(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119855915 A
(43)申请公布日 2025.04.18

(21)申请号 202380064459.5
(22)申请日 2023.09.11
(30)优先权数据
2022-144633 2022.09.12 JP
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2025.03.07
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/JP2023/033021 2023.09.11
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2024/058111 JA 2024.03.21
(71)申请人 高砂香料工业株式会社
地址 日本
(72)发明人 村井正人 柏木贵裕
(74)专利代理机构 北京林达刘知识产权代理事务所(普通合伙) 11277
专利代理师 刘新宇 李茂家
(51)Int.Cl.
C12Q 1/06(2006.01)
C07K 14/705(2006.01)
C12N 5/0793(2006.01)
C12N 5/10(2006.01)
C12N 15/12(2006.01)
G01N 33/15(2006.01)
G01N 33/50(2006.01)

权利要求书1页 说明书9页
序列表（电子公布） 附图6页

(54)发明名称

抑制恶臭的原料的筛选方法

(57)摘要

本发明提供高效地筛选抑制己醛臭的原料的候选物质的方法等。本发明的筛选方法包括如下步骤:对特定的嗅觉受体多肽添加试验物质和己醛的步骤;测定前述嗅觉受体多肽对己醛的响应的步骤;和基于测得的响应,将抑制前述嗅觉受体多肽的响应的试验物质鉴定为抑制己醛臭的原料的候选物质的步骤。

CN 119855915 A

1.一种抑制己醛臭的原料的候选物质的筛选方法,所述方法包括如下步骤:

对选自由嗅觉受体OR2C1、OR2J2、OR2J3、OR5K1、OR5P3和OR51E1、以及包含与所述各嗅觉受体所具有的氨基酸序列具有80％以上的同源性的氨基酸序列且对己醛显示响应性的多肽组成的组中的至少1种嗅觉受体多肽添加试验物质和己醛的步骤;

测定所述嗅觉受体多肽对己醛的响应的步骤;和

基于测得的响应,将抑制所述嗅觉受体多肽的响应的试验物质鉴定为抑制己醛臭的原料的候选物质。

2.根据权利要求1所述的方法,其中,所述己醛臭为源自于己醛的臭味、或至少一部分中包含该臭味的臭味,根据情况为给人带来不愉快的臭味,进而根据情况为体臭、汗臭、狐臭、头皮臭、半干臭、浴室臭、护理臭和大豆或乳制品的变质臭中的1种以上。

3.根据权利要求1或2所述的方法,其中,在表达所述嗅觉受体的从生物体单离的细胞上、或通过基因操作人为地表达所述嗅觉受体的细胞上,测定所述嗅觉受体多肽对己醛的响应。

4.根据权利要求1或2所述的方法,其中,通过报告基因分析或钙成像来测定嗅觉受体多肽的响应。

抑制恶臭的原料的筛选方法

技术领域

[0001] 本发明涉及筛选抑制恶臭的原料的候选物质的方法。

背景技术

[0002] 近年来,根据消费者的嗜好性的多样化、生活环境的多样化而对身边的臭气/恶臭敏感的人增加。该范围从生活空间中的臭味到食品中所含的微弱的异味(off-flavor),遍及多个方面,为了改善生活品质而要求更有效地减少/消除不愉快臭味的技术。

[0003] 作为生活空间中的不愉快臭味的代表性的臭味原因,可以举出体臭、半干臭、浴室臭、护理臭中所含的己醛等的醛臭(专利文献1～3、非专利文献1)。另外,作为一般家庭客厅中的代表性的臭气之一的醛臭被认为是客厅臭气中所占的贡献度高的臭气组,被认为是重要的除臭对象(非专利文献2)。通常认为,体臭中所含的己醛等醛类源自于不饱和脂肪酸,由存在于身体表面上的常驻性微生物、基于生物体内代谢的脂氧合酶等酶所催化的过氧化反应、分解而生成。尤其是香料业界,己醛还是用于重现汗臭、狐臭、头皮臭的香料中的重要的不愉快臭味成分(专利文献4、5)。进而,己醛等醛类不仅通过常驻于生活空间的微生物将从人体脱落的皮脂、调理时使用的油分解/代谢而产生,还通过与空气中的氧的氧化反应而自然产生(非专利文献2)。

[0004] 对于如此通过代谢、氧化反应而在生活空间中自然产生的己醛等醛类,难以完全抑制其产生,广泛要求气味控制(掩蔽)技术,所述技术选择性地不易感受到在利用了香料的生活空间内的不愉快臭味。

[0005] 另外,己醛表现为“青草味臭味”,也作为大豆、乳制品的变质时产生的异味而已知,也成为使食品的嗜好性降低的因素之一(非专利文献3、4)。大豆中,大豆脂氧合酶作用于不饱和脂肪酸而产生过氧化脂质,脂氢过氧化物裂解酶(hydroperoxidelyas)作用于所产生的过氧化脂质,从而生成正己醛等醛类,这成为青草味的原因。乳制品中,生乳被加工/贮藏的期间,乳脂中所含的亚油酸受到酶反应、光氧化而产生以正己醛为代表的醛类,由此产生不同于通常的臭气。因此,既然含有脂肪酸,那么就难以使食品中的己醛的产生完全为零,不使人特别地感觉到饮食时感觉到的己醛异味那样的香料原料的探索变得重要。

[0006] 如此,不易感觉到己醛臭的香料原料的探索出于衣食住行的两方面而言对于改善生活品质是非常重要的,但以往的不愉快臭味的减少/除臭物质的探索方法中,必须由气味评价的专家根据感官评价来逐一确认数量庞大的抑制恶臭的原料的候选物质,存在效率低的问题。另一方面,近年来确立的分子生物学的手法中,通过探索对恶臭来源物质的响应的嗅觉受体,且同时在体外筛选出如抑制该嗅觉受体的响应那样的抑制恶臭的原料,由此,可以迅速确定抑制恶臭的原料。

[0007] 人的嗅觉受体存在有约400种,已知一种气味物质会有多种嗅觉受体进行响应,但响应的受体的一部分大多为被称为广谱(Broadly Tuned)嗅觉受体的、无区别地识别广泛的气味物质的受体。非专利文献5中提及/示例了关于OR1A1,OR2W1等无论香味基调如何均广泛响应的广谱嗅觉受体。专利文献6中公开了,广谱嗅觉受体OR1A1、OR2W1、OR10A6负责调

整气味的灵敏度,通过增强或抑制该嗅觉受体的响应,从而可以增强或抑制气味灵敏度。

[0008] 非专利文献6中,作为与成为大豆的青草味的原因的己醛的感知相关的嗅觉受体,公开了广谱嗅觉受体OR2W1,作为抑制OR2W1响应的掩蔽剂,确定了α-蒎烯等。

[0009] 如此,虽然已知有被认为对己醛有响应的嗅觉受体,但是在体外试验中,显示浓度依赖性的己醛响应、并且与己醛臭的识别实际相关的嗅觉受体仅为广谱嗅觉受体OR2W1。

[0010] 现有技术文献

[0011] 专利文献

[0012] 专利文献1:日本特开平11-286423号公报

[0013] 专利文献2:日本专利第4950927号

[0014] 专利文献3:日本特开2007-14749号公报

[0015] 专利文献4:日本特开2004-263102号公报

[0016] 专利文献5:日本特开2011-184469号公报

[0017] 专利文献6:日本特开2018-121623号公报

[0018] 专利文献7:WO2019/230903

[0019] 专利文献8:WO2021/193429

[0020] 非专利文献

[0021] 非专利文献1:绪方规矩也,以看护/护理现场的舒适空间化为目标的“除臭功能的设计”,京都市产业技术研究所研究报告,No.9,p.73-76(2014)

[0022] 非专利文献2:中村祐子等,生活环境不同的家庭中的室内臭气成分的实际状态调查,Indoor Enviroment,Vol.17,No.1,pp.1-9(2014)

[0023] 非专利文献3:Food Sci.Nutr.,2020Jan 14;8(2):1139-1149.

[0024] 非专利文献4:Milk Science,Vol.57,No.3,2008

[0025] 非专利文献5:Flavour Fragr.J.,2015,30,342-361

[0026] 非专利文献6:寺田祐子等,与成为大豆的青草味的原因的正己醛的感知相关的嗅觉受体的确定,大豆蛋白质研究,Vol.23,p.159-164(2020)

[0027] 非专利文献7:Christophe Verbeurgt et.al,PLoS One.,2014.9(5):e96333(https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096333)

发明内容

[0028] 发明要解决的问题

[0029] 对于以响应广泛的气味、调整气味的灵敏度的广谱嗅觉受体为目标的掩蔽剂的用途,为了能无区别地抑制广泛的气味,无法否定有甚至掩蔽掉食品中、香料中所含的优选的气味,较弱地感受到气味整体的可能性。在这样的情况下,期望确定不是无区别地识别广泛的气味的广谱嗅觉受体而是对己醛臭本身的识别真正重要的嗅觉受体组,且开发出高效地筛选出抑制己醛臭的原料的候选物质的方法等。

[0030] 用于解决问题的方案

[0031] 本发明是考虑上述情况而作出的,提供以下所示的、筛选抑制己醛臭的原料的候选物质的方法。

[0032] [1]一种筛选抑制己醛臭的原料的候选物质的方法,所述方法包括如下步骤:

[0033] 对选自由嗅觉受体OR2C1、OR2J2、OR2J3、OR5K1、OR5P3和OR51E1、以及包含与前述各嗅觉受体所具有的氨基酸序列具有80％以上的同源性的氨基酸序列且对恶臭来源物质己醛显示响应性的多肽组成的组中的至少1种嗅觉受体多肽添加试验物质和己醛的步骤;

[0034] 测定前述嗅觉受体多肽对己醛的响应的步骤;和

[0035] 基于测得的响应,将抑制前述嗅觉受体多肽的响应的试验物质鉴定为抑制己醛臭的原料的候选物质的步骤。

[0036] [2]根据[1]所述的方法,其中,前述己醛臭为源自于己醛的臭味、或至少一部分中包含该臭味的臭味,根据情况为给人带来不愉快的臭味,进而根据情况为体臭、汗臭、狐臭、头皮臭、半干臭、浴室臭、护理臭和大豆或乳制品的变质臭中的1种以上。

[0037] [3]根据[1]或[2]所述的方法,其中,在表达前述嗅觉受体的从生物体单离的细胞上、或通过基因操作人为地表达前述嗅觉受体的细胞上,测定前述嗅觉受体多肽对己醛臭来源物质的响应。

[0038] [4]根据[1]～[3]中任一项所述的方法,其中,通过报告基因分析(reporter gene assay)或钙成像来测定嗅觉受体多肽的响应。

[0039] 发明的效果

[0040] 通过使用本发明的方法,从而可以筛选出能阻碍己醛与嗅觉受体OR2C1、OR2J2、OR2J3、OR5K1、OR5P3和OR51E1的结合的抑制己醛臭的原料的候选物质。

附图说明

[0041] 图1为示出嗅觉受体OR2C1对己醛的响应的测定结果的图。

[0042] 图2为示出嗅觉受体OR2J2对己醛的响应的测定结果的图。

[0043] 图3为示出嗅觉受体OR2J3对己醛的响应的测定结果的图。

[0044] 图4为示出嗅觉受体OR5K1对己醛的响应的测定结果的图。

[0045] 图5为示出嗅觉受体OR5P3对己醛的响应的测定结果的图。

[0046] 图6为示出嗅觉受体OR51E1对己醛的响应的测定结果的图。

[0047] 图7为示出基于抑制己醛臭的原料β-石竹烯氧化物的添加的、嗅觉受体OR2C1对己醛的响应抑制效果的图。

[0048] 图8为示出基于抑制己醛臭的原料乳酸薄荷酯的添加的、嗅觉受体OR2J2对己醛的响应抑制效果的图。

[0049] 图9为示出基于抑制己醛臭的原料诺卡酮的添加的、嗅觉受体OR2J3对己醛的响应抑制效果的图。

[0050] 图10为示出基于抑制己醛臭的原料β-石竹烯氧化物的添加的、嗅觉受体OR5K1对己醛的响应抑制效果的图。

[0051] 图11为示出基于抑制己醛臭的原料乳酸薄荷酯的添加的、嗅觉受体OR5P3对己醛的响应抑制效果的图。

[0052] 图12为示出基于抑制己醛臭的原料β-石竹烯氧化物的添加的、嗅觉受体OR51E1对己醛的响应抑制效果的图。

具体实施方式

[0053] 本发明内容

[0054] 本说明书包含成为本申请优先权主张的基础的日本特愿2022-144633号说明书(令和4年(2022年)9月12日的申请)的全部。另外,本说明书中引用的全部发行物、例如现有技术文献、和公开公报、专利公报、其他专利文献作为参照并入到本说明书中。

[0055] 本发明中,提供探索对己醛以浓度依赖性方式显示响应的真正的嗅觉受体组,高效地筛选出抑制该己醛臭的原料的候选物质的方法、进而减少该己醛臭的不愉快感的抑制己醛臭的组合物。

[0056] 本发明人新发现了约400种存在的人嗅觉受体中的特定的受体,即,OR2C1、OR2J2、OR2J3、OR5K1、OR5P3和OR51E1对恶臭来源物质己醛以浓度依赖性方式显示响应。另外,还发现了已在基于人嗅觉的感官试验中被证实有抑制己醛臭能力的已知的抑制己醛臭的原料可抑制上述特定的嗅觉受体这一新见解,并确定了上述特定的嗅觉受体组为对己醛臭的识别重要的真正的嗅觉受体组。由此,基于嗅觉受体拮抗剂的掩蔽效果的抑制己醛臭的原料的评价和选择成为可能。本发明是基于这样的新见解而发现的。

[0057] 以下,对本发明的抑制己醛臭的原料的候选物质的筛选方法(以下,称为本发明的筛选方法)具体进行说明。

[0058] 如前述,本发明的筛选方法包括以下的工序:

[0059] 对选自由人嗅觉受体OR2C1、OR2J2、OR2J3、OR5K1、OR5P3和OR51E1、以及包含与前述各嗅觉受体所具有的氨基酸序列具有80%以上的同源性的氨基酸序列且对己醛显示响应性的多肽组成的组中的至少1种嗅觉受体多肽添加试验物质和己醛;

[0060] 测定前述嗅觉受体多肽对己醛的响应;和

[0061] 基于测得的响应,将抑制前述嗅觉受体多肽的响应的试验物质鉴定为抑制己醛臭的原料的候选物质。本发明例如可以根据以下的实施方式而实施。

[0062] 作为一实施方式,本发明为:使用对恶臭来源物质己醛显示响应性的OR2C1、OR2J2、OR2J3、OR5K1、OR5P3和OR51E1,从试验物质中筛选出抑制己醛臭的原料的候选物质的方法,其特征在于,所述方法包括如下工序:

[0063] 工序(i),使选自由嗅觉受体OR2C1、OR2J2、OR2J3、OR5K1、OR5P3和OR51E1、以及包含与前述各嗅觉受体所具有的氨基酸序列具有80%以上的同源性的氨基酸序列且对己醛显示响应性的蛋白质(多肽)组成的组中的嗅觉受体与己醛接触,测定接触己醛以前的嗅觉受体的基础活性响应(T0)和接触己醛后的任意时间下的嗅觉受体对己醛的响应(Tx);

[0064] 工序(ii),比较工序(i)中的测定结果即接触己醛以前的嗅觉受体的基础活性响应(T0)与接触己醛后的任意时间下的嗅觉受体对己醛的响应(Tx),计算并求出响应性的变化值;

[0065] 工序(iii),工序(i)中在己醛中混合试验物质,与工序(ii)同样地计算并求出响应性的变化值;

[0066] 工序(iv),选择与工序(ii)相比工序(iii)的值减少的试验物质作为抑制己醛臭的原料的候选物质。

[0067] 本发明的筛选方法中,将试验物质对选自由嗅觉受体OR2C1、OR2J2、OR2J3、OR5K1、OR5P3和OR51E1、以及包含与前述各嗅觉受体所具有的氨基酸序列具有80%以上的同源性

的氨基酸序列且对己醛显示响应性的蛋白质(多肽)组成的组中的嗅觉受体的响应性作为指标,从试验物质中选择抑制己醛臭的原料的候选物质。

[0068] 体外嗅觉受体测定中,通常,在嗅觉受体的表达量全部相同的前提下进行评价,认为每1个嗅觉受体单位的响应值越高,越是高灵敏度的嗅觉受体。然而,人嗅上皮中实际表达的嗅觉受体的表达量根据嗅觉受体的种类而不同,在体外测定中为强响应的嗅觉受体未必将存在于人嗅上皮的嗅神经细胞中的气味感觉强烈地传递到脑中枢。因此推测,即使基于体外嗅觉受体测定为对气味物质的响应值小的嗅觉受体,在实际表达人嗅上皮中表达量多的嗅觉受体的嗅神经细胞中,基于气味刺激的响应也变强,对气味识别有很大贡献。根据前述的非专利文献7,人的嗅觉受体的实际表达量如下:广谱嗅觉受体的OR2W1的平均表达量为6±13,非常少,另一方面,本申请发明人等经深入研究最后确定的己醛嗅觉受体的平均表达量公开如下:OR2C1的平均值为78、OR2J2的平均值为37、OR2J3的平均值为82、OR5K1的平均值为598、OR5P3的平均值为752、OR51E1的平均值为170,可知在所确定的全部嗅觉受体中,表达量普遍较多,是对人嗅觉中的己醛臭识别贡献度高的嗅觉受体。由此,通过将己醛嗅觉受体OR2C1、OR2J2、OR2J3、OR5K1、OR5P3和OR51E1作为目标来评价试验物质的响应性,从而可以从试验物质中选择能阻碍己醛与嗅觉受体结合的候选物质。需要说明的是,本说明书中,“试验物质”没有特别限定,是指抑制己醛臭效果的调查对象,是指化合物、组合物或混合物。另外,本说明书中“抑制己醛臭的原料”没有特别限定,是指能抑制己醛臭的化合物、组合物或混合物。以下,对本发明的筛选方法的各工序(前述工序(i)~(v))进行说明。

[0069] ＜工序(i)＞

[0070] 工序(i)中,使选自由嗅觉受体OR2C1、OR2J2、OR2J3、OR5K1、OR5P3和OR51E1、以及包含与前述各嗅觉受体所具有的氨基酸序列具有80％以上的同源性的氨基酸序列且对己醛显示响应性的蛋白质(多肽)组成的组中的嗅觉受体与己醛接触,测定接触己醛以前的嗅觉受体的基础活性响应(T0)和接触己醛后的任意时间下的嗅觉受体对己醛的响应(Tx)。

[0071] 作为嗅觉受体,使用选自由OR2C1、OR2J2、OR2J3、OR5K1、OR5P3和OR51E1、以及包含与前述各嗅觉受体所具有的氨基酸序列具有80％以上的同源性的氨基酸序列且对己醛显示响应性的蛋白质(多肽)组成的组中的嗅觉受体。

[0072] OR2C1在NCBI(GenBank)的网站(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)中登记为“Accession number:NM_012368.2”、“Accession number:NP_036500.2”,是由序列编号1所示的碱基序列的第53号～第991号的DNA编码而成的氨基酸序列(序列编号2)所构成的蛋白质(多肽)。

[0073] OR2J2在NCBI(GenBank)的网站中登记为“Accession number:NM_030905.2”、“Accession number:NP_112167.2”,是由序列编号3所示的碱基序列的第103号～第1041号的DNA编码而成的氨基酸序列(序列编号4)所构成的蛋白质(多肽)。

[0074] OR2J3在NCBI(GenBank)的网站中登记为“Accession number:NM_001005216.3”、“Accession number:NP_001005216.2”,是由序列编号5所示的碱基序列的第82号～第1017号的DNA编码而成的氨基酸序列(序列编号6)所构成的蛋白质(多肽)。

[0075] OR5K1在NCBI(GenBank)的网站中登记为“Accession number:NM_001004736.3”、“Accession number:NP_001004736.2”,是由序列编号7所示的碱基序列的第98号～第1024

号的DNA编码而成的氨基酸序列(序列编号8)所构成的蛋白质(多肽)。

[0076] OR5P3在NCBI(GenBank)的网站中登记为“Accession number:NM_153445.2”、“Accession number:NP_703146.1”,是由序列编号9所示的碱基序列的第39号～第974号的DNA编码而成的氨基酸序列(序列编号10)所构成的蛋白质(多肽)。

[0077] OR51E1在NCBI(GenBank)的网站中登记为“Accession number:NM_152430.3”、“Accession number:NP_689643.2”,是由序列编号11所示的碱基序列的第145号～第1101号的DNA编码而成的氨基酸序列(序列编号12)所构成的蛋白质(多肽)。

[0078] 该嗅觉受体OR2C1、OR2J2、OR2J3、OR5K1、OR5P3和OR51E1选择性地对己醛臭响应,因此,使用了OR2C1、OR2J2、OR2J3、OR5K1、OR5P3和OR51E1的筛选方法可以对抑制己醛臭的原料的开发做出贡献。

[0079] 作为嗅觉受体,可以使用选自由OR2C1、OR2J2、OR2J3、OR5K1、OR5P3和OR51E1、以及包含与前述各嗅觉受体所具有的氨基酸序列具有80％以上、优选85％以上、更优选90％以上、进一步优选95％以上、特别优选98％以上的同源性的氨基酸序列且对己醛显示响应性的蛋白质(多肽)组成的组中的嗅觉受体。需要说明的是,本说明书中氨基酸序列的序列同源性可以根据BLAST搜索算法(可以从NCBI公开获得)而算出。

[0080] 嗅觉受体可以以一种使用,也可以组合两种以上而使用。

[0081] 本发明中,己醛臭是指源自于己醛的臭味、或至少一部分中包含该臭味的臭味,优选只要为给人带来不愉快的臭味就无限定,例如可以举出体臭、汗臭、狐臭、头皮臭、半干臭、浴室臭、护理臭和大豆或乳制品的变质臭等。

[0082] 本发明中,使嗅觉受体与己醛接触,测定嗅觉受体对己醛臭的响应的方法没有特别限制。例如,可以在表达嗅觉受体的从生物体分离的细胞上与己醛接触,测定嗅觉受体的响应,也可以在通过基因操作而人为地表达嗅觉受体的细胞上与己醛接触,测定嗅觉受体的响应。使嗅觉受体与己醛接触的时间还依赖于己醛的浓度、测定方法,因此,不能一概而论,但本发明中的萤光素酶测定法中,为0～60分钟、优选0～30分钟,钙成像法中,为几秒～几分钟左右。

[0083] 通过使用插入了编码嗅觉受体的基因的载体来转化细胞,从而可以制作通过基因操作而人为表达嗅觉受体的细胞。

[0084] 本发明的优选方式中,与嗅觉受体一起也可以插入牛视紫红质的N末端20个氨基酸残基。通过插入牛视紫红质的N末端20个氨基酸残基,从而可以促进嗅觉受体的细胞膜表达。

[0085] 牛视紫红质在NCBI(GenBank)的网站中登记为“Accession number:NM_001014890.2”、“Accession number:NP_001014890.1”。牛视紫红质是由序列编号13所示的碱基序列的第1号～第1047号的DNA编码而成的氨基酸序列(序列编号14)所构成的蛋白质(多肽)。

[0086] 另外,也可以使用包含与序列编号14所示的氨基酸序列具有80％以上、优选85％以上、更优选90％以上、进一步优选95％以上、特别优选98％以上的同源性的氨基酸序列且能促进嗅觉受体的细胞膜表达的蛋白质(多肽)来代替牛视紫红质。

[0087] 需要说明的是,只要能促进嗅觉受体的细胞膜表达即可,不限定于牛视紫红质,也可以使用其他蛋白质(多肽)的氨基酸残基。

[0088] 测定嗅觉受体的响应的方法没有特别限制,可以使用本领域中使用的任意方法。例如已知:当香气化合物与嗅觉受体结合时,使细胞内的G蛋白活化,G蛋白活化腺苷酸环化酶,将ATP转化成环状AMP(cAMP),增加细胞内的cAMP量。因此,通过测定cAMP量,从而可以测定嗅觉受体的响应。作为测定cAMP量的方法,可使用ELISA法、报告基因分析法等。其中,优选通过使用萤光素酶等发光物质的报告基因分析法来测定嗅觉受体的响应。

[0089] ＜工序(ii)＞

[0090] 工序(ii)中,比较工序(i)中的测定结果即接触己醛以前的嗅觉受体的基础活性响应(T0)与接触己醛后的任意时间下的嗅觉受体对己醛的响应(Tx),计算并求出响应性的变化值。

[0091] 根据本发明的一实施方式,响应性的变化可以将倍增(Fold Increase)值作为指标来进行评价,所述倍增值是用工序(i)中的接触己醛后的任意时间下的嗅觉受体对己醛的响应(Tx)除以接触己醛以前的嗅觉受体的基础活性响应(T0)中的测定结果而求出的。例如,在通过使用萤光素酶等发光物质的报告基因分析法来测定嗅觉受体的响应的情况下,可以使用倍增值优选成为1以上、更优选成为1.2以上、进一步优选成为2以上的浓度的恶臭来源物质进行评价。

[0092] ＜工序(iii)＞

[0093] 工序(iii)中,工序(i)中在己醛中混合试验物质,与工序(ii)同样地计算并求出响应性的变化值。

[0094] ＜工序(iv)＞

[0095] 工序(iv)中,选择工序(iii)中求出的变化值比工序(ii)中求出的变化值减少了的试验物质作为抑制恶臭的原料的候选物质。

[0096] 本发明中,比较工序(ii)和(iii)中的测定结果可见响应性的变化值减少的情况下,可以将工序(iii)中使用的试验物质评价为抑制恶臭的原料的候选物质。

[0097] 本发明中,比较工序(ii)和(iii)中的变化值的测定结果可见响应性的变化值的减少情况下,可以将评价工序(iii)中使用的试验物质评价为抑制恶臭的原料的候选物质。

[0098] 如上述,可以从试验物质中筛选出抑制己醛臭的原料的候选物质。根据本发明,可以从大量的试验物质中选择出抑制己醛臭的原料的候选物质而不会产生基于通过人的嗅觉而进行的感官评价所引起的嗅觉疲劳、个体差异等所导致的问题。

[0099] 所选择的物质可以用作抑制己醛臭的原料的候选物质。也可以基于所选择的物质,根据需要进行改变等,开发出具有最佳的气味的新型的化合物。进而,可以将所选择的物质与其他香料原料共混来抑制己醛臭、且还能开发出具有最佳的气味的香料原料。通过使用本发明的筛选方法,从而可以开发出作为抑制己醛臭的原料的新香料原料。

[0100] 实施例

[0101] 以下,列举实施例对本发明进而详细地进行说明,但本发明不受这些实施例的任何限制。

[0102] [实施例1]

[0103] 嗅觉受体OR2C1、OR2J2、OR2J3、OR5K1、OR5P3和OR51E1对己醛响应的确认

[0104] (1)嗅觉受体基因克隆

[0105] 人嗅觉受体基因通过基于前述NCBI(GenBank)的网站中登记的碱基序列信息(参

照序列编号1、3、5、7、9和11)、由Human Genomic DNA:Female(Promega公司)、以PCR法进行克隆从而得到。在pME18S载体中插入编码牛视紫红质的N末端20个氨基酸残基的DNA(序列编号13的碱基序列的第1号～第60号的碱基所构成的DNA),进而在其下游插入得到的人嗅觉受体基因,由此,得到人嗅觉受体基因表达载体。

[0106] (2)对己醛响应的嗅觉受体基因的表达筛选

[0107] 将人嗅觉受体基因表达载体0.05μg、RTP1S载体0.01μg、包含CMV启动子的萤火虫萤光素酶载体(Firefly Luciferase Vector)pGloSensor™-22F cAMP Plasmid(Promega公司)0.01μg溶解于Opti-MEM I(gibco公司)10μL中,形成基因溶液(1孔份)。将HEK293T细胞各100μL以24小时后达到亚汇合(subconfluent)的细胞数接种至96孔板(Biocoat、Corning公司),根据Lipofectamine 3000的使用法,通过脂质体转染法在各孔中添加基因溶液,对细胞中进行基因导入,在37℃、5%二氧化碳气氛下培养24小时。去除培养液后,用HEPES缓冲液清洗1次,在各孔中添加用含FBS的HEPES缓冲液调整为规定浓度的GloSensor™ cAMP Reagent(Promega公司)100μL,在室温下静置2小时。之后,在各孔中添加用含有300μM $CuCl_2$和FBS的HEPES缓冲液制备的己醛10mM溶液各10μL,自刚刚添加后起每1分钟测定萤光素酶活性的响应值的经时变化,从而获得约400种人嗅觉受体对己醛的响应。嗅觉受体的响应强度用己醛刺激后所产生的萤光素酶活性的最大响应值除以己醛刺激前的萤光素酶活性而求出的倍增值来表示。由此,作为对己醛响应的嗅觉受体候选,可以确定OR2C1、OR2J2、OR2J3、OR5K1、OR5P3和OR51E1。之后,以成为最终浓度的10倍浓度的方式,用含有300μM $CuCl_2$和FBS的HEPES缓冲液制备被检体的香气化合物,在各孔中添加本香气化合物刺激液各10μL,自刚刚添加后起每1分钟测定萤光素酶活性的经时变化,从而获得约400种人嗅觉受体对香气化合物的响应。嗅觉受体的响应强度用由香气化合物的刺激而产生的萤光素酶活性的最大值除以香气化合物刺激前的萤光素酶活性而求出的倍增值来表示。

[0108] (3)对己醛响应的嗅觉受体的鉴定

[0109] 通过上述萤光素酶活性测定法,在各种浓度下测定了嗅觉受体OR2C1、OR2J2、OR2J3、OR5K1、OR5P3和OR51E1对作为恶臭来源物质的己醛的响应。将其结果分别示于图1～6。OR2C1、OR2J2、OR2J3、OR5K1、OR5P3和OR51E1显示了对己醛的浓度依赖性的各种响应。另一方面,Mock试验(使用不表达嗅觉受体的细胞)中未见响应。即、OR2C1、OR2J2、OR2J3、OR5K1、OR5P3和OR51E1对己醛特异性地显示响应。

[0110] [实施例2]

[0111] 基于抑制己醛臭的原料的OR2C1、OR2J2、OR2J3、OR5K1、OR5P3和OR51E1的响应抑制效果的评价

[0112] 对于前述专利文献7、8中的已知掩蔽己醛臭的已知的抑制己醛臭的原料:乳酸薄荷酯、诺卡酮、β-石竹烯氧化物,通过下述萤光素酶测定法测定了己醛嗅觉受体OR2C1、OR2J2、OR2J3、OR5K1、OR5P3和OR51E1的响应抑制效果。

[0113] (1)萤光素酶测定

[0114] 将人嗅觉受体OR2C1、OR2J2、OR2J3、OR5K1、OR5P3和OR51E1的各基因表达载体0.05μg、RTP1S载体0.01μg、包含CMV启动子的萤火虫萤光素酶载体pGloSensor™-22F cAMP Plasmid(Promega公司)0.01μg溶解于Opti-MEM I(gibco公司)10μL中,形成基因溶液(1孔份)。将HEK293T细胞各100μL以24小时后达到亚汇合的细胞数接种至96孔板(Biocoat、

Corning公司),根据Lipofectamine 3000的使用法,通过脂质体转染法,在各孔中添加基因溶液,对细胞中进行基因导入,在37℃、5%二氧化碳气氛下培养24小时。去除培养液后,用HEPES缓冲液清洗1次,在各孔中添加用含FBS的HEPES缓冲液调整为规定浓度的GloSensor™ cAMP Reagent(Promega公司)100μL,在室温下静置2小时。之后,在各孔中添加在用含有300μM $CuCl_2$和FBS的HEPES缓冲液制备的己醛7mM溶液中混合有抑制己醛臭的原料3mM的溶液各10μL,自刚刚添加后起每1分钟测定萤光素酶活性的经时变化,从而获得前述各人嗅觉受体的经时响应。嗅觉受体的响应强度用由香气化合物的刺激所产生的萤光素酶活性除以香气化合物刺激前的萤光素酶活性而求出的倍增值来表示。

[0115] (2)基于抑制己醛臭的原料的嗅觉受体响应的抑制评价

[0116] 上述萤光素酶测定中,在被检体中混合并使用己醛和抑制己醛臭的原料:乳酸薄荷酯、诺卡酮或β-石竹烯氧化物中的任意者,求出在不混合抑制己醛臭的原料的试验中、以及在混合了抑制己醛臭的原料的试验中的倍增值的经时变化。将其结果示于图7~图12。抑制己醛臭的原料(乳酸薄荷酯、诺卡酮、β-石竹烯氧化物)示出了抑制己醛嗅觉受体OR2C1、OR2J2、OR2J3、OR5K1、OR5P3和OR51E1的响应的效果(图7~图12)。这些结果表明:以乳酸薄荷酯、诺卡酮、β-石竹烯氧化物为代表的已知的抑制己醛臭的原料通过抑制己醛嗅觉受体组OR2C1、OR2J2、OR2J3、OR5K1、OR5P3和OR51E1中的至少1种嗅觉受体来抑制己醛臭。

[0117] 产业上的可利用性

[0118] 根据本发明,可以提供:筛选出能阻碍己醛与嗅觉受体OR2C1、OR2J2、OR2J3、OR5K1、OR5P3和OR51E1的结合的抑制己醛臭的原料的候选物质的方法。

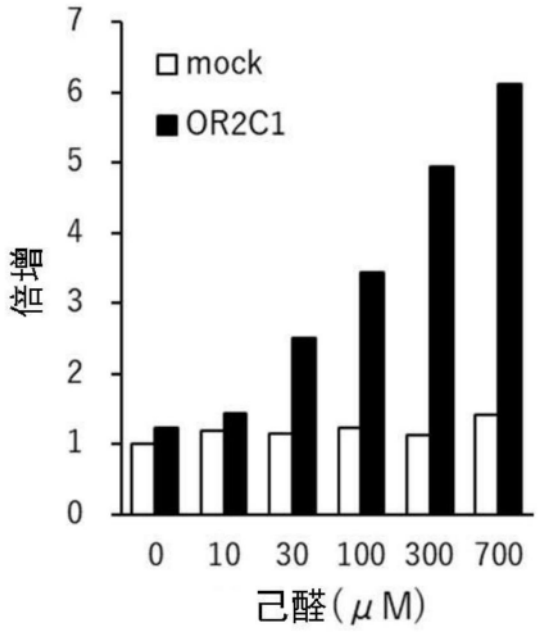

mock
OR2C1
倍增
0
1
2
3
4
5
6
7
0
10
30
100
300
700
己醛(μM)

图1

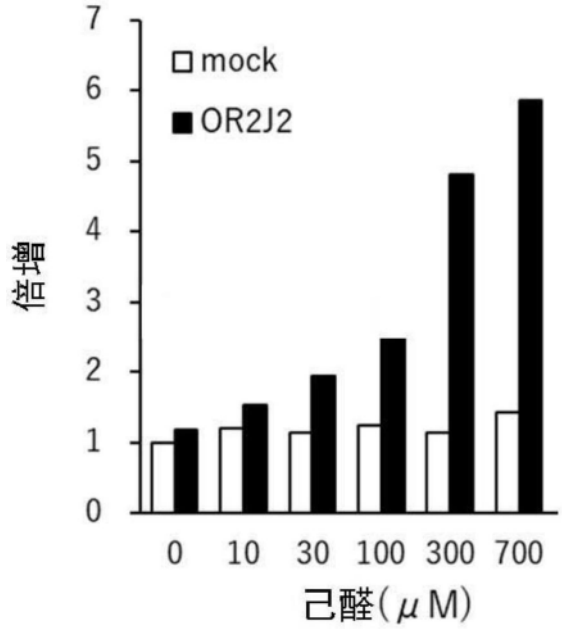

mock
OR2J2
倍增
0
1
2
3
4
5
6
7
0
10
30
100
300
700
己醛(μM)

图2

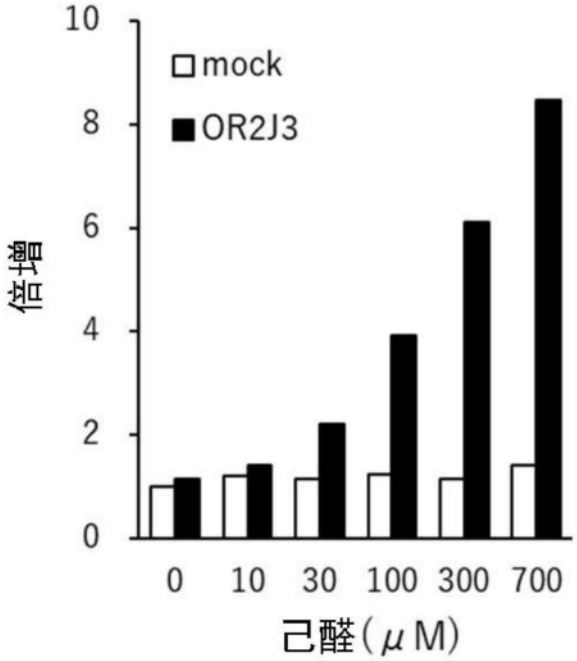

10
8
6
4
2
0
mock
OR2J3
倍增
0
10
30
100
300
700
己醛(μM)

图3

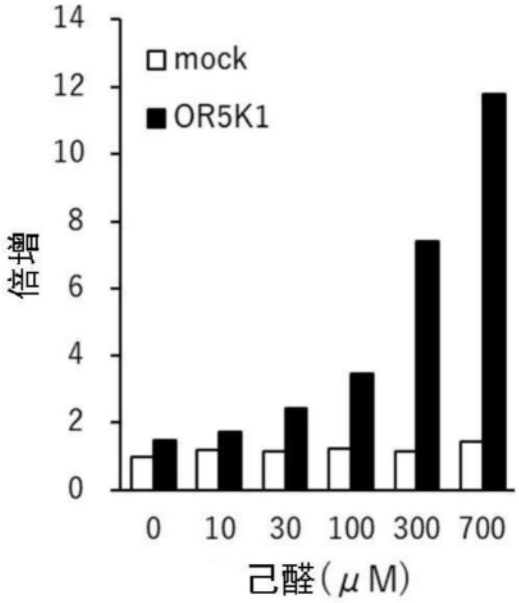

14
12
10
8
6
4
2
0
mock
OR5K1
倍增
0
10
30
100
300
700
己醛(μM)

图4

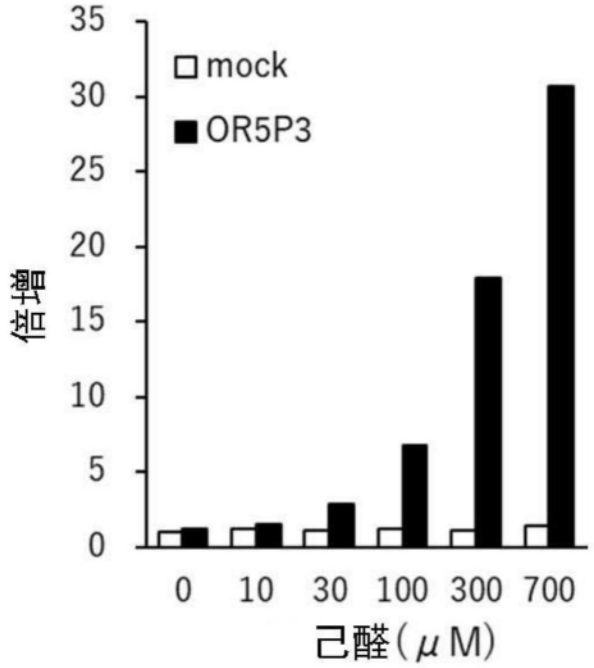

35
30
25
20
15
10
5
0
mock
OR5P3
倍增
0
10
30
100
300
700
己醛(μM)

图5

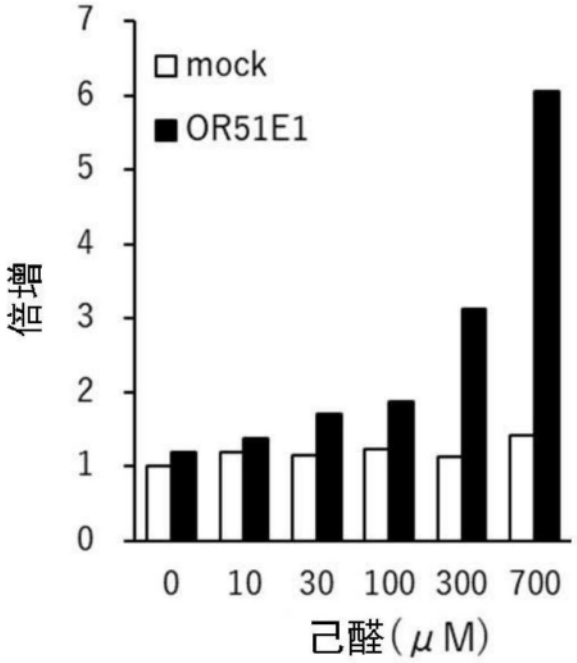

7
6
5
4
3
2
1
0
mock
OR51E1
倍增
0
10
30
100
300
700
己醛(μM)

图6

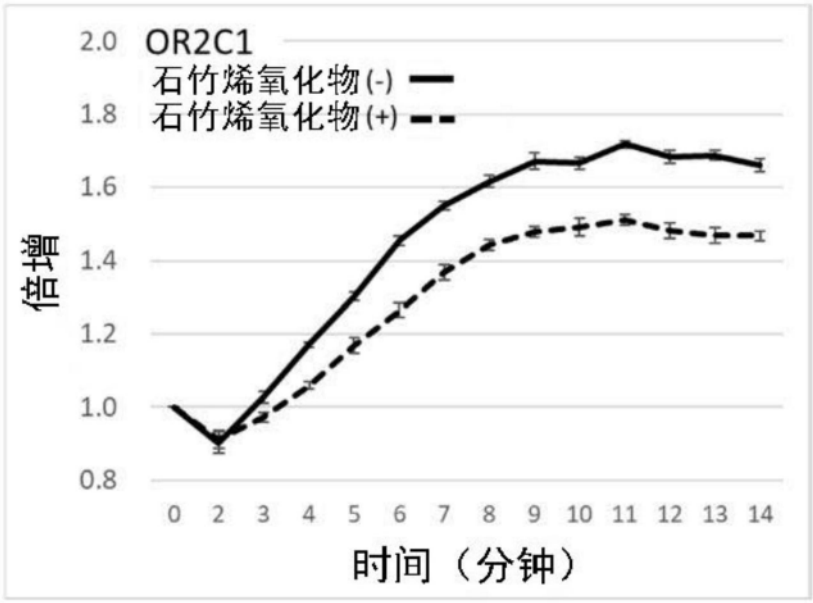

OR2C1
石竹烯氧化物(-)
石竹烯氧化物(+)
倍增
2.0
1.8
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14
时间（分钟）

图7

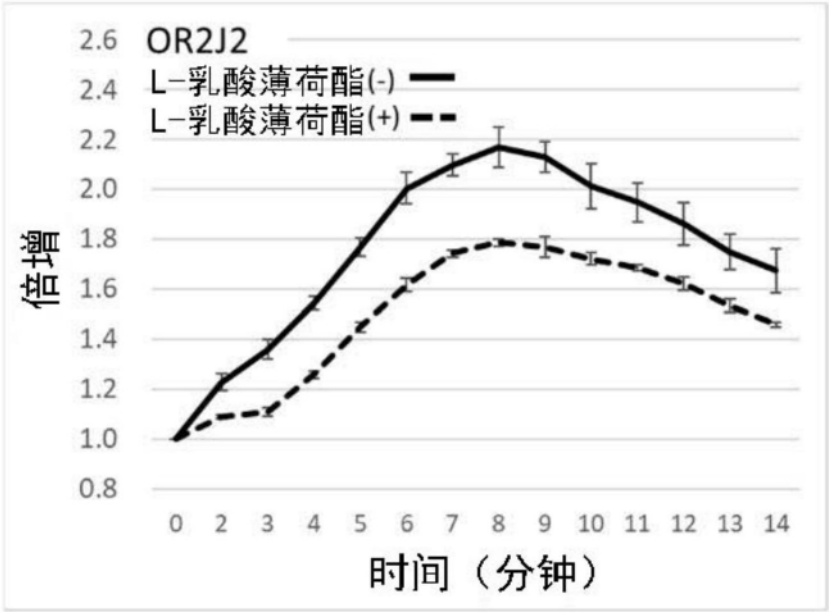

OR2J2
L-乳酸薄荷酯(-)
L-乳酸薄荷酯(+)
倍增
2.6
2.4
2.2
2.0
1.8
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14
时间（分钟）

图8

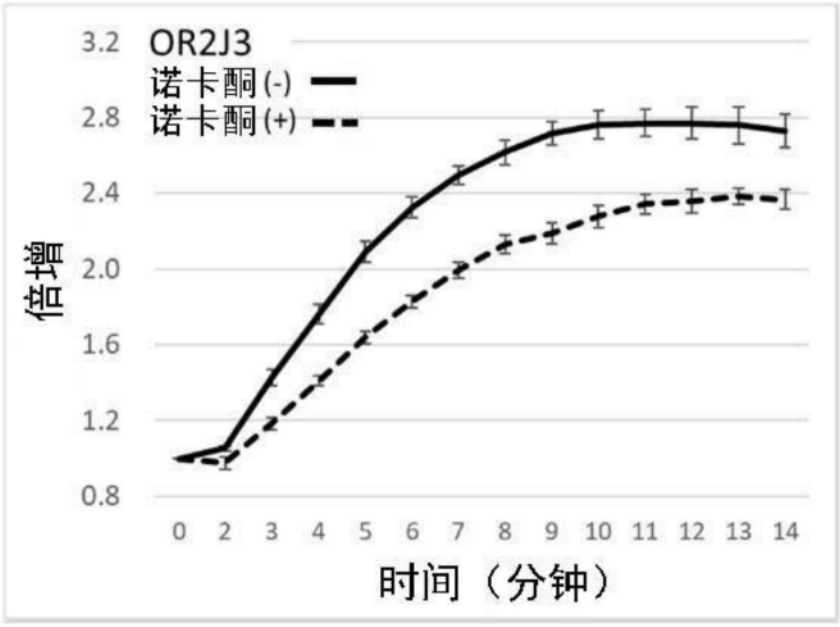

OR2J3
诺卡酮(-)
诺卡酮(+)
3.2
2.8
2.4
2.0
1.6
1.2
0.8
倍增
0 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14
时间（分钟）

图9

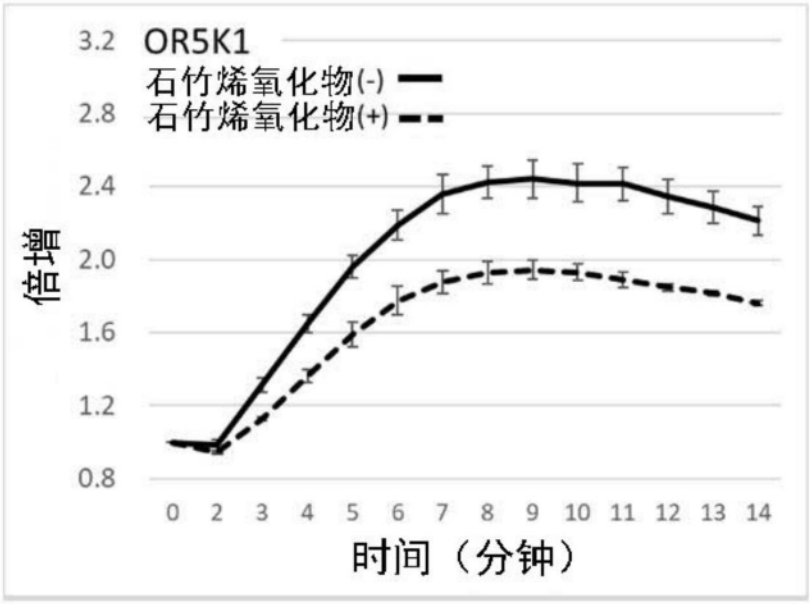

OR5K1
石竹烯氧化物(-)
石竹烯氧化物(+)
3.2
2.8
2.4
2.0
1.6
1.2
0.8
倍增
0 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14
时间（分钟）

图10

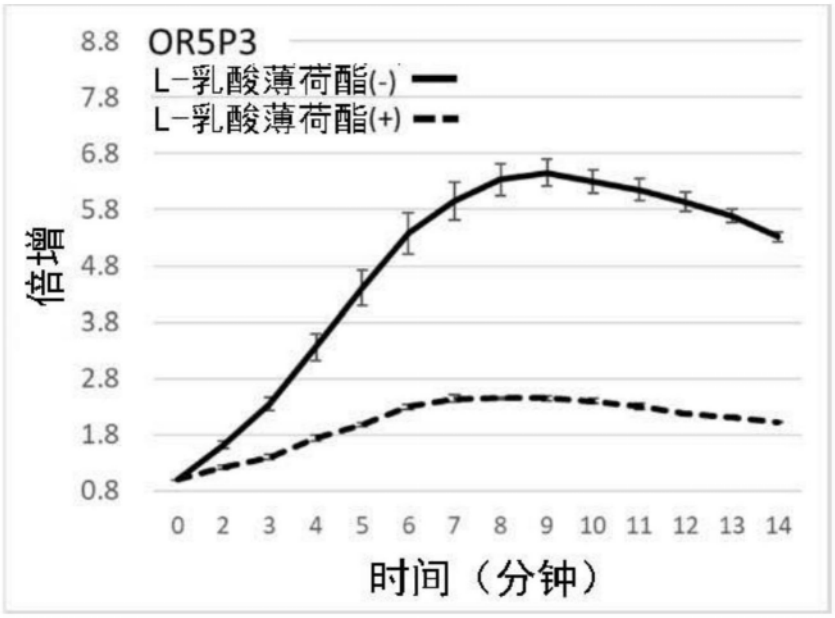

OR5P3
L-乳酸薄荷酯(-)
L-乳酸薄荷酯(+)
倍增
8.8
7.8
6.8
5.8
4.8
3.8
2.8
1.8
0.8
0 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14
时间（分钟）

图11

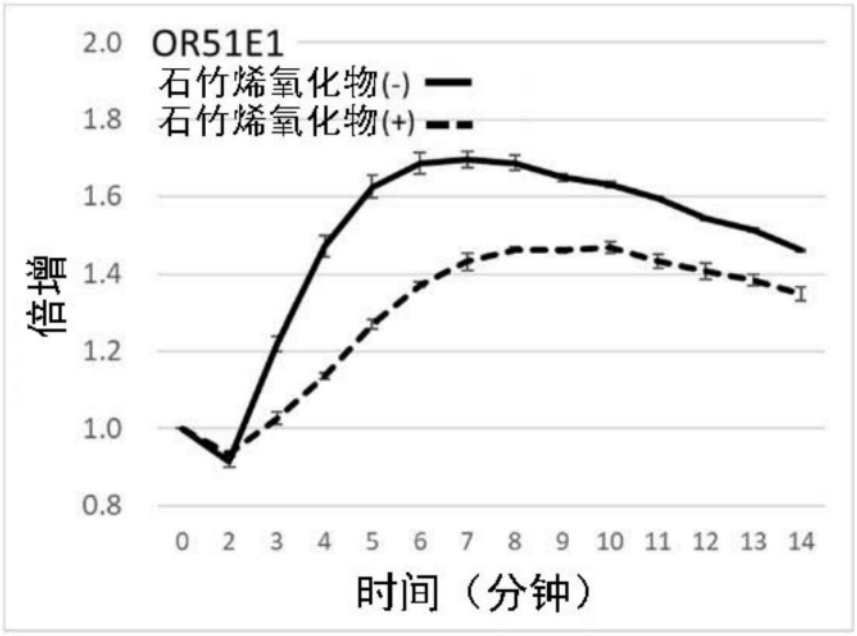

OR51E1
石竹烯氧化物(-)
石竹烯氧化物(+)
倍增
2.0
1.8
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14
时间（分钟）

图12