

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局

(43) 国際公開日  
2020年9月3日(03.09.2020)



(10) 国際公開番号

WO 2020/175562 A1

(51) 国際特許分類:

C12Q 1/02 (2006.01) C12N 15/12 (2006.01)  
C12N 5/10 (2006.01) G01N 33/15 (2006.01)  
C07K 14/47 (2006.01) G01N 33/50 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2020/007788

(22) 国際出願日: 2020年2月26日(26.02.2020)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:

特願 2019-033258 2019年2月26日(26.02.2019) JP

(71) 出願人: 味の素株式会社 (AJINOMOTO CO., INC.) [JP/JP]; 〒1048315 東京都中央区京橋一丁目15番1号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 白石 郁美 (SHIRAISHI, Ikumi); 〒2108681 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社内 Kanagawa (JP). 本河 史恵 (HONKAWA, Fumie); 〒2108681 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社内 Kanagawa (JP). 石渡 裕 (ISHIWATARI, Yutaka); 〒2108681 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社内 Kanagawa

(JP). 伊地知 千織 (IJICHI, Chiori); 〒2108681 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社内 Kanagawa (JP).

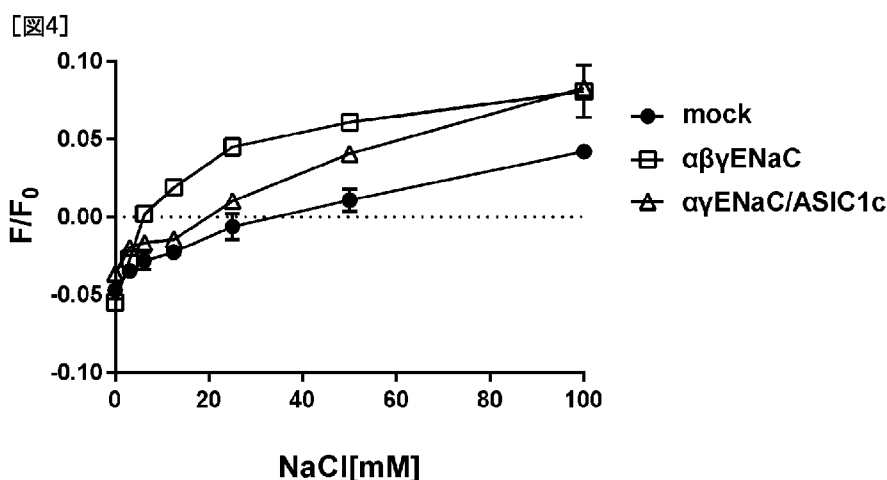
(74) 代理人: 特許業務法人秀和特許事務所 (IP FIRM SHUWA); 〒1030004 東京都中央区東日本橋三丁目4番10号 アクロポリス21ビル8階 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ,

(54) Title: SCREENING METHOD FOR SUBSTANCES REGULATING EFFECTS OF SODIUM

(54) 発明の名称: ナトリウムの作用を調節する物質のスクリーニング方法



(57) Abstract: Provided is a screening method for substances that regulate the effects of sodium. Substances that regulate the effects of sodium are screened using a combination of αENaC protein, γENaC protein, and ASIC1c protein.

(57) 要約: ナトリウムの作用を調節する物質をスクリーニングする方法を提供する。αENaCタンパク質、γENaCタンパク質、およびASIC1cタンパク質を組み合わせることで利用してナトリウムの作用を調節する物質をスクリーニングする。

[続葉有]

TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類：

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

## 明 細 書

発明の名称：

ナトリウムの作用を調節する物質のスクリーニング方法

技術分野

[0001] 本発明は、ナトリウムの作用を調節する物質のスクリーニング方法に関する。

背景技術

[0002] 現代人の食塩摂取量は目標塩分摂取量と比較すると格段に多い。過剰な食塩摂取は高血圧や循環器病に直結することから、減塩が望まれている。現在、減塩のためにはKCl等の塩味代替物質が使用されている。しかし、KClは塩味以外に苦味やえぐ味等を有するため、その使用量に上限がある。そのため、NaClの塩味を増強する物質等の、減塩に有効な物質が求められている。

[0003] 上皮性ナトリウムチャネル (epithelial sodium channel ; ENaC) は、塩味受容体として知られている (非特許文献 1) 。ENaCは、3 種のサブユニット  $\alpha$  ENaC、 $\beta$  ENaC、 $\gamma$  ENaC のヘテロ多量体として機能する。ENaCは、アミロライド (amiloride) によってチャネルとしての機能を阻害される。ヒトやマウスにおいては、アミロライドによる塩味受容の阻害は限局的であることから、ENaCを介する塩味受容機構とそれ以外の塩味受容機構が存在すると考えられている (非特許文献 2) 。ENaC以外の塩味受容体の候補としては、例えば、TRPV1t、TRPML3、Kv3.2、TMC6が見出されている。

[0004] 酸感受性イオンチャネル (acid-sensing ion channel ; ASIC) は、酸味受容体として機能することが示唆されている。ASICは、例えば、ASIC1、ASIC2、ASIC3、ASIC4、ASIC5等のASICサブユニットのホモ多量体またはヘテロ多量体として機能し得る。ASIC1サブユニットとしては、例えば、ASIC1a、ASIC1b、ASIC1cが知られている。また、ASICサブユニットは、例えば、ENaCサブユニットと複合体 (すなわちヘテロ多量体) を形成して機能し得る。例えば、 $\alpha$  ENaC/ASIC1a ( $\alpha$  ENaCとASIC1aの組み合わせ) が、非選択的カチオンチャネ

ルとして機能することが報告されている（非特許文献3）。

## 先行技術文献

### 非特許文献

[0005] 非特許文献1: Chandrashekar J. et al., The cells and peripheral representation of sodium taste in mice. Nature. 2010 Mar 11;464(7286):297-301.

非特許文献2: Roper SD, The taste of table salt. Eur J Physiol. 2015 Mar;467(3):457-63.

非特許文献3: Trac PT. et al., Alveolar nonselective channels are ASIC1a/ $\alpha$ -ENaC channels and contribute to AFC. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2017 Jun 1;312(6):L797-L811.

## 発明の概要

### 発明が解決しようとする課題

[0006] 本発明は、ナトリウムの作用を調節する物質のスクリーニング方法を提供することを課題とする。

### 課題を解決するための手段

[0007] 本発明者は、上記課題を解決するために鋭意検討した結果、イオンチャネルサブユニットの特定の組み合わせである $\alpha$   $\gamma$  ENaC/ASIC1cがナトリウムに強く応答することを見出し、本発明を完成するに至った。

[0008] すなわち、本発明は以下の通り例示できる。

[1]

目的物質をスクリーニングする方法であって、

下記工程（A）～（C）：

（A）試験物質の存在下で $\alpha$   $\gamma$  ENaC/ASIC1cとナトリウムを接触させる工程；

（B）ナトリウムに対する前記 $\alpha$   $\gamma$  ENaC/ASIC1cの応答を測定する工程；および

（C）前記応答に基づいて前記試験物質を目的物質として同定する工程；

を含み、

前記応答が前記試験物質により調節されている場合に、該試験物質を目的物質として同定し、

前記目的物質が、ナトリウムの作用を調節する物質であり、

前記  $\alpha$   $\gamma$  ENaC/ASIC1c が、 $\alpha$  ENaC タンパク質、 $\gamma$  ENaC タンパク質、および ASIC1c タンパク質の組み合わせである、方法。

[ 2 ]

前記応答が、ナトリウムによる前記  $\alpha$   $\gamma$  ENaC/ASIC1c の活性化である、前記方法。

[ 3 ]

前記  $\alpha$   $\gamma$  ENaC/ASIC1c が、細胞、細胞膜、人工脂質二重膜小胞、または人工脂質二重膜に担持された形態で使用される、前記方法。

[ 4 ]

前記  $\alpha$   $\gamma$  ENaC/ASIC1c が、細胞に担持された形態で使用される、前記方法。

[ 5 ]

前記細胞が、動物細胞である、前記方法。

[ 6 ]

前記工程 ( B ) および ( C ) が、それぞれ、下記工程 ( B 1 ) および ( C 1 ) により実施される、前記方法：

( B 1 ) 前記工程 ( A ) を実施した際の前記  $\alpha$   $\gamma$  ENaC/ASIC1c の活性化の程度 D 1 を測定する工程；

( C 1 ) 前記活性化の程度 D 1 に基づいて前記試験物質を目的物質として同定する工程。

[ 7 ]

前記工程 ( C 1 ) が、下記工程 ( C 2 ) により実施される、前記方法：

( C 2 ) 前記活性化の程度 D 1 と対照条件における前記  $\alpha$   $\gamma$  ENaC/ASIC1c の活性化の程度 D 2 との差に基づいて前記試験物質を目的物質として同定する工程。

[ 8 ]

前記対照条件が、下記条件（C 2 - 1）または（C 2 - 2）である、前記方法：

（C 2 - 1）前記試験物質の非存在下で前記  $\alpha$   $\gamma$  ENaC/ASIC1c とナトリウムを接触させる条件；

（C 2 - 2）前記試験物質の存在下で前記  $\alpha$   $\gamma$  ENaC/ASIC1c とナトリウムを接触させる条件であって、該試験物質の濃度が前記工程（A）における該試験物質の濃度よりも低い濃度である条件。

[ 9 ]

さらに、前記活性化の程度 D 2 を測定する工程を含む、前記方法。

[ 1 0 ]

前記目的物質が、ナトリウムの作用を促進または阻害する物質であり、前記応答が前記試験物質により促進されている場合に、前記試験物質をナトリウムの作用を促進する物質として同定し、

前記応答が前記試験物質により阻害されている場合に、前記試験物質をナトリウムの作用を阻害する物質として同定する、前記方法。

[ 1 1 ]

前記活性化の程度 D 1 が前記活性化の程度 D 2 よりも高い場合に、前記試験物質をナトリウムの作用を促進する物質として同定する、前記方法。

[ 1 2 ]

前記活性化の程度 D 1 が前記活性化の程度 D 2 よりも低い場合に、前記試験物質をナトリウムの作用を阻害する物質として同定する、前記方法。

[ 1 3 ]

前記ナトリウムの作用を促進する物質が塩味増強物質であり、前記ナトリウムの作用を阻害する物質が塩味低減物質である、前記方法。

[ 1 4 ]

前記工程（A）において、塩化ナトリウムがナトリウムとして用いられる、前記方法。

[ 1 5 ]

前記応答が、膜電流、膜電位、またはイオン濃度を指標として測定され、該イオン濃度が、細胞内のイオン濃度、人工脂質二重膜小胞内のイオン濃度、または細胞膜もしくは人工脂質二重膜により区分された内部空間内のイオン濃度である、前記方法。

[ 1 6 ]

前記イオン濃度が、ナトリウムイオン濃度、カルシウムイオン濃度、または塩化物イオン濃度である、前記方法。

[ 1 7 ]

前記  $\alpha$  ENaC タンパク質が、下記 (A) または (B) に記載のタンパク質である、前記方法：

(A) 哺乳類の  $\alpha$  ENaC タンパク質；

(B) 2 種またはそれ以上の哺乳類の  $\alpha$  ENaC タンパク質のキメラタンパク質。

[ 1 8 ]

前記  $\alpha$  ENaC タンパク質が、下記 (a)、(b)、または (c) に記載のタンパク質である、前記方法：

(a) 配列番号 2 に示すアミノ酸配列を含むタンパク質；

(b) 配列番号 2 に示すアミノ酸配列において、1～10 個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入、および／または付加を含むアミノ酸配列を含み、且つ、 $\gamma$  ENaC タンパク質および ASIC1c タンパク質との組み合わせでナトリウムに対する応答性を有するタンパク質；

(c) 配列番号 2 に示すアミノ酸配列に対して 80% 以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、且つ、 $\gamma$  ENaC タンパク質および ASIC1c タンパク質との組み合わせでナトリウムに対する応答性を有するタンパク質。

[ 1 9 ]

前記  $\gamma$  ENaC タンパク質が、下記 (A) または (B) に記載のタンパク質である、前記方法：

(A) 哺乳類の $\gamma$ ENaCタンパク質；

(B) 2種またはそれ以上の哺乳類の $\gamma$ ENaCタンパク質のキメラタンパク質

。

[ 2 0 ]

前記 $\gamma$ ENaCタンパク質が、下記 (a)、(b)、または (c) に記載のタンパク質である、前記方法：

(a) 配列番号 6 に示すアミノ酸配列を含むタンパク質；

(b) 配列番号 6 に示すアミノ酸配列において、1～10個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入、および／または付加を含むアミノ酸配列を含み、且つ、 $\alpha$ ENaCタンパク質およびASIC1cタンパク質との組み合わせでナトリウムに対する応答性を有するタンパク質；

(c) 配列番号 6 に示すアミノ酸配列に対して80%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、且つ、 $\alpha$ ENaCタンパク質およびASIC1cタンパク質との組み合わせでナトリウムに対する応答性を有するタンパク質。

[ 2 1 ]

前記ASIC1cタンパク質が、下記 (A) または (B) に記載のタンパク質である、前記方法：

(A) 哺乳類のASIC1cタンパク質；

(B) 2種またはそれ以上の哺乳類のASIC1cタンパク質のキメラタンパク質

。

[ 2 2 ]

前記ASIC1cタンパク質が、下記 (a)、(b)、または (c) に記載のタンパク質である、前記方法：

(a) 配列番号 8 に示すアミノ酸配列を含むタンパク質；

(b) 配列番号 8 に示すアミノ酸配列において、1～10個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入、および／または付加を含むアミノ酸配列を含み、且つ、 $\alpha$ ENaCタンパク質および $\gamma$ ENaCタンパク質との組み合わせでナトリウムに対する応答性を有するタンパク質；



(c) 配列番号8に示すアミノ酸配列に対して80%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、且つ、 $\alpha$ ENaCタンパク質および $\gamma$ ENaCタンパク質との組み合わせでナトリウムに対する応答性を有するタンパク質。

[23]

さらに、同定された目的物質の塩味調節機能を評価する工程を含む、前記方法。

[24]

前記評価が、官能評価によって実施される、前記方法。

[25]

$\alpha$ ENaCタンパク質をコードする遺伝子、 $\gamma$ ENaCタンパク質をコードする遺伝子、およびASIC1cタンパク質をコードする遺伝子が導入された細胞。

[26]

動物細胞である、前記細胞。

## 図面の簡単な説明

[0009] [図1]膜電流を指標として測定した、ENaCサブユニットおよび／またはASIC1cを発現する細胞のナトリウムに対する応答を示す図。データは、平均値 $\pm$ SDとして示す (Water : n=24,  $\alpha$ ENaC and  $\alpha$   $\gamma$ ENaC : n=5, ASIC1c : n=4,  $\alpha$ ENaC/ASIC1c : n=17,  $\alpha$   $\gamma$ ENaC/ASIC1c : n=9,  $\alpha$   $\gamma$ ENaC/ASIC1c+Ami : n=8) 。\* :  $p<0.05$ , \*\*\*\* :  $p<0.0001$ , Tukey' s test.

[図2]膜電流を指標として測定した、ENaCサブユニットを発現する細胞のナトリウムに対する応答を示す図。データは、平均値 $\pm$ SDとして示す (Water : n=10,  $\alpha$   $\beta$ ENaC : n=5,  $\alpha$   $\beta$   $\gamma$ ENaC and  $\alpha$   $\beta$   $\gamma$ ENaC+Ami : n=6) 。

[図3]膜電流を指標として測定した、 $\alpha$   $\beta$   $\gamma$ ENaCまたは $\alpha$   $\gamma$ ENaC/ASIC1cを発現する細胞のカリウムに対する応答を示す図。データは、平均値 $\pm$ SDとして示す (n=5) 。

[図4]細胞内カルシウム濃度を指標として測定した、 $\alpha$   $\beta$   $\gamma$ ENaCまたは $\alpha$   $\gamma$ ENaC/ASIC1cを発現する細胞のナトリウムに対する応答を示す図。データは、2 wellの平均値として示す。

## 発明を実施するための形態

[0010] 以下、本発明を詳細に説明する。

[0011] 本発明の方法は、イオンチャネルサブユニットの特定の組み合わせである  $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cを利用したナトリウムの作用を調節する物質のスクリーニング方法である。ナトリウムの作用を調節する物質を「目的物質」ともいう。本発明の方法においては、 $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cを利用して、目的物質を同定する（すなわち試験物質が目的物質であるかを同定する）ことができる。本発明の方法においては、具体的には、試験物質の存在下でのナトリウムに対する  $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cの応答に基づいて、目的物質を同定する（すなわち当該試験物質が目的物質であるかを同定する）ことができる。本発明の方法においては、より具体的には、ナトリウムに対する  $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cの応答が試験物質により調節されるかに基づいて、目的物質を同定する（すなわち当該試験物質が目的物質であるかを同定する）ことができる。すなわち、本発明の方法は、具体的には、（A）試験物質の存在下で  $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cとナトリウムを接触させる工程；（B）ナトリウムに対する前記  $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cの応答を測定する工程；及び、（C）前記応答に基づいて前記試験物質を目的物質として同定する工程、を含み、前記応答が前記試験物質により調節されている場合に、該試験物質を目的物質として同定する、目的物質のスクリーニング方法であってよい。

[0012] <1>目的物質

「目的物質」とは、ナトリウムの作用を調節する物質をいう。すなわち、目的物質は、ナトリウムの作用を調節する機能を有する。ナトリウムの作用の調節としては、ナトリウムの作用の促進やナトリウムの作用の阻害が挙げられる。すなわち、目的物質としては、ナトリウムの作用を促進する物質やナトリウムの作用を阻害する物質が挙げられる。

[0013] ナトリウムは、例えば、ナトリウムに対する応答性を有するタンパク質に対して作用する。すなわち、ナトリウムの作用の調節としては、そのようなタンパク質に対するナトリウムの作用の調節が挙げられる。また、言い換え

ると、ナトリウムの作用の調節としては、ナトリウムに対するそのようなタンパク質の応答の調節が挙げられる。そのようなタンパク質としては、塩味の受容体が挙げられる。すなわち、ナトリウムの作用は、例えば、塩味として感知され得る。よって、ナトリウムの作用の調節により、塩味を調節することができる期待される。すなわち、目的物質としては、塩味を調節する物質が挙げられる。塩味を調節する物質を、「塩味調節物質」ともいう。すなわち、目的物質は、塩味を調節する機能を有してよい。同機能を「塩味調節機能」ともいう。「塩味の調節」とは、ナトリウムにより惹起される塩味の調節を意味してよく、特に、塩化ナトリウムの塩味の調節を意味してよい。例えば、ナトリウムの作用の促進により、塩味を増強することができる期待される。また、例えば、ナトリウムの作用の阻害により、塩味を低減することができる期待される。すなわち、塩味の調節としては、塩味の増強や塩味の低減が挙げられる。すなわち、目的物質（具体的には塩味調節物質）としては、塩味を増強する物質や塩味を低減する物質が挙げられる。また、ナトリウムの作用を促進する物質としては、塩味を増強する物質が挙げられる。また、ナトリウムの作用を阻害する物質としては、塩味を低減する物質が挙げられる。塩味を増強する物質および塩味を低減する物質を、それぞれ、「塩味増強物質」および「塩味低減物質」ともいう。塩味調節物質は、それ自体が塩味を呈してもよく、呈さなくてもよい。

[0014] 目的物質は、単一の成分からなるもの（すなわち純物質）であってもよく、2種またはそれ以上の成分の組み合わせからなるもの（すなわち混合物）であってもよい。「混合物」を「組成物」ともいう。目的物質が混合物である場合、当該混合物がナトリウムの作用を調節する機能等の上述したような機能を有する限り、当該混合物を構成する各成分は、単独で、ナトリウムの作用を調節する機能等の上述したような機能を有していてもよく、有してなくてもよい。

[0015] <2>試験物質

「試験物質」とは、目的物質の候補として本発明の方法に用いられる物質

をいう。試験物質は、特に制限されない。試験物質は、単一の成分からなるもの（すなわち純物質）であってもよく、2種またはそれ以上の成分の組み合わせからなるもの（すなわち混合物）であってもよい。試験物質が混合物である場合、当該混合物を構成する成分の種類数や構成比率は、特に制限されない。試験物質は、公知物質であってもよく、新規物質であってもよい。試験物質は、天然物であってもよく、人工物であってもよい。試験物質は、例えば、コンビナトリアルケミストリー技術を用いて作製された化合物ライブラリーであってもよい。試験物質としては、例えば、アルコール、ケトン、アルデヒド、エーテル、エステル、炭化水素、糖、有機酸、核酸、アミノ酸、ペプチド、脂質、その他の有機または無機の各種成分が挙げられる。また、試験物質としては、特に、既存の食品添加物が挙げられる。「既存の食品添加物」とは、食品添加物としての使用が認められている物質をいう。試験物質としては、1種の試験物質を用いてもよく、2種またはそれ以上の試験物質を組み合わせ用いてもよい。2種またはそれ以上の成分をまとめて $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cに接触させて本発明の方法を実施することにより、それらの成分の組み合わせが全体として目的物質であるかを同定することができる。

「2種またはそれ以上の成分をまとめて $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cに接触させる」場合としては、混合物である試験物質を $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cに接触させる場合や、2種またはそれ以上の試験物質をまとめて $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cに接触させる場合が挙げられる。

[0016] 試験物質は、例えば、既存の食品添加物等の、上記例示したような物質を含むように選択されてよい。すなわち、試験物質としては、例えば、1種の既存の食品添加物を用いてもよく、2種またはそれ以上の食品添加物を組み合わせ用いてもよく、1種またはそれ以上の食品添加物と1種またはそれ以上の他の成分とを組み合わせ用いてもよい。

[0017] また、試験物質は、例えば、既知の目的物質以外の物質を含むように選択されてよい。「既知の目的物質」とは、ナトリウムの作用を調節する機能等の上述したような機能を有することが既知である物質をいう。すなわち、本

発明の方法からは、試験物質が既知の目的物質からなる場合が除かれてもよい。また、本発明の方法からは、試験物質が既知の目的物質を含む場合が除かれてもよい。

[0018] <3>  $\alpha$   $\gamma$  ENaC/ASIC1c

「 $\alpha$   $\gamma$  ENaC/ASIC1c」とは、 $\alpha$  ENaCタンパク質、 $\gamma$  ENaCタンパク質、およびASIC1cタンパク質の組み合わせをいう。

[0019] 「 $\alpha$  ENaCタンパク質」とは、上皮性ナトリウムチャネル (epithelial sodium channel ; ENaC) の $\alpha$ サブユニットをいう。 $\alpha$  ENaCタンパク質を単に「 $\alpha$  ENaC」ともいう。 $\alpha$  ENaCタンパク質をコードする遺伝子を「 $\alpha$  ENaC遺伝子」ともいう。 $\alpha$  ENaCタンパク質としては、1種の $\alpha$  ENaCタンパク質を用いてもよく、2種またはそれ以上の $\alpha$  ENaCタンパク質を組み合わせ用いてもよい。

[0020] 「 $\gamma$  ENaCタンパク質」とは、上皮性ナトリウムチャネル (epithelial sodium channel ; ENaC) の $\gamma$ サブユニットをいう。 $\gamma$  ENaCタンパク質を単に「 $\gamma$  ENaC」ともいう。 $\gamma$  ENaCタンパク質をコードする遺伝子を「 $\gamma$  ENaC遺伝子」ともいう。 $\gamma$  ENaCタンパク質としては、1種の $\gamma$  ENaCタンパク質を用いてもよく、2種またはそれ以上の $\gamma$  ENaCタンパク質を組み合わせ用いてもよい。

[0021] 「ASIC1cタンパク質」とは、酸感受性イオンチャネル (acid-sensing ion channel ; ASIC) の1cサブユニットをいう。ASIC1cタンパク質を単に「ASIC1c」ともいう。ASIC1cタンパク質をコードする遺伝子を「ASIC1c遺伝子」ともいう。ASIC1cタンパク質としては、1種のASIC1cタンパク質を用いてもよく、2種またはそれ以上のASIC1cタンパク質を組み合わせ用いてもよい。

[0022]  $\alpha$  ENaCタンパク質、 $\gamma$  ENaCタンパク質、およびASIC1cタンパク質を、それぞれ、「イオンチャネルサブユニット」または「サブユニット」ともいう。 $\alpha$  ENaC遺伝子、 $\gamma$  ENaC遺伝子、およびASIC1c遺伝子を、それぞれ、「イオンチャネルサブユニット遺伝子」または「サブユニット遺伝子」ともいう。

[0023]  $\alpha$   $\gamma$  ENaC/ASIC1cは、ナトリウムに対する応答性を有する。すなわち、3つのサブユニット（すなわち $\alpha$  ENaCタンパク質、 $\gamma$  ENaCタンパク質、およびASIC1cタンパク質）の組み合わせは、ナトリウムに対する応答性を有する。言い

換えると、各サブユニットは、他のサブユニットとの組み合わせで、ナトリウムに対する応答性を有する。各サブユニットは、単独で、ナトリウムに対する応答性を有していてもよく、いなくてもよい。 $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cは、各サブユニットと比較して、ナトリウムに対する高い応答性を有してよい。また、 $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cは、3つのサブユニットから選択される2つのサブユニットの組み合わせと比較して、ナトリウムに対する高い応答性を有してよい。「ナトリウムに対する応答性を有する」とは、ナトリウムにより活性化されることを意味してよく、特に、塩化ナトリウムにより活性化されることを意味してよい。また、「ナトリウムに対する応答性を有する」とは、ナトリウムの存在下でナトリウムチャネルとして機能することを意味してよく、特に、塩化ナトリウムの存在下でナトリウムチャネルとして機能することを意味してよい。

[0024] また、 $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cは、例えば、アミロライドの存在下でナトリウムに対する応答性を有してよい。具体的には、例えば、100  $\mu$ Mアミロライドの存在下での $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cのナトリウムに対する応答性は、アミロライドの非存在下での $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cのナトリウムに対する応答性の、80%以上、90%以上、または95%以上であってもよい。

[0025] ナトリウムに対する応答性については、本発明の方法におけるナトリウムに対する $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cの応答の測定についての記載を準用できる。

[0026] サブユニット遺伝子およびサブユニットとしては、各種生物のサブユニット遺伝子およびサブユニットが挙げられる。生物としては、例えば、哺乳類等の動物が挙げられる。哺乳類等の動物として、具体的には、例えば、表1～3に示すものが挙げられる。哺乳類等の動物としては、特に、ヒトが挙げられる。各種生物のサブユニット遺伝子の塩基配列およびサブユニットのアミノ酸配列は、例えば、NCBIやEnsembl等の公開データベースから取得できる。ヒトの $\alpha$ ENaC遺伝子(mRNA)の塩基配列および $\alpha$ ENaCタンパク質のアミノ酸配列を、それぞれ、配列番号1および2に示す。ヒトの $\gamma$ ENaC遺伝子(mRNA)の塩基配列および $\gamma$ ENaCタンパク質のアミノ酸配列を、それぞれ、配列番

号5および6に示す。ヒトのASIC1c遺伝子（mRNA）の塩基配列およびASIC1cタンパク質のアミノ酸配列を、それぞれ、配列番号7および8に示す。なお、配列番号1、5、および7において、mRNAの塩基配列の「U」は「T」に変換して記載した。サブユニットの一例を表1～3に示す。表中、「Identity」は、ClustalWを用いて算出したヒトのサブユニットのアミノ酸配列（配列番号2、6、または8）に対する各生物のサブユニットのアミノ酸配列の同一性を示す。

[0027]

[表1]

表1 dENaC タンパク質の一例

| Organism                           | NCBI Accession No. | Identity [%] |
|------------------------------------|--------------------|--------------|
| <i>Homo sapiens</i>                | NP_001029.1        | 100          |
| <i>Gorilla gorilla gorilla</i>     | XP_018894070.1     | 99.0         |
| <i>Pan paniscus</i>                | XP_008971989.1     | 98.5         |
| <i>Pongo abelii</i>                | XP_024112545.1     | 97.6         |
| <i>Theropithecus gelada</i>        | XP_025258765.1     | 94.5         |
| <i>Mandrillus leucophaeus</i>      | XP_011838331.1     | 94.6         |
| <i>Callithrix jacchus</i>          | XP_009001713.1     | 92.7         |
| <i>Otolemur garnettii</i>          | XP_003796461.2     | 86.8         |
| <i>Tupaia chinensis</i>            | XP_006170913.1     | 79.9         |
| <i>Felis catus</i>                 | XP_003988407.1     | 86.0         |
| <i>Canis lupus familiaris</i>      | XP_005637311.1     | 87.2         |
| <i>Condylura cristata</i>          | XP_004692925.1     | 82.1         |
| <i>Odobenus rosmarus divergens</i> | XP_012422639.1     | 82.1         |
| <i>Ailuropoda melanoleuca</i>      | XP_011227042.1     | 85.8         |
| <i>Rattus norvegicus</i>           | NP_113736.1        | 82.5         |
| <i>Marmota marmota marmota</i>     | XP_015356212.1     | 84.5         |
| <i>Equus przewalskii</i>           | XP_008512147.1     | 84.3         |
| <i>Vicugna pacos</i>               | XP_006210986.2     | 81.8         |
| <i>Enhydra lutris kenyon</i>       | XP_022378086.1     | 84.7         |
| <i>Camelus dromedarius</i>         | XP_010989203.1     | 80.7         |
| <i>Mus musculus</i>                | XP_017176960.1     | 77.6         |
| <i>Castor canadensis</i>           | XP_020013830.1     | 84.3         |
| <i>Bos taurus</i>                  | NP_777023.1        | 83.8         |
| <i>Desmodus rotundus</i>           | XP_024435334.1     | 81.6         |
| <i>Pteropus vampyrus</i>           | XP_011364191.1     | 81.5         |
| <i>Sus scrofa</i>                  | NP_998923.1        | 85.8         |
| <i>Capra hircus</i>                | XP_017904088.1     | 81.6         |
| <i>Ovis aries</i>                  | XP_012031522.1     | 79.8         |
| <i>Physeter catodon</i>            | XP_023985074.1     | 83.5         |
| <i>Octodon degus</i>               | XP_023559504.1     | 69.4         |
| <i>Loxodonta africana</i>          | XP_003410832.2     | 84.3         |
| <i>Orycteropus afer afer</i>       | XP_007935387.1     | 86.1         |
| <i>Gallus gallus</i>               | NP_990476.2        | 57.0         |
| <i>Xenopus tropicalis</i>          | NP_001184124.1     | 55.1         |

[0028]



[表2]

表2  $\gamma$ ENaC タンパク質の一例

| Organism                           | NCBI Accession No. | Identity [%] |
|------------------------------------|--------------------|--------------|
| <i>Homo sapiens</i>                | NP_001030.2        | 100          |
| <i>Gorilla gorilla gorilla</i>     | XP_004057396.1     | 99.5         |
| <i>Pan paniscus</i>                | XP_003813763.1     | 99.4         |
| <i>Pongo abelii</i>                | XP_002826269.1     | 98.8         |
| <i>Theropithecus gelada</i>        | XP_025226930.1     | 98.2         |
| <i>Mandrillus leucophaeus</i>      | XP_011843318.1     | 98.0         |
| <i>Callithrix jacchus</i>          | XP_003734470.1     | 96.9         |
| <i>Otolemur garnettii</i>          | XP_003795771.1     | 90.0         |
| <i>Tupaia chinensis</i>            | XP_006148374.1     | 88.6         |
| <i>Felis catus</i>                 | XP_019676355.1     | 87.5         |
| <i>Canis lupus familiaris</i>      | XP_547093.2        | 87.8         |
| <i>Condylura cristata</i>          | XP_004692127.1     | 87.4         |
| <i>Odobenus rosmarus divergens</i> | XP_004398868.1     | 87.2         |
| <i>Ailuropoda melanoleuca</i>      | XP_002927173.1     | 87.2         |
| <i>Rattus norvegicus</i>           | NP_058742.2        | 86.1         |
| <i>Marmota marmota marmota</i>     | XP_015347056.1     | 85.8         |
| <i>Equus przewalskii</i>           | XP_008534480.1     | 82.7         |
| <i>Vicugna pacos</i>               | XP_006201261.1     | 85.8         |
| <i>Enhydra lutris kenyon</i>       | XP_022382364.1     | 87.0         |
| <i>Manis javanica</i>              | XP_017527916.1     | 86.7         |
| <i>Camelus ferus</i>               | XP_006193183.1     | 85.8         |
| <i>Mus musculus</i>                | NP_035456.1        | 85.4         |
| <i>Castor canadensis</i>           | XP_020009311.1     | 85.5         |
| <i>Bos taurus</i>                  | NP_001180103.1     | 85.4         |
| <i>Desmodus rotundus</i>           | XP_024416231.1     | 86.6         |
| <i>Pteropus alecto</i>             | XP_006912616.1     | 83.4         |
| <i>Sus scrofa</i>                  | XP_003124591.1     | 86.6         |
| <i>Capra hircus</i>                | XP_017896535.1     | 84.6         |
| <i>Ovis aries</i>                  | XP_011959654.1     | 84.6         |
| <i>Physeter catodon</i>            | XP_023979271.1     | 82.9         |
| <i>Octodon degus</i>               | XP_004623177.1     | 82.1         |
| <i>Loxodonta africana</i>          | XP_003418947.2     | 81.0         |
| <i>Orycteropus afer afer</i>       | XP_007951383.1     | 81.8         |
| <i>Gallus gallus</i>               | XP_015149986.1     | 62.9         |
| <i>Xenopus tropicalis</i>          | XP_004918046.1     | 56.4         |

[0029]

[表3]

表3 ASIC1c タンパク質の一例

| Organism                           | NCBI Accession No. | Identity [%] |
|------------------------------------|--------------------|--------------|
| <i>Homo sapiens</i>                | NP_001243759.1     | 100          |
| <i>Gorilla gorilla gorilla</i>     | XP_018894138.1     | 100          |
| <i>Pan paniscus</i>                | XP_008949452.1     | 99.5         |
| <i>Pongo abelii</i>                | XP_024113293.1     | 99.6         |
| <i>Theropithecus gelada</i>        | XP_025259454.1     | 98.8         |
| <i>Mandrillus leucophaeus</i>      | XP_011820034.1     | 98.8         |
| <i>Callithrix jacchus</i>          | XP_017831535.1     | 76.5         |
| <i>Otolemur garnettii</i>          | XP_012661113.1     | 94.8         |
| <i>Tupaia chinensis</i>            | XP_006168241.1     | 95.5         |
| <i>Felis catus</i>                 | XP_003988728.1     | 95.7         |
| <i>Canis lupus familiaris</i>      | XP_005636918.1     | 95.0         |
| <i>Condylura cristata</i>          | XP_004692824.1     | 93.9         |
| <i>Odobenus rosmarus divergens</i> | XP_004400896.1     | 95.2         |
| <i>Ailuropoda melanoleuca</i>      | XP_011227181.1     | 95.7         |
| <i>Rattus norvegicus</i>           | XP_006257440.1     | 93.4         |
| <i>Marmota marmota marmota</i>     | XP_015349078.1     | 95.0         |
| <i>Equus przewalskii</i>           | XP_008510775.1     | 96.1         |
| <i>Vicugna pacos</i>               | XP_006203018.1     | 93.7         |
| <i>Enhydra lutris kenyon</i>       | XP_022375268.1     | 95.3         |
| <i>Manis javanica</i>              | XP_017530778.1     | 95.2         |
| <i>Camelus dromedarius</i>         | XP_010988001.1     | 94.4         |
| <i>Mus musculus</i>                | NP_001276720.1     | 93.2         |
| <i>Castor canadensis</i>           | XP_020010887.1     | 89.3         |
| <i>Bos taurus</i>                  | XP_005206368.1     | 96.4         |
| <i>Desmodus rotundus</i>           | XP_024431275.1     | 94.8         |
| <i>Pteropus alecto</i>             | XP_006916853.1     | 95.3         |
| <i>Sus scrofa</i>                  | XP_020947299.1     | 76.4         |
| <i>Capra hircus</i>                | XP_017903300       | 95.0         |
| <i>Ovis aries</i>                  | XP_004006417.1     | 95.2         |
| <i>Physeter catodon</i>            | XP_007107532.1     | 95.0         |
| <i>Octodon degus</i>               | XP_004637857.1     | 93.4         |
| <i>Loxodonta africana</i>          | XP_023395100.1     | 68.9         |
| <i>Orycteropus afer afer</i>       | XP_007936014.1     | 95.0         |
| <i>Gallus gallus</i>               | XP_015155718.1     | 74.4         |
| <i>Xenopus tropicalis</i>          | XP_004912018.1     | 66.1         |

[0030] すなわち、サブユニット遺伝子は、例えば、上記例示したサブユニットの  
アミノ酸配列をコードする塩基配列（例えば表1～3のNCBI Accession No.

で登録されているアミノ酸配列をコードする塩基配列)を有する遺伝子であってよい。また、サブユニットは、例えば、上記例示したサブユニットのアミノ酸配列(例えば表1~3のNCBI Accession No.で登録されているアミノ酸配列)を有するタンパク質であってよい。なお、「(アミノ酸または塩基)配列を有する」という表現は、特記しない限り、当該「(アミノ酸または塩基)配列を含む」ことを意味し、当該「(アミノ酸または塩基)配列からなる」場合も包含する。

[0031] また、サブユニットとしては、キメラサブユニットも挙げられる。キメラサブユニットとしては、キメラ $\alpha$ ENaCタンパク質、キメラ $\gamma$ ENaCタンパク質、キメラASIC1cタンパク質が挙げられる。なお、キメラサブユニットの説明で言及される「サブユニット」とは、キメラ $\alpha$ ENaCタンパク質の場合には $\alpha$ ENaCタンパク質を、キメラ $\gamma$ ENaCタンパク質の場合には $\gamma$ ENaCタンパク質を、キメラASIC1cタンパク質の場合にはASIC1cタンパク質を指す。「キメラサブユニット」とは、サブユニットのキメラタンパク質(すなわち、2種またはそれ以上のサブユニットのキメラタンパク質)をいう。また、言い換えると、「キメラサブユニット」とは、サブユニットのキメラ配列を有するタンパク質(すなわち、2種またはそれ以上のサブユニットのキメラ配列を有するタンパク質)をいう。「サブユニットのキメラ配列」とは、サブユニットのアミノ酸配列のキメラ配列(すなわち、2種またはそれ以上のサブユニットのアミノ酸配列のキメラ配列)をいう。「サブユニットのキメラ配列」とは、具体的には、サブユニットのアミノ酸配列であって、その部分配列が、1種またはそれ以上の他のサブユニットのアミノ酸配列の部分配列で置換されたアミノ酸配列をいう。キメラサブユニットの構築におけるアミノ酸配列の置換は、サブユニットのアミノ酸配列中の対応する部位間で実施することができる。「サブユニットのアミノ酸配列中の対応する部位」とは、それらサブユニットのアミノ酸配列のアラインメントにおいて対応する位置に配列される部位をいう。キメラサブユニットとしては、例えば、上記例示したサブユニットのキメラタンパク質(具体的には、上記例示したサブユニットから

選択される２種またはそれ以上のサブユニットのキメラタンパク質）が挙げられる。キメラサブユニットとして、具体的には、例えば、哺乳類のキメラサブユニット（具体的には、哺乳類のサブユニットから選択される２種またはそれ以上のサブユニットのキメラタンパク質）が挙げられる。すなわち、サブユニットは、例えば、上記例示したサブユニットのアミノ酸配列のキメラ配列（具体的には、上記例示したサブユニットのアミノ酸配列から選択される２種またはそれ以上のアミノ酸配列のキメラ配列）を有するタンパク質であってもよい。キメラサブユニットとしては、ナトリウムに対する応答性を有するものを選択することができる。

[0032] キメラサブユニットを構成するサブユニットの種類数は、特に制限されない。キメラサブユニットを構成するサブユニットの種類数は、２種であってもよく、３種またはそれ以上であってもよい。

[0033] キメラサブユニットにおける各サブユニットの構成比率は特に制限されない。各サブユニットの構成比率は、キメラサブユニットを構成するサブユニットの構成比率の合計が１００％を超えない範囲で適宜設定することができる。各サブユニットの構成比率は、例えば、１％以上、３％以上、５％以上、１０％以上、２０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、または９９％以上であってもよく、９９％以下、９７％以下、９５％以下、９０％以下、８０％以下、７０％以下、６０％以下、５０％以下、４０％以下、３０％以下、２０％以下、１０％以下、５％以下、３％以下、または１％以下であってもよく、それらの矛盾しない組み合わせであってもよい。「各サブユニットの構成比率」とは、キメラサブユニットを構成するアミノ酸残基の総数に対する各サブユニットに由来するアミノ酸残基の個数の比率をいう。なお、キメラサブユニットを構成するアミノ酸残基が当該キメラサブユニットを構成するサブユニットの保存配列に該当する場合、当該アミノ酸残基はそれらサブユニットのいずれに由来するとみなしてもよい。

[0034] キメラサブユニットにおける各サブユニットに由来する部位の分布態様は

特に制限されない。キメラサブユニットにおいて、各サブユニットに由来する部位は、1ヶ所に固まって存在していてもよく、2ヶ所またはそれ以上に分散して存在していてもよい。例えば、或るサブユニット（サブユニットA）の内部のアミノ酸配列を別のサブユニット（サブユニットB）のアミノ酸配列で置換してキメラサブユニットをデザインした場合、サブユニットAのアミノ酸配列は当該キメラサブユニットのN末側とC末側に分散して残存する。

[0035] 同様に、サブユニット遺伝子としては、キメラサブユニット遺伝子が挙げられる。キメラサブユニットについての記載は、キメラサブユニット遺伝子にも準用できる。

[0036] サブユニット遺伝子は、元の機能が維持されている限り、上記例示したサブユニット遺伝子、例えば表1～3のNCBI Accession No.で登録されているアミノ酸配列をコードする塩基配列またはそれらのキメラ配列を有する遺伝子、のバリエーションであってもよい。同様に、サブユニットは、元の機能が維持されている限り、上記例示したサブユニット、例えば表1～3のNCBI Accession No.で登録されているアミノ酸配列またはそれらのキメラ配列を有するタンパク質、のバリエーションであってもよい。なお、そのような元の機能が維持されたバリエーションを「保存的バリエーション」という場合がある。「 $\alpha$ ENaC遺伝子」、「 $\gamma$ ENaC遺伝子」、および「ASIC1c遺伝子」という用語は、それぞれ、上記例示した $\alpha$ ENaC遺伝子、 $\gamma$ ENaC遺伝子、およびASIC1c遺伝子に加えて、それらの保存的バリエーションを包含するものとする。同様に、「 $\alpha$ ENaCタンパク質」、「 $\gamma$ ENaCタンパク質」、および「ASIC1cタンパク質」という用語は、それぞれ、上記例示した $\alpha$ ENaCタンパク質、 $\gamma$ ENaCタンパク質、およびASIC1cタンパク質に加えて、それらの保存的バリエーションを包含するものとする。保存的バリエーションとしては、例えば、上記例示したサブユニット遺伝子やサブユニットのホモログや人為的な改変体が挙げられる。

[0037] また、由来する生物種で特定されるサブユニット遺伝子は、当該生物種において見出されるサブユニット遺伝子そのものに限られず、当該生物種にお

いて見出されるサブユニット遺伝子の塩基配列を有する遺伝子およびそれらの保存的バリエーションを包含するものとする。同様に、由来する生物種で特定されるサブユニットは、当該生物種において見出されるサブユニットそのものに限られず、当該生物種において見出されるサブユニットのアミノ酸配列を有するタンパク質およびそれらの保存的バリエーションを包含するものとする。それら保存的バリエーションは、当該生物種において見出されてもよく、見出されなくてもよい。例えば、「哺乳類のサブユニット」という用語は、哺乳類において見出されるサブユニットのアミノ酸配列を有するタンパク質およびそれらの保存的バリエーションを包含するものとする。また、例えば、「哺乳類のキメラサブユニット」という用語は、哺乳類において見出されるサブユニットのアミノ酸配列のキメラ配列を有するタンパク質およびそれらの保存的バリエーションを包含するものとする。言い換えると、「哺乳類のキメラサブユニット」を構成するサブユニットは、哺乳類において見出されるサブユニットそのものに限られず、それらの保存的バリエーションであってもよい。

[0038] 「元の機能が維持されている」とは、遺伝子またはタンパク質のバリエーションが、元の遺伝子またはタンパク質の機能（活性や性質）に対応する機能（活性や性質）を有することをいう。遺伝子についての「元の機能が維持されている」とは、遺伝子のバリエーションが、元の機能が維持されたタンパク質をコードすることをいう。すなわち、各サブユニット遺伝子についての「元の機能が維持されている」とは、遺伝子のバリエーションが他のサブユニットとの組み合わせでナトリウムに対する応答性を有するタンパク質（サブユニット）をコードすることをいう。また、各サブユニットについての「元の機能が維持されている」とは、タンパク質（サブユニット）のバリエーションが他のサブユニットとの組み合わせでナトリウムに対する応答性を有することをいう。

[0039] サブユニットの組み合わせがナトリウムに対する応答性を有することは、例えば、当該組み合わせをナトリウムと接触させた際の当該組み合わせの応答を測定することにより、確認できる。

[0040] 以下、保存的バリエーションについて例示する。

[0041] サブユニット遺伝子のホモログまたはサブユニットのホモログは、例えば、上記例示したサブユニット遺伝子の塩基配列または上記例示したサブユニットのアミノ酸配列を問い合わせ配列として用いたBLAST検索やFASTA検索によって公開データベースから容易に取得することができる。また、サブユニット遺伝子のホモログは、例えば、各種生物の染色体を鋳型にして、これら公知のサブユニット遺伝子の塩基配列に基づいて作製したオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いたPCRにより取得することができる。

[0042] サブユニット遺伝子は、元の機能が維持されている限り、上記アミノ酸配列（例えば表1～3のNCBI Accession No.で登録されているアミノ酸配列またはそれらのキメラ配列）において、1若しくは数個の位置での1又は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加されたアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする遺伝子であってもよい。例えば、コードされるタンパク質は、そのN末端および／またはC末端が、延長または短縮されていてもよい。なお上記「1又は数個」とは、アミノ酸残基のタンパク質の立体構造における位置や種類によっても異なるが、具体的には、例えば、1～50個、1～40個、1～30個、好ましくは1～20個、より好ましくは1～10個、さらに好ましくは1～5個、特に好ましくは1～3個を意味する。

[0043] 上記の1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、および／または付加は、タンパク質の機能が正常に維持される保存的変異である。保存的変異の代表的なものは、保存的置換である。保存的置換とは、置換部位が芳香族アミノ酸である場合には、Phe、Trp、Tyr間で、置換部位が疎水性アミノ酸である場合には、Leu、Ile、Val間で、極性アミノ酸である場合には、Gln、Asn間で、塩基性アミノ酸である場合には、Lys、Arg、His間で、酸性アミノ酸である場合には、Asp、Glu間で、ヒドロキシル基を持つアミノ酸である場合には、Ser、Thr間でお互いに置換する変異である。保存的置換とみなされる置換としては、具体的には、AlaからSer又はThrへの置換、ArgからGln、His又

はLysへの置換、AsnからGlu、Gln、Lys、His又はAspへの置換、AspからAsn、Glu又はGlnへの置換、CysからSer又はAlaへの置換、GlnからAsn、Glu、Lys、His、Asp又はArgへの置換、GluからGly、Asn、Gln、Lys又はAspへの置換、GlyからProへの置換、HisからAsn、Lys、Gln、Arg又はTyrへの置換、IleからLeu、Met、Val又はPheへの置換、LeuからIle、Met、Val又はPheへの置換、LysからAsn、Glu、Gln、His又はArgへの置換、MetからIle、Leu、Val又はPheへの置換、PheからTrp、Tyr、Met、Ile又はLeuへの置換、SerからThr又はAlaへの置換、ThrからSer又はAlaへの置換、TrpからPhe又はTyrへの置換、TyrからHis、Phe又はTrpへの置換、及び、ValからMet、Ile又はLeuへの置換が挙げられる。また、上記のようなアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、または逆位等には、遺伝子が由来する生物の個体差、種の違いに基づく場合などの天然に生じる変異（mutant又はvariant）によって生じるものも含まれる。

[0044] また、サブユニット遺伝子は、元の機能が維持されている限り、上記アミノ酸配列全体に対して、例えば、50%以上、65%以上、80%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、さらに好ましくは97%以上、特に好ましくは99%以上の同一性（identity）を有するアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする遺伝子であってもよい。

[0045] また、サブユニット遺伝子は、元の機能が維持されている限り、上記塩基配列（例えば表1～3のNCBI Accession No.で登録されているアミノ酸配列をコードする塩基配列またはそれらのキメラ配列）から調製され得るプローブ、例えば上記塩基配列の全体または一部に対する相補配列、とストリンジエントな条件下でハイブリダイズする遺伝子、例えばDNA、であってもよい。「ストリンジエントな条件」とは、いわゆる特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいう。一例を示せば、同一性が高いDNA同士、例えば、50%以上、65%以上、80%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、さらに好ましくは97%以上、特に好ましくは99%以上の同一性を有するDNA同士がハイブリダイズし、それより同一性が低いDNA同士がハイブリダイズしない条件、あるいは通常のサザンハイブリダイゼー



ションの洗いの条件である60℃、1×SSC、0.1% SDS、好ましくは60℃、0.1×SSC、0.1% SDS、より好ましくは68℃、0.1×SSC、0.1% SDSに相当する塩濃度および温度で、1回、好ましくは2～3回洗浄する条件を挙げることができる。

[0046] 上述の通り、上記ハイブリダイゼーションに用いるプローブは、遺伝子の相補配列の一部であってもよい。そのようなプローブは、公知の遺伝子配列に基づいて作製したオリゴヌクレオチドをプライマーとし、上述の遺伝子を含むDNA断片を鋳型とするPCRによって作製することができる。例えば、プローブとしては、300 bp程度の長さのDNA断片を用いることができる。プローブとして300 bp程度の長さのDNA断片を用いる場合には、ハイブリダイゼーションの洗いの条件としては、50℃、2×SSC、0.1% SDSが挙げられる。

[0047] また、宿主によってコドンの縮重性が異なるので、サブユニット遺伝子は、任意のコドンとそれと等価のコドンに置換したものであってもよい。すなわち、サブユニット遺伝子は、例えば、遺伝コードの縮重による上記例示したサブユニット遺伝子のバリエーションであってもよい。例えば、サブユニット遺伝子は、使用する宿主のコドン使用頻度に応じて最適なコドンを有するように改変されてよい。

[0048] なお、本発明において、「遺伝子」という用語は、目的のタンパク質をコードする限り、DNAに限られず、任意のポリヌクレオチドを包含してよい。すなわち、「サブユニット遺伝子」とは、サブユニットをコードする任意のポリヌクレオチドを意味してよい。サブユニット遺伝子は、DNAであってもよく、RNAであってもよく、その組み合わせであってもよい。サブユニット遺伝子は、一本鎖であってもよく、二本鎖であってもよい。サブユニット遺伝子は、一本鎖DNAであってもよく、一本鎖RNAであってもよい。サブユニット遺伝子は、二本鎖DNAであってもよく、二本鎖RNAであってもよく、DNA鎖とRNA鎖からなるハイブリッド鎖であってもよい。サブユニット遺伝子は、単一のポリヌクレオチド鎖中に、DNA残基とRNA残基の両方を含んでいてもよい。サブユニット遺伝子がRNAを含む場合、上記例示した塩基配列等のDNAに関する記

載は、RNAに合わせて適宜読み替えてよい。サブユニット遺伝子は、イントロンを含んでいてもよく、含んでいなくてもよい。サブユニット遺伝子の態様は、その利用態様等の諸条件に応じて適宜選択できる。

[0049] なお、アミノ酸配列間の「同一性」とは、blastpによりデフォルト設定のScoring Parameters (Matrix: BLOSUM62; Gap Costs: Existence=11, Extension=1; Compositional Adjustments: Conditional compositional score matrix adjustment) を用いて算出されるアミノ酸配列間の同一性を意味する。また、塩基配列間の「同一性」とは、blastnによりデフォルト設定のScoring Parameters (Match/Mismatch Scores=1,-2; Gap Costs=Linear) を用いて算出される塩基配列間の同一性を意味する。

[0050] また、サブユニットは、サブユニットの保存配列（すなわち、2種またはそれ以上のサブユニットのアミノ酸配列の保存配列）の一部または全部を有していてもよい。なお、保存配列の説明で言及される「サブユニット」とは、 $\alpha$ ENaCタンパク質が有する保存配列の場合には $\alpha$ ENaCタンパク質を、 $\gamma$ ENaCタンパク質が有する保存配列の場合には $\gamma$ ENaCタンパク質を、ASIC1cタンパク質が有する保存配列の場合にはASIC1cタンパク質を指す。サブユニットは、例えば、上記例示したサブユニットの保存配列（具体的には、上記例示したサブユニットから選択される2種またはそれ以上のサブユニットのアミノ酸配列の保存配列）の一部または全部を有していてもよい。サブユニットは、具体的には、例えば、哺乳類のキメラサブユニットの保存配列（具体的には、哺乳類のサブユニットから選択される2種またはそれ以上のサブユニットのアミノ酸配列の保存配列）の一部または全部を有していてもよい。また、サブユニットは、例えば、表1～3のNCBI Accession No.で登録されているアミノ酸配列（ $\alpha$ ENaCタンパク質について計34個、 $\gamma$ ENaCタンパク質について計35個、ASIC1cタンパク質について計35個）のアラインメントにおいて、10個以上、20個以上、または30個以上のアミノ酸配列において保存されているアミノ酸配列の一部または全部を有していてもよい。保存配列は対象のアミノ酸配列のアラインメントにより決定できる。保存配列の

一部または全部としては、保存配列の10%以上、30%以上、50%以上、70%以上、90%以上、または100%の領域が挙げられる。

[0051] また、サブユニットは、上述したようなサブユニットのアミノ酸配列に加えて、その他のアミノ酸配列を含んでいてもよい。すなわち、サブユニットは、上述したようなサブユニットのアミノ酸配列とその他のアミノ酸配列との融合タンパク質であってもよい。その他のアミノ酸配列は、サブユニットがナトリウムに対する応答性を損なわない限り、特に制限されない。その他のアミノ酸配列としては、例えば、HisタグやV5エピトープタグ等のタグ配列が挙げられる。その他のアミノ酸配列は、例えば、サブユニットのN末端、若しくはC末端、又はその両方に連結されていてよい。

[0052] サブユニットは、目的物質のスクリーニングに利用可能な任意の形態で 사용할ことができる。すなわち、具体的には、サブユニットは、 $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cが試験物質と接触でき、且つ $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cがナトリウムに対する応答性を有する限り、任意の形態で 사용할ことができる。サブユニットの使用形態は、本発明の方法の実施態様等の諸条件に応じて適宜設定できる。

[0053] サブユニットは、例えば、精製物や粗精製物等の所望の程度に単離された形態で使用されてもよく、素材に含有された形態で使用されてもよい。サブユニットは、具体的には、例えば、構造物に担持された形態で使用されてもよい。構造物としては、例えば、細胞、細胞膜、人工脂質二重膜小胞、人工脂質二重膜が挙げられる。構造物としては、特に、細胞が挙げられる。言い換えると、サブユニットは、例えば、サブユニットを有する細胞、サブユニットを有する細胞膜、サブユニットを有する人工脂質二重膜小胞、またはサブユニットを有する人工脂質二重膜等のサブユニットを有する（担持する）構造物の形態で 사용할ことができる。これらサブユニットを有する構造物も、例えば、所望の程度に単離された形態で使用されてもよく、素材に含有された形態で使用されてもよい。また、サブユニットは、器具の一部を構成していてもよい。すなわち、サブユニットは、例えば、サブユニットを備える器具の形態で 사용할こともできる。サブユニットを備える器具としては

、例えば、サブユニットが固定化された器具や、サブユニットを有する構造物（脂質二重膜等）を備える器具が挙げられる。脂質二重膜を備える器具としては、例えば、脂質二重膜を配列したチップ（W02005/000558；Watanabe R. et al., Arrayed lipid bilayer chambers allow single-molecule analysis of membrane transporter activity, Nat Commun, 2014 Jul 24;5:4519.；Kamiya K. et al., Preparation of artificial cell membrane and single ion channel measurement, Electrochemistry, 83, 1096-1100 (2015)) や、液滴接触法により調製された脂質二重膜を備えるイオンチャネル測定デバイス（Kawano R. et al., Automated Parallel Recordings of Topologically Identified Single Ion Channels, Scientific Reports, 3, No. 1995 (2013)) が挙げられる。これらの形態のサブユニットは、いずれも、本発明の方法で使用されるサブユニットの範囲に含まれる。

[0054] サブユニットは、例えば、サブユニット遺伝子を発現させることにより製造できる。サブユニット遺伝子の発現は、例えば、細胞を用いて実施してもよいし、無細胞タンパク質合成系を用いて実施してもよい。細胞を用いたサブユニット遺伝子の発現については、後述するサブユニットを有する細胞の説明を参照できる。発現したサブユニットは、適宜、上述したような形態で取得し、本発明の方法に利用できる。

[0055] サブユニットを有する細胞を「本発明の細胞」ともいう。サブユニットは、例えば、細胞膜に局在して機能し得る。よって、本発明の細胞は、サブユニットを、例えば、細胞膜に有してよい。

[0056] サブユニットは、サブユニット遺伝子から発現する。よって、本発明の細胞は、サブユニット遺伝子を有する。本発明の細胞は、具体的には、サブユニット遺伝子を発現可能に有する。なお、本発明の細胞は、サブユニットを発現するまでサブユニット遺伝子を有していれば足りる。すなわち、本発明の細胞は、サブユニットの発現後には、サブユニット遺伝子を有していてもよく、いなくてもよい。また、本発明の細胞は、言い換えると、サブユニット遺伝子を発現した細胞であり、また、サブユニットを発現した細胞である。

。なお、「サブユニット遺伝子の発現」と「サブユニットの発現」とは同義に用いられ得る。

[0057] 本発明の細胞は、各サブユニット遺伝子について、1コピーのサブユニット遺伝子を有していてもよく、2コピーまたはそれ以上のサブユニット遺伝子を有していてもよい。また、本発明の細胞は、各サブユニット遺伝子について、1種のサブユニット遺伝子を有していてもよく、2種またはそれ以上のサブユニット遺伝子を有していてもよい。また、本発明の細胞は、各サブユニットについて、1種のサブユニットを有していてもよく、2種またはそれ以上のサブユニットを有していてもよい。

[0058] 本発明の細胞は、本来的にサブユニット遺伝子を有するものであってもよく、サブユニット遺伝子を有するように改変されたものであってもよい。

[0059] 本来的にサブユニット遺伝子を有する細胞としては、上記のようなサブユニット遺伝子が由来する生物の細胞、例えば、ヒト等の哺乳類の味細胞、が挙げられる。本来的にサブユニット遺伝子を有する細胞は、例えば、当該細胞を含む生物体や組織から取得することができる。

[0060] サブユニット遺伝子を有するように改変された細胞としては、サブユニット遺伝子が導入された細胞が挙げられる。本発明の細胞は、例えば、 $\alpha$ ENaC遺伝子、 $\gamma$ ENaC遺伝子、およびASIC1c遺伝子から選択される1種またはそれ以上の遺伝子が導入された細胞であってよい。本発明の細胞は、例えば、 $\alpha$ ENaC遺伝子、 $\gamma$ ENaC遺伝子、およびASIC1c遺伝子が導入された細胞であっててもよい。

[0061] なお、本発明の細胞およびそれを取得するために用いられる細胞（例えば、サブユニット遺伝子が導入される又は導入された細胞）を総称して「宿主細胞」ともいう。

[0062] 宿主細胞は、機能するサブユニットを発現でき、以て目的物質のスクリーニングに利用可能なものであれば特に制限されない。宿主細胞としては、例えば、細菌細胞、真菌細胞、植物細胞、昆虫細胞、および動物細胞が挙げられる。好ましい宿主細胞としては、真菌細胞、植物細胞、昆虫細胞、および

動物細胞等の真核細胞が挙げられる。より好ましい宿主細胞としては、動物細胞が挙げられる。動物としては、例えば、哺乳類、鳥類、両生類が挙げられる。哺乳類としては、例えば、げっ歯類や霊長類が挙げられる。げっ歯類としては、例えば、チャイニーズハムスター、ハムスター、マウス、ラット、モルモットが挙げられる。霊長類としては、例えば、ヒト、サル、チンパンジーが挙げられる。鳥類としては、例えば、ニワトリが挙げられる。両生類としては、例えば、アフリカツメガエルが挙げられる。また、宿主細胞が由来する組織または細胞は特に制限されない。宿主細胞が由来する組織または細胞としては、例えば、卵巣、腎臓、副腎、舌上皮、嗅上皮、松果体、甲状腺、メラノサイトが挙げられる。チャイニーズハムスターの細胞としては、例えば、チャイニーズハムスター卵巣由来細胞株（CHO）が挙げられる。CHOとして、具体的には、例えば、CHO-DG44やCHO-K1が挙げられる。ヒトの細胞としては、例えば、ヒト胎児腎細胞由来細胞株（HEK）が挙げられる。HEKとして、具体的には、例えば、HEK293やHEK293Tが挙げられる。サルの細胞としては、例えば、アフリカミドリザル腎細胞由来細胞株（COS）が挙げられる。COSとして、具体的には、例えば、COS-1が挙げられる。アフリカツメガエルの細胞としては、例えば、アフリカツメガエル卵母細胞が挙げられる。昆虫細胞としては、例えば、Sf9、Sf21、SF+等の*Spodoptera frugiperda*由来細胞や、High-Five等の*Trichoplusia ni*由来細胞が挙げられる。宿主細胞は、個々の独立した細胞（例えば遊離の細胞）であってもよいし、組織等の集合体を形成していてもよい。

[0063] サブユニット遺伝子は、サブユニット遺伝子を有する生物からのクローニングにより取得できる。クローニングには、同遺伝子を含むゲノムDNAやcDNA等の核酸を利用できる。また、サブユニット遺伝子は、化学合成によっても取得できる（Gene, 60(1), 115-127 (1987)）。

[0064] 取得したサブユニット遺伝子は、そのまま、あるいは適宜改変して、利用することができる。すなわち、サブユニット遺伝子を改変することにより、そのバリエーションを取得することができる。遺伝子の改変は公知の手法により

行うことができる。例えば、部位特異的変異法により、DNAの目的部位に目的の変異を導入することができる。すなわち、例えば、部位特異的変異法により、コードされるタンパク質が特定の部位においてアミノ酸残基の置換、欠失、挿入、および／または付加を含むように、遺伝子のコード領域を改変することができる。部位特異的変異法としては、PCRを用いる方法（Higuchi, R., 61, in PCR technology, Erlich, H. A. Eds., Stockton press (1989); Carter, P., Meth. in Enzymol., 154, 382 (1987)) や、ファージを用いる方法（Kramer, W. and Frits, H. J., Meth. in Enzymol., 154, 350 (1987); Kunkel, T. A. et al., Meth. in Enzymol., 154, 367 (1987)) が挙げられる。また、サブユニット遺伝子のバリエントを化学合成によって直接取得してもよい。

[0065] サブユニット遺伝子を宿主細胞に導入する形態は特に制限されない。サブユニット遺伝子は、発現可能に宿主細胞に保持されていればよい。具体的には、例えば、サブユニット遺伝子をDNA等の転写を要する形態で導入する場合、宿主細胞において、サブユニット遺伝子は、当該宿主細胞で機能するプロモーターの制御下で発現可能に保持されていればよい。宿主細胞において、サブユニット遺伝子は、染色体外に存在していてもよく、染色体上に導入されていてもよい。2つまたはそれ以上の遺伝子を導入する場合、各遺伝子が、発現可能に宿主細胞に保持されていればよい。

[0066] サブユニット遺伝子を発現させるためのプロモーターは、宿主細胞において機能するものであれば特に制限されない。「宿主細胞において機能するプロモーター」とは、宿主細胞においてプロモーター活性を有するプロモーターをいう。プロモーターは、宿主細胞由来のプロモーターであってもよく、異種由来のプロモーターであってもよい。プロモーターは、サブユニット遺伝子の固有のプロモーターであってもよく、他の遺伝子のプロモーターであってもよい。プロモーターは、サブユニット遺伝子の固有のプロモーターよりも強力なプロモーターであってもよい。例えば、動物細胞において機能するプロモーターとしては、SV40プロモーター、EF1aプロモーター、RSVプロモ

ーター、CMVプロモーター、SRalphaプロモーターが挙げられる。また、プロモーターとしては、各種レポーター遺伝子を用いることにより、在来プロモーターの高活性型のものを取得し利用してもよい。プロモーターの強度の評価法および強力なプロモーターの例は、Goldsteinらの論文（Prokaryotic promoters in biotechnology. *Biotechnol. Annu. Rev.*, 1, 105-128 (1995)）等に記載されている。

[0067] サブユニット遺伝子は、例えば、同遺伝子を含むベクターを用いて宿主細胞に導入することができる。サブユニット遺伝子を含むベクターを、「サブユニット遺伝子の発現ベクター」ともいう。サブユニット遺伝子の発現ベクターは、例えば、サブユニット遺伝子を含むDNA断片をベクターと連結することにより、構築することができる。サブユニット遺伝子の発現ベクターを宿主細胞に導入することにより、同遺伝子を宿主細胞に導入することができる。ベクターは、薬剤耐性遺伝子などのマーカーを備えていてもよい。また、ベクターは、挿入された遺伝子を発現するためのプロモーター等の発現調節配列を備えていてもよい。ベクターは、宿主細胞の種類やサブユニット遺伝子の導入形態等の諸条件に応じて適宜選択できる。例えば、動物細胞への遺伝子導入に用いることができるベクターとしては、プラスミドベクターやウイルスベクターが挙げられる。ウイルスベクターとしては、例えば、レトロウイルスベクターやアデノウイルスベクターが挙げられる。プラスミドベクターとしては、例えば、pcDNAシリーズベクター（pcDNA3.1等；Thermo Fisher Scientific）、pBApo-CMVシリーズベクター（タカラバイオ）、pCI-neo（Promega）が挙げられる。なお、ベクターの種類や構成によっては、ベクターは、宿主細胞の染色体に組み込まれ得るし、宿主細胞の染色体外で自律複製し得るし、あるいは宿主細胞の染色体外に一時的に保持され得る。例えば、SV40複製起点等のウイルスの複製起点を有するベクターは、動物細胞の染色体外で自律複製し得る。具体的には、例えば、pcDNAシリーズベクターはSV40複製起点を有しており、SV40のラージT抗原を発現する宿主細胞（COS-1やHEK293T等）において染色体外で自律複製し得る。



- [0068] また、サブユニット遺伝子は、例えば、同遺伝子を含む核酸断片を宿主細胞に導入することによっても、宿主細胞に導入することができる。サブユニット遺伝子を含む核酸断片を、「サブユニット遺伝子断片」ともいう。そのような断片としては、直鎖状DNAや直鎖状RNAが挙げられる。直鎖状RNAとしては、例えば、mRNAやcRNAが挙げられる。
- [0069] ベクターや核酸断片等の核酸を宿主細胞に導入する方法は、宿主細胞の種類等の諸条件に応じて適宜選択できる。例えば、動物細胞等の宿主細胞にベクターや核酸断片等の核酸を導入する方法としては、DEAEデキストラン法、リン酸カルシウム法、リポフェクション法、エレクトロポレーション法、マイクロインジェクション法が挙げられる。また、ベクターがウイルスベクターである場合は、同ベクター（ウイルス）を宿主細胞に感染させることにより、宿主細胞に同ベクターを導入することができる。
- [0070] また、本来的にサブユニット遺伝子を有する細胞を、サブユニット遺伝子の発現が増大するよう改変して用いてもよい。「遺伝子の発現が増大する」とは、同遺伝子の細胞当たりの発現量が非改変細胞と比較して増大することを意味する。ここでいう「非改変細胞」とは、標的の遺伝子の発現が増大するように改変されていない対照細胞を意味する。非改変細胞としては、野生型の細胞や改変元の細胞が挙げられる。サブユニット遺伝子の発現を増大させる手法としては、サブユニット遺伝子のコピー数を増加させることやサブユニット遺伝子の転写効率や翻訳効率を向上させることが挙げられる。サブユニット遺伝子のコピー数の増加は、サブユニット遺伝子を宿主細胞に導入することにより達成できる。サブユニット遺伝子の導入は、上述したように実施できる。なお、導入されるサブユニット遺伝子は、宿主細胞由来であってもよく、異種由来であってもよい。サブユニット遺伝子の転写効率や翻訳効率の向上は、プロモーター等の遺伝子の発現調節配列の改変により達成できる。例えば、サブユニット遺伝子の転写効率の向上は、サブユニット遺伝子のプロモーターをより強力なプロモーターに置換することにより達成できる。

[0071] 本発明の細胞は、目的物質のスクリーニングに利用できる限り、その他の任意の性質を有してよい。そのような性質としては、例えば、ナトリウムに対するサブユニットの応答を測定するために有用な性質が挙げられる。

[0072] 本発明の細胞は、例えば、サブユニット以外の呈味受容体（「他の呈味受容体」ともいう）を有していてもよく、有していなくてもよい。本発明の細胞は、他の呈味受容体を有しないのが好ましい場合があり得る。他の呈味受容体を有しない細胞としては、他の呈味受容体をコードする遺伝子を有しない細胞や、他の呈味受容体をコードする遺伝子を有するが同遺伝子を発現していない細胞が挙げられる。本発明の細胞は、例えば、本来的に他の呈味受容体を有しないものであってもよく、他の呈味受容体を有しないように改変されたものであってもよい。他の呈味受容体を有しないように細胞を改変することは、例えば、他の呈味受容体をコードする遺伝子をノックアウトすることにより達成できる。

[0073] また、本発明の細胞は、例えば、 $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cの活性化に直接的または間接的に応答するタンパク質を有していてもよい。言い換えると、本発明の細胞は、そのようなタンパク質をコードする遺伝子を有してよい。そのようなタンパク質としては、カルシウムチャネルや塩素チャネルが挙げられる。カルシウムチャネルとして、具体的には、電位依存性カルシウムチャネルが挙げられる。塩素チャネルとして、具体的には、カルシウム依存性塩素チャネルが挙げられる。

[0074] また、本発明の細胞は、例えば、測定するパラメーターに応じた構成要素を有してよい。そのような構成要素としては、カルシウム指示薬や膜電位感受性色素等のプローブが挙げられる。カルシウム指示薬等のプローブを遺伝子から発現する場合、本発明の細胞は、当該プローブをコードする遺伝子を有してよい。

[0075] 本発明の細胞は、本来的に上記例示したような性質を有するものであってもよく、上記例示したような性質を有するように改変されたものであってもよい。細胞の改変については、サブユニット遺伝子の導入等のサブユニット

遺伝子に関する細胞の改変の記載を準用できる。上記例示したような遺伝子は、宿主細胞由来の遺伝子であってもよく、異種由来の遺伝子であってもよい。また、上記例示したような遺伝子は、サブユニット遺伝子と、同一の由来であってもよく、そうでなくてもよい。2つまたはそれ以上の遺伝子を導入する場合、各遺伝子が、発現可能に宿主細胞に保持されていればよい。それらの遺伝子は、例えば、全てが単一の発現ベクター上に保持されていてもよく、全てが染色体上に保持されていてもよい。また、それらの遺伝子は、例えば、複数の発現ベクター上に別々に保持されていてもよく、単一または複数の発現ベクター上と染色体上とに別々に保持されていてもよい。上記例示したような遺伝子およびそれにコードされるタンパク質は、それぞれ、例えば、公知の遺伝子およびタンパク質の塩基配列およびアミノ酸配列を有していてよい。また、上記例示したような遺伝子およびそれにコードされるタンパク質は、それぞれ、例えば、公知の遺伝子およびタンパク質の保存的バリエーションであってもよい。遺伝子およびタンパク質の保存的バリエーションについては、サブユニット遺伝子およびサブユニットの保存的バリエーションに関する記載を準用できる。

- [0076] サブユニット遺伝子を有する細胞は、そのまま、あるいは適宜サブユニット遺伝子を発現させて、サブユニットを有する細胞（本発明の細胞）として使用することができる。すなわち、サブユニット遺伝子を有する細胞が既にサブユニット遺伝子を発現している場合、当該細胞は、そのまま、サブユニットを有する細胞（本発明の細胞）として使用してもよい。また、サブユニット遺伝子を有する細胞にサブユニット遺伝子を発現させることにより、サブユニットを有する細胞（本発明の細胞）が得られる。例えば、サブユニット遺伝子を有する細胞を培養することにより、サブユニット遺伝子を発現させることができ、以てサブユニットを有する細胞（本発明の細胞）が得られる。具体的には、例えば、サブユニット遺伝子の導入（例えばトランスフェクション）後、宿主細胞の培養を継続し、サブユニット遺伝子を発現させることができる。培地組成や培養条件は、サブユニット遺伝子を有する細胞を

維持する（例えば増殖させる）ことができ、サブユニット遺伝子が発現する限り、特に制限されない。培養の際に、サブユニット遺伝子を有する細胞は、増殖してもよく、しなくてもよい。培地組成や培養条件は、宿主細胞の種類等の諸条件に応じて適宜設定することができる。培養は、例えば、動物細胞等の細胞の培養に利用される通常の培地および通常の条件をそのまま、あるいは適宜改変して用いて実施することができる。例えば、動物細胞の培養に利用できる培地として、具体的には、Opti-MEM培地（Thermo Fisher Scientific）、DMEM培地、RPMI 1640培地、CD293培地が挙げられる。培養は、例えば、36℃～38℃で、5%CO<sub>2</sub>等のCO<sub>2</sub>含有雰囲気下で静置培養により行うことができる。また、必要に応じて、選択薬剤や発現誘導剤を用いることができる。

[0077] サブユニットが発現したことは、他のサブユニットと組み合わせた際のナトリウムに対する応答を測定することにより確認できる。また、サブユニットが発現したことは、サブユニット遺伝子から転写されるmRNAの量を測定することや、抗体を用いてウェスタンブロットによりサブユニットを検出することでも確認できる。

[0078] 本発明の細胞は、例えば、そのまま（培養物に含まれたまま）、あるいは培地から回収して、本発明の方法に使用することができる。また、培養物やそれから回収した細胞は、例えば、適宜、洗浄、濃縮、希釈、固定化等の処理をしてから、本発明の方法に使用してもよい。このように、本発明の細胞は、例えば、所望の程度に単離された形態で使用されてもよく、素材に含有された形態で使用されてもよい。サブユニットを有する他の構造物についても同様である。

[0079] サブユニットを有する細胞膜は、例えば、本発明の細胞から調製することができる。サブユニットを有する細胞膜は、具体的には、例えば、本発明の細胞を破碎した際の膜画分として得られる。

[0080] また、サブユニットを利用してサブユニットを有する人工脂質二重膜小胞や人工脂質二重膜を製造することができる。例えば、予め調製された人工脂

質二重膜小胞や人工脂質二重膜にサブユニットを組み込むことで、サブユニットを有する人工脂質二重膜小胞や人工脂質二重膜を調製することができる。また、例えば、サブユニットを原料として人工脂質二重膜小胞や人工脂質二重膜にサブユニットを調製することで、サブユニットを有する人工脂質二重膜小胞や人工脂質二重膜を調製することができる。サブユニットを有する人工脂質二重膜小胞や人工脂質二重膜の調製には、サブユニットを有する膜画分等の適切な形態のサブユニットを用いることができる。人工脂質二重膜小胞や人工脂質二重膜は、例えば、公知の手段により製造できる。例えば、人工脂質二重膜の製造法としては、Montal-Mueller法や、液滴接触法（Kawano R. et al., Automated Parallel Recordings of Topologically Identified Single Ion Channels, Scientific Reports, 3, No. 1995 (2013)) が挙げられる。例えば、US2018-0095071には、ナトリウムチャネルTMC6を発現させた細胞から得た粗精製膜画分を用いて人工脂質二重膜を調製したことが開示されている。人工脂質二重膜小胞は、サブユニットを、例えば、その膜に有してよい。脂質二重膜小胞としては、リポソームが挙げられる。

[0081] 細胞膜や人工脂質二重膜等の膜は、例えば、当該膜により区分された空間が生じるように使用することができる。そのような膜は、例えば、2つのウェル等の2つの空間を区分するように使用することができる。すなわち、そのような膜は、例えば、2つのウェル等の2つの空間を備える反応系であって、当該2つの空間が当該膜によって互いに区分されている反応系を提供するように使用することができる。そのような2つの空間は、その境界の少なくとも一部がそのような膜により区分されていればよい。そのような反応系は、例えば、上述したような装置として提供されてよい。例えば、US2018-0095071には、ナトリウムチャネルTMC6を有する人工脂質二重膜で区分された2つのウェルを備えたイオンチャネル測定デバイスが開示されている。

[0082] 本発明の方法においては、3つのサブユニット（すなわち $\alpha$ ENaCタンパク質、 $\gamma$ ENaCタンパク質、およびASIC1cタンパク質）の組み合わせが利用される。3つのサブユニットは、まとめて製造されてもよく、そうでなくてもよ

い。3つのサブユニットがまとめて製造される場合、それらサブユニットはそのまま本発明の方法に使用することができる。また、3つのサブユニットがまとめて製造されない場合、それらサブユニットは製造後に適宜組み合わせて本発明の方法に使用することができる。3つのサブユニットは、具体的には、それらサブユニットが共同で機能できるよう、それらサブユニットが共存した状態で本発明の方法に使用すればよい。例えば、3つのサブユニットを構造物に担持した形態で使用する場合、それらサブユニットを単一の構造物に担持した形態で使用するすることができる。3つのサブユニットは、例えば、単一の細胞に担持した形態で使用するすることができる。そのような細胞は、例えば、3つのサブユニットを宿主細胞で共発現することにより得られる。3つのサブユニットは、例えば、複合体（すなわちヘテロ多量体）を形成して機能してもよい。3つのサブユニットは、具体的には、例えば、それらサブユニット全てを含む複合体（すなわちヘテロ多量体）を形成して機能してもよい。

[0083] <4>本発明の方法

本発明の方法は、*in vitro*で実施することができる。

[0084] まず、試験物質の存在下で $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cとナトリウムを接触させることができる。言い換えると、ナトリウムの存在下で $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cと試験物質を接触させることができる。また、言い換えると、 $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cとナトリウムおよび試験物質を接触させることができる。すなわち、「試験物質の存在下で $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cとナトリウムを接触させる」、「ナトリウムの存在下で $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cと試験物質を接触させる」、および「 $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cとナトリウムおよび試験物質を接触させる」という表現は、互いに同義で用いることができる。以下、ナトリウムおよび試験物質を総称して、単に、「物質」ともいう。

[0085]  $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cと両物質との接触が実施される系を「反応系」ともいう。 $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cと両物質との接触は、適当な液体中で実施することができる。 $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cと両物質との接触が実施される液体を「反応液」ともいう。

。すなわち、例えば、適当な反応液中で $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cと両物質とを共存させることにより、 $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cと両物質とを接触させることができる。具体的には、例えば、 $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1c（例えば $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cを有する細胞等の上記例示したような形態のもの）および両物質を適当な液体媒体中に溶解、懸濁、または分散等して共存させることにより、 $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cと両物質とを接触させることができる。液体媒体としては、水や水性緩衝液等の水性媒体が挙げられる。なお、両物質等の2種またはそれ以上の成分をまとめて $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cに接触させる場合、それらの成分と $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cとの接触は、同時に開始してもよく、そうでなくてもよい。すなわち、例えば、或る成分と $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cとの接触を開始した後、別の成分をさらに反応系に添加してもよい。具体的には、例えば、試験物質と $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cとの接触を開始した後でナトリウムをさらに反応系に添加してもよく、ナトリウムと $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cとの接触を開始した後で試験物質をさらに反応系に添加してもよい。通常は、試験物質とナトリウムとを予め混合してから $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cに接触させればよい。反応条件（ $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cと両物質との接触を実施する条件）は、目的物質のスクリーニングが可能である限り、特に制限されない。反応条件は、 $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cの使用形態、試験物質の種類、 $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cの応答の測定手法等の諸条件に応じて適宜設定できる。反応条件としては、例えば、タンパク質とリガンド間の相互作用等の物質間の相互作用を測定する際の公知の反応条件をそのまま、あるいは適宜改変して利用してもよい。試験物質の濃度は、例えば、0.01 nM～500 mM、10 nM～100 mM、または1  $\mu$ M～10 mMであってもよい。ナトリウムの濃度は、例えば、5 mM～500 mM、20 mM～300 mM、または50 mM～200 mMであってもよい。 $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cの濃度は、例えば、1 pg/mL～10 mg/mLであってもよい。また、 $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cを有する細胞を用いる場合、 $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cを有する細胞の濃度は、例えば、10 cell/mL～10,000,000 cell/mLであってもよい。 $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cと両物質との接触は、適当な時点で終了してもよいし、しなくてもよい。 $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cと両物質との接触は、通常、少なくともナトリウムに対する $\alpha\gamma$ E

NaC/ASIC1cの応答の測定時まで継続されていてよい。 $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cと両物質との接触の継続時間は、例えば、0.1秒以上、0.5秒以上、1秒以上、5秒以上、10秒以上、20秒以上、30秒以上、40秒以上、50秒以上、1分以上、2分以上、3分以上、5分以上、10分以上、30分以上、1時間以上、または2時間以上であってもよく、24時間以下、12時間以下、6時間以下、2時間以下、または1時間以下であってもよく、それらの矛盾しない組み合わせであってもよい。反応系は、目的物質のスクリーニングが可能である限り、 $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1c（例えば $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cを有する細胞等の上記例示したような形態のもの）および両物質に加えて、その他の成分を含有していてよい。その他の成分は、 $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cの使用形態、試験物質の種類、 $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cの応答の測定手法等の諸条件に応じて適宜設定できる。その他の成分としては、カルシウム塩等の塩類、グルコース等の炭素源、その他の培地成分、pH緩衝剤が挙げられる。

[0086] ナトリウムは、目的物質のスクリーニングに利用可能な任意の形態で 사용할ことができる。すなわち、具体的には、ナトリウムは、 $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cの応答を惹起できる任意の形態で 사용할ことができる。ナトリウムは、例えば、反応系でナトリウムイオンを与える（生じる）物質の形態で反応系に提供され使用されてよい。そのような物質を「ナトリウムイオン源」ともいう。言い換えると、ナトリウムとしては、ナトリウムイオン源を使用することができる。ナトリウムイオン源としては、ナトリウム塩が挙げられる。ナトリウム塩としては、塩化ナトリウムが挙げられる。すなわち、一態様において、「ナトリウムの存在下」とは、ナトリウムイオン源（塩化ナトリウム等）の存在下を意味してよい。また、一態様において、「 $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cとナトリウムの接触」とは、 $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cとナトリウムイオン源（塩化ナトリウム等）の接触を意味してよい。また、一態様において、「ナトリウムに対する応答」とは、ナトリウムイオン源（塩化ナトリウム等）に対する応答を意味してよい。

[0087] ナトリウムは、通常、イオン化して反応系に存在していてよい。すなわち



、「ナトリウムの存在下」とは、ナトリウムイオンの存在下を意味してよい。また、「 $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cとナトリウムの接触」とは、 $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cとナトリウムイオンの接触を意味してよい。また、「ナトリウムに対する応答」とは、ナトリウムイオンに対する応答を意味してよい。塩化ナトリウム等のナトリウムイオン源についても同様である。すなわち、例えば、「塩化ナトリウムの存在下」とは、塩化物イオンとナトリウムイオンの存在下を意味してよい。また、例えば、「 $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cと塩化ナトリウムの接触」とは、塩化物イオンの存在下での $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cとナトリウムイオンの接触を意味してよい。また、例えば、「塩化ナトリウムに対する応答」とは、塩化物イオンの存在下でのナトリウムイオンに対する応答を意味してよい。

[0088] 次いで、ナトリウムに対する $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cの応答を測定することができる。ナトリウムに対する $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cの応答は、後述するように、試験物質による応答調節を評価するための指標となる。よって、「ナトリウムに対する $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cの応答を測定する」とは、具体的には、試験物質による応答調節を測定することを意味してもよい。「試験物質による応答調節」とは、ナトリウムに対する $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cの応答が試験物質により調節されることをいう。応答調節としては、応答促進や応答阻害が挙げられる。

[0089] ナトリウムに対する $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cの応答を測定するタイミングは、試験物質が目的物質であった場合に測定可能な程度に当該試験物質による応答調節が生じている時点であれば特に制限されない。ナトリウムに対する $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cの応答を測定するタイミングは、具体的には、 $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cと両物質との接触が開始した時点から、試験物質による応答調節が消失する時点までの適当な時点であってよい。ナトリウムに対する $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cの応答を測定するタイミングは、例えば、試験物質による応答調節が最大となる時点であってもよい。ナトリウムに対する $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cの応答を測定するタイミングは、通常、 $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cと両物質との接触中であってよい。また、ナトリウムに対する $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cの応答を測定するタイミングは、例えば、 $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cと両物質との接触が開始した時点の0.1秒後以降、0

、5秒後以降、1秒後以降、5秒後以降、10秒後以降、20秒後以降、30秒後以降、40秒後以降、50秒後以降、1分後以降、2分後以降、3分後以降、5分後以降、10分後以降、30分後以降、1時間後以降、または2時間後以降であってもよく、24時間後まで、12時間後まで、6時間後まで、2時間後まで、1時間後まで、30分後まで、10分後まで、5分後まで、3分後まで、2分後まで、または1分後までであってもよく、それらの矛盾しない組み合わせであってもよい。ナトリウムに対する $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cの応答を測定するタイミングは、具体的には、例えば、 $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cと両物質との接触が開始した時点の1秒後以降10分後までであってもよい。

[0090] 次いで、ナトリウムに対する $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cの応答に基づいて、試験物質が目的物質であるかを同定することができる。すなわち、ナトリウムに対する $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cの応答に基づいて、試験物質を目的物質として同定することができる。

[0091] 具体的には、ナトリウムに対する $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cの応答に基づいて試験物質による応答調節を評価することができ、さらに、試験物質による応答調節に基づいて試験物質を目的物質として同定することができる。より具体的には、試験物質による応答調節が認められた場合に、すなわち、ナトリウムに対する $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cの応答が試験物質により調節されている場合に、当該試験物質を目的物質として同定することができる。例えば、試験物質による応答促進が認められた場合に、すなわち、ナトリウムに対する $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cの応答が試験物質により促進されている場合に、当該試験物質をナトリウムの作用を促進する物質（塩味増強物質等）として同定することができる。また、例えば、試験物質による応答阻害が認められた場合に、すなわち、ナトリウムに対する $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cの応答が試験物質により阻害されている場合に、当該試験物質をナトリウムの作用を阻害する物質（塩味低減物質等）として同定することができる。

[0092] ナトリウムに対する $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cの応答としては、ナトリウムによる $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cの活性化が挙げられる。すなわち、ナトリウムに対する $\alpha\gamma$ EN

aC/ASIC1cの応答は、例えば、ナトリウムによる $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cの活性化を指標として測定することができる。すなわち、ナトリウムによる $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cの活性化が試験物質により調節されている場合に、当該試験物質を目的物質として同定することができる。ナトリウムによる $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cの活性化が試験物質により調節されることを、「試験物質による活性化調節」ともいう。活性化調節としては、活性化促進や活性化阻害が挙げられる。例えば、試験物質による活性化促進が認められた場合に、すなわち、ナトリウムによる $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cの活性化が試験物質により促進されている場合に、当該試験物質をナトリウムの作用を促進する物質（塩味増強物質等）として同定することができる。また、例えば、試験物質による活性化阻害が認められた場合に、すなわち、ナトリウムによる $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cの活性化が試験物質により阻害されている場合に、当該試験物質をナトリウムの作用を阻害する物質（塩味低減物質等）として同定することができる。試験物質による活性化促進を「試験物質による $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cの活性化」ともいう。試験物質による活性化阻害を「試験物質による $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cの不活性化」ともいう。

[0093] 試験物質による活性化調節は、前記工程（A）を実施した際の（すなわち試験物質の存在下で $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cとナトリウムを接触させる条件における） $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cの活性化の程度（活性化の程度D1）を指標として決定することができる。すなわち、上記工程（B）は、例えば、（B1）活性化の程度D1を測定する工程であってよい。また、上記工程（C）は、例えば、（C1）活性化の程度D1に基づいて試験物質が目的物質であるかを同定する工程であってよい。

[0094] 試験物質による活性化調節は、具体的には、前記工程（A）を実施した際の（すなわち試験物質の存在下で $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cとナトリウムを接触させる条件における） $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cの活性化の程度（活性化の程度D1）と対照条件における $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cの活性化の程度（活性化の程度D2）とを比較することにより決定できる。すなわち、上記工程（C1）は、例えば、（C2）活性化の程度D1と活性化の程度D2との差に基づいて試験物質が目的

物質であるかを同定する工程であってもよい。

[0095] 「対照条件」とは、下記条件（C 2－1）または（C 2－2）をいう：

（C 2－1）試験物質の非存在下で $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cとナトリウムを接触させる条件；

（C 2－2）試験物質の存在下で $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cとナトリウムを接触させる条件であって、該試験物質の濃度が上記工程（A）における該試験物質の濃度よりも低い濃度である条件。

[0096] 言い換えると、試験物質による活性化調節は、例えば、ナトリウムの存在下での試験物質の有無または濃度差による $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cの活性化の程度の差を指標として決定できる。

[0097] 上記条件（C 2－1）としては、 $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cと試験物質を接触させる前の条件であって、 $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cとナトリウムを接触させる条件が挙げられる。上記条件（C 2－1）としては、 $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cとナトリウムおよび試験物質を接触させた後の条件であって、試験物質が実質的に（例えば完全に）反応系から除去され、且つ試験物質による応答調節が実質的に（例えば完全に）消失している条件も挙げられる。上記条件（C 2－2）における試験物質の濃度は、活性化の程度D 1と活性化の程度D 2とで測定可能な程度に差が認められる濃度であれば特に制限されない。上記条件（C 2－2）における試験物質の濃度は、例えば、上記工程（A）における試験物質の濃度の、90%以下、70%以下、50%以下、30%以下、20%以下、10%以下、5%以下、または1%以下の濃度であってよい。対照条件は、試験物質の有無または濃度以外は、試験物質による応答調節を評価することができる限り、特に制限されない。対照条件は、試験物質の有無または濃度以外は、例えば、上記工程（A）の条件と同一であってよい。

[0098] 本発明の方法は、活性化の程度D 2を測定する工程を含んでいてもよい。活性化の程度D 1と活性化の程度D 2は、単一の反応系において時間差で測定されてもよいし、それぞれ別個の反応系において同時にあるいは時間差で測定されてもよい。活性化の程度D 2は、活性化の程度D 1よりも先に測定

されてもよく、後に測定されてもよい。例えば、活性化の程度D 2を測定した後、反応系に試験物質を添加して活性化の程度D 1を測定してもよい。

[0099] 活性化の程度D 1とD 2に差がある場合に、試験物質による活性化調節が認められたと判断できる。

[0100] 例えば、活性化の程度D 1が高い場合に、試験物質による $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cの活性化が認められたと判断できる。具体的には、活性化の程度D 1が活性化の程度D 2よりも高い場合に、試験物質による $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cの活性化が認められたと判断できる。例えば、活性化の程度D 2に対する活性化の程度D 1の比率が120%以上、130%以上、140%以上、150%以上、160%以上、170%以上、180%以上、190%以上、200%以上、250%以上、または300%以上である場合に、試験物質による $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cの活性化が認められたと判断してもよい。

[0101] また、例えば、活性化の程度D 1が低い場合に、試験物質による $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cの不活性化が認められたと判断できる。具体的には、活性化の程度D 1が活性化の程度D 2よりも低い場合に、試験物質による $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cの不活性化が認められたと判断できる。例えば、活性化の程度D 2に対する活性化の程度D 1の比率が80%未満、70%未満、60%未満、50%未満、40%未満、30%未満、20%未満、または10%未満である場合に、試験物質による $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cの不活性化が認められたと判断してもよい。

[0102] 試験物質による活性化調節を決定する場合についての上記の記載は、他の指標に基づいて試験物質による応答調節を決定する場合にも準用できる。

[0103] ナトリウムに対する $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cの応答を測定する手法は特に制限されない。ナトリウムに対する $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cの応答を測定する手法は、 $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cの使用形態や測定する応答の種類等の諸条件に応じて適宜選択できる。ナトリウムに対する $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cの応答は、例えば、ナトリウムによる $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cの活性化を測定できる適当な手法により測定することができる。

[0104] 「 $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cの活性化」とは、同タンパク質がイオンチャネルとして

機能することを意味してよく、特に、同タンパク質がナトリウムチャンネルとして機能することを意味してよい。よって、ナトリウムによる $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cの活性化は、例えば、ナトリウムイオンの輸送またはそれに伴う現象を測定することにより、測定することができる。ナトリウムイオンの輸送またはそれに伴う現象を測定するための指標としては、イオン流入、膜電流、膜電位、イオン濃度が挙げられる。すなわち、ナトリウムによる $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cの活性化は、例えば、これらのパラメーターの1種またはそれ以上を指標として測定することができる。また、ナトリウムに対する $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cの応答は、試験物質による応答調節を評価するための指標となる。すなわち、言い換えると、試験物質による $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cの活性化または不活性化は、例えば、これらのパラメーターの1種またはそれ以上を指標として測定することができる。ナトリウムによる $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cの活性化または試験物質による $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cの活性化または不活性化は、例えば、膜電流、膜電位、またはイオン濃度を指標として測定されてよい。イオン流入としては、膜により区分された空間内へのイオン流入が挙げられ、特に、細胞内へのイオン流入、人工脂質二重膜小胞内へのイオン流入、細胞膜や人工脂質二重膜等の膜により区分された空間内へのイオン流入が挙げられる。膜電流としては、細胞の膜電流、人工脂質二重膜小胞の膜電流、細胞膜の膜電流、人工脂質二重膜の膜電流が挙げられる。膜電位としては、細胞の膜電位、人工脂質二重膜小胞の膜電位、細胞膜の膜電位、人工脂質二重膜の膜電位が挙げられる。イオン濃度としては、膜により区分された空間内のイオン濃度が挙げられ、特に、細胞内のイオン濃度、人工脂質二重膜小胞内のイオン濃度、細胞膜や人工脂質二重膜等の膜により区分された空間内のイオン濃度が挙げられる。膜により区分された空間としては、後述するような、膜により区分された内部空間が挙げられる。イオン流入またはイオン濃度について言及されるイオンとしては、ナトリウムイオン、カルシウムイオン、塩化物イオンが挙げられる。

[0105] 以下、 $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cを有する細胞を用いる場合を参照して $\alpha\gamma$ ENaC/ASI

C1cの活性化または不活性化を測定する手法について例示する。

[0106] すなわち、細胞内へのイオン流入（すなわち、細胞外から細胞内へのイオンの流れ）が対照条件と比較して増大または減少した場合に、それぞれ、 $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cが活性化または不活性化された（すなわち、活性化の程度D1が活性化の程度D2よりも高いまたは低い）と判断できる。また、細胞の膜電位が対照条件と比較して増大（脱分極）または減少（過分極）した場合に、それぞれ、 $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cが活性化または不活性化された（すなわち、活性化の程度D1が活性化の程度D2よりも高いまたは低い）と判断できる。また、細胞の内向きの膜電流が対照条件と比較して増大または減少した場合に、それぞれ、 $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cが活性化または不活性化された（すなわち、活性化の程度D1が活性化の程度D2よりも高いまたは低い）と判断できる。また、細胞内のイオン濃度が対照条件と比較して増大または減少した場合に、それぞれ、 $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cが活性化または不活性化された（すなわち、活性化の程度D1が活性化の程度D2よりも高いまたは低い）と判断できる。なお、 $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cは、直接的または間接的に上記例示したようなパラメーターに影響してよい。例えば、一態様においては、 $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cを通してナトリウムイオンが細胞内に流入することにより細胞の膜電位が脱分極し、脱分極によりカルシウムチャネルを通してのカルシウムイオンの細胞内への流入が誘導されてもよい。また、例えば、一態様においては、カルシウムチャネルを通してカルシウムイオンが細胞内へ流入することにより細胞内カルシウムイオン濃度が増大し、以て塩素チャネルを通しての塩化物イオンの細胞内への流入が誘導されてもよい。

[0107] これらのパラメーターを測定する手法は特に制限されない。これらのパラメーターは、例えば、公知の手法により測定することができる。例えば、細胞の膜電位、細胞の膜電流、細胞内のイオン濃度は、いずれも、細胞内へのイオン流入（特に細胞へのナトリウムイオン流入の指標）の指標でもあり得る。よって、細胞内へのイオン流入（特に細胞へのナトリウムイオン流入）は、例えば、該細胞の膜電位、該細胞の膜電流、または該細胞内のイオン濃

度を測定することにより、測定することができる。膜電位を測定する手法としては、パッチクランプ法や膜電位感受性色素を用いた方法が挙げられる。膜電位感受性色素としては、例えば、FLIPR membrane potential (FMP) dye (Molecular Devices) が挙げられる。膜電流を測定する手法としては、パッチクランプ法や電位固定法が挙げられる。細胞内ナトリウム濃度を測定する手法としては、CoroNa Green Sodium Indicator (Thermo Fisher Scientific 社) 等のナトリウム指示薬を用いた方法が挙げられる。細胞内のカルシウム濃度を測定する手法としては、カルシウムイメージングが挙げられる。カルシウムイメージングにおいては、カルシウム指示薬を利用して、細胞内のカルシウム濃度を測定することができる。カルシウム指示薬としては、カルシウム感受性蛍光色素やカルシウム感受性蛍光タンパク質が挙げられる。カルシウム感受性蛍光色素としては、例えば、Fura 2、Fluo 4が挙げられる。また、カルシウム感受性蛍光タンパク質としては、例えば、Cameleon、TN-XL、GCaMP、G-GECOが挙げられる。Cameleonとして、具体的には、例えば、Yellow Cameleon 2.60 (YC2.60) (PNAS vol.101:10554-10559 (2004)) が挙げられる。カルシウムイメージングにおけるシグナル（例えば蛍光）の検出は、蛍光検出器等のシグナルの種類に応じた検出器を用いて実施することができる。蛍光検出器としては、例えば、FV1200（オリンパス社製）等の共焦点レーザー顕微鏡やFDSS7000（浜松ホトニクス社製）等のハイスループットスクリーニングシステムが挙げられる。FDSS7000は、96穴や384穴プレート等のマルチウェルプレートの測定に対応しており、複数の試験物質をまとめて試験できる。

[0108]  $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cを有する細胞を用いた $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cの活性化または不活性化の測定についての記載は、その他の態様で $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cを用いる場合にも準用できる。その他の態様で $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cを用いる場合としては、 $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cを有する、人工脂質二重膜小胞、細胞膜、または人工脂質二重膜を用いる場合が挙げられる。その他の態様で $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cを用いる場合としては、特に、 $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cが内部空間を有する形態で使用される場



合が挙げられる。

[0109] すなわち、例えば、 $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cを有する人工脂質二重膜小胞を用いて、 $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cを有する細胞を用いる場合と同様の手法により $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cの活性化または不活性化を測定することができる。そのような場合、 $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cを有する細胞を用いた $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cの活性化または不活性化の測定についての記載における「細胞」は、「人工脂質二重膜小胞」と読み替えることができる。

[0110] また、例えば、 $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cを有する細胞膜や人工脂質二重膜等の膜を当該膜により区分された空間が生じるように用いて、 $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cを有する細胞を用いる場合と同様の手法により $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cの活性化または不活性化を測定することができる。具体的には、例えば、そのような膜が2つの空間を区分するように使用される場合、すなわち、そのような膜が、2つの空間を備える反応系であって、当該2つの空間が当該膜によって互いに区分されている反応系を提供するように使用される場合、 $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cを有する細胞を用いる場合と同様の手法により $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cの活性化または不活性化を測定することができる。そのような場合、膜により区分された空間を細胞の内部（「内部空間」ともいう）とみなすことができる。具体的には、それら2つの空間の内、一方を細胞の内部（「内部空間」ともいう）とみなすことができ、他方を細胞の外部（「外部空間」ともいう）とみなすことができる。それらの空間の内、ナトリウムおよび試験物質を含有する方を外部空間とみなすことができる。そのような場合、 $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cを有する細胞を用いた $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cの活性化または不活性化の測定についての記載における「細胞内へのイオン流入」、「細胞の膜電位」、「細胞の膜電流」、「細胞内のイオン濃度」は、それぞれ、「内部空間内へのイオン流入」、「膜の膜電位」、「膜の膜電流」、「内部空間内のイオン濃度」と読み替えることができる。例えば、US2018-0095071には、ナトリウムチャネルTMC6を有する人工脂質二重膜で区分された2つのウェルを備えたイオンチャネル測定デバイスを利用してナトリウムイオンの輸送により生じる膜電流を測定したこと

が開示されている。

- [0111] いずれの場合も、 $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cの使用態様に応じて、測定可能なパラメーターを選択することができる。
- [0112] なお、「或るパラメーターを測定し、ナトリウムに対する $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cの応答を測定するための指標として利用する」とは、当該応答を測定できる限り、具体的には、当該応答に基づいて試験物質による応答調節を評価できる（すなわち、試験物質による応答調節が認められるかを判定できる）限り、当該パラメーターを反映するデータを取得して利用することで足り、当該パラメーターの値自体を取得することは必要としない。すなわち、或るパラメーターを反映するデータを取得した場合、当該データから当該パラメーターの値自体を算出することは必要としない。具体的には、例えば、カルシウムイメージングにより細胞内のカルシウム濃度を測定し、ナトリウムによる $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cの活性化を測定するための指標として利用する場合、当該活性化を測定できる限り、具体的には、当該活性化に基づいて試験物質による活性化調節を評価できる（すなわち、試験物質による活性化調節が認められるかを判定できる）限り、細胞内のカルシウム濃度を反映するデータ（例えば、カルシウム指示薬のシグナル強度やシグナル強度比率）を取得して利用することで足り、当該データから細胞内のカルシウム濃度自体を算出することは必要としない。
- [0113] また、「ナトリウムに対する $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cの応答を測定する」とは、当該応答を反映するデータであって、試験物質による応答調節を評価するために利用できるものを取得することで足りる。同様に、試験物質による応答調節を評価するための指標として利用される「ナトリウムに対する $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cの応答」とは、当該応答を反映するデータであって、試験物質による応答調節を評価するために利用できるものであれば足りる。そのようなデータとしては、例えば、ナトリウムに対する $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cの応答を測定する手法を実施することにより得られたデータ（例えば、上記例示したようなパラメーターやそれを反映するデータ）を、そのまま、あるいは適宜加工して、

用いることができる。

[0114] このようにして目的物質を同定することができる。本発明の方法は、さらに、同定された目的物質（特に塩味調節物質）の塩味調節機能を評価する工程を含んでいてもよい。すなわち、同定された目的物質の塩味調節機能を評価することにより、当該目的物質が実際に塩味を調節（例えば増強または低減）するかを確認することができる。同定された目的物質の塩味調節機能を評価する手法は特に制限されない。同定された目的物質の塩味調節機能は、例えば、物質の塩味等の呈味を評価する公知の手法により評価することができる。そのような手法としては、官能評価（官能試験による評価）が挙げられる。同定された目的物質の塩味調節機能は、具体的には、例えば、目的物質の共存下での塩化ナトリウムの塩味と、目的物質の非共存下での塩化ナトリウムの塩味とを比較することにより、評価することができる。

[0115] 従来の塩味調節剤の開発過程では、官能試験等によって膨大な数の物質またはそれらの組み合わせの塩味調節機能を1つ1つ確認して塩味調節物質を選択していかなければならなかったため、塩味調節剤の開発までに多くの時間とコストが必要であった。しかし、本発明の方法によれば、 $\alpha$   $\gamma$  ENaC/ASIC 1cを利用することにより、塩味調節物質を効率的にスクリーニングすることができる。よって、本発明の方法によれば、塩味調節剤の開発の効率を大きく向上させることができる。

[0116] スクリーニングされた目的物質の用途は、特に制限されない。目的物質（特に塩味調節物質）は、例えば、塩化ナトリウムを含有する対象物（例えば飲食品）に配合して使用することができる。目的物質（特に塩味調節物質）の配合により、塩化ナトリウムを含有する対象物における塩味を調節（例えば増強または低減）することができる。また、目的物質は、例えば、新たな目的物質の開発のための原料として使用することもできる。

## 実施例

[0117] 以下、非限定的な実施例を示し、本発明をより具体的に説明する。

[0118] 実施例1：電気生理学的手法を用いた評価

### (1) 発現プラスミド構築

ヒトの $\alpha$ ENaC遺伝子、 $\beta$ ENaC遺伝子、及び $\gamma$ ENaC遺伝子のORFクローンをClontech社より、ヒトのASIC1c遺伝子のORFクローンをPromega社より購入した。各遺伝子のmRNAのNCBI Accession No. は、 $\alpha$ ENaC : NM\_001038、 $\beta$ ENaC : NM\_000336、 $\gamma$ ENaC : NM\_001039、ASIC1c : NM\_001256830である。ORFクローンを鋳型として、PCR法により各ORFを含むDNA断片を増幅した。増幅したDNA断片をIn-Fusionクローニングシステム (#639648、Clontech社) により哺乳細胞発現用ベクターであるpcDNA3.1(+) (#V790-20、Invitrogen) のマルチクローニングサイト (HindIII、XbaI) に挿入し、各遺伝子の発現プラスミドを得た。

### [0119] (2) cRNA合成

発現プラスミドを制限酵素XbaIにより切断し、直鎖状DNAを得た。得られたDNAをproteinase K処理 (50°C 30分) に供して制限酵素及びRNaseを不活化させ、次いでフェノール/クロロホルム抽出法により精製した。精製したDNAを鋳型として、MEGAscript T7 Kit (#AM1334、Life technologies社) によりcRNAの合成を行った (GTP量は1/5量、Ribo m7G Cap Analog (Promega社) をfinal 40 mMで添加)。得られたcRNAをフェノール/クロロホルム抽出法により精製した後、イソプロパノール沈殿法により沈殿物として回収した。cRNAを70%エタノールで洗浄し風乾した。cRNAを水に溶解し、70°C、2分間のヒートショックを与え、cRNA溶液を調製した。Bioanalyzer (2100、Agilent社) 及びNanodropを用いてcRNAの品質の確認と定量を行った。

### [0120] (3) cRNAのマイクロインジェクション

調製したcRNA溶液はマイクロキャピラリーを用い23.3 nLずつアフリカツメガエルから単離した卵母細胞にインジェクションした ( $\alpha$ ENaC : 3.1 ng、 $\beta$ ENaC : 3.1 ng、 $\gamma$ ENaC : 3.1 ng、ASIC1c : 34.6 ng)。インジェクションしたcRNA溶液は以下の通りである： $\alpha$ ENaC単独、ASIC1c単独、 $\alpha\beta$ ENaC ( $\alpha$ ENaCと $\beta$ ENaCの組み合わせ)、 $\alpha\gamma$ ENaC ( $\alpha$ ENaCと $\gamma$ ENaCの組み合わせ)、 $\alpha\beta\gamma$ ENaC ( $\alpha$ ENaCと $\beta$ ENaCと $\gamma$ ENaCの組み合わせ)、 $\alpha$ ENaC/ASIC1c ( $\alpha$ ENaCとASI

C1cの組み合わせ)、および $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1c ( $\alpha$ ENaCと $\gamma$ ENaCとASIC1cの組み合わせ)。また、MOCKとして、cRNA溶液に代えて水をインジェクションした。卵母細胞を培養用バッファーND96溶液 (96 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM HEPES, 1.8 mM CaCl<sub>2</sub>, pH7.4, 1%抗生物質, 2%ピルビン酸ナトリウム) に移して、18°Cで一晩から3日程度インキュベートし、十分に遺伝子を発現させた。

[0121] (4) 二電極膜電位固定法による膜電流の測定

ガラスピペット内に3 M 塩化カリウム水溶液を充填し、電流測定および電位測定各ヘッドステージにセットして、ガラス電極とした。電極の抵抗値を測定し、電流電極の抵抗値が0.2~0.8 M $\Omega$ 、電位電極の抵抗値が2 M $\Omega$ 以下であることを確認し、必要に応じて電流値補正を行った。測定用バッファーの流速が約2 mL/minになるようにフローコントロールピンチバルブにて調節した。チャンバーには測定に使う卵母細胞を置き、ガラス電極の先端を細胞膜へなるべく直角になるよう卵に刺し、静止電位を確認した。ソフトウェアで設定した電位 (-80 mV) をA/D-D/Aコンバーター (Digidata 1440A, Axon CNS) およびアンプ (Gene clamp 500B, Axon) を介して卵母細胞に与え、イオン電流 (膜電流) の経時変化を記録した (使用ソフトウェアClampex 10.2.09、Axon)。解析にはClampfit ソフトウェア (v10.2.09、Axon) を用いた。測定用バッファーとしては、まず、Naを含むND96 (96 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM HEPES, 1.8 mM CaCl<sub>2</sub>, pH7.3) を用い、次いで、Naを含まないNMDG96 (96 mM NMDG, 2 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM HEPES, 1.8 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7.3) に切り替えた。ND96で得られた膜電流の測定値と、NMDG96で得られた膜電流の測定値との差を、Naによる膜電流の変化とみなした。NMDG96で得られた膜電流の測定値としては、NMDG96に切り替えてから1~3分後の安定した値を用いた。また、 $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1c発現細胞および $\alpha\beta\gamma$ ENaC発現細胞について、100  $\mu$ M Amiloride存在下で、同様の手順でNaによる膜電流の変化を測定した (「 $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1c+Ami」 および 「 $\alpha\beta\gamma$ ENaC+Ami」)。Naによる膜電流の変化をNa応答の指標とした。

## [0122] (5) 結果

結果を図1～2に示す。 $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1c発現細胞は、 $\alpha$ ENaC発現細胞、ASIC1c発現細胞、 $\alpha\gamma$ ENaC発現細胞と比較して、顕著に高いNa応答を示した(図1)。また、ENaC阻害剤であるAmilorideは、 $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1c発現細胞のNa応答には影響しなかった(図1)。一方、Amilorideは $\alpha\beta\gamma$ ENaC発現細胞のNa応答を80%程度抑制した(図2)。このことから、 $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cは $\alpha\beta\gamma$ ENaCと異なる性質を有するNaチャネルであると考えられた。すなわち、 $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cが $\alpha\beta\gamma$ ENaCと異なる塩味受容体として機能している可能性が示唆された。

## [0123] (6) Na選択性の評価

ENaCサブユニット及びASIC1サブユニットを含むチャネルとしては、 $\alpha$ ENaC/ASIC1aが知られている(Trac PT. et al., Alveolar nonselective channels are ASIC1a/ $\alpha$ -ENaC channels and contribute to AFC. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2017 Jun 1;312(6):L797-L811.)。  $\alpha$ ENaC/ASIC1aは非選択的カチオンチャネルであり、ナトリウム(Na)とカリウム(K)間で選択性に差はない。そこで、 $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cのイオン選択性について検討する目的で、 $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cのKに対する応答を測定した。測定は、測定用バッファのNaClをKClに替えたこと以外は、上記(4)と同様の手順で実施した。

[0124] 結果を図3に示す。 $\alpha\beta\gamma$ ENaC発現細胞はK応答を示した。なお、 $\alpha\beta\gamma$ ENaC発現細胞のK応答はAmilorideで抑制されなかった(Data not shown)。一方、 $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1c発現細胞のK応答は、MOCKとほぼ同等であった。このことから、 $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cはNaに対して選択性を有すると考えられた。よって、 $\alpha\gamma$ ENaC/ASIC1cを利用することにより、K等のNa以外のカチオンに影響されることなく、Naの作用を調節する物質を効率的にスクリーニングできると期待される。

## [0125] 実施例2：ヒト培養細胞を用いた評価

## (1) リポフェクションによる遺伝子導入

HEK293T細胞を100mm<sup>2</sup>シャーレの成長培地(G418不含)に $1.5 \times 10^6$  cells/10

mL培地で播種し、CO<sub>2</sub>インキュベータ（5 % CO<sub>2</sub>、37 °C）で16～24時間培養した。培地を養生培地（DMEM/HamF-12／5%FBS）に交換し、Fugene6（Promega）を用いて実施例1（1）で得た発現プラスミドを培養細胞にトランスフェクションした。トランスフェクションした発現プラスミドは以下の通りである： $\alpha$   $\beta$   $\gamma$  ENaC（ $\alpha$  ENaCと $\beta$  ENaCと $\gamma$  ENaCの組み合わせ）および $\alpha$   $\gamma$  ENaC/ASIC1c（ $\alpha$  ENaCと $\gamma$  ENaCとASIC1cの組み合わせ）。また、MOCKとして、発現プラスミドに代えて空ベクターpcDNA3.1を培養細胞にトランスフェクションした。DNAとトランスフェクション試薬はDNA : Fugene6 = 1  $\mu$ g : 4  $\mu$ Lの割合で定法に従って調製した。トランスフェクション後の細胞をCO<sub>2</sub>インキュベーターで4～6時間培養した後、細胞を回収して7×10<sup>4</sup> cells/100  $\mu$ L/wellでFDSS用アッセイプレート（FALCON Biocoat Black clear-bottom 96well plate (PDL coat) #356692) に播種し、16～24時間培養した。FDSS用アッセイプレートの培地としては75mM Na-DMEM培地を用いた。

[0126] （2）FDSS/ $\mu$ CELLによる膜電位測定

培養後のFDSS用アッセイプレートは、培地を除去した後、Na-free Ringer Solution（150 mM NMDG-Cl, 5 mM KCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM glucose, 10 mM HEPES（pH7.3））で1回洗浄し、FLIPR membrane potential (FMP) dyeにて染色した。FMP dyeは定法に従ってNa-free Ringer Solutionで希釈して調製し、200  $\mu$ L/wellで添加し45分間37°C CO<sub>2</sub>インキュベーターにて静置した。Na刺激液（NaClをNa-free Ringer Solutionで希釈して調製）はサンプルプレート（COSTAR 96well pp plate #3363）に終濃度の5倍になるように調製し、FDSS/ $\mu$ CELL（浜松ホトニクス社）にて50  $\mu$ L/wellでアッセイプレートに添加した。Na刺激液添加後120秒間、535/565nmの蛍光の経時変化を測定した。Na刺激液添加10秒後から120秒後までの蛍光値変化を算出し、F/F<sub>0</sub>とした。F/F<sub>0</sub>はNa刺激による膜電位の変化を反映しており、F/F<sub>0</sub>をNa応答の指標とした。

[0127] （3）結果

結果を図4に示す。MOCKと比較し、 $\alpha$   $\gamma$  ENaC/ASIC1c発現細胞は高いNa応答

を示した。すなわち、 $\alpha$   $\gamma$  ENaC/ASIC1cはNaチャンネルであると考えられた。

### 産業上の利用可能性

[0128] 本発明によれば、ナトリウムの作用を調節する物質を効率的にスクリーニングすることができる。

[0129] <配列表の説明>

配列番号：

- 1：ヒトの $\alpha$  ENaC遺伝子（mRNA）の塩基配列
- 2：ヒトの $\alpha$  ENaCタンパク質のアミノ酸配列
- 3：ヒトの $\beta$  ENaC遺伝子（mRNA）の塩基配列
- 4：ヒトの $\beta$  ENaCタンパク質のアミノ酸配列
- 5：ヒトの $\gamma$  ENaC遺伝子（mRNA）の塩基配列
- 6：ヒトの $\gamma$  ENaCタンパク質のアミノ酸配列
- 7：ヒトのASIC1c遺伝子（mRNA）の塩基配列
- 8：ヒトのASIC1cタンパク質のアミノ酸配列



## 請求の範囲

- [請求項1] 目的物質をスクリーニングする方法であって、  
下記工程（A）～（C）：  
（A）試験物質の存在下で $\alpha$   $\gamma$  ENaC/ASIC1cとナトリウムを接触させる工程；  
（B）ナトリウムに対する前記 $\alpha$   $\gamma$  ENaC/ASIC1cの応答を測定する工程；および  
（C）前記応答に基づいて前記試験物質を目的物質として同定する工程；  
を含み、  
前記応答が前記試験物質により調節されている場合に、該試験物質を目的物質として同定し、  
前記目的物質が、ナトリウムの作用を調節する物質であり、  
前記 $\alpha$   $\gamma$  ENaC/ASIC1cが、 $\alpha$  ENaCタンパク質、 $\gamma$  ENaCタンパク質、およびASIC1cタンパク質の組み合わせである、方法。
- [請求項2] 前記応答が、ナトリウムによる前記 $\alpha$   $\gamma$  ENaC/ASIC1cの活性化である、請求項1に記載の方法。
- [請求項3] 前記 $\alpha$   $\gamma$  ENaC/ASIC1cが、細胞、細胞膜、人工脂質二重膜小胞、または人工脂質二重膜に担持された形態で使用される、請求項1または2に記載の方法。
- [請求項4] 前記 $\alpha$   $\gamma$  ENaC/ASIC1cが、細胞に担持された形態で使用される、請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項5] 前記細胞が、動物細胞である、請求項3または4に記載の方法。
- [請求項6] 前記工程（B）および（C）が、それぞれ、下記工程（B1）および（C1）により実施される、請求項1～5のいずれか1項に記載の方法：  
（B1）前記工程（A）を実施した際の前記 $\alpha$   $\gamma$  ENaC/ASIC1cの活性化の程度D1を測定する工程；

(C 1) 前記活性化の程度 D 1 に基づいて前記試験物質を目的物質として同定する工程。

[請求項7] 前記工程 (C 1) が、下記工程 (C 2) により実施される、請求項 6 に記載の方法：

(C 2) 前記活性化の程度 D 1 と対照条件における前記  $\alpha$   $\gamma$  ENaC/ASIC1c の活性化の程度 D 2 との差に基づいて前記試験物質を目的物質として同定する工程。

[請求項8] 前記対照条件が、下記条件 (C 2 - 1) または (C 2 - 2) である、請求項 7 に記載の方法：

(C 2 - 1) 前記試験物質の非存在下で前記  $\alpha$   $\gamma$  ENaC/ASIC1c とナトリウムを接触させる条件；

(C 2 - 2) 前記試験物質の存在下で前記  $\alpha$   $\gamma$  ENaC/ASIC1c とナトリウムを接触させる条件であって、該試験物質の濃度が前記工程 (A) における該試験物質の濃度よりも低い濃度である条件。

[請求項9] さらに、前記活性化の程度 D 2 を測定する工程を含む、請求項 7 または 8 に記載の方法。

[請求項10] 前記目的物質が、ナトリウムの作用を促進または阻害する物質であり、

前記応答が前記試験物質により促進されている場合に、前記試験物質をナトリウムの作用を促進する物質として同定し、

前記応答が前記試験物質により阻害されている場合に、前記試験物質をナトリウムの作用を阻害する物質として同定する、請求項 1 ～ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

[請求項11] 前記活性化の程度 D 1 が前記活性化の程度 D 2 よりも高い場合に、前記試験物質をナトリウムの作用を促進する物質として同定する、請求項 10 に記載の方法。

[請求項12] 前記活性化の程度 D 1 が前記活性化の程度 D 2 よりも低い場合に、前記試験物質をナトリウムの作用を阻害する物質として同定する、請

求項 10 に記載の方法。

[請求項13] 前記ナトリウムの作用を促進する物質が塩味増強物質であり、前記ナトリウムの作用を阻害する物質が塩味低減物質である、請求項 10 ～ 12 のいずれか 1 項に記載の方法。

[請求項14] 前記工程 (A) において、塩化ナトリウムがナトリウムとして用いられる、請求項 1 ～ 13 のいずれか 1 項に記載の方法。

[請求項15] 前記応答が、膜電流、膜電位、またはイオン濃度を指標として測定され、該イオン濃度が、細胞内のイオン濃度、人工脂質二重膜小胞内のイオン濃度、または細胞膜もしくは人工脂質二重膜により区分された内部空間内のイオン濃度である、請求項 3 ～ 14 のいずれか 1 項に記載の方法。

[請求項16] 前記イオン濃度が、ナトリウムイオン濃度、カルシウムイオン濃度、または塩化物イオン濃度である、請求項 15 に記載の方法。

[請求項17] 前記  $\alpha$ ENaC タンパク質が、下記 (A) または (B) に記載のタンパク質である、請求項 1 ～ 16 のいずれか 1 項に記載の方法：

(A) 哺乳類の  $\alpha$ ENaC タンパク質；

(B) 2 種またはそれ以上の哺乳類の  $\alpha$ ENaC タンパク質のキメラタンパク質。

[請求項18] 前記  $\alpha$ ENaC タンパク質が、下記 (a)、(b)、または (c) に記載のタンパク質である、請求項 1 ～ 17 のいずれか 1 項に記載の方法：

(a) 配列番号 2 に示すアミノ酸配列を含むタンパク質；

(b) 配列番号 2 に示すアミノ酸配列において、1 ～ 10 個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入、および／または付加を含むアミノ酸配列を含み、且つ、 $\gamma$ ENaC タンパク質および ASIC1c タンパク質との組み合わせでナトリウムに対する応答性を有するタンパク質；

(c) 配列番号 2 に示すアミノ酸配列に対して 80 % 以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、且つ、 $\gamma$ ENaC タンパク質および ASIC1c タ

ンパク質との組み合わせでナトリウムに対する応答性を有するタンパク質。

[請求項19] 前記 $\gamma$ ENaCタンパク質が、下記（A）または（B）に記載のタンパク質である、請求項1～18のいずれか1項に記載の方法：

（A）哺乳類の $\gamma$ ENaCタンパク質；

（B）2種またはそれ以上の哺乳類の $\gamma$ ENaCタンパク質のキメラタンパク質。

[請求項20] 前記 $\gamma$ ENaCタンパク質が、下記（a）、（b）、または（c）に記載のタンパク質である、請求項1～19のいずれか1項に記載の方法：

（a）配列番号6に示すアミノ酸配列を含むタンパク質；

（b）配列番号6に示すアミノ酸配列において、1～10個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入、および／または付加を含むアミノ酸配列を含み、且つ、 $\alpha$ ENaCタンパク質およびASIC1cタンパク質との組み合わせでナトリウムに対する応答性を有するタンパク質；

（c）配列番号6に示すアミノ酸配列に対して80%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、且つ、 $\alpha$ ENaCタンパク質およびASIC1cタンパク質との組み合わせでナトリウムに対する応答性を有するタンパク質。

[請求項21] 前記ASIC1cタンパク質が、下記（A）または（B）に記載のタンパク質である、請求項1～20のいずれか1項に記載の方法：

（A）哺乳類のASIC1cタンパク質；

（B）2種またはそれ以上の哺乳類のASIC1cタンパク質のキメラタンパク質。

[請求項22] 前記ASIC1cタンパク質が、下記（a）、（b）、または（c）に記載のタンパク質である、請求項1～21のいずれか1項に記載の方法：

（a）配列番号8に示すアミノ酸配列を含むタンパク質；

(b) 配列番号 8 に示すアミノ酸配列において、1～10個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入、および／または付加を含むアミノ酸配列を含み、且つ、 $\alpha$ ENaCタンパク質および $\gamma$ ENaCタンパク質との組み合わせでナトリウムに対する応答性を有するタンパク質；

(c) 配列番号 8 に示すアミノ酸配列に対して80%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、且つ、 $\alpha$ ENaCタンパク質および $\gamma$ ENaCタンパク質との組み合わせでナトリウムに対する応答性を有するタンパク質。

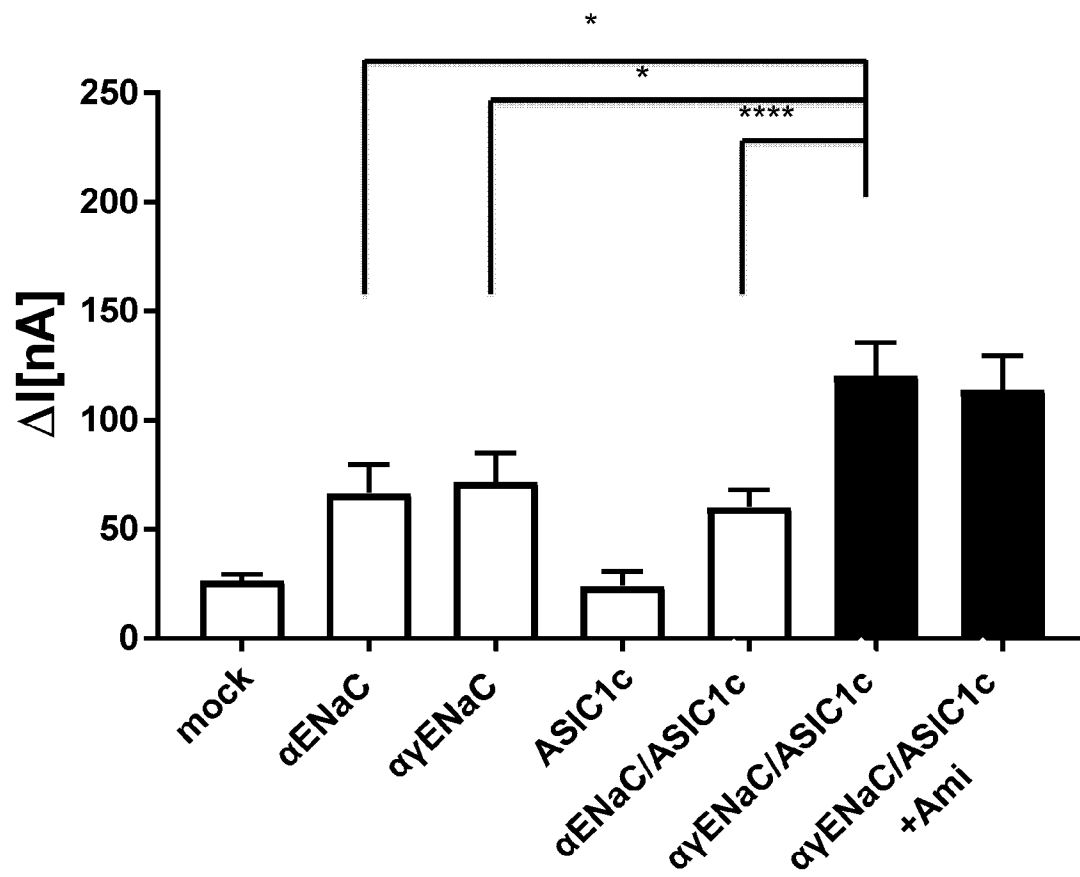
[請求項23] さらに、同定された目的物質の塩味調節機能を評価する工程を含む、請求項1～22のいずれか1項に記載の方法。

[請求項24] 前記評価が、官能評価によって実施される、請求項23に記載の方法。

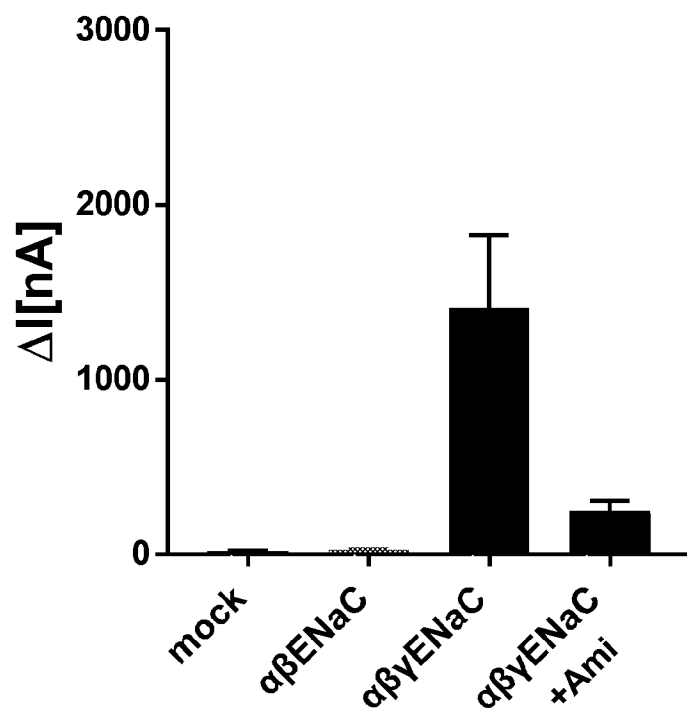
[請求項25]  $\alpha$ ENaCタンパク質をコードする遺伝子、 $\gamma$ ENaCタンパク質をコードする遺伝子、およびASIC1cタンパク質をコードする遺伝子が導入された細胞。

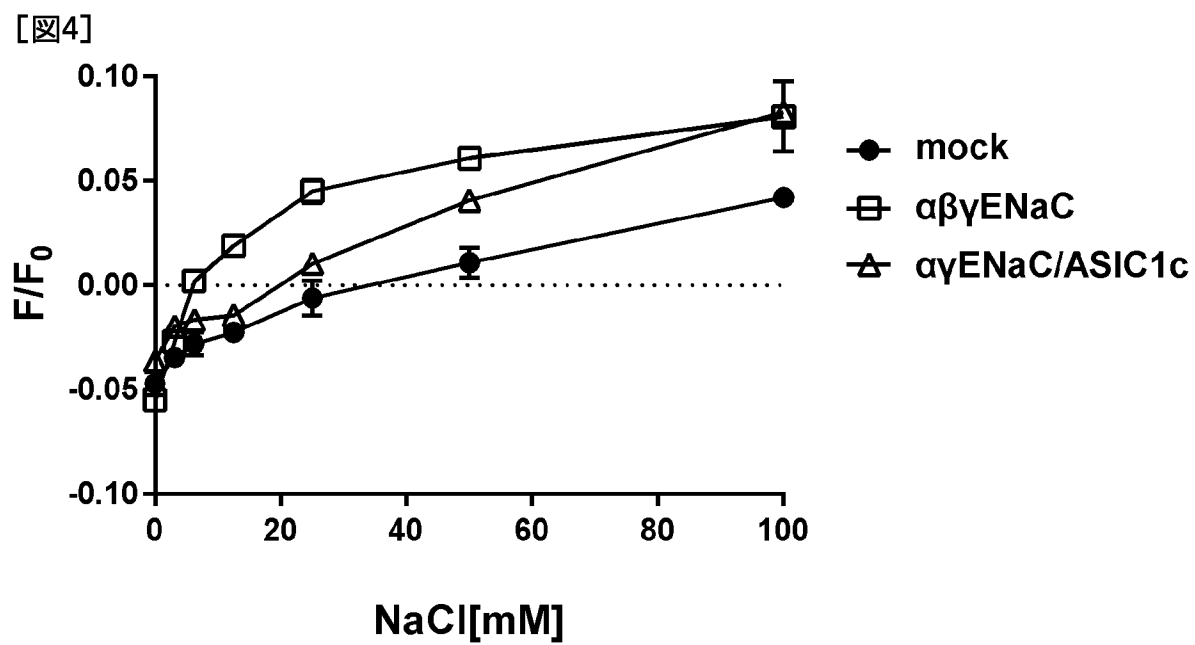
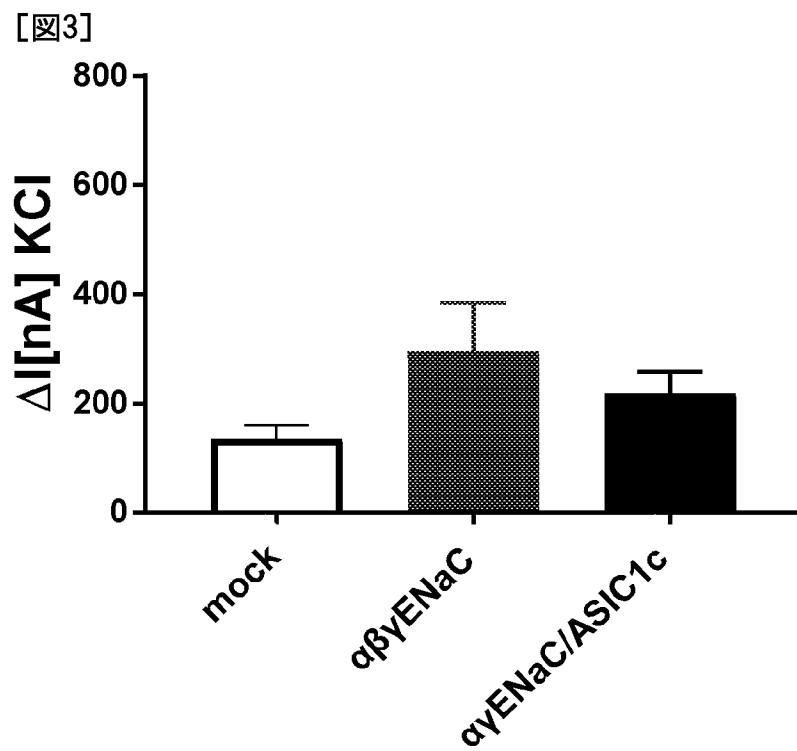
[請求項26] 動物細胞である、請求項25に記載の細胞。

[図1]



[図2]





## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2020/007788

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q 1/02(2006.01)i; C12N 5/10(2006.01)i; C07K 14/47(2006.01)n; C12N 15/12(2006.01)n; G01N 33/15(2006.01)n; G01N 33/50(2006.01)n  
 FI: C12Q1/02 ZNA; C12N5/10; C12N15/12; C07K14/47; G01N33/50 Z;  
 G01N33/15 Z

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

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q1/02; C12N5/10; C07K14/47; C12N15/12; G01N33/15; G01N33/50

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

|                                                          |           |
|----------------------------------------------------------|-----------|
| Published examined utility model applications of Japan   | 1922-1996 |
| Published unexamined utility model applications of Japan | 1971-2020 |
| Registered utility model specifications of Japan         | 1996-2020 |
| Published registered utility model applications of Japan | 1994-2020 |

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN); UniProt/GeneSeq

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                      | Relevant to claim No. |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| X         | JP 2007-528712 A (SENOYX, INC.) 18.10.2007 (2007-10-18) claim 1, examples, etc.                                                                                                                                                                                         | 25, 26                |
| A         | claim 1, examples, etc.                                                                                                                                                                                                                                                 | 1-24                  |
| X         | CABALLERO, A. G. et al., "Cav3.2 calcium channel interactions with the 25, 26 epithelial sodium channel ENaC", Molecular Brain, 08 February 2019, vol. 12, 12, page 2, right column, section "surface labeling", lines 1-4, page 4, left column, lines 3-15, fig. 5A, B | 25, 26                |
| A         | page 2, right column, section "surface labeling", lines 1-4, page 4, left column, lines 3-15, fig. 5A, B                                                                                                                                                                | 1-24                  |



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T"

later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

13 May 2020 (13.05.2020)

Date of mailing of the international search report

26 May 2020 (26.05.2020)

Name and mailing address of the ISA/

Japan Patent Office  
 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,  
 Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2020/007788

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | Relevant to claim No. |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| A         | JP 2010-506929 A (MONELL CHEMICAL SENSES CENTER)<br>04.03.2010 (2010-03-04) claims 1, 3, paragraph<br>[0027], etc.                                                                                                                                                                                                                                                                      | 1-24                  |
| A         | HOAGLAND, E. N. et al., "Identification of a<br>Calcium Permeable Human Acid- sensing Ion Channel<br>1 Transcript Variant", THE JOURNAL OF BIOLOGICAL<br>CHEMISTRY, 2010, vol. 285, no. 53, pp. 41852-<br>41862, abstract, paragraph 41854, right column,<br>lower paragraph, line 12 to page 41855, left<br>column, line 7, page 41855, left column, line 7 to<br>right column, line 4 | 1-24                  |
| A         | Homo sapiens ACCN2 variant 3 mRNA, complete eds.<br>[online], 2011, retrieval date 13 May 2020,<br>internet<br>< <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/HM991481.1/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/HM991481.1/</a> ><br>entire text                                                                                                                                       | 1-24                  |

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2020/007788

| Patent Documents<br>referred in the<br>Report | Publication<br>Date | Patent Family                                                                                                 | Publication<br>Date |
|-----------------------------------------------|---------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|
| JP 2007-528712 A                              | 18 Oct. 2007        | US 2005/0059094 A1<br>WO 2005/014848 A2<br>claim 1, examples                                                  |                     |
| JP 2010-506929 A                              | 04 Mar. 2010        | US 2011/0236313 A1<br>WO 2008/051447 A2<br>claim 1, 3, paragraph<br>[0027]<br>EP 2557087 A1<br>CN 101611049 A |                     |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                                                            |                                                                |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|
| A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））<br>C12Q 1/02(2006.01)i; C12N 5/10(2006.01)i; C07K 14/47(2006.01)n; C12N 15/12(2006.01)n;<br>G01N 33/15(2006.01)n; G01N 33/50(2006.01)n<br>FI: C12Q1/02 ZNA; C12N5/10; C12N15/12; C07K14/47; G01N33/50 Z; G01N33/15 Z                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                            |                                                                |
| B. 調査を行った分野<br>調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））<br>C12Q1/02; C12N5/10; C07K14/47; C12N15/12; G01N33/15; G01N33/50<br>最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの<br>日本国実用新案公報 1922-1996年<br>日本国公開実用新案公報 1971-2020年<br>日本国実用新案登録公報 1996-2020年<br>日本国登録実用新案公報 1994-2020年<br>国際調査で利用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）<br>JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN); UniProt/GeneSeq                                                             |                                                                                                                                                                                            |                                                                |
| C. 関連すると認められる文献                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                                                            |                                                                |
| 引用文献の<br>カテゴリー*                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示                                                                                                                                                          | 関連する<br>請求項の番号                                                 |
| X                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | JP 2007-528712 A (セノミックス、インコーポレイテッド) 18.10.2007 (2007-10-18)                                                                                                                               | 25, 26                                                         |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 請求項1、実施例等                                                                                                                                                                                  | 1-24                                                           |
| X                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | CABALLERO A. G. et al., Cav3.2 calcium channel interactions with the epithelial sodium channel ENaC, Molecular Brain, 2019.02.08, Vol.12, 12                                               | 25, 26                                                         |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 第2頁右欄 “Surface labeling” の項の第1-4行、第4頁左欄第3-15行、Fig.5A, B                                                                                                                                    | 1-24                                                           |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | JP 2010-506929 A (モネル ケミカル センシズ センター) 04.03.2010 (2010-03-04)                                                                                                                              | 1-24                                                           |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 請求項1、3、段落0027等                                                                                                                                                                             |                                                                |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | HOAGLAND E. N. et al., Identification of a Calcium Permeable Human Acid-sensing Ion Channel 1 Transcript Variant, THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 2010, Vol.285, No.53, p.41852-41862 | 1-24                                                           |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | Abstract, 第41854頁右欄下段-第12行-第41855頁左欄第7行、第41855頁左欄第7行-右欄第4行                                                                                                                                 |                                                                |
| <input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input checked="" type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                            |                                                                |
| * 引用文献のカテゴリー<br>“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの<br>“E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの<br>“L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）<br>“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献<br>“P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献<br>“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの<br>“X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの<br>“Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの<br>“&” 同一パテントファミリー文献 |                                                                                                                                                                                            |                                                                |
| 国際調査を完了した日<br>13.05.2020                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                                            | 国際調査報告の発送日<br>26.05.2020                                       |
| 名称及びあて先<br>日本国特許庁(ISA/JP)<br>〒100-8915<br>日本国<br>東京都千代田区霞が関三丁目4番3号                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                                                                            | 権限のある職員（特許庁審査官）<br>北村 悠美子 4B 4501<br>電話番号 03-3581-1101 内線 3448 |

| C. 関連すると認められる文献 |                                                                                                                                                                                                               |                |
|-----------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|
| 引用文献の<br>カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示                                                                                                                                                                             | 関連する<br>請求項の番号 |
| A               | Homo sapiens ACCN2 variant 3 mRNA, complete cds. [online], 2011, 2020.5.13検索、インターネット< <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/HM991481.1/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/HM991481.1/</a> ><br>全文 | 1-24           |
| <hr/>           |                                                                                                                                                                                                               |                |

国際調査報告  
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2020/007788

| 引用文献 |             |   | 公表日        | パテントファミリー文献 |                    |    | 公表日 |
|------|-------------|---|------------|-------------|--------------------|----|-----|
| JP   | 2007-528712 | A | 18.10.2007 | US          | 2005/0059094       | A1 |     |
|      |             |   |            | WO          | 2005/014848        | A2 |     |
|      |             |   |            |             | claim 1, EXAMPLE   |    |     |
| JP   | 2010-506929 | A | 04.03.2010 | US          | 2011/0236313       | A1 |     |
|      |             |   |            | WO          | 2008/051447        | A2 |     |
|      |             |   |            |             | claim 1, 3, [0027] |    |     |
|      |             |   |            | EP          | 2557087            | A1 |     |
|      |             |   |            | CN          | 101611049          | A  |     |
|      |             |   |            |             |                    |    |     |