

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】第 1 部門第 1 区分

【発行日】平成24年6月7日(2012.6.7)

【公表番号】特表2009-540804(P2009-540804A)

【公表日】平成21年11月26日(2009.11.26)

【年通号数】公開・登録公報2009-047

【出願番号】特願2009-515685(P2009-515685)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 0 7 K 19/00 (2006.01)

C 0 7 K 14/705 (2006.01)

C 1 2 N 1/15 (2006.01)

C 1 2 N 1/19 (2006.01)

C 1 2 N 1/21 (2006.01)

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 P 21/02 (2006.01)

C 1 2 Q 1/02 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 0 7 K 19/00

C 0 7 K 14/705

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 1/21

C 1 2 N 5/00 A

C 1 2 P 21/02 C

C 1 2 Q 1/02

【手続補正書】

【提出日】平成24年4月12日(2012.4.12)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

少なくとも 1 つの甘味料または甘味増強剤と結合可能な C S R : : T 1 R キメラタンパク質であって、配列番号 2 または配列番号 2 0 と少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する C S R : : T 1 R 2 ポリペプチド、および配列番号 4 または配列番号 2 2 と少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する C S R : : T 1 R 3 ポリペプチドからなる群から選択される 1 または 2 以上の C S R : : T 1 R ポリペプチドを含む、前記 C S R : : T 1 R キメラタンパク質。

【請求項 2】

C S R : : T 1 R 2 / C S R : : T 1 R 3 ヘテロダイマーキメラタンパク質、C S R : : T 1 R 2 / T 1 R 3 ヘテロダイマーキメラタンパク質、および T 1 R 2 / C S R : : T 1 R 3 ヘテロダイマーキメラタンパク質からなる群から選択されるヘテロダイマータンパク質を形成する 2 つのポリペプチドサブユニットを含み、ヘテロダイマーの T 1 R 2 サブユニットが配列番号 8 と少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する ポリペプチドを含有し、

ヘテロダイマーの T 1 R 3 サブユニットが配列番号 1 0 と少なくとも 9 0 % の配列同一性を有するポリペプチドを含む、請求項 1 に記載の C S R : : T 1 R キメラタンパク質。

【請求項 3】

C S R : : T 1 R 2 - a / C S R : : T 1 R 3 - a ヘテロダイマータンパク質、C S R : : T 1 R 2 - b / C S R : : T 1 R 3 - b ヘテロダイマータンパク質、C S R : : T 1 R 2 - a / C S R : : T 1 R 3 - b ヘテロダイマータンパク質、C S R : : T 1 R 2 - b / C S R : : T 1 R 3 - a ヘテロダイマータンパク質または少なくとも 9 0 % の配列同一性を有するヘテロダイマータンパク質からなる群から選択される C S R : : T 1 R 2 / C S R : : T 1 R 3 ヘテロダイマーキメラタンパク質を含む、請求項 2 に記載の 2 つのポリペプチドサブユニットを含む C S R : : T 1 R キメラタンパク質であって、C S R : : T 1 R 2 - a が配列番号 2 に相当し、C S R : : T 1 R 2 - b が配列番号 2 0 に相当し、C S R : : T 1 R 3 - a が配列番号 4 に相当しおよび C S R : : T 1 R 3 - b が配列番号 2 2 に相当する、前記 C S R : : T 1 R キメラタンパク質。

【請求項 4】

少なくとも 1 つの甘味料または甘味増強剤と結合することができる請求項 1 に記載の C S R : : T 1 R キメラタンパク質をコードする核酸であって、5 0 % のホルムアルデヒド、5 × S S C、および 0 . 1 % の S D S からなる溶液中で 4 2 の温度、および 0 . 2 × S S C および 0 . 1 % の S D S からなる溶液中で 6 5 で洗浄されるというストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でのハイブリダイゼーションによって決定された、配列番号 1 ( C S R : : T 1 R 2 - a )、配列番号 1 9 ( C S R : : T 1 R 2 - b )、配列番号 3 ( C S R : : T 1 R 3 - a ) および配列番号 2 1 ( C S R : : T 1 R 3 - b ) からなる群から選択される核酸配列と少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する核酸、配列番号 2 または配列番号 2 0 と少なくとも 9 0 % 以上の配列同一性を有する C S R : : T 1 R 2 ポリペプチドをコードする核酸、および配列番号 4 または配列番号 2 2 と少なくとも 9 0 % 以上の配列同一性を有する C S R : : T 1 R 3 ポリペプチドをコードする核酸の 1 種または 2 種以上を含む、前記核酸。

【請求項 5】

配列番号 6 ( H S V タグ ) をその対応するタンパク質の C 末端またはその付近に含む、請求項 4 に記載の核酸。

【請求項 6】

請求項 4 または 5 で定義された核酸を含む、発現ベクター。

【請求項 7】

請求項 6 で定義された発現ベクターを形質転換された、宿主細胞。

【請求項 8】

安定的に請求項 1 で定義された C S R : : T 1 R キメラタンパク質および G タンパク質、任意に G a q - ガストデューシンと少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する G タンパク質を発現する、宿主細胞。

【請求項 9】

一時的に請求項 1 で定義された C S R : : T 1 R キメラタンパク質および G タンパク質、任意に G a q - ガストデューシンと少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する G タンパク質を発現する、宿主細胞。

【請求項 1 0】

請求項 1 ~ 3 のいずれかで定義された C S R : : T 1 R キメラタンパク質を産生する方法であって、C S R : : T 1 R キメラタンパク質をコードする発現ベクターを含む真核細胞、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た宿主細胞を、発現に十分な条件下で培養し、それによって C S R : : T 1 R キメラタンパク質を形成し、任意にそれを細胞から回収するステップを含む、前記方法。

【請求項 1 1】

味覚細胞における甘味シグナルを調節する剤を同定する方法であって、

( i ) 任意に他の剤の存在下で、剤の、甘味刺激およびカルシウム刺激から選択される刺

激に応答して機能的応答を提供するCSR：：T1Rキメラタンパク質を発現する細胞への接触、および

(ii) 少なくとも1つの剤が、前記細胞中の少なくとも1つの機能応答によって、前記細胞中の前記CSR：：T1Rキメラタンパク質の機能応答に影響するかどうかの決定、を含み、

前記CSR：：T1Rキメラタンパク質が請求項1～3のいずれかに定義されたものである、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。

【請求項13】

Gタンパク質が、Ga<sub>q</sub>-ガストデューシンと少なくとも90%の配列同一性を有するキメラ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Gアルファ16-ガストデューシン44である、請求項13に記載の方法。

【請求項15】

ステップ(ii)が、細胞内メッセンジャーのまたはそれに起因する変化を計測することによって実施される、請求項11に記載の方法。

【請求項16】

機能応答が、IP<sub>3</sub>およびカルシウム<sup>2+</sup>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、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た細胞である、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】

哺乳類細胞が、CHO、COS、HeLaおよびHEK-293細胞からなる群より選択された哺乳類細胞である、請求項18に記載の方法。

【請求項20】

ステップ(i)が、CSR：：T1Rキメラタンパク質と試験剤をカルシウムの存在下で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】

カルシウムが、塩化カルシウムの形態で提供される、請求項20に記載の方法。

【請求項22】

(i) 請求項1～3のいずれかで定義されたCSR：：T1Rキメラタンパク質を発現する遺伝子組換え細胞、および

(ii) CSR：：T1Rキメラタンパク質のアゴニスト

を、CSR：：T1Rキメラタンパク質の調節剤としての試験剤の同定のために組み合わせて利用することを含む、キット。

【請求項23】

(i) CSR：：T1Rキメラタンパク質を発現する遺伝子組換え細胞を成長させること、

(ii) 適切な濃度のアゴニストの存在下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における応答の比較により、細胞の機能的応答における変化を決定すること、ならびにその結果、試験剤が請求項1～3のいずれかで定義されたCSR：：T1Rキメラタンパク質の調節剤であることが同定されること

を含む、請求項22に記載のキットの利用方法。

【請求項24】

請求項1～3のいずれかで定義されたCSR：：T1Rキメラタンパク質を調節する剤

の同定方法であって、

( i ) C S R : : T 1 R キメラタンパク質へのリガンド結合に応答して変化するパラメータを計測すること、および

( i i ) 任意にリガンドの存在下で、試験剤に応答して変化するパラメータの、ネガティブコントロールと比較した変化を決定すること、およびそれによって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 2 5】

リガンドが、カルシウム、カルシウムイオンおよび塩化カルシウムからなる群から選択されたりガンドである、請求項 2 4 に記載の方法。

【請求項 2 6】

ステップ ( i ) が、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 C S R : : T 1 R キメラタンパク質の特性を計測する、請求項 2 4 または 2 5 に記載の方法。