

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7203760号
(P7203760)

(45)発行日 令和5年1月13日(2023.1.13)

(24)登録日 令和5年1月4日(2023.1.4)

(51)国際特許分類	F I
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02 Z N A
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63 Z
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	C 1 2 N 15/12

請求項の数 9 (全19頁)

(21)出願番号	特願2019-562121(P2019-562121)	(73)特許権者	000169466 高砂香料工業株式会社 東京都大田区蒲田五丁目37番1号
(86)(22)出願日	平成30年12月26日(2018.12.26)	(74)代理人	100092783 弁理士 小林 浩
(86)国際出願番号	PCT/JP2018/047918	(74)代理人	100128761 弁理士 田村 恭子
(87)国際公開番号	WO2019/131789	(74)代理人	100104282 弁理士 鈴木 康仁
(87)国際公開日	令和1年7月4日(2019.7.4)	(72)発明者	三木 あずさ 神奈川県平塚市西八幡一丁目4番11号 高砂香料工業株式会社内
審査請求日	令和3年10月5日(2021.10.5)	(72)発明者	寺田 育生 神奈川県平塚市西八幡一丁目4番11号 高砂香料工業株式会社内
(31)優先権主張番号	特願2017-252587(P2017-252587)		
(32)優先日	平成29年12月27日(2017.12.27)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	日本国(JP)		

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 加齢臭抑制素材のスクリーニング方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

加齢臭抑制素材のスクリーニング方法であって、以下の工程：

(a) OR2C1、OR2J2、OR4E2、OR5P3、及び(b)前記(a)のいずれかのポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも90%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ加齢臭原因物質に対して応答性を示すポリペプチドからなる群より選択される少なくとも1種の嗅覚受容体ポリペプチドに、試験物質及び加齢臭原因物質を添加すること；

前記加齢臭原因物質に対する前記嗅覚受容体ポリペプチドの応答を測定すること；及び、測定された応答に基づいて前記嗅覚受容体ポリペプチドの応答を抑制する試験物質を同定すること、
を含み、

前記加齢臭原因物質がトランス-2-ノネナール及びトランス-2-オクテナールからなる群より選択される1種以上である、方法。

【請求項2】

前記嗅覚受容体ポリペプチドを発現している生体から単離された細胞上、または嗅覚受容体ポリペプチドを遺伝子操作により人為的に発現させた細胞上で、前記嗅覚受容体ポリペプチドの応答を測定する、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記嗅覚受容体ポリペプチドの応答を、リポーターアッセイにより測定する、請求項1

または2に記載の方法。

【請求項4】

トランス-2-ノネナル臭抑制素材のスクリーニング方法であって、以下の工程：

(a) OR1D2、OR2C1、OR2J2、OR4E2、OR5P3、OR52N2、及び(b)前記(a)のいずれかのポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも90%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつトランス-2-ノネナルに対して応答性を示すポリペプチドからなる群より選択される少なくとも1種の嗅覚受容体ポリペプチドに、試験物質及びトランス-2-ノネナルを添加すること；

前記トランス-2-ノネナルに対する前記嗅覚受容体ポリペプチドの応答を測定すること；及び、

測定された応答に基づいて前記嗅覚受容体ポリペプチドの応答を抑制する試験物質を同定すること、を含む方法。

10

【請求項5】

前記嗅覚受容体ポリペプチドを発現している生体から単離された細胞上、または嗅覚受容体ポリペプチドを遺伝子操作により人為的に発現させた細胞上で、前記嗅覚受容体ポリペプチドの応答を測定する、請求項4に記載の方法。

【請求項6】

前記嗅覚受容体ポリペプチドの応答を、リポーターアッセイにより測定する、請求項4または5に記載の方法。

20

【請求項7】

トランス-2-オクテナル臭抑制素材のスクリーニング方法であって、以下の工程：

(a) OR2C1、OR2J2、OR2J3、OR4E2、OR5P3、OR7G1、OR9I1、OR51A7、及び(b)前記(a)のいずれかのポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも90%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつトランス-2-オクテナルに対して応答性を示すポリペプチドからなる群より選択される少なくとも1種の嗅覚受容体ポリペプチドに、試験物質及びトランス-2-オクテナルを添加すること；

前記トランス-2-オクテナルに対する前記嗅覚受容体ポリペプチドの応答を測定すること；及び、

測定された応答に基づいて前記嗅覚受容体ポリペプチドの応答を抑制する試験物質を同定すること、を含む方法。

30

【請求項8】

前記嗅覚受容体ポリペプチドを発現している生体から単離された細胞上、または嗅覚受容体ポリペプチドを遺伝子操作により人為的に発現させた細胞上で、前記嗅覚受容体ポリペプチドの応答を測定する、請求項7に記載の方法。

【請求項9】

前記嗅覚受容体ポリペプチドの応答を、リポーターアッセイにより測定する、請求項7または8のいずれか1項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

40

【技術分野】

【0001】

本発明は、加齢臭抑制素材をスクリーニングする方法に関する。また本発明は、トランス-2-ノネナル臭抑制素材をスクリーニングする方法、さらにはトランス-2-オクテナル臭抑制素材をスクリーニングする方法に関する。

【背景技術】

【0002】

生活の中で不快に感じる身の回りの臭気・悪臭に対して、生活環境向上のため、より有効に消臭することが強く望まれており、その中でも近年体臭に関する意識が高まっている。

体臭は、口臭、足臭、腋臭、頭皮臭等の「体の各部分の匂い」と「体幹より発せられる

50

からなる群より選択される 1 種以上である [1] 記載の方法。

[3] 前記嗅覚受容体ポリペプチドを発現している生体から単離された細胞上、または嗅覚受容体ポリペプチドを遺伝子操作により人為的に発現させた細胞上で、前記嗅覚受容体ポリペプチドの応答を測定する、[1] または [2] のいずれかに記載の方法。

[4] 前記嗅覚受容体ポリペプチドの応答を、リポーターアッセイにより測定する、[1] ~ [3] のいずれかに記載の方法。

[5] トランス - 2 - ノネナル臭抑制素材のスクリーニング方法であって、以下の工程：

(a) OR 1 D 2、OR 2 C 1、OR 2 J 2、OR 4 E 2、OR 5 P 3、OR 5 2 N 2、及び (b) 前記 (a) のいずれかのポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも 8 0 % の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつトランス - 2 - ノネナルに対して応答性を示すポリペプチドからなる群より選択される少なくとも 1 種の嗅覚受容体ポリペプチドに、試験物質及びトランス - 2 - ノネナルを添加すること；

前記トランス - 2 - ノネナルに対する前記嗅覚受容体ポリペプチドの応答を測定すること；及び、

測定された応答に基づいて前記嗅覚受容体ポリペプチドの応答を抑制する試験物質を同定すること、

を含む方法。

[6] 前記嗅覚受容体ポリペプチドを発現している生体から単離された細胞上、または嗅覚受容体ポリペプチドを遺伝子操作により人為的に発現させた細胞上で、前記嗅覚受容体ポリペプチドの応答を測定する、[5] に記載の方法。

[7] 前記嗅覚受容体ポリペプチドの応答を、リポーターアッセイにより測定する、[5] または [6] のいずれか 1 項に記載の方法。

[8] トランス - 2 - オクテナル臭抑制素材のスクリーニング方法であって、以下の工程：

(a) OR 2 C 1、OR 2 J 2、OR 2 J 3、OR 4 E 2、OR 5 P 3、OR 7 G 1、OR 9 I 1、OR 5 1 A 7、及び (b) 前記 (a) のいずれかのポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも 8 0 % の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつトランス - 2 - オクテナルに対して応答性を示すポリペプチドからなる群より選択される少なくとも 1 種の嗅覚受容体ポリペプチドに、試験物質及びトランス - 2 - オクテナルを添加すること；

前記トランス - 2 - オクテナルに対する前記嗅覚受容体ポリペプチドの応答を測定すること；及び、

測定された応答に基づいて前記嗅覚受容体ポリペプチドの応答を抑制する試験物質を同定すること、

を含む方法。

[9] 前記嗅覚受容体ポリペプチドを発現している生体から単離された細胞上、または嗅覚受容体ポリペプチドを遺伝子操作により人為的に発現させた細胞上で、前記嗅覚受容体ポリペプチドの応答を測定する、[8] に記載の方法。

[1 0] 前記嗅覚受容体ポリペプチドの応答を、リポーターアッセイにより測定する、[8] または [9] のいずれか 1 項に記載の方法。

【発明の効果】

【 0 0 0 9 】

本発明の方法を用いることにより、試験物質の中から加齢臭原因物質と嗅覚受容体ポリペプチドとの結合を阻害することができる加齢臭抑制素材の候補物質をスクリーニングすることができる。また、本発明の方法を用いることにより、トランス - 2 - ノネナル臭抑制素材及びトランス - 2 - オクテナル臭抑制素材の候補物質をスクリーニングすることができる。本発明のスクリーニング方法は、加齢臭抑制素材、トランス - 2 - ノネナル臭抑制素材及びトランス - 2 - オクテナル臭抑制素材の開発に貢献できるものと期待される。

また、新しい香料素材を開発するために多数の候補物質の匂いを人間の嗅覚のみで評価することは、嗅覚疲労や個人差の問題があり、適切に候補物質を選択することに困難を伴

10

20

30

40

50

う場合があるが、本発明の方法によれば、このような問題を解消または軽減することができる。

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1】トランス-2-ノネナールに対する各種嗅覚受容体ポリペプチドの応答の測定結果を示す図である。

【図2】トランス-2-ノネナールに対する嗅覚受容体OR1D2の応答の測定結果を示す図である。

【図3】トランス-2-ノネナールに対する嗅覚受容体OR2C1の応答の測定結果を示す図である。

【図4】トランス-2-ノネナールに対する嗅覚受容体OR2J2の応答の測定結果を示す図である。

【図5】トランス-2-ノネナールに対する嗅覚受容体OR4E2の応答の測定結果を示す図である。

【図6】トランス-2-ノネナールに対する嗅覚受容体OR5P3の応答の測定結果を示す図である。

【図7】トランス-2-ノネナールに対する嗅覚受容体OR52N2の応答の測定結果を示す図である。

【図8】トランス-2-オクテナールに対する各種嗅覚受容体ポリペプチドの応答の測定結果を示す図である。

【図9】シス-3-ヘキセノールの添加による、トランス-2-ノネナールに対する嗅覚受容体OR2C1における応答抑制効果の結果を示す図である。

【図10】ジメチルテトラヒドロベンズアルデヒドの添加による、トランス-2-ノネナールに対する嗅覚受容体OR2C1の応答抑制効果の結果を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0011】

以下、本発明のスクリーニング方法について具体的に説明する。

【0012】

1. 加齢臭抑制素材のスクリーニング方法

本発明にかかる加齢臭抑制素材のスクリーニング方法は、加齢臭原因物質に対して応答性を示す嗅覚受容体ポリペプチドを用いて、試験物質の中から加齢臭抑制素材の候補物質をスクリーニングする方法であって、以下の工程：

(a) OR2C1、OR2J2、OR4E2、OR5P3、及び(b)前記(a)のいずれかのポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも80%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ加齢臭原因物質に対して応答性を示すポリペプチドからなる群より選択される少なくとも1種の嗅覚受容体ポリペプチドに、試験物質及び加齢臭原因物質を添加すること；

前記加齢臭原因物質に対する前記嗅覚受容体ポリペプチドの応答を測定すること；及び、測定された応答に基づいて前記嗅覚受容体ポリペプチドの応答を抑制する試験物質を同定すること、を含むことを特徴としている。

【0013】

本発明の好ましい態様によれば、本発明の加齢臭抑制素材のスクリーニング方法は、(i)(a)OR2C1、OR2J2、OR4E2、OR5P3、及び(b)前記(a)のいずれかのポリペプチドのアミノ酸配列と80%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ加齢臭原因物質に対して応答性を示すポリペプチドからなる群より選択される嗅覚受容体ポリペプチドと加齢臭原因物質を接触させ、加齢臭原因物質に対する嗅覚受容体ポリペプチドの応答を測定する工程と、

(ii)加齢臭原因物質に試験物質を混合して、工程(i)で用いた嗅覚受容体ポリペプチドの応答を測定する工程と、

10

20

30

40

50

(i i i) 工程 (i) および (i i) における測定結果を比較して、応答を低減させた試験物質を、加齢臭抑制素材の候補物質として選択する工程とを含む。

【 0 0 1 4 】

本発明にかかる加齢臭抑制素材のスクリーニング方法は、OR 2 C 1、OR 2 J 2、OR 4 E 2、OR 5 P 3、及びこれらのポリペプチドのアミノ酸配列と 8 0 % 以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ加齢臭原因物質に対して応答性を示すポリペプチドからなる群より選択される嗅覚受容体ポリペプチドに対する試験物質の応答性を指標として、試験物質の中から加齢臭抑制素材の候補物質を選択するものである。

一種の嗅覚受容体は類似構造を有する複数種の香気化合物に応答することが知られていることから、既知の加齢臭原因物質に対して応答性を示す嗅覚受容体ポリペプチドを特定し、その嗅覚受容体ポリペプチドに対する試験物質の応答性を評価することによって、試験物質の中から既知の加齢臭原因物質が嗅覚受容体ポリペプチドと結合することを妨げることができる候補物質を選択することができる。なお、本明細書において、「試験物質」とは、特に限定するものではないが、加齢臭抑制効果の調査対象をいい、化合物、組成物または混合物をいうものとする。また、本明細書において「加齢臭抑制素材」とは、特に限定するものではないが、加齢臭を抑制することができる化合物、組成物または混合物をいうものとする。以下、本発明のスクリーニング方法の各工程について説明する。

【 0 0 1 5 】

< 工程 (i) >

工程 (i) では、OR 2 C 1、OR 2 J 2、OR 4 E 2、OR 5 P 3、及びこれらのいずれかのポリペプチドのアミノ酸配列と 8 0 % 以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ加齢臭原因物質に対して応答性を示すポリペプチドからなる群より選択される嗅覚受容体ポリペプチドと加齢臭原因物質を接触させ、加齢臭原因物質に対する嗅覚受容体ポリペプチドの応答を測定する。

【 0 0 1 6 】

嗅覚受容体ポリペプチドとしては、OR 2 C 1、OR 2 J 2、OR 4 E 2、OR 5 P 3、及びこれらのいずれかのポリペプチドのアミノ酸配列と 8 0 % 以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ加齢臭原因物質に対して応答性を示すポリペプチドからなる群より選択される嗅覚受容体ポリペプチドが用いられる。

OR 2 C 1 は Gen Bank に N _ 0 1 2 3 6 8 として登録されており、配列番号 1 で示される塩基配列の DNA によってコードされるアミノ酸配列 (配列番号 2) からなるポリペプチドである。

OR 2 J 2 は Gen Bank に N _ 0 3 0 9 0 5 として登録されており、配列番号 3 で示される塩基配列の DNA によってコードされるアミノ酸配列 (配列番号 4) からなるポリペプチドである。

OR 4 E 2 は Gen Bank に N _ 0 0 1 0 0 1 9 1 2 として登録されており、配列番号 5 で示される塩基配列の DNA によってコードされるアミノ酸配列 (配列番号 6) からなるポリペプチドである。

OR 5 P 3 は Gen Bank に N _ 1 5 3 4 4 5 として登録されており、配列番号 7 で示される塩基配列の DNA によってコードされるアミノ酸配列 (配列番号 8) からなるポリペプチドである。

これらのポリペプチドは、トランス - 2 - ノネナル及びトランス - 2 - オクテナルに選択的に強く応答することから、OR 2 C 1、OR 2 J 2、OR 4 E 2、OR 5 P 3 を用いたスクリーニング方法は、加齢臭抑制素材の開発に貢献できるものと期待される。

【 0 0 1 7 】

嗅覚受容体としてこれらのポリペプチドが有するアミノ酸配列 (すなわち、配列番号 2、4、6 または 8) と 8 0 % 以上、好ましくは 8 5 % 以上、より好ましくは 9 0 % 以上、さらに好ましくは 9 5 % 以上、特に好ましくは 9 8 % 以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ加齢臭原因物質に対して応答性を示すポリペプチドからなる群より選択され

10

20

30

40

50

る嗅覚受容体ポリペプチドを用いてもよい。なお、本明細書においてアミノ酸配列の配列同一性は、BLAST検索アルゴリズム（NCBIより公に入手できる）によって算出される。

【0018】

嗅覚受容体ポリペプチドは、一種で用いても、二種以上を組み合わせて用いてもよい。

【0019】

本発明において、加齢臭原因物質としては、トランス-2-ノネナル及びトランス-2-オクテナルからなる群より選ばれる1種以上を好ましく用いることができる。

【0020】

本発明において嗅覚受容体ポリペプチドと加齢臭原因物質を接触させ、加齢臭原因物質に対する嗅覚受容体ポリペプチドの応答を測定する方法は特に制限されない。例えば、嗅覚受容体ポリペプチドを発現している生体から単離された細胞上で加齢臭原因物質と接触させ、嗅覚受容体ポリペプチドの応答を測定してもよいし、嗅覚受容体ポリペプチドを遺伝子操作により人為的に発現させた細胞上で加齢臭原因物質と接触させ、嗅覚受容体ポリペプチドの応答を測定してもよい。嗅覚受容体ポリペプチドと加齢臭原因物質を接触させる時間は、加齢臭原因物質の濃度にも依存するため一概には言えないが、通常、2～4時間である。加齢臭原因物質に試験物質を混合して嗅覚受容体ポリペプチドと接触させる場合も同様である。

10

【0021】

嗅覚受容体ポリペプチドを遺伝子操作により人為的に発現させた細胞は、嗅覚受容体ポリペプチドをコードする遺伝子を組み込んだベクターを用いて細胞を形質転換することで作製することができる。

20

【0022】

本発明の好ましい態様では、嗅覚受容体ポリペプチドと共に、ウシロドプシンのN末端20アミノ酸残基を組み込んでよい。ウシロドプシンのN末端20アミノ酸残基を組み込むことにより、嗅覚受容体ポリペプチドの細胞膜発現を促進することができる。

ウシロドプシンは、GenBankにNM_001014890として登録されている。ウシロドプシンは、配列番号21で示される塩基配列の第1番目から第1047番目のDNAによってコードされるアミノ酸配列（配列番号22）からなるポリペプチドである。

また、ウシロドプシンに代えて、配列番号22で示されるアミノ酸配列と80%以上、好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上、特に好ましくは98%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ嗅覚受容体ポリペプチドの細胞膜発現を促進することができるポリペプチドを用いてもよい。

30

なお、嗅覚受容体ポリペプチドの細胞膜発現を促進できるものであれば、ウシロドプシンに限らず、他のポリペプチドのアミノ酸残基を用いてもよい。

【0023】

嗅覚受容体ポリペプチドの応答を測定する方法は特に制限されなく、当分野で用いられている任意の方法を用いることができる。例えば、香気化合物が嗅覚受容体ポリペプチドへ結合すると、細胞内のGタンパク質を活性化し、Gタンパク質がアデニル酸シクラーゼを活性化して、ATPを環状AMP（cAMP）へと変換し、細胞内のcAMP量を増加させることが知られている。したがって、cAMP量を測定することで嗅覚受容体ポリペプチドの応答を測定することができる。cAMP量を測定する方法としては、ELISA法やレポータージーンアッセイ法等が用いられる。中でも、ルシフェラーゼなどの発光物質を用いたレポータージーンアッセイ法により嗅覚受容体ポリペプチドの応答を測定することが好ましい。

40

【0024】

本発明の一実施態様によれば、嗅覚受容体ポリペプチドの応答は、加齢臭原因物質存在下における測定結果を、加齢臭原因物質の非存在下における測定結果で割ることで求められるFold Increase値を指標として評価してもよい。例えば、ルシフェラーゼなどの発光物質を用いたレポータージーンアッセイ法により嗅覚受容体ポリペプチドの応

50

答を測定する場合、Fold Increase 値が好ましくは 2 以上、より好ましくは 4 以上、さらに好ましくは 10 以上となる濃度の加齢臭原因物質を使用して評価することができる。

【0025】

<工程(ii)>

工程(ii)では、加齢臭原因物質に試験物質を混合して、工程(i)で用いた嗅覚受容体の応答を測定する。

嗅覚受容体ポリペプチドの応答を測定する方法は、加齢臭原因物質と試験物質を混合して嗅覚受容体ポリペプチドに接触させることを除いて、工程(i)で示した方法と同様の方法を用いることができる。例えば、嗅覚受容体ポリペプチドを発現している生体から単離された細胞上で嗅覚受容体ポリペプチドの応答を測定してもよいし、嗅覚受容体ポリペプチドを遺伝子操作により人為的に発現させた細胞上で嗅覚受容体ポリペプチドの応答を測定してもよい。工程(i)と(ii)における測定結果を適切に比較するために、工程(i)と(ii)における測定条件は、試験物質の有無を除いて、同じであることが好ましい。

10

【0026】

<工程(iii)>

工程(iii)では、工程(i)および(ii)における測定結果を比較して、応答が低減した試験物質を、加齢臭抑制素材の候補物質として選択する。

本発明では、工程(i)および(ii)における測定結果を比較して応答の低減が見られた場合、工程(iii)で用いた試験物質を、加齢臭抑制素材の候補物質として評価することができる。

20

【0027】

上記のようにして、試験物質の中から加齢臭抑制素材の候補物質をスクリーニングすることができる。本発明によれば、人間の嗅覚によって行う官能評価による嗅覚疲労や個人差などによる問題を生じることなく、多数の試験物質の中から加齢臭抑制素材の候補物質を選択することができる。

選択された物質は、加齢臭抑制素材の候補物質として用いることができる。選択された物質を基に必要に応じて改変等を行い、最適な匂いのする新規な化合物を開発することもできる。さらには、選択された物質を他の香料素材とブレンドして加齢臭を抑制することができ、かつ最適な匂いのする香料素材を開発することも可能である。本発明のスクリーニング方法を用いることにより、加齢臭抑制素材の新しい香料素材の開発に貢献することができる。

30

【0028】

2. トランス-2-ノネナル臭抑制素材のスクリーニング方法

本発明にかかるトランス-2-ノネナル臭抑制素材のスクリーニング方法は、トランス-2-ノネナルに対して応答性を示す嗅覚受容体ポリペプチドを用いて、試験物質の中からトランス-2-ノネナル臭抑制素材の候補物質をスクリーニングする方法であって、以下の工程：

(a) OR1D2、OR2C1、OR2J2、OR4E2、OR5P3、OR52N2、及び(b)前記(a)のいずれかのポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも80%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつトランス-2-ノネナルに対して応答性を示すポリペプチドからなる群より選択される少なくとも1種の嗅覚受容体ポリペプチドに、試験物質及びトランス-2-ノネナルを添加すること；

40

前記トランス-2-ノネナルに対する前記嗅覚受容体ポリペプチドの応答を測定すること；及び、

測定された応答に基づいて前記嗅覚受容体ポリペプチドの応答を抑制する試験物質を同定すること、を含むことを特徴としている。

【0029】

50

本発明の好ましい態様によれば、本発明のトランス - 2 - ノネナール臭抑制素材のスクリーニング方法は、

(i) (a) OR 1 D 2、OR 2 C 1、OR 2 J 2、OR 4 E 2、OR 5 P 3、OR 5 2 N 2、及び (b) 前記 (a) のいずれかのポリペプチドのアミノ酸配列と 8 0 % 以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつトランス - 2 - ノネナールに対して応答性を示すポリペプチドからなる群より選択される嗅覚受容体ポリペプチドとトランス - 2 - ノネナールを接触させ、トランス - 2 - ノネナールに対する嗅覚受容体ポリペプチドの応答を測定する工程と、

(i i) トランス - 2 - ノネナールに試験物質を混合して、工程 (i) で用いた嗅覚受容体ポリペプチドの応答を測定する工程と、

(i i i) 工程 (i) および (i i) における測定結果を比較して、応答を低減させた試験物質を、トランス - 2 - ノネナールの候補物質として選択する工程と

を含む。

【 0 0 3 0 】

本発明にかかるトランス - 2 - ノネナール臭抑制素材のスクリーニング方法は、OR 1 D 2、OR 2 C 1、OR 2 J 2、OR 4 E 2、OR 5 P 3、OR 5 2 N 2、及びこれらのポリペプチドのアミノ酸配列と 8 0 % 以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ加齢臭原因物質に対して応答性を示すポリペプチドからなる群より選択される嗅覚受容体ポリペプチドに対する試験物質の応答性を指標として、試験物質の中からトランス - 2 - ノネナール臭抑制素材の候補物質を選択するものである。

本発明にかかるトランス - 2 - ノネナール臭抑制素材のスクリーニング方法において「試験物質」とは、特に限定するものではないが、トランス - 2 - ノネナール臭抑制効果の調査対象をいい、化合物、組成物または混合物をいうものとする。また、「トランス - 2 - ノネナール臭抑制素材」とは、特に限定するものではないが、トランス - 2 - ノネナール臭を抑制することができる化合物、組成物または混合物をいうものとする。また、「トランス - 2 - ノネナール臭」とは、トランス - 2 - ノネナールを原因物質とする臭いを意味し、例えば、加齢臭、オフフレーバーなどを含む。以下、各工程について説明する。

【 0 0 3 1 】

< 工程 (i) >

工程 (i) では、OR 1 D 2、OR 2 C 1、OR 2 J 2、OR 4 E 2、OR 5 P 3、OR 5 2 N 2、及びこれらのいずれかのポリペプチドのアミノ酸配列と 8 0 % 以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつトランス - 2 - ノネナールに対して応答性を示すポリペプチドからなる群より選択される嗅覚受容体ポリペプチドとトランス - 2 - ノネナールを接触させ、トランス - 2 - ノネナールに対する嗅覚受容体ポリペプチドの応答を測定する。

【 0 0 3 2 】

嗅覚受容体ポリペプチドとしては、OR 1 D 2、OR 2 C 1、OR 2 J 2、OR 4 E 2、OR 5 P 3、OR 5 2 N 2、及びこれらのいずれかのポリペプチドのアミノ酸配列と 8 0 % 以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつトランス - 2 - ノネナールに対して応答性を示すポリペプチドからなる群より選択される嗅覚受容体ポリペプチドが用いられる。

OR 2 C 1 は Gen Bank に N _ 0 1 2 3 6 8 として登録されており、配列番号 1 で示される塩基配列の DNA によってコードされるアミノ酸配列 (配列番号 2) からなるポリペプチドである。

OR 2 J 2 は Gen Bank に N _ 0 3 0 9 0 5 として登録されており、配列番号 3 で示される塩基配列の DNA によってコードされるアミノ酸配列 (配列番号 4) からなるポリペプチドである。

OR 4 E 2 は Gen Bank に N _ 0 0 1 0 0 1 9 1 2 として登録されており、配列番号 5 で示される塩基配列の DNA によってコードされるアミノ酸配列 (配列番号 6) からなるポリペプチドである。

10

20

30

40

50

OR5P3はGenBankにN__153445として登録されており、配列番号7で示される塩基配列のDNAによってコードされるアミノ酸配列(配列番号8)からなるポリペプチドである。

R1D2は、GenBankにN__002548として登録されており、配列番号9で示される塩基配列のDNAによってコードされるアミノ酸配列(配列番号10)からなるポリペプチドである。

OR52N2はGenBankにN__001005174として登録されており、配列番号11で示される塩基配列のDNAによってコードされるアミノ酸配列(配列番号12)からなるポリペプチドである。

これらのポリペプチドは、トランス-2-ノネナールに選択的に強く応答することから、OR1D2、OR2C1、OR2J2、OR4E2、OR5P3、OR52N2を用いたスクリーニング方法は、トランス-2-ノネナール臭抑制素材の開発に貢献できるものと期待される。

【0033】

嗅覚受容体としてこれらのポリペプチドが有するアミノ酸配列(すなわち、配列番号2、4、6、8、10または12)と80%以上、好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上、特に好ましくは98%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつトランス-2-ノネナールに対して応答性を示すポリペプチドからなる群より選択される嗅覚受容体ポリペプチドを用いてもよい。

【0034】

嗅覚受容体ポリペプチドは、一種で用いても、二種以上を組み合わせ用いてもよい。

【0035】

本発明において嗅覚受容体ポリペプチドとトランス-2-ノネナールを接触させ、トランス-2-ノネナールに対する嗅覚受容体ポリペプチドの応答を測定する方法は特に制限されない。例えば、嗅覚受容体ポリペプチドを発現している生体から単離された細胞上でトランス-2-ノネナールと接触させ、嗅覚受容体ポリペプチドの応答を測定してもよいし、嗅覚受容体ポリペプチドを遺伝子操作により人為的に発現させた細胞上でトランス-2-ノネナールと接触させ、嗅覚受容体ポリペプチドの応答を測定してもよい。嗅覚受容体ポリペプチドとトランス-2-ノネナールを接触させる時間は、トランス-2-ノネナールの濃度にも依存するため一概には言えないが、通常、2~4時間である。トランス-2-ノネナールに試験物質を混合して嗅覚受容体ポリペプチドと接触させる場合も同様である。

【0036】

嗅覚受容体ポリペプチドを遺伝子操作により人為的に発現させた細胞は、嗅覚受容体ポリペプチドをコードする遺伝子を組み込んだベクターを用いて細胞を形質転換することで作製することができる。

【0037】

本発明の好ましい態様では、嗅覚受容体ポリペプチドと共に、ウシロドプシンのN末端20アミノ酸残基を組み込んでよい。ウシロドプシンのN末端20アミノ酸残基を組み込むことにより、嗅覚受容体ポリペプチドの細胞膜発現を促進することができる。

ウシロドプシンは、GenBankにNM_001014890として登録されている。ウシロドプシンは、配列番号21で示される塩基配列の第1番目から第1047番目のDNAによってコードされるアミノ酸配列(配列番号22)からなるポリペプチドである。

また、ウシロドプシンに代えて、配列番号22で示されるアミノ酸配列と80%以上、好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上、特に好ましくは98%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ嗅覚受容体ポリペプチドの細胞膜発現を促進することができるポリペプチドを用いてもよい。

なお、嗅覚受容体ポリペプチドの細胞膜発現を促進できるものであれば、ウシロドプシンに限らず、他のポリペプチドのアミノ酸残基を用いてもよい。

【0038】

10

20

30

40

50

嗅覚受容体ポリペプチドの応答を測定する方法は特に制限されなく、当分野で用いられている任意の方法を用いることができる。例えば、香気化合物が嗅覚受容体ポリペプチドへ結合すると、細胞内のGタンパク質を活性化し、Gタンパク質がアデニル酸シクラーゼを活性化して、ATPを環状AMP(cAMP)へと変換し、細胞内のcAMP量を増加させることが知られている。したがって、cAMP量を測定することで嗅覚受容体ポリペプチドの応答を測定することができる。cAMP量を測定する方法としては、ELISA法やレポータージーンアッセイ法等が用いられる。中でも、ルシフェラーゼなどの発光物質を用いたレポータージーンアッセイ法により嗅覚受容体ポリペプチドの応答を測定することが好ましい。

【0039】

本発明の一実施態様によれば、嗅覚受容体ポリペプチドの応答は、トランス-2-ノネナル存在下における測定結果を、トランス-2-ノネナルの非存在下における測定結果で割ることで求められるFold Increase値を指標として評価してもよい。例えば、ルシフェラーゼなどの発光物質を用いたレポータージーンアッセイ法により嗅覚受容体ポリペプチドの応答を測定する場合、Fold Increase値が好ましくは2以上、より好ましくは4以上、さらに好ましくは10以上となる濃度のトランス-2-ノネナルを使用して評価することができる。

【0040】

<工程(ii)>

工程(ii)では、トランス-2-ノネナルに試験物質を混合して、工程(i)で用いた嗅覚受容体の応答を測定する。

嗅覚受容体ポリペプチドの応答を測定する方法は、トランス-2-ノネナルと試験物質を混合して嗅覚受容体ポリペプチドに接触させることを除いて、工程(i)で示した方法と同様の方法を用いることができる。例えば、嗅覚受容体ポリペプチドを発現している生体から単離された細胞上で嗅覚受容体ポリペプチドの応答を測定してもよいし、嗅覚受容体ポリペプチドを遺伝子操作により人為的に発現させた細胞上で嗅覚受容体ポリペプチドの応答を測定してもよい。工程(i)と(ii)における測定結果を適切に比較するために、工程(i)と(ii)における測定条件は、試験物質の有無を除いて、同じであることが好ましい。

【0041】

<工程(iii)>

工程(iii)では、工程(i)および(ii)における測定結果を比較して、応答が低減した試験物質を、トランス-2-ノネナル臭抑制素材の候補物質として選択する。

本発明では、工程(i)および(ii)における測定結果を比較して応答の低減が見られた場合、工程(iii)で用いた試験物質を、トランス-2-ノネナル臭抑制素材の候補物質として評価することができる。

【0042】

上記のようにして、試験物質の中からトランス-2-ノネナル臭抑制素材の候補物質をスクリーニングすることができる。本発明によれば、人間の嗅覚によって行う官能評価による嗅覚疲労や個人差などによる問題を生じることなく、多数の試験物質の中からトランス-2-ノネナル臭抑制素材の候補物質を選択することができる。

選択された物質は、トランス-2-ノネナル臭抑制素材の候補物質として用いることができる。選択された物質を基に必要な応じて改変等を行い、最適な匂いのする新規な化合物を開発することもできる。さらには、選択された物質を他の香料素材とブレンドしてトランス-2-ノネナル臭を抑制することができ、かつ最適な匂いのする香料素材を開発することも可能である。本発明のスクリーニング方法を用いることにより、トランス-2-ノネナル臭抑制素材の新しい香料素材の開発に貢献することができる。

【0043】

3. トランス-2-オクテナル臭抑制素材のスクリーニング方法

本発明にかかるトランス-2-オクテナル臭抑制素材のスクリーニング方法は、トラ

10

20

30

40

50

ンス - 2 - オクテナールに対して応答性を示す嗅覚受容体ポリペプチドを用いて、試験物質の中からトランス - 2 - オクテナール臭抑制素材臭抑制素材の候補物質をスクリーニングする方法であって、以下の工程：

(a) OR 2 C 1、OR 2 J 2、OR 2 J 3、OR 4 E 2、OR 5 P 3、OR 7 G 1、OR 9 I 1、OR 5 1 A 7、及び (b) 前記 (a) のいずれかのポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも 8 0 % の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつトランス - 2 - オクテナールに対して応答性を示すポリペプチドからなる群より選択される少なくとも 1 種の嗅覚受容体ポリペプチドに、試験物質及びトランス - 2 - オクテナールを添加すること；前記トランス - 2 - オクテナールに対する前記嗅覚受容体ポリペプチドの応答を測定すること；及び、

測定された応答に基づいて前記嗅覚受容体ポリペプチドの応答を抑制する試験物質を同定すること、を含むことを特徴としている。

【 0 0 4 4 】

本発明の好ましい態様によれば、本発明のトランス - 2 - オクテナール臭抑制素材のスクリーニング方法は、

(i) (a) OR 2 C 1、OR 2 J 2、OR 2 J 3、OR 4 E 2、OR 5 P 3、OR 7 G 1、OR 9 I 1、OR 5 1 A 7、及び (b) 前記 (a) のいずれかのポリペプチドのアミノ酸配列と 8 0 % 以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつトランス - 2 - オクテナールに対して応答性を示すポリペプチドからなる群より選択される嗅覚受容体ポリペプチドとトランス - 2 - オクテナールを接触させ、トランス - 2 - オクテナールに対する嗅覚受容体ポリペプチドの応答を測定する工程と、

(i i) トランス - 2 - オクテナールに試験物質を混合して、工程 (i) で用いた嗅覚受容体ポリペプチドの応答を測定する工程と、

(i i i) 工程 (i) および (i i) における測定結果を比較して、応答を低減させた試験物質を、トランス - 2 - オクテナールの候補物質として選択する工程とを含む。

【 0 0 4 5 】

本発明にかかるトランス - 2 - オクテナール臭抑制素材のスクリーニング方法は、OR 2 C 1、OR 2 J 2、OR 2 J 3、OR 4 E 2、OR 5 P 3、OR 7 G 1、OR 9 I 1、OR 5 1 A 7、及びこれらのポリペプチドのアミノ酸配列と 8 0 % 以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつトランス - 2 - オクテナールに対して応答性を示すポリペプチドからなる群より選択される嗅覚受容体ポリペプチドに対する試験物質の応答性を指標として、試験物質の中からトランス - 2 - オクテナール臭抑制素材の候補物質を選択するものである。

本発明にかかるトランス - 2 - オクテナール臭抑制素材のスクリーニング方法において「試験物質」とは、特に限定するものではないが、トランス - 2 - オクテナール臭抑制効果の調査対象をいい、化合物、組成物または混合物をいうものとする。また、「トランス - 2 - オクテナール臭抑制素材」とは、特に限定するものではないが、トランス - 2 - オクテナール臭を抑制することができる化合物、組成物または混合物をいうものとする。また、「トランス - 2 - オクテナール臭」とは、トランス - 2 - オクテナールを原因物質とする臭いを意味し、例えば、加齢臭、オフフレーバーなどを含む。以下、各工程について説明する。

【 0 0 4 6 】

< 工程 (i) >

工程 (i) では、OR 2 C 1、OR 2 J 2、OR 2 J 3、OR 4 E 2、OR 5 P 3、OR 7 G 1、OR 9 I 1、OR 5 1 A 7、及びこれらのいずれかのポリペプチドのアミノ酸配列と 8 0 % 以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつトランス - 2 - オクテナールに対して応答性を示すポリペプチドからなる群より選択される嗅覚受容体ポリペプチドとトランス - 2 - オクテナールを接触させ、トランス - 2 - オクテナールに対する嗅覚受

10

20

30

40

50

容体ポリペプチドの応答を測定する。

【0047】

嗅覚受容体ポリペプチドとしては、OR2C1、OR2J2、OR2J3、OR4E2、OR5P3、OR7G1、OR9I1、OR51A7、及びこれらのいずれかのポリペプチドのアミノ酸配列と80%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつトランス-2-オクテナールに対して応答性を示すポリペプチドからなる群より選択される嗅覚受容体ポリペプチドが用いられる。

OR2C1はGenBankにN_012368として登録されており、配列番号1で示される塩基配列のDNAによってコードされるアミノ酸配列(配列番号2)からなるポリペプチドである。

OR2J2はGenBankにN_030905として登録されており、配列番号3で示される塩基配列のDNAによってコードされるアミノ酸配列(配列番号4)からなるポリペプチドである。

OR4E2はGenBankにN_001001912として登録されており、配列番号5で示される塩基配列のDNAによってコードされるアミノ酸配列(配列番号6)からなるポリペプチドである。

OR5P3はGenBankにN_153445として登録されており、配列番号7で示される塩基配列のDNAによってコードされるアミノ酸配列(配列番号8)からなるポリペプチドである。

R2J3は、GenBankにN_001005216として登録されており、配列番号13で示される塩基配列のDNAによってコードされるアミノ酸配列(配列番号14)からなるポリペプチドである。

OR7G1はGenBankにN_001005192として登録されており、配列番号15で示される塩基配列のDNAによってコードされるアミノ酸配列(配列番号16)からなるポリペプチドである。

OR9I1はGenBankにN_001005211として登録されており、配列番号17で示される塩基配列のDNAによってコードされるアミノ酸配列(配列番号18)からなるポリペプチドである。

OR51A7はGenBankにN_001004749として登録されており、配列番号19で示される塩基配列のDNAによってコードされるアミノ酸配列(配列番号20)からなるポリペプチドである。

これらのポリペプチドは、トランス-2-オクテナールに選択的に強く応答することから、OR2C1、OR2J2、OR2J3、OR4E2、OR5P3、OR7G1、OR9I1、OR51A7を用いたスクリーニング方法は、トランス-2-オクテナール臭抑制素材の開発に貢献できるものと期待される。

【0048】

嗅覚受容体としてこれらのポリペプチドが有するアミノ酸配列(すなわち、配列番号2、4、6、8、14、16、18または20)と80%以上、好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上、特に好ましくは98%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつトランス-2-オクテナールに対して応答性を示すポリペプチドからなる群より選択される嗅覚受容体ポリペプチドを用いてもよい。

【0049】

嗅覚受容体ポリペプチドは、一種で用いても、二種以上を組み合わせ用いてもよい。

【0050】

本発明において嗅覚受容体ポリペプチドとトランス-2-オクテナールを接触させ、トランス-2-オクテナールに対する嗅覚受容体ポリペプチドの応答を測定する方法は特に制限されない。例えば、嗅覚受容体ポリペプチドを発現している生体から単離された細胞上でトランス-2-オクテナールと接触させ、嗅覚受容体ポリペプチドの応答を測定してもよいし、嗅覚受容体ポリペプチドを遺伝子操作により人為的に発現させた細胞上でトランス-2-オクテナールと接触させ、嗅覚受容体ポリペプチドの応答を測定してもよい。

10

20

30

40

50

嗅覚受容体ポリペプチドとトランス - 2 - オクテナールを接触させる時間は、トランス - 2 - オクテナールの濃度にも依存するため一概には言えないが、通常、2 ~ 4 時間である。トランス - 2 - オクテナールに試験物質を混合して嗅覚受容体ポリペプチドと接触させる場合も同様である。

【 0 0 5 1 】

嗅覚受容体ポリペプチドを遺伝子操作により人為的に発現させた細胞は、嗅覚受容体ポリペプチドをコードする遺伝子を組み込んだベクターを用いて細胞を形質転換することで作製することができる。

【 0 0 5 2 】

本発明の好ましい態様では、嗅覚受容体ポリペプチドと共に、ウシロドプシンのN末端20アミノ酸残基を組み込んでよい。ウシロドプシンのN末端20アミノ酸残基を組み込むことにより、嗅覚受容体ポリペプチドの細胞膜発現を促進することができる。

ウシロドプシンは、GenBankにNM_001014890として登録されている。ウシロドプシンは、配列番号21で示される塩基配列の第1番目から第1047番目のDNAによってコードされるアミノ酸配列(配列番号22)からなるポリペプチドである。

また、ウシロドプシンに代えて、配列番号22で示されるアミノ酸配列と80%以上、好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上、特に好ましくは98%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ嗅覚受容体ポリペプチドの細胞膜発現を促進することができるポリペプチドを用いてもよい。

なお、嗅覚受容体ポリペプチドの細胞膜発現を促進できるものであれば、ウシロドプシンに限らず、他のポリペプチドのアミノ酸残基を用いてもよい。

【 0 0 5 3 】

嗅覚受容体ポリペプチドの応答を測定する方法は特に制限されなく、当分野で用いられている任意の方法を用いることができる。例えば、香気化合物が嗅覚受容体ポリペプチドへ結合すると、細胞内のGタンパク質を活性化し、Gタンパク質がアデニル酸シクラーゼを活性化して、ATPを環状AMP(cAMP)へと変換し、細胞内のcAMP量を増加させることが知られている。したがって、cAMP量を測定することで嗅覚受容体ポリペプチドの応答を測定することができる。cAMP量を測定する方法としては、ELISA法やレポータージーンアッセイ法等が用いられる。中でも、ルシフェラーゼなどの発光物質を用いたレポータージーンアッセイ法により嗅覚受容体ポリペプチドの応答を測定することが好ましい。

【 0 0 5 4 】

本発明の一実施態様によれば、嗅覚受容体ポリペプチドの応答は、トランス - 2 - オクテナール存在下における測定結果を、トランス - 2 - オクテナールの非存在下における測定結果で割ることで求められるFold Increase値を指標として評価してもよい。例えば、ルシフェラーゼなどの発光物質を用いたレポータージーンアッセイ法により嗅覚受容体ポリペプチドの応答を測定する場合、Fold Increase値が好ましくは2以上、より好ましくは4以上、さらに好ましくは10以上となる濃度のトランス - 2 - オクテナールを使用して評価することができる。

【 0 0 5 5 】

< 工程 (i i) >

工程 (i i) では、トランス - 2 - オクテナールに試験物質を混合して、工程 (i) で用いた嗅覚受容体の応答を測定する。

嗅覚受容体ポリペプチドの応答を測定する方法は、トランス - 2 - オクテナールと試験物質を混合して嗅覚受容体ポリペプチドに接触させることを除いて、工程 (i) で示した方法と同様の方法を用いることができる。例えば、嗅覚受容体ポリペプチドを発現している生体から単離された細胞上で嗅覚受容体ポリペプチドの応答を測定してもよいし、嗅覚受容体ポリペプチドを遺伝子操作により人為的に発現させた細胞上で嗅覚受容体ポリペプチドの応答を測定してもよい。工程 (i) と (i i) における測定結果を適切に比較するために、工程 (i) と (i i) における測定条件は、試験物質の有無を除いて、同じであ

10

20

30

40

50

ることが好ましい。

【0056】

<工程(iii)>

工程(iii)では、工程(i)および(ii)における測定結果を比較して、応答が低減した試験物質を、トランス-2-オクテナル臭抑制素材の候補物質として選択する。

本発明では、工程(i)および(ii)における測定結果を比較して応答の低減が見られた場合、工程(i)で用いた試験物質を、トランス-2-オクテナル臭抑制素材の候補物質として評価することができる。

【0057】

上記のようにして、試験物質の中からトランス-2-オクテナル臭抑制素材の候補物質をスクリーニングすることができる。本発明によれば、人間の嗅覚によって行う官能評価による嗅覚疲労や個人差などによる問題を生じることなく、多数の試験物質の中からトランス-2-オクテナル臭抑制素材の候補物質を選択することができる。

10

選択された物質は、トランス-2-オクテナル臭抑制素材の候補物質として用いることができる。選択された物質を基に必要に応じて改変等を行い、最適な匂いのする新規な化合物を開発することもできる。さらには、選択された物質を他の香料素材とブレンドしてトランス-2-オクテナル臭を抑制することができ、かつ最適な匂いのする香料素材を開発することも可能である。本発明のスクリーニング方法を用いることにより、トランス-2-オクテナル臭抑制素材の新しい香料素材の開発に貢献することができる。

【実施例】

20

【0058】

以下、実施例を挙げて本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に何ら制限されるものではない。

【0059】

[実施例1]

トランス-2-ノネナルに応答する嗅覚受容体ポリペプチドの探索

(1) 嗅覚受容体遺伝子クローニング

ヒト嗅覚受容体遺伝子はGenBankに登録されている配列情報を基に、Human Genomic DNA: Female (Promega社)よりPCR法にてクローニングすることで得た。pME18SベクターにウシロドプシンのN末端20アミノ酸残基を組み込み、さらにその下流に、得られたヒト嗅覚受容体遺伝子を組み込むことで、ヒト嗅覚受容体遺伝子発現ベクターを得た。

30

(2) HEK293T細胞での嗅覚受容体遺伝子の発現

ヒト嗅覚受容体遺伝子発現ベクター0.05 μ g、RTP1Sベクター0.01 μ g、cAMP応答配列プロモーターを含むホタルルシフェラーゼベクターpGL4.29 (Promega社)0.01 μ g、およびチミジンキナーゼプロモーターを含むウミシタケルシフェラーゼベクターpGL4.74 (Promega社)0.005 μ gをOpti-MEM1 (Gibco社)10 μ Lに溶解して遺伝子溶液(1穴分)とした。HEK293T細胞を、24時間後にコンフルエントに達する細胞数で96穴プレート(Biocoat, Corning社)に100 μ Lずつ播種し、Lipofectamine 3000の使用法に従ってリポフェクション法によって遺伝子溶液を各穴に添加して、細胞に遺伝子導入を行い、37 $^{\circ}$ C、5%二酸化炭素雰囲気下で24時間培養した。

40

【0060】

(3) ルシフェラーゼレポータージーンアッセイ

培養液を除去した後に、検体となる香気物質を測定する濃度になる様にCD293 (Gibco社)培地(20 μ M L-グルタミン添加)で調製したものを50 μ Lずつ添加し、3時間の刺激を行った後に、Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega社)の使用法に従ってルシフェラーゼ活性を測定した。嗅覚受容体ポリペプチドの応答強度は、香気物質の刺激によって生じたルシフェラーゼ活性を、香気物質を含まない試験系で生じたルシフェラーゼ活性で割ることで求められ

50

る Fold Increase 値で表現した。

【0061】

(4) トランス - 2 - ノネナルに反応する嗅覚受容体ポリペプチドの同定

ヒト嗅覚受容体 402 種を発現させた細胞で、トランス - 2 - ノネナル 60 μM に対する受容体応答を、ルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイによって測定した。結果を図 1 に示す。トランス - 2 - ノネナルに対して OR1D2、OR2C1、OR2J2、OR4E2、OR5P3 および OR52N2 が、Fold Increase 値 2 以上の応答を示した。

【0062】

また、OR1D2、OR2C1、OR2J2、OR4E2、OR5P3 および OR52N2 の、様々な濃度のトランス - 2 - ノネナルに対する受容体応答を、ルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイによって測定した。結果を図 2 ~ 7 にそれぞれ示す。OR1D2、OR2C1、OR2J2、OR4E2、OR5P3 および OR52N2 はトランス - 2 - ノネナルに対して濃度依存的な応答を示した。一方で、Mock 試験では応答が見られなかった。すなわち、OR1D2、OR2C1、OR2J2、OR4E2、OR5P3 および OR52N2 はトランス - 2 - ノネナルに対して、特異的に反応することが示された。

10

【0063】

[実施例 2]

トランス - 2 - オクテナルに反応する嗅覚受容体ポリペプチドの探索

20

実施例 1 と同様にして、ヒト嗅覚受容体 402 種を発現させた細胞で、トランス - 2 - オクテナル 50 μM に対する受容体応答を、ルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイによって測定した。結果を図 8 に示す。トランス - 2 - オクテナルに対して OR2C1、OR2J2、OR2J3、OR4E2、OR5P3、OR7G1、OR9I1 および OR51A7 が、Fold Increase 値 2 以上の応答を示した。

【0064】

[実施例 3]

加齢臭抑制素材に対する OR2C1 の反応抑制効果の評価

日本化粧品技術者会誌、34(4)、379 - 386、(2000)において加齢臭をマスキングおよび変調する加齢臭抑制素材として知られているシス - 3 - ヘキセノールおよびジメチルテトラヒドロベンズアルデヒド (IFF 社商品名: トリプラー) について、トランス - 2 - ノネナルに対して強い反応を示した OR2C1 の反応を抑制する効果を、ルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイによって測定した。ルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイにおいて、検体にトランス - 2 - ノネナルと加齢臭抑制素材を混合して用い、加齢臭抑制素材を混合しなかった試験での Fold Increase 値を 100 とした際の、加齢臭抑制素材を混合した試験での Fold Increase 値の割合を求めた。結果を図 9 及び 10 にそれぞれ示す。シス - 3 - ヘキセノールおよびジメチルテトラヒドロベンズアルデヒドは、OR2C1 のトランス - 2 - ノネナルに対する反応を、濃度依存的に低減させる効果を示した。

30

【産業上の利用可能性】

40

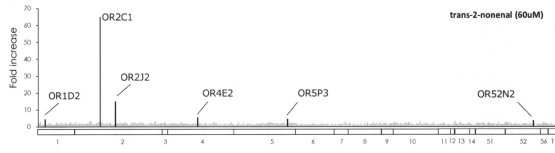
【0065】

本発明のスクリーニング方法を用いることにより、多数の試験物質の中から加齢臭抑制素材、トランス - 2 - ノネナル臭抑制素材及びトランス - 2 - オクテナル臭抑制素材の候補物質をそれぞれ選択することができる。本発明のスクリーニング方法は、加齢臭抑制素材、さらにはトランス - 2 - ノネナル臭抑制素材及びトランス - 2 - オクテナル臭抑制素材の開発に貢献できるものと期待される。

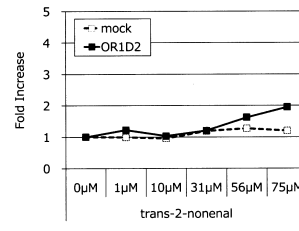
50

【図面】

【図 1】

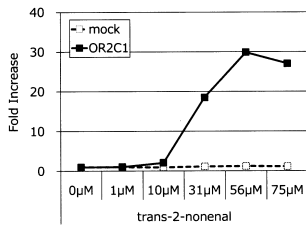


【図 2】

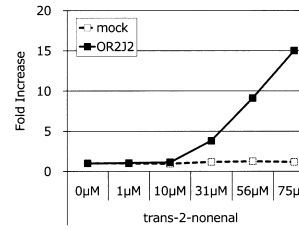


10

【図 3】

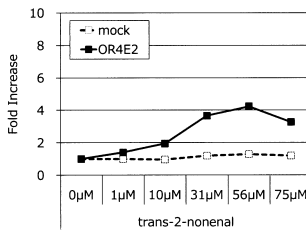


【図 4】

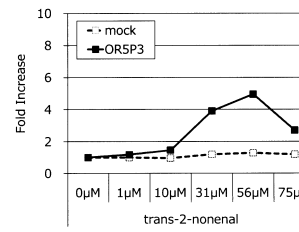


20

【図 5】



【図 6】

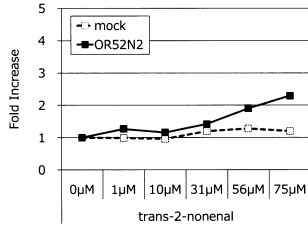


30

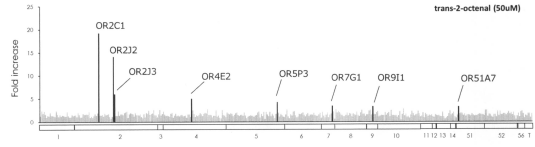
40

50

【 7 】

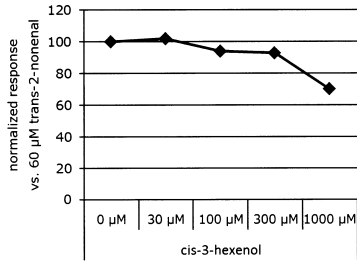


【 8 】

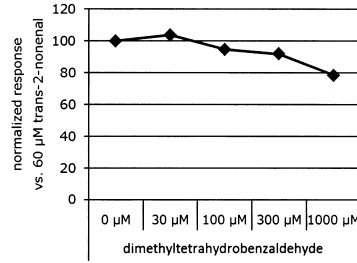


10

【 9 】



【 10 】



20

【 配列表 】

0007203760000001.app

30

40

50

フロントページの続き

審査官 田ノ上 拓白

- (56)参考文献 特開2011-178721(JP,A)
国際公開第2012/108495(WO,A1)
特開2014-240441(JP,A)
特開2012-249614(JP,A)
国際公開第2016/204211(WO,A1)
特開2012-050411(JP,A)
米国特許出願公開第2013/0336910(US,A1)
特開平11-286423(JP,A)
特開2012-250958(JP,A)
米国特許出願公開第2010/0248390(US,A1)
The molecular receptive range of an odorant receptor, Nature Neuroscience, 2000年, Vol.3, No.12, p.1248-1255
- (58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)
C12Q 1/00 - 3/00
C12N 15/00 - 15/90
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
Caplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)