

(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2009-534017

(P2009-534017A)

(43) 公表日 平成21年9月24日 (2009.9.24)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B 0 2 4
C 0 7 K 14/705 (2006.01)	C 0 7 K 14/705 Z N A	4 B 0 6 3
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	4 B 0 6 4
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 B 0 6 5
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 H 0 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 41 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2009-505697 (P2009-505697)
 (86) (22) 出願日 平成19年4月19日 (2007.4.19)
 (85) 翻訳文提出日 平成20年12月17日 (2008.12.17)
 (86) 国際出願番号 PCT/CH2007/000186
 (87) 国際公開番号 W02007/121600
 (87) 国際公開日 平成19年11月1日 (2007.11.1)
 (31) 優先権主張番号 60/793, 521
 (32) 優先日 平成18年4月20日 (2006.4.20)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 501105842
 ジボダン エス エー
 スイス国 1 2 1 4 ヴェルニエ、 シュ
 マン ド ラ パルフュムリー 5 番
 (74) 代理人 100102842
 弁理士 葛和 清司
 (74) 代理人 100135943
 弁理士 三橋 規樹
 (72) 発明者 スラック、ジェイ、パトリック
 アメリカ合衆国 オハイオ州 オーエイチ
 4 5 1 4 O、ラブランド、ストーンブリッ
 ジ ドライブ 9 9 2 5
 Fターム (参考) 4B024 AA01 AA05 BA63 BA80 CA01
 DA01 DA02 DA05 DA11 EA04
 GA11 HA08

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 核酸、ポリペプチドおよびその利用

(57) 【要約】

新規な甘味受容体タンパク質、対応する核酸配列、発現ベクター、トランスフェクトされた宿主細胞、および上記物質を利用する甘味応答のリガンドを含む調節剤のためのスクリーニング方法が提供される。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ペリラルチンと結合でき、ペリラルチンにより活性化され得る T 1 R 2 - T M D 甘味受容体であって、1または2以上の

配列番号 2 と実質的に相同なポリペプチド、

配列同一性によって決定される、配列番号 1 に記載のヌクレオチド配列と実質的に相同なヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチド、

ハイブリダイゼーションによって決定される、配列番号 2 に記載のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列と実質的に相同なヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチド、

ヌクレオチド配列同一性によって決定される、配列番号 2 に記載のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列に実質的に相同なヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチド、

を含み、

ここで、実質的に相同なポリペプチドは少なくとも 7 4 % の配列同一性を有し、

配列同一性によって決定される実質的に相同なヌクレオチドは、少なくとも 6 5 % の配列同一性を有し、および

ハイブリダイゼーションによって決定される実質的に相同なヌクレオチドは、5 0 % のホルムアミド、5 × S S C、および 1 % の S D S からなる溶液中での 4 2 ° の温度、ならびに 0 . 2 × S S C および 0 . 1 % の S D S からなる溶液中での 6 5 ° での洗浄のストリン

ジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズし、

ただし、T 1 R 2 - T M D 受容体は 1 または 2 以上の

配列番号 1 0 または配列番号 1 2 と相同なポリペプチド、

配列同一性によって決定される、配列番号 9 または配列番号 1 1 に記載のヌクレオチド配列と相同なヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチド、

ハイブリダイゼーションによって決定される、配列番号 1 0 または配列番号 1 2 に記載のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列と相同なヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチド、

ヌクレオチド配列同一性によって決定される、配列番号 1 0 または配列番号 1 2 に記載のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列と相同なヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチド、

を含まず、

ここで、配列番号 1 0 または配列番号 1 2 と相同なポリペプチドは少なくとも 6 0 % の配列同一性を有し、

配列同一性によって決定される、配列番号 9 または配列番号 1 1 に記載のヌクレオチド配列に相同なヌクレオチド配列は、少なくとも 5 0 % の配列同一性を有し、

ハイブリダイゼーションによって決定される、配列番号 9 または配列番号 1 1 に記載のヌクレオチド配列に相同なヌクレオチド配列は、5 0 % のホルムアミド、5 × S S C、および 1 % の S D S からなる溶液中での 4 2 ° の温度、ならびに 0 . 2 × S S C および 0 . 1 % の S D S からなる溶液中で 4 2 ° での洗浄の中程度にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズする、

前記甘味受容体。

【請求項 2】

ペリラルチンと結合でき、ペリラルチンにより活性化され得る T 1 R 2 - T M D 甘味受容体をコードする核酸であって、1または2以上の

配列同一性によって決定される、配列番号 1 に記載のヌクレオチド配列と実質的に相同な核酸、

ハイブリダイゼーションによって決定される、配列番号 1 に記載のヌクレオチド配列と実質的に相同な核酸、

請求項 1 で定義された T 1 R 2 - T M D 甘味受容体をコードするヌクレオチド配列と実質

10

20

30

40

50

的に相同な核酸、
を含み、

ここで、配列同一性によって決定される実質的に相同なヌクレオチドは、少なくとも 65 %の配列同一性を有し、

ハイブリダイゼーションによって決定される実質的に相同なヌクレオチドは、50%のホルムアミド、5×SSC、および1%のSDSからなる溶液中での42℃の温度、ならびに0.2×SSCおよび0.1%のSDSからなる溶液中での65℃での洗浄のストリンジেন্টなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズし、

ただし、前記核酸は、1または2以上の

配列同一性によって決定される、配列番号9または配列番号11に記載のヌクレオチド配列と相同な核酸、

ハイブリダイゼーションによって決定される、配列番号9または配列番号11に記載のヌクレオチド配列と相同な核酸、

配列番号10または配列番号12に記載のポリペプチドと相同なポリペプチドをコードするヌクレオチド配列と相同な核酸、

を含まず、

ここで、配列同一性によって決定される実質的に相同なヌクレオチドは、少なくとも50 %の配列同一性を有し、および

ハイブリダイゼーションによって決定される実質的に相同なヌクレオチドは、50%のホルムアミド、5×SSC、および1%のSDSからなる溶液中での42℃の温度、ならびに0.2×SSCおよび0.1%のSDSからなる溶液中での42℃での洗浄の中程度にストリンジেন্টなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズする、

前記核酸。

【請求項3】

配列番号2と実質的に相同なポリペプチド、

配列同一性によって決定される、配列番号1に記載のヌクレオチド配列と実質的に相同なヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチド、

ハイブリダイゼーションによって決定される、配列番号2に記載のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列と実質的に相同なヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチド、

ヌクレオチド配列同一性によって決定される、配列番号2に記載のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列に実質的に相同なヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチド、

からなる群より選択され、

実質的に相同なポリペプチドは少なくとも74%の配列同一性を有し、

配列同一性によって決定される実質的に相同なヌクレオチドは、少なくとも65%の配列同一性を有し、および

ハイブリダイゼーションによって決定される実質的に相同なヌクレオチドは、50%のホルムアミド、5×SSC、および1%のSDSからなる溶液中での42℃の温度、ならびに0.2×SSCおよび0.1%のSDSからなる溶液中での65℃での洗浄のストリンジেন্টなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズする、

T1R2-TMD甘味受容体。

【請求項4】

配列同一性によって決定される、配列番号1に記載のヌクレオチド配列と実質的に相同な核酸、

ハイブリダイゼーションによって決定される、配列番号1に記載のヌクレオチド配列と実質的に相同な核酸、

請求項3で定義されたT1R2-TMD甘味受容体をコードするヌクレオチド配列と実質的に相同な核酸、

からなる群より選択される核酸であって

10

20

30

40

50

配列同一性によって決定される実質的に相同なヌクレオチドは、少なくとも 65 % の配列同一性を有し、

ハイブリダイゼーションによって決定される実質的に相同なヌクレオチドは、50 % のホルムアミド、5 × SSC、および 1 % の SDS からなる溶液中での 42 °C の温度、ならびに 0.2 × SSC および 0.1 % の SDS からなる溶液中での 65 °C での洗浄のストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズする、

前記核酸。

【請求項 5】

請求項 4 で定義された核酸を含む発現ベクター。

【請求項 6】

請求項 5 で定義された発現ベクターでトランスフェクトされたが T1R3 を含有しない宿主細胞。

【請求項 7】

請求項 3 で定義された T1R2 - TMD 甘味受容体および G タンパク質を安定的に発現する、請求項 6 で定義された宿主細胞。

【請求項 8】

請求項 3 で定義された T1R2 - TMD 甘味受容体および G タンパク質を一過性に発現する、請求項 6 で定義された宿主細胞。

【請求項 9】

請求項 1 で定義された T1R2 - TMD 甘味受容体を産生する方法であって、発現に十分な条件下で T1R2 - TMD 甘味受容体をコードする発現ベクターをその中に含有する宿主細胞を培養し、それによって T1R2 - TMD 甘味受容体を形成し、任意に細胞からそれを回収する工程を含む、前記方法。

【請求項 10】

請求項 3 で定義された T1R2 - TMD 甘味受容体を産生する方法であって、発現に十分な条件下で T1R2 - TMD 甘味受容体をコードする発現ベクターをその中に含有する宿主細胞を培養し、それによって T1R2 - TMD 甘味受容体を形成し、任意に細胞からそれを回収する工程を含む、前記方法。

【請求項 11】

味覚細胞において甘味シグナリングを調節する剤を同定する方法であって、
(i) 甘味刺激に応答する T1R2 - TMD 甘味受容体を発現する細胞を、任意に他の剤の存在下で、剤と接触させること、および

(ii) 前記細胞中の少なくとも 1 つの機能的応答によって、少なくとも 1 つの剤が、前記細胞中の前記 T1R2 - TMD 甘味受容体の機能的活性に影響するかを同定すること、を含み、

ここで、前記 T1R2 - TMD 甘味受容体が、配列番号 2 と実質的に相同なポリペプチド、配列同一性によって決定される、配列番号 1 と実質的に相同なヌクレオチドによってコードされるポリペプチド、およびハイブリダイゼーションによって決定される、配列番号 1 と実質的に相同なヌクレオチドによってコードされるポリペプチドからなる群より選択され、

実質的に相同なポリペプチドは少なくとも 74 % の配列同一性を有し、

配列同一性によって決定される実質的に相同なヌクレオチドは、少なくとも 65 % の配列同一性を有し、

ハイブリダイゼーションによって決定される実質的に相同なヌクレオチドは、50 % のホルムアミド、5 × SSC、および 1 % の SDS からなる溶液中での 42 °C の温度、ならびに 0.2 × SSC および 0.1 % の SDS からなる溶液中での 65 °C での洗浄のストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズし、

T1R2 甘味受容体発現細胞は T1R3 受容体を発現しない、前記方法。

【請求項 12】

細胞が、G タンパク質もまた発現する、請求項 11 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 13】

Gタンパク質が、Gαq - ガストデューシンに基づくキメラGタンパク質である、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

Gタンパク質が、キメラGタンパク質であるGアルファ16 - ガストデューシン44である、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 15】

(ii) が、細胞内メッセンジャーにおける変化または細胞内メッセンジャーに起因する変化の計測によって行われる、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 16】

機能的応答が、IP₃ およびカルシウム²⁺ から選択される細胞内メッセンジャーの変化を計測することによって決定される、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 17】

細胞が、細菌細胞、真核細胞、酵母細胞、昆虫細胞、哺乳類細胞、両生類細胞、およびぜん虫細胞からなる群より選択される、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 18】

細胞が、哺乳類細胞である、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

細胞が、CHO、COS、HeLa および HEK - 293 からなる群より選択される哺乳類細胞である、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 20】

(i) が、T1R2 甘味受容体を甘味物質の存在下で試験剤と接触させることをさらに含む、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 21】

甘味物質が、ペリラルチンおよびメチルカピコール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】

(i) T1R2 - TMD 甘味受容体、または実質的に類似するそのホモログを発現するが、T1R3 受容体は発現しない組換え細胞、および

(ii) T1R2 - TMD 甘味受容体のアゴニスト、
を、試験剤を T1R2 - TMD の調節剤として同定するために組み合わせて利用するために含むキット。

【請求項 23】

請求項 22 に記載のキットを使用する方法であって、

(i) 固体支持体上で組換え細胞を成長させること、

(ii) 定義されたプレートまたはウェルの培養培地へ、アゴニストの存在下、適切な濃度で試験剤を添加すること、および

(iii) 試験剤の存在下および非存在下での応答を比較することにより、細胞の機能的応答の変化を決定し、それにより、試験剤が T1R2 甘味受容体またはその実質的に類似するホモログの調節物質であることを同定すること

を含む、前記方法。

【請求項 24】

約 1 nM ~ 100 mM またはそれ以上の量の試験剤を、適切な濃度のアゴニストの存在下で、定義されたプレートまたはウェルの培養培地に添加することを含む、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 25】

T1R2 - TMD を調節する剤の同定方法であって、

(i) T1R2 - TMD へのリガンドの結合に応答して変化するパラメータ計測すること、

(ii) 任意にリガンドの存在下で、ネガティブコントロールとの比較で試験剤に応答し

10

20

30

40

50

たパラメータの変化を決定し、それにより調節剤またはリガンドを同定すること、を含む、前記方法。

【請求項 26】

リガンドが、ペリラルチンおよびメチルカピコールからなる群より選択される、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 27】

(i) が、蛍光分光法、NMR 分光法、1 または 2 以上の吸収、屈折率の計測、流体力学法、クロマトグラフィ、溶解度計測、生物化学的方法からなる群より選択される方法で行われ、これらの方法は、溶液、二重膜、固相への連結、単脂質膜中、膜上への結合、および小胞内からなる群より選択される適切な環境において T1R2 - TMD ポリペプチドの特性を計測する、請求項 25 または 26 に記載の方法。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本願は 35 U.S.C. § 111(b) による特許仮出願である。

本発明は新規な甘味受容体タンパク質に基づくアッセイ、前記甘味受容体タンパク質を形成する核酸構築物を含む異種発現システム、およびスクリーニングにおける甘味受容体タンパク質の利用に関する。

【背景技術】

【0002】

新規な甘味受容体タンパク質のアッセイは、ヒトにおいて味覚応答を調整することができる剤（甘味調節剤）を同定するのに利用され得、したがってある食べ物をより口当たりのよいものとし、または経口薬剤および栄養補助食品に対する患者コンプライアンスを増大させる。かかる甘味調節剤はヒトにおいて味覚応答を誘発する甘味料を含む。

20

【0003】

甘味の感知は受容体、味覚受容体細胞に特異的に発現し、甘味受容体ダイマー複合体（T1R2 / T1R3 ヘテロダイマー）を形成する、2 つのサブユニット T1R2 および T1R3 を含む受容体によって媒介されることが知られている。双方のサブユニットはともに、「G タンパク質共役受容体」または GPCR と呼ばれるファミリー、特にクラス C GPCR に属する。

30

【0004】

他のほとんどの GPCR のように、クラス C 受容体は 7 本ヘリックス膜貫通ドメイン（TMD）を有する。しかしながら他のタイプの GPCR とは異なり、クラス C GPCR は 2 つの部分：リガンド結合に関連する「ピーナスフライトラップモジュール」（VFTM）と、高度に保存された 9 つのシステインを含有し、VFTM を TMD に連結しているシステインリッチドメイン（CRD）、からなる大きな細胞外ドメインも有する。様々な長さの細胞内 C 末端によってクラス C 受容体が完成する。

【0005】

甘味受容体応答の活性化には甘味受容体ダイマー複合体の両サブユニットが必要であると考えられており、これまでのところ、全ての試験された甘味料は T1R2 / T1R3 ヘテロダイマーを活性化する。T1R2 / T1R3 ヘテロダイマーが、天然の糖（スクロース、フルクトース、グルコース、マルトース）、甘味アミノ酸（D-トリプトファン）、および人工甘味料（アセスルファム-K、アスパルテム、サイクラミン酸塩、サッカリン、スクラロース）から、甘味タンパク質（モネリン、ソーマチン、ブラゼイン）に至る範囲の、広範囲の化学的に異なった甘味料に応答するにもかかわらず、ヒト甘味受容体の分離したサブユニット（T1R2 ホモマーまたは T1R3 ホモマー）による公知の試験は、何らの活性も示さなかった（例えば Li et al., 2002, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99(7), 4692~6 など参照）。

40

【0006】

キメラ T1R 受容体および部位特異的変異導入の研究は、甘味化合物サイクラミン酸塩

50

が T 1 R 3 の T M D に結合し、したがってヘテロダイマー T 1 R 2 / T 1 R 3 受容体複合体を活性化することを示している。反対に、甘味タンパク質ブラゼインは T 1 R 3 のシステインリッチドメインに結合し、したがってヘテロダイマー T 1 R 2 / T 1 R 3 受容体複合体を活性化することが報告されている。

【 0 0 0 7 】

T 1 R 2 ホモマー結合アッセイは、U S 2 0 0 5 0 0 3 2 1 5 8 に記載されている。結合アッセイは、機能的受容体活性化ではなく結合のみを示し、エンドポイントに基づくものであり、反応速度測定を含むより迅速な機能アッセイと比較すると時間がかかる。U S 2 0 0 5 0 0 3 2 1 5 8 はさらに、知られた機能的受容体 T 1 R 1 / T 1 R 3 および T 1 R 2 / T 1 R 3 に適した、T 1 R の細胞ベースのアッセイを含む、機能アッセイについても記載している。

10

【 0 0 0 8 】

今まで、1つの T A S 1 R モノマーの T M D は甘味化合物と結合し得るだけでなく他の必須のモノマーパートナーの不在で G タンパク質を活性化することは知られていなかっただけでなく、両サブユニットの存在がシグナル伝達に不可欠であることもまた信じられていた。

本発明者らは、T 1 R 2 / T 1 R 3 ヘテロダイマー受容体複合体の T 1 R 2 ホモマーの重度に切断された配列に相当する新規な受容体タンパク質が、驚くべきことに、甘味リガンドと結合する機能的甘味受容体を形成し、G タンパク質を活性化することができることを見出した。

20

【 0 0 0 9 】

本明細書で以下に使用されている、T 1 R 2 「ホモマー」または「ホモマーの」ポリペプチド、タンパク質、または受容体という用語は、ヘテロダイマー T 1 R 2 / T 1 R 3 受容体複合体ではなく、T 1 R 2 ポリペプチドまたはタンパク質のモノマーモノマー、ダイマーまたはオリゴマーを包含することを意味する。

【 0 0 1 0 】

この新規な受容体タンパク質 T 1 R 2 - T M D は全長 T 1 R 2 ホモマーに比べて異なるアゴニスト範囲を有することがわかった。後者は驚くべきことにリガンドと結合できるだけでなく、下流シグナリングの活性化もできることがわかった。

【 0 0 1 1 】

30

本明細書で提供される方法によれば、T 1 R 2 - T M D および G タンパク質の両方を発現するが T 1 R 3 は発現しない細胞を、任意に知られたまたは新たに決定された甘味物質と組み合わせた試験剤と、前記剤の甘味調節剤としての特性を決定するために、接触させる。本明細書で提供されるアッセイは、したがって、甘味料または(甘味料、T 1 R 2、または下流イベントの)甘味応答の調節剤である試験剤を同定するために利用することができる。

【 0 0 1 2 】

受容体および G タンパク質における剤の機能的な効果は、例えば細胞内 I P ₃ および C a ²⁺ などの伝達経路のパラメータの変化を計測するアッセイなど、適した機能的アッセイによって、または G T P S を標識するなどの当業者に知られた技術に従った他の G タンパク質特異的アッセイによって決定される。

40

代替的に、結合アッセイは、T 1 R 2 - T M D と結合するリガンドの決定に利用してもよい。

【 0 0 1 3 】

本明細書に記載されているクローニング、リガンド - 受容体ペアの解明、および甘味応答の調節剤の検索に関する様々な側面および態様の実践において、分子生物学、微生物学および組換え技術および甘味試験における慣習的な技術が利用される。これらには、T 1 R 2 - T M D を含む G タンパク質共役受容体 (G P C R) に適した様々な知られた方法を含む。したがって、当業者にはかかる技術が十分に知らされており、それゆえ以下では本発明の状況をより十分に記載するために、かかる技術はごく簡略化して論じる。

50

【発明の開示】

【0014】

概略

最初の側面において、ペリラルチンと結合でき、ペリラルチンにより活性化され得る T 1 R 2 - T M D 甘味受容体であって、1または2以上の

配列番号2と実質的に相同なポリペプチド、

配列同一性によって決定される、配列番号1に記載のヌクレオチド配列と実質的に相同なヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチド、

ハイブリダイゼーションによって決定される、配列番号2に記載のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列と実質的に相同なヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチド、

ヌクレオチド配列同一性によって決定される、配列番号2に記載のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列に実質的に相同なヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチド、

を含み、

【0015】

ここで、実質的に相同なポリペプチドは少なくとも74%の配列同一性を有し、

配列同一性によって決定される実質的に相同なヌクレオチドは、少なくとも65%の配列同一性を有し、および

ハイブリダイゼーションによって決定される実質的に相同なヌクレオチドは、50%のホルムアミド、5×SSC、および1%のSDSからなる溶液中での42℃の温度、ならびに0.2×SSCおよび0.1%のSDSからなる溶液中での65℃での洗浄のストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズし、

【0016】

ただし、T 1 R 2 - T M D 受容体は1または2以上の

配列番号10または配列番号12と相同なポリペプチド、

配列同一性によって決定される、配列番号9または配列番号11に記載のヌクレオチド配列と相同なヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチド、

ハイブリダイゼーションによって決定される、配列番号10または配列番号12に記載のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列と相同なヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチド、

ヌクレオチド配列同一性によって決定される、配列番号10または配列番号12に記載のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列と相同なヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチド、

を含まず、

【0017】

ここで、配列番号10または配列番号12と相同なポリペプチドは少なくとも60%の配列同一性を有し、

配列同一性によって決定される、配列番号9または配列番号11に記載のヌクレオチド配列に相同なヌクレオチド配列は、少なくとも50%の配列同一性を有し、

ハイブリダイゼーションによって決定される、配列番号9または配列番号11に記載のヌクレオチド配列に相同なヌクレオチド配列は、50%のホルムアミド、5×SSC、および1%のSDSからなる溶液中での42℃の温度、ならびに0.2×SSCおよび0.1%のSDSからなる溶液中で42℃での洗浄の中程度にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズする、

前記甘味受容体が提供される。

【0018】

他の側面において、本発明は、

配列番号2と実質的に相同なポリペプチド、

配列同一性によって決定される、配列番号1に記載のヌクレオチド配列と実質的に相同な

10

20

30

40

50

ヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチド、
ハイブリダイゼーションによって決定される、配列番号 2 に記載のポリペプチドをコード
するヌクレオチド配列と実質的に相同なヌクレオチド配列によってコードされるポリペプ
チド、

ヌクレオチド配列同一性によって決定される、配列番号 2 に記載のポリペプチドをコード
するヌクレオチド配列に実質的に相同なヌクレオチド配列によってコードされるポリペプ
チド、

からなる群より選択され、

【 0 0 1 9 】

実質的に相同なポリペプチドは少なくとも 7 4 % の配列同一性を有し、

配列同一性によって決定される実質的に相同なヌクレオチドは、少なくとも 6 5 % の配列
同一性を有し、および

ハイブリダイゼーションによって決定される実質的に相同なヌクレオチドは、5 0 % のホ
ルムアミド、5 × S S C、および 1 % の S D S からなる溶液中での 4 2 の温度、ならび
に 0 . 2 × S S C および 0 . 1 % の S D S からなる溶液中での 6 5 での洗浄のストリン
ジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズする、

T 1 R 2 - T M D 甘味受容体に関する。

【 0 0 2 0 】

さらなる側面において、ペリラルチンと結合でき、ペリラルチンにより活性化され得る
T 1 R 2 - T M D 甘味受容体をコードする核酸であって、1 または 2 以上の

配列同一性によって決定される、配列番号 1 に記載のヌクレオチド配列と実質的に相同な
核酸、

ハイブリダイゼーションによって決定される、配列番号 1 に記載のヌクレオチド配列と実
質的に相同な核酸、

T 1 R 2 - T M D 甘味受容体をコードするヌクレオチド配列と実質的に相同な核酸、
を含み、

ここで、配列同一性によって決定される実質的に相同なヌクレオチドは、少なくとも 6 5
% の配列同一性を有し、

ハイブリダイゼーションによって決定される実質的に相同なヌクレオチドは、5 0 % のホ
ルムアミド、5 × S S C、および 1 % の S D S からなる溶液中での 4 2 の温度、ならび
に 0 . 2 × S S C および 0 . 1 % の S D S からなる溶液中での 6 5 での洗浄のストリン
ジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズし、

【 0 0 2 1 】

ただし、前記核酸は、1 または 2 以上の

配列同一性によって決定される、配列番号 9 または配列番号 1 1 に記載のヌクレオチド配
列と相同な核酸、

ハイブリダイゼーションによって決定される、配列番号 9 または配列番号 1 1 に記載のヌ
クレオチド配列と相同な核酸、

配列番号 1 0 または配列番号 1 2 に記載のポリペプチドと相同なポリペプチドをコードす
るヌクレオチド配列と相同な核酸、

を含まず、

【 0 0 2 2 】

ここで、配列同一性によって決定される実質的に相同なヌクレオチドは、少なくとも 5 0
% の配列同一性を有し、および

ハイブリダイゼーションによって決定される実質的に相同なヌクレオチドは、5 0 % のホ
ルムアミド、5 × S S C、および 1 % の S D S からなる溶液中での 4 2 の温度、ならび
に 0 . 2 × S S C および 0 . 1 % の S D S からなる溶液中での 4 2 での洗浄の中程度に
ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズする、

前記核酸が提供される。

【 0 0 2 3 】

10

20

30

40

50

他の側面において、
配列同一性によって決定される、配列番号1に記載のヌクレオチド配列と実質的に相同な核酸、

ハイブリダイゼーションによって決定される、配列番号1に記載のヌクレオチド配列と実質的に相同な核酸、

T 1 R 2 - T M D 甘味受容体をコードするヌクレオチド配列と実質的に相同な核酸、
からなる群より選択される核酸であって

配列同一性によって決定される実質的に相同なヌクレオチドは、少なくとも65%の配列同一性を有し、

ハイブリダイゼーションによって決定される実質的に相同なヌクレオチドは、50%のホルムアミド、5×SSC、および1%のSDSからなる溶液中での42℃の温度、ならびに0.2×SSCおよび0.1%のSDSからなる溶液中での65℃での洗浄のストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズする、
前記核酸が提供される。

【0024】

他の側面において、上記で定義された核酸を含む発現ベクターが提供される。

他の側面において、上記で定義された発現ベクターでトランスフェクトされたがT 1 R 3を含有しない宿主細胞が提供される。

ある具体的な態様において、上記で定義された宿主細胞は、上記で定義されたT 1 R 2 - T M D 甘味受容体およびGタンパク質を安定的に発現する。

他の態様において、上記で定義された宿主細胞は、上記で定義されたT 1 R 2 - T M D 甘味受容体およびGタンパク質を一過性に発現する。

【0025】

他の側面において、上記で定義されたT 1 R 2 - T M D 甘味受容体およびGタンパク質甘味受容体を産生する方法であって、発現に十分な条件下でT 1 R 2 - T M D 甘味受容体をコードする発現ベクターをその中に含有する宿主細胞を培養し、それによってT 1 R 2 - T M D 甘味受容体を形成し、任意に細胞からそれを回収することを含む、前記方法が提供される。

【0026】

他の側面において、味覚細胞において甘味シグナリングを調節する剤を同定する方法であって、

(i) 甘味刺激に応答するT 1 R 2 - T M D 甘味受容体を発現する細胞を、任意に他の剤の存在下で、剤と接触させること、および

(ii) 前記細胞中の少なくとも1つの機能的応答によって、少なくとも1つの剤が、前記細胞中の前記T 1 R 2 - T M D 甘味受容体の機能的活性に影響するかを同定すること、を含む、

ここで、前記T 1 R 2 - T M D 甘味受容体が、配列番号2と実質的に相同なポリペプチド、配列同一性によって決定される、配列番号1と実質的に相同なヌクレオチドによってコードされるポリペプチド、およびハイブリダイゼーションによって決定される、配列番号1と実質的に相同なヌクレオチドによってコードされるポリペプチドからなる群より選択され、

【0027】

実質的に相同なポリペプチドは少なくとも74%の配列同一性を有し、

配列同一性によって決定される実質的に相同なヌクレオチドは、少なくとも65%の配列同一性を有し、

ハイブリダイゼーションによって決定される実質的に相同なヌクレオチドは、50%のホルムアミド、5×SSC、および1%のSDSからなる溶液中での42℃の温度、ならびに0.2×SSCおよび0.1%のSDSからなる溶液中での65℃での洗浄のストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズし、

T 1 R 2 甘味受容体発現細胞はT 1 R 3 受容体を発現しない、前記方法を提供する。

10

20

30

40

50

【 0 0 2 8 】

ある具体的な態様では、上記で定義された方法は G タンパク質をも発現する細胞を利用する。

他の態様では、上記で定義された方法において、G タンパク質は G a q - ガストデューシンに基づくキメラ G タンパク質である。

さらなる態様では、上記で定義された方法において、G タンパク質はキメラ G タンパク質 G であるアルファ 1 6 - ガストデューシン 4 4 である。

またさらなる態様では、上記で定義された方法において、(i i) は細胞内メッセンジャーにおけるまたはそれに起因する変化の計測によって実施される。

さらに、さらなる態様では、上記で定義された方法において、機能的応答は I P ₃ およびカルシウム²⁺ から選択される細胞内メッセンジャーの変化を計測することによって決定される。

10

【 0 0 2 9 】

他の態様では、上記で定義された方法において、細胞は、細菌細胞、真核細胞、酵母細胞、昆虫細胞、哺乳類細胞、両生類細胞、およびぜん虫細胞からなる群より選択される。

ある態様では、上記で定義された方法において、細胞は哺乳類細胞である。

さらなる態様では、上記で定義された方法において、細胞は、C H O、C O S、H e L a および H E K - 2 9 3 からなる群より選択される哺乳類細胞である。

またさらなる態様では、上記で定義された方法において、(i) はさらに T 1 R 2 甘味受容体を甘味物質の存在下で試験剤と接触させることを含む。

20

さらに別の態様では、上記で定義された方法において、甘味物質はペリラルチンおよびメチルカピコールからなる群より選択される。

【 0 0 3 0 】

他の側面において、キットが提供され、キットは：

(i) T 1 R 2 - T M D 甘味受容体、または実質的に類似するそのホモログを発現するが、T 1 R 3 受容体は発現しない組換え細胞、および

(i i) T 1 R 2 - T M D 甘味受容体のアゴニスト、を、試験剤を T 1 R 2 - T M D の調節剤として同定するために組み合わせて利用するために含む。

【 0 0 3 1 】

30

他の側面において、上記で定義されたキットを利用する方法が提供される。方法は：

(i) 固体支持体上で組換え細胞を成長させること、

(i i) 定義されたプレートまたはウェルの培養培地へ、アゴニストの存在下、適切な濃度で試験剤を添加すること、および

(i i i) 試験剤の存在下および非存在下での応答を比較することにより、細胞の機能的応答の変化を決定し、それにより、試験剤が T 1 R 2 甘味受容体またはその実質的に類似するホモログの調節物質であることを同定することを含む。

【 0 0 3 2 】

他の側面において、T 1 R 2 - T M D を調節する剤の同定方法を提供し、方法は：

40

(i) T 1 R 2 - T M D へのリガンドの結合に応答して変化するパラメータ計測すること、

(i i) 任意にリガンドの存在下で、ネガティブコントロールとの比較で試験剤に応答したパラメータの変化を決定し、それにより調節剤またはリガンドを同定すること、を含む。

ある態様において、上記で定義された方法において、リガンドは、ペリラルチンおよびメチルカピコールからなる群より選択されるリガンドである。

【 0 0 3 3 】

ある態様において、上記で定義された方法において、(i) は、蛍光分光法、N M R 分光法、1 または 2 以上の吸収、屈折率の計測、流体力学法、クロマトグラフィ、溶解度計

50

測、生物化学的方法からなる群より選択される方法で行われ、これらの方法は、溶液、二重膜、固相への連結、単脂質膜中、膜上への結合、および小胞内からなる群より選択された適切な環境において T 1 R 2 - T M D ポリペプチドの特性を計測する。

【 0 0 3 4 】

詳細な説明

アッセイに利用する細胞

本発明によるスクリーニングまたはアッセイに有用な細胞は、T 1 R 3 を含まない細胞である。トランスフェクトされたまたは内在性の T 1 R 3 は、T 1 R 2 - T M D のアゴニスト応答または他の調節剤による前記応答の変化を決定する方法を否定的に妨害し得る。T 1 R 3 の非存在は、T 1 R 2 - T M D 活性化の決定にヌルバックグラウンド (null background) を提供し、観察されるシグナルは直接 T 1 R 2 - T M D 活性の結果とすることができる。このことは、T 1 R 2 - T M D を特異的に調節する剤の同定を可能にし、T 1 R 3 が甘味およびうま味ヘテロダイマー両方の一部であるため、うま味物質をも含み得る T 1 R 3 を活性化する剤を排除できる。

【 0 0 3 5 】

適切な真核細胞は、T 1 R 3 を含まない真核細胞、例えば、限定することなく、哺乳類細胞、酵母細胞、または昆虫細胞 (S f 9 を含む)、両生類細胞 (メラニン保有細胞を含む)、または Caenorhabditis 細胞 (Caenorhabditis elegans を含む) を含む。T 1 R 3 を含まない適切な哺乳類細胞は、例えば、限定することなく、COS 細胞 (Cos - 1 および Cos - 7 を含む)、CHO 細胞、HEK 293 細胞、HEK 293 T 細胞、HEK 293 T - Rex TM 細胞、または他のトランスフェクト可能な真核細胞系を含む。T 1 R 3 を含有しない適切な細菌細胞は、限定することなく、E. Coli を含む。

【 0 0 3 6 】

細胞は、当業者によく知られているように、GPCR および G タンパク質 (受容体をホスホリパーゼ C シグナル伝達経路に連結する) を一過性にまたは安定的にトランスフェクトされる。味覚 GPCR との増強されたカップリングを提供するキメラ G タンパク質 G アルファ 16 - ガストデューシン 44 の優れた異種発現系は WO 2004 / 055048 (G . sub . . alpha . 16 gust (ducin) 44、G . sub . alpha . 16 gust (ducin) 44、G 16 gust (ducin) 44、Ga 16 gust (ducin) 44、G 16 - ガストデューシン 44、または以下で使用されているように「G 16 gust 44」としても知られている) に詳細に記載されている。代替的に、WO 2004 / 055048 に記載されている G q - ガストデューシンに基づいた他のキメラ G タンパク質、または、例えば G 16 または G 15 などの、他の G タンパク質もまた利用してよい。

【 0 0 3 7 】

T 1 R 2 - T M D は、受容体を、例えばホスホリパーゼ C シグナル伝達経路などの、シグナル伝達経路、または例えば後述のものを含むシグナル伝達経路に連結する G タンパク質とともに、細胞内で発現させることが可能である：アデニル酸シクラーゼ、グアニル酸シクラーゼ、ホスホリパーゼ C、IP₃、GTPase / GTP 結合、アラキドン酸、cAMP / cGMP、DAG、プロテインキナーゼ c (PKC)、MAP キナーゼ、チロシンキナーゼ、または ERK キナーゼ。代替的に、以下に詳述するように、いかなる適切なリポーター遺伝子も T 1 R 2 - T M D 活性化応答プロモーターに連結し、T 1 R 2 - T M D 活性の決定に利用することができる。

【 0 0 3 8 】

上述の細胞に利用されるベクター構築物

かかる細胞中で GPCR ならびに / あるいは G タンパク質を発現するベクター構築物は、本質的にポリメラーゼ連鎖反応を利用する知られた手法によって産生することができる。配列の確認後、cDNA 断片は、例えば pcDNA 3.1 哺乳類細胞用哺乳類発現ベクターなど、適切なベクター内へサブクローニングされてよく、正しい遺伝子の発現を可能

にするために対応する宿主細胞に一過性にトランスフェクトされてよい。

【0039】

例えば48時間の、トランスフェクト後期間の後、タンパク質の正しい発現を確認するために細胞溶解物を調製し、ウェスタンブロットによって解析される。一度正しいタンパク質の発現が確認されれば、例えばHEK293T細胞およびHEK T-ResTMを含む哺乳類細胞などの適切な細胞は、当業者に知られた技術に従って、安定してタンパク質を発現する細胞を生成するためにトランスフェクトされてよい。

【0040】

代替的に、様々な非哺乳類発現ベクター/宿主システムが、Gタンパク質共役受容体(GPCR)T1R2-TMDをコードする配列の含有および発現に利用可能である。これらは、例えば組換えバクテリオファージ、プラスミド、またはコスミドDNA発現ベクターで形質転換された細菌を含む微生物、酵母発現ベクターで形質転換された酵母、ウイルス発現ベクター(例えばバキュロウィルス)、または細菌発現ベクター(例えばpBR322プラスミド)で感染させた昆虫細胞システムなどを含む。以上に記載された系とともに利用することができる特定のベクターの例は、G-protein coupled receptors, Signal Transduction Series, 編者:Tatsuya Haga and Gabriel Berstein、第1版、CRC Press - Boca Raton FL; September 1999に記載されている。

【0041】

細菌系において、多くのクローニングおよび発現ベクターが、GPCRをコードするポリヌクレオチド配列について意図する利用に応じて選択し得る。例えば、GPCRをコードするポリヌクレオチド配列のルーチンのクローニング、サブクローニング、および増殖が、pBLUESCRIPT(Stratagene, La Jolla Calif.)またはpSPORT1プラスミド(Life Technologies)などの多機能性大腸菌ベクターを利用して行える。GPCRをコードする配列の、ベクターのマルチクローニングサイトへのライゲーションはlacZ遺伝子を妨害し、組換え分子を含有する形質転換細菌の同定のための比色スクリーニング手法を利用可能にする。加えて、これらベクターはインビトロ転写、ジデオキシシークエンシング、ヘルパーファージによる一本鎖レスキュー(single strand rescue)、およびクローニングされた配列内のネストされた欠失の作出にも有用であり得る。例えば抗体の産生など、多量のGPCRが必要な場合、GPCRの高発現を導くベクターが利用し得る。例えば強い、誘導可能なSP6またはT7バクテリオファージプロモーターを含むベクターなどが利用し得る。

【0042】

酵母発現系はGPCRの産生に利用されてよい。アルファファクター、アルコールオキシダーゼ、およびPGHプロモーターなどの構成的または誘導プロモーターを含む多数のベクターが酵母Saccharomyces cerevisiaeまたはPichia pastorisに利用し得る。加えて、かかるベクターは、発現タンパク質の分泌または細胞内の保持を導き、安定的増殖のための外来性配列の宿主遺伝子への統合を可能にする。

【0043】

異種タンパク質の昆虫細胞細胞系での発現のために、例えば、Lepidopteran baculovirusまたはAutographia californicaマルチカプシドヌクレオウィルス(AcMNPV)の誘導体が利用可能である。このシステムにおいて、外来性遺伝子発現は、ポリヘドリンまたはp10プロモーターのいずれかの、非常に強い後期ウィルスプロモーターに導かれ、多様なベクターが、組換えタンパク質の発現および回収の最適化に利用可能である。これらのベクターは膜結合型および分泌型タンパク質の両方を高度に発現することが可能であり、また哺乳類システム中で起こることが知られる、N-およびO-連結糖鎖付加、リン酸化、アシル化、タンパク質分解および分泌ワクチン成分を含む多くの翻訳後修飾も可能である。例えばInvitrogenのInsectSelectTMなどの多くのベクターが商業的に入手可能である。

【0044】

発現系

10

20

30

40

50

求めるタンパク質（例えばG P C RおよびGタンパク質）をコードするc D N Aを発現するために、転写を導く強力なプロモーター、転写 / 翻訳ターミネーターおよび翻訳開始のためのリボソーム結合領域を含む、適切なc D N Aが入った発現ベクターを典型的にサブクローニングする。例えばE.coli、Bacillus sp.、およびSalmonellaなど、適切な細菌プロモーターは当業者によく知られており、かかる発現系のためのキットが商業的に入手可能である。同様に、哺乳類細胞、酵母、および昆虫細胞のための真核細胞発現系も商業的に入手可能である。真核細胞発現ベクターは、例えばアデノウィルスベクター、アデノ随伴ベクター、またはレトロウィルスベクターなどであってよい。

【0045】

プロモーターに加えて、発現ベクターは典型的に、宿主細胞においてタンパク質をコードする核酸を発現するのに必要な付加的要素の全てを含む、転写ユニットまたは発現カセットを含む。典型的な発現カセットはしたがって、タンパク質をコードする核酸配列に作動可能に連結したプロモーターおよび、転写の効率的なポリアデニレーションに必要なシグナル、リボソーム結合領域、および翻訳ターミネーションを含む。タンパク質をコードする核酸配列は典型的に、組換えタンパク質の効率的な細胞表面発現を推進するために、ラットソマトスタチン - 3 受容体配列のN末端45アミノ酸などの、細胞表面受容体に有用な膜標的化シグナルに連結してよい。付加的な要素は、例えばエンハンサーなどを含んでもよい。発現カセットはまた、構造遺伝子の下流に、効果的なターミネーションを提供するための転写終止領域も含むべきである。終止領域はプロモーター配列と同じ遺伝子から得てもよく、また異なる遺伝子から得てもよい。

10

20

【0046】

タンパク質の発現のために、真核細胞または原核細胞における発現のために当業者によく知られた、慣用のベクターを利用してよい。ベクターの例は、例えばp B R 3 2 2 ベースのプラスミド、p S K F、およびp E T 2 3 Dを含むプラスミドなどの細菌発現ベクター、および例えばG S TおよびL a c Zなどの融合発現系を含む。

【0047】

真核ウィルス由来の制御要素を含む発現ベクター、例えばS V 4 0 ベクター、サイトメガロウィルスベクター、パピローマウィルスベクター、およびエプスタイン・バーウィルス由来のベクターなどは、典型的に真核発現ベクターとして利用される。他の真核ベクターの例には、p M S G、p A V 0 0 9 / A⁺、p M T O 1 0 / A⁺、p M A M n e o - 5、バキュロウィルスp D S V E、p c D N A 3 . 1、p I R E S、およびS V 4 0 早期プロモーター、S V 4 0 後期プロモーター、メタロチオネインプロモーター、マウス乳腺腫瘍ウィルスプロモーター、ラウス肉腫ウィルスプロモーター、ポリヘドリンプロモーター、または真核細胞内での発現に効果を示す他のプロモーターの指揮下でタンパク質を発現させられる他のいかなるベクターも含む。いくつかの発現系は、チミジンキナーゼ、ハイグロマイシンBホスホトランスフェラーゼ、ジヒドロ葉酸リダクターゼなどの遺伝子増幅を提供するマーカーを有する。

30

【0048】

典型的に発現ベクターに含まれる要素には、E.Coli中で機能するレプリコン、組換えプラスミドを取り込んだ細菌の選別を可能にする薬剤耐性をコードする遺伝子、および真核配列の挿入を可能にするプラスミドの本質的でない領域のユニークな制限部位なども含んでよい。選択される特定の薬剤耐性遺伝子は重大ではなく、当該技術分野で知られたあらゆる多くの薬剤耐性遺伝子が適している。必要に応じて、原核配列は、真核細胞内でのD N Aの複製を妨害しないように任意に選択される。

40

【0049】

細菌システムにおいて、G P C Rのc D N A断片は、単独で、または、対象となるG P C Rが、E.Coliペリプラズムマルトース結合タンパク質（M B P）であって、シグナルペプチドを含むM B PがG P C Rのアミノ末端に連結しているものに融合した融合タンパク質として発現されてよい。野生型G P C Rのc D N AあるいはM B P：G P C R融合c D N Aは、例えばE.Coli G P C Rの発現がL a c野生型プロモーターによって駆動される

50

p B R 3 2 2 など、適切なプラスミドへサブクローニングされる。E.Coliにおける G P C R の発現方法は、例えばG-protein coupled receptors, Signal Transduction Series, 編者：Tatsuya Haga and Gabriel Berstein, 第 1 版, CRC Press - Boca Raton FL; September 1999などに記載されている。

【 0 0 5 0 】

内在性 G P C R を欠損した遺伝子操作酵母システムおよび昆虫細胞システムは、T 1 R 2 - T M D 活性化スクリーニングに対してヌルバックグラウンドであるという利点を提供する。遺伝子操作酵母システムはヒト G P C R および G タンパク質を、対応する内在性酵母フェロモン受容体経路の成分と代替するものである。下流シグナル経路はまた、通常の酵母シグナル応答が選択培地上でのプラス成長またはレポーター遺伝子発現に転換するように、改変される (Broach, J. R. and J. Thorner, 1996, Nature, 384 (supp.):14 ~ 16に記載)。遺伝子操作された昆虫システムは、受容体をホスホリパーゼ C シグナル経路に連結できるヒト G P C R および G タンパク質を組み込んでいる (例えばKnight and Grigliatti, 2004, J. Receptors and Signal Transduction, 24: 241 ~ 256参照)。両生類細胞システム、特にメラニン含有細胞は、例えば G P C R 発現系について記載した国際特許出願 9 2 / 0 1 8 1 0 などに記載されている。

10

【 0 0 5 1 】

T 1 R 2 - T M D の過剰発現

T 1 R 2 - T M D は、例えば C M V 早期プロモーターなどの強力な構成的プロモーターの制御下に置くことにより過剰発現されることが可能である。代替的に、保存されている G P C R アミノ酸またはアミノ酸ドメインのある変異を導入し、利用する G P C R を構成的に活性化させることが可能である。

20

【 0 0 5 2 】

T 1 R 2 - T M D 発現ベクター構築物の細胞内へのトランスフェクション

大量のタンパク質を発現する細菌、哺乳類、酵母または昆虫細胞セルラインを産生するのに、標準的なトランスフェクション法が利用可能である。

核酸配列を宿主細胞に導入するために知られたいかなる方法も利用してよい。用いる特定の遺伝子操作手順は、対象となるタンパク質を発現できる宿主細胞中に関係する遺伝子を首尾良く導入できさえすればそれでよい。これらの方法は、クローニングされたゲノム DNA、c DNA、合成 DNA または他の外来性の遺伝物質を宿主細胞中に導入することを伴ってもよく、リン酸カルシウムトランスフェクション、ポリブレン、プロトプラスト融合、エレクトロポレーション、リポソーム、マイクロインジェクション、プラズマベクター、ウィルスベクターなどを含む。

30

【 0 0 5 3 】

例えば、限定することなく、T - R e x ^{T M} 発現系 (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) を用いることができる。T - R e x ^{T M} システムは、E.Coli T n 1 0 にコードされたテトラサイクリン (T e t) 耐性オペロン由来の調節エレメントを利用したテトラサイクリン制御哺乳類発現系である。T - R e x ^{T M} システム中のテトラサイクリン調節は、テトラサイクリンの T e t リプレッサーへの結合および対象となる遺伝子の発現を制御するプロモーターの抑制解除に基づいている。

40

【 0 0 5 4 】

細胞培養

トランスフェクト後、トランスフェクトされた細胞は、当業者によく知られた標準的な培養条件で培養することができる。異なる細胞は、適切な温度および細胞培養培地を含む、異なる培養状態を要求することは、当業者に明らかである。

【 0 0 5 5 】

T 1 R 2 - T M D 受容体タンパク質回収

必要に応じて、タンパク質を標準的な技術を利用して細胞培養から回収することができる。例えば、沈殿およびクロマトグラフィ工程に供する前に細胞を機械的にまたは浸透圧ショックによって破裂させてよく、その性質と順序は回収される特定の組換え物質次第で

50

ある。あるいは、組換えタンパク質を、組換え細胞が培養された培養培地から回収することもできる。

【0056】

本明細書のアッセイによって同定され得る調節物質

T1R2 - TMD 受容体活性の調節物質（リガンド、アゴニスト、部分的アゴニスト、アンタゴニスト、逆アゴニスト、阻害剤、増強剤）は、以下に記載されたように同定可能である。これから前記アッセイによって同定される剤の定義について述べる。

【0057】

調節剤は、1または2以上の後述のものの増大または減少を引き起こす剤である：受容体の細胞表面発現、リガンドの受容体への結合、または受容体の活性化形態によって開始される細胞内応答（アゴニストの存在下または非存在下における）。調節剤はそれ自身が受容体に結合し、それを活性化し、それによって細胞内応答の増大を調節するアゴニストであり得る。

【0058】

調節剤は、小分子、ペプチド、タンパク質、核酸、抗体またはその断片を含む様々なタイプの化合物を含む。それらは、合成または天然物質、天然材料の抽出物を含む様々な給源、例えば動物、哺乳類、昆虫、植物、細菌または真菌細胞材料または培養細胞、またはかかる細胞の馴化培地などに由来し得る。

【0059】

リガンドは受容体と結合する剤であり、アゴニスト、部分的アゴニスト、増強剤、アンタゴニスト、または逆アゴニストであってもよい。アゴニスト（甘味物質）は、受容体を活性化し、受容体に結合したときにアゴニストの非存在下での細胞内応答と比較して、細胞内応答を増大させる T1R2 - TMD 受容体のリガンドである。付加的にまたは代替的に、アゴニストは、アゴニストの非存在下で細胞表面に存在する細胞表面受容体の数と比較して、受容体の細胞表面発現を増大させるように、細胞表面受容体の内在化を減少させ得る。

【0060】

部分的アゴニストは、受容体を最大限活性化する他のアゴニストと比べて、部分的にしか作用しないアゴニストである。アンタゴニストは、アゴニストと同じ（競合的アンタゴニスト）または異なる（アロステリックアンタゴニスト）受容体の部位に結合するが、受容体の活性化形態によって起こる細胞内応答を活性化せず、それゆえアゴニストの存在下およびアンタゴニストの非存在下と比較して、アゴニストによって誘導される細胞内応答を阻害するリガンドである。受容体と結合する逆アゴニストは、受容体によって媒介される構成的細胞内応答を、逆アゴニストの非存在下における細胞内応答と比較して減少させる。阻害剤は、阻害剤の非存在下におけるアゴニストの結合と比較して、アゴニストと受容体との結合を減少させ、および/またはアゴニストによって誘導される細胞内応答を減少させる。増強剤は、アゴニストの受容体への結合を、増強剤の非存在下におけるアゴニストの結合と比較して増大させ、および/またはアゴニストによって誘導される細胞内応答を増大させる。

【0061】

リガンドを結合し、例えば G タンパク質（すなわち増強剤との種々の相互作用に起因して）などによりシグナルを伝達する受容体の活性または活性の変化は、以下に記載されるアッセイによって決定可能である。

【0062】

T1R2 - TMD 受容体の調節剤同定のためのアッセイ

調節剤は、機能的効果 / パラメータを決定および比較するための、多種多様なインビトロおよびインビボアッセイを利用して、または代替的に結合アッセイによって、同定可能である。受容体の機能上の試験剤の効果は適切な機能的パラメータを分析することで計測可能である。受容体活性に影響するあらゆる生理学的変化は、調節剤の同定のために利用可能である。

10

20

30

40

50

【0063】

かかる機能的アッセイは、例えば動物から単離された無傷の細胞または組織を利用したアッセイおよび濃度または活性またはそれらの二次メッセンジャーの変化（例えば細胞内カルシウム（ Ca^{2+} ）、cAMP、cGMP、イノシトールリン酸（ IP_3 ）、ジアシルグリセロール/DAG、アラキドン酸、MAPキナーゼまたはチロシンキナーゼなどを含む）、イオンフラックス、リン酸化レベル、転写レベル、神経伝達物質レベルの計測に基づいたアッセイ、およびGTP結合性、GTP分解酵素、アデニル酸シクラーゼ、リン脂質分解、ジアシルグリセロール、イノシトール三リン酸、アラキドン酸放出、PKC、キナーゼおよび転写レポーターに基づいたアッセイなど、当業者によく知られている。いくつかの適切なアッセイが、例えばWO 01/18050に記載されている。

10

【0064】

受容体活性化は、典型的には例えば、例えば細胞内に貯蔵されたカルシウムイオンを放出する IP_3 などの二次メッセンジャーの増大など、後続する細胞内イベントの起点となる。いくつかのGタンパク質共役受容体活性化は、ホスホリパーゼC媒介ホスファチジルイノシトール加水分解を通じたイノシトール三リン酸（ IP_3 ）の形成を刺激する。 IP_3 は次に細胞内に貯蔵されたカルシウムイオンの放出を刺激する。全ての機能的アッセイは、例えば受容体をその表面または単離細胞膜画分に発現する細胞を含有するサンプルで行うことができる。有用な細胞は上述されている。また、例えば遺伝子組換え動物からの組織も利用してよい。

【0065】

20

それ自身がアゴニストではない調節剤（例えば、拮抗剤、部分的アゴニスト、逆アゴニスト、阻害剤、または増強剤）を同定するため、試験剤を有するおよび有さないサンプルを比較する。例えば、コントロール（アゴニストを含むが増強剤は含まない）の相対受容体活性値を100とする。コントロールに対する活性の減少で阻害剤、拮抗剤または逆アゴニストが同定され、その増大で増強剤が同定される。通常、試験剤を含まないサンプルとの比較における、または試験剤を含むが、 $T1R2$ を発現しない細胞（モックトランスフェクションされた細胞）に基づくサンプルとの比較における、試験剤を含むサンプルにおける10%またはそれ以上の計測された活性の増大または減少は、有意とみなすことができる。

【0066】

30

アゴニストまたは部分的アゴニストの同定

アゴニストまたは部分的アゴニストを同定するために、試験剤を有するサンプルを、アゴニスト（例えばペリラルチンまたはメチルカピコール）を有するポジティブコントロールと比較し、または代替的に/付加的に、試験剤を有するおよび有さないサンプルが、その受容体活性について比較される。例えば、アゴニストまたは部分的アゴニストは、アゴニストまたは部分的アゴニストが100mMまたはそれ以下で存在していた場合、ポジティブコントロール甘味物質の最大生物学的活性の少なくとも10%に相当する生物学的活性を有しており、例えばアゴニストの最大生物学的活性に匹敵するまたはそれ以上の最大生物学的活性を有し得る。

【0067】

40

最大生物学的活性は、与えられた受容体アッセイフォーマット内で達成可能なアゴニスト、例えばペリラルチンまたはメチルカピコールなどアッセイに対する最大達成可能な受容体応答であって、その応答が、同じアゴニストの濃度を増大させて適用してもさらに増大できないものと定義される。

【0068】

代替的に、試験剤を有するサンプルにおける、例えば10%またはそれ以上の計測活性の増大が、試験剤を有さないサンプルまたは試験剤を有するが $T1R2$ - TMD を発現しない細胞（モックトランスフェクション細胞）に基づくサンプルと比較される。

【0069】

アンタゴニストを同定するために、知られたアゴニストの存在下における、試験剤の存

50

在下および非存在下での受容体活性が比較される。アンタゴニストは、例えば少なくとも 10 % の、アゴニスト刺激性受容体活性の減少を示す。逆アゴニストを同定するために、知られたアゴニストの存在下における試験剤の存在下および非存在下での受容体活性が、上述のように、受容体を過剰発現する動物 / 細胞 / 膜を含有するサンプルで比較される。逆アゴニストは、例えば少なくとも 10 % の、受容体の構成的活性の減少を示す。

【 0 0 7 0 】

上述のアッセイにおける T 1 R 2 - T M D 受容体活性を計測する適切な検出法の様々な例を以下に記載する。

【 0 0 7 1 】

細胞質イオンまたは膜電位の変化の検出

G-protein coupled receptors, (Signal Transduction Series), CRC Press 1999; 第 1 版; Haga and Berstein 編に詳述されているように、細胞を受容体活性を報告するためのイオン感受性色素で染色する。細胞質におけるイオン濃度または膜電位の変化は、それぞれイオン感受性または膜電位蛍光指標を利用して計測される。

【 0 0 7 2 】

カルシウムフラックス

G P C R の活性化によって誘導される細胞内カルシウム放出は、カルシウムに結合する細胞持続性 (cell-permanent) 色素を利用して決定される。カルシウム結合性色素は、細胞内のカルシウム上昇に比例する蛍光シグナルを発生する。この方法は、受容体活性の迅速かつ定量的な計測を可能にする。

【 0 0 7 3 】

用いる細胞は、上述のようにホスホリパーゼ C 経路に連結できるようにするために、T 1 R 2 - T M D G P C R と G タンパク質とを共発現するトランスフェクト細胞である。ネガティブコントロールは、候補化合物の可能な非特異的効果を排除するために、T 1 R 2 - T M D を発現しない細胞またはその膜 (モックトランスフェクションしたもの) を含む。カルシウムフラックス検出手順は G-protein coupled receptors, Signal Transduction Series, 編者: Tatsuya Haga and Gabriel Berstein, 第 1 版, CRC Press - Boca Raton FL; September 1999 に詳述されており、適合させたバージョンの概略を以下に記載する。

【 0 0 7 4 】

0 日目: 96 ウェルプレートに、1 ウェルあたり 8500 個の細胞を播種し、栄養成長培地中、一晚 37 °C で維持する。

1 日目: 1 ウェルあたり 150 ng の G P C R D N A および 0.3 μl のリポフェクタミン 2000 (Invitrogen) を利用して、細胞をトランスフェクトする。トランスフェクトされた細胞は栄養成長培地中、一晚 37 °C で維持する。

【 0 0 7 5 】

2 日目: 成長培地を捨て、細胞を、1.5 μM の Fluo-4 AM (Molecular Probes) および 2.5 μM の プロベニシド (probenicid) を、10 mM の H e p e s 、200 μM の C a C l 2 および 0.1 % のウシ血清アルブミンを添加したハanks平衡塩溶液 (H B S S)、37 °C で pH 7.4、に溶かしたもので、1 時間 (室温暗所で) インキュベートする。2.5 μM の プロベニシド (probenicid) を、10 mM の H e p e s 、200 μM の C a C l 2 および 0.1 % のウシ血清アルブミンを添加したハanks平衡塩溶液 (H B S S)、37 °C で pH 7.4、に溶かしたものである洗浄緩衝液 125 μl をそれぞれのウェルに加え、プレートをさらに 30 分室温暗所でインキュベートする。緩衝溶液を捨て、プレートを 100 μl の洗浄緩衝液で 5 回洗浄し、200 μl の洗浄緩衝液に戻し、37 °C で 15 分間インキュベートする。

【 0 0 7 6 】

プレートを、例えば Flexstation (Molecular Devices) または FLIPR (Molecular Devices) などの蛍光マイクロプレートリーダーに設置し、20 μl の 10 倍濃縮リガンドストック溶液を加えて受容体活性化を開始する。

10

20

30

40

50

【0077】

蛍光は、リガンドを加える15秒前からリガンドを加えた後45～110秒後まで継続的に監視する。受容体活性化レベルは以下の2つの方程式で定義される：活性化の% = (最大蛍光 - 基準蛍光 / 基準蛍光) × 100、または蛍光増加 = 最大蛍光 - 基準蛍光、式中基準蛍光はリガンド添加前の平均蛍光レベルを表す。

【0078】

有用な細胞は、例えばHEK293T細胞およびHEK293T-RET細胞などの上述した哺乳類細胞である。細胞は、当該技術分野でよく知られているとおり、GPCRとGタンパク質で一過性にまたは安定的にトランスフェクトすることができる。優れた異種発現系は、WO2004/055048に詳述されている。カルシウムフラックスアッセイは、例えば後述の例1に記載されているように行うことができる。

10

【0079】

調節剤の同定は上述の方法を後述のとおりに変更して行う。シグナルは、アゴニストの存在下だが試験剤の非存在下でT1R2-TMDを発現する遺伝子組換え細胞から得られた、T1R2-TMD活性の基準レベルと比較される。例えば、少なくとも2倍、少なくとも5倍、少なくとも10倍、少なくとも100倍またはそれ以上などの、T1R2-TMD活性における増大または減少は調節剤を同定する。

【0080】

代替的に、同定は、調節剤が存在しないサンプルと比較した場合または調節剤は存在するがT1R2-TMDポリペプチドを発現しない細胞（モックトランスフェクションした細胞）のサンプルと比較した場合、例えば10%またはそれ以上の、蛍光強度の増大または減少を伴う。

20

【0081】

アデニル酸シクラーゼ活性

アデニル酸シクラーゼ活性のためのアッセイは、例えばKenimer & Nirenberg, 1981, Mol. Pharmacol. 20: 585～591に詳述されているように行われる。反応混合物は通常37

で10分以下インキュベートされる。インキュベーション後、反応混合物は0.9mlの冷6%トリクロロ酢酸を添加して除タンパクする。チューブを遠心し、それぞれの上清をDowex AG50W-X4カラムに加える。カラムからのcAMP画分を、アゴニストによる受容体活性化を受けて発生したcAMPレベルを計測するために、4mlの0.1mMイミダゾール-HCl (pH 7.5) で計数バイアル中に溶出する。コントロール反応もまた、T1R2-TMDポリペプチドを発現しない細胞のタンパク質ホモジネートを利用して行うべきである。

30

【0082】

IP₃ / Ca²⁺ シグナル

Gタンパク質を発現している細胞中で、イノシトール三リン酸 (IP₃) / Ca²⁺ およびその結果としての受容体活性に相当するシグナルを、蛍光を利用して決定可能である。GPCRを発現している細胞は、細胞内貯蔵およびイオンチャネルの活性化経路の寄与の結果、細胞質カルシウムレベルの増大を見せ得、必須ではないが、カルシウムフリー緩衝液中でかかるアッセイを実施し、内在ストアからのカルシウム放出の結果による蛍光応答と区別するために、任意にEDTAなどのキレート剤を補完することが望ましいだろう。

40

【0083】

ホスホリパーゼC / 細胞内Ca²⁺ シグナル

T1R2-TMDは、受容体とホスホリパーゼCシグナル伝達経路を連結するGタンパク質を有する細胞で発現される。細胞内Ca²⁺濃度の変化は、例えば蛍光Ca²⁺指示色素および/または蛍光イメージングなどを利用して、計測する。

【0084】

GTPase / GTP結合

T1R2-TMDを含むGPCRにとって、受容体活性の指標はGPCRを含む細胞膜

50

によるGTPの結合である。計測されるのは、標識GTPの結合を検出することで膜と連結するGタンパク質である。受容体を発現する細胞から単離された膜は、35S-GTP Sおよび未標識GDPを含有する緩衝液中でインキュベートされる。活性を有するGTPaseは無機リン酸塩として標識を放出し、これは20mMの H_3PO_4 中の活性炭5%懸濁液中で遊離無機リン酸塩を分離した後にシンチレーションカウンティングによって決定される。混合物をインキュベートし、未結合標識GTPをGF/Bフィルターでろ過して取り除く。結合した標識GTPを液体シンチレーションカウンティングで計測する。コントロールは、試験剤の非特異的効果の可能性を排除するために、T1R2-TMDを発現しない細胞(モックトランスフェクションしたもの)から単離した膜を利用するアッセイを含む。方法はTraynor and Nahorski, 1995, Mol. Pharmacol., 47: 848~854に詳述されている。

10

【0085】

調節剤を同定するために、上述の、GTP結合またはGTPase活性などの、10%またはそれ以上の変化(増大または減少)は通常十分である。しかしながら、作用薬を同定するためには、上述のアッセイは以下のように変更して実施する。剤は、化合物が100mMまたはそれ以下、例えば10から500 μ M、例えば約100 μ Mで存在したときに、活性が、知られた作用薬(例えばペリラルチン)のその少なくとも50%であった場合、または知られた作用薬によって誘導されるレベルと同じまたはそれ以上のレベルを誘導する場合、通常作用薬として同定される。

20

【0086】

マイクロフィジオメーターまたはバイオセンサー

かかるアッセイはHafner, 2000, Biosens. Bioelectron. 15: 149~158に詳述されているように行うことができる。

アラキドン酸

アラキドン酸の細胞内レベルは受容体活性の指標として採用される。かかる方法はGijon et al., 2000, J. Biol. Chem., 275:20146~20156に詳述されている。

【0087】

cAMP / cGMP

細胞内または細胞外cAMPは、cAMPラジオイムノアッセイ(RIA)または、例えばHorton & Baxendale, 1995, Methods Mol. Biol. 41: 91~105に記載されているような、cAMP結合タンパク質を利用して計測される。代替的に、例えばLJL BiosystemsおよびNEN Life Science Productsの高効率蛍光偏光ベースホモジニアスアッセイなど、複数のcAMP計測のためのキットもまた商業的に入手可能である。代替的に、cGMPの細胞内または細胞外レベルもまた、例えばイムノアッセイを利用して計測可能である。例えば、Felly-Bosco et al., Am. J. Resp. Cell and Mol. Biol., 11:159~164(1994)に記載の方法などが、cGMPレベルを決定するのに利用され得る。代替的に、米国特許4,115,538に記載されているcAMPおよび/またはcGMPを計測するアッセイキットもまた利用可能である。試験剤の非特異的効果の可能性を排除するためのモックトランスフェクションされた細胞またはその抽出物を有するネガティブコントロールが利用され得る。

30

40

【0088】

DAG / IP₃

例えばPhospholipid Signaling Protocols, Ian M. Bird, Totowa, N.J.編, Humana Press, 1998に記載のように、受容体活性に起因するリン脂質分解によって放出される、二次メッセンジャーのジアシルグリセロール(DAG)および/またはイノシトール三リン酸(IP₃)を検出し、T1R2-TMD活性の指標として利用することが可能である。代替的に、Perkin Elmer and CisBio Internationalから商業的に入手可能な、イノシトール三リン酸の計測のためのキットが利用可能である。試験剤の非特異的効果の可能性を排除するためのモックトランスフェクションされた細胞またはその抽出物を有するネガティブコントロールが利用され得る。

50

【 0 0 8 9 】

P K C 活性

成長因子受容体チロシンキナーゼは、リン脂質およびカルシウム活性化タンパク質キナーゼファミリーの、タンパク質キナーゼC (P K C) の活性化を伴う経路を通してシグナリング可能である。P K C に誘導される遺伝子産物の増大は、P K C の活性化およびその結果としての受容体の活性化を示す。これらの遺伝子産物は、例えばガン原遺伝子転写因子コード遺伝子 (c - f o s 、 c - m y c および c - j u n を含む) 、プロテアーゼ、プロテアーゼ阻害剤 (コラーゲナーゼタイプI およびブラズミノゲン活性化因子阻害剤を含む) 、および接着分子 (細胞内接着因子I (I C A M I) を含む) などを含む。P K C 活性はKikkawa et al., 1982, J. Biol. Chem., 257: 13341に記載されているように、その後ホスホセルロースペーパーに結合することによって分離されるP K C 基質ペプチドのリン酸化を計測することで、直接計測し得る。これは精製キナーゼまたは粗細胞抽出物中の活性の計測に利用可能である。タンパク質キナーゼC サンプルは20 mM H E P E S / 2 mM D T T でアッセイ直前に希釈可能である。代替的なアッセイは、PanVeraから商業的に入手可能なタンパク質キナーゼC アッセイキットを利用して行うことも可能である。

10

【 0 0 9 0 】

上述のP K C アッセイは、T 1 R 2 - T M D を発現する細胞からの抽出物に対して行う。代替的に、活性は、P K C 活性化によって活性化される遺伝子の制御配列によって駆動するリポーター遺伝子構築物の利用を通して計測可能である。試験剤の非特異的効果の可能性を排除するためのモックトランスフェクションされた細胞またはその抽出物を有するネガティブコントロールが利用され得る。

20

【 0 0 9 1 】

M A P キナーゼ活性

M A P キナーゼ活性は、例えばNew England Biolabsのp 3 8 M A P キナーゼアッセイキット、またはPerkin-Elmer Life ScienceのFlashPlate^{T M} M A P キナーゼアッセイなど、商業的に入手可能なキットを利用して計測可能である。p 4 2 / 4 4 M A P キナーゼまたはE R K 1 / 2 は、G q およびG i 結合G P C R を有する細胞を利用している場合、T 1 R 2 - T M D 活性を示すために計測可能であり、G P C R 活性化に続く内在性E R K 1 / 2 キナーゼのリン酸化を計測するE R K 1 / 2 アッセイキットはTGR Biosciencesによって商業的に入手可能である。代替的に、知られた合成または天然チロシンキナーゼ基質および標識リン酸塩を通したチロシンキナーゼ活性の直接計測はよく知られており、他のタイプのキナーゼ (例えばセリン / スレオニンキナーゼ) の活性も同様に計測可能である。

30

【 0 0 9 2 】

全てのキナーゼアッセイは、精製キナーゼおよびT 1 R 2 - T M D ポリペプチドを発現する細胞から調製した粗抽出物両方で行うことができる。利用するキナーゼの基質は、全長タンパク質または基質の代わりとなる合成ペプチドであり得る。Pinna & Ruzzene (1996, Biochem. Biophys. Acta 1314: 191 ~ 225) は、キナーゼ活性の検出に有用な複数のリン酸化基質部位を列挙している。複数のキナーゼ基質ペプチドが商業的に入手可能である。特に有用なものは、多くの受容体および非受容体チロシンキナーゼの基質である、「S r c - 関連ペプチド」R R L I E D A E Y A A R G (Sigma から商業的に入手可能) である。いくつかの方法は、ペプチド基質のフィルターへの結合を必要とし、そこでペプチド基質は、結合を促進するために、正味で正に荷電しているべきである。一般的に、ペプチド基質は少なくとも2つの塩基性残基および遊離アミノ末端を有しているべきである。反応は一般的に、0 . 7 ~ 1 . 5 mM のペプチド濃度を利用する。試験剤の非特異的効果の可能性を排除するためのモックトランスフェクションされた細胞またはその抽出物を有するネガティブコントロールが利用され得る。

40

【 0 0 9 3 】

転写レポーター / T 1 R 2 - T M D 応答性プロモーター / レポーター遺伝子

50

レポーター遺伝子アッセイで調節剤を同定するためには、シグナルにおける少なくとも2倍の増大または10%の減少が顕著である。アゴニストは、試験剤の存在下および非存在下における活性を比較した場合、例えば少なくとも2倍、5倍、10倍またはそれ以上活性化する。

T1R2-TMDへのアゴニストの結合によって開始される細胞内シグナルは、細胞内事象のカスケードを作動させ、最終結果として1または2以上の遺伝子の転写または翻訳における迅速かつ検出可能な変化をもたらす。受容体の活性はしたがって、T1R2-TMD活性化に応答するプロモーターによって駆動されるレポーター遺伝子の発現の計測によって決定される。

【0094】

本明細書で使用される「プロモーター」は、遺伝子発現の受容体媒介制御に必要な1または2以上の転写制御エレメントまたは配列であり、これは受容体調節発現に必要な1または2以上の基本プロモーター、エンハンサーおよび転写因子結合部位を含む。T1R2-TMDへのアゴニストの結合の結果もたらされる細胞内シグナルに応答するプロモーターは、選択され、転写、翻訳または絶対的活性が容易に検出および計測可能な、対応するプロモーター制御レポーター遺伝子に作動可能に連結される。

【0095】

レポーター遺伝子は、例えばルシフェラーゼ、CAT、GFP、 β -ラクタマーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、およびいわゆる「前初期」遺伝子、c-fosガン原遺伝子、転写因子CREB、血管作動性腸ペプチド(VIP)遺伝子、ソマトスタチン遺伝子、プロエンケファリン遺伝子、ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ(PEPCK)遺伝子、NF- κ Bに応答する遺伝子、およびAP-1応答遺伝子(FosおよびJun、Fos関連抗原(Fra)1および2、I κ B、オルニチンデカルボキシラーゼ、およびアネキシンIおよびIIの遺伝子を含む)から選択されてよい。プロモーターは、当業者には明らかなように、選択されたレポーター遺伝子に応じて選択される。ルシフェラーゼ、CAT、GFP、 β -ラクタマーゼ、 β -ガラクトシダーゼおよびその産物の検出のためのアッセイは当該技術分野でよく知られている。さらなるレポーター遺伝子の例は以下に記載されている。

【0096】

「前初期」遺伝子は好適であり、速やかに誘導される(例えば受容体とエフェクタータンパク質またはリガンドとの接触から数分以内)。レポーター遺伝子の求められる特性には、次の1または2以上のものが含まれる:リガンド結合に対する速やかな応答性、休眠細胞における低発現または検出できない発現、新たなタンパク質合成の一過性かつ独立した誘導、後続する転写の遮断に新たなタンパク質合成が必要であること、およびこれらの遺伝子から転写されたmRNAが数分から数時間の短い半減期を有すること。同様に、プロモーターも、これらの特性を1つ、数個、または全て有し得る。

【0097】

c-fosガン原遺伝子は、複数の異なる刺激に応答し、速やかな誘導を有する遺伝子の例である。c-fos調節エレメントは、転写開始に必要なTATAボックス、基本転写のための2つの上流エレメント、および、二回対称性を有するエレメントを含む、TPA、血清、EGF、およびPMAによる誘導に必要なエンハンサーを含む。c-fosのmRNAキャップ部位の上流-317~-298bpの間に位置する20bpのc-fos転写エンハンサーエレメントは、血清枯渴NIH3T3細胞の血清誘導に不可欠である。2つの上流エレメントのうちの1つは-63~-57に位置し、cAMP調節のためのコンセンサス配列に類似する。

【0098】

転写因子CREB(サイクリックAMP応答エレメント結合タンパク質)は細胞内cAMPのレベルに応答する。したがって、cAMPレベルの調節を通してシグナルする受容体の活性化は、転写因子の結合か、またはCREB結合エレメント(CRE、またはcAMP応答エレメントと称する)に連結されたレポーター遺伝子の発現を検出することで決

10

20

30

40

50

定可能である。CREのDNA配列はTGACGTCAである。CREB結合活性に応答するレポーター構築物は米国特許5,919,649に記載されている。

【0099】

他の好適なレポーター遺伝子およびそのプロモーターは、血管作動性腸ペプチド(VIP)遺伝子およびcAMP応答性のそのプロモーター、ソマトスタチン遺伝子およびcAMP応答性のそのプロモーター、プロエンケファリンおよびcAMP、ニコチンアゴニストおよびホルボールエステルに応答性のそのプロモーター、およびホスホエノールビルビン酸カルボキシキナーゼ(PEPCK)遺伝子およびcAMP応答性のそのプロモーターを含む。

【0100】

GPCR活性の変化に応答するレポーター遺伝子およびそのプロモーターのさらなる例は、AP-1転写因子およびNF- κ Bを含む。AP-1プロモーターは、回文配列TGA(C/G)TCAであるコンセンサスAP-1結合部位により特徴付けられる。AP-1はまた、ホルボールエステル12-O-テトラデカノイルホルボール-アセテート(TPA)を含む腫瘍プロモーターによる誘導の媒介に関与しており、したがって、TRE(TPA応答性エレメント)と呼ばれることもある。AP-1は、増殖刺激に対する細胞の早期の応答に関与する複数の遺伝子を活性化する。AP-1応答性遺伝子の例は、FosおよびJun(タンパク質それ自体がAP-1活性を組成する)、Fos関連抗原(Fra)1および2、I κ B、オルニチンデカルボキシラーゼ、およびアネキシンIおよびIIの遺伝子を含む。

【0101】

NF- κ Bプロモーター/結合エレメントはコンセンサス配列GGGACCTTTCを有する。多くの遺伝子がNF- κ B応答性であると同定されていて、その制御エレメントをレポーター遺伝子と連結し、GPCR活性を監視することが可能である。NF- κ Bに応答する遺伝子は、例えばIL-1、TNF- α 、CCR5、P-セレクトリン、Fasリガンド、GM-CSFおよびI κ Bをコードするものを含む。NF- κ B応答性レポーターをコードするベクターは当該技術分野で知られているか、または当該技術分野の通常の技術、例えば合成NF- κ Bエレメントおよび最小プロモーターを用いて、またはNF- κ B制御に従うことが知られる遺伝子のNF- κ B応答性配列を用いて容易に形成可能である。さらに、NF- κ B応答性レポーター構築物は、例えばCLONTECHから商業的に入手可能である。

【0102】

与えられたプロモーター構築物は、構築物をトランスフェクトした、T1R2-TMD発現細胞を、アゴニスト(例えばペリラルチン)に曝露することで簡単に試験できる。アゴニストに応答するレポーター遺伝子の発現における、少なくとも2倍の増大は、レポーターがT1R2-TMD活性を計測するのに適していることを示す。転写アッセイのためのコントロールは、T1R2-TMDを発現しないがレポーター構築物を保持している細胞およびプロモーターのないレポーター構築物を有する細胞の両方を含む。

【0103】

レポーター遺伝子の活性化によって示されるT1R2-TMD活性を調節する剤は、他のプロモーターおよび/または他の受容体を用いて、シグナルのT1R2-TMD特異性を立証し、およびその活性範囲を決定することによって立証可能であり、これにより、あらゆる非特異的シグナル、例えばレポーター遺伝子経路経由の非特異的シグナルなどを排除する。

【0104】

イノシトールリン酸(IP)計測

ホスファチジルイノシトール(PI)加水分解は、少なくとも48時間またはそれ以上の³H-ミオイノシトールによる細胞標識を伴う、米国特許5,436,128に記載されているように決定されてよい。標識細胞は試験剤に1時間接触させ、次いでそれらの細胞を溶解し、クロロホルム-メタノール-水に抽出する。その後、イノシトールリン酸を

10

20

30

40

50

イオン交換クロマトグラフィで分離し、シンチレーションカウンティングで定量する。アゴニストに関して、刺激比 (fold stimulation) は、試験剤の存在下における計数毎分 (cpm) の、緩衝液コントロールの存在下での cpm に対する比を計算して決定される。同じように、阻害剤、アンタゴニストおよび逆アゴニストに関して、阻害比は、試験剤の存在下における計数毎分 (cpm) の、緩衝液コントロール (アゴニストを含有してもしなくてもよい) の存在下での cpm に対する比を計算して決定される。

【0105】

結合アッセイ：

以上に記載されている、リガンド結合に対する機能的応答に起因するパラメータ変化を計測する機能的アッセイに代替して、リガンド結合を、T1R2 - TMD 受容体へのリガンドの結合を計測する結合アッセイで決定してもよい。

結合アッセイは当業者によく知られており、溶液中、任意に固層に付着した二重膜中、単脂質膜中、または小胞中で試験可能である。T1R2 - TMD ポリペプチドへの調節剤の結合は、例えば分光特性 (例えば蛍光、吸収、または屈折率) の変化の計測、水力学的手法 (例えば形状の使用)、クロマトグラフィ、T1R2 - TMD の溶解特性を計測すること等によって決定可能である。1つの態様において、結合アッセイは生物化学的および組換え T1R2 - TMD ポリペプチドを発現する細胞 / 組織からの膜抽出物を利用する。

結合アッセイは、例えば、T1R について Adler et al. によってアメリカ特許出願 20050032158 の段落 [0169] から [0198] に記載されている、その中でアメリカ特許出願 20050032158 が「細胞ベース結合アッセイ」と呼ぶ機能アッセイと区別するために「インビトロ結合アッセイ」と呼ばれていたもののよう实施方式でよい。

【0106】

T1R2 - TMD 受容体ポリペプチドおよび核酸、ならびに実質的に相同なポリペプチドおよび核酸

【0107】

本発明による方法に有用な T1R2 - TMD 受容体は配列番号 2 の受容体か、または代替的に、実質的に相同な受容体 (または T1R2 - TMD 受容体を形成する核酸配列) であって、依然として機能的である (すなわちリガンドと結合し、リガンドによって活性化される) 受容体であってよい。かかる相同的な受容体は、例えば配列番号 2 の対立遺伝子変異体であるか、あるいはラット (約 77.9% のアミノ酸配列同一性および約 81.2% の核酸配列同一性)、マウス (約 76.2% のアミノ酸配列同一性および約 80.9% の核酸配列同一性)、イヌ (約 74.4% のアミノ酸配列同一性および約 82.6% の核酸配列同一性)、またはヒト受容体と十分なアミノ酸配列同一性を有する他のあらゆる種を含む異なる種の対応する相同配列などであってよい。

【0108】

さらに、実質的に相同な T1R2 - TMD 核酸またはポリペプチド配列は、保存的変異および / または点突然変異により形成されてもよく、下記のあらゆる保存的に改変された変異体を含む。

核酸配列について、保存的に改変された変異体は、同一のまたは本質的に同一のアミノ酸配列 (保存的に置換されたアミノ酸、すなわちアルギニンに差し替えられたリシンおよび下記に説明されているさらなる例など) をコードする核酸を意味する。

【0109】

遺伝コードの縮重によって、配列は異なるが機能的に同一な複数の核酸が任意の与えられたポリペプチド / タンパク質をコードする。かかる核酸変異は「サイレント変異」であり、保存的に改変された変異の 1 種である。ポリペプチドをコードするそれぞれの核酸配列はまた、全ての可能な核酸のサイレント変異を記載している。したがって、それぞれの核酸中のコドン (通常メチオニンの唯一のコドンである AUG、および通常トリプトファンの唯一のコドンである TGG を除く) は、同一のポリペプチドを産生する機能的に同一の核酸配列を得るために改変し得る。したがって、ポリペプチドをコードする核酸のそれ

それぞれのサイレント変異は、それぞれの与えられた核酸配列に内在する。

【0110】

アミノ酸配列について、アミノ酸置換は、かかる変化をT1R2 - TMD配列に導入するのに利用することができる、PCR、遺伝子クローニング、cDNAの部位特異的突然変異誘発法、宿主細胞のトランスフェクション、およびインビトロ転写を含む、遺伝子組換え技術の知られた手順を利用して導入することができる。次いで、変異体を、味覚細胞特異的GPCR機能活性についてスクリーニングすることができる。機能的に類似しているアミノ酸を提供する保存的置換表は当該技術分野でよく知られている。例えば、保存的置換を選択する1つの典型的な指針は(オリジナルの残基の後に典型的な置換が続く): ala / gly または ser、arg / lys、asn / gln または his、asp / glu、cys / ser、gln / asn、gly / asp、gly / ala または pro、his / asn または gln、ile / leu または val、leu / ile または val、lys / arg または gln または glu、met / leu または tyr または ile、phe / met または leu または tyr、ser / thr、thr / ser、trp / tyr、tyr / trp または phe、val / ile または leu を含む。

10

【0111】

代替的な典型的な指針は、お互いが保存的置換であるアミノ酸をそれぞれ含有する後続の6群: 1) アラニン(A)、セリン(S)、スレオニン(T)、2) アスパラギン酸(D)、グルタミン酸(E)、3) アスパラギン(N)、グルタミン(Q)、4) アルギニン(R)、リシン(K)、5) イソロイシン(I)、ロイシン(L)、メチオニン(M)、バリン(V)、および6) フェニルアラニン(F)、チロシン(Y)、トリプトファン(W)を利用する。他の代替的な指針は、全ての荷電アミノ酸を、正であるか負であるかで、相互の保存的置換を認めるものである。加えて、独立的コードされた配列における単一のアミノ酸または小さい割合(例えば26%まで、または20%まで、または10%まで、または5%まで)のアミノ酸を変化させ、追加し、または削除する個別の置換、欠失または付加もまた保存的に改変された変異とみなされる。実質的に相同なヌクレオチドまたはペプチド配列は、以下に示す配列同一性の度合いを有するか、または以下に示すある一定のストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズする。

20

【0112】

%配列同一性

実質的に相同なヌクレオチド配列は、例えば少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも98%の%配列同一性を有する。実質的に相同なポリペプチド配列は、例えば少なくとも74%、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95%、または少なくとも98%の%配列同一性を有する。

30

【0113】

配列同一性の計算は、後述のように決定される: BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) は、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>で利用可能なプログラム `blastn` に使用されているヒューリスティックな検索アルゴリズムである。他のヌクレオチド配列に対するヌクレオチドクエリー配列の%同一性を決定するために、10のEXPECT (データベース配列に対する一致を報告するための統計学的に有意な閾値)、およびDUSTフィルタリングを含む、BLASTバージョン2.2.1.3のデフォルトパラメーターを用いた `blastn` が利用される。他のポリペプチド配列に対するポリペプチドクエリー配列の%同一性を決定するために、10のEXPECT、およびDUSTフィルタリングを含む、BLASTバージョン2.2.1.3のデフォルトパラメーターを用いた `blastp` が利用される。

40

【0114】

ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件

ヌクレオチド配列は、本明細書で提示するヌクレオチド配列、またはその相補体と、以下に詳述するストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で選択的にハイブリダイ

50

ズできた場合、実質的に相同であると考えられる。

ストリンジェントな条件は、50%のホルムアミド、5×SSC、および1%のSDSからなる溶液中の42℃の温度、および0.2×SSCおよび0.1%のSDS(1×SSC=0.15MのNaCl、0.015Mのクエン酸ナトリウム、pH7.0)からなる溶液中での65℃での洗浄である。バックグラウンドハイブリダイゼーションは、他のヌクレオチド配列が、例えばスクリーニングされるcDNAまたはゲノムDNA中に存在するために起こり得る。バックグラウンドのシグナル強度の少なくとも2倍、任意にバックグラウンドハイブリダイゼーションのシグナル強度の10倍の陽性シグナルが、標的DNAとの特異的相互作用(すなわち選択的ハイブリダイゼーション)であると考えられる。任意に、標的DNAで観察される特異的相互作用の10倍以下の強度のシグナルはバックグラウンドであると考えられる。相互作用の強度は、例えば、プローブを、例えば³²Pによって放射性標識して計測することができる。

10

【0115】

調節剤を同定するためのキット

キットは、例えば、T1R2-TMDホモマー、もしくはそれと実質的に相同な配列を発現するがT1R3は発現しない組換え細胞を含み、かつ、T1R2-TMDホモマーのアゴニスト、例えば、ペリラルチンまたはメチルカピコールを含む、スクリーニングキットまたはハイスループットスクリーニングキットを含む。

【0116】

任意に、細胞はさらに例えばカルシウムシグナリングのためのGタンパク質を含む。好適なGタンパク質は既知であり、上述されており、当業者は必要な場合にそれをどのように細胞に導入すればよいかを承知している。非常に有用なキメラGタンパク質はGアルファ16-ガストデューシン44である。アゴニストは、例えば1nMから10mM、または0.1マイクロM~1ミリM、例えば0.1マイクロM~100マイクロMなどの好適な濃度で提供される。

20

【0117】

キットの任意構成要素は、提供される組換え細胞を培養するための好適な培地、および、細胞をその上で成長させるための固体支持体、例えば細胞培養皿またはマイクロタイタープレートなどを含んでよく、これらの任意構成要素は当業者が容易に入手できる。

キットは以下のように利用されてよい：

30

(i) 組換え細胞を固体支持体上で成長させる。

(ii) 約1nMまたはそれ以下から100mMまたはそれ以上までの濃度の試験剤を、所定のプレートまたはウェルの培養培地に好適な濃度のアゴニストの存在下で加える。

(iii) 細胞の機能的応答の変化が、試験剤の存在下および非存在下での応答を比較することで決定され、その結果試験剤が調節剤であり得るかどうか決定される。

【0118】

例えば、(iii)は上述のアッセイのいずれかに従い、上述の受容体活性を報告する検出方法のいずれかと組合せて行うことができる。これは、同じく上述された、特別に選択したまたは適応させた組換え細胞を必要とすることがある。好適なアッセイは、例えば、T1R2-TMDの活性化および試験剤に応答したその変化を決定するためのカルシウムフラックスアッセイである。

40

【0119】

同定された調節剤の確認

上述の方法によって同定された調節剤は、フレーバリストのパネルまたは試験者に同定された調節剤をテイスティングさせる単純な官能試験によって簡単に確認し得る。化合物は、例えば、甘味を確認するために水中で、または甘味を増強する調節剤であることを確認するために甘味料と一緒に、調節剤のないネガティブコントロールと比較してテイスティングする。

【0120】

大規模スクリーニングアッセイ

50

上述の転写レポーターアッセイおよびほとんどの細胞ベースのアッセイは、ライブラリーを T 1 R 2 - T M D 活性を調節する剤についてスクリーニングするのに適している。アッセイは、アッセイ工程の自動化および、典型的には平行して実行される（例えばロボットアッセイにおけるマイクロタイタープレート上のマイクロタイター形式など）、任意の好都合な給源からの化合物のアッセイへの供給によって、巨大な化学的ライブラリーをスクリーニングするように設計され得る。

【 0 1 2 1 】

アッセイは、多くの潜在的調節剤を含むコンビナトリアルケミカルまたはペプチドライブラリーの提供を伴う、ハイスループットスクリーニング法で実行されてもよい。かかるライブラリーは、次いで、上述の活性を呈するライブラリー剤（特に化学種またはサブクラス）を同定するために、上述の 1 またはそれ以上のアッセイでスクリーニングされる。こうして同定された調節剤は直接利用でき、または、誘導体を製造および試験することでさらなる調節剤を同定するためのリードとして利用することができる。合成化合物ライブラリーは、Maybridge Chemical Co. (Treciliet, Cornwall, UK)、Comgenex (Princeton, N.J.)、Brandon Associates (Merrimack, N.H.)、およびMicrosource (New Milford, Conn.) を含む多くの企業から商業的に入手可能である。

10

【 0 1 2 2 】

試験剤のライブラリー

コンビナトリアルケミカルライブラリーは、試薬などの多くの化学的「ビルディングブロック」の組合せることにより、化学合成または生物学的合成のいずれかによって生成された様々な化学化合物のコレクションである。例えば、ポリペプチドライブラリーなどのリニアコンビナトリアルケミカルライブラリーは、所定の化合物長（すなわち、ポリペプチド化合物中のアミノ酸の数）について、化学的ビルディングブロック（アミノ酸）のセットをあらゆる可能な方法で組合せることによって形成される。何百万もの化学的化合物が、かかる化学的ビルディングブロックの組合せ混合を通して合成可能である。レアケミカルライブラリーはAldrich (Milwaukee, Wis.) から入手可能である。

20

【 0 1 2 3 】

細菌、真菌、植物および動物抽出物の形態の天然化合物のライブラリーは、例えばPan Laboratories (Bothell, Wash.) またはMycosSearch (NC) から商業的に入手可能であり、あるいは、当該技術分野で知られた方法で容易に生成可能である。さらに、天然および合成的に産生されたライブラリーおよび化合物は、慣用の化学的、物理的および生化学的手法で容易に改変される。他のライブラリーとしては、タンパク質 / 発現ライブラリー、例えば食物、植物、動物、細菌を含む天然給源からの c D N A ライブラリー、1 または 2 以上のポリペプチドをランダムにまたは体系的に変異させた変異体を発現するライブラリー、および 1 つの細胞または組織の m R N A 内容を発現させるのに利用されるウィルスベクターでのゲノムライブラリーを含む。

30

【 0 1 2 4 】

ハイスループットアッセイでは、数千の異なる調節剤またはリガンドを 1 日でスクリーニングすることが可能である。特に、マイクロタイタープレートの各ウェルは、選択された潜在的調節剤に対する別個のアッセイの実施に利用でき、または、濃度またはインキュベーション時間の効果を観察すべき場合、各 5 ~ 10 ウェルで 1 つの増強物を試験可能である。したがって、1 つの標準的なマイクロタイタープレートは約 100 の調節剤をアッセイ可能である。1536 ウェルプレートを利用した場合、1 つのプレートは、約 100 から約 1500 の異なる化合物を、簡単にアッセイ可能である。1 日にいくつかの異なるプレートをアッセイ可能なので、約 6,000 ~ 20,000 の異なる化合物のためのアッセイスクリーニングが可能である。

40

【 0 1 2 5 】

本アッセイ方法で T 1 R 2 - T M D の調節効果を試験し得る試験剤のタイプ

試験剤は、小化学化合物、化学ポリマー、生物ポリマー、ペプチド、タンパク質、糖、炭水化物、核酸および脂質を含む任意の剤であってもよい。剤は、合成化合物、化合物の

50

混合物、天然産物または天然サンプル、例えば植物抽出物、培養上清、または組織サンプルなどであり得る。

【 0 1 2 6 】

甘味料、または甘味を改変する化合物の例として、テアサポニン E 1、アセスルファム K、アリテーム、アスパルテーム、C H 4 0 1、ズルチン、エリスリトール、グアニジン甘味料、イソマルト、イソマルトシルフルクトシド (isomaltosylfructoside)、イソラフィノース、N C 1 7 4、ネオテーム、フェニルアセチルグリシル - L - リシン、サッカリン、S C 4 5 6 4 7、サイクラミン酸ナトリウム、ソルビトール、スクラロース、スクロノン酸 (sucrononic acid)、スオサン (Suosan)、スーパーアスパルテーム、メチルアルファ - L - アラビノシド、メチルベータ - L - アラビノシド、メチルベータ - D - グルコシド、メチル a - D - マンノシド、メチルベータ - L - キシロピラノシド、メチルアルファ - D - キシロシド、メチルアルファ - D - グルコシド 2 , 3 - ジ - スレオニン、メチルアルファ - D - グルコシド 2 , 3 - ジ - イソロイシン、プロトカテク酸、シナリン、グリシフィリン、

10

【 0 1 2 7 】

レバウジオシド C、アブルソシド A (Abrusoside A)、アブルソシド B、アブルソシド C、アブルソシド D、アブルソシド E、アピオグリチルリチン、アラボグリチルリチン、バユノシド、ブラゼイン、プリオズルコシド、カルノシフルオシド V (Carnosifloside V)、カルノシフルオシド V I、D、クミンシー、シクロカリオシド A、シクロカリオシド I、ズルコシド A、フルオレン - 4 - アルファ、6 - ジカルボキシル酸、4 - ベータ、10 - アルファ - ジメチル - 1 , 2 , 3 , 4 , 5 , 10 - ヘキサヒドロ - ガウジカウジオシド A (4-beta, 10-alpha-dimethyl-1,2,3,4,5,10-hexahydor-Gaudichaudioside A)、グリチルリチン酸、ヘルナンズルチン、ヘルナンズルチン、4 ベータ - ヒドロキシ - ヘスペリチン - 7 - グルコシドジヒドロカルコン、ハンキオシド E (Huangqioside E)、ハンキオシド E、

20

【 0 1 2 8 】

3 - ヒドロキシフロリジン、ケンフェロール、2 , 3 - ジヒドロ - 6 - メトキシ 3 - O - アセテート、マピンリンマルトシル - アルファ - (1 , 6) - ネオヘスペリジンジヒドロカルコン、モグロシド I I E、モグロシド I I I、モグロシド I I I E、モグロシド I V、モグロシド V、11 - オキシモグロシド V、モナチン、モネリン、モノアンモニウムグリチルリチン塩 (M a g)、ムクロジオシド I i b (Mukurozioside lib)、ナリンジンジヒドロカルコン、ネオアスチルビン、ネオヘスペリジンジヒドロカルコン (N H D H C)、ネオモグロシド、オスラジン、ペンタジン、ペリアンドリン I、ペリアンドリン I I、ペリアンドリン I I I、ペリアンドリン I V、ペリアンドリン V、フロミソシド I (Phlomisoside I)、フロリジン、フィロズルチン、ポリポドシド A、グリチルリチンカリウムマグネシウムカルシウム、プテロカリオシド A (Pterocaryoside A)、プテロカリオシド B、クエルセチン、

30

【 0 1 2 9 】

2 , 3 - ジヒドロ - 3 - O - アセテート、クエルセチン、2 , 3 - ジヒドロ - 6 - メトキシ - クエルセチン、2 , 3 - ジヒドロ - 6 - メトキシ - 3 - O - アセテート、レバウジオシド A、レバウジオシド B、ルブソシド、スカンデノシド R 6 (Scandenoside R6) シアメノシド I、グリチルリチン酸ナトリウム、ステビオールビオシド、ステビオシド、ステビオシド、アルファ - グリコシルスアピオシド A、スアピオシド B、スアピオシド G、スアピオシド H、スアピオシド I、スアピオシド J、タウマチン、グリチルリチン酸トリアンモニウム (T A G)、トリロバチンセリゲアイン A (Trilobatin Selligueain A)、ヘマトキシリン、マルチトール、マンニトール、メチルアルファ - D - グルコシド 2 , 3 - ジ - アスパラギン酸、安息香酸、2 - (4 - ジメチルアミノベンゾイル) - 安息香酸、2 - ヒドロキシ - 4 - アミノメチル安息香酸、2 - (3 - ヒドロキシ - 4 - メトキシベンゾイル) - メチルベータ - D - フルクトシド、

40

【 0 1 3 0 】

50

メチルアルファ - D - ガラクトシド、メチルベータ - D - ガラクトシド、クルクリン、ストロジン 1、ストロジン 2、ストロジン 4、ミラクリン、フェニル酢酸、3, 4 - ジメトキシ - アミノ安息香酸、3 - アニス酸、ベンジルアルコール、3 - アミノ - 4 - n - プロポキシ 3, 4 - カフェイン酸、ケイ皮酸、ジヒドロキシケイ皮酸、2, 4 - フェルラ酸、加水分解グアーガム、ヒドロキシアミノ安息香酸、2, 4 - ニゲロオリゴサッカリン酸塩、サトウキビバガス抽出物、ジヒドロ安息香酸、2, 3 - ジヒドロ安息香酸、2, 4 - クマル酸、p - ジヒドロ安息香酸、3, 5 - ヒドロキシ安息香酸、3 - グルマリン、ギムネマサポニン I I I、ギムネマサポニン I V、ギムネマサポニン V、ギムネマサポニン I I I、ギムネム酸 I、ギムネム酸 I I、ギムネム酸 I I I、ギムネム酸 I V、ホダルシン、ジュジュバサポニン I I、ジュジュバサポニン I I I、プロピオン酸、(-) - 2 - (4 - メトキシフェノキシ)ジジフィン、

10

【0131】

エチルマルトール、マルトール、ブタン酸、2 - オキソ - 3 - メチルアラニン、N - (1 - メチル - 4 - オキソ - 2 - イミダゾリン - 2 - イル)クレアチニン、アブルソシド E、モノ - メチルエステル、ラクチトール、ペリアンドリン酸 I、モノグルクロニド、ペリアンドリン酸 I I、モノグリクロニド、キシリトール、タガトース、d - ベンゾイルオキシ酢酸、4 - メトキシホズロシド I (4-Methoxy Hoduloside I)、4 - ニトロフェニル α - D - ガラクトシド、4 - ニトロフェニルアルファ - D - グルコシド、4 - ニトロフェニルベータ - D - グルコシド、4 - ニトロフェニルアルファ - D - マンノピラノシド、尿素、(N - (4 - シアノフェニル) - N' - ((ソディオスルホ)メチル)クロランフェニコール、クロロゲン酸、メチルアルファ - D - グルコース、メチルアルファ - D - グルコシド 2, 3 - ジ - アラニン、メチルアルファ - D - グルコシド 2, 3 - ジ - グリシン、

20

【0132】

メチルアルファ - D - グルコシド 2, 3 - ジ - プロリン、メチルアルファ - D - グルコシド 2, 3 - ジ - バリン、アニリン、2 - ブトキシ - 5 - ニトロ - アニリン、2 - エトキシ - 5 - ニトロ - アニリン、2 - メトキシ - 5 - ニトロ - アニリン、3 - ニトロ - (+) - バイユノール - ベータ - D - グルコシド - アルファ - D - グルコシド、アニリン、1, 3 - ヒドロキシ - 4 - メトキシベンジルアニリン、2 - プロポキシ - 5 - ニトロ - (P 4 0 0 0)ベンゾ - 1, 4 - ジオキサン 2 - (3 - ヒドロキシ - 4 - メトキシフェニル) - ベンゾ - 1, 3 - ジオキサン - 4 - オン 2 - (3 - ヒドロキシ 4 - メトキシフェニル)安息香酸、2 - ベンゾイル - 4 - メトキシ - 安息香酸、2 - (4 - メトキシベンゾイル) - ベンゾ - 1, 3 (4 H) - キサチアン、2 - (3 - ヒドロキシ - 4 - メトキシフェニル) - ベンゾ - 1, 4 - キサチアン 3 - (3 - ヒドロキシ - 4 - メトキシフェニル) - ブタン酸、

30

【0133】

4 - [3, 5 - ジヒドロキシ - 4 - [3 - (3 - ヒドロキシ - 4 - メトキシフェニル) - 1 - オキソプロピル]フェノキシ] - 2 - ヒドロキシ - モノナトリウム塩、ブタン酸、4 - [3, 5 - ジヒドロキシ - 4 - [3 - (3 ヒドロキシ - 4 - メトキシフェニル) - 1 - オキソプロピル]フェノキシ] - 3 - オキソ - モノナトリウム塩、シクロヘキサジエン - 1, 4 1 - カルボキシアルデヒド - 4 - (メトキシメチル) -、(E)オキシムエチルベンゼン、ベータ - (1, 3 - ヒドロキシ - 4 - メトキシベンジル) - ヘスペルチンジヒドロカルコン、3' - カルボキシ - ヘスペルチンジヒドロカルコン、3' - ホルミル - イソクマリン、3, 4 - ジヒドロ - 3 - (3 - ヒドロキシ - 4 - メトキシ) - ペリラルチン、8, 9 - エポキシ - フェニル 3 - ヒドロキシ - 4 - メトキシベンジルーエテル、リン酸、[3 - [3, 5 - ジヒドロキシ - 4 - [3 - (3 - ヒドロキシ - 4 - メトキシフェニル) - 1 - オキソプロピル]フェノキシ]プロピル]モノカリウム塩、

40

【0134】

ステビオシドアナログ、スルファミン酸、[2 - [3, 5 - ジヒドロキシ - 4 - [3 - (3 - ヒドロキシ - 4 - メトキシフェニル) - 1 - オキソプロピル]フェノキシ]エチル] - モノカリウム塩、尿素、および N - (4 - シアノフェニル) - N' - (2 - カルボキシ

50

エチル) - L - テアニンを挙げることができる。

【0135】

同定された甘味料は、例えば、甘味知覚を誘発することが可能な人工甘味料が含まれてよい。これらは、例えばカロリーを減少させるためまたは歯にとってより健康な消費材を提供するために、糖化合物の代わりに利用可能であるという点で特に興味がある。消費材は食料製品、飲料、口腔ケア製品、およびかかる製品を混合した組成物、特に風味組成物を含む。風味組成物は、加工食品または飲料の産生を通して添加され得る、またはそれら自身が、例えばソースなどの調味料など、実際に消費材となり得る。甘味料は、菓子類およびデザートを含む他の甘味消費材において特に有用であるが、風味のあるおよび甘酸っぱい消費材においても同じである。消費材の例は、菓子製品、ケーキ、シリアル製品、パン屋製品、パン製品、ガム、チューインガム、ソース(調味料)、スープ、加工食品、調理果物および野菜製品、肉および肉製品、卵製品、乳および乳製品、チーズ製品、バターおよび代替バター製品、代替乳製品、大豆製品、食用油および油脂製品、薬剤、飲料、アルコール飲料、ビール、ソフトドリンク、食品抽出物、植物抽出物、肉抽出物、調味料、甘味料、栄養補助食品、薬剤および非薬剤ガム、錠剤、トローチ、ドロップ、乳剤、エリキシル剤、シロップおよび飲料を作るための他の調製物、インスタント飲料および発泡錠を含む。

10

【0136】

T1R2 - TMD 配列

配列は後述の配列表に示されている。配列番号1はT1R2 - TMD受容体をコードするヌクレオチド/核酸配列に対応し、配列番号2はT1R2 - TMD受容体タンパク質のポリペプチド/アミノ酸配列に対応する。

20

トランスフェクトされた構築物において、新規T1R2 - TMDタンパク質をコードする核酸(配列番号1)がSSTタグ(配列番号3)に後続し、その後にHSVタグ核酸(配列番号5)が続いている。

したがって、得られるタンパク質は、以下のアミノ酸を指示された順序で含む：配列番号4、配列番号2および配列番号6のアミノ酸。

【0137】

配列番号1 + 2 : T1R2 - TMD核酸およびタンパク質

配列番号3 + 4 : SSTタグ核酸およびタンパク質

配列番号5 + 6 : HSVタグ核酸およびタンパク質

配列番号7 + 8 : T1R2 - TMDベクター構築物のフォワードおよびリバースプライマー

配列番号9 + 10 : T1R2全長(核酸およびタンパク質)

配列番号11 + 12 : T1R3全長(核酸およびタンパク質)

30

【0138】

これより以下に、上述の方法を例証する一連の例が続く。以下の例は単なる例示であって、いかようにも本方法またはキットを限定すると解すべきではない。

【0139】

例

全ての例においてヒト受容体を利用する。

40

例1

F1uo - 4カルシウムアッセイ

F1uo - 4は、細胞内カルシウムの蛍光指示薬であり、カルシウム濃度の変化、特にリガンド(例えばベリラルチンまたはメチルカビコール)添加後に起こる受容体活性化に応答した増加の決定を可能にする。

Gアルファ16 - ガストデューション44(G16gust44)を安定発現し、例3に記載されているようにT1R2 - TMDをトランスフェクトしたHEK293細胞を宿主細胞として利用した。

【0140】

50

黒く、底が透明な 96 ウェルプレートを用いたアッセイで利用した。アッセイの前日、プレートに、ウェル毎に 8500 個のトランスフェクト細胞を播種し、用いた細胞に適した成長培地中、37℃で一晩維持した。HEK293 については、高グルコース、L-グルタミン、塩酸ピロキシジンを含む、10%ウシ胎仔血清を添加したダルベッコ改変イーグル培地を HEK293 細胞の成長および維持に利用した。

【0141】

アッセイの際に成長培地を廃棄し、細胞を 1 時間 (37℃にて暗所で)、C1 緩衝溶液に溶解した 1.5 μM の Fluo-4 AM (Molecular Probes™, Invitrogen, US) および 2.5 μM のプロベニシド (Sigma-Aldrich) からなる 50 μl のカルシウムアッセイ溶液でインキュベートした。C1 緩衝溶液は 130 mM の NaCl、5 mM の KCl、10 mM の HEPES、2 mM の CaCl₂ および 10 mM のグルコース (pH 7.4) を含有する。

10

【0142】

最初の 1 時間の負荷期間の後、プレートをウェルあたり 100 μl の C1 緩衝液で 5 回、自動プレート洗浄機 (BioTek) を利用して洗浄し、洗浄の後、Fluo-4-AM の完全な脱エステル化をもたらすために、プレートを室温にて 30 分間暗所でさらにインキュベートした。緩衝溶液を廃棄し、プレートを 100 μl の C1 洗浄緩衝液で洗浄し、最終的に細胞を 180 μl の C1 洗浄緩衝液中に入れた。

【0143】

アッセイの読み取りのため、プレートを FLIPR (蛍光イメージングプレートリーダー (FLIPR-Tetra, Molecular Devices)) 中に置き、受容体活性化を、20 μl の 10×濃縮リガンドストック溶液の添加後に開始させた。

20

蛍光は、リガンド添加前 15 秒間およびリガンド添加後 105 秒間で継続的に監視した (45 ~ 105 秒で十分であろう)。

受容体活性化は相対蛍光単位 (RFU) で与えられ、次の等式で定義される：

蛍光増加 = 最大蛍光 - 基準蛍光

式中、基準蛍光はリガンド添加前の最初の 10 ~ 15 秒について計算した平均蛍光を表す。

【0144】

ネガティブコントロールとして、モックトランスフェクションした細胞を同濃度のリガンドに曝露し、シグナルに対応しない微量のカルシウム濃度を決定した。活性化された受容体を有する細胞は、ネガティブコントロールを有意に上回るシグナル (RFU) によって同定した。

30

【0145】

例 2

T1R2 - TMD ベクター構築物の調製

Pfu ポリメラーゼ (Invitrogen) を利用した PCR を、下記に列挙した特定のプライマーを利用して、T1R2 - TMD 構築物を生成するのに用いた。

T1R2 - TMD フォワードプライマー

5' - T A T A G A A T T C G C A C C C A C C A T C G C T G T G G C C - 3'

40

T1R2 - TMD リバースプライマー

5' - A T A T G C G G C C G C A G T C C C T C C T C A T G G T - 3'

【0146】

PCR 増幅の鋳型は、ヒト茸状乳頭味覚組織から生成された cDNA ライブラリから単離されたヒト T1R2 の全長 cDNA であった。反応条件は、94℃で 5 分間の後、94℃で 45 秒、54℃で 15 秒および 68℃で 1 分を 35 サイクル、その後最終伸長サイクルの 68℃で 10 分間であった。

【0147】

得られた核酸断片 (配列番号 1 を参照) をゲル電気泳動によって分離し、精製し、およ

50

び p C R - T o p o - I I ベクター (Invitrogen) にサブクローニングし、P C R 増幅によって起こった変異が無いことを保証するために、得られたクローンを D N A シークエンシングによって確認した。シークエンシングの後、T 1 R 2 - T M D 挿入物を p c D N A 4 / T O (Invitrogen) に基づく発現カセットにサブクローニングした。クローニングカセットは、導入遺伝子の細胞表面膜標的化を促進するために、ラットソマトスタチンタイプ 3 受容体の最初の 4 5 アミノ酸を N 末端に既に含んでいる (Bufe et al., 2002, Nat. Genet. 32(3), 397 ~ 401 に記載)。

【 0 1 4 8 】

このベクターの C 末端は単純ヘルペスウイルス (H S V) 糖タンパク質 D エピトープをコードしており、このエピトープに結合する特異抗体を利用した免疫細胞化学研究に利用可能である。得られたベクター構築物は、配列番号 4 (ラットソマトスタチンの 4 5 アミノ酸) が前に位置し、配列番号 6 (H S V エピトープ) が後続する (アミノ末端から C 末端方向に) 配列番号 2 (T 1 R 2 - T M D) の連結アミノ酸配列の T 1 R 2 - T M D タンパク質の発現を可能にする。

【 0 1 4 9 】

例 3

細胞への T 1 R 2 - T M D のトランスフェクション、T 1 R 2 - T M D および G 1 6 g u s t 4 4 を安定的に発現する細胞

ヒト T 1 R 2 - T M D を安定的に発現するヒト細胞系を、ヒト T 1 R 2 - T M D (2 で記載したように形成) を含む線状化 p c D N A 4 / T O ベクター (Invitrogen) を W O 2 0 0 4 / 0 5 5 0 4 8 に記載されているように形成した G 1 6 g u s t 4 4 発現細胞系へトランスフェクトすることで作出した。この細胞系は味覚受容体への増強された結合を示し、テトラサイクリンによって誘導され、非特異的 G タンパク質 G 1 6 g u s t 4 4 を安定的に発現し、H E K - 2 9 3 - T - R e x 細胞系 (Invitrogen, USA から商業的に入手可能) に基づいている。

【 0 1 5 0 】

トランスフェクションは以下のように行われた。

0 日目に、H E K 2 9 3 T / G 1 6 g u s t 4 4 細胞を 6 ウェルの黒い、透明底のプレートに、ウェルあたり 9 0 0 , 0 0 0 個の密度で播種し、選択的成長培地で一晚成長させた。1 日目に、培地を抗生物質不含かつ血清不含の成長培地に変更し、細胞を 4 μ g の線状化 T 1 R 2 - T M D ベクター構築物 D N A および 0 . 3 μ l のリポフェクタミン 2 0 0 0 (Invitrogen) を利用してトランスフェクトした。リポフェクタミン / D N A 混合物を細胞上で 3 ~ 4 時間インキュベートし、その後抗生物質不含の血清含有成長培地に交換した。2 4 時間後、細胞を 1 0 % F B S、0 . 0 0 5 m g / m l のブラストシジン、0 . 3 6 m g / m l の G 4 1 8、および 0 . 1 m g / m l のゼオシン (Invitrogen) を添加した D M E M を含有する選択培地に 3 7 $^{\circ}$ C で再播種した。2 ~ 4 週間後ゼオシン耐性コロニーを選択し、拡大し、5 0 μ M のペリラルチンへの応答について例 1 に記載したようにカルシウムイメージングで試験した。

【 0 1 5 1 】

耐性コロニーを拡大し、T 1 R 2 - T M D を含有していることを、1 0 μ g / m l のテトラサイクリンによる T 1 R 2 - T M D 発現の誘導の後に例 1 に記載されている方法を利用して、FLIPR-Tetra 装置 (Molecular Devices) での自動蛍光イメージングを介して決定される 5 0 μ M のペリラルチンへのその応答によって同定した。

【 0 1 5 2 】

全ての潜在的クローンはまた、低レベルであるが機能的に十分なレベルの T 1 R 2 - T M D 受容体を基底的に発現するあらゆるクローンを同定するために、テトラサイクリン誘導の非存在下での 5 0 μ M のペリラルチンへの機能的応答も評価した (T - R e x H E K - 2 9 3 (Invitrogen) などのテトラサイクリン調節システムは、システムの固有の漏出性に起因して、導入遺伝子が基底的に低レベルで発現していることが知られている)。

【 0 1 5 3 】

10

20

30

40

50

前記評価の結果として、これらの細胞系をペリラルチンに曝露した場合、多くの細胞クローンがこの刺激に対して、ネガティブコントロール（非特異的 G タンパク質 G 1 6 g u s t 4 4 を発現するが T 1 R 2 - T M D は発現しない細胞）のシグナルと比較して 1 0 倍以上のシグナルの有意な蛍光の増加を伴って応答することが分かった。

【 0 1 5 4 】

シグナルは、T 1 R 2 - T M D の過剰発現を誘導するためにテトラサイクリンで処理した細胞において顕著に低い。テトラサイクリン誘導 T 1 R 2 - T M D 細胞における応答の欠如は、T 1 R 2 - T M D のテトラサイクリン誘導性の過剰発現によって起こった細胞毒性に起因するものと考えられる。

【表 1】

	平均 [RFU]	標準偏差 [RFU]
T1R2-TMD/G16gust44	973.06	69.48
G16gust44 のみ (ネガティブコントロール)	73.78	55.43

10

【 0 1 5 5 】

例 4

T 1 R 2 / T 1 R 3 甘味受容体ヘテロダイマーおよび G 1 6 g u s t 4 4 を安定的に発現する細胞のトランスフェクション

T 1 R 3 は、テトラサイクリン調節 T 1 R 2 の存在下において、両タンパク質の構成的過剰発現の細胞毒性効果の可能性を回避するために構成的に過剰発現させた。ヘテロダイマーの 1 つのサブユニットをテトラサイクリン調節ベクター内に置くことにより、その発現レベルを調節し、その結果、安定クローン株の生存率および機能性を最適化することが可能となる。

【 0 1 5 6 】

ヒト T 1 R 2 / T 1 R 3 甘味ヘテロダイマーを安定的に発現するヒト細胞系は、まずヒト T 1 R 3 を含む線状化 p I R E S - P u r o ベクター（Clontech）を、W O 2 0 0 4 / 0 5 5 0 4 8 に記載されているように形成した G 1 6 g u s t 4 4 発現細胞系にトランスフェクトすることで作出する。この細胞系は、味覚受容体への増強された結合を示し、テトラサイクリンによって誘導され、非特異的 G タンパク質 G 1 6 g u s t 4 4 を安定的に発現し、H E K - 2 9 3 - T - R e x 細胞系（Invitrogen, USA から商業的に入手可能）に基づいている。T 1 R 3 を安定的に発現する不均一な細胞集団の作出後、ヒト T 1 R 2 c D N A を含む線状化 p c D N A 4 / T O ベクター（Invitrogen）をトランスフェクトした。

30

【 0 1 5 7 】

2 4 時間後、細胞を、1 0 % F B S、0 . 0 0 5 m g / m l のブラストシジン、0 . 3 6 m g / m l の G 4 1 8、および 0 . 4 μ g / m l のピューロマイシンを添加した Glutam ax DMEM（Invitrogen）を含有する選択培地に、1 : 1 5 0 , 0 0 0 までの 1 0 × 希釈で 3 7 にて再播種した。2 週間後、ピューロマイシン耐性の T 1 R 3 発現細胞の不均一な集団を、次いで 4 μ g の線状化 T 1 R 2 ベクター構築物 D N A および 0 . 3 μ l のリポフェクタミン 2 0 0 0（Invitrogen）を利用してトランスフェクトした。リポフェクタミン / D N A 混合物を細胞上で 3 ~ 4 時間インキュベートし、その後抗生物質不含の血清含有成長培地に交換した。2 4 時間後、細胞を 1 0 % F B S、0 . 0 0 5 m g / m l のブラストシジン、0 . 3 6 m g / m l の G 4 1 8、0 . 4 μ g / m l のピューロマイシンおよび 0 . 1 m g / m l のゼオシンを添加した Glutam ax DMEM を含有する選択培地に 3 7 で再播種した。

40

【 0 1 5 8 】

50

耐性コロニーを拡大し、T 1 R 2 / T 1 R 3 甘味ヘテロダイマーを含むことを、例 1 に記載されている方法を利用して、FLIPR-Tetra装置 (Molecular Devices) 上の自動蛍光イメージングにより決定される、スクロース、スクラロース、アスパルテームおよびアセスルファム K を含む様々な甘味化合物へのその応答によって同定した。全ての潜在的クローンはまた、 $10 \mu\text{g} / \text{ml}$ のテトラサイクリン (T 1 R 2 の過剰発現を誘導するため) の存在下における甘味物質に対する機能的な応答について評価し、同様に、低レベルであるが T 1 R 3 と合わさって機能的な甘味ヘテロダイマー複合体を成すことができるのに十分なレベルの T 1 R 2 を基底的に発現するあらゆるクローンを同定するために、テトラサイクリン誘導の非存在下でも試験した (T - R e x H E K - 2 9 3 (Invitrogen) などのテトラサイクリン調節システムは、システム固有の漏出性に起因して、導入遺伝子が基底的に低レベルで発現していることが知られている)。

10

【0159】

前記評価の結果として、テトラサイクリン処理されていないこれらの細胞系が甘味物質に曝露した場合、多くの細胞クローンがこの刺激に対して、有意な蛍光の増加 (ネガティブコントロールと比較して 10 倍以上のシグナル) を伴って応答することが分かった。シグナルは、T 1 R 2 の過剰発現を誘導するためにテトラサイクリンで処理した細胞において顕著に低い。テトラサイクリン誘導 T 1 R 2 / T 1 R 3 細胞における低応答は、T 1 R 2 のテトラサイクリン誘導性の過剰発現によって起こった細胞毒性に起因するものと考えられる。甘味物質に対する最も大きな応答を見せた 1 つのクローン細胞系を増殖させ、T 1 R 2 - T M D 安定セルラインとの後続の比較に利用した。

20

【0160】

シグナルは、T 1 R 2 の過剰発現を誘導するためにテトラサイクリンで処理した細胞において低い。テトラサイクリン誘導 T 1 R 2 / T 1 R 3 細胞における低応答は、T 1 R 2 のテトラサイクリン誘導過剰発現によって起こった細胞毒性に起因するものであろう。甘味物質に対する最も大きな応答を見せた 1 つのクローンセルラインを増殖し、後続の T 1 R 2 - T M D 安定セルラインに対する比較に利用した。

【0161】

例 5

9. T 1 R 2 - T M D アゴニストとしてのペリラルチンの同定

用いた細胞は、例 3 に記載されているように形成した、G 1 6 g u s t 4 4 を安定的に発現し、T 1 R 2 - T M D を安定的にトランスフェクトされた H E K 2 9 3 T 細胞であった。

30

$50 \mu\text{M}$ のペリラルチンに対する細胞内カルシウム応答が決定された。

【0162】

細胞を、黒い、透明底のプレート (Costar) に、8500 細胞 / ウェルの密度で播種し、例 1 で記載したように受容体活性決定の前に選択的成長培地 (例 3 で記載のもの) 中で 48 時間維持した。

選択した特定のクローンは、リガンド刺激に続く細胞内カルシウムの強い増大を生成するのに十分なレベルの T 1 R 2 - T M D を既に基底的に発現しているため、細胞をテトラサイクリンで誘導しなかった。

40

【0163】

データは例 1 で記載したように計算され、 $50 \mu\text{M}$ のペリラルチンによる細胞刺激後の蛍光の基準値以上の正味の増大を示した。データは平均値 \pm 6 回の反復実験の標準偏差を表している。

ペリラルチン刺激によって、カルシウムシグナリングにおける顕著な増大が、ヒト T 1 R 2 - T M D を発現する細胞内で観察されたが、ネガティブコントロール (G 1 6 g u s t 4 4 キメラ G タンパク質のみを発現する宿主細胞) では観察されなかった。

【表 2】

	平均 [RFU]	標準偏差 [RFU]
T1R2-TMD/G16gust44	973.06	69.48
G16gust44 のみ (ネガティブコントロール)	73.78	55.43

【0164】

10

例 6

10. T1R2-TMDホモマーおよびT1R2/T1R3ヘテロダイマーのペリラルチンに対する用量反応曲線

本方法は、T1R2-TMD活性を定量し、例えば、甘味物質を含む同定された候補調節剤の有効性の予測を可能にする。

G16gust44およびT1R2-TMD(例6で記載されているように形成した)を安定的に発現するHEK293T細胞にカルシウム色素Fluo-4を負荷し、そのペリラルチンに対する応答を、例1に記載されているように蛍光カルシウムシグナルを利用して計測する。データは例1に記載されているように計算した(0.1~200マイクロモラーの範囲に及ぶ、ペリラルチンの増大する用量による細胞刺激に続く基準値を超える蛍光の正味の増大量)。データは平均値±3回の反復実験の標準偏差を含んでいる。

20

【0165】

インビボでの妥当性を確認するため、T1R2-TMD発現細胞中でペリラルチンによって誘発されるシグナルの用量反応曲線を、T1R2/T1R3ヘテロダイマーを安定的に発現する細胞中で得られるシグナルと比較した。二つの用量反応曲線は厳密に一致することが見出された(図1参照)。

【0166】

結果は下表に示されており、用量反応曲線は図1に示されている。表中のデータはGraphPad Prismソフトウェアパッケージ(GraphPad Software, Inc.)で、下に示す4パラメータロジスティック非線形回帰方程式を利用して曲線適合した：

30

$$Y = \text{基底値} + (\text{最高値} - \text{基底値}) / (1 + 10^{((\log EC_{50} - X) \times \text{傾斜})})$$

式中、Xはペリラルチン濃度の対数であり、Yは応答である。

Yは下から始まり、上に向かってS字状の姿をとる。

【0167】

これらのデータから最大応答の50%を誘発するアゴニスト濃度を表し、受容体感受性を示す(低いEC50値はアゴニストに対する大きな感受性を示す)、EC50値がこの回帰分析から計算された。計算されたT1R2-TMDのEC50値は6.2マイクロモラーであり、T1R2/T1R3ヘテロダイマーのものは3.5マイクロモラーである。同様の用量依存性および、同じ感受性範囲にある、同様のEC50は、T1R2-TMDが生物学的に関連性のある受容体であることを示している。

40

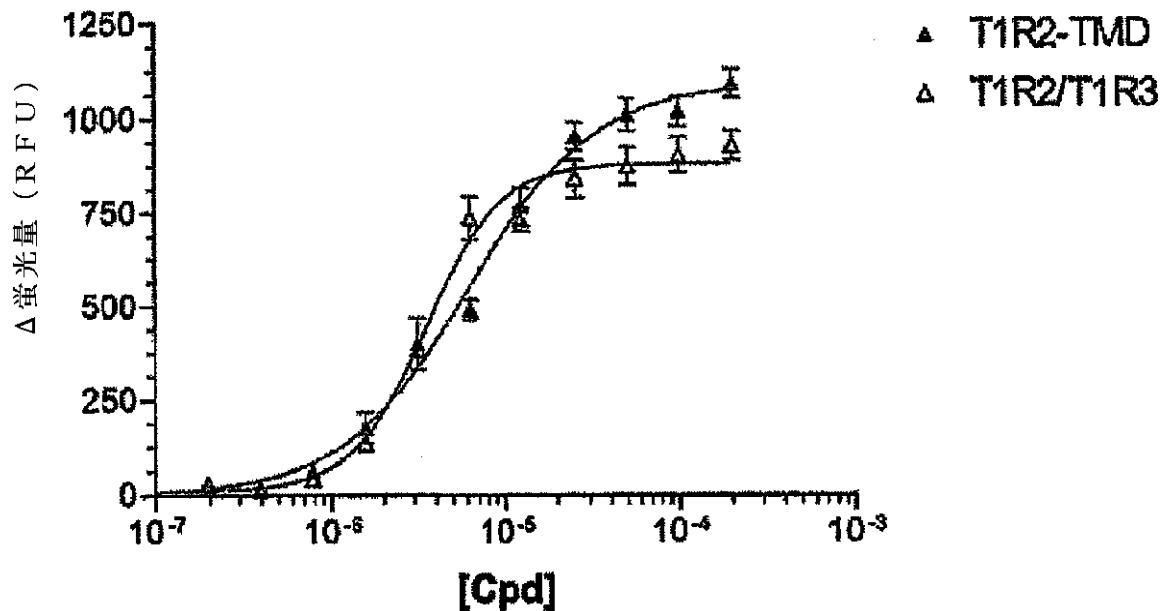
【表 3】

T1R2-TMD		T1R2/T1R3ヘテロダイマー	
平均 [RFU]	標準偏差 [RFU]	平均 [RFU]	標準偏差 [RFU]
1093.24	64.88	929.14	68.45
1019.61	68.83	902.95	82.16
1010.79	73.23	874.83	87.04
953.94	63.83	840.69	87.40
768.43	84.59	730.81	54.59
489.68	45.02	735.04	100.86
399.58	119.53	385.13	24.38
178.86	68.37	140.21	38.04
61.96	7.16	45.33	3.76
20.53	4.77	15.15	7.73
33.09	7.03	28.38	7.75
18.18	2.70	14.90	2.53

10

20

【表 4】



30

40

図 1 T1R2-TMDホモマー（黒三角）およびT1R2/T1R3ヘテロダイマー（白三角）の用量反応曲線

【0168】

例 7

T1R2-TMDを活性化するがT1R2/T1R3ヘテロダイマーは活性化しない化合物の同定

例1に記載のカルシウムフラックスアッセイを利用して、88個の試験剤のパネルがT1R2-TMD受容体依存性応答について評価された。試験剤は最終濃度100マイクロモラーでデュプリケートで試験した。G16gust44を安定的に発現する細胞およびT1R2-TMD含有細胞（例3に記載されているように形成した）内で試験剤によっ

50

て誘発されたシグナルは、G 1 6 g u s t 4 4 および T 1 R 2 / T 1 R 3 ヘテロダイマーを安定的に発現する細胞（例 4 に記載されているように形成した）内で得られたシグナルと比較し、そしてネガティブコントロールとして G 1 6 g u s t 4 4 を安定的に発現する細胞を利用した。

【 0 1 6 9 】

データは例 1 で記載したように計算し（試験剤による細胞刺激後の蛍光の基準値以上の正味の増大）、T 1 R 2 - T M D を強く活性化するが T 1 R 2 / T 1 R 3 ヘテロダイマーまたはネガティブコントロールは僅かにしか誘発しないまたは活性化しない、同定された剤のカルシウムシグナルの結果を下表に示す。データは、1 つの代表実験からの 2 つの複製の平均に対応し、その代表実験は引き続き試験によって確認した。

10

【 0 1 7 0 】

下表に示されている同定された化合物では、T 1 R 2 - T M D を安定的に発現する細胞内における前記化合物による刺激でカルシウムシグナルの顕著な増大が観察された。T 1 R 2 / T 1 R 3 ヘテロダイマーを発現する細胞ではネガティブコントロールを顕著に上回るシグナルは見られなかった。

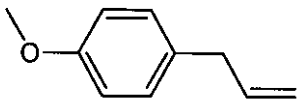
結果は、T 1 R 2 - T M D が T 1 R 2 / T 1 R 3 ヘテロダイマーを活性化しない化合物によって活性化されることを示しており、したがって、T 1 R 2 - T M D ホモマーに基づくアッセイは、T 1 R 3 の存在下で行われる T 1 R 2 / T 1 R 3 ヘテロダイマーに基づくアッセイを利用しては同定できない調節剤を同定できる。

20

【 0 1 7 1 】

メチルカピコール（F E M A # 2 4 1 1、エストラゴール、p - メトキシアリルベンゼン）は、甘味を有することが記載されている既知の香味料であり、その味は次のように記載されている：「甘く、草のような、アニス - ウイキョウ臭（anise-fennel odour）」、「甘く、フェノール性の、アニスのような、辛辣な、香辛料のような、青々とした、ハーブのような、ミントのような」臭いおよび 1 0 p p m で「甘い、甘草の、フェノール性の、雑草のような、香辛料のような、セロリのような」味。

【表 5】

メチルカピコール	T1R2 TMD [RFU]	T1R2/T1R3 [RFU]	ネガティブコントロール [RFU]
	7372.615	777.765	732.195

30

【 0 1 7 2 】

本甘味受容体タンパク質、核酸、方法およびキットは、上記においてある例示的な態様に関して記載されているが、同様の機能を実施するために、他の同様の態様が利用されてよく、または改変および付加が加えられてもよいと理解されるべきである。さらに、全ての開示された実施例は必ずしも互いに排他的ではなく、様々な実施例は必要な特性を提供するために組み合わせてもよい。当業者は、本開示の精神と範囲から離れることなく変更を加えることができる。したがって、本方法およびキットはいかなる単一の態様に限定されるべきではなく、むしろ請求項の記載にしたがった幅および範囲をもって解釈されるべきである。

40

【配列表】

[20095340170000001.xml](#)

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/CH2007/000186

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K14/705		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, Sequence Search, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE Geneseq [Online] 7 April 2005 (2005-04-07), "Human taste receptor, T1R2." XP002451133 retrieved from EBI accession no. GSP:ADW26976 Database accession no. ADW26976 abstract	1-27
X	WO 2005/005480 A (MONELL CHEMICAL SENSES CT [US]; LI XIA [US]; LI WEIHUA [US]; REED DANI) 20 January 2005 (2005-01-20) the whole document	1-27
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *&* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
17 September 2007		10/10/2007
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Young, Craig

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/CH2007/000186

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LI XIAODONG ET AL: "Human receptors for sweet and umami taste" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, WASHINGTON, DC, US, vol. 99, no. 7, 2 April 2002 (2002-04-02), pages 4692-4696, XP002254830 ISSN: 0027-8424 the whole document	1-27
X	----- DATABASE EMBL [Online] 12 April 2002 (2002-04-12), "Homo sapiens taste-specific G-protein coupled receptor T1R2 (TAS1R2) gene, exon 6 and complete cds." XP002451134 retrieved from EBI accession no. EMBL:AF458154 Database accession no. AF458154 abstract	1-27
X	----- WO 02/086079 A (SINAI SCHOOL MEDICINE [US]; MARGOLSKEE ROBERT F [US]; MAX MARIANNA [US] 31 October 2002 (2002-10-31) the whole document	1-27

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/CH2007/000186

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2005005480	A	20-01-2005	AU 2004256023 A1 EP 1639005 A2	20-01-2005 29-03-2006
WO 02086079	A	31-10-2002	CA 2445197 A1 EP 1572871 A2 JP 2005501519 T MX PA03009580 A	31-10-2002 14-09-2005 20-01-2005 06-12-2004

フロントページの続き

(51) Int.Cl.			F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/21		
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/00	A	
C 1 2 P	21/02	(2006.01)	C 1 2 P	21/02	C	

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

F ターム (参考) 4B063 QA01 QA18 QQ08 QQ16 QQ89 QQ91 QR50 QR66 QR77 QS03
 QS28 QS36 QS39 QX02
 4B064 AG20 CA02 CA05 CA10 CA11 CA19 CC24 DA01 DA10
 4B065 AA01X AA57X AA87X AA90Y AB01 BA02 CA42 CA44
 4H045 AA10 AA20 AA30 BA09 CA40 DA50 EA02 FA74