

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6114439号
(P6114439)

(45) 発行日 平成29年4月12日(2017.4.12)

(24) 登録日 平成29年3月24日(2017.3.24)

| | |
|-------------------------|-------------------|
| (51) Int.Cl. | F 1 |
| C 12 Q 1/02 (2006.01) | C 12 Q 1/02 Z N A |
| G 01 N 33/15 (2006.01) | G 01 N 33/15 Z |
| G 01 N 33/50 (2006.01) | G 01 N 33/50 Z |
| C 12 N 15/09 (2006.01) | C 12 N 15/00 A |
| C 07 K 14/705 (2006.01) | C 07 K 14/705 |

請求項の数 22 (全 25 頁)

| | |
|--------------|-------------------------------|
| (21) 出願番号 | 特願2016-96146 (P2016-96146) |
| (22) 出願日 | 平成28年5月12日 (2016.5.12) |
| (65) 公開番号 | 特開2016-224039 (P2016-224039A) |
| (43) 公開日 | 平成28年12月28日 (2016.12.28) |
| 審査請求日 | 平成28年12月6日 (2016.12.6) |
| (31) 優先権主張番号 | 特願2015-110390 (P2015-110390) |
| (32) 優先日 | 平成27年5月29日 (2015.5.29) |
| (33) 優先権主張国 | 日本国 (JP) |

早期審査対象出願

| | |
|-----------|--|
| (73) 特許権者 | 000000918 花王株式会社 東京都中央区日本橋茅場町1丁目14番1 0号 |
| (74) 代理人 | 110000084 特許業務法人アルガ特許事務所 |
| (74) 代理人 | 100077562 弁理士 高野 登志雄 |
| (74) 代理人 | 100096736 弁理士 中嶋 俊夫 |
| (74) 代理人 | 100117156 弁理士 村田 正樹 |
| (74) 代理人 | 100111028 弁理士 山本 博人 |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】匂い抑制物質の選択方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

標的の匂いの交差順応を引き起こす物質の選択方法であって、

(1) 嗅覚受容体ポリペプチドを探索し、標的の匂いの原因物質に応答するものを同定すること、

(2) 該同定された嗅覚受容体ポリペプチドに、該標的の匂いの原因物質とは異なる物質である試験物質を添加して、その応答を測定すること、

(3) 該嗅覚受容体ポリペプチドの応答を活性化させた該試験物質を、該標的の匂いの交差順応を引き起こす物質として選択すること、

を含む、方法。

【請求項2】

前記(1)において、前記嗅覚受容体ポリペプチドが、ヒト嗅覚受容体、マウス嗅覚受容体、ラット嗅覚受容体、及びそれらとアミノ酸配列において少なくとも90%同一であつて匂い分子の結合によって活性化するポリペプチドからなる群より選択される少なくとも1種である、請求項1記載の方法。

【請求項3】

前記(2)において、前記試験物質を添加する嗅覚受容体ポリペプチドが、該嗅覚受容体ポリペプチドを発現するように遺伝的に操作された組換え細胞上に発現されている、請求項1又は2記載の方法。

【請求項4】

前記(2)において、前記嗅覚受容体ポリペプチドの応答が、E L I S A若しくはレボータージーンアッセイによる細胞内cAMP量測定、あるいはカルシウムイメージング、又は電気生理学的手法により測定される、請求項1～3のいずれか1項記載の方法。

【請求項5】

(4)官能試験により、前記(3)で選択された物質の中から、前記標的の匂いの交差順応を引き起こす物質を選択すること、
をさらに含む、請求項1～4のいずれか1項記載の方法。

【請求項6】

前記標的の匂いがタバコ臭である、請求項1～5のいずれか1項記載の方法。

【請求項7】

前記標的の匂いが尿臭である、請求項1～5のいずれか1項記載の方法。

10

【請求項8】

標的の匂いを抑制する物質の選択方法であって、

(1)嗅覚受容体ポリペプチドを探索し、標的の匂いの原因物質に応答するものを同定すること、

(2)該同定された嗅覚受容体ポリペプチドに、該標的の匂いの原因物質とは異なる物質である試験物質を添加して、その応答を測定すること、

(3)該嗅覚受容体ポリペプチドの応答を活性化させた該試験物質を、該標的の匂いを抑制する物質として選択すること、

を含む、方法。

20

【請求項9】

前記(1)において、前記嗅覚受容体ポリペプチドが、ヒト嗅覚受容体、マウス嗅覚受容体、ラット嗅覚受容体、及びそれらとアミノ酸配列において少なくとも90%同一であって匂い分子の結合によって活性化するポリペプチドからなる群より選択される少なくとも1種である、請求項8記載の方法。

【請求項10】

前記(2)において、前記試験物質を添加する嗅覚受容体ポリペプチドが、該嗅覚受容体ポリペプチドを発現するように遺伝的に操作された組換え細胞上に発現されている、請求項8又は9記載の方法。

【請求項11】

前記(2)において、前記嗅覚受容体ポリペプチドの応答が、E L I S A若しくはレボータージーンアッセイによる細胞内cAMP量測定、あるいはカルシウムイメージング、又は電気生理学的手法により測定される、請求項8～10のいずれか1項記載の方法。

30

【請求項12】

(4)官能試験により、前記(3)で選択された物質の中から、前記標的の匂いを抑制する物質を選択すること、

をさらに含む、請求項8～11のいずれか1項記載の方法。

【請求項13】

前記標的の匂いがタバコ臭である、請求項8～12のいずれか1項記載の方法。

【請求項14】

前記標的の匂いが尿臭である、請求項8～12のいずれか1項記載の方法。

40

【請求項15】

標的の匂いの交差順応を引き起こす物質の選択方法であって、

(1)標的の匂いの原因物質に応答する少なくとも1種の嗅覚受容体ポリペプチドを準備すること、

(2)該少なくとも1種の嗅覚受容体ポリペプチドに、該標的の匂いの原因物質とは異なる物質である試験物質を添加して、その応答を測定すること、

(3)該少なくとも1種の嗅覚受容体ポリペプチドのいずれかの応答を活性化させた該試験物質を、該標的の匂いの交差順応を引き起こす物質として選択すること、

を含み、

50

ここで、

該標的の匂いがタバコ臭であり、かつ該少なくとも1種の嗅覚受容体ポリペプチドが、配列番号4で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、及び該アミノ酸配列と少なくとも90%同一であってタバコ臭原因物質に対して応答性を有するポリペプチドからなる群より選択される少なくとも1種であるか、又は

該標的の匂いが尿臭であり、かつ該少なくとも1種の嗅覚受容体ポリペプチドが、配列番号6で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、及び該アミノ酸配列と少なくとも90%同一であって尿臭原因物質に対して応答性を有するポリペプチドからなる群より選択される少なくとも1種である、

方法。

10

【請求項16】

前記嗅覚受容体ポリペプチドが、該嗅覚受容体ポリペプチドを発現するように遺伝的に操作された組換え細胞上に発現されている、請求項15記載の方法。

【請求項17】

前記(2)において、前記嗅覚受容体ポリペプチドの応答が、ELISA若しくはレポータージーンアッセイによる細胞内cAMP量測定、あるいはカルシウムイメージング、又は電気生理学的手法により測定される、請求項15又は16記載の方法。

【請求項18】

(4)官能試験により、前記(3)で選択された物質の中から、前記標的の匂いに対して交差順応を起こさせる物質を選択すること、

20

をさらに含む、請求項15～17のいずれか1項記載の方法。

【請求項19】

標的の匂いを抑制する物質の選択方法であって、

(1)標的の匂いの原因物質に応答する少なくとも1種の嗅覚受容体ポリペプチドを準備すること、

(2)該少なくとも1種の嗅覚受容体ポリペプチドに、該標的の匂いの原因物質とは異なる物質である試験物質を添加して、その応答を測定すること、

(3)該少なくとも1種の嗅覚受容体ポリペプチドのいずれかの応答を活性化させた該試験物質を、該標的の匂いを抑制する物質として選択すること、

を含み、

30

ここで、

該標的の匂いがタバコ臭であり、かつ該少なくとも1種の嗅覚受容体ポリペプチドが、配列番号4で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、及び該アミノ酸配列と少なくとも90%同一であってタバコ臭原因物質に対して応答性を有するポリペプチドからなる群より選択される少なくとも1種であるか、又は

該標的の匂いが尿臭であり、かつ該少なくとも1種の嗅覚受容体ポリペプチドが、配列番号6で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、及び該アミノ酸配列と少なくとも90%同一であって尿臭原因物質に対して応答性を有するポリペプチドからなる群より選択される少なくとも1種である、

方法。

40

【請求項20】

前記嗅覚受容体ポリペプチドが、該嗅覚受容体ポリペプチドを発現するように遺伝的に操作された組換え細胞上に発現されている、請求項19記載の方法。

【請求項21】

前記(2)において、前記嗅覚受容体ポリペプチドの応答が、ELISA若しくはレポータージーンアッセイによる細胞内cAMP量測定、あるいはカルシウムイメージング、又は電気生理学的手法により測定される、請求項19又は20記載の方法。

【請求項22】

(4)官能試験により、前記(3)で選択された物質の中から、前記標的の匂いを抑制する物質を選択すること、

50

をさらに含む、請求項 19～21 のいずれか 1 項記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、匂いの順応機構に基づいて匂いを抑制する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

ヒト等の哺乳動物においては、匂い物質は、鼻腔内最深部に広がる嗅上皮に存在する嗅神経細胞の嗅覚受容体によって認識される。鼻腔内に取り込まれた匂い分子は、嗅覚受容体に作用して活性化させ、活性化した嗅覚受容体に引き起こされた嗅神経細胞からのシグナルが中枢神経系へと伝達されることにより、匂いが知覚される。嗅覚受容体をコードする遺伝子はヒトの場合 400 種以上存在することが予想されている。特定の匂い物質に対して我々が知覚する匂いの質は、該匂い物質によって上記 400 種以上の嗅覚受容体のうちのどの組み合わせが活性化されたかによって決定されると考えられている。10

【0003】

匂いとその認識に関わる嗅覚受容体との関係については、既に様々な報告がある。例えば、2014 年マウスを使った研究により、数十万ともいわれる匂い物質の中でもムスク系の香料は、例外的に極めて少数の嗅覚受容体で認識されることが示唆された。ヒトでも、ムスクを認識する嗅覚受容体としては OR5AN1 の 1 種類のみが見出されており、この 1 種類の受容体がムスクの匂い認識に大きく貢献していることが示唆されている（非特許文献 1）。また例えば、グアイアコール（2-メトキシフェノール）という匂い物質の認識には、OR10G4 という 1 種類の嗅覚受容体が高く寄与していることが示唆されている（非特許文献 2）。20

【0004】

衣類など繊維製品から生じる「生乾き臭」、頭部、口腔、鼠蹊部、足の裏などから発生する「体臭」、排泄されてから長時間が経過した尿から発せられる「尿臭」など、様々な悪臭が、近年の清潔志向の高まりに伴い問題となっている。これら悪臭の原因となる匂い物質の多くは、分子量約 30～300 の揮発性の低分子有機化合物である。悪臭に対する不快感を軽減する方法としては、中和反応を利用した化学消臭、悪臭物質を多孔質表面などに吸着させる物理消臭、別の匂い物質を使った感覚消臭がある。さらに感覚消臭としては、（1）他の匂い物質を悪臭の環境に導入し、悪臭と一緒に嗅がせる方法（マスキング）、（2）悪臭を嗅ぐ前に、他の匂い物質を嗅がせることによって、悪臭に対する人間の嗅覚を低下させる方法（交差順応）がある。30

【0005】

近年、感覚消臭を引き起こす嗅覚メカニズムを解明し、それに基づいて効率的に感覚消臭技術を開発する取り組みがなされている。例えば、ある嗅覚受容体を活性化する匂い分子が、別の嗅覚受容体の活性化を阻害するアンタゴニストとして働くことが報告されている。この事実を踏まえて、マスキングによる感覚消臭（1）の一種として、悪臭を認識する嗅覚受容体のアンタゴニストを利用した技術が報告されている（特許文献 1）。このアンタゴニストを利用した技術は、嗅覚受容体を直接制御するという観点からは、現在のところ唯一の感覚消臭技術である。40

【0006】

感覚消臭（2）の方法は、嗅覚の交差順応という生理現象に基づいた方法である。嗅覚の交差順応とは、ある一つの匂い物質に慣れることで、異なる匂い物質にも慣れが生じ嗅覚感度が低下することと定義される（非特許文献 3）。すなわち、悪臭ではない匂いに慣れさせることで、悪臭に対しても慣れが生じてその知覚が抑制される。特許文献 2 では、腋臭の原因成分に化学構造が酷似するがより弱い又は不快でない匂いを有する物質を嗅がせ続けることによって、該腋臭原因成分に対する嗅覚感度を低下させる、交差順応に基づく匂い抑制方法が記載されている。また特許文献 3 には、天然フレーバーと、その匂いを模したイミテーションフレーバーとの間の匂い類似性を、交差順応に基づいて評価する方50

法が記載されている。特許文献3では、二つのフレーバー組成物が同質の匂いであるほど強い交差順応が生じ、その順応の影響が脳血流量変化に表れる想定して、脳血流量変化を指標として二つのフレーバーの類似性を評価している。

【0007】

交差順応による匂い感受性の低下は、嗅覚受容体レベルのみならず嗅神経細胞レベル、神経回路レベルなど多様な機序で起こり得る。嗅覚の交差順応のメカニズムとして様々な仮説が考えられてきた。一つは、交差順応は、高次脳領域の神経細胞で起こるという仮説である。すなわち、末梢の嗅神経細胞からの情報が統合され匂いの質が解読される高次脳領域の神経細胞が、変化せずに留まる匂い情報に不要に応答し続けないよう感受性を失うメカニズムである。もう一つは、交差順応は、末梢の嗅神経細胞の嗅覚受容体のレベルで起こるという仮説である。すなわち、ある匂い物質の嗅覚受容体が、予め別の物質に応答した結果脱感作して、後から曝露された当該匂い物質に対してシグナルを流さなくなるというメカニズムが推量される。前者の仮説については、匂いの情報がどのような高次脳神経回路で処理されているかが未だ不明であるため、検証が困難である。一方、後者の仮説も、400種以上といわれる嗅覚受容体の数の多さと、匂い物質の認識におけるそれらの組み合わせの複雑さのために、やはり検証が困難であった。

【0008】

また従来、ある匂いの交差順応を引き起こす物質については、その匂いの原因物質と化学構造が酷似しているか、若しくは匂いの質が似た物質であるとの推定がなされている（非特許文献3）。一方で、そのような原則はいずれも成立しないという指摘もなされている（非特許文献4）。非特許文献5では、ある一つのラット嗅覚受容体に受容された匂い物質同士が、良く似た匂いの質を呈し、それら匂い物質はヒトに交差順応を起こしたことが報告されている。しかし、一般的に一つの匂い物質は、選択性の異なる多数の嗅覚受容体で認識される。

【0009】

このように、交差順応が生じる生体メカニズムは未だ解明されておらず、また交差順応を引き起こす匂い物質を同定する方法も確立されていない。したがって、従来、交差順応を人為的かつ計画的に引き起こすことによって匂いを抑制する技術の開発は、極めて困難であった。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0010】

【特許文献1】特許第5646255号公報

【特許文献2】特開2005-53887号公報

【特許文献3】特許第4966790号公報

【非特許文献】

【0011】

【非特許文献1】Shirasu M. et al., *Neuron*, 81:165-178, 2014

【非特許文献2】Mainland J.D. et al., *Nat. Neurosci.*, 17(1):114-20, 2014

【非特許文献3】川崎通昭・堀内哲嗣郎「嗅覚とにおい物質」p71-72、社団法人におい・かおり環境協会

【非特許文献4】Pierce J.D., *Chemical senses*, 21:223-237, 1996

【非特許文献5】*Chemosensory Perception*, 3(3):149-155, 2010

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

本発明は、嗅覚受容体の応答を指標として交差順応を起こす匂い物質ペアを選択する方法を提供する。また本発明は、ある匂いの原因物質に対する嗅覚受容体の活性化を指標として、交差順応に基づいて該匂いを抑制する物質を選択する方法を提供する。

【課題を解決するための手段】

10

20

30

40

50

【0013】

すなわち、本発明は、標的の匂いの交差順応を引き起こす物質の選択方法であって、
 (1) 嗅覚受容体ポリペプチドを探索し、標的の匂いの原因物質に応答するものを同定すること、
 (2) 該同定された嗅覚受容体ポリペプチドに試験物質を添加して、その応答を測定すること、
 (3) 該嗅覚受容体ポリペプチドの応答を活性化させた該試験物質を、該標的の匂いの交差順応を引き起こす物質として選択すること、
 を含む方法を提供する。

【0014】

10

また本発明は、標的の匂いを抑制する物質の選択方法であって、
 (1) 嗅覚受容体ポリペプチドを探索し、標的の匂いの原因物質に応答するものを同定すること、
 (2) 該同定された嗅覚受容体ポリペプチドに試験物質を添加して、その応答を測定すること、
 (3) 該嗅覚受容体ポリペプチドの応答を活性化させた該試験物質を、該標的の匂いを抑制する物質として選択すること、
 を含む方法を提供する。

【0015】

20

さらに本発明は、標的の匂いの交差順応を引き起こす物質の選択方法であって、
 (1) 標的の匂いの原因物質に応答する少なくとも1種の嗅覚受容体ポリペプチドを準備すること、
 (2) 該少なくとも1種の嗅覚受容体ポリペプチドに試験物質を添加して、その応答を測定すること、
 (3) 該少なくとも1種の嗅覚受容体ポリペプチドのいずれかの応答を活性化させた該試験物質を、該標的の匂いの交差順応を引き起こす物質として選択すること、
 を含む方法を提供する。

【0016】

30

さらに本発明は、標的の匂いを抑制する物質の選択方法であって、
 (1) 標的の匂いの原因物質に応答する少なくとも1種の嗅覚受容体ポリペプチドを準備すること、
 (2) 該少なくとも1種の嗅覚受容体ポリペプチドに試験物質を添加して、その応答を測定すること、
 (3) 該少なくとも1種の嗅覚受容体ポリペプチドのいずれかの応答を活性化させた該試験物質を、該標的の匂いを抑制する物質として選択すること、
 を含む方法を提供する。

【発明の効果】

【0017】

40

本発明によれば、交差順応に基づいて標的の匂いを選択的に消臭することができる物質を、効率良く選択することができる。

【図面の簡単な説明】

【0018】

【図1】ムスコン、グアイアコール、p-クレゾールに対する嗅覚受容体の応答。横軸は被験対象とした370種の各嗅覚受容体、縦軸は受容体の相対応答強度を表す。

【図2】p-クレゾールに対する嗅覚受容体OR9Q2の応答。M o c kは嗅覚受容体を発現させない細胞の応答を表す。エラーバー = \pm S E、n = 3 ~ 4。

【図3】嗅覚受容体OR5AN1発現細胞の各種試験物質に対する応答。横軸は試験物質濃度、縦軸は応答強度を示す。M o c kは嗅覚受容体を発現させない細胞の応答を表す。エラーバー = \pm S E、n = 3 ~ 4。

【図4】嗅覚受容体OR1A1発現細胞の各種試験物質に対する応答。横軸は試験物質濃度、縦軸は応答強度を示す。M o c kは嗅覚受容体を発現させない細胞の応答を表す。エラーバー = \pm S E、n = 3 ~ 4。

50

度、縦軸は応答強度を示す。Mockは嗅覚受容体を発現させない細胞の応答を表す。エラーバー = \pm S E、n = 3。

【図5】A～B：嗅覚受容体OR10G4(A)及びOR9Q2(B)発現細胞の各種試験物質に対する応答。横軸は試験物質濃度、縦軸は応答強度を示す。エラーバー = \pm S E、n = 3。C：嗅覚受容体発現細胞のムスコンに対する応答。エラーバー = \pm S D、n = 2。

【図6】A：試験物質によるムスコンの匂いの交差順応(n = 5～7)。B：試験物質によるグアイアコールの匂いの交差順応(n = 7)。C：試験物質によるp-クレゾールの匂いの交差順応(n = 8)。いずれも、バーは官能試験の評価結果の平均値、エラーバーは標準誤差(S E)を示す。

【発明を実施するための形態】

【0019】

本明細書において、「嗅覚受容体ポリペプチド」とは、嗅覚受容体又はそれと同等の機能を有するポリペプチドをいい、「嗅覚受容体と同等の機能を有するポリペプチド」とは、嗅覚受容体と同様に、細胞膜上に発現することができ、匂い分子の結合によって活性化し、かつ活性化されると、細胞内のG_s若しくはG_{o1f}と共にアデニル酸シクラーゼを活性化することで細胞内cAMP量を増加させる機能を有するポリペプチドをいう。

【0020】

本明細書において、標的匂いに関する「匂いの交差順応(又は嗅覚の交差順応)」とは、当該標的匂いの原因物質とは別の物質の匂いを予め受容し、その匂いに慣れることによって、該標的匂いの原因物質に対する嗅覚感受性が低下又は変化する現象を指す。本発明者らは、「匂いの交差順応」が、嗅覚受容体アゴニズムに基づく現象であることを明らかにした。すなわち、標的匂いの原因物質に対する嗅覚受容体が、該標的匂いの原因物質への応答に先だって異なる匂いの原因物質に応答し、その後応答が順応することにより、後から該標的匂いの原因物質に曝されても低い応答しかできず、その結果、個体に認識される標的匂いの強度の低下又は変質が生じる。したがって、本発明による標的匂いの交差順応、及びそれにに基づく標的匂いの抑制には、嗅覚受容体アゴニスト等の、標的匂いの原因物質に対する嗅覚受容体の応答を活性化させる物質が使用され得る。

【0021】

本明細書において、ヌクレオチド配列及びアミノ酸配列の同一性は、リップマン・パーソン法(Lipman-Pearson法; Science, 1985, 227: 1435-41)によって計算される。具体的には、遺伝情報処理ソフトウェアGenetyx-Win(Ver. 5.1.1; ソフトウェア開発)のホモロジー解析(Search homology)プログラムを用いて、Unit size to compare(ktup)を2として解析を行うことにより算出される。

【0022】

本明細書において、アミノ酸配列及びヌクレオチド配列に関する「少なくとも80%の同一性」とは、80%以上、好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、さらには95%以上、さらにより好ましくは98%以上、なお好ましくは99%以上の同一性をいう。

【0023】

標的匂いの原因物質の認識に関わる嗅覚受容体の活動に着目することで、交差順応物質を探索できるという可能性があった。しかし、一般的に一つの匂い物質は複数の嗅覚受容体で認識されるため、そのような探索は複雑であるうえ、探索された物質が実際に標的匂いの交差順応を引き起こすかどうかも不明であった。

【0024】

本発明者らは、ムスク系香料と嗅覚受容体OR5AN1、及びグアイアコール(2-メトキシフェノール)と嗅覚受容体OR10G4という、匂い知覚と特定の嗅覚受容体応答との高い関連性が示唆されている単純な匂い-嗅覚受容体モデルを利用することで、匂い

10

20

30

40

50

の交差順応への嗅覚受容体レベルでの関与を初めて検証することに成功した。その結果、本発明者らは、標的匂いの原因物質を高感度に認識する嗅覚受容体が認識する別の物質は、該標的匂いの交差順応を起こすという原則を発見した。さらに本発明者らは、別の匂い - 嗅覚受容体モデル (p - クレゾールと O R 9 Q 2) でのさらなる実験の結果、当該原則に普遍性があることを確認した。以上のことから本発明者らは、匂い物質応答性について嗅覚受容体をスクリーニングしてさらなる匂い - 嗅覚受容体モデルを構築することで、種々の匂いについて交差順応を調べることを見出した。

【 0 0 2 5 】

上記原則に基づいて、本発明は、標的匂いの交差順応を引き起こす物質、及び交差順応により標的匂いを抑制する物質を、スクリーニング又は同定する方法を提供する。 10

【 0 0 2 6 】

したがって本発明は、標的の匂いの交差順応を引き起こす物質の選択方法であって、(1) 嗅覚受容体ポリペプチドを探索し、標的の匂いの原因物質に応答するものを同定すること、

(2) 該同定された嗅覚受容体ポリペプチドに試験物質を添加して、その応答を測定すること、

(3) 該嗅覚受容体ポリペプチドの応答を活性化させた該試験物質を、該標的の匂いの交差順応を引き起こす物質として選択すること、
を含む方法を提供する。

【 0 0 2 7 】

20

また本発明は、標的の匂いを抑制する物質の選択方法であって、

(1) 嗅覚受容体ポリペプチドを探索し、標的の匂いの原因物質に応答するものを同定すること、

(2) 該同定された嗅覚受容体ポリペプチドに試験物質を添加して、その応答を測定すること、

(3) 該嗅覚受容体ポリペプチドの応答を活性化させた該試験物質を、該標的の匂いを抑制する物質として選択すること、
を含む方法を提供する。

【 0 0 2 8 】

30

また本発明は、標的の匂いの交差順応を引き起こす物質の選択方法であって、

(1) 標的の匂いの原因物質に応答する少なくとも 1 種の嗅覚受容体ポリペプチドを準備すること、

(2) 該少なくとも 1 種の嗅覚受容体ポリペプチドに試験物質を添加して、その応答を測定すること、

(3) 該少なくとも 1 種の嗅覚受容体ポリペプチドのいずれかの応答を活性化させた該試験物質を、該標的の匂いの交差順応を引き起こす物質として選択すること、
を含む方法を提供する。

【 0 0 2 9 】

40

また本発明は、標的の匂いを抑制する物質の選択方法であって、

(1) 標的の匂いの原因物質に応答する少なくとも 1 種の嗅覚受容体ポリペプチドを準備すること、

(2) 該少なくとも 1 種の嗅覚受容体ポリペプチドに試験物質を添加して、その応答を測定すること、

(3) 該少なくとも 1 種の嗅覚受容体ポリペプチドのいずれかの応答を活性化させた該試験物質を、該標的の匂いを抑制する物質として選択すること、
を含む方法を提供する。

【 0 0 3 0 】

上記本発明の方法は、匂いの情報伝達を担う全ての嗅覚受容体ポリペプチド、及びそれらに認識される全ての匂いに適用することができる。

【 0 0 3 1 】

50

上記本発明の方法は、*in vitro*又は*ex vivo*で行われる方法であり得る。上記本発明の方法においては、まず、交差順応を引き起こしたい又は抑制したい標的的匂いについて、該標的的匂いの原因物質に応答性を有する少なくとも1種の嗅覚受容体ポリペプチドを準備する。

【0032】

本発明で使用される、標的的匂いの原因物質に応答する少なくとも1種の嗅覚受容体ポリペプチドは、嗅覚受容体ポリペプチドの集団を探索し、その中から、該標的的匂いの原因物質に応答するものを同定することによって得ることができる。同定すべき該「標的的匂いの原因物質に対する嗅覚受容体」は、該標的的匂いの原因物質の受容能力をもつ全ての嗅覚受容体である必要はなく、該標的的匂いの認識に大きな役割をもつ受容体、言い換えれば該標的的匂いの原因物質に対して比較的低い濃度から応答できる、もしくはある濃度の匂いの原因物質に対して比較的高い応答性を示す受容体であればよい。また、受容体を発現させた細胞応答の匂いの原因物質濃度依存性を求め、その結果より算出される50%効果濃度(EC50)が比較的低いものを「標的的匂いの原因物質に対する嗅覚受容体」として同定してもよい。または、受容体ポリペプチドに対する匂いの原因物質の結合を直接的に評価する場合、同定すべき「標的的匂いの原因物質に対する嗅覚受容体」は、解離定数が低いなどより高い結合能をもつ受容体であればよい。

【0033】

例えば、標的的匂いの原因物質に応答性を有する嗅覚受容体ポリペプチドは、後述の実施例1に記載されるように、参考例1～2記載の方法に従って種々の嗅覚受容体ポリペプチドによる応答をモニターし、標的的匂いの原因物質に応答を示す嗅覚受容体ポリペプチドをスクリーニングすることによって、同定することができる。

【0034】

上記本発明の方法において使用される嗅覚受容体ポリペプチドは、哺乳動物由来の嗅覚受容体ポリペプチドであればよい。哺乳動物由来の嗅覚受容体ポリペプチドの好ましい例としては、ヒト、チンパンジーをはじめとする霊長類、又は、マウス、ラットなどげっ歯類由来の嗅覚受容体ポリペプチドが挙げられ、より好ましい例としては、ヒトがもつ400以上の嗅覚受容体及びそれと同等の機能を有するポリペプチドが挙げられる。ヒト、マウス及びラットの嗅覚受容体の情報は、GenBank [www.ncbi.nlm.nih.gov]より取得することができる。

【0035】

上記探索の対象となる嗅覚受容体ポリペプチドの集団は、単一の哺乳動物種由来であってもよく、又は2種以上の異なる哺乳動物種に由来する嗅覚受容体ポリペプチドを含んでいてもよい。好ましくは、上記探索の対象となる嗅覚受容体ポリペプチドの集団は、ヒト、マウス及びラットの嗅覚受容体、ならびにそれらとアミノ酸配列において少なくとも80%同一であってかつ嗅覚受容体と同等の機能を有するポリペプチドのうちのいずれかを含み、より好ましくは、ヒト嗅覚受容体、及びそれらとアミノ酸配列において少なくとも80%同一であってかつ嗅覚受容体と同等の機能を有するポリペプチドのうちのいずれかを含む。

【0036】

本発明の方法において、上記嗅覚受容体ポリペプチドは、標的的匂いの原因物質に対する応答性を失わない限り、任意の形態で使用され得る。例えば、該嗅覚受容体ポリペプチドは、生体から単離された嗅覚受容器若しくは嗅細胞等の、該嗅覚受容体ポリペプチドを天然に発現する組織若しくは細胞、又はそれらの培養物；該嗅覚受容体ポリペプチドを担持した嗅細胞の膜；該嗅覚受容体ポリペプチドを発現するように遺伝的に操作された組換え細胞又はその培養物；該嗅覚受容体ポリペプチドを有する当該組換え細胞の膜；該嗅覚受容体ポリペプチドを有する人工脂質二重膜、などの形態で使用され得る。これらの形態は全て、本発明で使用される嗅覚受容体ポリペプチドの範囲に含まれる。

【0037】

好ましい態様において、上記嗅覚受容体ポリペプチドは、哺乳動物の嗅細胞等の上記嗅

10

20

30

40

50

覚受容体ポリペプチドを天然に発現する細胞、又は該嗅覚受容体ポリペプチドを発現するように遺伝的に操作された組換え細胞、あるいはそれらの培養物であり得る。好ましい例としては、ヒト嗅覚受容体ポリペプチドを発現するように遺伝的に操作された組換えヒト細胞が挙げられる。

【0038】

上記組換え細胞は、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。あるいは細胞内に遺伝子の転写産物を直接導入することによっても嗅覚受容体ポリペプチドを発現させることが可能である。好適には、嗅覚受容体ポリペプチドの細胞膜発現を促進するために、該嗅覚受容体ポリペプチドをコードする遺伝子とともに、RTP (receptor - transpor 10 rting protein) をコードする遺伝子を細胞に導入する。好ましくは、RTP1Sをコードする遺伝子を、該嗅覚受容体ポリペプチドをコードする遺伝子とともに細胞に導入する。RTP1Sの例としては、ヒトRTP1Sが挙げられる。ヒトRTP1Sは、GenBankにGI:50234917として登録されているタンパク質である。

【0039】

標的の匂いの種類は、特に限定されず、一般的に知られる悪臭又は不快臭（例えば、体臭、腋臭、口臭、糞便臭、尿臭、タバコ臭、カビ臭、生乾き臭、腐敗臭、生ごみ臭、汚水臭、排気臭、ダクト臭、排ガス臭、等）だけでなく、食品由来又は香料物質の匂い、その他の物質（例えば、化粧品、医薬品、洗浄剤、日用品、等）由来の匂い、などのあらゆる匂いを包含する。

【0040】

標的の匂いの原因物質は、嗅覚受容体に作用して該標的の匂いを知覚させる物質であればよい。該原因物質は、天然に存在する物質であっても、化学的若しくは生物学的方法等で人工的に合成した物質であってもよく、又は化合物であっても、組成物若しくは混合物であってもよい。好ましくは、該原因物質は揮発性物質である。該原因物質の例としては、ムスク香の原因物質であるムスコン、タバコ臭の原因物質であるグアイアコール、尿臭の原因物質であるp-クレゾール、生乾き臭の原因物質である4-メチル-3-ヘキセン酸、腋臭の原因物質である3-メルカプト-3-メチルヘキサノール、3-ヒドロキシ-3-メチルヘキサン酸及び3-メチル-2-ヘキセン酸、カビ臭の原因物質であるジオスミン及び2-メチルイソボルネオール、糞便臭又は口臭の原因物質であるスカトール及びインドール、体臭の原因物質であるノナン酸、ヘキサン酸及びイソ吉草酸、生ごみ、汚水又は排水口から発せられる悪臭の原因物質である揮発性硫黄化合物、ならびにアクリル酸ブチル、ピラジン誘導体、フラネオール、ソトロンなどが挙げられる。

【0041】

上記嗅覚受容体ポリペプチドに標的の匂いの原因物質が添加され、該原因物質に対するその応答が測定される。測定は、嗅覚受容体の応答を測定する方法として当該分野で知られている任意の方法、例えば、細胞内cAMP量測定等によって行えばよい。例えば、嗅覚受容体は、匂い分子によって活性化されると、細胞内のGsと共に役してアデニル酸シクラーゼを活性化することで、細胞内cAMP量を増加させることが知られている。したがって、該原因物質添加後の細胞内cAMP量を指標にすることで、該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ことができる。cAMP量を測定する方法としては、ELISA法、レポータージーンアッセイ等が挙げられる。嗅覚受容体ポリペプチドの応答を測定する他の方法としては、カルシウムイメージング法が挙げられる。さらに別の方法としては、電気生理学的手法による測定が挙げられる。電気生理学的測定では、例えば、嗅覚受容体ポリペプチドを他のイオンチャネルとともに共発現させた細胞（アフリカツメガエル卵母細胞等）を作製し、該細胞上のイオンチャネルの活動をパッチクランプ法、二電極膜電位固定法などで測定することにより、該嗅覚受容体ポリペプチドの応答を測定する。

【0042】

次いで測定された応答に基づいて、上記標的の匂いの原因物質に応答する嗅覚受容体ボ

10

20

30

40

50

リペプチドを同定する。応答性の評価は、該原因物質を添加した該嗅覚受容体ポリペプチド（試験群）の応答を、対照群と比較することによって行うことができる。対照群としては、異なる濃度の該原因物質を添加した該嗅覚受容体ポリペプチド、該原因物質を添加しなかった該嗅覚受容体ポリペプチド、対照物質を添加した該嗅覚受容体ポリペプチド、該原因物質を添加する前の該嗅覚受容体ポリペプチド、該嗅覚受容体ポリペプチドが発現していない細胞、などを挙げることができる。あるいは、対照群としては、該原因物質に対して応答性を有さないもしくは低い応答性を有する他の嗅覚受容体ポリペプチドが挙げられる。

【0043】

試験群における応答が対照群よりも増強されていた場合、該嗅覚受容体ポリペプチドは、標的の匂いの原因物質に応答するものとして同定される。例えば、試験群における嗅覚受容体ポリペプチドの応答が、対照群と比較して好ましくは200%以上、より好ましくは300%以上、さらに好ましくは400%以上に増強されていれば、該嗅覚受容体ポリペプチドは、標的の匂いの原因物質に応答するものとして同定される。あるいは、試験群における嗅覚受容体ポリペプチドの応答が、対照群と比較して統計学的に有意に増強されていれば、該嗅覚受容体ポリペプチドは、標的の匂いの原因物質に応答するものとして同定される。

10

【0044】

必要に応じて、同定された嗅覚受容体ポリペプチドに標的の匂いの原因物質を異なる濃度で添加して、同様の手順で応答を測定してもよい。応答が原因物質の濃度依存的に増加していれば、該嗅覚受容体ポリペプチドが標的の匂いの原因物質に応答性を有するものであると確認することができる。

20

【0045】

標的の匂いの原因物質に応答性を有する嗅覚受容体ポリペプチドが複数種見出され、それらの応答強度が互いに異なる場合、その中から、該原因物質に対して比較的高い応答性を示す1種以上の嗅覚受容体ポリペプチドをさらに選択することができる。例えば、標的の匂いの原因物質に対する応答性の高い方から1種、2種もしくは3種以上の嗅覚受容体ポリペプチドを選択することができ、またはさらに応答性の最も高い1種を選択することができる。あるいは、標的の匂いの原因物質に最も低い応答性を有する嗅覚受容体ポリペプチドを選択しないことができ、またはさらに応答性の低い方から2種以上を選択しないことができる。好適には、上記「選択する」1種以上の嗅覚受容体ポリペプチドは、上記「選択しない」嗅覚受容体ポリペプチドの各々と比べて、200%以上、好ましくは300%以上、より好ましくは400%以上の応答性を有する。あるいは、嗅覚受容体ポリペプチドの標的の匂いの原因物質に対する応答度をECSO、応答閾値などを指標として評価し、高感度の嗅覚受容体ポリペプチドを選択することができる。さらに、上記応答性および応答度の評価に基づいて、高感度かつ高応答性の嗅覚受容体ポリペプチドを選択することができる。

30

【0046】

嗅覚受容体ポリペプチドは、培養細胞などに発現させた際、その種類によって異なる基底活性を示す。そのため、嗅覚受容体ポリペプチド間で応答を比較する場合、嗅覚受容体ポリペプチドごとに応答値を基準化し、得られた基準化値について嗅覚受容体ポリペプチド間での比較を行うことが望ましい。基準化の方法としては、例えば、1種類の嗅覚受容体を発現させた細胞について、匂い刺激を行わなかった際のシグナル値を1としたときの匂い刺激に対するシグナルの相対値を求める方法、1種類の嗅覚受容体を発現させた細胞について、匂い刺激を行わなかった際のシグナル値を、匂い刺激に対するシグナル値から減算する方法、などが挙げられる。

40

【0047】

以上の手順で、標的の匂いの原因物質に応答性を有する嗅覚受容体ポリペプチドを同定することができる。斯くして、標的の匂いの原因物質に応答性を有する少なくとも1種の嗅覚受容体ポリペプチドが準備される。

50

【0048】

本発明の方法において準備される、上記少なくとも1種の嗅覚受容体ポリペプチドの例としては、標的の匂いの原因物質に応答性を有するヒト、マウス又はラットの嗅覚受容体、及びそれとアミノ酸配列において少なくとも80%同一であって、かつ該標的の匂いの原因物質に対して応答性を有するポリペプチドからなる群より選択される少なくとも1種が挙げられる。より好ましい例としては、標的の匂いの原因物質に応答性を有するヒト嗅覚受容体、及びそれとアミノ酸配列において少なくとも80%同一であって、かつ該標的の匂いの原因物質に対して応答性を有するポリペプチドからなる群より選択される少なくとも1種が挙げられる。さらに好ましい例としては、標的の匂いの原因物質に応答性を有するヒト嗅覚受容体群のうち、最も高い応答性を示す嗅覚受容体、及びそれとアミノ酸配列において少なくとも80%同一であって、かつ該標的の匂いの原因物質に対して応答性を有するポリペプチドからなる群より選択される少なくとも1種が挙げられる。なお好ましい例としては、標的の匂いの原因物質に応答性を有するヒト嗅覚受容体群のうち、最も高感度かつ高応答性を示す嗅覚受容体、及びそれとアミノ酸配列において少なくとも80%同一であって、かつ該標的の匂いの原因物質に対して応答性を有するポリペプチドからなる群より選択される少なくとも1種が挙げられる。

10

【0049】

本発明の方法において準備される上記嗅覚受容体ポリペプチドは、上記標的匂いの原因物質に対する応答性を示す少なくとも1種であればよいが、いずれか2種以上を組み合わせてもよい。

20

【0050】

例えば、本発明の方法において、標的匂いがムスク香である場合、匂い原因物質はムスク系香料であり、使用される嗅覚受容体ポリペプチドは、OR5AN1（配列番号2）、及び配列番号2で示されるアミノ酸配列と少なくとも80%同一なアミノ酸配列からなりかつムスク系香料に対して応答性を有するポリペプチドからなる群より選択される少なくとも1種である（図1参照）。

【0051】

また例えば、本発明の方法において、標的匂いがグアイアコール（2-メトキシフェノール）の匂いである場合、匂い原因物質はグアイアコールであり、使用される嗅覚受容体ポリペプチドは、OR10G4（配列番号4）、及び配列番号4で示されるアミノ酸配列と少なくとも80%同一なアミノ酸配列からなりかつグアイアコールに対して応答性を有するポリペプチドからなる群より選択される少なくとも1種である（図1参照）。

30

【0052】

グアイアコールは、タバコ臭の主な原因物質であることが知られている（特開2006-321943号公報）。したがって、本発明の方法の一実施形態においては、標的匂いはタバコ臭であり、使用される嗅覚受容体ポリペプチドは、グアイアコールの受容体であるOR10G4（配列番号4）、及び配列番号4で示されるアミノ酸配列と少なくとも80%同一なアミノ酸配列からなりかつタバコ臭原因物質、好ましくはグアイアコールに対して応答性を有するポリペプチドからなる群より選択される少なくとも1種である。

【0053】

40

本発明の方法の一実施形態において、標的匂いは尿臭である。特開2009-132770号公報には、飛び散って乾燥した尿、又は使用後放置したおむつから発する尿臭に対する最も寄与の高い成分がp-クレゾールであること、及びp-クレゾールとそれ以外の炭素数6～10のフェノール化合物との組成物により、尿臭を再現できることが記載されている。国際公開公報第2009/037861号には、菌が産生する-グルクロニダーゼが尿に作用すると、p-クレゾール又はその他の成分が尿中に増加し、尿臭強度を顕著に増加させることが記載されている。さらに本出願人は、p-クレゾールに応答する嗅覚受容体の応答性を抑える物質により、尿臭を抑制できることを見出し、特許出願を行っている（特願2015-060636）。したがって、本発明における「尿臭原因物質」の例としては、尿の-グルクロニダーゼ処理物又はその抽出物、及びp-クレゾールが

50

挙げられる。尿の - グルクロニダーゼ処理物としては、尿に - グルクロニダーゼを添加して処理したもの、尿中の菌が産生する - グルクロニダーゼが作用した尿、などが挙げられる。これらの尿処理物又はその抽出物は、p - クレゾールを含有する。

【 0 0 5 4 】

尿臭原因物質である p - クレゾールを認識する嗅覚受容体としては、O R 9 Q 2 が見出されている（図 1 及び 2 参照）。O R 9 Q 2 は、G e n B a n k に G I : 2 8 4 4 1 3 7 1 0 として登録されている、配列番号 6 で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドである。したがって好ましくは、本発明の方法において標的匂いが尿臭である場合、使用される嗅覚受容体ポリペプチドは、O R 9 Q 2 (配列番号 6) 、及び配列番号 6 で示されるアミノ酸配列と少なくとも 8 0 % 同一なアミノ酸配列からなりかつ尿臭原因物質、好ましくは p - クレゾールに対して応答性を有するポリペプチドからなる群より選択される少なくとも 1 種である。10

【 0 0 5 5 】

次いで、本発明の方法においては、上記標的の匂いの原因物質に応答性を有する嗅覚受容体ポリペプチドに対して、試験物質を添加する。

【 0 0 5 6 】

本発明の方法に使用される試験物質は、標的の匂いの交差順応を引き起こす物質として、又は標的の匂いの抑制物質として使用することを所望する物質であれば、特に限定されない。試験物質は、天然に存在する物質であっても、化学的若しくは生物学的方法等で人工的に合成した物質であってもよく、又は化合物であっても、組成物若しくは混合物であってもよい。ただし試験物質は、標的の匂いの原因物質とは異なる物質である。好ましくは、試験物質は揮発性物質であって、標的匂いとは別の匂いを有する物質である。また好ましくは、試験物質は、標的匂いとは別の匂いを有する香料である。20

【 0 0 5 7 】

続いて、上記試験物質に対する嗅覚受容体ポリペプチドの応答が測定される。測定は、標的の匂いの原因物質に対する嗅覚受容体ポリペプチドの応答の測定に関して上記で説明した方法に従って行えばよい。

【 0 0 5 8 】

次いで、測定された嗅覚受容体ポリペプチドの応答に基づいて、上記試験物質の受容体活性化作用を評価し、標的の匂いの交差順応を引き起こす試験物質を同定する。試験物質による作用の評価は、試験物質を添加した該嗅覚受容体（試験群）の応答を、対照群と比較することによって行うことができる。対照群としては、異なる濃度の試験物質を添加した該嗅覚受容体ポリペプチド、試験物質を添加しなかった該嗅覚受容体ポリペプチド、対照物質を添加した該嗅覚受容体ポリペプチド、試験物質を添加する前の該嗅覚受容体ポリペプチド、該嗅覚受容体ポリペプチドが発現していない細胞、などを挙げることができる。あるいは、対照群としては、該試験物質に対して応答性を有さないもしくは低い応答性を有する他の嗅覚受容体ポリペプチドが挙げられる。30

【 0 0 5 9 】

試験群における応答が、対照群よりも増強されていた場合、当該試験物質を、該嗅覚受容体ポリペプチドの応答を活性化する物質として評価することができる。例えば、嗅覚受容体ポリペプチドの応答に対して試験物質が及ぼす作用は、試験物質添加群と非添加群との間、試験物質添加群と対照物質添加群との間、試験物質添加前後、又は嗅覚受容体ポリペプチド発現細胞群と非発現細胞群との間で、嗅覚受容体ポリペプチドの応答を比較することによって評価することができる。嗅覚受容体ポリペプチドの応答が、試験物質添加により誘導された場合、該試験物質は、標的匂いの原因物質に応答する嗅覚受容体ポリペプチドの応答を活性化する物質として評価される。40

【 0 0 6 0 】

例えば、試験物質添加群における嗅覚受容体ポリペプチドの応答が、対照群と比較して好ましくは 2 0 0 % 以上、より好ましくは 3 0 0 % 以上、さらに好ましくは 4 0 0 % 以上に増強されていれば、該試験物質を、嗅覚受容体ポリペプチドの応答を活50

活性化する物質として評価することができる。あるいは、試験物質添加群における嗅覚受容体ポリペプチドの応答が、対照群と比較して統計学的に有意に増強されていれば、該試験物質を、嗅覚受容体ポリペプチドの応答を活性化する物質として評価することができる。

【0061】

上記で得られた標的の匂いの原因物質に応答する嗅覚受容体ポリペプチドの応答を活性化する試験物質は、該標的の匂いの交差順応を引き起こす物質として選択される。すなわち、該試験物質の存在下では、標的匂いを認識する嗅覚受容体は、活性され、続いて順応により応答性が低下するので、後から添加される標的匂いの原因物質に対する応答性を損なう。結果、該試験物質によって標的匂いの交差順応が引き起こされる。

【0062】

あるいは、上記で得られた標的の匂いの原因物質に応答する嗅覚受容体ポリペプチドの応答を活性化する試験物質は、該標的の匂いを抑制する物質として選択される。すなわち、該試験物質は、標的の匂いの交差順応を引き起こすことによって、該標的の匂いを抑制することができる物質である。

【0063】

本発明の方法においては、必要に応じて、上記手順にて選択された試験物質を官能試験にかけ、その交差順応能、又は標的の匂いの抑制能をさらに評価してもよい。官能試験は、当該分野で通常行われる消臭剤の評価手順に準じて行われ得るが、好ましくは、試験物質が交差順応誘導物質であることを考慮して、評価者に対する試験物質と標的の匂い原因物質の適用順序が調整される。例えば、本発明による官能試験では、評価者は、最初に上記手順にて選択された候補試験物質の匂いを嗅ぎ、その匂いに順応しておく。次いで該評価者は、標的の匂いを嗅ぎ、その強度を評価する。得られた評価結果は、試験物質に順応させなかった場合の標的の匂いの強度と比較される。官能試験の結果、標的の匂いの強度を低下させたと評価された試験物質は、該標的の匂いに対して交差順応を起こさせる物質、又は該標的の匂いを抑制する物質として選択される。

【0064】

本発明の方法によって選択された物質は、交差順応に基づいて標的の匂いを抑制することができる物質である。本発明の方法によって得られた標的の匂いを抑制する物質を使用する場合の一実施形態は、以下のとおりである：まず、標的の匂いの抑制を所望する対象者に、該対象者が標的の匂いに曝露される前に、該標的の匂いを抑制する物質の匂いを嗅がせておく。あるいは、該対象者に対し、標的の匂いよりも強い匂いとなるように該標的の匂いを抑制する物質を適用する。その結果、該対象者は、標的の匂いに曝露されても、該標的の匂いに対する嗅覚感受性が低下しているため、該標的の匂いを弱いと感じるか、又は感じなくなる。本発明で得られた標的の匂いを抑制する物質の適用例としては、トイレの前又は中への該物質の載置；病棟又は介護施設などで排泄の処置に関わる者に、該物質を携行させたり、該処置の前に該物質を曝露したりする方法；該物質を含んだ紙おむつ又は生理用品；該物質を含んだ肌着、下着、リネン類等の服飾類、布製品、又は織物；該物質を含んだ洗濯用洗剤又は柔軟剤；該物質を含んだ香粧品、洗浄剤、デオドラント等の外用剤、医薬品、食品、等；標的の匂いを有する製品の製造ライン若しくは標的の匂いを発生する環境への適用、などが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0065】

本発明の例示的実施形態として、さらに以下の物質、製造方法、用途あるいは方法を本明細書に開示する。ただし、本発明はこれらの実施形態に限定されない。

【0066】

<1> 標的の匂いの交差順応を引き起こす物質の選択方法であって、
 (1) 嗅覚受容体ポリペプチドを探索し、標的の匂いの原因物質に応答するものを同定すること、
 (2) 該同定された嗅覚受容体ポリペプチドに試験物質を添加して、その応答を測定すること、
 (3) 該嗅覚受容体ポリペプチドの応答を活性化させた該試験物質を、該標的の匂いの交

10

20

30

40

50

差順応を引き起こす物質として選択すること、
を含む、方法。

【0067】

<2>標的の匂いを抑制する物質の選択方法であって、
(1)嗅覚受容体ポリペプチドを探索し、標的の匂いの原因物質に応答するものを同定すること、
(2)該同定された嗅覚受容体ポリペプチドに試験物質を添加して、その応答を測定すること、
(3)該嗅覚受容体ポリペプチドの応答を活性化させた該試験物質を、該標的の匂いを抑制する物質として選択すること、
を含む、方法。

【0068】

<3>好ましくは、上記(1)で探索される嗅覚受容体ポリペプチドが、ヒト、マウス及びラットの嗅覚受容体、ならびにそれらとアミノ酸配列において少なくとも80%同一であってかつ嗅覚受容体と同等の機能を有するポリペプチドのうちのいずれかを含む、嗅覚受容体ポリペプチドの集団である、<1>又は<2>記載の方法。

【0069】

<4>標的の匂いの交差順応を引き起こす物質の選択方法であって、
(1)標的の匂いの原因物質に応答する少なくとも1種の嗅覚受容体ポリペプチドを準備すること、
(2)該少なくとも1種の嗅覚受容体ポリペプチドに試験物質を添加して、その応答を測定すること、
(3)該少なくとも1種の嗅覚受容体ポリペプチドのいずれかの応答を活性化させた該試験物質を、該標的の匂いの交差順応を引き起こす物質として選択すること、
を含む、方法。

【0070】

<5>標的の匂いを抑制する物質の選択方法であって、
(1)標的の匂いの原因物質に応答する少なくとも1種の嗅覚受容体ポリペプチドを準備すること、
(2)該少なくとも1種の嗅覚受容体ポリペプチドに試験物質を添加して、その応答を測定すること、
(3)該少なくとも1種の嗅覚受容体ポリペプチドのいずれかの応答を活性化させた該試験物質を、該標的の匂いを抑制する物質として選択すること、
を含む、方法。

【0071】

<6>好ましくは、上記少なくとも1種の嗅覚受容体ポリペプチドが、以下からなる群より選択される少なくとも1種である、<4>又は<5>記載の方法：

ラット若しくはマウス嗅覚受容体；

ヒト嗅覚受容体；及び

該ラット、マウス若しくはヒト嗅覚受容体とアミノ酸配列において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、さらにより好ましくは98%以上、なお好ましくは99%以上同一であって、かつ上記標的の匂いの原因物質に対して応答性を有するポリペプチド。

【0072】

<7>好ましくは、上記嗅覚受容体ポリペプチドが、該嗅覚受容体ポリペプチドを発現するように遺伝的に操作された組換え細胞上に発現されている、<1>～<6>のいずれか1項記載の方法。

【0073】

<8>好ましくは、上記嗅覚受容体ポリペプチドの応答が、ELISA若しくはレポータージーンアッセイによる細胞内cAMP量測定、あるいはカルシウムイメージング又は電

10

20

30

40

50

気生理学的手法により測定される、<1>～<7>のいずれか1項記載の方法。

【0074】

<9>好ましくは、(4)官能試験により、上記(3)で選択された物質の中から、上記標的の匂いに対して交差順応を起こさせる物質、又は上記標的の匂いを抑制する物質を選択すること、

をさらに含む、<1>～<8>のいずれか1項記載の方法。

【0075】

<10><1>～<9>のいずれか1項記載の方法であって、好ましくは、上記標的の匂いがタバコ臭又は尿臭である、方法。

【0076】

<11><4>～<9>のいずれか1項記載の方法であって、好ましくは、上記標的の匂いがタバコ臭であり、かつ

上記少なくとも1種の嗅覚受容体ポリペプチドが、以下：

配列番号4で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド；及び

配列番号4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、さらにより好ましくは98%以上、なお好ましくは99%以上同一であって、かつタバコ臭原因物質に対して応答性を有するポリペプチド、

からなる群より選択される少なくとも1種である、方法。

【0077】

<12><4>～<9>のいずれか1項記載の方法であって、好ましくは、上記標的の匂いが尿臭であり、かつ

上記少なくとも1種の嗅覚受容体ポリペプチドが、以下：

配列番号6で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド；及び

配列番号6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、さらにより好ましくは98%以上、なお好ましくは99%以上同一であって、かつ尿臭原因物質に対して応答性を有するポリペプチド、

からなる群より選択される少なくとも1種である、方法。

【0078】

<13><1>～<12>のいずれか1項記載の方法であって、好ましくは、上記試験物質が上記標的の匂いの原因物質とは異なる物質である、方法。

【0079】

<14><1>～<13>のいずれか1項記載の方法であって、好ましくは、上記標的の匂いの原因物質に対して応答性を示す少なくとも1種の嗅覚受容体ポリペプチドの中から、該原因物質に対して高い応答性を示すものを選択し、標的の匂いの原因物質に応答する嗅覚受容体ポリペプチドとして同定することをさらに含む、方法。

【実施例】

【0080】

以下、実施例を示し、本発明をより具体的に説明する。

【0081】

参考例1 ヒト嗅覚受容体発現細胞の調製

1) ヒト嗅覚受容体遺伝子のクローニング

GenBankに登録されている配列情報を基に、表1-1及び1-2に記載の370種のヒト嗅覚受容体をコードする各遺伝子、及びヒト嗅覚受容体OR5AN1、OR10G4、OR9Q2をコードする遺伝子(それぞれ、配列番号1、3、5)をクローニングした。各遺伝子は、human genomic DNA female (G1521:Promega)を鑄型としたPCR法によりクローニングした。PCR法により増幅した各遺伝子をpENTRベクター(Invitrogen)にマニュアルに従って組み込み、pENTRベクター上に存在するNotI、AscIサイトを利用して、pME18

10

20

30

40

50

Sベクター上のFlag-Rhoタグ配列の下流に作製したNote、Accessサイトへと組換えた。

【0082】

【表1-1】

| 実施例に用いた嗅覚受容体一覧（名称はGenBank [www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/]に従う） | | | | | | | |
|---|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| OR1A1 | OR2D2 | OR4A16 | OR4X2 | OR5T2 | OR8B4 | OR10H3 | OR51F1 |
| OR1A2 | OR2D3 | OR4A47 | OR5A1 | OR5T3 | OR8B8 | OR10H4 | OR51F2 |
| OR1B1 | OR2F1 | OR4B1 | OR5A2 | OR5U1 | OR8B12 | OR10H5 | OR51G1 |
| OR1C1 | OR2F2 | OR4C3 | OR5AC2 | OR5V1 | OR8D1 | OR10J1 | OR51G2 |
| OR1D2 | OR2G2 | OR4C6 | OR5AK2 | OR5W2 | OR8D2 | OR10J3 | OR51I1 |
| OR1D4 | OR2G3 | OR4C11 | OR5AN1 | OR6A2 | OR8D4 | OR10J5 | OR51I2 |
| OR1D5 | OR2G6 | OR4C12 | OR5AP2 | OR6B1 | OR8G1 | OR10K1 | OR51L1 |
| OR1E1 | OR2H1 | OR4C13 | OR5AR1 | OR6B2 | OR8G2 | OR10K2 | OR51M1 |
| OR1E2 | OR2H2 | OR4C15 | OR5AS1 | OR6B3 | OR8G5 | OR10P1 | OR51Q1 |
| OR1F1 | OR2J2 | OR4C16 | OR5AT1 | OR6C1 | OR8H1 | OR10Q1 | OR51S1 |
| OR1G1 | OR2J3 | OR4C45 | OR5AU1 | OR6C2 | OR8H2 | OR10R2 | OR51T1 |
| OR1I1 | OR2K2 | OR4C46 | OR5B2 | OR6C3 | OR8H3 | OR10S1 | OR51V1 |
| OR1J1 | OR2L2 | OR4D1 | OR5B3 | OR6C4 | OR8I2 | OR10T2 | OR52A1 |
| OR1J2 | OR2L3 | OR4D2 | OR5B12 | OR6C6 | OR8J1 | OR10V1 | OR52A4 |
| OR1J4 | OR2L8 | OR4D5 | OR5B17 | OR6C65 | OR8J3 | OR10W1 | OR52A5 |
| OR1K1 | OR2L13 | OR4D6 | OR5B21 | OR6C68 | OR8K1 | OR10X1 | OR52B2 |
| OR1L1 | OR2M2 | OR4D9 | OR5BF1 | OR6C70 | OR8K3 | OR10Z1 | OR52B4 |
| OR1L3 | OR2M3 | OR4D10 | OR5BU1 | OR6C74 | OR8K5 | OR11A1 | OR52B6 |
| OR1L4 | OR2M4 | OR4D11 | OR5C1 | OR6C75 | OR8U1 | OR11G2 | OR52D1 |
| OR1L6 | OR2M5 | OR4E2 | OR5D13 | OR6C76 | OR8U8 | OR11H1 | OR52E2 |
| OR1L8 | OR2M7 | OR4F3 | OR5D14 | OR6F1 | OR8U9 | OR11H4 | OR52E4 |
| OR1M1 | OR2S2 | OR4F4 | OR5D16 | OR6K2 | OR9A2 | OR11H6 | OR52E6 |
| OR1N1 | OR2T1 | OR4F5 | OR5D18 | OR6K3 | OR9A4 | OR11L1 | OR52E8 |
| OR1N2 | OR2T2 | OR4F6 | OR5F1 | OR6K6 | OR9G1 | OR12D2 | OR52H1 |

10

20

30

【表1-2】

| 実施例に用いた嗅覚受容体一覧（名称は GenBank [www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/]に従う） | | | | | | | |
|--|--------|--------|--------|--------|---------|--------|--------|
| OR1Q1 | OR2T3 | OR4F15 | OR5H1 | OR6M1 | OR9G4 | OR12D3 | OR52I1 |
| OR1S1 | OR2T4 | OR4F16 | OR5H2 | OR6N1 | OR9G9 | OR13A1 | OR52I2 |
| OR1S2 | OR2T5 | OR4F17 | OR5H6 | OR6N2 | OR9I1 | OR13C2 | OR52J3 |
| OR2A1 | OR2T6 | OR4F21 | OR5H14 | OR6Q1 | OR9K2 | OR13C3 | OR52K1 |
| OR2A2 | OR2T8 | OR4F29 | OR5H15 | OR6S1 | OR9Q1 | OR13C4 | OR52K2 |
| OR2A4 | OR2T10 | OR4K1 | OR5I1 | OR6T1 | OR9Q2 | OR13C5 | OR52L1 |
| OR2A5 | OR2T11 | OR4K2 | OR5J2 | OR6V1 | OR10A2 | OR13C8 | OR52M1 |
| OR2A7 | OR2T12 | OR4K5 | OR5K1 | OR6X1 | OR10A3 | OR13C9 | OR52N1 |
| OR2A12 | OR2T27 | OR4K13 | OR5K2 | OR6Y1 | OR10A4 | OR13D1 | OR52N2 |
| OR2A14 | OR2T29 | OR4K14 | OR5K3 | OR7A5 | OR10A5 | OR13F1 | OR52N5 |
| OR2A25 | OR2T33 | OR4K15 | OR5K4 | OR7A10 | OR10A6 | OR13G1 | OR52R1 |
| OR2A42 | OR2T34 | OR4K17 | OR5L1 | OR7A17 | OR10A7 | OR13H1 | OR52W1 |
| OR2AE1 | OR2V2 | OR4L1 | OR5L2 | OR7C1 | OR10AD1 | OR13J1 | OR56A1 |
| OR2AG1 | OR2W1 | OR4M1 | OR5M1 | OR7C2 | OR10AG1 | OR51A2 | OR56A3 |
| OR2AG2 | OR2W3 | OR4M2 | OR5M3 | OR7D2 | OR10C1 | OR51A4 | OR56A4 |
| OR2AK2 | OR2W5 | OR4N2 | OR5M8 | OR7D4 | OR10G2 | OR51A7 | OR56B1 |
| OR2AT4 | OR2Z1 | OR4N4 | OR5M9 | OR7E24 | OR10G3 | OR51B2 | OR56B4 |
| OR2B11 | OR3A1 | OR4N5 | OR5M10 | OR7G1 | OR10G4 | OR51B4 | |
| OR2B2 | OR3A2 | OR4P4 | OR5M11 | OR7G2 | OR10G7 | OR51B5 | |
| OR2B3 | OR3A3 | OR4Q3 | OR5P2 | OR7G3 | OR10G8 | OR51B6 | |
| OR2B6 | OR3A4 | OR4S1 | OR5P3 | OR8A1 | OR10G9 | OR51D1 | |
| OR2C1 | OR4A5 | OR4S2 | OR5R1 | OR8B2 | OR10H1 | OR51E1 | |
| OR2C3 | OR4A15 | OR4X1 | OR5T1 | OR8B3 | OR10H2 | OR51E2 | |

【0083】

2) pME18S - ヒト RTP1S ベクターの作製

ヒト RTP1S をコードする遺伝子を pME18S ベクターの EcoRI、XbaI サイドへ組み込んだ。

【0084】

3) 嗅覚受容体発現細胞の作製

実施例1の1)では、ヒト嗅覚受容体370種をそれぞれ発現させたHEK293細胞を作製した。表2に示す組成の反応液を調製しクリーンベンチ内で15分静置した後、384ウェルプレート(BioCoat)の各ウェルに4.4 μLずつ添加した。次いで、HEK293細胞(20 × 10⁴細胞/cm²)を40 μLずつ各ウェルに播種し、37、5%CO₂を保持したインキュベータ内で24時間培養した。

【0085】

【表2】

| | | |
|--|----------------|----|
| DMEM (4.5g/l Glucose) with L-Gln and Sodium Pyruvate, liquid (ナカライトスク) | 2.2 μ L | 10 |
| TE (pH8.0: 10mMTris-HCl, 1mM EDTA, ニッポンジーン) | 2.2 μ L | |
| ヒト嗅覚受容体遺伝子(N 末端に Flag-Rho タグが付加された pME18S ベクターに組み込まれたもの) | 0.029 μ g | |
| pGL4.29 (fluc2P-CRE-hygro, Promega) | 0.022 μ g | |
| pGL4.75 (hRluc-CMV, Promega) | 0.0012 μ g | |
| pME18S-ヒト RTP1S ベクター | 0.012 μ g | |
| lipofectamine 2000 (Invitrogen) or PEI-MAX (Polyscience) | 0.16 μ L | |

【0086】

実施例1の2)及び実施例2、3では、ヒト嗅覚受容体OR5AN1、OR10G4、OR9Q2又はOR1A1を発現させたHEK293細胞を作製した。表3に示す組成の反応液を調製しクリーンベンチ内で15分静置した後、96ウェルプレート(BioCoat)の各ウェルに10 μ Lずつ添加した。次いで、HEK293細胞(3 \times 10⁵細胞/cm²)を90 μ Lずつ各ウェルに播種し、37℃、5%CO₂を保持したインキュベータ内で24時間培養した。対照区として用いるために、嗅覚受容体を発現させない条件の細胞(Mock)も用意し、同様に実験に用いた。 20

【0087】

【表3】

| | | |
|--|---------------|----|
| DMEM ((4.5g/l Glucose) with L-Gln and Sodium Pyruvate, liquid, ナカライトスク) | 10 μ L | 30 |
| ヒト嗅覚受容体遺伝子(OR5AN1、OR10G4、OR9Q2、OR1A1のいずれか)(N 末端に Flag-Rho タグが付加された pME18S ベクターに組み込まれたもの) | 0.075 μ g | |
| pGL4.29 (fluc2P-CRE-hygro, Promega) | 0.03 μ g | |
| pGL4.75 (hRluc-CMV, Promega) | 0.03 μ g | |
| pME18S-ヒト RTP1S ベクター | 0.03 μ g | |
| lipofectamine 2000 (Invitrogen) or PEI-MAX (Polyscience) | 0.41 μ L | |

【0088】

参考例2 ルシフェラーゼアッセイ
HEK293細胞に発現させた嗅覚受容体は、細胞内在性のG_sと共にアデニル酸シクラーゼを活性化することで、細胞内cAMP量を増加させる。本研究での匂い応答測定には、細胞内cAMP量の増加をホタルルシフェラーゼ遺伝子(fluc2P-CRE-hygro)由来の発光値としてモニターするルシフェラーゼレポータージーンアッセイを用いた。また、CMVプロモータ下流にウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子を融合させたもの(hRluc-CMV)を同時に遺伝子導入し、遺伝子導入効率又は細胞数の誤差を補正する内部標準として用いた。ルシフェラーゼの活性測定には、Dual-Glo™ luciferase assay system(Promega)を用い、製品の操作マニュアルに従って測定を行った。各種刺激条件について、ホタルルシフェラーゼ由来の発光値をウミシイタケルシフェラーゼ由来の発光値で除した値fLuc/hRlucを算出した。匂い物質刺激により誘導されたfLuc/hRlucを、匂い物質刺激を 40

行わない細胞での f L u c / h R l u c で割った値を fold increase として算出し、応答強度の指標とした。用量作用曲線の解析は Graph Pad Prism を用いて行った。

【0089】

参考例3 勃い物質

匂い物質としては、以下を使用した。

Musccone ((R)-3-methyl-1-cyclopentadecano ne; MP Biomedical社)、

Musk xylol (1-tert-butyl-3,5-dimethyl-2,4,6-trinitrobenzene; 東京化成工業社)、

Muscenone delta (3-methyl-5-cyclopentadecen-1-one; FIRMINICH社)、

Globanone (Cyclohexadec-8-en-1-one; SYMRISE社)、

Exaltolide (登録商標) (16-oxacyclohexadecan-1-one; FIRMINICH社)、

Ambrettolide (17-oxacycloheptadec-6-en-1-one; Sigma-Aldrich社)、

Phenyl ethyl alcohol (PEA) (2-Phenylethanol; Sigma-Aldrich社)、

Lyral (登録商標) (4-(4-Hydroxy-4-methyl-pentyl)-cyclohex-3-enecarbaldehyde; 高砂香料社又はIFF社)

Cis-3-hexenol (Sigma-Aldrich社)、

Guaiacol (2-methoxyphenol; 東京化成工業社)、

Ethylvanillin (3-ethoxy-4-hydroxybenzaldehyde; Sigma-Aldrich社)、

p-Cresol

p-Cresyl acetate ((4-Methylphenyl)acetate; 東京化成工業社)、

p-Cresyl iso butyrate (p-Tolyl isobutyrate、又は(4-Methylphenyl)2-methylpropanoate; 東京化成工業社)、

p-Methyl quinoline (6-Methyl quinoline; Sigma-Aldrich社)

【0090】

実施例1 勃い物質に対する嗅覚受容体応答

1) 勃い物質に応答する嗅覚受容体の同定

参考例1に従って作製した嗅覚受容体発現細胞の培養物から培地を取り除き、匂い物質 (Musccone、Guaiacol又はp-Cresol) を添加した。Musccone若しくはグアイアコールを含むDMEM培地 (Nacalai) を、該培養物を含む384ウェルプレートの各ウェルに 30 μL ずつ添加した (最終濃度: Musccone 100 μM、Guaiacol 1 mM)。また p-Cresol を含むCD293培地 (Invitrogen) を、該培養物を含む96ウェルプレートの各ウェルに 75 μL ずつ添加した (最終濃度 1 mM)。細胞を CO₂ インキュベータ内で 2.5 ~ 3 時間培養し、ルシフェラーゼ遺伝子を細胞内で十分に発現させた後、参考例2の手法でルシフェラーゼアッセイを行い、匂い物質に対する嗅覚受容体の応答強度 (fold increase) を測定した。

【0091】

結果を図1に示す。縦軸は、匂い刺激なしの条件での応答強度を1としたときの、各受

10

20

30

40

50

容体発現細胞の匂い刺激に対する相対応答強度を表す。Muscone、Guaiacol及びp-Cresolに対して最も高い応答性をもたらす受容体として、OR5AN1、OR10G4、OR9Q2がそれぞれ同定された。

【0092】

2) 嗅覚受容体応答の匂い物質濃度依存性

参考例1、2記載の方法に従って、異なる濃度のp-Cresolに対するOR9Q2の応答を測定した。その結果、OR9Q2はp-クレゾール濃度依存的な応答を示し、p-Cresol受容体であることが確認された(図2)。

【0093】

実施例2 嗅覚受容体に対する匂い物質の作用

10

1) 嗅覚受容体応答の測定

参考例1に従って作製した嗅覚受容体発現細胞の培養物から、培地を取り除き、DME M培地(ナカライトスク)で0.3 μMから100 μMに調製した匂い物質を含む溶液を75 μL添加した。細胞をCO₂インキュベータ内で3~4時間培養し、ルシフェラーゼ遺伝子を細胞内で十分に発現させた後、参考例2の手法でルシフェラーゼアッセイを行い、匂い物質に対する嗅覚受容体の応答強度(fold increase)を測定した。

【0094】

2) 結果

OR5AN1は、ムスク系香料に応答する嗅覚受容体である。OR5AN1に対して9種の物質を適用した結果、その応答を活性化させる物質として、Musconeに加えて、Musk xylol、Muscenone delta、Globanone、及びExaltolide(登録商標)が見出された。OR5AN1は、これらの物質に対して濃度依存的に応答した(図3)。これらの応答は、OR5AN1を発現させない細胞(Mock)では認められなかったことから、OR5AN1に依存したものである。一方、Ambrettolide、Phenyl ethyl alcohol(PEA)、Lyral(登録商標)、及びCis-3-hexanolは、OR5AN1の応答を引き起こさなかった。

20

一方で、Musconeに対してOR5AN1よりも弱い応答性を示したOR1A1(図1)は、PEA及びCis-3-hexanolによっても活性化された(図4)。

OR10G4については、GuaiacolとEthylvanillinに対する応答性を有することが確認された(図5A)。

30

OR9Q2については、図2にも示したとおり尿臭原因物質であるp-Cresolに対する応答性が確認されるとともに、さらにp-Cresyl Acetate、p-Cresyl iso butyrate、及びp-Methyl quinolineに対する応答性が見出された(図5B)。一方、OR10G4及びOR9Q2はいずれも、Musconeに対する応答性をもたないことが判明した(図5C)。

【0095】

実施例3 匂い物質による交差順応作用の官能評価

1) 方法

実施例2で評価した匂い物質による交差順応作用を、官能試験によって評価した。ガラス瓶(柏洋硝子No.11、容量110mL)に標的匂い物質を加え、標的サンプルとした。標的匂い物質としては、Muscone、Guaiacol又はp-Cresolを用いた。Musconeは、綿球に1mgを染み込ませたものを用いた。Guaiacolとp-Cresolはどちらも、10ppm濃度のミネラルオイル(Sigma-Aldritch)溶液1mLを用いた。同様の手順で、試験物質をガラス瓶に加え、試験サンプルとした。試験物質としては、5mgのEthylvanillin粉末、又は1000ppmに調製したp-Cresyl Acetate、p-Cresyl iso butyrate、若しくはp-Methyl quinolineのミネラルオイル(Sigma-Aldritch)溶液1mLを用いた。

40

官能試験はパネラー5~8名で単盲方式にて行った。パネラーに、まず標的サンプルを

50

呈示し、その匂い強度を回答させた。次に、試験サンプルを2分間、あるいは匂いが感知できなくなるまで呈示した。その後、改めて標的サンプルを提示し、その匂い強度を評価させた。これを1セットとし、1日に1人あたり4セットを上限として行った。各セット間には少なくとも10分以上の休憩を設けた。

評価した標的匂いの強度は、両端にそれぞれ「No Odor」、「Strong Odor」と尺度を示した9.5cmの直線上に記入させた。最初の評価での標的匂い強度記入位置とNo Odorとの距離(A)と、2回目の評価での標的匂い強度記入位置とNo Odorとの距離(B)を求め、最初の評価に対する%匂い強度(% Odor intensity of initial estimate) [B / A * 100 - 100]を算出した。この値が低いほど、2回目に嗅いだ標的匂いの強度が1回目に比べて強く抑制された、すなわち強く交差順応したことを表す。この値が-100%である場合、2回目に標的匂いが全く感じられなかったことを意味する。
10

【0096】

2) 結果

官能試験の結果を図6に示す。ムスコンに対しては、OR5AN1を活性化した4つの匂い物質はいずれも交差順応を引き起こし、一方、OR5AN1を活性化しなかった4つの匂い物質は全て交差順応を引き起こさなかった(図6A)。特に、低応答性のムスコン受容体であるOR1A1を活性化したPEAとCis-3-hexanolがムスコンに対して交差順応を起こさなかったことから、交差順応を起こすためには比較的高い応答性をもつ受容体を標的とすることが重要であることが判明した。また、Ambrettoleideは、ムスコンと良く似た質の匂いを示すのにも関わらず、交差順応を起こさなかった。このことから、匂いの交差順応は匂いの質が認識される高次脳領域よりも末梢側で生じていることが示唆され、匂いの交差順応が嗅覚受容体レベルで説明できるという本発明の原理が支持された。
20

【0097】

Guaiacolの匂いに対して最も応答性が高い嗅覚受容体はOR10G4である(図1)。官能試験の結果、Guaiacolの匂いは、OR10G4を活性化するEthyl vanillinによって交差順応させられることが判明した(図6B)。一方、Guaiacolの匂いは、OR10G4を活性化しないMusconeによって交差順応を起こさず、またEthyl vanillinの匂いもMusconeによって交差順応を起こさなかった。この結果より、標的匂いの原因物質に高反応性の嗅覚受容体で認識される別の物質は、該標的匂いの交差順応を起こすという原則がOR10G4に関しても適用できることが示された。
30

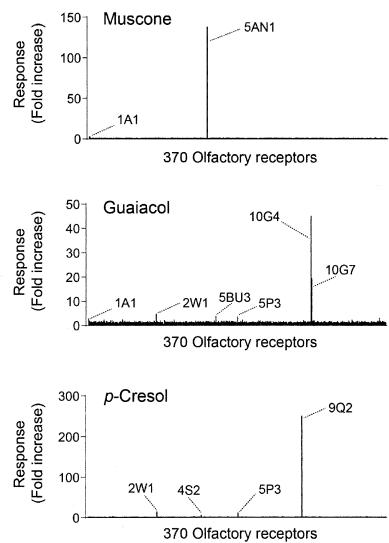
【0098】

当該原則に普遍性があることを検証するために、p-Cresol-OR9Q2ペアに関してもOR9Q2を活性化する別の匂い物質により交差順応が起こるかを調べた。その結果、p-Cresolの匂いに対しては、p-Cresol受容体OR9Q2を活性化するp-Cresyl Acetate、p-Cresyl iso butyrate、及びp-Methyl quinolineが交差順応を引き起こした(図6C)。一方、OR9Q2を活性化しないMusconeは、p-Cresolの匂いに対しても、p-Cresyl Acetate、p-Cresyl iso butyrate、及びp-Methyl quinolineの匂いに対しても、いずれも交差順応を起こさなかった。
40

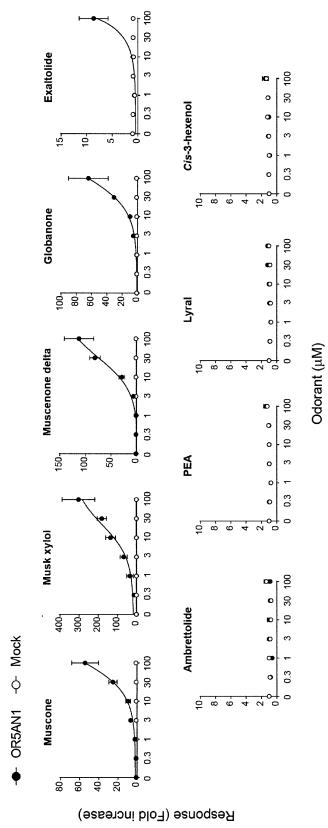
【0099】

以上の結果より、匂いの交差順応と、嗅覚受容体の活性化との因果関係が実証され、標的匂いの原因物質に対して高い応答性をもつ嗅覚受容体を活性化し脱感作させられる物質が標的匂いの交差順応を引き起こすという原則が初めて明らかになった。この原則に基づいて、本発明は、嗅覚受容体の応答の活性化を指標として、交差順応に基づいて標的匂いを抑制することができる匂い物質を同定するという新規な方法を提供する。

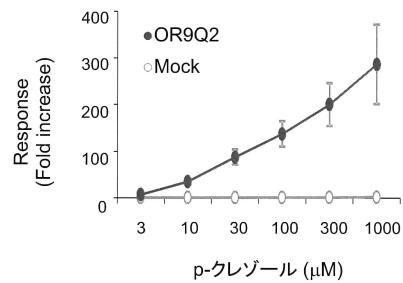
【図1】



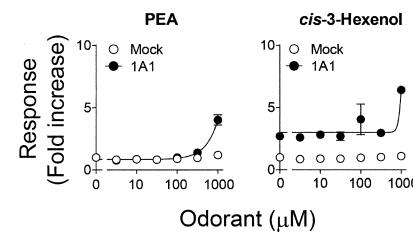
【図3】



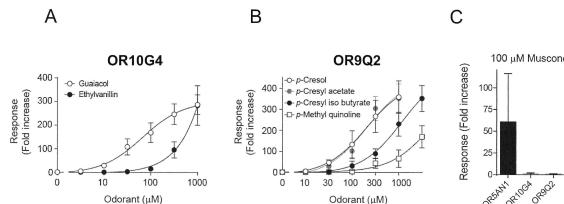
【図2】



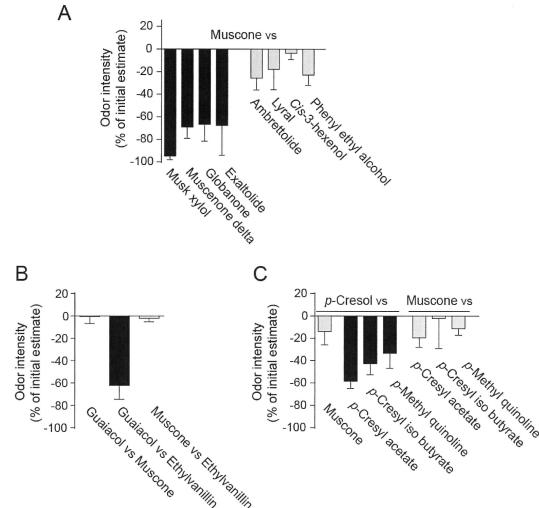
【図4】



【図5】



【図6】



【配列表】

0006114439000001.app

フロントページの続き

(72)発明者 吉川 敬一

栃木県芳賀郡市貝町赤羽2606 花王株式会社研究所内

(72)発明者 斎藤 菜穂子

栃木県芳賀郡市貝町赤羽2606 花王株式会社研究所内

審査官 戸来 幸男

(56)参考文献 国際公開第2012/029922 (WO, A1)

国際公開第2012/169644 (WO, A1)

特開2014-235098 (JP, A)

特開2005-053887 (JP, A)

米国特許出願公開第2007/0020210 (US, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12Q 1/02

G01N 33/15

G01N 33/50

C12N 15/00 - 15/90

C07K 14/705

UniProt/GenSeq

Capplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/

WPI/DS(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

PubMed