

(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
2022年2月3日(03.02.2022)



(10) 国際公開番号

WO 2022/024903 A1

(51) 国際特許分類:

C12N 15/12 (2006.01) *C12N 1/19* (2006.01)
A01K 67/027 (2006.01) *C12N 1/21* (2006.01)
A01K 67/033 (2006.01) *C12N 5/10* (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01) *C12N 15/09* (2006.01)
C12N 1/15 (2006.01) *G01N 21/64* (2006.01)

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, 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).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2021/027267

(22) 国際出願日: 2021年7月21日(21.07.2021)

(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 2020-126686 2020年7月27日(27.07.2020) JP

添付公開書類:

- 一 国際調査報告(条約第21条(3))
- 一 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))

(71) 出願人: 住友化学株式会社
(SUMITOMO CHEMICAL COMPANY, LIMITED) [JP/JP]; 〒1048260 東京都中央区新川二丁目27番1号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 尾添 淳文(OZOE, Atsufumi); 〒5548558 大阪府大阪市此花区春日出中三丁目1番98号 住友化学株式会社内 Osaka (JP). 高橋 康彦(TAKAHASHI, Yasuhiko); 〒5548558 大阪府大阪市此花区春日出中三丁目1番98号 住友化学株式会社内 Osaka (JP).

(74) 代理人: 特許業務法人三枝国際特許事務所(SAEGUSA & PARTNERS); 〒5410045 大阪府大阪市中央区道修町1-7-1 北浜コニシビル Osaka (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, IT, 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,

(54) Title: NITRO COMPOUND DETECTION ELEMENT

(54) 発明の名称: ニトロ化合物検出素子

(57) Abstract: The present invention addresses the problem of providing a nitro compound detection technique, and solves this problem by providing a nitro compound detection element that is formed from a specific type of insect olfactory receptor, or an insect olfactory receptor to which a specific mutation has been introduced.

(57) 要約: ニトロ化合物検出技術を提供することを課題とし、該課題を、特定タイプの、或いは特定の変異が導入されてなる昆虫嗅覚受容体からなる、ニトロ化合物検出素子、により解決する。



WO 2022/024903 A1

明 細 書

発明の名称：ニトロ化合物検出素子

技術分野

[0001] 本開示は、ニトロ化合物検出素子等に関する。

背景技術

[0002] ニトロ化合物には爆発性を有するものが多く、その検出技術の開発が求められている。犬などの生物がニトロ化合物を認識することが知られており、この認識にかかわる生体因子として、哺乳類（マウス、ラット）の嗅覚受容体遺伝子が同定されている（非特許文献1）。

[0003] 一方、近年、昆虫の嗅覚機能は匂い物質の認識特異性が高いとされており、嗅覚センサー等への利用が模索されている。昆虫の嗅覚器には、匂い物質を認識する嗅覚受容体と嗅覚受容体共受容体とが形成した嗅覚受容体複合体が存在しており、匂い物質により活性化されると、上記複合体がイオンチャネル活性を示し、それにより匂い物質が検知される。しかしながら、昆虫の嗅覚受容体がニトロ化合物を検出できることは知られていない。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：特開2013-27376号公報

特許文献2：特開2018-59786号公報

特許文献3：特開2012-78351号公報

非特許文献

[0005] 非特許文献1：Li J, Haddad R, Chen S, Santos V, Luetje CW. A broadly tuned mouse odorant receptor that detects nitrotoluenes. J Neurochem. 2012 Jun;121(6):881-890.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 本開示は、ニトロ化合物検出技術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に鑑みて鋭意研究を進めた結果、特定タイプの、或いは特定の変異が導入されてなる昆虫嗅覚受容体が、ニトロ化合物応答性を有することを見出した。本発明者は、この知見に基づいてさらに研究を進めた結果、本開示の発明を完成させた。即ち、本開示は、下記の態様を包含する。

[0008] 項 1. (1) 配列番号1に示されるアミノ酸配列1A又は前記アミノ酸配列1Aと80%以上の同一性を有するアミノ酸配列1Bが変異してなり、変異1a：第1細胞外ループの一部又は全部の領域の欠失を含む、アミノ酸配列1C；

(2) 配列番号2に示されるアミノ酸配列2A又は前記アミノ酸配列2Aと80%以上の同一性を有するアミノ酸配列2Bが変異してなり、変異2a：前記アミノ酸配列2AにおけるL60、M138及びA152からなる群より選択される少なくとも1種のアミノ酸の置換2ax又は前記アミノ酸配列2Bにおける前記置換2axに対応する置換2ayを含む、アミノ酸配列2C；

(3) 配列番号3に示されるアミノ酸配列3A又は前記アミノ酸配列3Aと80%以上の同一性を有するアミノ酸配列3Bが変異してなり、変異3a：前記アミノ酸配列3AにおけるS114、A120、H162、V186、V352、及びS368からなるアミノ酸群の置換3ax又は前記アミノ酸配列3Bにおける前記置換3axに対応する置換3ay、並びに変異3b：第3細胞外ループから第3細胞内ループまでの領域における荷電アミノ酸の非荷電アミノ酸への置換を含む、アミノ酸配列3C；

(4) 配列番号4に示されるアミノ酸配列4A又は前記アミノ酸配列4Aと80%以上の同一性を有するアミノ酸配列4Bが変異してなり、変異4a：前記アミノ酸配列4AにおけるM61、C104、R112、G181、V189、及びI327からなるアミノ酸群の置換4ax又は前記アミノ酸配列4Bにおける前記置換4axに対応する置換4ayを含む、アミノ酸配列4C； 又は

(5) 配列番号5に示されるアミノ酸配列5A又は前記アミノ酸配列5Aと80%以上の同一性を有するアミノ酸配列5Bが変異してなり、変異5a：前記アミノ酸配列5AにおけるL178のアミノ酸の置換5ax又は前記アミノ酸配列5Bにおける前

記置換5axに対応する置換5ayを含む、アミノ酸配列5C

を含む嗅覚受容体タンパク質からなる、ニトロ化合物検出素子。

[0009] 項1 A. (1) 配列番号1に示されるアミノ酸配列1A又は前記アミノ酸配列1Aと80%以上の同一性を有するアミノ酸配列1Bが変異してなり、変異1a：第1細胞外ループの一部又は全部の領域の欠失を含む、アミノ酸配列1C；

(2) 配列番号2に示されるアミノ酸配列2A又は前記アミノ酸配列2Aと80%以上の同一性を有するアミノ酸配列2Bが変異してなり、変異2a：前記アミノ酸配列2AにおけるL60、M138及びA152からなる群より選択される少なくとも1種のアミノ酸の置換2ax又は前記アミノ酸配列2Bにおける前記置換2axに対応する置換2ayを含む、アミノ酸配列2C；

(3) 配列番号3に示されるアミノ酸配列3A又は前記アミノ酸配列3Aと80%以上の同一性を有するアミノ酸配列3Bが変異してなり、変異3a：前記アミノ酸配列3AにおけるS114、A120、H162、V186、V352、及びS368からなるアミノ酸群の置換3ax又は前記アミノ酸配列3Bにおける前記置換3axに対応する置換3ay、並びに変異3b：第3細胞外ループから第3細胞内ループまでの領域における荷電アミノ酸の非荷電アミノ酸への置換を含む、アミノ酸配列3C；

(4) 配列番号4に示されるアミノ酸配列4A又は前記アミノ酸配列4Aと80%以上の同一性を有するアミノ酸配列4Bが変異してなり、変異4a：前記アミノ酸配列4AにおけるM61、C104、R112、G181、V189、及びI327からなるアミノ酸群の置換4ax又は前記アミノ酸配列4Bにおける前記置換4axに対応する置換4ayを含む、アミノ酸配列4C； 又は

(5) 配列番号5に示されるアミノ酸配列5A又は前記アミノ酸配列5Aと80%以上の同一性を有するアミノ酸配列5Bが変異してなり、変異5a：前記アミノ酸配列5AにおけるL178のアミノ酸の置換5ax又は前記アミノ酸配列5Bにおける前記置換5axに対応する置換5ayを含む、アミノ酸配列5C
を含む嗅覚受容体タンパク質の、ニトロ化合物検出素子としての使用。

[0010] 項1 B. (1) 配列番号1に示されるアミノ酸配列1A又は前記アミノ酸配列1Aと80%以上の同一性を有するアミノ酸配列1Bが変異してなり、変異1a：第1

細胞外ループの一部又は全部の領域の欠失を含む、アミノ酸配列1C；

(2) 配列番号2に示されるアミノ酸配列2A又は前記アミノ酸配列2Aと80%以上の同一性を有するアミノ酸配列2Bが変異してなり、変異2a：前記アミノ酸配列2AにおけるL60、M138及びA152からなる群より選択される少なくとも1種のアミノ酸の置換2ax又は前記アミノ酸配列2Bにおける前記置換2axに対応する置換2ayを含む、アミノ酸配列2C；

(3) 配列番号3に示されるアミノ酸配列3A又は前記アミノ酸配列3Aと80%以上の同一性を有するアミノ酸配列3Bが変異してなり、変異3a：前記アミノ酸配列3AにおけるS114、A120、H162、V186、V352、及びS368からなるアミノ酸群の置換3ax又は前記アミノ酸配列3Bにおける前記置換3axに対応する置換3ay、並びに変異3b：第3細胞外ループから第3細胞内ループまでの領域における荷電アミノ酸の非荷電アミノ酸への置換を含む、アミノ酸配列3C；

(4) 配列番号4に示されるアミノ酸配列4A又は前記アミノ酸配列4Aと80%以上の同一性を有するアミノ酸配列4Bが変異してなり、変異4a：前記アミノ酸配列4AにおけるM61、C104、R112、G181、V189、及びI327からなるアミノ酸群の置換4ax又は前記アミノ酸配列4Bにおける前記置換4axに対応する置換4ayを含む、アミノ酸配列4C； 又は

(5) 配列番号5に示されるアミノ酸配列5A又は前記アミノ酸配列5Aと80%以上の同一性を有するアミノ酸配列5Bが変異してなり、変異5a：前記アミノ酸配列5AにおけるL178のアミノ酸の置換5ax又は前記アミノ酸配列5Bにおける前記置換5axに対応する置換5ayを含む、アミノ酸配列5C

を含む嗅覚受容体タンパク質の、ニトロ化合物検出素子の製造のための使用。

[0011] 項2. 前記変異1aにおける欠失領域がN末端のアミノ酸から5~30アミノ酸の領域であり；

前記変異2aにおけるL60の変異後のアミノ酸がプロリンであり、M138の変異後のアミノ酸が分岐鎖アミノ酸であり、且つ/或いはA152の変異後のアミノ酸が親水性中性アミノ酸であり；

前記変異3aにおけるS114の変異後のアミノ酸が脂肪族アミノ酸であり、A120の変異後のアミノ酸が酸性アミノ酸であり、H162の変異後のアミノ酸が芳香族アミノ酸であり、V186の変異後のアミノ酸が脂肪族アミノ酸であり、V352の変異後のアミノ酸が含硫アミノ酸であり、S368の変異後のアミノ酸がプロリンであり；

前記変異3bにおける非荷電アミノ酸への前記置換の数が6~18であり；

前記変異4aにおけるM61の変異後のアミノ酸が親水性中性アミノ酸であり、C104の変異後のアミノ酸が塩基性アミノ酸であり、R112の変異後のアミノ酸が親水性中性アミノ酸であり、G181の変異後のアミノ酸が脂肪族アミノ酸であり、V189の変異後のアミノ酸が分岐鎖アミノ酸であり、且つI327の変異後のアミノ酸が分岐鎖アミノ酸であり；

前記変異5aにおけるL178の変異後のアミノ酸がプロリンである、
項1に記載のニトロ化合物検出素子。

[0012] 項3. 前記変異1aにおける欠失領域がN末端のアミノ酸から15~25アミノ酸の領域であり；

前記変異2aにおけるL60の変異後のアミノ酸がプロリンであり、M138の変異後のアミノ酸がイソロイシンであり、且つ/或いはA152の変異後のアミノ酸がトレオニンであり；前記変異3aにおけるS114の変異後のアミノ酸がアラニンであり、A120の変異後のアミノ酸がグルタミン酸であり、H162の変異後のアミノ酸がチロシンであり、V186の変異後のアミノ酸がアラニンであり、V352の変異後のアミノ酸がメチオニンであり、S368の変異後のアミノ酸がプロリンであり；

前記変異3bにおける非荷電アミノ酸への前記置換の数が8~14であり；

前記変異4aにおけるM61の変異後のアミノ酸がトレオニンであり、C104の変異後のアミノ酸がアルギニンであり、R112の変異後のアミノ酸がグルタミンであり、G181の変異後のアミノ酸がアラニンであり、V189の変異後のアミノ酸がイソロイシンであり、且つI327の変異後のアミノ酸がバリンであり；

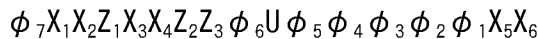
前記変異5aにおけるL178の変異後のアミノ酸がプロリンである、

項1又は2に記載のニトロ化合物検出素子。

[0013] 項4. 前記ニトロ化合物が、ベンゼン環にニトロ基が直接連結してなる構造を含む化合物、且つ／或いはニトロ基を2つ以上含む化合物である、項1～3のいずれかに記載のニトロ化合物検出素子。

[0014] 項5. 前記嗅覚受容体タンパク質が、

対応する野生型嗅覚受容体タンパク質中の一般式(1)：



[式中、 $X_1 \sim X_6$ 及び $Z_1 \sim Z_3$ は野生型昆虫嗅覚受容体のアミノ酸配列に由来するアミノ酸を示し、 ϕ_1 は疎水性アミノ酸を示し、 $\phi_2 \sim \phi_7$ はそれぞれ独立して無電荷極性アミノ酸又は疎水性アミノ酸を示し、Uは無電荷極性アミノ酸を示す。]

で示されるアミノ酸配列Aが変異してなるアミノ酸配列Bを含み、

下記条件1～3：

(条件1) 前記アミノ酸配列Bにおいて、 X_3 及び／又は X_4 が置換しており、 X_3 が分岐鎖アミノ酸であり且つ／或いは X_4 が無電荷極性アミノ酸であること、

(条件2) 前記アミノ酸配列Aにおいて X_5 及び X_6 が共に正電荷極性アミノ酸である場合に、前記アミノ酸配列Bにおいて、 X_6 が正電荷極性アミノ酸以外のアミノ酸であること、及び(条件3) 前記アミノ酸配列Aにおいて X_1 及び X_2 の一方又は両方が正電荷極性アミノ酸である場合に、前記アミノ酸配列Bにおいて、 X_1 及び／又は X_2 が置換しており、 X_1 が無電荷極性アミノ酸であり且つ／或いは X_2 が疎水性アミノ酸であること、

からなる群より選択される少なくとも1種の条件を満たす、

項1～4のいずれかに記載のニトロ化合物検出素子。

[0015] 項6. (1) 配列番号1に示されるアミノ酸配列1A又は前記アミノ酸配列1Aと80%以上の同一性を有するアミノ酸配列1Bが変異してなり、変異1a：第1細胞外ループの一部又は全部の領域の欠失を含む、アミノ酸配列1C；

(2) 配列番号2に示されるアミノ酸配列2A又は前記アミノ酸配列2Aと80%以上の同一性を有するアミノ酸配列2Bが変異してなり、変異2a：前記アミノ酸

配列2AにおけるL60、M138及びA152からなる群より選択される少なくとも1種のアミノ酸の置換2ax又は前記アミノ酸配列2Bにおける前記置換2axに対応する置換2ayを含む、アミノ酸配列2C；

(3) 配列番号3に示されるアミノ酸配列3A又は前記アミノ酸配列3Aと80%以上の同一性を有するアミノ酸配列3Bが変異してなり、変異3a：前記アミノ酸配列3AにおけるS114、A120、H162、V186、V352、及びS368からなるアミノ酸群の置換3ax又は前記アミノ酸配列3Bにおける前記置換3axに対応する置換3ay、並びに変異3b：第3細胞外ループから第3細胞内ループまでの領域における荷電アミノ酸の非荷電アミノ酸への置換を含む、アミノ酸配列3C；又は

(4) 配列番号4に示されるアミノ酸配列4A又は前記アミノ酸配列4Aと80%以上の同一性を有するアミノ酸配列4Bが変異してなり、変異4a：前記アミノ酸配列4AにおけるM61、C104、R112、G181、V189、及びI327からなるアミノ酸群の置換4ax又は前記アミノ酸配列4Bにおける前記置換4axに対応する置換4ayを含む、アミノ酸配列4C

を含む、嗅覚受容体タンパク質。

[0016] 項7. 項6に記載の嗅覚受容体タンパク質のコード配列を含む、ポリヌクレオチド。

[0017] 項8. 項7に記載のポリヌクレオチドを含む、細胞。

[0018] 項9. 項8に記載の細胞を含む、非ヒト動物。

[0019] 項10. 項1～5のいずれかに記載のニトロ化合物検出素子を含む脂質二重膜、細胞、又は前記細胞を含む非ヒト動物を備える、ニトロ化合物検出センサ。

[0020] 項10A. 項1～5のいずれかに記載のニトロ化合物検出素子を含む脂質二重膜、細胞、又は前記細胞を含む非ヒト動物の、ニトロ化合物検出センサとしての使用。

[0021] 項10B. 項1～5のいずれかに記載のニトロ化合物検出素子を含む脂質二重膜、細胞、又は前記細胞を含む非ヒト動物の、ニトロ化合物検出センサの製造のための使用。

[0022] 項11. 項1～5のいずれかに記載のニトロ化合物検出素子、又は項10に記載のニトロ化合物検出センサと、ニトロ化合物とを接触させることを含む、ニトロ化合物検出方法。

発明の効果

[0023] 本開示によれば、ニトロ化合物検出技術を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0024] [図1]ハマダラカ嗅覚受容体28及びその変異体のニトロ化合物（2,3-ジニトロトルエン、2,6-ジニトロトルエン）応答活性の測定結果を示す（試験例1）。縦軸は蛍光量（＝活性強度）を示し、横軸は、被検物質の培養液中の濃度を示す。グラフ上方に、使用した嗅覚受容体（WTは野生型を示し、その他は変異部位を表す）を示す。

[図2]ハマダラカ嗅覚受容体47及びその変異体のニトロ化合物（4-アミノ-2,6-ジニトロトルエン）応答活性の測定結果を示す（試験例2）。縦軸は蛍光量（＝活性強度）を示し、横軸は、被検物質の培養液中の濃度（凡例参照）を示す。グラフ上方に、使用した嗅覚受容体（WTは野生型を示し、その他は変異部位を表す）を示す。

[図3]ハマダラカ嗅覚受容体47及びその変異体のニトロ化合物（4-アミノ-2,6-ジニトロトルエン）応答活性の測定結果を示す（試験例2）。縦軸は蛍光量（＝活性強度）を示し、横軸は、被検物質の培養液中の濃度（凡例参照）を示す。グラフ上方に、使用した嗅覚受容体の変異部位を示す。

[図4]ハマダラカ嗅覚受容体47及びその変異体のニトロ化合物（3-トリフルオロメチル-4-ニトロフェノール、2,3-ジニトロトルエン、2,4-ジニトロトルエン、又は2,6-ジニトロトルエン）応答活性の測定結果を示す（試験例2）。縦軸は蛍光量（＝活性強度）を示し、横軸は、被検物質の培養液中の濃度を示す。グラフ上方に、使用した嗅覚受容体（野生型、又は7重変異（実施例12））を示す。

[図5]ハマダラカ嗅覚受容体47及びその変異体のニトロ化合物（3-ニトロトルエン、4-ニトロトルエン、又はトルエン）応答活性の測定結果を示す（試験

例2)。縦軸は蛍光量 (= 活性強度) を示し、横軸は、被検物質の培養液中の濃度を示す。グラフ上方に、使用した嗅覚受容体 (野生型、又は7重変異 (実施例12)) を示す。

[図6]ハマダラカ嗅覚受容体47及びその変異体のニトロ化合物 (2,3-ジメチル-2,3-ジニトロブタン) 応答活性の測定結果を示す (試験例2)。縦軸は蛍光量 (= 活性強度) を示し、横軸は、被検物質の培養液中の濃度を示す (DMSOは0 μ Mを示す)。グラフ上方に、使用した嗅覚受容体 (WTは野生型を示し、その他は変異部位を表す) を示す。

[図7]ハマダラカ嗅覚受容体6及びその変異体のニトロ化合物 (2-ニトロアニリン) 応答活性の測定結果を示す (試験例3)。縦軸は蛍光量 (= 活性強度) を示し、横軸は、被検物質の培養液中の濃度を示す (DMSOは0 μ Mを示す)。グラフ上方に、使用した嗅覚受容体 (野生型、変異型) を示す。

[図8]ハマダラカ嗅覚受容体15及びその変異体のニトロ化合物 (2-ニトロアニリン) 応答活性の測定結果を示す (試験例4)。縦軸は蛍光量 (= 活性強度) を示し、横軸は、被検物質の培養液中の濃度を示す (DMSOは0 μ Mを示す)。グラフ上方に、使用した嗅覚受容体 (野生型、変異型) を示す。

[図9]シマカ嗅覚受容体4のニトロ化合物 (2,4-ジニトロトルエン、4-ニトロトルエン) 応答活性の測定結果を示す (試験例5)。縦軸は蛍光量 (= 活性強度) を示し、横軸は、被検物質の培養液中の濃度を示す。グラフ上方に、使用した嗅覚受容体を示す。

[図10]ハマダラカ嗅覚受容体28とマウス嗅覚受容体Olfir256_17のニトロ化合物 (3-ニトロトルエン) 応答活性の測定結果を示す (試験例6)。縦軸は蛍光量 (= 活性強度) を示し、横軸は、被検物質の培養液中の濃度を示す。

[図11]ハマダラカ嗅覚受容体28の第7膜貫通領域においてさらにアミノ酸置換を導入した場合のニトロ化合物 (2,3-ジニトロトルエン) 応答活性の測定結果を示す (試験例7)。縦軸は蛍光量 (= 活性強度) を示し、横軸は、被検物質の培養液中の濃度を示す (DMSOは0 μ Mを示す)。

発明を実施するための形態

[0025] 1. 定義等

本明細書中において、「含有」及び「含む」なる表現については、「含有」、「含む」、「実質的にからなる」及び「のみからなる」という概念を含む。

本明細書において、アミノ酸配列の「同一性」とは、2以上の対比可能なアミノ酸配列の、お互いに対するアミノ酸配列の一致の程度をいう。従って、ある2つのアミノ酸配列の一致性が高いほど、それらの配列の同一性又は類似性は高い。アミノ酸配列の同一性のレベルは、例えば、配列分析用ツールであるFASTAを用い、デフォルトパラメータを用いて決定される。若しくは、Karlin及びAltschulによるアルゴリズムBLAST (Karlin S, Altschul SF. “Methods for assessing the statistical significance of molecular sequence features by using general scoringschemes” Proc Natl Acad Sci USA, 87:2264–2268 (1990)、KarlinS, Altschul SF. “Applications and statistics for multiple high-scoring segments in molecular sequences.” Proc Natl Acad Sci USA, 90:5873–7 (1993))を用いて決定できる。このようなBLASTのアルゴリズムに基づいたBLASTXと呼ばれるプログラムが開発されている。これらの解析方法の具体的な手法は公知であり、National Center of Biotechnology Information (NCBI) のウェブサイト (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) を参照すればよい。また、塩基配列の「同一性」も上記に準じて定義される。本明細書中において、「保存的置換」とは、アミノ酸残基が類似の側鎖を有するアミノ酸残基に置換されることを意味する。例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジンといった塩基性側鎖を有するアミノ酸残基同士で置換されることが、保存的な置換にあたる。その他、アスパラギン酸、グルタミン酸といった酸性側鎖を有するアミノ酸残基；グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システインといった非帯電性極性側鎖を有するアミノ酸残基；アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファンといった非極性側鎖を有するアミノ酸残基；トレオニン、バリン、イソロイシ

ンといった β -分枝側鎖を有するアミノ酸残基；チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジンといった芳香族側鎖を有するアミノ酸残基同士での置換も同様に、保存的な置換にあたる。

[0026] 本明細書において、DNA、RNAなどのヌクレオチドには、次に例示するように、公知の化学修飾が施されていてもよい。ヌクレアーゼなどの加水分解酵素による分解を防ぐために、各ヌクレオチドのリン酸残基（ホスフェート）を、例えば、ホスホロチオエート（PS）、メチルホスホネート、ホスホロジチオネート等の化学修飾リン酸残基に置換することができる。また、各リボヌクレオチドの糖（リボース）の2位の水酸基を、 $-OR$ （ R は、例えば CH_3 （ $2'$ - $O-Me$ ）、 $CH_2CH_2OCH_3$ （ $2'$ - $O-MOE$ ）、 $CH_2CH_2NHC(NH)NH_2$ 、 $CH_2CONHCH_3$ 、 CH_2CH_2CN 等を示す）に置換してもよい。さらに、塩基部分（ピリミジン、プリン）に化学修飾を施してもよく、例えば、ピリミジン塩基の5位へのメチル基やカチオン性官能基の導入、あるいは2位のカルボニル基のチオカルボニルへの置換などが挙げられる。さらには、リン酸部分やヒドロキシル部分が、例えば、ビオチン、アミノ基、低級アルキルアミン基、アセチル基等で修飾されたものなどを挙げるができるが、これに限定されない。また、ヌクレオチドの糖部の2'酸素と4'炭素を架橋することにより、糖部のコンフォメーションをN型に固定したものであるBNA（LNA）等もまた、好ましく用いられ得る。

[0027] 嗅覚受容体タンパク質は、7回膜貫通構造を有する膜タンパク質であり、そのアミノ末端（以下、「N末端」という場合もある。）からカルボキシル末端（以下、「C末端」という場合もある。）に向かって順に、N末端領域（NT）、第1膜貫通ドメイン（TM1）、第1細胞外ループ（EC1）、第2膜貫通ドメイン（TM2）、第1細胞内ループ（IC1）、第3膜貫通ドメイン（TM3）、第2細胞外ループ（EC2）、第4膜貫通ドメイン（TM4）、第2細胞内ループ（IC2）、第5膜貫通ドメイン（TM5）、第3細胞外ループ（EC3）、第6膜貫通ドメイン（TM6）、第3細胞内ループ（IC3）、第7膜貫通ドメイン（TM7）、及びC末端領域（CT）が連結されて構成される。本開示において、各領域は、TMpred（K, Hofm

ann, W. Stoffel, TMbase - a database of membrane spanning proteins segments, Biol. Chem. Hoppe-Seyler, 374 (1993), p. 166、https://embnet.vital-it.ch/software/TMPRED_form.html) を用いた構造予測 (条件はデフォルト) により決定される。

[0028] 本明細書において、アミノ酸の変異は、具体的には、アミノ酸の欠失、置換、挿入、又は付加である。嗅覚受容体タンパク質は、化学物質応答活性への影響が少ないアミノ酸が欠失していてもよく、例えば膜貫通領域以外のアミノ酸の一部が欠失している嗅覚受容体ペプチドであってもよい。

[0029] 本明細書において、アミノ酸配列中のアミノ酸の位置は、アミノ酸位置文字表記+N末端アミノ酸から数えた場合のアミノ酸番号で示すことがある。例えば、「A153」は、N末端から153番目のアミノ酸であるアラニンを示す。

[0030] 本明細書において、ニトロ化合物応答性とは、嗅覚受容体がニトロ化合物を認識し、その嗅覚受容体と嗅覚受容体共受容体とが形成した嗅覚受容体複合体が活性化されてイオンチャネル活性を示す性質をいう。嗅覚受容体のニトロ化合物応答性は、ニトロ化合物と接触した嗅覚受容体と嗅覚受容体共受容体とが形成する嗅覚受容体複合体のイオンチャネル活性を指標として測定することができる。例えば、(a)嗅覚受容体、(b)嗅覚受容体共受容体、及び (c)嗅覚受容体が応答した場合に細胞内に流入するイオン (カルシウムイオン等) により発色又は発光するタンパク質を発現する細胞と、ニトロ化合物とを接触させ、当該細胞の発光量を測定する。測定された発光量が多い程、嗅覚受容体のニトロ化合物応答性が高いと判定する。後述の試験例1-2及び試験例1-3に、ニトロ化合物応答性を測定した具体例が記載されている。

[0031] 2. 嗅覚受容体タンパク質

本開示は、その一態様において、(1) 配列番号1に示されるアミノ酸配列1A又は前記アミノ酸配列1Aと80%以上の同一性を有するアミノ酸配列1Bが変異してなり、変異1a：第1細胞外ループの一部又は全部の領域の欠失を含む、アミノ酸配列1C；

(2) 配列番号2に示されるアミノ酸配列2A又は前記アミノ酸配列2Aと80%以

上の同一性を有するアミノ酸配列2Bが変異してなり、変異2a：前記アミノ酸配列2AにおけるL60、M138及びA152からなる群より選択される少なくとも1種のアミノ酸の置換2ax又は前記アミノ酸配列2Bにおける前記置換2axに対応する置換2ayを含む、アミノ酸配列2C；

(3) 配列番号3に示されるアミノ酸配列3A又は前記アミノ酸配列3Aと80%以上の同一性を有するアミノ酸配列3Bが変異してなり、変異3a：前記アミノ酸配列3AにおけるS114、A120、H162、V186、V352、及びS368からなるアミノ酸群の置換3ax又は前記アミノ酸配列3Bにおける前記置換3axに対応する置換3ay、並びに変異3b：第3細胞外ループから第3細胞内ループまでの領域における荷電アミノ酸の非荷電アミノ酸への置換を含む、アミノ酸配列3C；

(4) 配列番号4に示されるアミノ酸配列4A又は前記アミノ酸配列4Aと80%以上の同一性を有するアミノ酸配列4Bが変異してなり、変異4a：前記アミノ酸配列4AにおけるM61、C104、R112、G181、V189、及びI327からなるアミノ酸群の置換4ax又は前記アミノ酸配列4Bにおける前記置換4axに対応する置換4ayを含む、アミノ酸配列4C； 又は

(5) 配列番号5に示されるアミノ酸配列5A又は前記アミノ酸配列5Aと80%以上の同一性を有するアミノ酸配列5Bが変異してなり、変異5a：前記アミノ酸配列5AにおけるL178のアミノ酸の置換5ax又は前記アミノ酸配列5Bにおける前記置換5axに対応する置換5ayを含む、アミノ酸配列5C

を含む嗅覚受容体タンパク質（本明細書において、「本開示の嗅覚受容体タンパク質」と示すこともある。）に関する。以下に、これについて説明する。

[0032] 2-1. アミノ酸配列1C

アミノ酸配列1Cは、配列番号1に示されるアミノ酸配列1A又は前記アミノ酸配列1Aと80%以上の同一性を有するアミノ酸配列1Bが、変異してなる配列であって、変異1a：第1細胞外ループの一部又は全部の領域の欠失を含む限り、特に制限されない。

[0033] アミノ酸配列1Aは、ガンビエハマダラカ (*Anopheles gambiae*) が内在的に

発現する（固有に有する）嗅覚受容体28のアミノ酸配列である。

[0034] アミノ酸配列1Bは、該配列に変異1aが導入されてなる配列からなるタンパク質（タンパク質1B）のニトロ化合物応答性が、アミノ酸配列1Aに変異1aが導入されてなる配列からなるタンパク質（タンパク質1A）のニトロ化合物応答性から著しく低減しない限り、特に制限されない。タンパク質1Bのニトロ化合物応答性は、タンパク質1Aのニトロ化合物応答性100%に対して、例えば50%以上、好ましくは60%以上、より好ましくは70%以上、さらに好ましくは80%以上、よりさらに好ましくは90%以上である。この観点から、アミノ酸配列1Bのアミノ酸配列1Aに対する同一性は、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、よりさらに好ましくは97%以上、特に好ましくは99%以上であり、また100%未満である。

[0035] アミノ酸配列1Bは、好ましくは、下記（1B'）に記載のアミノ酸配列：
（1B'）アミノ酸配列1Aに対して1若しくは複数個のアミノ酸が変異したアミノ酸配列1B'、である。

[0036] アミノ酸配列1B'において、「複数個」とは、例えば2~20個、好ましくは2~10個、より好ましくは2~5個、さらに好ましくは2~3個、よりさらに好ましくは2個である。

[0037] アミノ酸配列1Bのアミノ酸配列1Aに対するアミノ酸変異は、例えば置換、欠失、付加、挿入等が挙げられ、好ましくは置換が挙げられ、中でもより好ましくは保存的置換が挙げられる。

[0038] アミノ酸配列1Bは、好ましくは昆虫由来の嗅覚受容体のアミノ酸配列である。なお、「~由来の」とは、その生物が内在的に発現する（固有に有する）ものであることを意味する。昆虫としては、好ましくは内翅上目昆虫が挙げられ、より好ましくはカ科、ショウジョウバエ科等の双翅目昆虫；カイコガ科等の鱗翅目昆虫；ミツバチ科等の膜翅目昆虫等が挙げられ、さらに好ましくはカ科、ショウジョウバエ科等の双翅目昆虫が挙げられ、よりさらに好ましくはカ科昆虫が挙げられる。カ科の昆虫としては、例えば、ガンビエハマダラカ (*Anopheles gambiae*)、ネッタイシマカ (*Aedes aegypti*)、ネッ

タイイエカ (*Culex quinquefasciatus*) 等が挙げられる。ショウジョウバエ科の昆虫としては、例えば、キイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*)、ウスグロショウジョウバエ (*Drosophila pseudoobscura*)、クロショウジョウバエ (*Drosophila virillis*) 等が挙げられる。カイコガ科の昆虫としては、例えば、カイコガ (*Bombyx mori*)、クワコ (*Bombyx mandarina*)、イチジクカサン (*Trilocha varians*) 等が挙げられる。ミツバチ科の昆虫としては、例えば、セイヨウミツバチ (*Apis mellifera*)、ヒメミツバチ (*Apis florea*)、オオミツバチ (*Apis dorsata*)、セイヨウオオマルハナバチ (*Bombus terrestris*) 等が挙げられる。

[0039] 変異1aは、第1細胞外ループの一部又は全部の領域の欠失である。第1細胞外ループは、アミノ酸配列1Aにおいては、N末端から55番目のアミノ酸から84番目のアミノ酸までの30アミノ酸の領域である。変異1aは、より好ましくは第1細胞外ループのN末端のアミノ酸から5~30アミノ酸の領域、さらに好ましくはN末端のアミノ酸から10~25アミノ酸の領域、よりさらに好ましくはN末端のアミノ酸から15~25アミノ酸の領域である。

[0040] 変異1aにおいては、さらに第1細胞外ループのN末端側に隣接した領域である第1膜貫通ドメインのC末端側の一部が欠失していることが好ましい。例えば、第1膜貫通ドメインのC末端アミノ酸を含む1~5アミノ酸の領域が欠失していることが好ましい。

[0041] アミノ酸配列1Cは、好ましくは、さらに変異1b：アミノ酸配列1AにおけるT25及びP31からなる群より選択される少なくとも1種のアミノ酸の置換1bx又はアミノ酸配列1Bにおける置換1bxに対応する置換1byを含む。

[0042] なお、「対応する置換」とは、2つの配列をBLAST（設定はデフォルト）で比較した場合に、アライメント配列上同一の位置の置換であることを示す。例えば、アミノ酸配列1AにおけるT25に対応する置換とは、アミノ酸配列1Aとアミノ酸配列1Bと配列比較して得られるアライメント配列において、アミノ酸配列1Bにおいて、アミノ酸配列1AにおけるT25と同一の位置のアミノ酸の置換を示す。また、アミノ酸配列1Aにおける置換後のアミノ酸とアミノ酸配列1

Bにおける置換後のアミノ酸は同一である。

[0043] 変異1bにおけるT25又はそれに対応するアミノ酸の変異後のアミノ酸は、塩基性アミノ酸であることが好ましい。塩基性アミノ酸としては、例えばリジン、アルギニン、ヒスチジン等が挙げられ、これらの中でも特に好ましくはリジンが挙げられる。

[0044] 変異1bにおけるP31又はそれに対応するアミノ酸の変異後のアミノ酸は、親水性中性アミノ酸であることが好ましい。親水性中性アミノ酸としては、例えばセリン、トレオニン、アスパラギン、グルタミン等が挙げられ、これらの中でも特に好ましくはトレオニンが挙げられる。

[0045] アミノ酸配列1Cは、ニトロ化合物応答性が著しく損なわれない限りにおいて、他のアミノ酸変異（例えば置換、保存的置換）を含むことができる。一例として、第7膜貫通領域において特定の変異を導入することにより、ニトロ化合物応答性をさらに高めることも可能である。他のアミノ酸変異の数は、例えば1～50個、1～20個、1～10個、1～5個である。

[0046] アミノ酸配列1Cとして、具体的には、例えば配列番号21、25、27、又は29で示されるアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列と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、よりさらに好ましくは97%以上、特に好ましくは99%以上、また100%未満）の同一性を有するアミノ酸配列が挙げられる。

[0047] 2-2. アミノ酸配列2C

アミノ酸配列2Cは、配列番号2に示されるアミノ酸配列2A又は前記アミノ酸配列2Aと80%以上の同一性を有するアミノ酸配列2Bが変異してなり、変異2a：前記アミノ酸配列2AにおけるL60、M138及びA152からなる群より選択される少なくとも1種のアミノ酸の置換2ax又は前記アミノ酸配列2Bにおける前記置換2axに対応する置換2ayを含む限り、特に制限されない。

[0048] アミノ酸配列2Aは、ガンビエハマダラカ (*Anopheles gambiae*) が内在的に発現する（固有に有する）嗅覚受容体47のアミノ酸配列である。

[0049] アミノ酸配列2Bは、該配列に変異2aが導入されてなる配列からなるタンパ

ク質（タンパク質2B）のニトロ化合物応答性が、アミノ酸配列2Aに変異2aが導入されてなる配列からなるタンパク質（タンパク質2A）のニトロ化合物応答性から著しく低減しない限り、特に制限されない。タンパク質2Bのニトロ化合物応答性は、タンパク質2Aのニトロ化合物応答性100%に対して、例えば50%以上、好ましくは60%以上、より好ましくは70%以上、さらに好ましくは80%以上、よりさらに好ましくは90%以上である。この観点から、アミノ酸配列2Bのアミノ酸配列2Aに対する同一性は、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、よりさらに好ましくは97%以上、特に好ましくは99%以上であり、また100%未満である。

[0050] アミノ酸配列2Bは、好ましくは、下記（2B'）に記載のアミノ酸配列：

（2B'）アミノ酸配列2Aに対して1若しくは複数個のアミノ酸が変異したアミノ酸配列2B'、である。

[0051] アミノ酸配列2B'において、「複数個」とは、例えば2～20個、好ましくは2～10個、より好ましくは2～5個、さらに好ましくは2～3個、よりさらに好ましくは2個である。

[0052] アミノ酸配列2Bのアミノ酸配列2Aに対するアミノ酸変異は、例えば置換、欠失、付加、挿入等が挙げられ、好ましくは置換が挙げられ、中でもより好ましくは保存的置換が挙げられる。

[0053] アミノ酸配列2Bは、好ましくは昆虫由来の嗅覚受容体のアミノ酸配列である。昆虫由来の嗅覚受容体については、上記「2-1. アミノ酸配列1C」における定義と同様である。

[0054] 変異2aは、アミノ酸配列2AにおけるL60、M138及びA152からなる群より選択される少なくとも1種のアミノ酸の置換2ax又はアミノ酸配列2Bにおける置換2axに対応する置換2ay、である。「対応する置換」については、上記「2-1. アミノ酸配列1C」における定義と同様である。

[0055] 変異2aにおけるL60又はそれに対応するアミノ酸の変異後のアミノ酸は、プロリンであることが好ましい。

[0056] 変異2aにおけるM138又はそれに対応するアミノ酸の変異後のアミノ酸は、

分岐鎖アミノ酸であることが好ましい。分岐鎖アミノ酸としては、例えばバリン、イソロイシン、ロイシン等が挙げられ、これらの中でも特に好ましくはイソロイシンが挙げられる。

[0057] 変異2aにおけるA152又はそれに対応するアミノ酸の変異後のアミノ酸は、親水性中性アミノ酸であることが好ましい。親水性中性アミノ酸としては、例えばセリン、トレオニン、アスパラギン、グルタミン等が挙げられ、これらの中でも特に好ましくはトレオニンが挙げられる。

[0058] 変異2aは、M138及びA152の少なくとも1方の置換又はそれに対応するアミノ酸置換を含むことが好ましく、これらの両方の置換又はそれに対応するアミノ酸置換を含むことがより好ましい。

[0059] アミノ酸配列2Cは、好ましくは、さらに変異2b：アミノ酸配列2AにおけるD5、L71、I134、S140、F147、K235、及びN241からなる群より選択される少なくとも1種のアミノ酸の置換2bx又はアミノ酸配列2Bにおける置換2bxに対応する置換2byを含む。

[0060] 変異2bにおけるD5又はそれに対応するアミノ酸の変異後のアミノ酸は、酸性アミノ酸であることが好ましい。酸性アミノ酸としては、例えばアスパラギン酸、グルタミン酸等が挙げられ、これらの中でも特に好ましくはグルタミン酸が挙げられる。

[0061] 変異2bにおけるL71又はそれに対応するアミノ酸の変異後のアミノ酸は、芳香族アミノ酸であることが好ましい。芳香族アミノ酸としては、例えばフェニルアラニン、チロシン、トリプトファン等が挙げられ、これらの中でも特に好ましくはフェニルアラニンが挙げられる。

[0062] 変異2bにおけるI134又はそれに対応するアミノ酸の変異後のアミノ酸は、分岐鎖アミノ酸であることが好ましい。分岐鎖アミノ酸としては、例えばバリン、イソロイシン、ロイシン等が挙げられ、これらの中でも特に好ましくはバリンが挙げられる。

[0063] 変異2bにおけるS140又はそれに対応するアミノ酸の変異後のアミノ酸は、脂肪族アミノ酸であることが好ましい。脂肪族アミノ酸としては、例えばア

ラニン、グリシン、バリン、イソロイシン、ロイシン等が挙げられ、これらの中でも特に好ましくはグリシンが挙げられる。

[0064] 変異2bにおけるF147又はそれに対応するアミノ酸の変異後のアミノ酸は、分岐鎖アミノ酸であることが好ましい。分岐鎖アミノ酸としては、例えばバリン、イソロイシン、ロイシン等が挙げられ、これらの中でも特に好ましくはロイシンが挙げられる。

[0065] 変異2bにおけるK235又はそれに対応するアミノ酸の変異後のアミノ酸は、親水性中性アミノ酸であることが好ましい。親水性中性アミノ酸としては、例えばセリン、トレオニン、アスパラギン、グルタミン等が挙げられ、これらの中でも特に好ましくはグルタミンが挙げられる。

[0066] 変異2bにおけるN241又はそれに対応するアミノ酸の変異後のアミノ酸は、親水性中性アミノ酸であることが好ましい。親水性中性アミノ酸としては、例えばセリン、トレオニン、アスパラギン、グルタミン等が挙げられ、これらの中でも特に好ましくはセリンが挙げられる。

[0067] 変異2bは、好ましくはL71Fの置換又はそれに対応するアミノ酸置換を含み、より好ましくはL71F、及びI134の置換又はそれに対応するアミノ酸置換を含み、さらに好ましくはL71F、I134、及びS140の置換又はそれに対応するアミノ酸置換を含み、よりさらに好ましくはL71F、I134、S140、及びF147の置換又はそれに対応するアミノ酸置換を含む。

[0068] アミノ酸配列2Cは、ニトロ化合物応答性が著しく損なわれない限りにおいて、他のアミノ酸変異（例えば置換、保存的置換）を含むことができる。一例として、第7膜貫通領域において特定の変異を導入することにより、ニトロ化合物応答性をさらに高めることも可能である。他のアミノ酸変異の数は、例えば1～50個、1～20個、1～10個、1～5個である。

[0069] アミノ酸配列2Cとして、具体的には、例えば配列番号63、67、71、73、75、77、又は79で示されるアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列と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、よりさらに好ましくは97%以上、特に好ましくは99%以上、また100%未満）

の同一性を有するアミノ酸配列が挙げられる。

[0070] 2-3. アミノ酸配列3C

アミノ酸配列3Cは、配列番号3に示されるアミノ酸配列3A又は前記アミノ酸配列3Aと80%以上の同一性を有するアミノ酸配列3Bが変異してなり、変異3a：前記アミノ酸配列3AにおけるS114、A120、H162、V186、V352、及びS368からなるアミノ酸群の置換3ax又は前記アミノ酸配列3Bにおける前記置換3axに対応する置換3ay、並びに変異3b：第3細胞外ループから第3細胞内ループまでの領域における荷電アミノ酸の非荷電アミノ酸への置換を含む限り、特に制限されない。

[0071] アミノ酸配列3Aは、ガンビエハマダラカ (*Anopheles gambiae*) が内在的に発現する (固有に有する) 嗅覚受容体6のアミノ酸配列である。

[0072] アミノ酸配列3Bは、該配列に変異3a及び変異3bが導入されてなる配列からなるタンパク質 (タンパク質3B) のニトロ化合物応答性が、アミノ酸配列3Aに変異3a及び変異3bが導入されてなる配列からなるタンパク質 (タンパク質3A) のニトロ化合物応答性から著しく低減しない限り、特に制限されない。タンパク質3Bのニトロ化合物応答性は、タンパク質3Aのニトロ化合物応答性100%に対して、例えば50%以上、好ましくは60%以上、より好ましくは70%以上、さらに好ましくは80%以上、よりさらに好ましくは90%以上である。この観点から、アミノ酸配列3Bのアミノ酸配列3Aに対する同一性は、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、よりさらに好ましくは97%以上、特に好ましくは99%以上であり、また100%未満である。

[0073] アミノ酸配列3Bは、好ましくは、下記 (3B') に記載のアミノ酸配列：

(3B') アミノ酸配列3Aに対して1若しくは複数個のアミノ酸が変異したアミノ酸配列3B'、である。

[0074] アミノ酸配列3B'において、「複数個」とは、例えば2~20個、好ましくは2~10個、より好ましくは2~5個、さらに好ましくは2~3個、よりさらに好ましくは2個である。

- [0075] アミノ酸配列3Bのアミノ酸配列3Aに対するアミノ酸変異は、例えば置換、欠失、付加、挿入等が挙げられ、好ましくは置換が挙げられ、中でもより好ましくは保存的置換が挙げられる。
- [0076] アミノ酸配列3Bは、好ましくは昆虫由来の嗅覚受容体のアミノ酸配列である。昆虫由来の嗅覚受容体については、上記「2-1. アミノ酸配列1C」における定義と同様である。
- [0077] 変異3aは、アミノ酸配列3AにおけるS114、A120、H162、V186、V352、及びS368からなるアミノ酸群の置換3ax又はアミノ酸配列3Bにおける置換3axに対応する置換3ay、である。「対応する置換」については、上記「2-1. アミノ酸配列1C」における定義と同様である。
- [0078] 変異3aにおけるS114又はそれに対応するアミノ酸の変異後のアミノ酸は、脂肪族アミノ酸であることが好ましい。脂肪族アミノ酸としては、例えばアラニン、グリシン、バリン、イソロイシン、ロイシン等が挙げられ、これらの中でも特に好ましくはアラニンが挙げられる。
- [0079] 変異3aにおけるA120又はそれに対応するアミノ酸の変異後のアミノ酸は、酸性アミノ酸であることが好ましい。酸性アミノ酸としては、例えばアスパラギン酸、グルタミン酸等が挙げられ、これらの中でも特に好ましくはグルタミン酸が挙げられる。
- [0080] 変異3aにおけるH162又はそれに対応するアミノ酸の変異後のアミノ酸は、芳香族アミノ酸であることが好ましい。芳香族アミノ酸としては、例えばフェニルアラニン、チロシン、トリプトファン等が挙げられ、これらの中でも特に好ましくはチロシンが挙げられる。
- [0081] 変異3aにおけるV186又はそれに対応するアミノ酸の変異後のアミノ酸は、脂肪族アミノ酸であることが好ましい。脂肪族アミノ酸としては、例えばアラニン、グリシン、バリン、イソロイシン、ロイシン等が挙げられ、これらの中でも特に好ましくはアラニンが挙げられる。
- [0082] 変異3aにおけるV352又はそれに対応するアミノ酸の変異後のアミノ酸は、含硫アミノ酸であることが好ましい。含硫アミノ酸としては、例えばメチオ

ニン、システイン等が挙げられ、これらの中でも特に好ましくはメチオニンが挙げられる。

- [0083] 変異3aにおけるS368又はそれに対応するアミノ酸の変異後のアミノ酸は、プロリンであることが好ましい。
- [0084] 変異3bは、第3細胞外ループから第3細胞内ループまでの領域（すなわち、第3細胞外ループ、第6膜貫通ドメイン、及び第3細胞内ループからなる領域）における荷電アミノ酸の非荷電アミノ酸への置換、である。第3細胞外ループは、アミノ酸配列3Aにおいては、N末端から211番目のアミノ酸から279番目のアミノ酸までの69アミノ酸の領域である。第6膜貫通ドメインは、アミノ酸配列3Aにおいては、N末端から280番目のアミノ酸から302番目のアミノ酸までの23アミノ酸の領域である。第3細胞内ループは、アミノ酸配列3Aにおいては、N末端から303番目のアミノ酸から378番目のアミノ酸までの76アミノ酸の領域である。
- [0085] 荷電アミノ酸は、酸性アミノ酸及び塩基性アミノ酸であり、具体的には、リジン、アルギニン、ヒスチジン、及びアスパラギン酸、グルタミン酸である。変異3bにおいては、荷電アミノ酸の一部又は全部が非荷電アミノ酸へ置換される。非荷電アミノ酸は、荷電アミノ酸以外のアミノ酸である限り、特に制限されない。非荷電アミノ酸への置換の数は、通常、複数であり、例えば5~25以上、好ましくは6~18、より好ましくは8~14である。
- [0086] アミノ酸配列3Cは、ニトロ化合物応答性が著しく損なわれない限りにおいて、他のアミノ酸変異（例えば置換、保存的置換）を含むことができる。一例として、第7膜貫通領域において特定の変異を導入することにより、ニトロ化合物応答性をさらに高めることも可能である。他のアミノ酸変異の数は、例えば1~60個、1~20個、1~10個、1~5個である。
- [0087] アミノ酸配列3Cとして、具体的には、例えば配列番号81で示されるアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列と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、よりさらに好ましくは97%以上、特に好ましくは99%以上、また100%未満）の同一性を有するアミノ酸配列

が挙げられる。

[0088] 2-4. アミノ酸配列4C

アミノ酸配列4Cは、配列番号4に示されるアミノ酸配列4A又は前記アミノ酸配列4Aと80%以上の同一性を有するアミノ酸配列4Bが変異してなり、変異4a：前記アミノ酸配列4AにおけるM61、C104、R112、G181、V189、及びI327からなるアミノ酸群の置換4ax又は前記アミノ酸配列4Bにおける前記置換4axに対応する置換4ayを含む限り、特に制限されない。

[0089] アミノ酸配列4Aは、ガンビエハマダラカ (*Anopheles gambiae*) が内在的に発現する（固有に有する）嗅覚受容体15のアミノ酸配列である。

[0090] アミノ酸配列4Bは、該配列に変異4aが導入されてなる配列からなるタンパク質（タンパク質4B）のニトロ化合物応答性が、アミノ酸配列4Aに変異4aが導入されてなる配列からなるタンパク質（タンパク質4A）のニトロ化合物応答性から著しく低減しない限り、特に制限されない。タンパク質4Bのニトロ化合物応答性は、タンパク質4Aのニトロ化合物応答性100%に対して、例えば50%以上、好ましくは60%以上、より好ましくは70%以上、さらに好ましくは80%以上、よりさらに好ましくは90%以上である。この観点から、アミノ酸配列4Bのアミノ酸配列4Aに対する同一性は、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、よりさらに好ましくは97%以上、特に好ましくは99%以上であり、また100%未満である。

[0091] アミノ酸配列4Bは、好ましくは、下記（4B'）に記載のアミノ酸配列：

（4B'）アミノ酸配列4Aに対して1若しくは複数個のアミノ酸が変異したアミノ酸配列4B'、である。

[0092] アミノ酸配列4B'において、「複数個」とは、例えば2~20個、好ましくは2~10個、より好ましくは2~5個、さらに好ましくは2~3個、よりさらに好ましくは2個である。

[0093] アミノ酸配列4Bのアミノ酸配列4Aに対するアミノ酸変異は、例えば置換、欠失、付加、挿入等が挙げられ、好ましくは置換が挙げられ、中でもより好ましくは保存的置換が挙げられる。

- [0094] アミノ酸配列4Bは、好ましくは昆虫由来の嗅覚受容体のアミノ酸配列である。昆虫由来の嗅覚受容体については、上記「2-1. アミノ酸配列1C」における定義と同様である。
- [0095] 変異4aは、アミノ酸配列4AにおけるM61、C104、R112、G181、V189、及びI327からなるアミノ酸群の置換4ax又はアミノ酸配列4Bにおける置換4axに対応する置換4ay、である。「対応する置換」については、上記「2-1. アミノ酸配列1C」における定義と同様である。
- [0096] 変異4aにおけるM61又はそれに対応するアミノ酸の変異後のアミノ酸は、親水性中性アミノ酸であることが好ましい。親水性中性アミノ酸としては、例えばセリン、トレオニン、アスパラギン、グルタミン等が挙げられ、これらの中でも特に好ましくはトレオニンが挙げられる。
- [0097] 変異4aにおけるC104又はそれに対応するアミノ酸の変異後のアミノ酸は、塩基性アミノ酸であることが好ましい。塩基性アミノ酸としては、例えばリジン、アルギニン、ヒスチジン等が挙げられ、これらの中でも特に好ましくはアルギニンが挙げられる。
- [0098] 変異4aにおけるR112又はそれに対応するアミノ酸の変異後のアミノ酸は、親水性中性アミノ酸であることが好ましい。親水性中性アミノ酸としては、例えばセリン、トレオニン、アスパラギン、グルタミン等が挙げられ、これらの中でも特に好ましくはグルタミンが挙げられる。
- [0099] 変異4aにおけるG181又はそれに対応するアミノ酸の変異後のアミノ酸は、脂肪族アミノ酸であることが好ましい。脂肪族アミノ酸としては、例えばアラニン、グリシン、バリン、イソロイシン、ロイシン等が挙げられ、これらの中でも特に好ましくはアラニンが挙げられる。
- [0100] 変異4aにおけるV189又はそれに対応するアミノ酸の変異後のアミノ酸は、分岐鎖アミノ酸であることが好ましい。分岐鎖アミノ酸としては、例えばバリン、イソロイシン、ロイシン等が挙げられ、これらの中でも特に好ましくはイソロイシンが挙げられる。
- [0101] 変異4aにおけるI327又はそれに対応するアミノ酸の変異後のアミノ酸は、

分岐鎖アミノ酸であることが好ましい。分岐鎖アミノ酸としては、例えばバリン、イソロイシン、ロイシン等が挙げられ、これらの中でも特に好ましくはバリンが挙げられる。

[0102] アミノ酸配列4Cは、ニトロ化合物応答性が著しく損なわれない限りにおいて、他のアミノ酸変異（例えば置換、保存的置換）を含むことができる。一例として、第7膜貫通領域において特定の変異を導入することにより、ニトロ化合物応答性をさらに高めることも可能である。他のアミノ酸変異の数は、例えば1~50個、1~20個、1~10個、1~5個である。

[0103] アミノ酸配列4Cとして、具体的には、例えば配列番号83で示されるアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列と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、よりさらに好ましくは97%以上、特に好ましくは99%以上、また100%未満）の同一性を有するアミノ酸配列が挙げられる。

[0104] 2-5. アミノ酸配列5C

アミノ酸配列5Cは、配列番号5に示されるアミノ酸配列5A又は前記アミノ酸配列5Aと80%以上の同一性を有するアミノ酸配列5Bが変異してなり、変異5a：前記アミノ酸配列5AにおけるL178のアミノ酸の置換5ax又は前記アミノ酸配列5Bにおける前記置換5axに対応する置換5ayを含む限り、特に制限されない。

[0105] アミノ酸配列5Aは、ネッタイシマカ (*Aedes aegypti*) が内在的に発現する（固有に有する）嗅覚受容体4のアミノ酸配列である。

[0106] アミノ酸配列5Bは、該配列に変異5aが導入されてなる配列からなるタンパク質（タンパク質5B）のニトロ化合物応答性が、アミノ酸配列5Aに変異5aが導入されてなる配列からなるタンパク質（タンパク質5A）のニトロ化合物応答性から著しく低減しない限り、特に制限されない。タンパク質5Bのニトロ化合物応答性は、タンパク質5Aのニトロ化合物応答性100%に対して、例えば50%以上、好ましくは60%以上、より好ましくは70%以上、さらに好ましくは80%以上、よりさらに好ましくは90%以上である。この観点から、アミノ

酸配列5Bのアミノ酸配列5Aに対する同一性は、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、よりさらに好ましくは97%以上、特に好ましくは99%以上であり、また100%未満である。

[0107] アミノ酸配列5Bは、好ましくは、下記（5B'）に記載のアミノ酸配列：

（5B'）アミノ酸配列5Aに対して1若しくは複数個のアミノ酸が変異したアミノ酸配列5B'、である。

[0108] アミノ酸配列5B'において、「複数個」とは、例えば2~20個、好ましくは2~10個、より好ましくは2~5個、さらに好ましくは2~3個、よりさらに好ましくは2個である。

[0109] アミノ酸配列5Bのアミノ酸配列5Aに対するアミノ酸変異は、例えば置換、欠失、付加、挿入等が挙げられ、好ましくは置換が挙げられ、中でもより好ましくは保存的置換が挙げられる。

[0110] アミノ酸配列5Bは、好ましくは昆虫由来の嗅覚受容体のアミノ酸配列である。昆虫由来の嗅覚受容体については、上記「2-1. アミノ酸配列1C」における定義と同様である。

[0111] 変異5aは、アミノ酸配列5AにおけるL178のアミノ酸の置換5ax又はアミノ酸配列5Bにおける置換5axに対応する置換5ay、である。「対応する置換」については、上記「2-1. アミノ酸配列1C」における定義と同様である。

[0112] 変異5aにおけるL178又はそれに対応するアミノ酸の変異後のアミノ酸は、プロリンであることが好ましい。

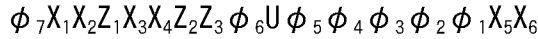
[0113] アミノ酸配列5Cは、ニトロ化合物応答性が著しく損なわれない限りにおいて、他のアミノ酸変異（例えば置換、保存的置換）を含むことができる。一例として、第7膜貫通領域において特定の変異を導入することにより、ニトロ化合物応答性をさらに高めることも可能である。他のアミノ酸変異の数は、例えば1~50個、1~20個、1~10個、1~5個である。

[0114] アミノ酸配列5Cとして、具体的には、例えば配列番号85で示されるアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列と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、よりさらに好ましくは97%以上

、特に好ましくは99%以上、また100%未満)の同一性を有するアミノ酸配列が挙げられる。

[0115] 2-6. タンパク質

本開示の嗅覚受容体タンパク質は、その一態様において、対応する野生型嗅覚受容体タンパク質中の一般式(1)：



[式中、 $X_1 \sim X_6$ 及び $Z_1 \sim Z_3$ は野生型昆虫嗅覚受容体のアミノ酸配列に由来するアミノ酸を示し、 ϕ_1 は疎水性アミノ酸を示し、 $\phi_2 \sim \phi_7$ はそれぞれ独立して無電荷極性アミノ酸又は疎水性アミノ酸を示し、Uは無電荷極性アミノ酸を示す。]

で示されるアミノ酸配列Aが変異してなるアミノ酸配列Bを含み、

下記条件1~3：

(条件1) 前記アミノ酸配列Bにおいて、 X_3 及び/又は X_4 が置換しており、 X_3 が分岐鎖アミノ酸であり且つ/或いは X_4 が無電荷極性アミノ酸であること、

(条件2) 前記アミノ酸配列Aにおいて X_5 及び X_6 が共に正電荷極性アミノ酸である場合に、前記アミノ酸配列Bにおいて、 X_6 が正電荷極性アミノ酸以外のアミノ酸であること、及び(条件3) 前記アミノ酸配列Aにおいて X_1 及び X_2 の一方又は両方が正電荷極性アミノ酸である場合に、前記アミノ酸配列Bにおいて、 X_1 及び/又は X_2 が置換しており、 X_1 が無電荷極性アミノ酸であり且つ/或いは X_2 が疎水性アミノ酸であること、

からなる群より選択される少なくとも1種の条件を満たすことができる。

[0116] これにより、ニトロ化合物応答性の向上を図ることができる。なお、「対応する野生型嗅覚受容体」とは、アミノ酸配列1A~5Aのいずれかからなる嗅覚受容体を意味する。前記一般式(1)で示されるアミノ酸配列Aは、第7膜貫通領域に含まれていてもよい。

[0117] 本開示の嗅覚受容体タンパク質は、ニトロ化合物応答性が著しく損なわれない限りにおいて、アミノ酸配列1C~5C以外の他のアミノ酸配列、例えばタンパク質タグ、蛍光タンパク質、発光タンパク質、シグナル配列等のタンパ

ク質又はペプチドが付加されたものであってもよい。タンパク質タグとしては、例えばビオチン、Hisタグ、FLAGタグ、Haloタグ、MBPタグ、HAタグ、Mycタグ、V5タグ、PAタグ等が挙げられる。

[0118] 本開示の嗅覚受容体タンパク質は、ニトロ化合物応答性が著しく損なわれない限りにおいて、化学修飾されたものであってもよい。

[0119] 本開示の嗅覚受容体タンパク質は、C末端がカルボキシル基 ($-COOH$)、カルボキシレート ($-COO^-$)、アミド ($-CONH_2$) またはエステル ($-COOR$) の何れであってもよい。

[0120] ここでエステルにおけるRとしては、例えば、メチル、エチル、*n*-プロピル、イソプロピル、*n*-ブチルなどの C_{1-6} アルキル基；例えば、シクロペンチル、シクロヘキシルなどの C_{3-8} シクロアルキル基；例えば、フェニル、 α -ナフチルなどの C_{6-12} アリール基；例えば、ベンジル、フェネチルなどのフェニル- C_{1-2} アルキル基； α -ナフチルメチルなどの α -ナフチル- C_{1-2} アルキル基などの C_{7-14} アラルキル基；ピバロイルオキシメチル基などが用いられる。

[0121] 本開示の嗅覚受容体タンパク質は、C末端以外のカルボキシル基（またはカルボキシレート）が、アミド化またはエステル化されていてもよい。この場合のエステルとしては、例えば上記したC末端のエステルなどが用いられる。

[0122] さらに、本開示の嗅覚受容体タンパク質には、N末端のアミノ酸残基のアミノ基が保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などの C_{1-6} アルカノイルなどの C_{1-6} アシル基など）で保護されているもの、生体内で切断されて生成し得るN末端のグルタミン残基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基（例えば-OH、-SH、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など）が適当な保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などの C_{1-6} アルカノイル基などの C_{1-6} アシル基など）で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖蛋白質などの複合蛋白質なども包含される。

[0123] 本開示の嗅覚受容体タンパク質は、酸または塩基との塩の形態であってもよい。塩は、特に限定されず、酸性塩、塩基性塩のいずれも採用することが

できる。例えば酸性塩の例としては、塩酸塩、臭化水素酸塩、硫酸塩、硝酸塩、リン酸塩等の無機酸塩； 酢酸塩、プロピオン酸塩、酒石酸塩、フマル酸塩、マレイン酸塩、リンゴ酸塩、クエン酸塩、メタンスルホン酸塩、パラトルエンスルホン酸塩等の有機酸塩； アスパラギン酸塩、グルタミン酸塩等のアミノ酸塩等が挙げられる。また、塩基性塩の例として、ナトリウム塩、カリウム塩等のアルカリ金属塩； カルシウム塩、マグネシウム塩等のアルカリ土類金属塩等が挙げられる。

[0124] 本開示の嗅覚受容体タンパク質は、溶媒和物の形態であってもよい。溶媒は、特に限定されず、例えば水、エタノール、グリセロール、酢酸等が挙げられる。

[0125] 本開示の嗅覚受容体タンパク質は、公知の遺伝子工学的手法に従って容易に製造することができる。例えば、PCR、制限酵素切断、DNA連結技術、*in vitro*転写・翻訳技術、リコンビナントタンパク質作製技術等を利用して製造することができる。

[0126] 3. ポリヌクレオチド、細胞、非ヒト動物

本開示は、その一態様において、本開示の嗅覚受容体タンパク質のコード配列を含む、ポリヌクレオチド（本明細書において、「本開示のポリヌクレオチド」と示すこともある。）、本開示のポリヌクレオチドを含む、細胞（本明細書において、「本開示の細胞」と示すこともある。）、本開示の細胞を含む、非ヒト動物（本明細書において、「本開示の非ヒト動物」と示すこともある。）に関する。以下に、これらについて説明する。

[0127] 本開示の嗅覚受容体タンパク質のコード配列は、本開示の嗅覚受容体タンパク質をコードする塩基配列からなるポリヌクレオチドである限り、特に制限されない。

[0128] 本開示のポリヌクレオチドは、その一態様において、本開示の嗅覚受容体タンパク質の発現カセットを含む。

[0129] 本開示の嗅覚受容体タンパク質の発現カセットは、細胞内で本開示の嗅覚受容体タンパク質を発現可能なポリヌクレオチドである限り特に制限されな

い。本開示の嗅覚受容体タンパク質の発現カセットの典型例としては、プロモーター、及びそのプロモーターの制御下に配置された本開示の嗅覚受容体タンパク質のコード配列を含むポリヌクレオチドが挙げられる。

[0130] 本開示の嗅覚受容体タンパク質の発現カセットに含まれるプロモーターとしては、特に制限されず、対象細胞に応じて適宜選択することができる。プロモーターとしては、例えばpol II系プロモーターを各種使用することができる。pol II系プロモーターとしては、特に制限されないが、例えばCMVプロモーター、EF1プロモーター、SV40プロモーター、MSCVプロモーター等が挙げられる。その他にも、プロモーターとして、例えばtrcやtac等のトリプトファンプロモーター、lacプロモーター、T7プロモーター、T5プロモーター、T3プロモーター、SP6プロモーター、アラビノース誘導プロモーター、コールドショックプロモーター、テトラサイクリン誘導性プロモーター等が挙げられる。

[0131] 本開示の嗅覚受容体タンパク質の発現カセットは、必要に応じて、他のエレメント（例えば、マルチクローニングサイト（MCS）、薬剤耐性遺伝子、複製起点、エンハンサー配列、リプレッサー配列、インスレーター配列、レポータータンパク質（例えば、蛍光タンパク質等）コード配列、薬剤耐性遺伝子コード配列などが挙げられる。）を含んでいてもよい。

[0132] 本開示のポリヌクレオチドは、ベクターの形態であることができる。使用目的（クローニング、タンパク質の発現）に応じて、また宿主細胞の種類を考慮して適当なベクターが選択される。大腸菌を宿主とするベクターとしてはM13ファージ又はその改変体、 λ ファージ又はその改変体、pBR322又はその改変体（pB325、pAT153、pUC8など）等、酵母を宿主とするベクターとしてはpYepSec1、pMFA、pYES2、pPIC3.5K等、昆虫細胞を宿主とするベクターとしてはpAc、pVL等、哺乳類細胞を宿主とするベクターとしてはpcDNA、pCDM8、pMT2PC等を例示することができる。

[0133] 本開示の細胞は、本開示のポリヌクレオチドを含む限り特に制限されない。細胞としては、例えば、Escherichia coli K12等の大腸菌、Bacillus subt

ilis MI114等のバチルス属細菌、Saccharomyces cerevisiae AH22等の酵母、Spodoptera frugiperda 由来の Sf細胞系もしくはTrichoplusia ni由来のHighFive細胞系、嗅神経細胞等の昆虫細胞、COS7細胞等の動物細胞等を挙げることができる。動物細胞としては、好ましくは、哺乳動物由来の培養細胞、具体的には、COS7細胞、CHO細胞、HEK293細胞、HEK293FT細胞、HeLa細胞、PC12細胞、N1E-115細胞、SH-SY5Y細胞等が挙げられる。

[0134] 本開示の細胞は、後述のニトロ化合物検出用途にそのまま使用できるという観点から、昆虫の嗅覚受容体共受容体のコード配列を含むことが好ましい。昆虫の嗅覚受容体共受容体は、嗅覚受容体と同様に7回膜貫通構造を有する膜タンパク質であるものの、それ自身は匂い物質を認識せず、嗅覚受容体とヘテロ複合体を形成して機能する。嗅覚受容体と嗅覚受容体共受容体とから構成されるヘテロ複合体である嗅覚受容体複合体は、匂い物質で活性化されるイオンチャンネル活性が備わっており、活性化されるとナトリウムイオン (Na^+)、カルシウムイオン (Ca^{2+}) 等の陽イオンを細胞内に流入させる。

[0135] 同様の観点から、本開示の細胞は、嗅覚受容体が応答した場合に細胞内に流入するイオン（カルシウムイオン等）により発色又は発光するタンパク質のコード配列を含むことが好ましい。このようなタンパク質としては、イクオリン、Yellow Cameleon (YC)、GCaMP等が挙げられる。或いは、本開示の細胞は、カルシウムイオン依存性蛍光色素（例えばFura-2、Fluo-3、Fluo-4等）を含むことが好ましい。

[0136] 同様の観点から、本開示の細胞は、本開示の嗅覚受容体タンパク質を含む、すなわち、本開示の細胞においては本開示の嗅覚受容体タンパク質が発現している。この場合、本開示の嗅覚受容体タンパク質は、7回膜貫通構造を有するので、膜タンパク質として、細胞膜上に配置される。

[0137] 本開示の非ヒト動物は、本開示の細胞を含む限り特に制限されない。非ヒト動物としては、特に制限されないが、後述のニトロ化合物検出用途に好適であるという観点から、昆虫が好ましい。昆虫については、上記「2-1. アミノ酸配列1C」における説明と同様である。また、同様の観点から、本開示の

非ヒト動物における本開示の細胞は、嗅神経細胞を含むことが好ましい。

[0138] 4. 用途

本開示の嗅覚受容体タンパク質は、ニトロ化合物に応答して、細胞内に陽イオン（ナトリウムイオン (Na^+)、カルシウムイオン (Ca^{2+}) 等) を流入させる活性を有する。この陽イオンを検出することにより、或いはこの陽イオンの流入により惹起される嗅神経細胞活性化に基づく行動変化を検知することにより、ニトロ化合物を検出することができる。このため、本開示の嗅覚受容体タンパク質は、ニトロ化合物検出素子として利用することができる。

[0139] 本開示は、その一態様において、本開示の嗅覚受容体タンパク質からなるニトロ化合物検出素子（本開示の検出素子）、さらには本開示の検出素子を含む細胞、本開示の検出素子を含む脂質二重膜（人工細胞膜）又は該細胞を含む非ヒト動物を備える、ニトロ化合物検出センサ（本開示の検出センサ）、に関する。

[0140] ニトロ化合物は、ニトロ基を含む化合物である限り、特に制限されない。ニトロ化合物として、好ましくはベンゼン環にニトロ基が直接連結してなる構造を含む化合物、ニトロ基を2つ以上含む化合物等が挙げられる。ニトロ化合物の具体例としては、2-ニトロトルエン、3-ニトロトルエン、4-ニトロトルエン、2,3-ジニトロトルエン、2,4-ジニトロトルエン、2,6-ジニトロトルエン、4-アミノ-2,6-ジニトロトルエン、3-トリフルオロメチル-4-ニトロフェノール、ニトロアニリン、トリニトロトルエン、トリメチレントリニトロアミン、四硝酸ペンタエリスリトール、ピクリン酸、ニトログリセリン、2,3-ジメチル-2,3-ジニトロブタン等が挙げられる。

[0141] 細胞、脂質二重膜、又は非ヒト動物を利用した化学物質検出センサは、既に公知であり、その具体的な構成は、例えば特許文献1、特許文献2、特許文献3等に記載の構成を採用することができる。本開示の細胞又は脂質二重膜を備えるニトロ化合物検出センサは、例えば、本開示の細胞又は脂質二重膜を保持する容器、本開示の細胞におけるニトロ化合物応答（例えば光）を検出すると信号を出力するセンサ、及び前記信号に基づいてニトロ化合物を

検出する判定器を備える。本開示の非ヒト動物を備えるニトロ化合物検出センサは、例えば、本開示の非ヒト動物の動作を検知する検知部（例えば動体センサ、振動センサ、音センサ等）を備える。

実施例

[0142] 以下に、実施例に基づいて本発明の一態様を詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例によって限定されるものではない。

[0143] 以下の実施例において、ORは嗅覚受容体 (Odorant receptor) を示し、Orcは嗅覚受容体共受容体 (Odorant receptor co-receptor) を示し、Agはガンビエハマダラカ (*Anopheles gambiae*) を示し、Aaはネツタイシマカ (*Aedes aegypti*) を示す。

[0144] 以下の実施例で使用した野生型嗅覚受容体遺伝子は以下の通りである。

[0145] [表1]

由来生物名	野生型遺伝子	塩基配列: 配列番号	アミノ酸配列: 配列番号	Accession No.
<i>Anopheles gambiae</i>	AgOR6	配列番号 8	配列番号 3	XM_316227.4
<i>Anopheles gambiae</i>	AgOR15	配列番号 9	配列番号 4	XM_310073.1
<i>Anopheles gambiae</i>	AgOR28	配列番号 6	配列番号 1	XM_312203.1
<i>Anopheles gambiae</i>	AgOR47	配列番号 7	配列番号 2	XM_310064.1
<i>Aedes aegypti</i>	AaOR4 タイプ 1	配列番号 10	配列番号 5	NM_001358193.1
<i>Aedes aegypti</i>	AaOR4 タイプ 2	配列番号 86	配列番号 85	BK006140.1

[0146] 試験例1. AgOR28のニトロ化合物応答性の測定

嗅覚受容体（野生型AgOR28及び変異型AgOR28）のニトロ化合物に対する応答活性を測定した。

[0147] 試験例1-1. 発現プラスミドの作製

<比較例1. 野生型AgOR28発現プラスミドの作製>

いずれか一方のDNA鎖に、野生型AgOR28（アミノ酸配列：配列番号1）のコード配列（塩基配列：配列番号6）を有する二本鎖DNAを合成して、pcDNA3.1に導入して、野生型AgOR28発現プラスミド（pcDNA3.1-AgOR28）を得た。

[0148] <比較例2. 変異型AgOR28（T25K変異）発現プラスミドの作製>

野生型Ag0R28のアミノ酸配列において25番目のアミノ酸残基であるトレオニンがリジンに変異した変異型Ag0R28 (T25K変異) (アミノ酸配列: 配列番号11) のコード配列 (塩基配列: 配列番号12) を含むプラスミド (pcDNA3.1) を、以下のように作製した。

[0149] 野生型Ag0R28のアミノ酸配列において25番目のアミノ酸残基であるトレオニンがリジンに変換するように設計したPCRプライマー (CAGAGGCATGGCCAAGAA GATCCAGAACAGC (配列番号13)、GCTGTTCTGGATCTTCTTGCCATGCCTCTG (配列番号14)) を合成した。これらのプライマーを用いて、pcDNA3.1-Ag0R28を鋳型とするPCR増幅を行った。PCR反応は、KOD -Plus- Neo (TOYOBO) を用いて行い、反応液の組成は、添付のプロトコルにしたがって、1 x PCR buffer for KOD -Plus- Neo、0.2 mM dNTPs、1.5 mM MgSO₄、0.2 μM primer、1 U KOD -Plus- Neo DNA polymeraseで調製し、最終液量を50 μLとした。反応サイクルを、プレ変性 95°C 30秒の後、変性 95°C 30秒、アニーリング55 °C 1分、伸長反応 68°C 10分を1サイクルとする反応を16サイクル行った。得られたPCR産物20 μLにDpnI 0.4 μLを加え、37°Cで2時間処理した後に、大腸菌 (DH5α) にトランスフォームした。トランスフォーム後の大腸菌を、アンピシリンを添加済みのLBプレートに播種して、37°Cで培養してコロニーを形成させた。コロニーを2つ選択し、再度LB液体培地で培養した。その後、それらが保持するプラスミドの塩基配列を決定し、変異型Ag0R28 (T25K変異) 発現プラスミドを得た。

[0150] <比較例3. 変異型Ag0R28 (P31T変異) 発現プラスミドの作製>

野生型Ag0R28のアミノ酸配列において31番目のアミノ酸残基であるプロリンがトレオニンに変異した変異型Ag0R28 (P31T変異) (アミノ酸配列: 配列番号15) のコード配列 (塩基配列: 配列番号16) を含むプラスミド (pcDNA3.1) を、作製した。具体的には、PCRプライマーとして、プライマーF: CAGATC CAGAACAGCACCATCGACCTGTACGTG (配列番号17) 及びプライマーR: CACGTACAGGT CGATGGTGTCTTCTGGATCTG (配列番号18) を使用する以外は、比較例2と同様にして作製した。

[0151] <比較例4. 変異型AgOR28 (T25K-P31T 2重変異) 発現プラスミドの作製>
野生型AgOR28のアミノ酸配列において25番目のアミノ酸残基であるトレオニンがリジンに変異し、31番目のアミノ酸残基であるプロリンがトレオニンに変異した変異型AgOR28 (T25K、P31T 2重変異) (アミノ酸配列：配列番号19) のコード配列 (塩基配列：配列番号20) を含むプラスミド (pcDNA3.1) を、作製した。具体的には、PCRの鋳型として変異型AgOR28 (T25K変異) 発現プラスミド (比較例2) を使用する以外は、比較例3と同様にして作製した。

[0152] <実施例1. 変異型AgOR28 (22a, a欠失) 発現プラスミドの作製>
野生型AgOR28のアミノ酸配列において52番目から73番目までの22アミノ酸を連続して欠失した変異型AgOR28 (22a, a欠失) (アミノ酸配列：配列番号21) のコード配列 (塩基配列：配列番号22) を含むプラスミド (pcDNA3.1) を、作製した。具体的には、PCRプライマーとして、プライマーF1：TACCGAGCTCGGATCATGGCCAGACTGGTGCTG (配列番号23)、プライマーR1：GATATCTGCAGAATT TACTGCTGGTTGATGGTC (配列番号24)、プライマーF2：GCCAGCCTGTGCGTGCCCCA GTTCACCTACCTGGTGGTGGACACCAAG (配列番号90)、プライマーR2：CACCAGGTAGG TGAAGTGGGGCACGCACAGGCTGGCGATAGGGATG (配列番号91) を合成した。野生型AgOR28を鋳型として、プライマーF1とプライマーR2を用いたPCRとプライマーF2とプライマーR1を用いたPCRを実施し、それぞれの増幅産物をアガロースゲルで電気泳動し精製した。精製産物を1:1のモル比で混合し、95℃ 5分間後、室温で5分間静置した。この混合液10 μLを含む最終液量50 μLの反応液 (1U KOD -Plus- Neo DNA polymerase (TOYOBO)、1.5mM MgSO4 (TOYOBO)、0.2mM dNTPs Mix (TOYOBO)、1 x PCR Buffer for KOD plus neo PCR (TOYOBO)) を調製し、94℃ 2分の後、95℃ 30秒、63℃ 30秒、68℃ 1分50秒を1サイクルとする反応を2サイクル行った。この反応液5 μLをとり、プライマーF1とプライマーR1を用いたPCRを実施した。PCR反応液は、1 x PCR buffer for KOD -Plus- Neo、0.2 mM dNTPs、1.5 mM MgSO4、0.2 μM primer、1 U KOD -Plus- Neo DNA polymeraseの組成で調製し、最終液量を50 μLとし、プレ変性 94℃ 2分の後、変性 98℃ 10秒、アニーリング63℃ 30秒、伸長反応 68℃ 1分50秒を1サ

イクルとする反応を30サイクル行った。得られたPCR増幅断片と、BamHIおよびEcoRIによって切断したpcDNA3.1発現プラスミド断片を、In-Fusion HD Cloning Kit (タカラバイオ株式会社) を用いて、添付のプロトコルに則ってIn-Fusion反応を行って連結した。反応終了後、In-Fusion反応液を用いて、大腸菌 (DH5 α) にトランスフォームした。トランスフォーム後の大腸菌を、アンピシリンを添加済みのLBプレートに播種して、37°Cで培養してコロニーを形成させた。コロニーを2つ選択し、再度LB液体培地で培養した。その後、それらが保持するプラスミドの塩基配列を決定し、発現プラスミドを得た。

[0153] なお、野生型AgOR28のアミノ酸配列をTMPred (K. Hofmann, W. Stoffel, T Mbase - a database of membrane spanning proteins segments, Biol. Chem. Hoppe-Seyler, 374 (1993), p. 166, https://embnet.vital-it.ch/software/TMPRED_form.html) を用いて構造予測 (条件はデフォルト) したところ、55番目から84番目のアミノ酸領域は第1細胞外ループであると予測された。このことから、欠失領域は、第1細胞外ループであることが分かった。

[0154] <実施例2. 変異型AgOR28 (T25K変異、22a.a欠失) 発現プラスミドの作製> 野生型AgOR28のアミノ酸配列において25番目のアミノ酸残基であるトレオニンがリジンに変異し、且つ52番目から73番目までの22アミノ酸を連続して欠失した変異型AgOR28 (T25K変異、22a.a欠失) (アミノ酸配列: 配列番号25) のコード配列 (塩基配列: 配列番号26) を含むプラスミド (pcDNA3.1) を、作製した。具体的には、PCRの鋳型として変異型AgOR28 (22a.a欠失) 発現プラスミド (実施例1) を使用する以外は、比較例2と同様にして作製した。

[0155] <実施例3. 変異型AgOR28 (P31T変異、22a.a欠失) 発現プラスミドの作製> 野生型AgOR28のアミノ酸配列において31番目のアミノ酸残基であるプロリンがトレオニンに変異し、且つ52番目から73番目までの22アミノ酸を連続して欠失した変異型AgOR28 (P31T変異、22a.a欠失) (アミノ酸配列: 配列番号27) のコード配列 (塩基配列: 配列番号28) を含むプラスミド (pcDNA3.1) を、作製した。具体的には、PCRの鋳型として変異型AgOR28 (22a.a欠失)

発現プラスミド（実施例1）を使用する以外は、比較例3と同様にして作製した。

[0156] <実施例4. 変異型AgOR28（T25K-P31T 2重変異、22a, a欠失）発現プラスミドの作製> 野生型AgOR28のアミノ酸配列において25番目のアミノ酸残基であるトレオニンがリジンに変異し、31番目のアミノ酸残基であるプロリンがトレオニンに変異し、且つ52番目から73番目までの22アミノ酸を連続して欠失した変異型AgOR28（T25K-P31T 2重変異、22a, a欠失）（アミノ酸配列：配列番号29）のコード配列（塩基配列：配列番号30）を含むプラスミド（pcDNA 3.1）を、作製した。具体的には、PCRの鋳型として変異型AgOR28（T25K変異、22a, a欠失）発現プラスミド（実施例2）を使用する以外は、比較例3と同様にして作製した。

[0157] <参考例1. キメラOrco発現プラスミドの作製>

既報（特開2018-50556号公報）に従って、ショウジョウバエ共受容体の一部とミツバチ共受容体の一部との融合タンパク質Dm（NT-TM4）AmORCO（アミノ酸配列：配列番号92）のコード配列（塩基配列：配列番号93）を含むプラスミド（pcDNA3.1）を、作製した。Dm（NT-TM4）AmORCOでは、N末端領域（NT）から第4膜貫通ドメイン（TM4）までのアミノ酸配列（そのN末端アミノ酸残基から234番目のアミノ酸残基までのアミノ酸配列）がショウジョウバエ共受容体由来（Dm（NT-TM4））であり、第2細胞内ループからC末端領域までのアミノ酸配列がミツバチ共受容体由来（Am（IC2-CT））である。

[0158] 試験例1-2. 発現プラスミドの細胞への導入

HEK293FT細胞（Invitrogen社から購入）を10cmシャーレに 3×10^6 cells / シャーレで播種し、10% FBSを含むDMEM培地（ナカライテスク社製）中で、37℃、5%CO₂条件下にて約24時間培養した。作製したいずれかの嗅覚受容体発現プラスミド1.5μgと、嗅覚受容体共受容体発現プラスミド3.0μgと、GFP-イクオリン（GAP）発現プラスミド8μgとを、12.5μLのPlus試薬及び31.25μLのリポフェクトアミンLTX（Invitrogen社製）と混合し、10分間保持した。その後、この混合液を上記細胞にトランスフェクションした。トランスフェ

クション開始4時間後に96wellプレートに 9×10^4 cells/wellで播種し、10% FBSを含むDMEM培地（ナカライテスク社製）中で、37°C、5%CO₂条件下にて約24時間培養した。これにより、嗅覚受容体発現プラスミド、嗅覚受容体共受容体発現プラスミド、及びGAP発現プラスミドがトランジェントに導入された形質転換細胞を得た。

[0159] 試験例1-3. 活性測定

GFP-イクオリン（GAP）はカルシウムイオンと結合すると、セレンテラジン等の基質の存在下で活性化されて緑色蛍光を発する。したがって、GAPを発現する細胞の細胞内カルシウムイオン濃度の上昇は直接、蛍光量の増大として現れることになるため、被検物質の添加により嗅覚受容体複合体がイオンチャンネルとして機能しているかどうかを蛍光量の変化から測定することができる。

[0160] 上記形質転換細胞の培養液を除去してAssay buffer（0.5 μMセレンテラジンh（プロメガ社製）及び0.3%のBSAを含むHanks-HEPES（20 mM pH7.4））に置換し、更に4時間、室温で静置した。次いで、Flexstation 3（Molecular devices社製）を用いて、嗅覚受容体に対応する被検物質を細胞の培養液中に添加するとともに細胞の発光量を測定した。

[0161] 本試験例では、被検物質として、2,3-ジニトロトルエン、2,6-ジニトロトルエン、又はトルエンを使用した。

[0162] 結果を図1に示す。22a. a欠失を含むハマダラカ嗅覚受容体28はニトロ化合物応答性を示し、非ニトロ化合物に対しては応答しないことが分かった。一方、当該欠失を含まないハマダラカ嗅覚受容体28はニトロ化合物応答性を示さなかった。

[0163] 試験例2. AgOR47のニトロ化合物応答性の測定

嗅覚受容体（野生型AgOR47及び変異型AgOR47）のニトロ化合物に対する応答活性を測定した。

[0164] 試験例2-1. 発現プラスミドの作製

<比較例5. 野生型AgOR47発現プラスミドの作製>

いずれか一方のDNA鎖に、野生型AgOR47（アミノ酸配列：配列番号2）のコード配列（塩基配列：配列番号7）を有する二本鎖DNAを合成して、pcDNA3.1に導入して、野生型AgOR47発現プラスミド（pcDNA3.1-AgOR47）を得た。

[0165] <比較例6. 変異型AgOR47（L71F変異）発現プラスミドの作製>

野生型AgOR47のアミノ酸配列において71番目のアミノ酸残基であるロイシンがフェニルアラニンに変異した変異型AgOR47（L71F変異）（アミノ酸配列：配列番号35）のコード配列（塩基配列：配列番号36）を含むプラスミド（pcDNA3.1）を、以下のように作製した。

[0166] 野生型AgOR47のアミノ酸配列において71番目のアミノ酸残基であるロイシンがフェニルアラニンに変換するように設計したPCRプライマー（プライマーF：CTATCGCCGAGGGCATGTTTCAGCTTCAATACCACC（配列番号37）及びプライマーR：GGTGGTATTGAAGCTGAACATGCCCTCGGCGATAG（配列番号38））を合成した。これらのプライマーを用いて、pcDNA3.1-AgOR47を鋳型とするPCR増幅を行った（反応手順、条件は定法による）。増幅後のPCR反応液をDpnIで消化した後に、大腸菌（DH5 α ）にトランスフォームした。トランスフォーム後の大腸菌を、アンピシリンを添加済みのLBプレートに播種して、37°Cで培養してコロニーを形成させた。コロニーを2つ選択し、再度LB液体培地で培養した。その後、それらが保持するプラスミドの塩基配列を決定し、変異型AgOR47（L71F変異）発現プラスミドを得た。

[0167] <比較例7. 変異型AgOR47（I134V変異）発現プラスミドの作製>

野生型AgOR47のアミノ酸配列において134番目のアミノ酸残基であるイソロイシンがバリンに変異した変異型AgOR47（I134V変異）（アミノ酸配列：配列番号39）のコード配列（塩基配列：配列番号40）を含むプラスミド（pcDNA3.1）を、作製した。具体的には、PCRプライマーとして、プライマーF：CATCTTCACCAACGGCGTCGTGTTCCCATGAC（配列番号41）及びプライマーR：GGTCATGGCGAACACGACGCCGTTGGTGAAGATG（配列番号42）を使用する以外は、比較例6と同様にして作製した。

[0168] <比較例8. 変異型AgOR47（S140G変異）発現プラスミドの作製>

野生型Ag0R47のアミノ酸配列において140番目のアミノ酸残基であるセリンがグリシンに変異した変異型Ag0R47 (S140G変異) (アミノ酸配列：配列番号43) のコード配列 (塩基配列：配列番号44) を含むプラスミド (pcDNA3.1) を、作製した。具体的には、PCRプライマーとして、プライマーF：GTGTTCCGCCATGACCGGCTCTACAATCGCCGG (配列番号45) 及びプライマーR：CCGGCGATTGTAGAGCCGGTCATGGCGAACAC (配列番号46) を使用する以外は、比較例6と同様にして作製した。

[0169] <比較例9. 変異型Ag0R47 (F147L変異) 発現プラスミドの作製>

野生型Ag0R47のアミノ酸配列において147番目のアミノ酸残基であるフェニルアラニンがロイシンに変異した変異型Ag0R47 (F147L変異) (アミノ酸配列：配列番号47) のコード配列 (塩基配列：配列番号48) を含むプラスミド (pcDNA3.1) を、作製した。具体的には、PCRプライマーとして、プライマーF：CAATCGCCGGCATGTTCTACACCTACTACACC (配列番号49) 及びプライマーR：GGTGATGAGGTGTAGAACATGCCGGCGATTG (配列番号50) を使用する以外は、比較例6と同様にして作製した。

[0170] <比較例10. 変異型Ag0R47 (D5E変異) 発現プラスミドの作製>

野生型Ag0R47のアミノ酸配列において5番目のアミノ酸残基であるアスパラギン酸がグルタミン酸に変異した変異型Ag0R47 (D5E変異) (アミノ酸配列：配列番号51) のコード配列 (塩基配列：配列番号52) を含むプラスミド (pcDNA3.1) を、作製した。具体的には、PCRプライマーとして、プライマーF：ATGGTTGTGTTCGAACCACTGGACGACCC (配列番号53) 及びプライマーR：GGGTCGTCCAGTGGTTCGAACACAACCAT (配列番号54) を使用する以外は、比較例6と同様にして作製した。

[0171] <比較例11. 変異型Ag0R47 (K235Q変異) 発現プラスミドの作製>

野生型Ag0R47のアミノ酸配列において235番目のアミノ酸残基であるリジンがグルタミンに変異した変異型Ag0R47 (K235Q変異) (アミノ酸配列：配列番号55) のコード配列 (塩基配列：配列番号56) を含むプラスミド (pcDNA3.1) を、作製した。具体的には、PCRプライマーとして、プライマーF：GATCGGA

CCC GTT GACC AGT ATACT GCAG AGCTG (配列番号57) 及びプライマーR : CAGCTCTGCAG TATACTGGTCAACGGGTCCGATC (配列番号58) を使用する以外は、比較例6と同様にして作製した。

[0172] <比較例12. 変異型AgOR47 (N241S変異) 発現プラスミドの作製>

野生型AgOR47のアミノ酸配列において241番目のアミノ酸残基であるアスパラギンがセリンに変異した変異型AgOR47 (N241S変異) (アミノ酸配列 : 配列番号59) のコード配列 (塩基配列 : 配列番号60) を含むプラスミド (pcDNA3.1) を、作製した。具体的には、PCRプライマーとして、プライマーF : GTATAC TGCAGAGCTGAGTGAAATTATCGAACTTCAC (配列番号61) 及びプライマーR : GTGAAGT TCGATAATTTCACTCAGCTCTGCAGTATAC (配列番号62) を使用する以外は、比較例6と同様にして作製した。

[0173] <実施例5. 変異型AgOR47 (L60P変異) 発現プラスミドの作製>

野生型AgOR47のアミノ酸配列において60番目のアミノ酸残基であるロイシンがプロリンに変異した変異型AgOR47 (L60P変異) (アミノ酸配列 : 配列番号31) のコード配列 (塩基配列 : 配列番号32) を含むプラスミド (pcDNA3.1) を、作製した。具体的には、PCRプライマーとして、プライマーF : CTACGAG ACAATCCCGCAGTGCTTCCGGTC (配列番号33) 及び及びプライマーR : GACCGGAAGCA CTGCGGGATTGTCTCGTAG (配列番号34)) を使用する以外は、比較例6と同様にして作製した。

[0174] <実施例6. 変異型AgOR47 (M138I変異) 発現プラスミドの作製>

野生型AgOR47のアミノ酸配列において138番目のアミノ酸残基であるメチオニンがイソロイシンに変異した変異型AgOR47 (M138I変異) (アミノ酸配列 : 配列番号63) のコード配列 (塩基配列 : 配列番号64) を含むプラスミド (pcDNA3.1) を、作製した。具体的には、PCRプライマーとして、プライマーF : GGC GTCGTGTTCCGCATCACCGGCTCTACAATC (配列番号65) 及びプライマーR : GATTGTA GAGCCGGTGATGGCGAACACGACGCC (配列番号66) を使用する以外は、比較例6と同様にして作製した。

[0175] <実施例7. 変異型AgOR47 (A152T変異) 発現プラスミドの作製>

野生型AgOR47のアミノ酸配列において152番目のアミノ酸残基であるアラニンがトレオニンに変異した変異型AgOR47 (A152T変異) (アミノ酸配列: 配列番号67) のコード配列 (塩基配列: 配列番号68) を含むプラスミド (pcDNA3.1) を、作製した。具体的には、PCRプライマーとして、プライマーF: GGAATGTTTACACCTACTACACGAAAGATTCGGAATATTCC (配列番号69) 及びプライマーR: GGAATATTCCGAATCTTTCGTGTAGTAGGTGTAACATTCC (配列番号70) を使用する以外は、比較例6と同様にして作製した。

[0176] <実施例8. 変異型AgOR47 (L60P-A152T 2重変異) 発現プラスミドの作製>

野生型AgOR47のアミノ酸配列においてL60P--A152T 2重変異を有する変異型AgOR47 (L60P-A152T 2重変異) (アミノ酸配列: 配列番号71) のコード配列 (塩基配列: 配列番号72) を含むプラスミド (pcDNA3.1) を、作製した。具体的には、まず、PCRの鋳型として変異型AgOR47 (L60P変異) 発現プラスミド (実施例5) を使用する以外は、実施例7と同様にして発現プラスミドを作製した。

[0177] <実施例9. 変異型AgOR47 (M138I-A152T 2重変異) 発現プラスミドの作製>

野生型AgOR47のアミノ酸配列においてM138I-A152T 2重変異を有する変異型AgOR47 (M138I-A152T 2重変異) (アミノ酸配列: 配列番号73) のコード配列 (塩基配列: 配列番号74) を含むプラスミド (pcDNA3.1) を、作製した。具体的には、PCRの鋳型として変異型AgOR47 (M138I変異) 発現プラスミド (実施例6) を使用する以外は、実施例7と同様にして作製した。

[0178] <実施例10. 変異型AgOR47 (L60P-M138I-A152T 3重変異) 発現プラスミドの作製>

野生型AgOR47のアミノ酸配列においてL60P-M138I-A152T 3重変異を有する変異型AgOR47 (L60P-M138I-A152T 3重変異) (アミノ酸配列: 配列番号75) のコード配列 (塩基配列: 配列番号76) を含むプラスミド (pcDNA3.1) を、作製した。具体的には、PCRの鋳型として変異型AgOR47 (L60P-A152T 2重変異) 発現プラスミド (実施例8) を使用する以外は、実施例6と同様にして作製した。

[0179] <実施例11. 変異型AgOR47 (L60P-L71F-I134V-S140G-F147L 5重変異) 発現

プラスミドの作製>

野生型Ag0R47のアミノ酸配列においてL60P-L71F-I134V-S140G-F147L 5重変異を有する変異型Ag0R47 (L60P-L71F-I134V-S140G-F147L 5重変異) (アミノ酸配列: 配列番号108) のコード配列 (塩基配列: 配列番号109) を含むプラスミド (pcDNA3.1) を、作製した。具体的には、PCRの鋳型として変異型Ag0R47 (L60P重変異) 発現プラスミド (実施例5) を鋳型として、上記比較例で使用したプライマーを使用して順次変異を導入して作製した。

[0180] <実施例12. 変異型Ag0R47 (L60P-L71F-I134V-M138I-S140G-F147L-A152T 7重変異) 発現プラスミドの作製>

野生型Ag0R47のアミノ酸配列においてL60P-L71F-I134V-M138I-S140G-F147L-A152T 7重変異を有する変異型Ag0R47 (L60P-L71F-I134V-M138I-S140G-F147L-A152T 7重変異) (アミノ酸配列: 配列番号77) のコード配列 (塩基配列: 配列番号78) を含むプラスミド (pcDNA3.1) を、作製した。具体的には、まず、PCRの鋳型として変異型Ag0R47 (L60P-L71F-I134V-S140G-F147L 5重変異) 発現プラスミド (実施例11) を鋳型として、上記実施例及び比較例で使用したプライマーを使用して順次変異を導入して作製した。

[0181] <実施例13. 変異型Ag0R47 (L60P-L71F-I134V-M138I-S140G-F147L 6重変異) 発現プラスミドの作製>

野生型Ag0R47のアミノ酸配列においてL60P-L71F-I134V-M138I-S140G-F147L 6重変異を有する変異型Ag0R47 (L60P-L71F-I134V-M138I-S140G-F147L 6重変異) (アミノ酸配列: 配列番号79) のコード配列 (塩基配列: 配列番号80) を含むプラスミド (pcDNA3.1) を、作製した。具体的には、PCRの鋳型として変異型Ag0R47 (L60P-L71F-I134V-S140G-F147L 5重変異) 発現プラスミド (実施例11) を使用して、上記実施例で使用したプライマーを使用して変異を導入して作製した。

[0182] 試験例2-2. 発現プラスミドの細胞への導入、及び活性測定

試験例1-2と同様にして発現プラスミドを細胞へ導入し、試験例1-3と同様にして活性測定した。本試験例では、被検物質として、4-アミノ-2,6-ジニト

ロトルエン、3-トリフルオロメチル-4-ニトロフェノール、2,3-ジニトロトルエン、2,6-ジニトロトルエン、又は2,3-ジメチル-2,3-ジニトロブタンを使用した。

[0183] 結果を図2～図6に示す。A61、M138、及びA152からなる群より選択される少なくとも1種のアミノ酸の置換を含むハマダラカ嗅覚受容体47はニトロ化合物応答性を示すことが分かった。一方、当該欠失を含まないハマダラカ嗅覚受容体47はニトロ化合物応答性を示さなかった。

[0184] 試験例3. AgOR6のニトロ化合物応答性の測定

嗅覚受容体（野生型AgOR6及び変異型AgOR6）のニトロ化合物に対する応答活性を測定した。

[0185] 試験例3-1. 発現プラスミドの作製

<比較例13. 野生型AgOR6発現プラスミドの作製>

いずれか一方のDNA鎖に、野生型AgOR6（アミノ酸配列：配列番号3）のコード配列（塩基配列：配列番号8）を有する二本鎖DNAを合成して、pcDNA3.1に導入して、野生型AgOR6発現プラスミド（pcDNA3.1-AgOR6）を得た。

[0186] <実施例14. 変異型AgOR6発現プラスミドの作製>

野生型AgOR6のアミノ酸配列において114番目のアミノ酸残基であるセリンがアラニンに変異し、120番目のアミノ酸残基であるアラニンがグルタミン酸に変異し、162番目のアミノ酸残基であるヒスチジンがチロシンに変異し、186番目のアミノ酸残基であるバリンがアラニンに変異し、352番目のアミノ酸残基であるバリンがメチオニンに変異し、368番目のアミノ酸残基であるセリンがプロリンに変異し、79アミノ酸領域が置換（第3細胞外ループから第3細胞内ループまでの領域における11個の荷電アミノ酸の非荷電アミノ酸への置換を含む）された変異型AgOR6（アミノ酸配列：配列番号81）のコード配列（塩基配列：配列番号82）を含むプラスミド（pcDNA3.1）を、作製した。具体的には、いずれか一方のDNA鎖に、変異型AgOR6（アミノ酸配列：配列番号81）のコード配列（塩基配列：配列番号82）を有する二本鎖DNAを合成して、pcDNA3.1に導入して、変異型AgOR6発現プラスミド（pcDNA3.1-AgOR6）を得た。

。

[0187] 試験例3-2. 発現プラスミドの細胞への導入、及び活性測定

試験例1-2と同様にして発現プラスミドを細胞へ導入し、試験例1-3と同様にして活性測定した。本試験例では、被検物質として、2-ニトロアニリンを使用した。

[0188] 結果を図7に示す。変異型ハマダラカ嗅覚受容体6はニトロ化合物応答性を示すことが分かった。一方、野生型ハマダラカ嗅覚受容体6はニトロ化合物応答性を示さなかった。

[0189] 試験例4. AgOR15のニトロ化合物応答性の測定

嗅覚受容体（野生型AgOR15及び変異型AgOR15）のニトロ化合物に対する応答活性を測定した。

[0190] 試験例4-1. 発現プラスミドの作製

<比較例14. 野生型AgOR15発現プラスミドの作製>

いずれか一方のDNA鎖に、野生型AgOR15（アミノ酸配列：配列番号4）のコード配列（塩基配列：配列番号9）を有する二本鎖DNAを合成して、pcDNA3.1に導入して、野生型AgOR15発現プラスミド（pcDNA3.1-AgOR15）を得た。

[0191] <実施例15. 変異型AgOR15発現プラスミドの作製>

野生型AgOR15のアミノ酸配列において61番目のアミノ酸残基であるメチオニンがトレオニンに変異し、104番目のアミノ酸残基であるシステインがアルギニンに変異し、112番目のアミノ酸残基であるアルギニンがグルタミンに変異し、181番目のアミノ酸残基であるグリシンがアラニンに変異し、189番目のアミノ酸残基であるバリンがイソロイシンに変異し、327番目のアミノ酸残基であるイソロイシンがバリンに変異してなる変異型AgOR15（アミノ酸配列：配列番号83）のコード配列（塩基配列：配列番号84）を含むプラスミド（pcDNA3.1）を、作製した。具体的には、野生型AgOR15発現プラスミドを鋳型にして、以下のプライマーを使用し、M61T-C104R-R112Q-G181A-V189I-I327V6重変異体を作製した。

[0192] M61T変異導入用プライマーセット

CCCGACCTTGAGATAACGATCATTGGCACCGCTG (塩基配列：配列番号94) およびCAGCG
GTGCCAATGATCGTTATCTCAAGGTCGGG (塩基配列：配列番号95) C104R変異導入
用プライマーセット

CCCAAACGGTTATCCGTGCGTCACCTCCCGCG (塩基配列：配列番号96) およびCGCGGGA
GGTGACGCACGGATAACCGTTTGGG (塩基配列：配列番号97) R112Q変異導入用プ
ライマーセット

CCTCCCGCGGTGGTCCAGCATTTGACGACCCAG (塩基配列：配列番号98) およびCTGGGT
CGTCAAATGCTGGACCACCGCGGGAGG (塩基配列：配列番号99) G181A変異導入用
プライマーセット

CAGACTCGCACCTCGGCTACGCACTACCTGATC (塩基配列：配列番号100) およびGATCA
GGTAGTGCGTAGCCGAGGTGCGAGTCTG (塩基配列：配列番号101) V189I変異導入
用プライマーセット

CTACCTGATCTTCGGTATCGTCATGACGCCTACC (塩基配列：配列番号102) およびGGTA
GGCGTCATGACGATACCGAAGATCAGGTAG (塩基配列：配列番号103) I327V変異導
入用プライマーセット

CGTGTAGCACATACCGTTTACGAAAGTGGCTGG (塩基配列：配列番号104) およびCCAGC
CACTTTCGTAAACGGTATGTGCTACACG (塩基配列：配列番号105)。

[0193] 試験例4-2. 発現プラスミドの細胞への導入、及び活性測定

試験例1-2と同様にして発現プラスミドを細胞へ導入し、試験例1-3と同様
にして活性測定した。本試験例では、被検物質として、2-ニトロアニリンを
使用した。

[0194] 結果を図8に示す。変異型ハマダラカ嗅覚受容体15はニトロ化合物応答性を
示すことが分かった。一方、野生型ハマダラカ嗅覚受容体15はニトロ化合物
応答性を示さなかった。

[0195] 試験例5. AaOR4のニトロ化合物応答性の測定

嗅覚受容体 (2種の野生型AaOR4) のニトロ化合物に対する応答活性を測定
した。

[0196] 試験例5-1. 発現プラスミドの作製

<比較例15. 野生型Aa0R4タイプ1発現プラスミドの作製>

いずれか一方のDNA鎖に、野生型Aa0R4タイプ1（アミノ酸配列：配列番号5）のコード配列（塩基配列：配列番号10）を有する二本鎖DNAを合成して、pcDNA3.1に導入して、野生型Aa0R4タイプ1発現プラスミド（pcDNA3.1- Aa0R4タイプ1）を得た。

[0197] <実施例16. 野生型Aa0R4タイプ2発現プラスミドの作製>

野生型Aa0R4タイプ1のアミノ酸配列において178番目のアミノ酸残基であるロイシンがプロリンに変異してなる野生型Aa0R4タイプ2（アミノ酸配列：配列番号85）のコード配列（塩基配列：配列番号86）を含むプラスミド（pcDNA3.1）を、作製した。具体的には、以下のようにして作製した。

[0198] 野生型Aa0R4のアミノ酸配列において178番目のアミノ酸残基であるロイシンがプロリンに変換するように設計したPCRプライマー（GGGTCAAGCTATTTCCGTACGTGATTTGGTTC（配列番号106）、GAACCAAATCACGTACGGAAATAGCTTGACCC（配列番号107））を合成した。これらのプライマーを用いて、pcDNA3.1- Aa0R4タイプ1を鋳型とするPCR増幅を行った（反応手順、条件は定法による）。増幅後のPCR反応液をDpnIで消化した後に、大腸菌（DH5 α ）にトランスフォームした。トランスフォーム後の大腸菌を、アンピシリンを添加済みのプレートに播種して、37°Cで培養してコロニーを形成させた。コロニーを2つ選択し、再度LB液体培地で培養した。その後、それらが保持するプラスミドの塩基配列を決定し、野生型Aa0R4タイプ2（L178P変異）発現プラスミドを得た。

[0199] 試験例5-2. 発現プラスミドの細胞への導入、及び活性測定

試験例1-2と同様にして発現プラスミドを細胞へ導入し、試験例1-3と同様にして活性測定した。本試験例では、被検物質として、2,4-ジニトロトルエン、4-ニトロトルエン、又はトルエンを使用した。

[0200] 結果を図9に示す。野生型Aa0R4タイプ2はニトロ化合物応答性を示すことが分かった。一方、野生型Aa0R4タイプ1はニトロ化合物応答性を示さなかった。

[0201] 試験例6. 従来技術との比較

マウス嗅覚受容体Olf256_17を導入した細胞がニトロ化合物に反応することが知られている。そのような細胞は、マウス嗅覚受容体Olf256_17、Gタンパク質 (G α 15_olf)、受容体輸送タンパク質 (RTP1S)、及びGAPをコードするプラスミドを導入することにより作製できることが知られている。そこで、本試験例では、このような細胞（マウス嗅覚受容体発現細胞）を作製し、本発明の一実施態様で得られた細胞（変異型AgOR28 (T25K変異、22a.a欠失)（実施例2）が導入された細胞（試験例1-2））と、ニトロ化合物応答性を比較した。

[0202] まず、N末端にrhoタグ及びmycタグが付加されてなるマウス嗅覚受容体Olf256_17（アミノ酸配列：配列番号87）の発現プラスミド（rho-myc-mOlf256_17/pcDNA3.1）、G α 15_olf（アミノ酸配列：配列番号88）の発現プラスミド（Ga15_olf/pBK-CMV）、及びRTPS（アミノ酸配列：配列番号89）の発現プラスミド（mRTP1S/pcDNA3.1）を常法に従って作製した。

[0203] HEK293FT細胞（Invitrogen社から購入）を10cmシャーレに 3×10^6 cells/シャーレで播種し、10% FBSを含むDMEM培地（ナカライテスク社製）中で、37℃、5%CO₂条件下にて約24時間培養した。作製したGa15_olf/pBK-CMV(1 μ g)、rho-myc-mOlf256_17/pcDNA3.1(2.5 μ g)、mRTP1S/pcDNA3.1(1 μ g)、GFP-Aequorin/pcDNA3.1(8 μ g)とを、12.5 μ LのPlus試薬及び31.25 μ LのリポフェクトアミンLTX（Invitrogen社製）と混合し、10分間保持した。その後、この混合液を上記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開始4時間後に96 wellプレートに 9×10^4 cells/wellで播種し、10%FBSを含むDMEM培地（ナカライテスク社製）中で、37℃、5%CO₂条件下にて約24時間培養した。これにより、マウス嗅覚受容体Olf256_17、Gタンパク質、および受容体輸送タンパク質発現プラスミド、及びGAP発現プラスミドがトランジェントに導入された形質転換細胞を得た（マウス嗅覚受容体発現細胞）。

[0204] 変異型AgOR28 (T25K変異、22a.a欠失)（実施例2）が導入された細胞（試験例1-2）、及び上記で得られたマウス嗅覚受容体発現細胞を用いて、試験例1-3と同様にして活性測定した。本試験例では、被検物質として、3-ニトロト

ルエンを使用した。

[0205] 結果を図10に示す。変異型AgOR28 (T25K変異、22a.a欠失) は、マウス嗅覚受容体よりも、ニトロ化合物を高感度且つ高活性に検出できることが分かった。

[0206] 試験例7. 第7膜貫通領域へのアミノ酸変異の導入

変異型AgOR28 (T25K-P31T 2重変異、22a.a欠失) (実施例4) の第7膜貫通領域においてさらにアミノ酸置換 (S368A, Q376A, R380A, S382L, S385A) が導入されてなる変異型AgOR28 (T25K-P31T-S368A-Q376A-R380A-S382L-S385A 7重変異、22a.a欠失) の発現プラスミドを、実施例4等と同様にPCRによる変異導入技術を利用して作製した。試験例1-2と同様にして発現プラスミドを細胞へ導入し、試験例1-3と同様にして活性測定した。本試験例では、被検物質として、2,3-ジニトロトルエンを使用した。

[0207] 結果を図11に示す。第7膜貫通領域における変異導入により、ニトロ化合物応答性が高まることが分かった。

請求の範囲

[請求項1]

(1) 配列番号1に示されるアミノ酸配列1A又は前記アミノ酸配列1Aと80%以上の同一性を有するアミノ酸配列1Bが変異してなり、変異1a：第1細胞外ループの一部又は全部の領域の欠失を含む、アミノ酸配列1C；

(2) 配列番号2に示されるアミノ酸配列2A又は前記アミノ酸配列2Aと80%以上の同一性を有するアミノ酸配列2Bが変異してなり、変異2a：前記アミノ酸配列2AにおけるL60、M138及びA152からなる群より選択される少なくとも1種のアミノ酸の置換2ax又は前記アミノ酸配列2Bにおける前記置換2axに対応する置換2ayを含む、アミノ酸配列2C；

(3) 配列番号3に示されるアミノ酸配列3A又は前記アミノ酸配列3Aと80%以上の同一性を有するアミノ酸配列3Bが変異してなり、変異3a：前記アミノ酸配列3AにおけるS114、A120、H162、V186、V352、及びS368からなるアミノ酸群の置換3ax又は前記アミノ酸配列3Bにおける前記置換3axに対応する置換3ay、並びに変異3b：第3細胞外ループから第3細胞内ループまでの領域における荷電アミノ酸の非荷電アミノ酸への置換を含む、アミノ酸配列3C；

(4) 配列番号4に示されるアミノ酸配列4A又は前記アミノ酸配列4Aと80%以上の同一性を有するアミノ酸配列4Bが変異してなり、変異4a：前記アミノ酸配列4AにおけるM61、C104、R112、G181、V189、及びI327からなるアミノ酸群の置換4ax又は前記アミノ酸配列4Bにおける前記置換4axに対応する置換4ayを含む、アミノ酸配列4C； 又は

(5) 配列番号5に示されるアミノ酸配列5A又は前記アミノ酸配列5Aと80%以上の同一性を有するアミノ酸配列5Bが変異してなり、変異5a：前記アミノ酸配列5AにおけるL178のアミノ酸の置換5ax又は前記アミノ酸配列5Bにおける前記置換5axに対応する置換5ayを含む、アミノ酸配列5C

を含む嗅覚受容体タンパク質からなる、ニトロ化合物検出素子。

[請求項2] 前記変異1aにおける欠失領域がN末端のアミノ酸から5～30アミノ酸の領域であり；前記変異2aにおけるL60の変異後のアミノ酸がプロリンであり、M138の変異後のアミノ酸が分岐鎖アミノ酸であり、且つ／或いはA152の変異後のアミノ酸が親水性中性アミノ酸であり；前記変異3aにおけるS114の変異後のアミノ酸が脂肪族アミノ酸であり、A120の変異後のアミノ酸が酸性アミノ酸であり、H162の変異後のアミノ酸が芳香族アミノ酸であり、V186の変異後のアミノ酸が脂肪族アミノ酸であり、V352の変異後のアミノ酸が含硫アミノ酸であり、S368の変異後のアミノ酸がプロリンであり；前記変異3bにおける非荷電アミノ酸への前記置換の数が6～18であり；前記変異4aにおけるM61の変異後のアミノ酸が親水性中性アミノ酸であり、C104の変異後のアミノ酸が塩基性アミノ酸であり、R112の変異後のアミノ酸が親水性中性アミノ酸であり、G181の変異後のアミノ酸が脂肪族アミノ酸であり、V189の変異後のアミノ酸が分岐鎖アミノ酸であり、且つI327の変異後のアミノ酸が分岐鎖アミノ酸であり；前記変異5aにおけるL178の変異後のアミノ酸がプロリンである、請求項1に記載のニトロ化合物検出素子。

[請求項3] 前記変異1aにおける欠失領域がN末端のアミノ酸から15～25アミノ酸の領域であり；前記変異2aにおけるL60の変異後のアミノ酸がプロリンであり、M138の変異後のアミノ酸がイソロイシンであり、且つ／或いはA152の変異後のアミノ酸がトレオニンであり；前記変異3aにおけるS114の変異後のアミノ酸がアラニンであり、A120の変異後のアミノ酸がグルタミン酸であり、H162の変異後のアミノ酸がチロシンであり、V186の変異後のアミノ酸がアラニンであり、V352の変異後のアミノ酸がメチオニンであり、S368の変異後のアミノ酸がプロリンであり；前記変異3bにおける非荷電アミノ酸への前記置換の数が8～14であり；

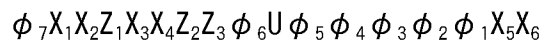
前記変異4aにおけるM61の変異後のアミノ酸がトレオニンであり、C104の変異後のアミノ酸がアルギニンであり、R112の変異後のアミノ酸がグルタミンであり、G181の変異後のアミノ酸がアラニンであり、V189の変異後のアミノ酸がイソロイシンであり、且つI327の変異後のアミノ酸がバリンであり；

前記変異5aにおけるL178の変異後のアミノ酸がプロリンである、請求項1又は2に記載のニトロ化合物検出素子。

[請求項4] 前記ニトロ化合物が、ベンゼン環にニトロ基が直接連結してなる構造を含む化合物、且つ／或いはニトロ基を2つ以上含む化合物である、請求項1～3のいずれかに記載のニトロ化合物検出素子。

[請求項5] 前記嗅覚受容体タンパク質が、

対応する野生型嗅覚受容体タンパク質中の一般式(1)：



[式中、 $X_1 \sim X_6$ 及び $Z_1 \sim Z_3$ は野生型昆虫嗅覚受容体のアミノ酸配列に由来するアミノ酸を示し、 ϕ_1 は疎水性アミノ酸を示し、 $\phi_2 \sim \phi_7$ はそれぞれ独立して無電荷極性アミノ酸又は疎水性アミノ酸を示し、Uは無電荷極性アミノ酸を示す。]

で示されるアミノ酸配列Aが変異してなるアミノ酸配列Bを含み、下記条件1～3：

(条件1) 前記アミノ酸配列Bにおいて、 X_3 及び／又は X_4 が置換しており、 X_3 が分岐鎖アミノ酸であり且つ／或いは X_4 が無電荷極性アミノ酸であること、

(条件2) 前記アミノ酸配列Aにおいて X_5 及び X_6 が共に正電荷極性アミノ酸である場合に、前記アミノ酸配列Bにおいて、 X_6 が正電荷極性アミノ酸以外のアミノ酸であること、及び(条件3) 前記アミノ酸配列Aにおいて X_1 及び X_2 の一方又は両方が正電荷極性アミノ酸である場合に、前記アミノ酸配列Bにおいて、 X_1 及び／又は X_2 が置換しており、 X_1 が無電荷極性アミノ酸であり且つ／或いは X_2 が疎水性アミノ酸であるこ

と、

からなる群より選択される少なくとも1種の条件を満たす、
請求項1～4のいずれかに記載のニトロ化合物検出素子。

[請求項6]

(1) 配列番号1に示されるアミノ酸配列1A又は前記アミノ酸配列1Aと80%以上の同一性を有するアミノ酸配列1Bが変異してなり、変異1a：第1細胞外ループの一部又は全部の領域の欠失を含む、アミノ酸配列1C；

(2) 配列番号2に示されるアミノ酸配列2A又は前記アミノ酸配列2Aと80%以上の同一性を有するアミノ酸配列2Bが変異してなり、変異2a：前記アミノ酸配列2AにおけるL60、M138及びA152からなる群より選択される少なくとも1種のアミノ酸の置換2ax又は前記アミノ酸配列2Bにおける前記置換2axに対応する置換2ayを含む、アミノ酸配列2C；

(3) 配列番号3に示されるアミノ酸配列3A又は前記アミノ酸配列3Aと80%以上の同一性を有するアミノ酸配列3Bが変異してなり、変異3a：前記アミノ酸配列3AにおけるS114、A120、H162、V186、V352、及びS368からなるアミノ酸群の置換3ax又は前記アミノ酸配列3Bにおける前記置換3axに対応する置換3ay、並びに変異3b：第3細胞外ループから第3細胞内ループまでの領域における荷電アミノ酸の非荷電アミノ酸への置換を含む、アミノ酸配列3C；又は

(4) 配列番号4に示されるアミノ酸配列4A又は前記アミノ酸配列4Aと80%以上の同一性を有するアミノ酸配列4Bが変異してなり、変異4a：前記アミノ酸配列4AにおけるM61、C104、R112、G181、V189、及びI327からなるアミノ酸群の置換4ax又は前記アミノ酸配列4Bにおける前記置換4axに対応する置換4ayを含む、アミノ酸配列4C
を含む、嗅覚受容体タンパク質。

[請求項7]

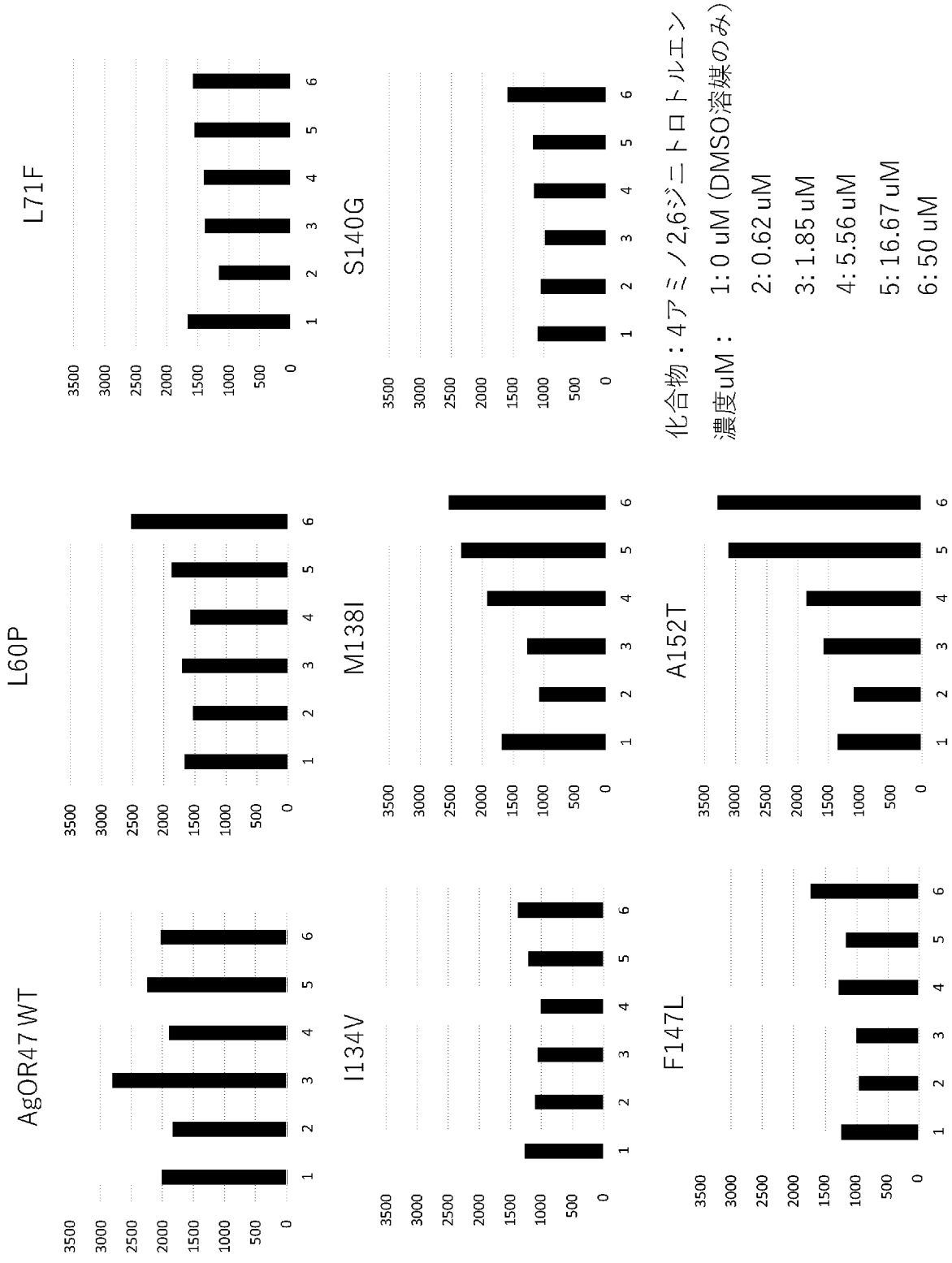
請求項6に記載の嗅覚受容体タンパク質のコード配列を含む、ポリヌクレオチド。

[請求項8]

請求項7に記載のポリヌクレオチドを含む、細胞。

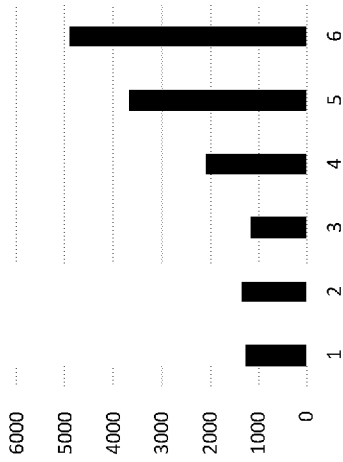
- [請求項9] 請求項8に記載の細胞を含む、非ヒト動物。
- [請求項10] 請求項1～5のいずれかに記載のニトロ化合物検出素子を含む脂質二重膜、細胞、又は前記細胞を含む非ヒト動物を備える、ニトロ化合物検出センサ。

[表2]

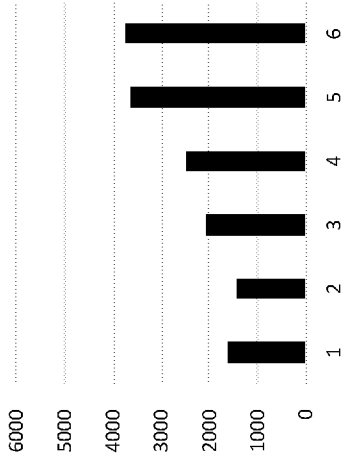


[3]

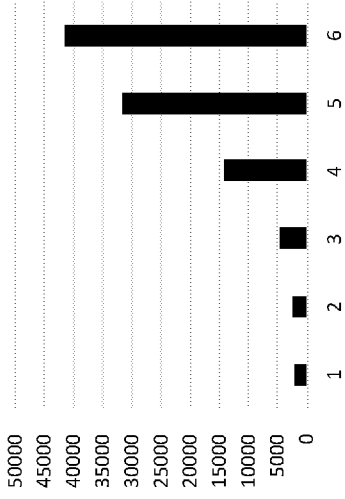
L60P, A152T



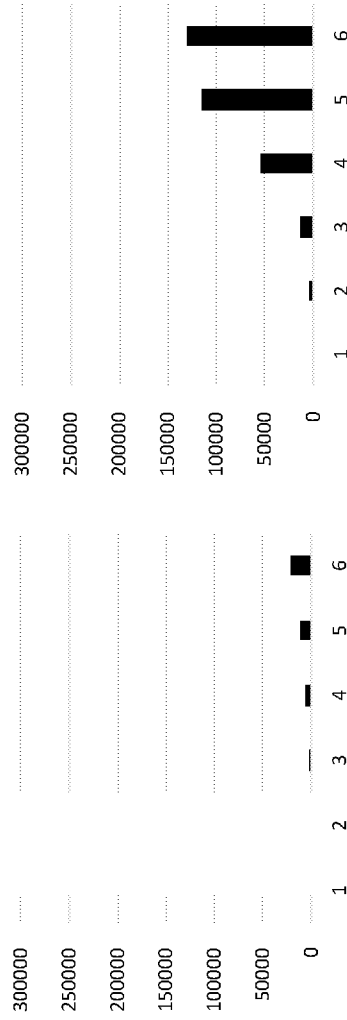
M138I, A152T



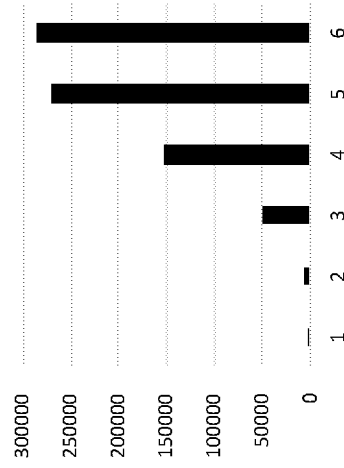
L60P, M138I, A152T



L60P, L71F, I134V, M138I, S140G, F147L



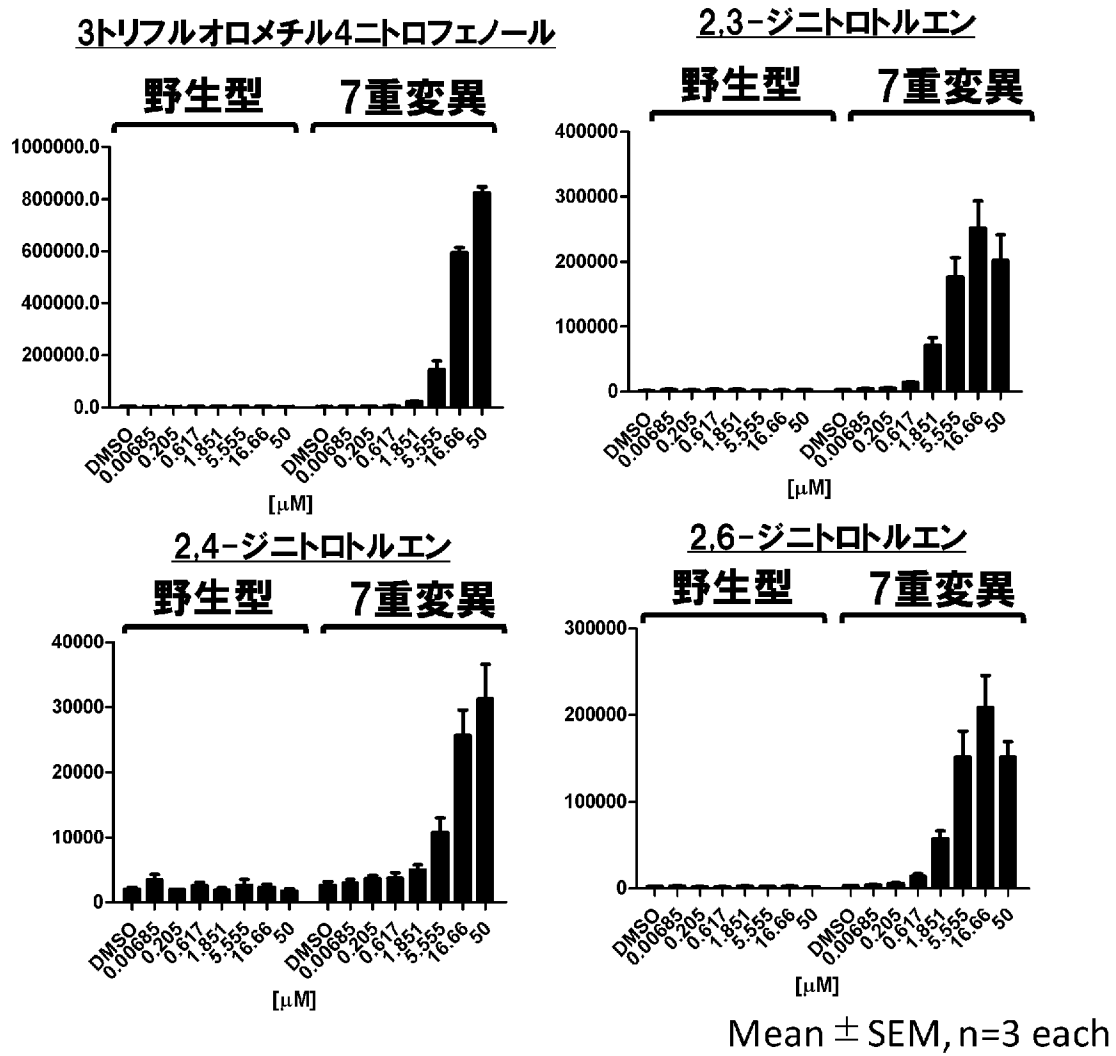
L60P, L71F, I134V, M138I, S140G, F147L, A152T



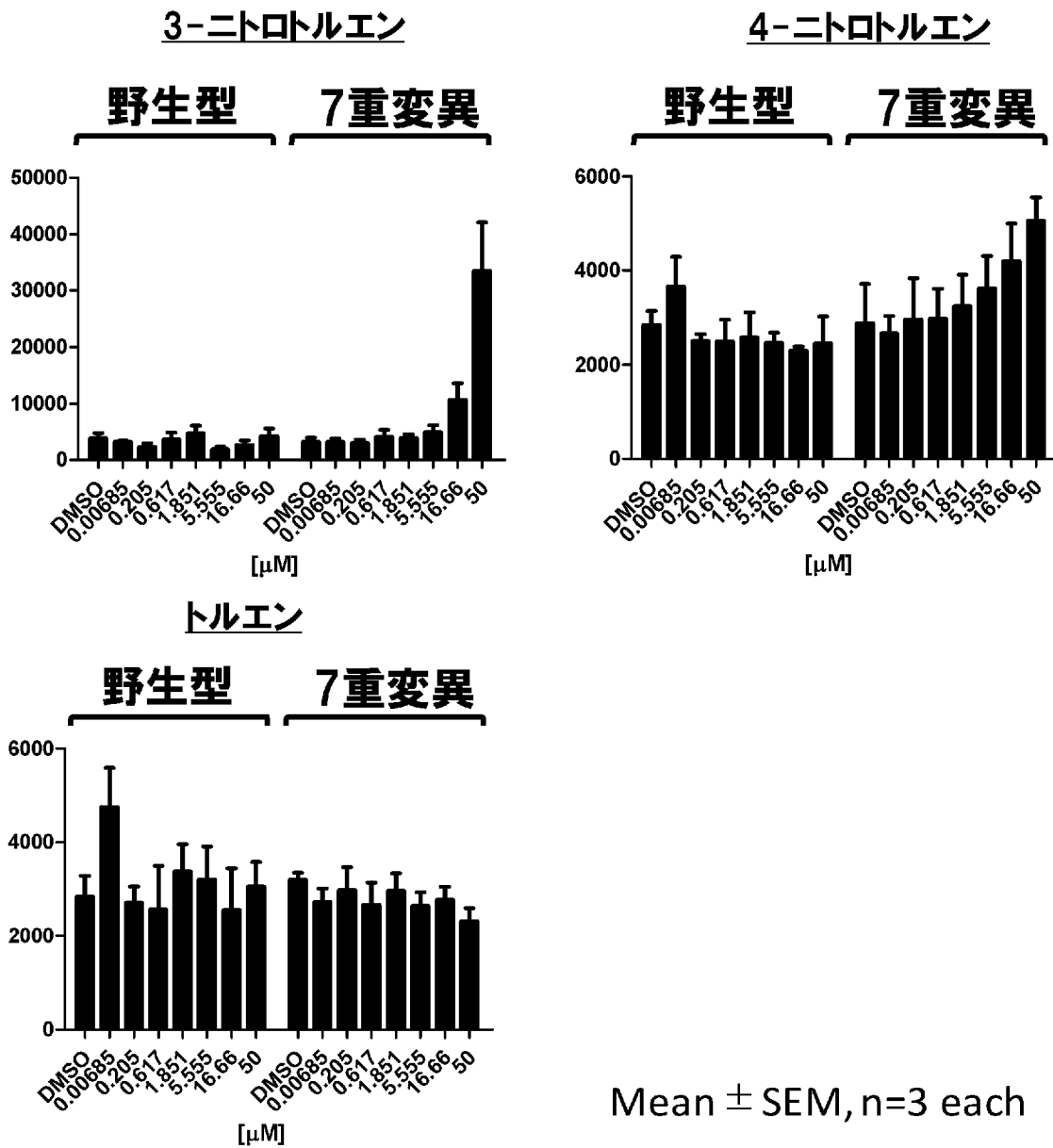
化合物：4アミノ2,6ジニトロトルエン

濃度μM：1: 0 μM (DMSO溶媒のみ)、2: 0.62 μM、3: 1.85 μM、4: 5.56 μM、5: 16.67 μM、6: 50 μM

[図4]

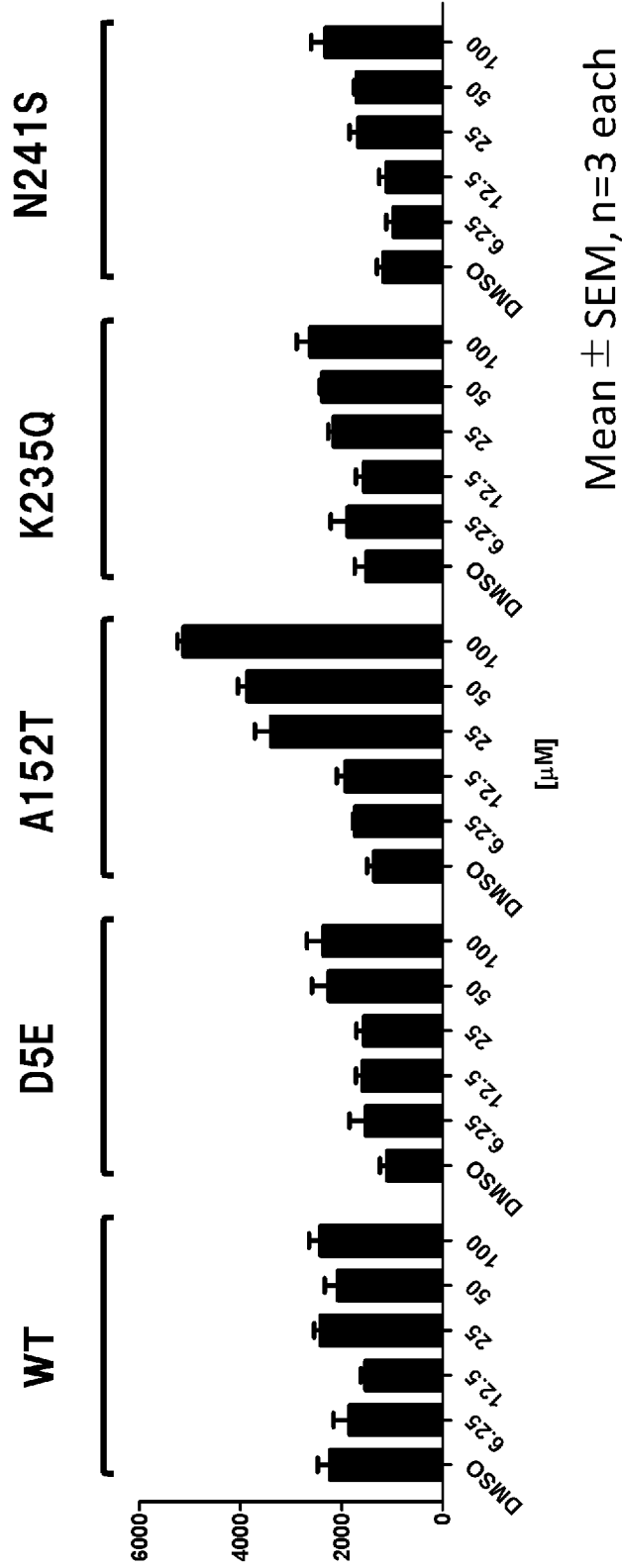


[図5]



[図6]

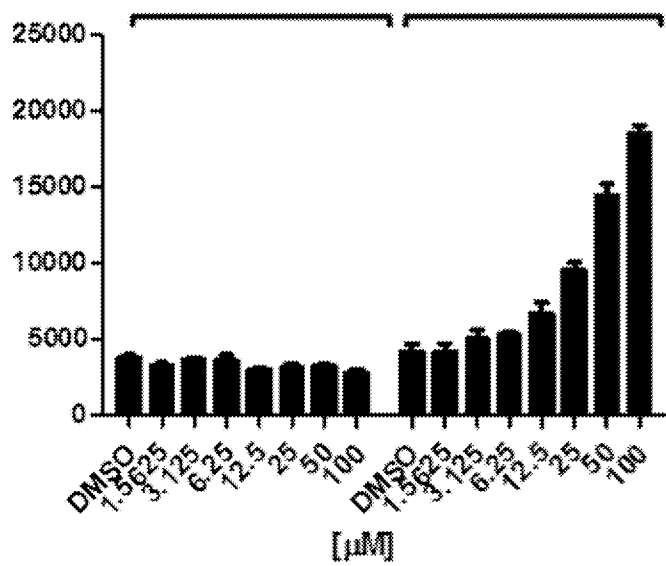
AgOR47: 2,3-ジメチル-2,3-ジニトロブタン



[図7]

AgOR6:2ニトロアニリン

野生型 変異体

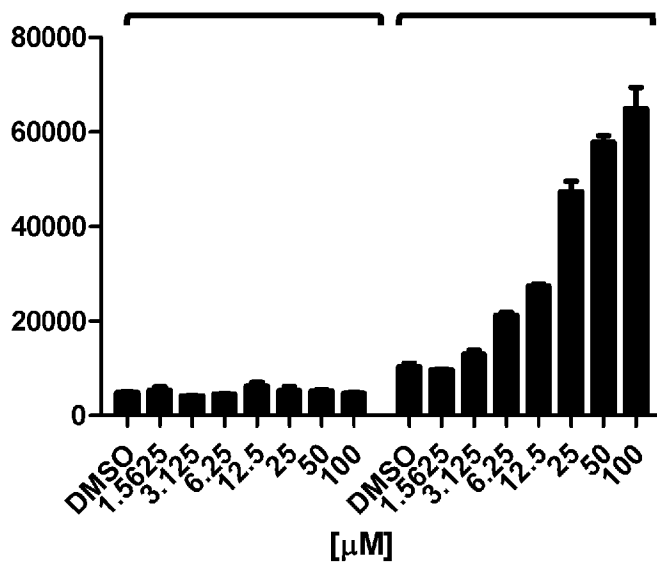


Mean ± SEM, n=3 each

[図8]

AgOR15: 2ニトロアニリン

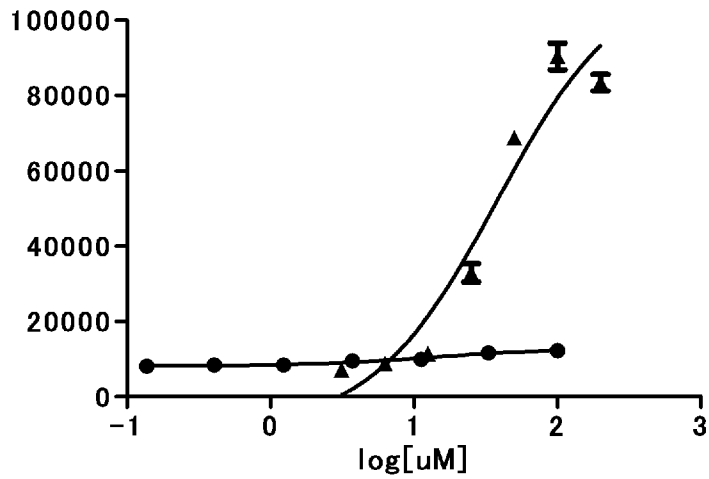
野生型 変異体



Mean ± SEM, n=3 each

[図10]

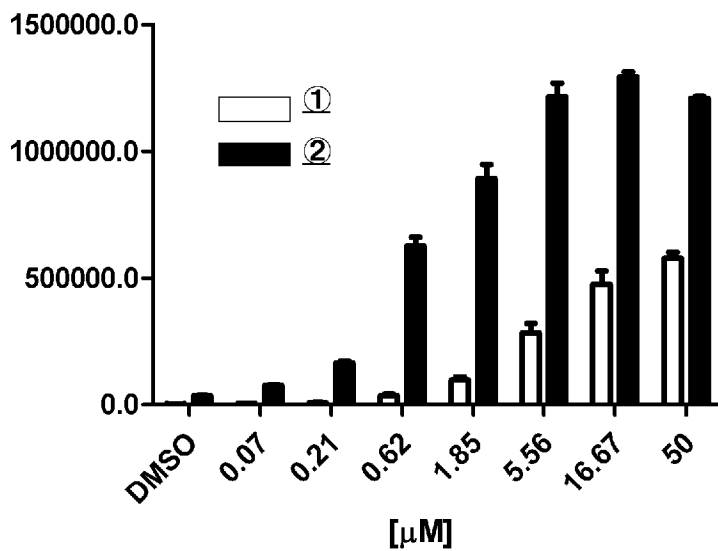
3-ニトロトルエンに対する反応



● マウスolfr256_17

▲ ハマダラカOR28 T25K, 22a.a.欠失

[図11]



① T25K-P31T 2重変異体、22a.a.欠失

② T25K-P31T-S368A-Q376A-R380A-S382L-S385A 7重変異体、22a.a.欠失

Mean ± SEM, n=3 each

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2021/027267

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
<p><i>C12N 15/12</i>(2006.01)i; <i>A01K 67/027</i>(2006.01)i; <i>A01K 67/033</i>(2006.01)i; <i>C07K 14/705</i>(2006.01)i; <i>C12N 1/15</i>(2006.01)i; <i>C12N 1/19</i>(2006.01)i; <i>C12N 1/21</i>(2006.01)i; <i>C12N 5/10</i>(2006.01)i; <i>C12N 15/09</i>(2006.01)i; <i>G01N 21/64</i>(2006.01)i FI: C12N15/12 ZNA; A01K67/027; A01K67/033 501; C07K14/705; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N5/10; C12N15/09 Z; G01N21/64 F</p> <p>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC</p>		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N15/12; A01K67/027; A01K67/033; C07K14/705; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N5/10; C12N15/09; G01N21/64		
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 1971-2021 Registered utility model specifications of Japan 1996-2021 Published registered utility model applications of Japan 1994-2021		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (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 2014-054218 A (SUMITOMO CHEMICAL CO., LTD.) 27 March 2014 (2014-03-27) claims 13, 15, 21, paragraph [0009]	6-9
A	claims 13, 15, 21, paragraph [0009]	1-5, 10
X	Database UniProt [online], Accession No. A0A1S4GFY3 sequence version 1, [retrieved on 14 September 2021], Retrieved from the Internet: URL< https://www.uniprot.org/uniprot/A0A1S4GFY3.txt >, 12 April 2017 sequence	6-9
A	sequence	1-5, 10
X	Database UniProt [online], Accession No. A0A182U8E6 sequence version 2, [retrieved on 14 September 2021], Retrieved from the Internet: URL< https://www.uniprot.org/uniprot/A0A182U8E6.txt >, 16 January 2019 sequence	6-9
A	sequence	1-5, 10
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>“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)</p> <p>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“&” document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search 14 September 2021		Date of mailing of the international search report 28 September 2021
Name and mailing address of the ISA/JP Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2021/027267

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Database UniProt [online], Accession No.A0A182XUL7 sequence version 1, [retrieved on 14 September 2021], Retrieved from the Internet: URL<https://www.uniprot.org/uniprot/A0A182XUL7.txt>, 07 September 2016 sequence	6-9
A	sequence	1-5, 10
X	Database UniProt [online], Accession No.A0A182WLM0 sequence version 1, [retrieved on 14 September 2021], Retrieved from the Internet: URL<https://www.uniprot.org/uniprot/A0A182WLM0.txt>, 07 September 2016 sequence	6-9
A	sequence	1-5, 10
A	Database UniProt [online], Accession No.Q16EI9 sequence version 1, [retrieved on 14 September 2021], Retrieved from the Internet: URL<https://www.uniprot.org/uniprot/Q16EI9.txt>, 25 July 2006 sequence	1-10
A	Database UniProt [online], Accession No.A0A1S7UE45 sequence version 1, [retrieved on 14 September 2021], Retrieved from the Internet: URL<https://www.uniprot.org/uniprot/A0A1S7UE45.txt>, 10 May 2017 sequence	1-10
A	WO 2018/062201 A1 (SUMITOMO CHEMICAL CO., LTD.) 05 April 2018 (2018-04-05) SEQ ID NO: 36	1-10
A	WO 2017/106914 A1 (COMMONWEALTH SCIENTIFIC AND INDUSTRIAL RESEARCH ORGANISATION) 29 June 2017 (2017-06-29) SEQ ID NO: 2	1-10

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. forming part of the international application as filed:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - on paper or in the form of an image file.
 - b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
 - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2021/027267

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP 2014-054218 A	27 March 2014	(Family: none)	
WO 2018/062201 A1	05 April 2018	JP 2018-52882 A SEQ ID NO: 36	
WO 2017/106914 A1	29 June 2017	(Family: none)	

<p>A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））</p> <p>C12N 15/12(2006.01)i; A01K 67/027(2006.01)i; A01K 67/033(2006.01)i; C07K 14/705(2006.01)i; C12N 1/15(2006.01)i; C12N 1/19(2006.01)i; C12N 1/21(2006.01)i; C12N 5/10(2006.01)i; C12N 15/09(2006.01)i; G01N 21/64(2006.01)i FI: C12N15/12 ZNA; A01K67/027; A01K67/033 501; C07K14/705; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N5/10; C12N15/09 Z; G01N21/64 F</p>																							
<p>B. 調査を行った分野</p> <p>調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））</p> <p>C12N15/12; A01K67/027; A01K67/033; C07K14/705; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N5/10; C12N15/09; G01N21/64</p> <p>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</p> <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2021年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2021年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2021年</td> </tr> </table> <p>国際調査で使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）</p> <p>JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN); UniProt/GeneSeq</p>			日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2021年	日本国実用新案登録公報	1996-2021年	日本国登録実用新案公報	1994-2021年													
日本国実用新案公報	1922-1996年																						
日本国公開実用新案公報	1971-2021年																						
日本国実用新案登録公報	1996-2021年																						
日本国登録実用新案公報	1994-2021年																						
<p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリー*</th> <th>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</th> <th>関連する 請求項の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>JP 2014-054218 A（住友化学株式会社）27.03.2014（2014-03-27）</td> <td>6-9</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>請求項13, 15, 21, [0009]</td> <td>1-5, 10</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>Database UniProt [online], Accession No. A0A1S4GFY3 sequence version 1, [retrieved on 2021.09.14], Retrieved from the Internet: URL<https://www.uniprot.org/uniprot/A0A1S4GFY3.txt>, 2017.04.12</td> <td>6-9</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>sequence</td> <td>1-5, 10</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>Database UniProt [online], Accession No. A0A182U8E6 sequence version 2, [retrieved on 2021.09.14], Retrieved from the Internet: URL<https://www.uniprot.org/uniprot/A0A182U8E6.txt>, 2019.01.16</td> <td>6-9</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>sequence</td> <td>1-5, 10</td> </tr> </tbody> </table> <p><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。</p> <p>* 引用文献のカテゴリー</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“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）</p> <p>“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“&” 同一パテントファミリー文献</p>			引用文献の 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 請求項の番号	X	JP 2014-054218 A（住友化学株式会社）27.03.2014（2014-03-27）	6-9	A	請求項13, 15, 21, [0009]	1-5, 10	X	Database UniProt [online], Accession No. A0A1S4GFY3 sequence version 1, [retrieved on 2021.09.14], Retrieved from the Internet: URL<https://www.uniprot.org/uniprot/A0A1S4GFY3.txt>, 2017.04.12	6-9	A	sequence	1-5, 10	X	Database UniProt [online], Accession No. A0A182U8E6 sequence version 2, [retrieved on 2021.09.14], Retrieved from the Internet: URL<https://www.uniprot.org/uniprot/A0A182U8E6.txt>, 2019.01.16	6-9	A	sequence	1-5, 10
引用文献の 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 請求項の番号																					
X	JP 2014-054218 A（住友化学株式会社）27.03.2014（2014-03-27）	6-9																					
A	請求項13, 15, 21, [0009]	1-5, 10																					
X	Database UniProt [online], Accession No. A0A1S4GFY3 sequence version 1, [retrieved on 2021.09.14], Retrieved from the Internet: URL<https://www.uniprot.org/uniprot/A0A1S4GFY3.txt>, 2017.04.12	6-9																					
A	sequence	1-5, 10																					
X	Database UniProt [online], Accession No. A0A182U8E6 sequence version 2, [retrieved on 2021.09.14], Retrieved from the Internet: URL<https://www.uniprot.org/uniprot/A0A182U8E6.txt>, 2019.01.16	6-9																					
A	sequence	1-5, 10																					
<p>国際調査を完了した日</p> <p>14.09.2021</p>	<p>国際調査報告の発送日</p> <p>28.09.2021</p>																						
<p>名称及びあて先</p> <p>日本国特許庁 (ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号</p>	<p>権限のある職員（特許庁審査官）</p> <p>伊藤 良子 4B 3644</p> <p>電話番号 03-3581-1101 内線 3448</p>																						

C. 関連すると認められる文献		
引用文献の 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 請求項の番号
X	Database UniProt [online], Accession No.A0A182XUL7 sequence version 1, [retrieved on 2021.09.14], Retrieved from the Internet: URL<https:// www.uniprot.org/uniprot/A0A182XUL7.txt>, 2016.09.07	6-9
A	sequence	1-5,10
X	Database UniProt [online], Accession No.A0A182WLM0 sequence version 1, [retrieved on 2021.09.14], Retrieved from the Internet: URL<https:// www.uniprot.org/uniprot/A0A182WLM0.txt>, 2016.09.07	6-9
A	sequence	1-5,10
A	Database UniProt [online], Accession No.Q16E19 sequence version 1, [retrieved on 2021.09.14], Retrieved from the Internet: URL<https:// www.uniprot.org/uniprot/Q16E19.txt>, 2006.07.25	1-10
A	Database UniProt [online], Accession No.A0A1S7UE45 sequence version 1, [retrieved on 2021.09.14], Retrieved from the Internet: URL<https:// www.uniprot.org/uniprot/A0A1S7UE45.txt>, 2017.05.10	1-10
A	WO 2018/062201 A1 (住友化学株式会社) 05.04.2018 (2018 - 04 - 05) 配列番号 3 6	1-10
A	WO 2017/106914 A1 (COMMONWEALTH SCIENTIFIC AND INDUSTRIAL RESEARCH ORGANISATION) 29.06.2017 (2017 - 06 - 29) SEQ ID NO:2	1-10

第 I 欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第 1 ページの 1. c の続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。
- a. 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
- 附属書C/ST.25テキストファイル形式
- 紙形式又はイメージファイル形式
- b. 国際出願とともに、PCT規則13の3.1(a)に基づき国際調査のためにのみ提出された、附属書C/ST.25テキストファイル形式の配列表
- c. 国際出願日後に、国際調査のためにのみ提出された配列表
- 附属書C/ST.25テキストファイル形式(PCT規則13の3.1(a))
- 紙形式又はイメージファイル形式(PCT規則13の3.1(b)及びPCT実施細則第713号)
2. さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しが提出され、変更後の配列表又は追加の写しに記載された情報が、出願時における配列表と同一である旨、又は出願時における国際出願の開示の範囲を超えない旨の陳述書の提出があった。
3. 補足意見:

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/JP2021/027267

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP 2014-054218 A	27.03.2014	(ファミリーなし)	
WO 2018/062201 A1	05.04.2018	JP 2018-52882 A 配列番号 3 6	
WO 2017/106914 A1	29.06.2017	(ファミリーなし)	