)	104.6
2' ' ' ' ' '	3.98 m	76.2
3' ' ' ' ' '	4.43 m	78.5
4' ' ' ' ' '	4.16 m	71.7
5' ' ' ' ' '	3.88 ddd (2.1、6.4、9.4)	78.9
6' ' ' ' ' '	4.10 m、4.35 m	62.5

<sup>a</sup> TOCSY、HSQCおよびHMBC相関に基づいて行った割当；<sup>b</sup> 化学シフト値は $\delta$  (ppm) で表す；<sup>c</sup> カップリング定数はHzで表す。

### 【0236】

化合物1の酸加水分解：生成されたReb M (5mg)を含むMeOH (10ml)の溶液に、3mlの5% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を添加し、混合物を24時間還流させた。反応混合物をその後、飽和炭酸ナトリウムで中和し、酢酸エチル (EtOAc) (2×25ml)で抽出し、糖を含む水性画分およびアグリコン部分を含むEtOAc画分を得た。水相を濃縮し、標準糖とTLC系EtOAc/n-ブタノール/水 (2:7:1)およびCH<sub>2</sub>C

10

20

30

40

50

1<sub>2</sub> / MeOH / 水 ( 10 : 6 : 1 ) を用いて比較し ; 糖を D - グルコースと同定した。

【 0 2 3 7 】

化合物の酵素加水分解 : 生成された Reb M ( 1 mg ) を 10 ml の 0 . 1 M 酢酸ナトリウム緩衝液、pH 4 . 5 に溶解し、クロコウジカビ由来の粗ペクチナーゼ ( 50 μL、Sigma - Aldrich、P2736 ) を添加した。混合物を 50 で 96 時間攪拌した。1 の加水分解から反応中に沈殿した生成物を、その co - TLC の標準化合物との比較および <sup>1</sup>H NMR スペクトルデータによりステビオールと同定した。

【 0 2 3 8 】

レバウジオシド ( rebaudisode ) M ( Reb M ) という名の化合物を得、生物変換により生成させた。レバウジオシド M ( Reb M ) に対する完全な <sup>1</sup>H および <sup>13</sup>C NMR スペクトル割当てを、大規模 1D および 2D NMR ならびに高分解能質量スペクトルデータに基づいて実施し、これにより、13 - [ ( 2 - O - D - グルコピラノシル - 3 - O - D - グルコピラノシル - D - グルコピラノシル ) オキシ ] エント - カウル - 16 - エン - 19 - オイック酸 - [ ( 2 - O - D - グルコピラノシル - 3 - O - D - グルコピラノシル - D - グルコピラノシル ) エステルとしての構造が示唆された。

【 0 2 3 9 】

実施例 24

この実施例では、ステビオール配糖体の生合成経路を記載する。

【 0 2 4 0 】

図 21 はルブソシドからのステビオール配糖体生合成の新規経路を示すスキームである。本明細書に記載されるように、組換え HV1 ポリペプチド ( 「 HV1 」 ) は 1, 2 - O - グルコースグリコシル化活性を含み、これは、第 2 のグルコシド部分をルブソシドの 19 - O - グルコースの C - 2' に転移させレバウジオシド KA ( 「 Reb KA 」 ) を生成させ ; 組換え EUGT11 ポリペプチド ( 「 EUGT11 」 ) は 1, 2 - O - グルコースグリコシル化活性を含み、これは第 2 のグルコシド部分をルブソシドの 19 - O - グルコースの C - 2' に転移させ、レバウジオシド KA を生成させ ; あるいは第 2 のグルコース部分をルブソシドの 13 - O - グルコースの C - 2' に転移させ、ステビオシドを生成させ ; 組換え UGT76G1 酵素 ( 「 UGT76G1 」 ) は 1, 3 - O - グルコースグリコシル化活性を含み、これは第 2 のグルコース部分をルブソシドの 13 - O - グルコースの C - 3' に転移させ、レバウジオシド G ( 「 Reb G 」 ) を生成させる。HV1 および EUGT11 はどちらも、第 2 の糖部分を、レバウジオシド G の 19 - O - グルコースの C - 2' に転移させ、レバウジオシド V ( 「 Reb V 」 ) を生成させ、または第 2 のグルコース部分をレバウジオシド KA の 13 - O - グルコースの C - 2' に転移させ、レバウジオシド E ( 「 Reb E 」 ) を生成させる。図 21 はまた、組換え UGT76G1 酵素は、第 3 の糖部分をレバウジオシド V の C - 19 - O - グルコースの C - 3' に転移させレバウジオシド W ( 「 Reb W 」 ) を生成させる反応を触媒し、ならびに EUGT11 は、第 3 のグルコース部分をレバウジオシド E の C - 13 - O - グルコースの C - 6' に連続して転移させ、レバウジオシド D2 を生成させることができることを示す。HV1 は第 3 のグルコース部分をレバウジオシド E の C - 13 - O - グルコースの C - 2' に転移させ、レバウジオシド Z1 ( 「 Reb Z1 」 ) を生成させることができ、かつ、第 3 のグルコース部分をレバウジオシド E の C - 19 - O - グルコースの C - 2' に転移させ、レバウジオシド Z2 ( 「 Reb Z2 」 ) を生成させることができる。HV1 および EUGT11 はどちらも、ステビオシドの Reb E への変換およびレバウジオシド A ( 「 Reb A 」 ) のレバウジオシド D ( 「 Reb D 」 ) への変換を触媒することができる。UGT76G1 は、第 3 のグルコース部分をレバウジオシド E ( 「 Reb E 」 ) の C - 13 - O - グルコースの C - 3' に転移させ、レバウジオシド D ( 「 Reb D 」 ) を形成させることができる。UGT76G1 はまた、ステビオシドのレバウジオシド ( 「 Reb A 」 ) への変換およびレバウジオシド D ( 「 Reb D 」 ) のレバウジオシド M ( 「 Reb M 」 ) への変換を触媒する。

10

20

30

40

50

【0241】

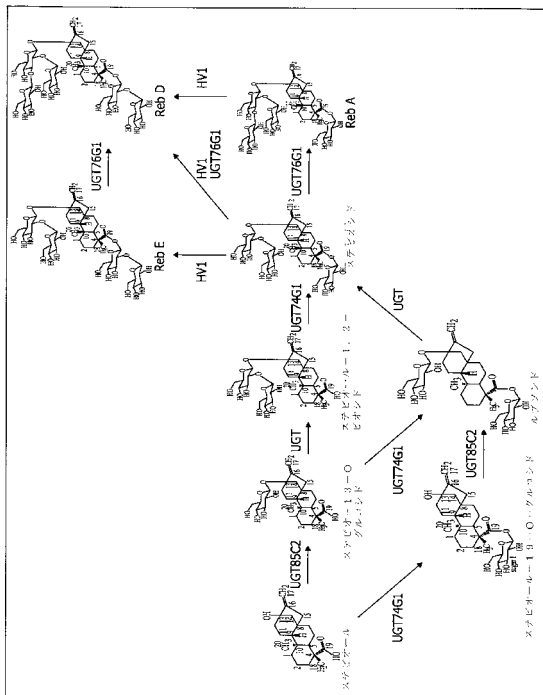
上記を考慮すると、本開示のいくつかの利点が達成され、他の有利な結果が得られることがわかるであろう。上記方法および系において本開示の範囲から逸脱せずに様々な変更が可能であるので、上記説明において含まれる、および添付の図面で示される全ての事項は、例示として解釈されるべきであり、制限する意味で解釈されるべきではないことが意図される。

【0242】

本開示または様々なバージョン、実施形態（複数可）またはその態様の要素を導入する場合、「1つの（a、an）」、「その（the）」および「前記」という冠詞は、1つ以上の要素が存在することを意味することが意図される。「含む」、「含有する」および「有する」という用語は包括的であることが意図され、列挙された要素以外の追加の要素が存在し得ることが意味される。

10

【図1】



【図2】

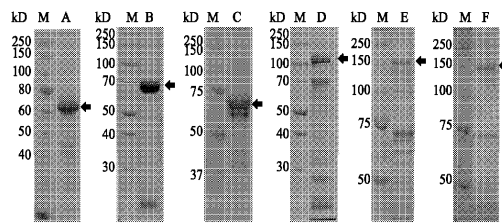
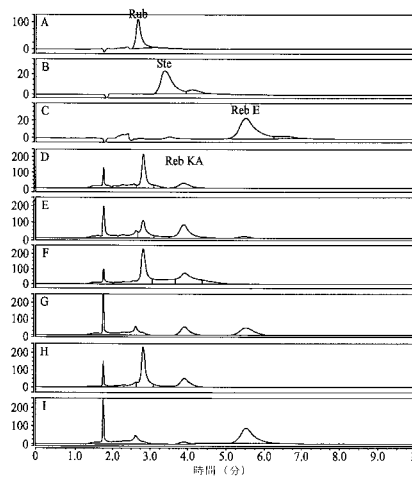
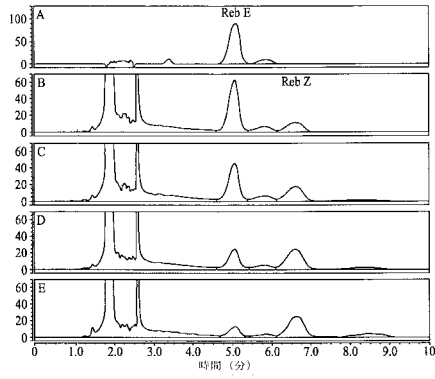


FIG. 2

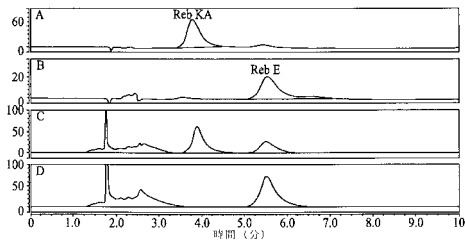
【図3】



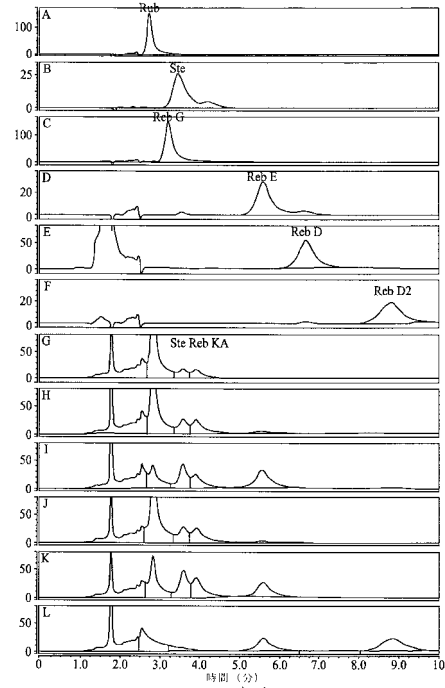
【 図 4 】



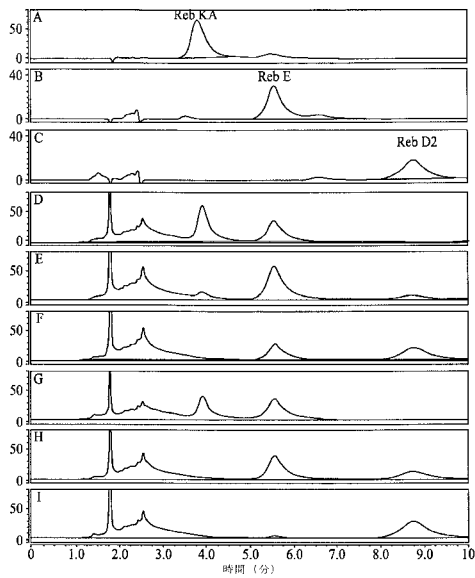
【 図 5 】



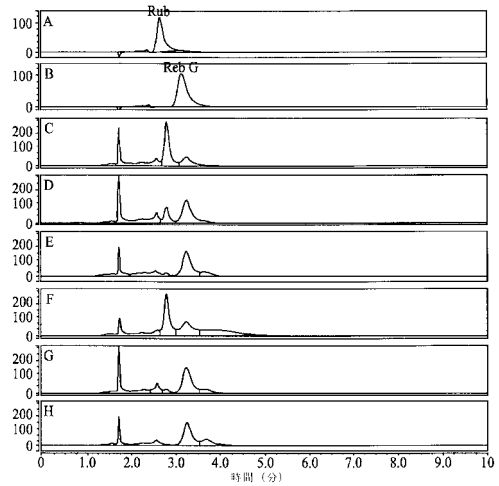
【 図 6 】



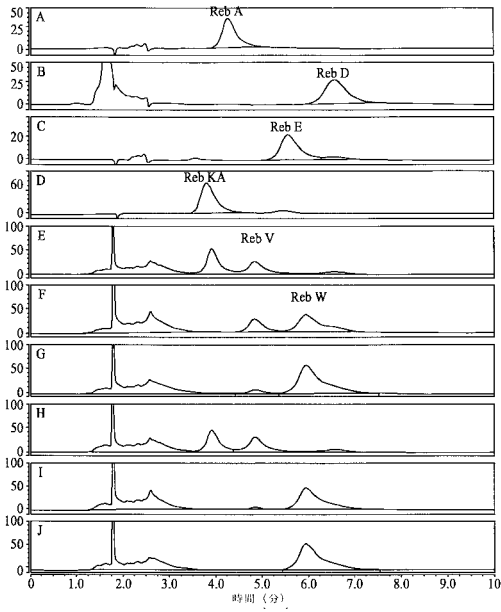
【 図 7 】



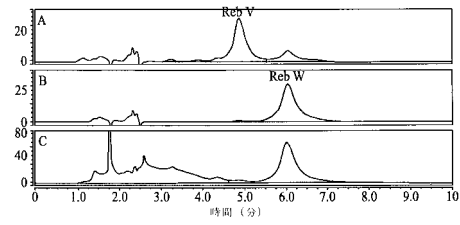
【 図 8 】



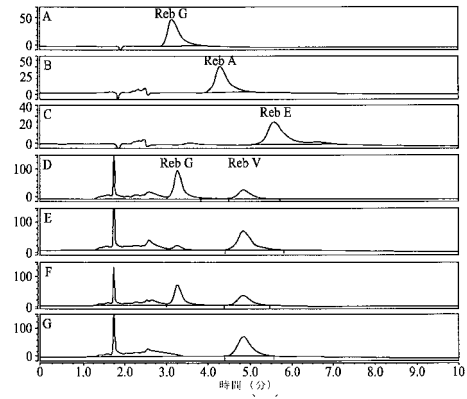
【 図 9 】



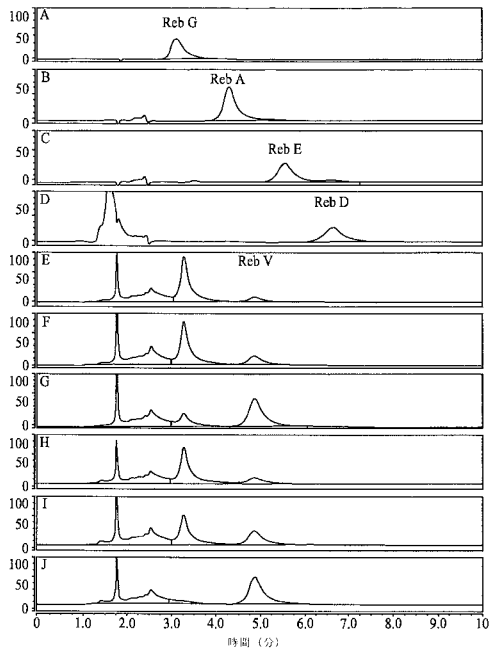
【 図 10 】



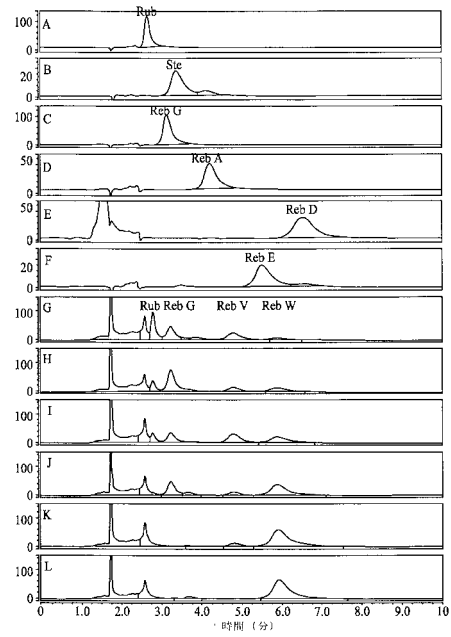
【 図 11 】



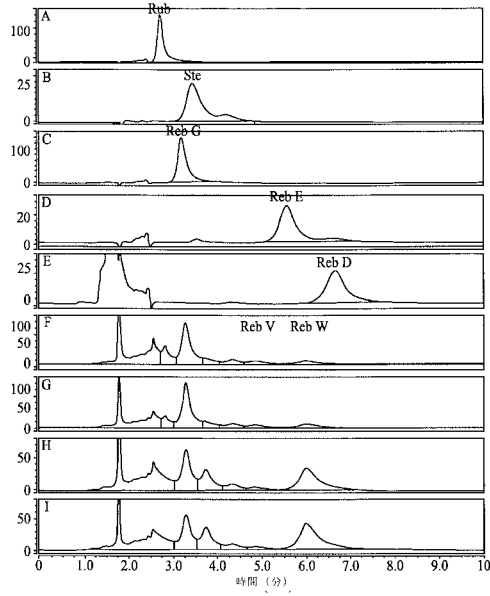
【 図 12 】



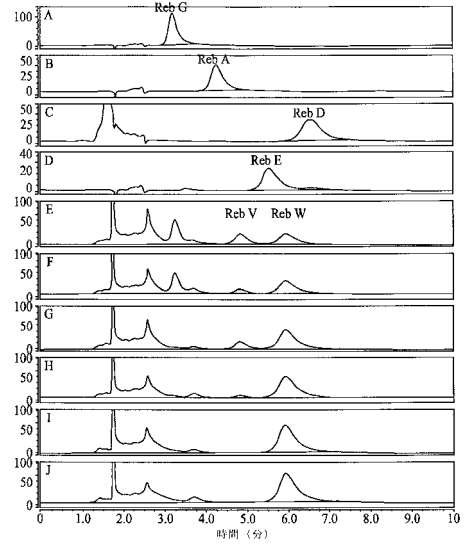
【 図 13 】



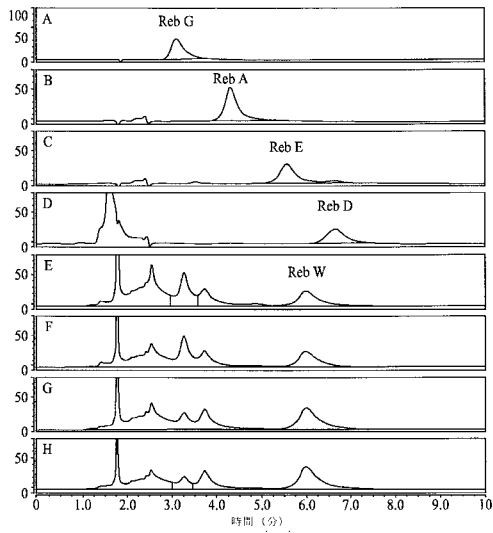
【 図 1 4 】



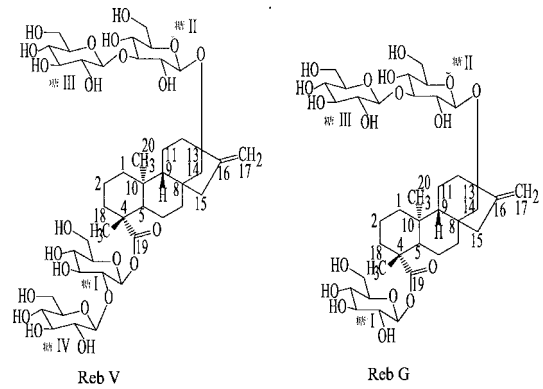
【 図 1 5 】



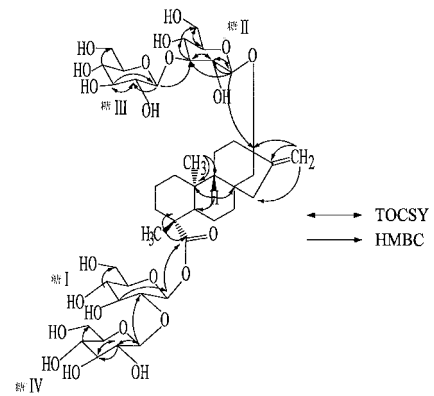
【 図 1 6 】



【 図 1 7 】

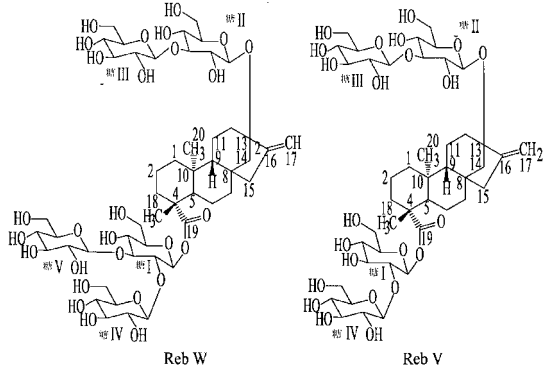


【 図 1 8 】

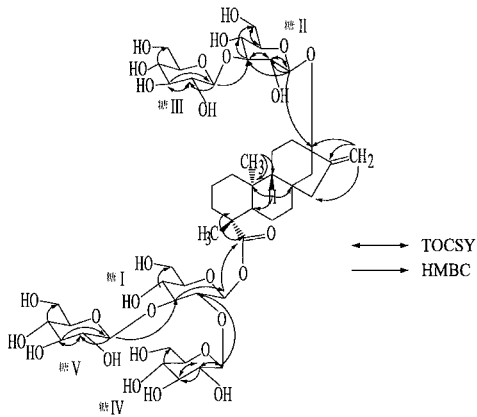




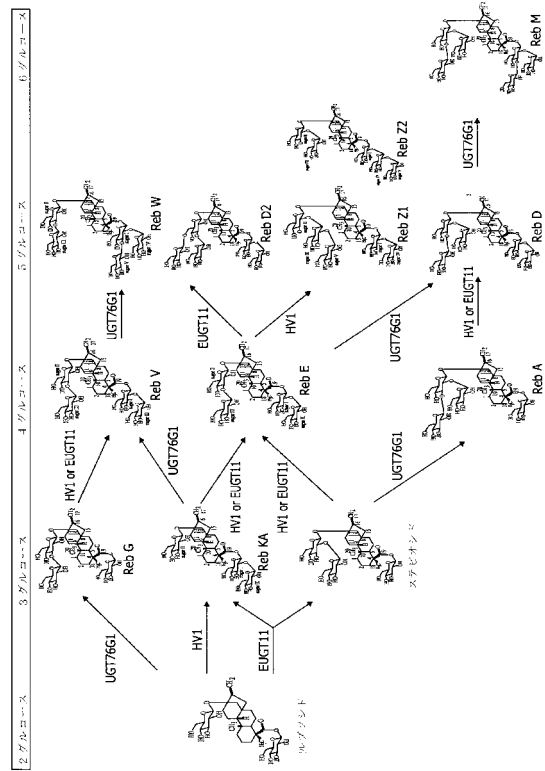
【 図 19 】



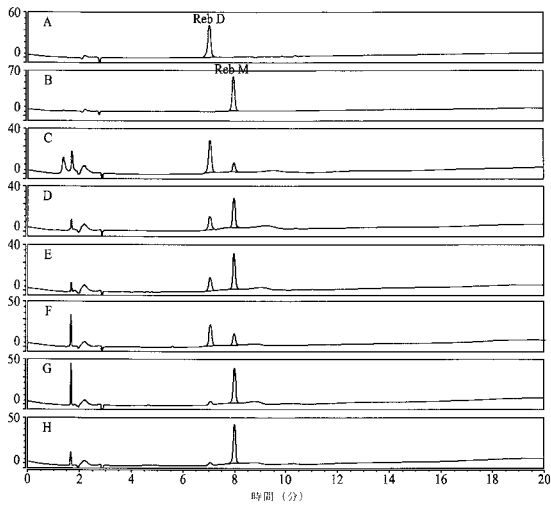
【 図 20 】



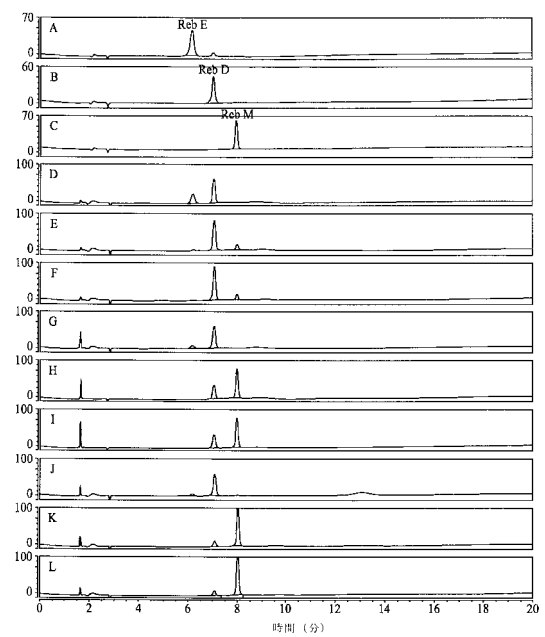
【 図 21 】



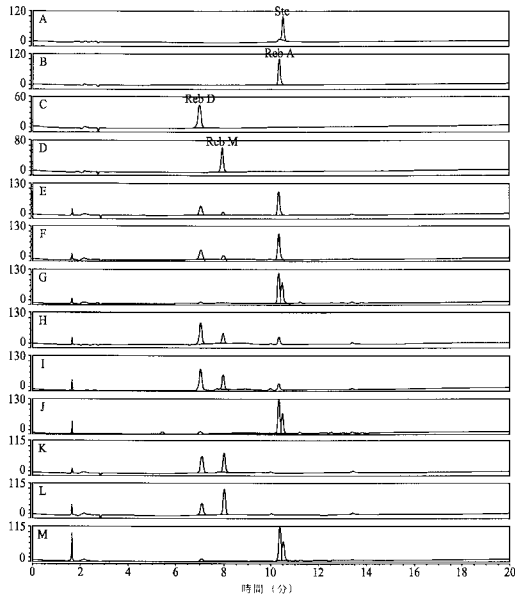
【 図 22 】



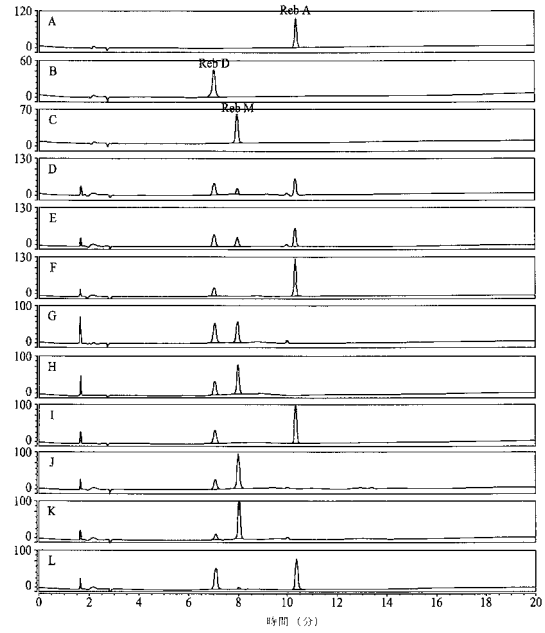
【 図 23 】



【 図 2 4 】



【 図 2 5 】



【 図 2 6 】

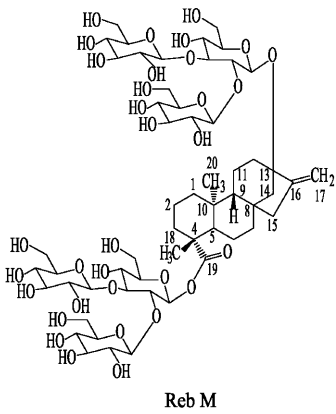
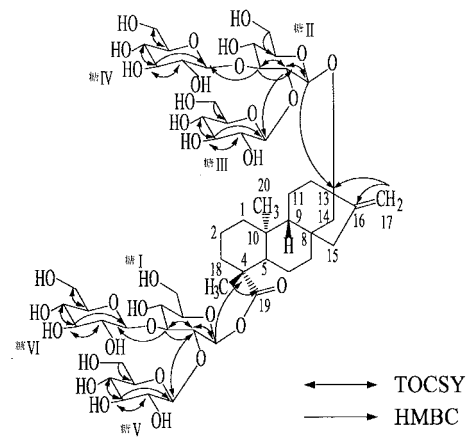


FIG. 26

【 図 2 7 】



←→ TOCSY  
→ HMBC

【手続補正書】

【提出日】平成29年6月20日(2017.6.20)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

2017529857000001.app

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 15/53767
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(8) - A23L 1/236; C12P 19/56; C07H 15/24 (2016.01) CPC - C12Y204/D1; A23L1/2366; A23L.1/236; C12P19/56; C07H15/24 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8) - A23L 1/236; C12P 19/56; C07H 15/24 (2016.01) CPC - C12Y204/D1; A23L1/2366; A23L.1/236; C12P19/56; C07H15/24 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC - 536/18.1; 435/76 (keyword limited; terms below) Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PatBase, Google Scholar, Search Terms: steviol glycosides, rubusoside, sucrose/UDP, UDP-glycosyltransferase, stevioside, rebaudioside KA, sucrose synthase		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2013/022989 A2 (EVOLVA SA) 14 February 2013 (14.02.2013) entire document, especially pg. 2, ln 19-22; pg 3, ln 17-28; pg 7, ln 15-16; pg 7, ln 21-23; pg 8, ln 1-4	1-11
Y	IBRAHIM et al. 'Minor Diterpene Glycosides from the Leaves of Stevia rebaudiana', J. Nat. Prod., 23 April 2014, Vol 77, pp 1231-1235; entire document, especially pg 1233, col 1, para 1	1-11
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* 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 20 January 2016		Date of mailing of the international search report <b>05 FEB 2016</b>
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/AUS 15/53767

Attachment to Box.No.III:

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1.

Group I: Claims 1-11, directed to methods for synthesizing rebaudioside KA from rubusoside.

Group II: Claims 12-18, directed to a method for synthesizing rebaudioside G from rubusoside.

Group III: Claims 19-46, directed methods for synthesizing rebaudioside M from rebaudioside D, rebaudioside E, stevioside or rebaudioside A.

The groups of inventions listed above do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Special Technical Features:

Group I includes the technical feature of synthesizing rebaudioside KA, not required by Groups II-III.

Group II includes the technical feature of synthesizing rebaudioside G, not required by Groups I and III.

Group III includes the technical feature of synthesizing rebaudioside M, not required by Groups I II.

Common technical features:

Groups I-III share the technical feature of a method for synthesizing a steviol glycoside by covalently coupling a glucose to another glycoside by the action of a UDP-glycosyltransferase enzyme, comprising: preparing a reaction mixture comprising a steviol glycoside, substrates selected from the group consisting of sucrose, uridine diphosphate (UDP) and uridine diphosphate-glucose (UDP-glucose), a UDP-glycosyltransferase and incubating the reaction mixture for a sufficient time..

Groups I and II further share the technical feature of incubating a reaction mixture comprising rubusoside.

These shared technical features, however, do not provide a contribution over the prior art, as being obvious over WO 2013/022989 A2 to Houghton-Larsen et al. published on 14 February 2013 (hereinafter 'Houghton-larsen') which discloses a method for synthesizing a mixture stevioside and a rebaudioside from rubusoside (pg 2, In 25-26 - stevioside and rebaudioside A are the primary compounds in commercially-produced stevia extracts.), the method comprising: preparing a reaction mixture comprising rubusoside (pg 7, In 15-16 - The steviol glycoside can be rubusoside, wherein the second sugar moiety is glucose, and stevioside is produced upon transfer of the second glucose moiety.), substrates selected from the group consisting of sucrose, uridine diphosphate (UDP) and uridine diphosphate-glucose 5 (UDP-glucose), a UDP-glycosyltransferase selected from the group consisting of EUGT 11 and a UDP-glycosyltransferase fusion enzyme (pg. 2, In 19-22 - EUGT11, a uridine 5'-diphospho (UDP) glycosyl transferase described herein, can be used alone or in combination with one or more other UDP glycosyl transferases such as UGT74G1, UGT76G1, UGT85C2, and UGT91D2e, to allow the production and accumulation of rebaudioside D in recombinant hosts or using in vitro systems.); and incubating the reaction mixture for a sufficient time to produce a mixture of stevioside and a rebaudioside, wherein a glucose is covalently coupled to C2' - 19-O-glucose of rubusoside to produce rebaudioside, and a glucose is covalently coupled to C2'-13-O-glucose of rubusoside to produce stevioside (pg 3, In 17-28 - a recombinant host that includes a recombinant gene encoding a polypeptide having the ability to transfer a second sugar moiety to the C-2' of a 19-O-glucose of rubusoside. This document also features a recombinant host that includes a recombinant gene encoding a polypeptide having the ability to transfer a second sugar moiety to the C-2' of a 19-O-glucose of stevioside....a recombinant host that includes a recombinant gene encoding a polypeptide having the ability to transfer a second sugar moiety to the C-2' of a 19-O-glucose of rebaudioside A to produce rebaudioside D). Although Houghton-Larsen does not disclose a specific example for producing a rebaudioside from rubusoside, based on the teachings of Houghton-Larsen, it would have been obvious to one of ordinary skill in the art to have designed, through routine experimentation, such a method for producing the desired rebaudioside for commercial use.

As said method was known in the art at the time of the invention, this cannot be considered a special technical feature, that would otherwise unify the inventions of Groups I-III.

The inventions of Groups I-III, therefore, lack unity under PCT Rule 13.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 15/53767

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:  
--Please see attached sheet--

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:  
1-11

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

## フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(72)発明者 マオ, グオホン

アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 01803, バーリントン, 503 ファームズ ドライブ

(72)発明者 ユー, シアオダン

アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 02421, レキシントン, 6231 レキシントン リッジ ドライブ

Fターム(参考) 4B050 CC03 DD13 KK07 LL02

4B064 AF01 AF41 CA19 CA21 CB28 CC24 CD09 DA10

4H045 AA20 AA30 BA10 CA30 DA89 EA01 FA74