

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5225986号  
(P5225986)

(45) 発行日 平成25年7月3日(2013.7.3)

(24) 登録日 平成25年3月22日(2013.3.22)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
C O 7 K 19/00 (2006.01)	C O 7 K 19/00
C O 7 K 14/705 (2006.01)	C O 7 K 14/705
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19

請求項の数 25 (全 43 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2009-515685 (P2009-515685)	(73) 特許権者	501105842
(86) (22) 出願日	平成19年6月15日 (2007.6.15)		ジボダン エス エー
(65) 公表番号	特表2009-540804 (P2009-540804A)		スイス国 1 2 1 4 ヴェルニエ、 シュ
(43) 公表日	平成21年11月26日 (2009.11.26)		マン ド ラ パルフュムリー 5番
(86) 国際出願番号	PCT/CH2007/000297	(74) 代理人	100102842
(87) 国際公開番号	W02007/147275		弁理士 葛和 清司
(87) 国際公開日	平成19年12月27日 (2007.12.27)	(74) 代理人	100135943
審査請求日	平成22年6月4日 (2010.6.4)		弁理士 三橋 規樹
(31) 優先権主張番号	60/814, 866	(72) 発明者	スラック, ジェイ, パトリック
(32) 優先日	平成18年6月19日 (2006.6.19)		アメリカ合衆国 オハイオ州 4 5 1 4 0
(33) 優先権主張国	米国 (US)		、ラブランド、ストーンブリッジ ドライ
(31) 優先権主張番号	60/881, 402		ブ 9 9 2 5
(32) 優先日	平成19年1月19日 (2007.1.19)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)	審査官	渡邊 潤也

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 核酸、ポリペプチドおよびその利用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

少なくとも1つの甘味料または甘味増強剤と結合可能なCSR::T1Rキメラタンパク質であって、配列番号2または配列番号20と少なくとも90%の配列同一性を有するCSR::T1R2ポリペプチド、および配列番号4または配列番号22と少なくとも90%の配列同一性を有するCSR::T1R3ポリペプチドからなる群から選択される1または2のCSR::T1Rポリペプチドを含む、前記CSR::T1Rキメラタンパク質。

【請求項 2】

CSR::T1R2 / CSR::T1R3ヘテロダイマーキメラタンパク質、CSR::T1R2 / T1R3ヘテロダイマーキメラタンパク質、およびT1R2 / CSR::T1R3ヘテロダイマーキメラタンパク質からなる群から選択されるヘテロダイマータンパク質を形成する2つのポリペプチドサブユニットを含み、ヘテロダイマーのT1R2サブユニットが配列番号8と少なくとも90%の配列同一性を有するポリペプチドを含有し、ヘテロダイマーのT1R3サブユニットが配列番号10と少なくとも90%の配列同一性を有するポリペプチドを含む、請求項1に記載のCSR::T1Rキメラタンパク質。

【請求項 3】

CSR::T1R2 - a / CSR::T1R3 - aヘテロダイマータンパク質、CSR::T1R2 - b / CSR::T1R3 - bヘテロダイマータンパク質、CSR::T1R2 - a / CSR::T1R3 - bヘテロダイマータンパク質、CSR::T1R2 - b

10

20

／CSR：：T1R3 - aヘテロダイマータンパク質からなる群から選択されるCSR：  
：T1R2／CSR：：T1R3ヘテロダイマーキメラタンパク質を含む、請求項2に記載の2つのポリペプチドサブユニットを含むCSR：：T1Rキメラタンパク質であって、

CSR：：T1R2 - aのアミノ酸配列が、配列番号2と少なくとも90%の配列同一性を有し、CSR：：T1R2 - bのアミノ酸配列が、配列番号20と少なくとも90%の配列同一性を有し、CSR：：T1R3 - aのアミノ酸配列が、配列番号4と少なくとも90%の配列同一性を有し、およびCSR：：T1R3 - bのアミノ酸配列が、配列番号22と少なくとも90%の配列同一性を有する、前記CSR：：T1Rキメラタンパク質。

10

【請求項4】

少なくとも1つの甘味料または甘味増強剤と結合することができる請求項1に記載のCSR：：T1Rキメラタンパク質をコードする核酸であって、

配列番号1 (CSR：：T1R2 - a)、配列番号19 (CSR：：T1R2 - b)、配列番号3 (CSR：：T1R3 - a) および配列番号21 (CSR：：T1R3 - b) からなる群から選択される核酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有する核酸、

50%のホルムアミド、5xSSC、および1%のSDSからなる溶液中で42の温度で、および0.2xSSCおよび0.1%のSDSからなる溶液中で65で洗浄されるというストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で、配列番号1 (CSR：：T1R2 - a)、配列番号19 (CSR：：T1R2 - b)、配列番号3 (CSR：：T1R3 - a) および配列番号21 (CSR：：T1R3 - b) からなる群から選択される核酸配列を有する核酸とハイブリダイズする核酸、

20

配列番号2または配列番号20と少なくとも90%以上の配列同一性を有するCSR：：T1R2ポリペプチドをコードする核酸、および

配列番号4または配列番号22と少なくとも90%以上の配列同一性を有するCSR：：T1R3ポリペプチドをコードする核酸の1種または2種以上を含む、前記核酸。

【請求項5】

CSR：：T1Rキメラタンパク質のアミノ酸配列が、C末端に配列番号6 (HSVタグ) を含む、請求項4に記載の核酸。

【請求項6】

請求項4または5で定義された核酸を含む、発現ベクター。

30

【請求項7】

請求項6で定義された発現ベクターを形質転換された、宿主細胞。

【請求項8】

安定的に請求項1で定義されたCSR：：T1Rキメラタンパク質およびGタンパク質、任意にGアルファ16 - ガストデューシン44と少なくとも90%の配列同一性を有するGタンパク質を発現する、宿主細胞。

【請求項9】

一時的に請求項1で定義されたCSR：：T1Rキメラタンパク質およびGタンパク質、任意にGアルファ16 - ガストデューシン44と少なくとも90%の配列同一性を有するGタンパク質を発現する、宿主細胞。

40

【請求項10】

請求項1～3のいずれかで定義されたCSR：：T1Rキメラタンパク質を産生する方法であって、CSR：：T1Rキメラタンパク質をコードする発現ベクターを含む真核細胞、酵母細胞、昆虫細胞、哺乳類細胞、両生類細胞、およびぜん虫細胞からなる群より選択された宿主細胞を、発現に十分な条件下で培養し、それによってCSR：：T1Rキメラタンパク質を形成し、任意にそれを細胞から回収するステップを含む、前記方法。

【請求項11】

味覚細胞における甘味シグナルを調節する剤を同定する方法であって、

(i) 任意に他の剤の存在下で、剤の、甘味刺激およびカルシウム刺激から選択される刺

50

激に応答して機能的応答を提供するCSR：：T1Rキメラタンパク質を発現する細胞への接触、および

(ii) 少なくとも1つの剤が、前記細胞中の少なくとも1つの機能応答によって、前記細胞中の前記CSR：：T1Rキメラタンパク質の機能応答に影響するかどうかの決定、を含み、

前記CSR：：T1Rキメラタンパク質が請求項1～3のいずれかに定義されたものである、前記方法。

【請求項12】

細胞が、Gタンパク質もまた発現する、請求項11に記載の方法。

【請求項13】

Gタンパク質が、Gアルファ16 - ガストデューシン44と少なくとも90%の配列同一性を有するキメラGタンパク質である、請求項12に記載の方法。

【請求項14】

ステップ(ii)が、細胞内メッセンジャーのまたはそれに起因する変化を計測することによって実施される、請求項11に記載の方法。

【請求項15】

機能応答が、 $IP_3$ およびカルシウム<sup>2+</sup>から選択される細胞内メッセンジャーの変化を計測することによって決定される、請求項12に記載の方法。

【請求項16】

細胞が、真核細胞、酵母細胞、昆虫細胞、哺乳類細胞、両生類細胞、およびぜん虫細胞からなる群より選択された細胞である、請求項11に記載の方法。

【請求項17】

細胞が、哺乳類細胞である、請求項16に記載の方法。

【請求項18】

哺乳類細胞が、CHO、COS、HeLaおよびHEK-293細胞からなる群より選択された哺乳類細胞である、請求項17に記載の方法。

【請求項19】

ステップ(i)が、CSR：：T1Rキメラタンパク質と試験剤をカルシウムの存在下で接触させることをさらに含む、請求項11に記載の方法。

【請求項20】

カルシウムが、塩化カルシウムの形態で提供される、請求項19に記載の方法。

【請求項21】

(i) 請求項1～3のいずれかで定義されたCSR：：T1Rキメラタンパク質を発現する遺伝子組換え細胞、および

(ii) CSR：：T1Rキメラタンパク質のアゴニストを、CSR：：T1Rキメラタンパク質の調節剤としての試験剤の同定のために組み合わせて利用することを含む、キット。

【請求項22】

(i) CSR：：T1Rキメラタンパク質を発現する遺伝子組換え細胞を成長させること、

(ii) 適切な濃度のアゴニストの存在下で試験剤を添加すること、および  
(iii) 試験剤の存在下および非存在下における応答の比較により、細胞の機能的応答における変化を決定すること、ならびにその結果、試験剤が請求項1～3のいずれかで定義されたCSR：：T1Rキメラタンパク質の調節剤であることが同定されることを含む、請求項21に記載のキットの利用方法。

【請求項23】

請求項1～3のいずれかで定義されたCSR：：T1Rキメラタンパク質を調節する剤の同定方法であって、

(i) CSR：：T1Rキメラタンパク質へのリガンド結合に応答して変化するパラメータを計測すること、および

10

20

30

40

50

( i i ) 任意にリガンドの存在下で、試験剤に応答して変化するパラメータの、ネガティブコントロールと比較した変化を決定すること、およびそれによって調節剤またはリガンドを同定すること

を含む、前記方法。

【請求項 2 4】

リガンドが、カルシウム、カルシウムイオンおよび塩化カルシウムからなる群から選択されたリガンドである、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 5】

ステップ ( i ) が、蛍光分光法、NMR 分光法、1 または 2 以上の吸収、屈折率の計測、流体力学法、クロマトグラフィ、溶解度計測、生物化学的方法からなる群より選択される方法で行われ、これらの方法は、溶液、二重膜、固相への連結、単脂質膜中、膜上への結合、および小胞内からなる群より選択された適切な環境において CSR : : T 1 R キメラタンパク質の特性を計測する、請求項 2 3 または 2 4 に記載の方法。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

甘味調節剤および特に甘味増強剤は、食品およびフレーバー業界にとって、例えば、糖や人工甘味料を含む甘味料を減らすことができる点で、強い興味がある。甘味増強剤の利用はカロリーの減少や、糖によるダメージから歯を防いだり、多くの人工甘味料に関連する苦味 / 金属味の異味および後味を回避するかまたは減少させることができる。

20

【背景技術】

【0002】

甘味修飾剤または増強剤をスクリーニングするのに、T 1 R 2 / T 1 R 3 ヘテロダイマー甘味受容体を採用した知られたスクリーニング法を利用することができる。

甘味修飾剤 / 増強剤を同定または特性化するために、通常潜在的増強剤 / 修飾剤の存在下および非存在下で、両サンプルが甘味料をさらに含有する、サンプルの結果が比較される。しかし、甘味料および特に糖は、浸透圧、および / または粘度において大きな影響を有する。粘度および浸透圧のようなサンプルの特性の変化に起因して、標準的なスクリーニング法を利用したとき、不正確な結果の原因となるアーティファクトが起こり得る。

30

【0003】

知られたスクリーニングの他の不利点は、野生型 T 1 R 2 / T 1 R 3 受容体は、特にスクロース、グルコース、フルクトースなどの炭水化物甘味料と同様に人工甘味料アスパルテムおよびスクラロースと結合するピーナスフライトラップ (「VFT」) ドメインを含む細胞外アミノ末端ドメインなどいくつかの結合ドメインを含有することである。したがって、特定のリガンドの特定の調節剤のためのスクリーニングおよび特に、VFT リガンドを除外した、T 1 R 2 および / または T 1 R 3 の膜貫通ドメイン (「TMD」) およびシステインリッチドメインのリガンドのためのものは、知られたスクリーニング法では不可能である。

【0004】

T 1 R 3 の TMD に結合するアゴニストはサイクラミン酸塩およびネオヘスペリジンジヒドロカルコン (NHDC) である。スクロースおよびスクラロースは T 1 R 2 および T 1 R 3 の VFT に結合し、アスパルテムは T 1 R 2 の VFT に結合する。

受容体への結合において糖と競合しうる剤の同定を防ぐため、VFT ドメインと物理的に異なる位置、特に TMD および / またはシステインリッチドメインに結合する甘味受容体調節剤の同定を可能にするスクリーニングが求められている。

40

【発明の概要】

【0005】

CSR : : T 1 R キメラタンパク質を利用することで、上の問題点を回避し、改良された結果を可能にするスクリーニング法および結合アッセイが提供される。

50

最初の側面において、少なくとも1つの甘味料または甘味増強剤と結合可能なCSR：  
：T1Rキメラタンパク質であって、配列番号2（CSR：：T1R2-a）または配列  
番号20（CSR：：T1R2-b）と少なくとも90%以上の配列同一性を有する実質  
的に相同なCSR：：T1R2ポリペプチド、配列番号4（CSR：：T1R3-a）ま  
たは配列番号22（CSR：：T1R3-b）と少なくとも90%以上の配列同一性を有  
する実質的に相同なCSR：：T1R3ポリペプチドからなる群から選択される1または  
2以上のCSR：：T1Rを含む、前記CSR：：T1Rキメラタンパク質が提供される  
。

【0006】

他の側面において、CSR：：T1R2/CSR：：T1R3ヘテロダイマーキメラ  
ンパク質、CSR：：T1R2/T1R3ヘテロダイマーキメラタンパク質、およびT1  
R2/CSR：：T1R3ヘテロダイマーキメラタンパク質からなる群から選択されるヘ  
テロダイマータンパク質を形成する2つのポリペプチドサブユニットを含む、上記で定義  
されたCSR：：T1Rキメラタンパク質であって、ヘテロダイマーのT1R2サブユ  
ニットが配列番号8と少なくとも90%の配列同一性を有する本質的に相同なポリペプチド  
を含有し；ヘテロダイマーのT1R3サブユニットが配列番号10と少なくとも90%の  
配列同一性を有する本質的に相同なポリペプチドを含む、前記CSR：：T1Rキメラ  
ンパク質が提供される。

10

【0007】

他の側面において、CSR：：T1R2-a/CSR：：T1R3-aヘテロダイマー  
タンパク質、CSR：：T1R2-b/CSR：：T1R3-bヘテロダイマータンパク  
質、CSR：：T1R2-a/CSR：：T1R3-bヘテロダイマータンパク質、CS  
R：：T1R2-b/CSR：：T1R3-aヘテロダイマータンパク質または本明細書  
で定義されるそれらの実質的に相同なヘテロダイマータンパク質を限定することなく含む  
CSR：：T1R2/CSR：：T1R3ヘテロダイマーキメラタンパク質である、上記  
で定義される2つのポリペプチドサブユニットを含むCSR：：T1Rキメラタンパク質  
であって、CSR：：T1R2-aが配列番号2に相当し、CSR：：T1R2-bが配  
列番号20に相当し、CSR：：T1R3-aが配列番号4に相当し、およびCSR：：  
T1R3-bが配列番号22に相当する、前記CSR：：T1Rキメラタンパク質が提供  
される。

20

30

【0008】

他の側面において、配列同一性によって決定された、配列番号1（CSR：：T1R2  
-a）、配列番号19（CSR：：T1R2-b）、配列番号3（CSR：：T1R3-  
a）および配列番号21（CSR：：T1R3-b）からなる群から選択される核酸配列  
と実質的に相同な核酸、ハイブリダイゼーションによって決定された、配列番号1（CS  
R：：T1R2-a）、配列番号19（CSR：：T1R2-b）、配列番号3（CSR  
：：T1R3-a）および配列番号21（CSR：：T1R3-b）からなる群から選択  
される核酸配列と実質的に相同な核酸、上記に定義されたCSR：：T1Rキメラタン  
パク質をコードする核酸と実質的に相同な核酸を1種または2種以上含む、少なくとも1つ  
の甘味料または甘味増強剤と結合することができるCSR：：T1Rキメラタンパク質を  
コードする核酸であって、

40

【0009】

配列同一性によって決定される実質的に相同な核酸が少なくとも90%の配列同一性を  
有し；ハイブリダイゼーションによって決定される実質的に相同な核酸が、50%のホル  
ムアルデヒド、5×SSC、および0.1%のSDSからなる溶液中で42の温度、お  
よび0.2×SSCおよび0.1%のSDSからなる溶液中で65で洗浄されるという  
ストリンジェントな条件下でハイブリダイズし；核酸が任意に配列番号6（HSVタグ）  
をその対応するタンパク質のC末端またはその付近に含む、前記核酸が提供される。

【0010】

他の側面において、上記で定義された核酸を含む発現ベクターが提供される。

50

他の側面において、上記で定義された発現ベクターを形質転換された宿主細胞が提供される。

他の側面において、上記のように安定的に上記で定義されたCSR::T1Rキメラタンパク質、Gタンパク質、任意にGaq - ガストデューシンと実質的に相同なGタンパク質を発現する宿主細胞が提供される。

他の側面において、上記のように一時的に上記で定義されたCSR::T1Rキメラタンパク質、Gタンパク質、任意にGaq - ガストデューシンと実質的に相同なGタンパク質を発現する宿主細胞が提供される。

【0011】

他の側面において、上記で定義されたCSR::T1Rキメラタンパク質を産生する方法であって、CSR::T1Rキメラタンパク質をコードする発現ベクターを含む宿主細胞を、発現に十分な条件下で培養し、それによってCSR::T1Rキメラタンパク質を形成し、任意にそれを細胞から回収するステップを含む、前記方法が提供される。

10

【0012】

他の側面において、味覚細胞における甘味シグナルを調節する剤を同定する方法であって：

(i) 任意に他の剤の存在下で、剤の、甘味刺激およびカルシウム刺激から選択される刺激に応答して機能的応答を提供するCSR::T1Rキメラタンパク質を発現する細胞への接触；および

(ii) 少なくとも1つの剤が、前記細胞中の少なくとも1つの機能応答によって、前記細胞中の前記CSR::T1Rキメラタンパク質の機能応答に影響するかどうかの決定；を含み、前記CSR::T1Rキメラタンパク質が上記で定義されたものである、前記方法が提供される。

20

【0013】

他の側面において、細胞が、Gタンパク質もまた発現する、上記で定義された方法が提供される。

他の側面において、Gタンパク質が、Gaq - ガストデューシンと実質的に相同なキメラGタンパク質である、上記で定義された方法が提供される。

他の側面において、Gタンパク質が、キメラGタンパク質Gアルファ16 - ガストデューシン44である、上記で定義された方法が提供される。

30

他の側面において、ステップ(ii)が、細胞内メッセンジャーのまたはそれに起因する変化を計測することによって実施される、上記で定義された方法が提供される。

【0014】

他の側面において、機能応答が、IP<sub>3</sub>およびカルシウム<sup>2+</sup>から選択される細胞内メッセンジャーの変化を計測することによって決定される、上記で定義された方法が提供される。

他の側面において、前記細胞が、細菌細胞、真核細胞、酵母細胞、昆虫細胞、哺乳類細胞、両生類細胞、およびぜん虫細胞からなる群より選択された細胞である、上記で定義された方法が提供される。

40

他の側面において、細胞が、哺乳類細胞である、上記で定義された方法が提供される。

【0015】

他の側面において、細胞が、CHO、COS、HeLaおよびHEK-293細胞からなる群より選択された哺乳類細胞である、上記で定義された方法が提供される。

他の側面において、ステップ(i)が、CSR::T1Rキメラタンパク質と試験剤をカルシウムの存在下で接触させることをさらに含む、上記で定義された方法が提供される。

他の側面において、カルシウムが、塩化カルシウムの形態で提供される、上記で定義された方法が提供される。

【0016】

50

他の側面において、

( i ) 上記で定義された CSR : : T 1 R キメラタンパク質を発現する遺伝子組換え細胞、および

( i i ) CSR : : T 1 R キメラタンパク質のアゴニストを、CSR : : T 1 R キメラタンパク質の調節剤としての試験剤の同定のために組み合わせて利用することを含むキットが提供される。

【 0 0 1 7 】

他の側面において、

( i ) 上記で定義された CSR : : T 1 R キメラタンパク質を発現する遺伝子組換え細胞を成長させること；

( i i ) 適切な濃度のアゴニストの存在下で試験剤を添加すること；

( i i i ) 試験剤の存在下および非存在下における応答の比較により、細胞の機能的応答における変化を決定すること、ならびにその結果、試験剤が上記で定義された CSR : : T 1 R キメラタンパク質の調節剤であることが同定されること

を含む、上記で定義されたキットの利用方法が提供される。

【 0 0 1 8 】

他の側面において、上記で定義された CSR : : T 1 R キメラタンパク質を調節する剤の同定方法であって；

( i ) CSR : : T 1 R キメラタンパク質へのリガンド結合に応答して変化するパラメータを計測すること、および

( i i ) 任意にリガンドの存在下で、試験剤に応答して変化するパラメータの、ネガティブコントロールと比較した変化を決定すること、およびそれによって調節剤またはリガンドを同定すること

を含む、前記方法が提供される。

【 0 0 1 9 】

他の側面において、リガンドが、カルシウム、カルシウムイオンおよび塩化カルシウムからなる群から選択されたリガンドである、上記で定義された方法が提供される。

他の側面において、ステップ ( i ) は、蛍光分光法、NMR分光法、1または2以上の吸収、屈折率の計測、流体力学法、クロマトグラフィ、溶解度計測、生物化学的方法からなる群より選択される方法で行われ、これらの方法は、溶液、二重膜、固相への連結、単脂質膜中、膜上への結合、および小胞内からなる群より選択された適切な環境において CSR : : T 1 R キメラタンパク質の特性を計測する、上記で定義された方法が提供される。

【 発明を実施するための形態 】

【 0 0 2 0 】

CSR : : T 1 R キメラタンパク質は、これに限定するものではないが、CSR : : T 1 R 2 モノマー、CSR : : T 1 R 3 モノマー、CSR : : T 1 R 2 / CSR : : T 1 R 3 ヘテロダイマー、CSR : : T 1 R 2 / T 1 R 3 ヘテロダイマー ( キメラ T 1 R 2 サブユニットと野生型 T 1 R 3 )、および T 1 R 2 / CSR : : T 1 R 3 ヘテロダイマー ( キメラ T 1 R 3 サブユニットと野生型 T 1 R 2 ) を含む。

【 0 0 2 1 】

CSR : : T 1 R 2 は、これに限定するものではないが、CSR : : T 1 R 2 - a および CSR : : T 1 R 2 - b を含む。CSR : : T 1 R 3 は、これに限定するものではないが、CSR : : T 1 R 3 - a および CSR : : T 1 R 3 - b を含む。各 - a 変異体は、異なる由来 ( CSR および T 1 R、それぞれ ) の 2 つの部位が連結してキメラ CSR : : T 1 R を与える正確な位置において、関連する - b 変異体とは異なる。それらの配列 ( 配列番号 1 + 2 : CSR : : T 1 R 2 - a 核酸 + タンパク質 ; 配列番号 3 + 4 : CSR : : T 1 R 3 - a 核酸 + タンパク質 ; 配列番号 19 + 20 : CSR : : T 1 R 2 - b 核酸 + タンパク質 ; 配列番号 21 + 22 : CSR : : T 1 R 3 - b 核酸 + タンパク質 ) から明らかのように、変異体 - a はシステインリッチドメイン ( CRD ) の直前で連結し、変異体 - b

10

20

30

40

50

はCRDの直後で連結する。

【0022】

各キメラサブユニットは、キメラサブユニットまたは野生型サブユニットお互いと連結し得る。したがって、CSR::T1Rキメラタンパク質は、特に、CSR::T1R2-aモノマー、CSR::T1R3-aモノマー、CSR::T1R2-a/CSR::T1R3-aヘテロダイマー、CSR::T1R2-a/T1R3ヘテロダイマー(キメラT1R2-aサブユニットと野生型T1R3)、T1R2/CSR::T1R3-aヘテロダイマー(キメラT1R3-aサブユニットと野生型T1R2)も、CSR::T1R2-bモノマー、CSR::T1R3-bモノマー、CSR::T1R2-b/CSR::T1R3-bヘテロダイマー、CSR::T1R2-b/T1R3ヘテロダイマー(キメラT1R2-bサブユニットと野生型T1R3)、T1R2/CSR::T1R3-bヘテロダイマー(キメラT1R3-bサブユニットと野生型T1R2)、CSR::T1R2-a/CSR::T1R3-bヘテロダイマー、およびCSR::T1R2-b/CSR::T1R3-aヘテロダイマーも含む。

10

【0023】

CSR:T1Rキメラタンパク質は、T1R2、T1R3、またはT1R2およびT1R3のVFTドメインを有しておらず、したがってT1R2および/またはT1R3のTMDドメインおよびシステインリッチドメインと結合する化合物を特異的に同定することが可能である。これらの同定された化合物は、インピボにおいて甘味受容体に結合するためにVFT部位と結合する炭水化物と競合しないことが期待される点で特に興味深く、したがって特に興味深い炭水化物の甘味増強剤の潜在的候補である。

20

【0024】

キメラタンパク質は、時に求める特性を組み合わせたり、不要なものを排除したりできる、2または3以上のオリジナルタンパク質の連結された断片である。三次元空間におけるタンパク質のフォールディングが重大で、アミノ酸の位置がフォールディングに影響するので、どんな2断片でも連結することができるわけではない。重大なドメインおよびアミノ酸が知られていても、発現の成功、正しいフォールディングおよび求める特性に变化のない機能性は、まったく予測できない。

【0025】

出願人らは、キメラモノマー、CSR::T1R2およびCSR::T1R3が機能的であり、機能的CSR::T1R2/CSR::T1R3ヘテロダイマー(CSR::T1R2-a/CSR::T1R3-aおよびCSR::T1R2-b/CSR::T1R3-bヘテロダイマーについての例参照; CSR::T1R2-a/CSR::T1R3-bおよびCSR::T1R2-b/CSR::T1R3-aもまた働き得る)を形成しうることを見出した。出願人らの実験は、CSR::T1R2モノマーサブユニットもまた、ヘテロダイマーを形成せずに、機能的甘味受容体としての機能をそれ自身に有していることを示す。予備実験はCSR::T1R3が、あるGタンパク質とかみ合いおよび/またはそれを活性化することに困難を有するだろうことを示したが、CSR::T1R3は、Gタンパク質を活性化する能力を必要としない結合アッセイにおいて有用である。

30

【0026】

したがって、CSR::T1R2およびCSR::T1R3は、本明細書に記載されている方法において、そのモノマー形態においてもまた有用である。代替的に、それらの方法に利用することができるヘテロダイマーはキメラサブユニット/野生型サブユニットヘテロダイマー(CSR::T1R2/T1R3およびT1R2/CSR::T1R3)である。

40

【0027】

CSR::T1R2/CSR::T1R3ヘテロダイマーにおいて、ヘテロダイマー複合体のそれぞれのCSR::T1Rサブユニットは、2つのソースタンパク質からの連結された配列断片からなる。2つのソースタンパク質はヒトカルシウム感受性受容体(hCaSR)、およびT1Rタンパク質(T1R2またはT1R3)である。両サブユニット

50

に共通する h C a S R 由来断片 ( C S R ) は、 h C a S R の細胞外ドメイン ( E C D ) を含有する。 T 1 R 由来断片は、 T 1 R 配列の膜貫通ドメイン ( T M D ) を含有し、それらがそれぞれ T 1 R 2 または T 1 R 3 由来であるので、異なっている。

【 0 0 2 8 】

キメラタンパク質は、甘味物質の代わりにカルシウムを受容体活性化のリガンド / アゴニストとして利用可能にし、甘味物質の存在に起因するあらゆる不都合な効果を回避することができる。

本明細書で利用される、 C S R : : T 1 R という語は、 C S R : : T 1 R 2 ホモマー ; または C S R : : T 1 R 3 ホモマー ; または C S R : : T 1 R 2 と C S R : : T 1 R 3 もしくは野生型 T 1 R 3 とのヘテロダイマー複合体 ( C S R : : T 1 R 2 / C S R : : T 1 R 3 または C S R : : T 1 R 2 / T 1 R 3 ) ; または C S R : : T 1 R 3 と C S R : : T 1 R 2 もしくは野生型 T 1 R 2 とのヘテロダイマー複合体 ( C S R : : T 1 R 2 / C S R : : T 1 R 3 または T 1 R 2 / C S R : : T 1 R 3 ) を指す。

10

【 0 0 2 9 】

より一般的には、インピボおよび多くのインピトロの方法において、受容体が G タンパク質と組み合わされているとき、 C S R : : T 1 R は「 G P C R 」とも言われる。

提供されるキメラ C S R : : T 1 R 構築物 ( D N A 、 ベクター、 遺伝子組換え細胞、 タンパク質 ) は、限定することなく、甘味応答の調節剤、例えば限定することなく甘味増強剤、をスクリーニングするとき有用である。慣習的なスクリーニング法および結合アッセイを調節剤および増強剤のスクリーニングに利用してもよい。かかるスクリーニングの方法論は、当該技術分野において周知であり、概略を下述する。

20

【 0 0 3 0 】

代替的に、キメラ C S R : : T 1 R 構築物中の C S R ( h C a S R の一部 ) がカルシウムに応答性の成果物受容体を表し、 T 1 R 受容体のリガンド / アゴニストの存在 / 非存在下における調節剤のスクリーニングのとき、リガンドはカルシウムと置き換えられる ( 例えば、限定することなく、塩化カルシウムの形態で ) 。これは、現実のリガンド / アゴニストに存在するあらゆる否定的な効果を回避する付加的な利点を有する。例えば、糖リガンド / アゴニストの調節剤のスクリーニングのとき、糖の浸透圧などへの不都合な効果が回避される。

【 0 0 3 1 】

アッセイに利用される細胞

トランスフェクトされたまたは内在性の T 1 R 3 および T 1 R 2 は、 C S R : : T 1 R 2 および / または C S R : : T 1 R 3 のアゴニスト応答を決定する方法それぞれ、または他の調節剤に依存する前記応答の変化に、否定的に影響し得る。 T 1 R 3 および T 1 R 2 の欠失は、 C S R : : T 1 R 2 および / または C S R : : T 1 R 3 活性化の決定のためのヌルバックグラウンドを提供し、観察されたシグナルが C S R : : T 1 R 2 および / または C S R : : T 1 R 3 活性化に直接結びつく。これにより、 C S R : : T 1 R 2 および / または C S R : : T 1 R 3 を特異的に調節する剤の同定が可能となり、野生型 T 1 R 2 および T 1 R 3 を活性化する剤を除外し、ここで、 T 1 R 3 の場合、 T 1 R 3 は、甘味および旨味のヘテロダイマー両方の一部であるから、旨味物質もまた含む。

30

40

【 0 0 3 2 】

内在性の野生型 T 1 R 2 および / または T 1 R 3 の存在はいくつかのバックグラウンドシグナルの原因となり、それは望ましくない。内在性 T 1 R 2 および / または T 1 R 3 を有する細胞は、十分に低いバックグラウンドの結果を獲得するのに依然として有用ではあるが、よりよい選択は内在性 T 1 R 2 および T 1 R 3 を含有しない細胞である。 C S R : : T 1 R 2 / T 1 R 3 キメラタンパク質を利用するときは、バックグラウンドに不都合な効果なしで野生型 T 1 R 3 を含有することができ、または T 1 R 2 / C S R : : T 1 R 3 キメラタンパク質を利用するときは、バックグラウンドに不都合な効果なしで野生型 T 1 R 2 を含有することができるという例外が発生する。

【 0 0 3 3 】

50

下に列挙した細胞は、内在性/野生型 T1R3 または内在性野生型 T1R2 を含有しない点で特に有用である。

しかし、代替的な細胞もまた本明細書に記載されている方法において有用である。

#### 【0034】

適切な真核細胞は、例えば、限定することなく、哺乳類細胞、酵母細胞、または昆虫細胞 (Sf9 を含む)、両生類細胞 (メラニン保有細胞を含む)、またはシノラブディス (Caenorhabditis) (Caenorhabditis elegans を含む) 細胞を含む ぜん虫細胞 などの真核細胞を含む。

適切な哺乳類細胞は、例えば、限定することなく、COS 細胞 (Cos-1 および Cos-7 を含む)、CHO 細胞、HEK293 細胞、HEK293T 細胞、HEK293T - Rex<sup>T<sup>M</sup></sup> 細胞、または他のトランスフェクト可能な真核細胞セルラインを含む。

適切な細菌細胞は限定することなく E. coli を含む。

#### 【0035】

細胞は、当該技術分野において周知のように、GPCR および G タンパク質 (受容体をホスホリパーゼ C シグナル伝達経路に連結する) を一過性にまたは安定的にトランスフェクトされてもよい。味覚 GPCR との増強されたカップリングを提供するキメラ G タンパク質である G アルファ 16 - ガストデューシン 44 (G.sub.alpha.16.gust(ducin)44、G.sub.alpha.16.gust(ducin)44、G.16.gust(ducin)44、Ga16.gust(ducin)44、G.16 - ガストデューシン 44、または以下で使用されているように「G.16.gust 44」としても知られている) を採用する優れた異種発現系は、WO2004/055048 に詳細に記載されている。代替的に、WO2004/055048 に記載されている Gaq - ガストデューシンに基づいた他のキメラ G タンパク質、または、例えば G16 または G15 などの、他の G タンパク質もまた利用してよい。

#### 【0036】

CSR::T1R は、受容体を、例えばホスホリパーゼ C シグナル伝達経路などの、シグナル伝達経路、または例えば後述のものを含むシグナル伝達経路に連結する G タンパク質とともに、細胞内で発現させることが可能である：アデニル酸シクラーゼ、グアニル酸シクラーゼ、ホスホリパーゼ C、IP<sub>3</sub>、GTPase / GTP 結合、アラキドン酸、cAMP / cGMP、DAG、プロテインキナーゼ c (PKC)、MAP キナーゼ、チロシンキナーゼ、または ERK キナーゼ。

#### 【0037】

代替的に、以下に詳述するように、いかなる適切なりポーター遺伝子も CSR::T1R 活性化応答プロモーターに連結し、CSR::T1R 活性の決定に利用することができる。

#### 【0038】

##### 上述の細胞に利用されるベクター構築物

かかる細胞中で GPCR および / または G タンパク質を発現するベクター構築物は、ポリメラーゼ連鎖反応を利用する、それ自体が周知なやり方によって産生され得る。配列の確認後、cDNA 断片は、例えば pcDNA3.1 哺乳類細胞用哺乳類発現ベクターなど、適切なベクター内へサブクローニングされてよく、正しい遺伝子の発現を可能にするために対応する宿主細胞に一過性にトランスフェクトされてよい。

#### 【0039】

例えば 48 時間の、トランスフェクト後期間の後、タンパク質の正しい発現を確認するために細胞溶解物を調製し、ウェスタンブロットによって解析してもよい。一度正しいタンパク質の発現が確認されれば、例えば HEK293T 細胞および HEK T - Rex<sup>T<sup>M</sup></sup> を含む哺乳類細胞などの適切な細胞は、当該技術分野において周知の技術に従って、安定してタンパク質を発現する細胞を生成するためにトランスフェクトされてよい。

#### 【0040】

代替的に、様々な非哺乳類発現ベクター / 宿主システムが、G タンパク質共役受容体 (

GPCR)CSR::T1Rをコードする配列の含有および発現に利用可能である。これらは、例えば組換えバクテリオファージ、プラスミド、またはコスミドDNA発現ベクターで形質転換された細菌を含む微生物、酵母発現ベクターで形質転換された酵母、ウィルス発現ベクター（例えばバキュロウィルス）、または細菌発現ベクター（例えばpBR322プラスミド）で感染させた昆虫細胞システムなどを含む。

#### 【0041】

以上に記載された系とともに利用することができる特定のベクターの例は、「G-protein coupled receptors (Signal Transduction Series)」、編者：Tatsuya Haga and Gabriel Berstein、第1版、CRC Press - Boca Raton FL; September 1999に記載されている。

#### 【0042】

細菌系において、多くのクローニングおよび発現ベクターが、GPCRをコードするポリヌクレオチド配列について意図する利用に応じて選択し得る。例えば、GPCRをコードするポリヌクレオチド配列のルーチンのクローニング、サブクローニング、および増殖が、pBLUESCRIPT (Stratagene, La Jolla Calif.)またはpSPORT1プラスミド (Life Technologies) などの多機能性大腸菌ベクターを利用して行える。GPCRをコードする配列の、ベクターのマルチクローニングサイトへのライゲーションはlacZ遺伝子を妨害し、組換え分子を含有する形質転換細菌の同定のための比色スクリーニング手法を利用可能にする。加えて、これらベクターはインビトロ転写、ジデオキシシークエンシング、ヘルパーファージによる一本鎖レスキュー (single strand rescue)、およびクローニングされた配列内のネストされた欠失の作出にも有用であり得る。例えば抗体の産生など、多量のGPCRが必要なとき、GPCRの高発現を導くベクターが利用し得る。例えば強い、誘導可能なSP6またはT7バクテリオファージプロモーターを含むベクターなどが利用し得る。

#### 【0043】

酵母発現系はGPCRの産生に利用されてよい。アルファファクター、アルコールオキシダーゼ、およびPGHプロモーターなどの構成的または誘導プロモーターを含む多数のベクターが酵母Saccharomyces cerevisiaeまたはPichia pastorisに利用し得る。加えて、かかるベクターは、発現タンパク質の分泌または細胞内の保持を導き、安定的増殖のための外来性配列の宿主遺伝子への統合を可能にする。

#### 【0044】

異種タンパク質を昆虫細胞セルラインで発現するために、例えば、鱗翅目昆虫のバキュロウィルスであるAutographia californicaマルチカプシドヌクレオウィルス (AcMNPV) の誘導体が利用可能である。このシステムにおいて、外来性遺伝子発現は、ポリヘドリンまたはp10プロモーターのいずれかの、非常に強い後期ウィルスプロモーターに導かれ、多様なベクターが、組換えタンパク質の発現および回収の最適化に利用可能である。これらのベクターは膜結合型および分泌型タンパク質の両方を高度に発現することが可能であり、また哺乳類システム中で起こることが知られる、N-およびO-連結糖鎖付加、リン酸化、アシル化、タンパク質分解および分泌ワクチン成分を含む多くの翻訳後修飾も可能である。例えばInvitrogenのInsectSelect<sup>TM</sup>などの多くのベクターが商業的に入手可能である。

#### 【0045】

##### 発現系

求めるタンパク質 (GPCR (CSR::T1R) およびGタンパク質) をコードするcDNAを発現するために、典型的には、適切なcDNAを、転写を導く強力なプロモーター、転写/翻訳ターミネーターおよび翻訳開始のためのリボソーム結合領域を含む発現ベクターにサブクローニングする。例えばE.coli、Bacillus sp.、およびSalmonellaなど、適切な細菌プロモーターは当該技術分野において周知であり、かかる発現系のためのキットが商業的に入手可能である。同様に、哺乳類細胞、酵母、および昆虫細胞のための真核細胞発現系も商業的に入手可能である。真核細胞発現ベクターは、例えばアデノウィルスベクター、アデノ随伴ベクター、またはレトロウィルスベクターなどであってよい。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 4 6 】

プロモーターに加えて、発現ベクターは典型的に、宿主細胞においてタンパク質をコードする核酸を発現するのに必要な付加的要素の全てを含む、転写ユニットまたは発現カセットを含む。典型的な発現カセットはしたがって、タンパク質をコードする核酸配列に作動可能に連結したプロモーターおよび、転写の効率的なポリアデニレーションに必要なシグナル、リボソーム結合領域、および翻訳ターミネーションを含む。タンパク質をコードする核酸配列は典型的に、組換えタンパク質の効率的な細胞表面発現を推進するために、ラットソマトスタチン - 3 受容体配列の N 末端 4 5 アミノ酸などの、細胞表面受容体に有用な膜標的化シグナルに連結してよい。付加的なベクター要素は、例えばエンハンサーなどを含んでもよい。

10

## 【 0 0 4 7 】

発現カセットはまた、構造遺伝子の下流に、効果的なターミネーションを提供するための転写終止領域も含むべきである。終止領域はプロモーター配列と同じ遺伝子から得てもよく、また異なる遺伝子から得てもよい。

タンパク質の発現のために、真核細胞または原核細胞における発現のために当該技術分野において周知の、慣用のベクターを利用してよい。ベクターの例は、例えば p B R 3 2 2 ベースのプラスミド、p S K F、および p E T 2 3 D を含むプラスミドなどの細菌発現ベクター、および例えば G S T および L a c Z などの融合発現系を含む。

## 【 0 0 4 8 】

真核ウイルス由来の制御要素を含む発現ベクター、例えば S V 4 0 ベクター、サイトメガロウイルスベクター、パピローマウイルスベクター、およびエプスタイン・バーウイルス由来のベクターなどは、典型的に真核発現ベクターとして利用される。他の真核ベクターの例には、p M S G、p A V 0 0 9 / A<sup>+</sup>、p M T O 1 0 / A<sup>+</sup>、p M A M n e o - 5、バキュロウイルス p D S V E、p c D N A 3 . 1、p I R E S、および S V 4 0 早期プロモーター、S V 4 0 後期プロモーター、メタロチオネインプロモーター、マウス乳腺腫瘍ウイルスプロモーター、ラウス肉腫ウイルスプロモーター、ポリヘドリンプロモーター、または真核細胞内での発現に効果を示す他のプロモーターの指揮下でタンパク質を発現させられる他のいかなるベクターも含む。

20

## 【 0 0 4 9 】

いくつかの発現系は、チミジンキナーゼ、ハイグロマイシン B ホスホトランスフェラーゼ、ジヒドロ葉酸リダクターゼなどの遺伝子増幅を提供するマーカーを有する。

30

## 【 0 0 5 0 】

典型的に発現ベクターに含まれる要素には、E. coli 中で機能するレプリコン、組換えプラスミドを取り込んだ細菌の選別を可能にする薬剤耐性をコードする遺伝子、および真核配列の挿入を可能にするプラスミドの本質的でない領域のユニークな制限部位なども含んでよい。選択される特定の薬剤耐性遺伝子は重大ではなく、当該技術分野で知られたあらゆる多くの薬剤耐性遺伝子が適している。必要ならば、原核配列は、真核細胞内での D N A の複製を妨害しないように任意に選択される。

## 【 0 0 5 1 】

細菌系において、G P C R の c D N A 断片は、単独で、または、対象となる G P C R が、E. coli ペリプラスムマルトース結合タンパク質 ( M B P ) であって、そのシグナルペプチドを含む M B P が G P C R のアミノ末端に連結しているものに融合した融合タンパク質として発現されてよい。野生型 G P C R の c D N A または M B P : G P C R 融合 c D N A は、例えば E. coli 中で G P C R の発現が l a c 野生型プロモーターによって駆動される p B R 3 2 2 など、適切なプラスミドへサブクローニングされる。E. coli における G P C R の発現方法は、例えば「G-protein coupled receptors (Signal Transduction Series)」, 編者: Tatsuya Haga and Gabriel Berstein, 第 1 版, pp. 265 ~ 280, CRC Press - Boca Raton FL; September 1999 などに記載されている。

40

## 【 0 0 5 2 】

内在性 G P C R を欠損した遺伝子操作酵母システムおよび昆虫細胞システムは、C S R

50

：：T1R活性化スクリーニングに対してヌルバックグラウンドであるという利点を提供する。

遺伝子操作酵母システムはヒトGPCRおよびGタンパク質を、対応する内在性酵母フェロモン受容体経路の成分と代替するものである。下流シグナル経路はまた、通常の酵母シグナル応答が選択培地上でのプラス成長またはレポーター遺伝子発現に転換するように、改変される(Broach, J. R. and J. Thorner, 1996, Nature, 384 (supp.):14~16に記載)。

#### 【0053】

遺伝子操作昆虫システムは、受容体をホスホリパーゼCシグナル経路に連結できるヒトGPCRおよびGタンパク質を組み込んでいる(例えばKnight and Grigliatti, (2004) J. Receptors and Signal Transduction, 24: 241~256参照)。

両生類細胞システム、特にメラニン含有細胞は、例えばGPCR発現系について記載したWO92/01810などに記載されている。

#### 【0054】

##### CSR：：T1Rの過剰発現

CSR：：T1Rは、例えばCMV早期プロモーターなどの強力な構成的プロモーターの制御下に置くことにより過剰発現することができる。代替的に、保存的なGPCRアミノ酸またはアミノ酸ドメインのある変異を導入し、利用するGPCRを構成的に活性化させることが可能である。

#### 【0055】

##### CSR：：T1R発現ベクター構築物の細胞内へのトランスフェクション

タンパク質を大量に発現する細菌、哺乳類、酵母または昆虫の細胞系を作出するために、標準的なトランスフェクション法が利用可能である。

#### 【0056】

核酸配列を宿主細胞に導入するために知られたいかなる方法も利用してよい。用いる特定の遺伝子操作手順は、対象となるタンパク質を発現できる宿主細胞中に関係する遺伝子を首尾良く導入できさえすればそれでよい。これらの方法は、クローニングされたゲノムDNA、cDNA、合成DNAまたは他の外来性の遺伝物質を宿主細胞中に導入することを伴ってもよく、リン酸カルシウムトランスフェクション、ポリブレン、プロトプラスト融合、エレクトロポレーション、リポソーム、マイクロインジェクション、プラズマベクター、ウィルスベクターなどを含む。

#### 【0057】

例えば、限定することなく、T-Rex<sup>TM</sup>発現系(Invitrogen Corp., Carlsbad, CA)を用いることができる。T-Rex<sup>TM</sup>システムは、E. coli Tn10にコードされたテトラサイクリン(Tet)耐性オペロン由来の調節エレメントを利用したテトラサイクリン制御哺乳類発現系である。T-Rex<sup>TM</sup>システム中のテトラサイクリン調節は、テトラサイクリンのTetリプレッサーへの結合および対象となる遺伝子の発現を制御するプロモーターの抑制解除に基づいている。

#### 【0058】

##### 細胞培養

トランスフェクト後、トランスフェクトされた細胞は、当該技術分野において周知の標準的な培養条件で培養することができる。異なる細胞は、適切な温度および細胞培養培地を含む、異なる培養状態を要求することは、当業者に明らかである。

#### 【0059】

##### CSR：：T1R受容体タンパク質回収

所望の場合、タンパク質を標準的な技術を利用して細胞培養から回収することができる。例えば、沈殿およびクロマトグラフィ工程に供する前に細胞を機械的にまたは浸透圧ショックによって破裂させてよく、その種類と順序は回収される特定の組換え物質次第である。あるいは、組換えタンパク質を、組換え細胞が培養された培養培地から回収することもできる。

10

20

30

40

50

## 【0060】

本明細書のアッセイによって同定され得る味覚調節物質

C S R : : T 1 R 受容体活性の調節物質（リガンド、アゴニスト、部分的アゴニスト、アンタゴニスト、逆アゴニスト、阻害剤、増強剤を含む様々なタイプ）は、下述のように同定可能である。

調節物質のタイプは同時に1以上のタイプを含んでもよく、濃度に依存し得る。例えば、剤がある濃度範囲においてアゴニストとして作用するが、別の濃度範囲においては他のアゴニスト（例えば甘味料または糖）の調節剤または増強剤として作用することもある。したがって、剤はその調節活性の決定のために異なる濃度で試験されるべきである。

これから本明細書に記載された方法において同定可能な剤の定義について述べる。

10

## 【0061】

調節剤は、1または2以上の後述のものの増大または減少を引き起こす剤である：受容体の細胞表面発現、リガンドの受容体への結合、または受容体の活性化形態によって開始される細胞内応答（アゴニストの存在下または非存在下における）。調節剤はそれ自身が受容体に結合し、それを活性化し、それによって細胞内応答の増大を調節するアゴニストであり得る。

## 【0062】

調節剤は、小分子、ペプチド、タンパク質、核酸、抗体またはその断片を含む様々なタイプの化合物を含む。それらは、合成または天然物質、天然材料の抽出物を含む様々な給源、例えば動物、哺乳類、昆虫、植物、細菌または真菌細胞材料または培養細胞、あるいはかかる細胞の馴化培地などに由来し得る。

20

リガンドは受容体と結合する剤であり、アゴニスト、部分的アゴニスト、増強剤、アンタゴニスト、または逆アゴニストであってもよい。

## 【0063】

アゴニストは、受容体に結合したときに、アゴニストの非存在下での細胞内応答と比較して、受容体を活性化し、細胞内応答を増大させるC S R : : T 1 Rキメラタンパク質受容体のリガンドである。付加的にまたは代替的に、アゴニストは、アゴニストの非存在下で細胞表面に存在する細胞表面受容体の数と比較して、受容体の細胞表面発現を増大させるように、細胞表面受容体の内在化を減少させ得る。

C S R : : T 1 Rのアゴニストは、例えばカルシウム、ペリラルチン、サイクラミン酸塩、NDHC、およびシンナモニトリルなどを含む。

30

## 【0064】

C S R : : T 1 Rキメラタンパク質のリガンドは、キメラタンパク質のC S R部分に結合するC S Rドメインリガンド（カルシウム）、またはキメラタンパク質のT 1 R部分に結合するT S Rドメインリガンド（甘味応答の調節剤）の2つのタイプに分類することができる。

部分的アゴニストは、受容体を最大限活性化する他のアゴニストと比べて、部分的にしか作用しないアゴニストである。

## 【0065】

アンタゴニストは、アゴニストと同じ（競合的アンタゴニスト）または異なる（アロステリックアンタゴニスト）受容体の部位に結合するが、受容体の活性化形態によって起こる細胞内応答を活性化せず、それゆえアゴニストの存在下およびアンタゴニストの非存在下と比較して、アゴニストによって誘導される細胞内応答を阻害するリガンドである。

40

受容体と結合する逆アゴニストは、受容体によって媒介される構成的細胞内応答を、逆アゴニストの非存在下における細胞内応答と比較して減少させる。

## 【0066】

阻害剤は、阻害剤の非存在下におけるアゴニストの結合と比較して、アゴニストと受容体との結合を減少させ、および/またはアゴニストによって誘導される細胞内応答を減少させる。

増強剤は、アゴニストの受容体への結合を、増強剤の非存在下におけるアゴニストの結

50

合と比較して増大させ、および/またはアゴニストによって誘導される細胞内応答を増大させる。

【0067】

リガンドを結合し、例えばGタンパク質(すなわち調節剤との種々の相互作用に起因して)などによりシグナルを伝達する受容体の活性または活性の変化は、以下に記載されるアッセイによって決定可能である。

【0068】

C S R : : T 1 R 受容体の調節剤同定のためのアッセイ

調節剤は、機能的効果/パラメータを決定および比較するための、多種多様なインビトロおよびインビボアッセイを利用して、または代替的に結合アッセイによって、同定可能である。受容体の機能上の試験剤の効果は適切な機能的パラメータを分析することで計測可能である。受容体活性に影響するあらゆる生理学的変化は、調節剤の同定のために利用可能である。

10

【0069】

かかる機能的アッセイは、例えば動物から単離された無傷の細胞または組織を利用した、濃度、活性またはそれらの二次メッセンジャーの変化(例えば細胞内カルシウム( $Ca^{2+}$ )、cAMP、cGMP、イノシトールリン酸( $IP_3$ )、ジアシルグリセロール/DAG、アラキドン酸、MAPキナーゼまたはチロシンキナーゼなどを含む)、イオンフラックス、リン酸化レベル、転写レベル、神経伝達物質レベルの計測に基づいたアッセイ、およびGTP結合性、GTP分解酵素、アデニル酸シクラーゼ、リン脂質分解、ジアシルグリセロール、イノシトール三リン酸、アラキドン酸放出、PKC、キナーゼおよび転写レポーターに基づいたアッセイなど、当該技術分野において周知である。いくつかの適切なアッセイが、例えばWO 01/18050に記載されている。

20

【0070】

受容体活性化は、典型的には例えば、例えば細胞内に貯蔵されたカルシウムイオンを放出する $IP_3$ などの二次メッセンジャーの増大など、後続する細胞内イベントの起点となる。いくつかのGタンパク質共役受容体活性化は、ホスホリパーゼC媒介ホスファチジルイノシトール加水分解を通じたイノシトール三リン酸( $IP_3$ )の形成を刺激する。 $IP_3$ は次に細胞内に貯蔵されたカルシウムイオンの放出を刺激する。したがって、細胞内カルシウムイオンレベルの変化、または $IP_3$ などの二次メッセンジャーレベルの変化は、Gタンパク質共役受容体活性の決定に利用可能である。

30

【0071】

全ての機能的アッセイは、例えば受容体をその表面または単離細胞膜画分上に発現する細胞を含有するサンプルで行うことができる。有用な細胞は上述されている。また、分離細胞または細胞膜を有するサンプルの代わりに、遺伝子組換え動物からの組織を利用してよい。

本明細書に記載されたスクリーニング方法は、甘味応答の調節剤、例えば甘味増強剤、を同定するのに特に有用である。

【0072】

それ自身がアゴニストではない調節剤(例えば、アンタゴニスト、部分的アゴニスト、逆アゴニスト、阻害剤、または増強剤)を同定するため、いずれもアゴニストを含有する、試験剤を含むサンプルおよび含まないサンプルを比較する。アゴニストとして、例えばカルシウムを用いることができる。カルシウムの使用は、両方のTMDがアクセス可能となる利点を有する。他の知られたまたは同定されたアゴニスト、例えば、ペリラルチン、サイクラミン酸塩、ネオヘスペリジンジヒドロカルコン(NDHC)、およびシンナモニトリルなどもまた利用可能であるが、同定される調節剤の調節剤結合部位と一致し得るリガンド/アゴニスト結合部位を部分的にふさぎ、低シグナルの原因となり得る。

40

【0073】

例えば、コントロール(アゴニストを含むが調節剤は含まない)の相対的受容体活性値を100とする。コントロールに対する活性の減少により阻害剤、アンタゴニストまたは

50

逆アゴニストが同定され、一方、増大により増強剤が同定される。通常、試験剤を含まないサンプルと比べて、または試験剤を含むが、CSR：：T1Rを発現しない細胞（モックトランスフェクション細胞）に基づいたサンプルと比べて、試験剤を含むサンプルにおいて計測された活性における、10%またはそれ以上の増大または減少は、有意であると考えられる。

#### 【0074】

甘味増強剤を同定するため、試験剤を含むサンプルおよび含まないサンプルを比較する。例えば、コントロール（例えば塩化カルシウムなどのアゴニストを含むが、調節剤は含まない）の相対的受容体活性値を100とする。増大により増強剤が同定される。通常、試験剤を含まないサンプルと比べて、または試験剤を含むが、CSR：：T1Rを発現しない細胞（モックトランスフェクション細胞）に基づいたサンプルと比べて、試験剤を含むサンプルにおいて計測された活性における、10%またはそれ以上の増大または減少は、有意であると考えられる。

10

#### 【0075】

CSR：：T1Rキメラタンパク質を採用するスクリーニングのために、カルシウムがアゴニストとして利用可能である。代替的に、CSR：：T1RのT1R2および/またはT1R3断片の関連部分に結合するアゴニストを利用してよい。これらのアゴニストは、例えばペリラルチン、サイクラミン酸塩、NDHC、およびシンナモニトリルを含む。

#### 【0076】

##### アゴニストまたは部分的アゴニストの同定

VFTドメインに結合しないアゴニストまたは部分的アゴニストを同定するために、試験剤を有するサンプルを、アゴニスト（例えば塩化カルシウム、ペリラルチン、サイクラミン酸塩、ネオヘスペリジンジヒドロカルコン（NDHC）、シンナモニトリル、または他の同定されたりガンド/アゴニスト）を有するポジティブコントロールと比較する。代替的に/付加的に、試験剤を有するおよび有さないサンプルが、そのCSR：：T1Rキメラタンパク質の活性について比較される。

20

#### 【0077】

例えば、アゴニストまたは部分的アゴニストは、アゴニストまたは部分的アゴニストが100mMまたはそれ以下で存在しているとき、ポジティブコントロール甘味アゴニストの最大生物学的活性の少なくとも10%に相当する生物学的活性を有しており、例えばアゴニストの最大生物学的活性に匹敵するまたはそれ以上の最大生物学的活性を有し得る。最大生物学的活性は、与えられた受容体アッセイフォーマット内で達成可能なアゴニスト、例えば塩化カルシウム、ペリラルチン、サイクラミン酸塩、ネオヘスペリジンジヒドロカルコン（NDHC）、シンナモニトリルなどアッセイに対する最大達成可能な受容体応答であって、その応答が、同じアゴニストの濃度を増大させて適用してもさらに増大できないものと定義される。

30

#### 【0078】

上述のアゴニストは、異なる濃度において、CSR：：T1Rキメラタンパク質のアゴニストの増強剤としても働き得る。これは、アゴニスト-試験剤を甘味増強効果を示すシグナルについて試験するために、カルシウムまたは他のアゴニストを利用したスクリーニング法で試験することができる。

40

代替的に、試験剤を有するサンプルにおける、例えば10%またはそれ以上の計測活性の増大が、試験剤を有さないサンプルまたは試験剤を有するがCSR：：T1Rを発現しない細胞（モックトランスフェクション細胞）に基づくサンプルと比較される。

#### 【0079】

アンタゴニストを同定するために、知られたアゴニストの存在下における、試験剤の存在下および非存在下での受容体活性が比較される。アンタゴニストは、例えば少なくとも10%の、アゴニスト刺激性受容体活性の減少を示す。

逆アゴニストを同定するために、試験剤の存在下および非存在下での受容体活性が、上

50

述のように、受容体を過剰発現する動物/細胞/膜を含有するサンプルで比較される。逆アゴニストは、例えば少なくとも10%の、受容体の構成的活性の減少を示す。

【0080】

上述のアッセイにおけるCSR::T1R受容体活性を計測する適切な検出法の様々な例を以下に記載する。

多くのスクリーニングはカルシウム活性に頼っており、これらについては、細胞、受容体、酵素またはリポーター遺伝子を非特異的に刺激することを回避するために、カルシウムの少ない緩衝系を利用すべきである。

【0081】

細胞質イオン濃度または膜電位の変化の決定：

「G-protein coupled receptors (Signal Transduction Series)」, CRC Press 1999; 第1版, Haga and Berstein編に詳述されているように、受容体活性を報告するために、細胞にイオン感受性色素を負荷することができる。細胞質または膜電位におけるイオン濃度の変化は、それぞれイオン感受性または膜電位蛍光指標を利用して計測される。

【0082】

カルシウムフラックス

GPCRの活性化によって誘導される細胞内カルシウム放出は、カルシウムに結合する細胞持続性 (cell-permanent) 色素を利用して決定される。カルシウム結合性色素は、細胞内のカルシウム上昇に比例する蛍光シグナルを発生する。この方法は、受容体活性の迅速かつ定量的な計測を可能にする。

【0083】

用いる細胞は、上述のようにホスホリパーゼC経路に連結できるようにするために、CSR::T1R GPCRとGタンパク質とを共発現するトランスフェクト細胞である。ネガティブコントロールは、候補化合物の可能な非特異的效果を排除するために、CSR::T1Rを発現しない細胞またはその膜 (モックトランスフェクションしたもの) を含む。

カルシウムフラックス検出手順は、「G-protein coupled receptors (Signal Transduction Series)」; 編者: Tatsuya Haga and Gabriel Berstein, 第1版, 424pp. CRC Press - Boca Raton FL; September 1999に詳述されており、適合させたバージョンの概略を以下に記載する。

【0084】

0日目: 96ウェルプレートに、1ウェルあたり8.5K個の細胞を播種し、栄養成長培地中、一晚37°Cで維持する。

1日目: 1ウェルあたり150ngのGPCR DNAおよび0.3μlのリポフェクタミン2000 (Invitrogen) を利用して、細胞をトランスフェクトする。トランスフェクトされた細胞は栄養成長培地中、一晚37°Cで維持する。

【0085】

2日目: 成長培地を捨て、細胞を、1.5μMのFluo-4 AM (Molecular Probes) および2.5μMのプロベニシドを、37°Cで130mMのNaCl、5mMのKCl、10mMのHepes、0.5mMのCaCl<sub>2</sub> および10mMのグルコースを含有する、低カルシウムC1緩衝液 (pH 7.4) に溶かしたもものからなる50μlのカルシウムアッセイ溶液で1時間 (室温にて暗所で) インキュベートする。125μlの低カルシウムC1緩衝溶液をそれぞれのウェルに加え、プレートをさらに30分室温にて暗所でインキュベートする。

緩衝溶液を捨て、プレートを100μlの低カルシウムC1緩衝溶液を洗浄緩衝液として5回洗浄し、細胞を200μlの低カルシウムC1緩衝液中で再構成する。

【0086】

プレートを、例えばFlexstation (Molecular Devices) またはFLIPR (Molecular Devices) などの蛍光マイクロプレートリーダーに設置し、20μlの10倍濃縮リガンドストック溶液を加えて受容体活性化を開始する。蛍光は、リガンドを加える15秒前からリガ

10

20

30

40

50

ンドを加えた後45～110秒後まで継続的に監視する。受容体活性化レベルは以下の2つの方程式で定義される：活性化の% = (最大蛍光 - 基準蛍光 / 基準蛍光) × 100、または蛍光増加 = 最大蛍光 - 基準蛍光、式中基準蛍光はリガンド添加前の平均蛍光レベルを表す。

#### 【0087】

有用な細胞は、これに限定するものではないが、例えばHEK293T細胞およびHEK293T-Rex<sup>T</sup>M細胞などの上述した哺乳類細胞である。細胞は、当該技術分野で周知のとおり、GPCRとGタンパク質で一過性にまたは安定的にトランスフェクトすることができる。優れた異種発現系は、WO2004/055048に詳述されている。

カルシウムフラックスアッセイは、例えば後述の例1に記載されているように行うことができる。

10

#### 【0088】

調節剤の同定は、上述の方法を以下のように変更して行われる。シグナルは、アゴニストの存在下だが試験剤の非存在下でCSR::T1Rを発現する遺伝子組換え細胞から得られた、CSR::T1R活性の基準レベルと比較される。CSR::T1R活性の増大または減少、例えば、少なくとも2倍、少なくとも5倍、少なくとも10倍、少なくとも100倍、またはそれ以上など、により調節剤を同定する。

#### 【0089】

代替的に、同定は、調節剤が存在しないサンプルと比較したとき、または調節剤は存在するがCSR::T1Rポリペプチドを発現しない細胞(モックトランスフェクションした細胞)のサンプルと比較したとき、例えば10%またはそれ以上の、蛍光強度の増大または減少を伴う。

20

#### 【0090】

##### アデニル酸シクラーゼ活性

アデニル酸シクラーゼ活性のためのアッセイは、例えばKenimer & Nirenberg, 1981, Mol. Pharmacol. 20: 585～591に詳述されているように行われる。反応混合物は通常37で10分より短くインキュベートされる。インキュベーション後、反応混合物は0.9mlの冷6%トリクロロ酢酸を添加して除タンパクする。チューブを遠心し、それぞれの上清をDowex AG50w-X4カラムに加える。カラムからのcAMP画分を、アゴニストによる受容体活性化を受けて発生したcAMPレベルを計測するために、4mlの0.1mMイミダゾール-HCl(pH7.5)で計数バイアル中に溶出する。コントロール反応もまた、T1R2-TMDまたはCSR::T1Rポリペプチドを発現しない細胞のタンパク質ホモジネートを利用して行うべきである。

30

#### 【0091】

##### IP<sub>3</sub> / Ca<sup>2+</sup> シグナル

Gタンパク質を発現している細胞中で、イノシトール三リン酸(IP<sub>3</sub>) / Ca<sup>2+</sup>およびその結果としての受容体活性に相当するシグナルを、蛍光を利用して決定可能である。GPCRを発現している細胞は、細胞内貯蔵およびイオンチャネルの活性化経路の寄与の結果、細胞質カルシウムレベルの増大を見せ得、必須ではないが、カルシウムフリー緩衝液中でかかるアッセイを実施し、内在ストアからのカルシウム放出の結果による蛍光応答と区別するために、随意にEDTAなどのキレート剤を補完することが望ましいだろう。

40

#### 【0092】

##### ホスホリパーゼC / 細胞内Ca<sup>2+</sup> シグナル

CSR::T1Rは、受容体とホスホリパーゼCシグナル伝達経路を連結するGタンパク質を有する細胞で発現される。細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の変化は、例えば蛍光Ca<sup>2+</sup>指示色素および/または蛍光イメージングなどを利用して、計測する。

#### 【0093】

##### GTPase / GTP結合

CSR::T1Rを含むGPCRにとって、受容体活性の指標はCSR::T1Rを含

50

む細胞膜によるGTPの結合である。本方法は、標識GTPの結合を決定することで膜と連結するGタンパク質を計測する。

受容体を発現する細胞から単離された膜は、 $35\text{S}$ -GTPaseおよび未標識GDPを含有する緩衝液中でインキュベートされる。活性を有するGTPaseは無機リン酸塩として標識を放出し、これは $20\text{mM}$ の $\text{H}_3\text{PO}_4$ 中の活性炭 $5\%$ 懸濁液中で遊離無機リン酸塩を分離した後にシンチレーションカウンティングによって決定される。混合物をインキュベートし、未結合標識GTPをGF/Bフィルターでろ過して取り除く。結合した標識GTPを液体シンチレーションカウンティングで計測する。コントロールは、試験剤の非特異的効果の可能性を排除するために、CSR: : T1Rを発現しない細胞(モックトランスフェクションしたもの)から単離した膜を利用するアッセイを含む。方法はTraynor and Nahorski, 1995, Mol. Pharmacol., 47: 848~854に詳述されている。

10

#### 【0094】

調節剤を同定するために、上述の、GTP結合またはGTPase活性などの、 $10\%$ またはそれ以上の変化(増大または減少)は通常十分である。しかしながら、アゴニストを同定するためには、上述のアッセイは以下のように変更して実施する。剤は、化合物が $100\text{mM}$ またはそれ以下、例えば $10\mu\text{M}$ から $500\mu\text{M}$ の範囲など、例えば約 $100\mu\text{M}$ で存在したときに、活性が、知られたアゴニスト(例えばペリラルチン)のその少なくとも $50\%$ であった場合、または知られたアゴニストによって誘導されるレベルと同じまたはそれ以上のレベルを誘導する場合、通常アゴニストとして同定される。

#### 【0095】

20

#### マイクロフィジオメーターまたはバイオセンサー

かかるアッセイはHafner, 2000, Biosens. Bioelectron. 15: 149~158に詳述されているように行うことができる。

#### アラキドン酸

アラキドン酸の細胞内レベルは受容体活性の指標として採用される。かかる方法はGijon et al., 2000, J. Biol. Chem., 275:20146-20156に詳述されている。

#### 【0096】

#### cAMP / cGMP

細胞内または細胞外cAMPは、cAMPラジオイムノアッセイ(RIA)または、例えばHorton & Baxendale, 1995, Methods Mol. Biol. 41: 91~105に記載されているような、cAMP結合タンパク質を利用して計測可能である。代替的に、例えばLJL BiosystemsおよびNEN Life Science Productsの高効率蛍光偏光ベースホモジニアスアッセイなど、複数のcAMP計測のためのキットもまた商業的に入手可能である。代替的に、cGMPの細胞内または細胞外レベルもまた、イムノアッセイを利用して計測可能である。例えば、Felly-Bosco et al., Am. J. Resp. Cell and Mol. Biol., 11:159-164(1994)に記載の方法などが、cGMPレベルを決定するのに利用され得る。代替的に、米国特許第4, 115, 538号に記載されているcAMPおよび/またはcGMPを計測するアッセイキットもまた利用可能である。

30

試験剤の非特異的効果の可能性を排除するためのモックトランスフェクションされた細胞またはその抽出物を有するネガティブコントロールが利用され得る。

40

#### 【0097】

#### DAG / IP<sub>3</sub>

例えばPhospholipid Signaling Protocols, Ian M. Bird, Totowa, N.J.編, Humana Press, 1998に記載のように、受容体活性に起因するリン脂質分解によって放出される、二次メッセンジャーのジアシルグリセロール(DAG)および/またはイノシトール三リン酸(IP<sub>3</sub>)をGPCR(CSR: : T1R)活性の指標として検出しおよび利用することが可能である。例えばPerkin Elmer and CisBio Internationalから商業的に入手可能な、イノシトール三リン酸の計測のためのキットもまた利用可能である。

試験剤の非特異的効果の可能性を排除するためのモックトランスフェクションされた細胞またはその抽出物を有するネガティブコントロールが利用され得る。

50

## 【 0 0 9 8 】

P K C 活性

成長因子受容体チロシンキナーゼは、リン脂質およびカルシウム活性化タンパク質キナーゼファミリーの、タンパク質キナーゼC ( P K C ) の活性化を伴う経路を通してシグナリング可能である。

P K C に誘導される遺伝子産物の増大は、P K C の活性化およびその結果としての受容体の活性化を示す。これらの遺伝子産物は、例えばガン原遺伝子転写因子コード遺伝子 ( c - f o s , c - m y c および c - j u n を含む ) 、プロテアーゼ、プロテアーゼ阻害剤 ( コラーゲナーゼタイプ I およびプラスミノゲン活性化因子阻害剤を含む ) 、および接着分子 ( 細胞内接着因子 I ( I C A M I ) を含む ) などを含む。

10

## 【 0 0 9 9 】

P K C 活性はKikkawa et al., 1982, J. Biol. Chem., 257: 13341に記載されているように、その後ホスホセルロースペーパーに結合することによって分離されるP K C 基質ペプチドのリン酸化を計測することで、直接計測し得る。これは精製キナーゼまたは粗細胞抽出物中の活性の計測に利用可能である。タンパク質キナーゼCサンプルは20 mM H E P E S / 2 mM D T T でアッセイ直前に希釈可能である。

代替的なアッセイは、PanVeraから商業的に入手可能なタンパク質キナーゼCアッセイキットを利用して行うことも可能である。

## 【 0 1 0 0 】

上述のP K C アッセイは、G P C R ( C S R : : T 1 R ) を発現する細胞からの抽出物に対して行う。

20

活性はまた、P K C 活性化によって活性化される遺伝子の制御配列によって駆動するリポーター遺伝子構築物の利用を通して計測可能である。

試験剤の非特異的効果の可能性を排除するためのモックトランスフェクションされた細胞またはその抽出物を有するネガティブコントロールが利用され得る。

## 【 0 1 0 1 】

M A P キナーゼ活性

M A P キナーゼ活性は、例えばNew England Biolabsのp 3 8 M A P キナーゼアッセイキット、またはPerkin-Elmer Life ScienceのFlashPlate<sup>T M</sup> M A P キナーゼアッセイなど、商業的に入手可能なキットを利用して計測可能である。p 4 2 / 4 4 M A P キナーゼまたはE R K 1 / 2 は、G q およびG i 結合G P C R を発現する細胞を利用しているとき、G P C R ( C S R : : T 1 R ) 活性を示すために計測可能であり、G P C R 活性化に続く内在性E R K 1 / 2 キナーゼのリン酸化を計測するE R K 1 / 2 アッセイキットはTGR Biosciencesから商業的に入手可能である。

30

## 【 0 1 0 2 】

知られた合成または天然チロシンキナーゼ基質および標識リン酸塩を通したチロシンキナーゼ活性の直接計測は周知であり、他のタイプのキナーゼ ( 例えばセリン / スレオニンキナーゼ ) の活性も同様に計測可能である。

## 【 0 1 0 3 】

全てのキナーゼアッセイは、精製キナーゼまたは1または2以上のC S R : : T 1 R ポリペプチドを発現する細胞から調製した粗抽出物で行うことができる。利用するキナーゼの基質は、全長タンパク質または基質の代わりとなる合成ペプチドであり得る。Pinna & Ruzzene ( 1996, Biochem. Biophys. Acta 1314: 191-225 ) は、キナーゼ活性の検出に有用な複数のリン酸化基質部位を列挙している。複数のキナーゼ基質ペプチドが商業的に入手可能である。特に有用なものは、多くの受容体および非受容体チロシンキナーゼの基質である、「S r c - 関連ペプチド」R R L I E D A E Y A A R G ( Sigma から商業的に入手可能 ) である。いくつかの方法は、ペプチド基質のフィルターへの結合を必要とし、そこでペプチド基質は、結合を促進するために、正味で正に荷電しているべきである。一般的に、ペプチド基質は少なくとも2つの塩基性残基および遊離アミノ末端を有しているべきである。反応は一般的に、0 . 7 ~ 1 . 5 m M のペプチド濃度を利用する。

40

50

試験剤の非特異的効果の可能性を排除するためのモックトランスフェクションされた細胞またはその抽出物を有するネガティブコントロールが利用され得る。

【0104】

転写レポーター / CSR : : T1R 応答性プロモーター / レポーター 遺伝子

レポーター 遺伝子 アッセイで調節剤を同定するためには、シグナルにおける、少なくとも2倍の増大または10%の減少が有意である。アゴニストは、試験剤の存在下および非存在下における活性を比較したとき、例えば少なくとも2倍、5倍、10倍またはそれ以上刺激する。

CSR : : T1R へのアゴニストの結合によって開始される細胞内シグナルは、細胞内事象のカスケードを作動させ、最終結果として1または2以上の遺伝子の転写または翻訳における迅速かつ検出可能な変化をもたらす。

受容体の活性はしたがって、CSR : : T1R 活性化にตอบสนองするプロモーターによって駆動されるレポーター 遺伝子の発現の計測によって決定される。

【0105】

本明細書で使用される「プロモーター」は、遺伝子発現の受容体媒介制御に必要な1または2以上の転写制御エレメントまたは配列であり、これは受容体調節発現に必要な1または2以上の基本プロモーター、エンハンサーおよび転写因子結合部位を含む。CSR : : T1R へのアゴニストの結合の結果もたらされる細胞内シグナルにตอบสนองするプロモーターは、選択され、発現または遺伝子産物活性が容易に検出および計測可能な、対応するプロモーター制御レポーター 遺伝子に作動可能に連結される。

【0106】

レポーター 遺伝子は、例えばルシフェラーゼ、CAT、GFP、 $\beta$ -ラクタマーゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、およびいわゆる「前初期」遺伝子、c-fos ガン原遺伝子、転写因子 CREB、血管作動性腸ペプチド (VIP) 遺伝子、ソマトスタチン遺伝子、プロエンケファリン遺伝子、ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ (PEPCK) 遺伝子、NF- $\kappa$ B にตอบสนองする遺伝子、および AP-1 応答遺伝子 (Fos および Jun、Fos 関連抗原 (Fra) 1 および 2、I $\kappa$ B、オルニチンデカルボキシラーゼ、および アネキシン I および II の遺伝子を含む) から選択されてよい。

【0107】

プロモーターは、当業者には明らかなように、選択されたレポーター 遺伝子に応じて選択される。

ルシフェラーゼ、CAT、GFP、 $\beta$ -ラクタマーゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ およびその産物の検出のためのアッセイは当該技術分野で周知である。さらなるレポーター 遺伝子の例は以下に記載されている。

【0108】

「前初期」遺伝子は好適であり、速やかに誘導される (例えば受容体とエフェクタータンパク質またはリガンドとの接触から数分以内)。レポーター 遺伝子の好ましい特性には、次の1または2以上のものが含まれる: リガンド結合に対する速やかな応答性、休眠細胞における低発現または検出できない発現、新たなタンパク質合成の一過性かつ独立した誘導、後続する転写の遮断に新たなタンパク質合成が必要であること、およびこれらの遺伝子から転写された mRNA が数分から数時間の短い半減期を有すること。同様に、プロモーターも好ましくは、これらの特性を1つ、数個、または全て有している。

【0109】

c-fos ガン原遺伝子は、複数の異なる刺激にตอบสนองし、速やかな誘導を有する遺伝子の例である。c-fos 調節エレメントは、転写開始に必要な TATA ボックス、基本転写のための2つの上流エレメント、および、二回対称性を有するエレメントを含み、TPA、血清、EGF、および PMA による誘導に必要なエンハンサーを含む。c-fos の mRNA キャップ部位の上流 -317 ~ -298 bp の間に位置する 20 bp の c-fos 転写エンハンサーエレメントは、血清枯渴 NIH 3T3 細胞の血清誘導に不可欠である。2つの上流エレメントのうちの1つは -63 ~ -57 に位置し、cAMP 調節のための

10

20

30

40

50

コンセンサス配列に類似する。

【0110】

転写因子 CREB (サイクリックAMP応答エレメント結合タンパク質)は細胞内cAMPのレベルに応答する。したがって、cAMPレベルの調節を通してシグナルする受容体の活性化は、転写因子の結合か、またはCREB結合エレメント(CRE、またはcAMP応答エレメントと称する)に連結されたレポーター遺伝子の発現を検出することで決定可能である。CREのDNA配列はTGACGTCAである。CREB結合活性に応答するレポーター構築物は米国特許第5,919,649号に記載されている。

【0111】

他の好適なレポーター遺伝子およびそのプロモーターは、血管作動性腸ペプチド(VIP)遺伝子およびcAMP応答性のそのプロモーター、ソマトスタチン遺伝子およびcAMP応答性のそのプロモーター、プロエンケファリンおよびcAMP、ニコチンアゴニスト、およびホルボールエステルに応答性のそのプロモーター、およびホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ(PEPCK)遺伝子およびcAMP応答性のそのプロモーターを含む。

10

【0112】

GPCR活性の変化に応答するレポーター遺伝子およびそのプロモーターのさらなる例は、AP-1転写因子およびNF- $\kappa$ Bを含む。AP-1プロモーターは、回文配列TGA(C/G)TCAであるコンセンサスAP-1結合部位により特徴付けられる。AP-1はまた、ホルボールエステル12-O-テトラデカノイルホルボール-アセテート(TPA)を含む腫瘍プロモーターによる誘導の媒介に関与しており、したがって、TPA応答性エレメントとして、TREと呼ばれることもある。AP-1は、増殖刺激に対する細胞の早期の応答に関与する複数の遺伝子を活性化する。AP-1応答性遺伝子の例は、FosおよびJun(タンパク質それ自体がAP-1活性を組成する)、Fos関連抗原(Fra)1および2、I $\kappa$ B、オルニチンデカルボキシラーゼ、およびアネキシンIおよびIIの遺伝子を含む。

20

【0113】

NF- $\kappa$ Bプロモーター/結合エレメントはコンセンサス配列GGGGACTTTCCを有する。多くの遺伝子がNF- $\kappa$ B応答性であると同定されていて、その制御エレメントをレポーター遺伝子と連結し、GPCR活性を監視することが可能である。NF- $\kappa$ Bに応答する遺伝子は、例えばIL-1、TNF- $\alpha$ 、CCR5、P-セレクチン、Fasリガンド、GM-CSFおよびI $\kappa$ Bをコードするものを含む。NF- $\kappa$ B応答性レポーターをコードするベクターは当該技術分野で知られているか、または当該技術分野の通常の技術、例えば合成NF- $\kappa$ Bエレメントおよび最小プロモーターを用いて、またはNF- $\kappa$ B制御に従うことが知られる遺伝子のNF- $\kappa$ B応答性配列を用いて容易に形成可能である。さらに、NF- $\kappa$ B応答性レポーター構築物は、例えばCLONTECHから商業的に入手可能である。

30

【0114】

与えられたプロモーター構築物は、構築物をトランスフェクトしたGPCR(CSR::T1R)発現細胞を、アゴニスト(例えばペリラルチン)に曝露することで簡単に試験することができる。アゴニストに応答するレポーター遺伝子の発現における、少なくとも2倍の増大は、レポーターがGPCR(CSR::T1R)活性を計測するのに適していることを示す。

40

転写アッセイのためのコントロールは、GPCR(CSR::T1R)を発現しないがレポーター構築物を保持している細胞、およびプロモーターのないレポーター構築物を有する細胞の両方を含む。

【0115】

レポーター遺伝子の活性化によって示されるGPCR(CSR::T1R)活性を調節する剤は、他のプロモーターおよび/または他の受容体を用いて、シグナルのGPCR(CSR::T1R)特異性を立証し、およびその活性範囲を決定することによって立証可

50

能であり、これにより、あらゆる非特異的シグナル、例えばレポーター遺伝子経路經由の非特異的シグナルなどを排除する。

【0116】

イノシトールリン酸 (IP) 計測

ホスファチジルイノシトール (PI) 加水分解は、少なくとも48時間またはそれ以上の<sup>3</sup>H-ミオイノシトールによる細胞標識を伴う、米国特許第5,436,128号に記載されているように決定されてよい。標識細胞は試験剤に1時間接触させ、次いでそれらの細胞を溶解し、クロロホルム-メタノール-水に抽出する。その後、イノシトールリン酸をイオン交換クロマトグラフィで分離し、シンチレーションカウンティングで定量する。アゴニストに関して、刺激比 (fold stimulation) は、試験剤の存在下における計数毎分 (cpm) の、緩衝液コントロールの存在下でのcpmに対する比を計算して決定される。同じように、阻害剤、アンタゴニストおよび逆アゴニストに関して、阻害比は、試験剤の存在下における計数毎分 (cpm) の、緩衝液コントロール (アゴニストを含有してもしなくてもよい) の存在下でのcpmに対する比を計算して決定される。

10

【0117】

結合アッセイ

リガンド結合に対する機能的応答に起因するパラメータ変化を計測する上述の機能的アッセイに代えて、リガンド結合を、CSR::T1R受容体へのリガンドの結合を計測する結合アッセイで決定してもよい。

結合アッセイは当該技術分野で周知であり、溶液中、任意に固相に付着した二重膜中、脂質単層中、または小胞中で試験可能である。CSR::T1Rポリペプチドへの調節剤の結合は、例えば分光特性 (例えば蛍光、吸収、または屈折率) の変化の計測、水力学的手法 (例えば外見の採用)、およびクロマトグラフィ、CSR::T1Rポリペプチドの可溶性特性の計測等によって決定可能である。1つの態様において、結合アッセイは生物化学的であり、組換えCSR::T1Rポリペプチドを発現する細胞/組織からの膜抽出物を利用する。結合アッセイは、例えば、T1RについてAdler et al.によってUS20050032158の段落[0169]から[0198]に記載されているように実施することができる。

20

【0118】

CSR::T1R受容体ポリペプチドおよび核酸、ならびに実質的に相同なポリペプチドおよび核酸

30

本明細書に記載されている方法に有用なCSR::T1Rキメラタンパク質は、配列番号2 (CSR::T1R2-a)、配列番号4 (CSR::T1R3-a)、配列番号20 (CSR::T1R2-b)、配列番号22 (CSR::T1R3-b)、配列番号2および配列番号4のキメラヘテロダイマー (CSR::T1R2-a/CSR::T1R3-a)、配列番号20および配列番号22のキメラヘテロダイマー (CSR::T1R2-b/CSR::T1R3-b)、配列番号2および配列番号22のキメラヘテロダイマー (CSR::T1R2-a/CSR::T1R3-b)、配列番号20および配列番号4のキメラヘテロダイマー (CSR::T1R2-b/CSR::T1R3-a)、配列番号2または20と野生型T1R3のヘテロダイマー (CSR::T1R2-a/T1R3またはCSR::T1R2-b/T1R3)、および配列番号4または22と野生型T1R2のヘテロダイマー (T1R2/CSR::T1R3-aまたはT1R2/CSR::T1R3-b) から選択されるポリペプチドからなる群から選択されてよい。

40

【0119】

あるいは、CSR::T1Rキメラタンパク質 (またはCSR::T1Rをコードする核酸配列) は、上記ポリペプチドと実質的に相同であって、依然として機能的である (すなわちリガンドと結合するおよび/またはリガンドによって活性化される、またはかかる受容体をコードしている) レセプター (またはかかるCSR::T1R受容体をコードする核酸配列) であってよい。

【0120】

50

実質的に相同なCSR::T1Rキメラタンパク質は、CSR::T1R2および/またはCSR::T1R3のT1R2またはT1R3部分が、対立遺伝子変異体またはマウス、ラット、ハムスター、サル、およびイヌ由来のT1R2および/またはT1R3を含む、異なる種の関連する部分に置き換えられているかかるタンパク質を含む。

さらに、実質的に相同なCSR::T1R核酸またはポリペプチド配列は、保存的変異および/または点変異により形成されてもよく、下記のあらゆる保存的に改変された変異体を含む。

#### 【0121】

核酸配列について、保存的に改変された変異体は、同一のまたは本質的に同一のアミノ酸配列（保存的に置換されたアミノ酸、すなわちアルギニンに差し替えられたリシンおよび下記に説明されているさらなる例など）をコードする核酸を意味する。

10

#### 【0122】

遺伝コードの縮重によって、配列は異なるが機能的に同一な複数の核酸が任意の与えられたポリペプチド/タンパク質をコードする。かかる核酸変異は「サイレント変異」であり、保存的に改変された変異の1種である。ポリペプチドをコードするそれぞれの核酸配列はまた、全ての可能な核酸のサイレント変異を記載している。したがって、それぞれの核酸中のコドン（通常メチオニンの唯一のコドンであるAUG、および通常トリプトファンの唯一のコドンであるTGGを除く）は、同一のポリペプチドを産生する機能的に同一の核酸配列を得るために改変し得る。したがって、ポリペプチドをコードする核酸のそれぞれのサイレント変異は、それぞれの与えられた核酸配列に内在する。

20

#### 【0123】

アミノ酸配列について、アミノ酸置換は、かかる変化をCSR::T1R配列に導入するのに利用することができる、PCR、遺伝子クローニング、cDNAの部位特異的突然変異誘発法、宿主細胞のトランスフェクション、およびインビトロ転写を含む、遺伝子組換え技術の知られた手順を利用して導入することができる。次いで、変異体を、味覚細胞特異的GPCR機能活性についてスクリーニングすることができる。機能的に類似しているアミノ酸を提供する保存的置換表は当該技術分野で周知である。例えば、保存的置換を選択する1つの典型的な指針は（オリジナルの残基の後に典型的な置換が続く）：ala/glyまたはser、arg/lys、asn/glnまたはhis、asp/glu、cys/ser、gln/asn、gly/asp、gly/alaまたはpro、his/asnまたはgln、ile/leuまたはval、leu/ileまたはval、lys/argまたはglnまたはglu、met/leuまたはtyrまたはile、phe/metまたはleuまたはtyr、ser/thr、thr/ser、trp/tyr、tyr/trpまたはphe、val/ileまたはleuを含む。

30

#### 【0124】

代替的な典型的な指針は、お互いが保存的置換であるアミノ酸をそれぞれ含有する後続の6群：1)アラニン(A)、セリン(S)、スレオニン(T)、2)アスパラギン酸(D)、グルタミン酸(E)、3)アスパラギン(N)、グルタミン(Q)、4)アルギニン(R)、リシン(K)、5)イソロイシン(I)、ロイシン(L)、メチオニン(M)、バリン(V)、および6)フェニルアラニン(F)、チロシン(Y)、トリプトファン(W)を利用する。

40

他の代替的な指針は、全ての荷電アミノ酸を、正であるか負であるかで、相互の保存的置換を認めるものである。加えて、コードされた配列における単一のアミノ酸または小さい割合（例えば26%まで、20%まで、10%まで、または5%まで）のアミノ酸を変化させ、追加し、または削除する個別の置換、欠失または付加もまた保存的に改変された変異とみなされる。

#### 【0125】

実質的に相同なヌクレオチドまたはポリペプチド配列は、以下に示す配列同一性の度合いを有するか、または以下に示すある一定のストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズする。

50

## 【0126】

## %配列同一性

実質的に相同なヌクレオチド配列は、例えば少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも98%の%配列同一性を有する。

実質的に相同なポリペプチド配列は、例えば少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも98%の%配列同一性を有する。

## 【0127】

配列同一性の計算は、後述のように決定される。

B L A S T (Basic Local Alignment Search Tool) は、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov> で利用可能なプログラム `blastn` に使用されているヒューリスティックな検索アルゴリズムである。他のヌクレオチド配列に対するヌクレオチドクエリー配列の%同一性を決定するために、10のEXPECT(データベース配列に対する一致を報告するための統計学的に有意な閾値)、およびDUSTフィルタリングを含む、BLASTバージョン2.2.1.3のデフォルトパラメーターを用いて、`blastn` が利用される。他のポリペプチド配列に対するポリペプチドクエリー配列の%同一性を決定するために、10のEXPECT、およびDUSTフィルタリングを含む、BLASTバージョン2.2.1.3のデフォルトパラメーターを用いて、`blastp` が利用される。

10

## 【0128】

## ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件

ヌクレオチド配列は、本明細書で提示するヌクレオチド配列、またはその相補体と、以下に詳述するストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で選択的にハイブリダイズできた場合、実質的に相同であると考えられる。ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件は、50%のホルムアミド、5×SSC、および1%のSDSからなる溶液中の42℃の温度、および0.2×SSCおよび0.1%のSDS(1×SSC=0.15MのNaCl、0.015Mのクエン酸ナトリウム、pH7.0)からなる溶液中での65℃での洗浄である。

20

## 【0129】

バックグラウンドハイブリダイゼーションは、他のヌクレオチド配列が、例えばスクリーニングされるcDNAまたはゲノムDNA中に存在するために起こり得る。

標的DNAで観察された特異的相互作用の10倍以下の強度のシグナルは、バックグラウンドであると考えられる。相互作用の強度は、例えば、プローブを、例えば<sup>32</sup>Pによって放射性標識して計測することができる。

30

## 【0130】

## 調節剤を同定するためのキット

キットは、例えば、CSR: : T1R、もしくはそれと実質的に相同な配列を発現する組換え細胞を含み、かつ、CSR: : T1Rのアゴニスト、例えば、限定することなく、塩化カルシウム、ペリラルチン、NDHC、サイクラミン酸塩、およびシンナモニトリルなどを含む、スクリーニングキットまたはハイスループットスクリーニングキットである。

カルシウムを含むキットの利用は、野生型受容体またはキメラタンパク質のT1R2およびT1R3部分ではなく、キメラタンパク質のみに結合し、それを活性化するという利点を有する。

40

## 【0131】

任意に、細胞はさらに例えばカルシウムシグナリングのためのGタンパク質を含む。好適なGタンパク質は既知であり、上述されており、当業者は必要な場合にそれをどのように細胞に導入すればよいかを承知している。非常に有用なキメラGタンパク質はGアルファ16-ガストデューシン44である。

アゴニストは、例えば1nM~10mM、または0.1マイクロM~1ミリM、例えば0.1マイクロM~100マイクロMなどの好適な濃度で提供される。

好適な濃度は、例えば、塩化カルシウムについては0.2~20mM、ペリラルチンに

50

については5 ~ 500 μM、シンナモニトリルについては10 ~ 1000 μM、サイクラミン酸塩については0.01 ~ 5 mM、ネオヘスペリジンジヒドロカルコン (NDHC) については0.033 ~ 3.3 mMである。

【0132】

キットの任意構成要素は、提供される組換え細胞を培養するための好適な培地、および、細胞をその上で成長させるための固体支持体、例えば細胞培養皿またはマイクロタイタープレートなどを含んでよく、これらの任意構成要素は当業者が容易に入手できる。

キットは以下のように利用されてよい：

(i) CSR : : T1Rキメラタンパク質を発現する組換え細胞を固体支持体上で成長させる。

10

(ii) 約1 nMから100 mMまたはそれ以上までの濃度の試験剤を、所定のプレートまたはウェルの培養培地に好適な濃度のアゴニストの存在下で加える。

(iii) 細胞の機能的応答の変化が、試験剤の存在下および非存在下での応答を比較することで決定され、その結果試験剤が調節剤であり得るかどうか決定される。

【0133】

例えば、(iii)は上述のアッセイのいずれかに従い、上述の受容体活性を報告する検出方法のいずれかと組合せて行うことができる。これは、同じく上述された、特別に選択したまたは適応させた組換え細胞を必要とすることがある。好適なアッセイは、例えば、CSR : : T1Rの活性化および試験剤に応答したその変化を決定するためのカルシウムフラックスアッセイである。

20

【0134】

キットは増強剤を同定するために以下のように利用することができる：

(i) CSR : : T1Rキメラタンパク質を発現する組換え細胞を固体支持体上で成長させる。

(ii) 約1 nMから100 mMまたはそれ以上の濃度の試験剤を、所定のプレートまたはウェルの培養培地に好適な濃度のカルシウムアゴニスト（例えば、限定することなく、塩化カルシウムの形態のもの）の存在下で加える。

(iii) カルシウムに対する細胞の機能的応答の変化が、試験剤の存在下および非存在下での応答を比較することで決定され、その結果試験剤が増強剤であると決定される。

好適な塩化カルシウムの濃度は、例えば、約0.2 ~ 20 mM、または0.5 ~ 10 mM、または約1 mMである。

30

【0135】

同定された増強剤の確認

上述の方法によって同定された増強剤は、フレーバリストのパネルまたは試験者に同定された調節剤をテイastingさせる単純な官能試験によって簡単に確認し得る。化合物は、例えば、甘味を確認するために水中で、または甘味を増強する調節剤であることを確認するために甘味料と一緒に、調節剤のないネガティブコントロールと比較してテイastingする。

【0136】

大規模スクリーニングアッセイ

40

上述の転写レポーターアッセイおよびほとんどの細胞ベースのアッセイは、ライブラリーをCSR : : T1R活性を調節する剤についてスクリーニングするのに適している。

アッセイは、アッセイ工程の自動化および、典型的には平行して実行される（例えばロボットアッセイにおけるマイクロタイタープレート上のマイクロタイター形式など）、任意の好都合な給源からの化合物のアッセイへの供給によって、巨大な化学的ライブラリーをスクリーニングするように設計され得る。

【0137】

アッセイは、多くの潜在的調節剤を含むコンビナトリアルケミカルまたはペプチドライブラリーの提供を伴う、ハイスループットスクリーニング法で実行されてもよい。かかるライブラリーは、次いで、上述の活性を呈するライブラリー剤（特に化学種またはサブク

50

ラス)を同定するために、上述の1またはそれ以上のアッセイでスクリーニングされる。こうして同定された調節剤は直接利用でき、または、誘導体を製造および試験することでさらなる調節剤を同定するためのリードとして利用することができる。

合成化合物ライブラリは、Maybridge Chemical Co. (Treciliet, Cornwall, UK)、Comgenex (Princeton, N.J.)、Brandon Associates (Merrimack, N.H.)、およびMicrosource (New Milford, Conn.)を含む多くの企業から商業的に入手可能である。

#### 【0138】

##### 試験剤のライブラリ

コンビナトリアルケミカルライブラリは、試薬などの多くの化学的「ビルディングブロック」の組合せることにより、化学合成または生物学的合成のいずれかによって生成された様々な化学化合物のコレクションである。例えば、ポリペプチドライブラリなどのリニアコンビナトリアルケミカルライブラリは、所定の化合物長(すなわち、ポリペプチド化合物中のアミノ酸の数)について、化学的ビルディングブロック(アミノ酸)のセットをあらゆる可能な方法で組合せることによって形成される。何百万もの化学的化合物が、かかる化学的ビルディングブロックの組合せ混合を通して合成可能である。

レアケミカルライブラリはAldrich (Milwaukee, Wis.)から入手可能である。

#### 【0139】

細菌、真菌、植物および動物抽出物の形態の天然化合物のライブラリは、例えばPan Laboratories (Bothell, Wash.)またはMycoSearch (NC)から商業的に入手可能であり、あるいは、当該技術分野で周知の方法で容易に生成可能である。さらに、天然および合成的に産生されたライブラリおよび化合物は、慣用の化学的、物理的および生化学的手法で容易に改変される。

他のライブラリとしては、タンパク質/発現ライブラリ、例えば食物、植物、動物、細菌を含む天然給源からのcDNAライブラリ、1または2以上のポリペプチドをランダムにまたは体系的に変異させた変異体を発現するライブラリ、および1つの細胞または組織のmRNA内容を発現させるのに利用されるウィルスベクターでのゲノムライブラリを含む。

#### 【0140】

ハイスループットアッセイでは、数千の異なる調節剤またはリガンドを1日でスクリーニングすることが可能である。特に、マイクロタイタープレートの各ウェルは、選択された潜在的調節剤に対する別個のアッセイの実施に利用でき、または、濃度またはインキュベーション時間の効果を観察すべき場合、各5~10ウェルで1つの調節剤を試験可能である。したがって、1つの標準的なマイクロタイタープレートは約100の調節剤をアッセイ可能である。1536ウェルプレートを利用した場合、1つのプレートは、約100から約1500の異なる化合物を、簡単にアッセイ可能である。1日にいくつかの異なるプレートをアッセイ可能なので、約6,000~20,000の異なる化合物のためのアッセイスクリーニングが可能である。

#### 【0141】

##### 本アッセイ方法でCSR::T1Rの調節効果を試験し得る試験剤のタイプ

試験剤は、小化学化合物、化学ポリマー、生物ポリマー、ペプチド、タンパク質、糖、炭水化物、核酸および脂質を含む任意の剤であってもよい。剤は、合成化合物、化合物の混合物、天然産物または天然サンプル、例えば植物抽出物、培養上清、または組織サンプルなどであり得る。

#### 【0142】

甘味を改変し得る化合物の例として、メチルカピコール、テアサポニンE1、アセスルファミンK、アリテーム、アスパルテーム、CH401、ズルチン、ネオテーム、サイクラミン酸ナトリウム、スクラロース、スーパーアスパルテーム、シナリン、グリシフィリン、レバウジオシドC、アブルソシドA (Abrusoside A)、アブルソシドB、アブルソシドC、アブルソシドD、アブルソシドE、アピオグリチルリチン、アラボグリチルリチン、バイユノシド、ブラゼイン、プリオズルコシド、カルノシフルオシドV (Carnosifloside

10

20

30

40

50

V)、カルノシフルオシドV I、D. cumminsii、シクロカリオシドA、シクロカリオシドI、ズルコシドA、グリチルリチン酸、ヘルナンズルチン、ヘルナンズルチン、4ベータ-ヒドロキシ-ヘスペリチン-7-グルコシドジヒドロカルコン、ハンキオシドE (Huangioside E)、ハンキオシドE、3-ヒドロキシフロリジン、

【0143】

2,3-ジヒドロ-6-メトキシ3-O-アセテート、マピンリンマルトシル-アルファ-(1,6)-ネオヘスペリジンジヒドロカルコン、モグロシドI I E、モグロシドI I I、モグロシドI I I E、モグロシドI V、モグロシドV、11-オキソモグロシドV、モナチン、グリチルリチン酸モノアンモニウム(Mag)、ムクロジオシドI i b (Mukurozioside lib)、ナリンジンジヒドロカルコン、ネオヘスペリジンジヒドロカルコン(NHDC)、ネオモグロシド、オスラジン、ペリアンドリンI、ペリアンドリンI I、ペリアンドリンI I I、ペリアンドリンI V、ペリアンドリンV、フロミソシドI (Phlomisioside I)、フロリジン、フィロズルチン、ポリポドシドA、グリチルリチンカリウムマグネシウムカルシウム、プテロカリオシドA (Pterocaryoside A)、プテロカリオシドB、レバウジオシドA、レバウジオシドB、ルブソシド、

【0144】

スカンデノシドR6 (Scandenoside R6)、シアメノシドI、グリチルリチン酸ナトリウム、ステビオールピオシド、ステビオシド、ステビオシド、アルファ-グリコシルスアピオシドA、スアピオシドB、スアピオシドG、スアピオシドH、スアピオシドI、スアピオシドJ、タウマチン、グリチルリチン酸トリアンモニウム(TAG)、トリロパチンクルクリン、ストロジン1、ストロジン2、ストロジン4、ミラクリン、ホダルシン、ジュジュバサポニンI I、ジュジュバサポニンI I I、アブルソシドE、ペリアンドリン酸I、モノグルクロニド、ペリアンドリン酸I I、モノグリクロニド、クロロゲン酸、ベータ-(1,3-ヒドロキシ-4-メトキシベンジル)-ヘスペルチンジヒドロカルコン、3'-カルボキシ-ヘスペルチンジヒドロカルコン、3'-ステビオシドアナログを挙げることができる。

同定された甘味料の調節剤は、例えば、甘味知覚を誘発することが可能な人工甘味料の調節剤を含んでもよい。

【0145】

消費材は食料製品、飲料、口腔ケア製品、およびかかる製品に混合するための組成物、特にフレーバー組成物を含む。フレーバー組成物は、加工食品または飲料にその加工の最中に添加することができ、またはそれら自身が、例えばソースなどの調味料などの消費材となり得る。甘味料は、菓子類ならびにデザートおよび風味のあるおよび甘酸っぱい消費材を含む他の甘味消費材に特に有用である。消費材の例は、菓子製品、ケーキ、シリアル製品、パン屋製品、パン製品、ガム、チューインガム、ソース(調味料)、スープ、加工食品、調理果物および野菜製品、肉および肉製品、卵製品、ミルクおよび乳製品、チーズ製品、バターおよび代替バター製品、代替乳製品、大豆製品、食用油および油脂製品、薬剤、飲料、アルコール飲料、ビール、ソフトドリンク、食品抽出物、植物抽出物、肉抽出物、調味料、甘味料、栄養補助食品、薬用および非薬用ガム、錠剤、トローチ、ドロップ、乳剤、エリキシル剤、シロップおよび飲料を製造するための他の調製物、インスタント飲料および発泡錠を含む。

【0146】

核酸およびタンパク質の配列

本明細書に記載の構築物および方法に用いた配列は、後述の配列表に見出すことができる。

配列番号1および19はCSR::T1R2キメラタンパク質(-a/-b)をコードするヌクレオチド/核酸配列に対応し、配列番号2および20はCSR::T1R2キメラタンパク質(-aおよび-b)のポリペプチド/アミノ酸配列に対応している。

配列番号3および21はCSR::T1R3キメラタンパク質(-aおよび-b)をコードするヌクレオチド/核酸配列に対応し、配列番号4および22はCSR::T1R3

10

20

30

40

50

キメラタンパク質 ( - a および - b ) のポリペプチド / アミノ酸配列に対応している。

【 0 1 4 7 】

2つのサブユニットを含む複合体として一緒になって、CSR : : T1R2キメラタンパク質およびCSR : : T1R3キメラタンパク質は機能的キメラ甘味受容体を形成する。得られる複合体は2つの - a 変異体、2つの - b 変異体、または組み合わせ ( CSR : : T1R2 - a と CSR : : T1R3 - b または CSR : : T1R2 - b と CSR : : T1R3 - a )、または本明細書に記載されているようにその機能を残した相同時変異体を含み得る。

【 0 1 4 8 】

トランスフェクトされた構築物において、新規なキメラタンパク質をコードする核酸 ( 変異体 - a についての配列番号1または3、および変異体 - b についての配列番号19または21 ) のC末端に、HSVタグを後続させる ( 配列番号5 ) 。

得られるタンパク質はしたがって次のアミノ酸を含有する：配列番号5が後続する配列番号1、配列番号5が後続する配列番号19、配列番号5が後続する配列番号3、または配列番号5が後続する配列番号21のアミノ酸。

【 0 1 4 9 】

T1R2 / T1R3 受容体複合体の、既知のT1R2およびT1R3サブユニットの既知の全長核酸及びタンパク質配列は、T1R2については配列番号7 + 8に、T1R3については配列番号9 + 10に与えられている。

既知の全長hCaSR受容体核酸およびタンパク質配列は配列番号11 + 12に与えられている。

【 0 1 5 0 】

配列番号1 + 2 : CSR : : T1R2 - a 核酸 + タンパク質

配列番号3 + 4 : CSR : : T1R3 - a 核酸 + タンパク質

配列番号5 + 6 : C末端のHSVタグ核酸 + タンパク質

配列番号7 + 8 : T1R2 ( 全長コード配列 ) 核酸 + タンパク質

配列番号9 + 10 : T1R3 ( 全長コード配列 ) 核酸 + タンパク質

配列番号11 + 12 : hCaSR 核酸 + タンパク質

配列番号13 ~ 18 : プライマー配列、例2a & b および例3a & bを比較

配列番号19 + 20 : CSR : : T1R2 - b 核酸 + タンパク質

配列番号21 + 22 : CSR : : T1R3 - b 核酸 + タンパク質

配列番号23 ~ 25 : プライマー配列、例2b および3bを比較

【 0 1 5 1 】

これより以下に、上述の方法を例証する一連の例が続く。以下の例は単なる例示であって、いかようにも本方法またはキットを限定すると解すべきではない。

【 0 1 5 2 】

実施例

全ての実施例において、ヒトT1R2、T1R3およびhCaSR由来のDNA配列を利用している。

実施例の概要

1 : Fluorimetric Calcium Assay

2a : CSR : : T1R2 - a ベクター構築物の調製

2b : CSR : : T1R2 - b ベクター構築物の調製

3a : CSR : : T1R3 - a ベクター構築物の調製

3b : CSR : : T1R3 - b ベクター構築物の調製

4 : T1R2、T1R3 ベクター構築物の調製 ( 比較のための野生型受容体 )

5 : CSR : : T1R2 / CSR : : T1R3、およびT1R2 / T1R3 異種発現系のトランスフェクション

5.2 : CSR : : T1R2 / CSR : : T1R3 ヘテロダイマーを発現する安定細胞株の調製

10

20

30

40

50

6 a : C S R : : T 1 R 2 - a / C S R : : T 1 R 3 - a の活性化

6 b : C S R : : T 1 R 2 - b / C S R : : T 1 R 3 - b の活性化

【 0 1 5 3 】

#### 例 1

##### F l u o - 4 カルシウムアッセイ

F l u o - 4 は、細胞内カルシウムの蛍光指示薬であり、カルシウム濃度の変化、特にリガンド添加後に起こる受容体活性化に応答した増加の決定を可能にする。

G 1 6 - ガストデューシン 4 4 を安定発現する H E K 2 9 3 細胞を宿主細胞として利用し、例 5 に記載のとおり様々な構築物でトランスフェクトした。

【 0 1 5 4 】

黒く、底が透明な 9 6 ウェルプレートを用いた。アッセイの前日、プレートに、ウェル毎に 8 5 0 0 個のトランスフェクト細胞を播種し、用いた細胞に適した成長培地中、3 7 °C で一晩維持した。H E K 2 9 3 については、高グルコース、L - グルタミン、塩酸ピロキシジンを含む、1 0 % ウシ胎仔血清を添加したダルベッコ改変イーグル培地を H E K 2 9 3 細胞の成長および維持に利用した。

【 0 1 5 5 】

アッセイの際に成長培地を廃棄し、細胞を 1 時間 ( 3 7 °C にて暗所で )、低カルシウム C 1 緩衝溶液に溶解した 1 . 5 μ M の F l u o - 4 A M ( Molecular Probes™, Invitrogen, US ) および 2 . 5 μ M のプロベニシド ( Sigma-Aldrich ) からなる 5 0 μ l のカルシウムアッセイ溶液でインキュベートした。低カルシウム C 1 緩衝溶液は 1 3 0 m M の N a C l 、 5 m M の K C l 、 1 0 m M の H e p e s 、 0 . 5 m M の C a C l 2 ( 2 m M から減じてある ) および 1 0 m M のグルコース ( p H 7 . 4 ) を含有する。

【 0 1 5 6 】

最初の 1 時間の負荷期間の後、プレートをウェルあたり 1 0 0 μ l の低カルシウム C 1 緩衝液で 5 回、自動プレート洗浄機 ( BioTek ) を利用して洗浄し、洗浄の後、F l u o - 4 - A M の完全な脱エステル化をもたらすために、プレートを室温にて 3 0 分間暗所でさらにインキュベートした。緩衝溶液を廃棄し、プレートを 1 0 0 μ l の低カルシウム C 1 洗浄緩衝液で洗浄し、最終的に細胞を 1 8 0 μ l の低カルシウム C 1 洗浄緩衝液中に入れた。

【 0 1 5 7 】

アッセイの読み取りのため、プレートを F L I P R ( 蛍光イメージングプレートリーダー ( FLIPR-Tetra, Molecular Devices ) ) 中に置き、受容体活性化を、低カルシウム C 1 緩衝液中で調製した 2 0 μ l の 1 0 × 濃縮リガンドストック溶液の添加後に開始させた。

蛍光は、リガンド添加前 1 5 秒間およびリガンド添加後 1 0 5 秒間で継続的に監視した ( 4 5 ~ 1 0 5 秒で十分であろう ) 。

受容体活性化は相対蛍光単位 ( R F U ) で与えられ、次の等式で定義される :

蛍光増加 = 最大蛍光 - 基準蛍光

式中、基準蛍光はリガンド添加前の最初の 1 0 ~ 1 5 秒について計算した平均蛍光を表す。

【 0 1 5 8 】

ネガティブコントロールとして、モックトランスフェクションした細胞を同濃度のリガンドに曝露し、シグナルに対応しない微量のカルシウム濃度を決定した。活性化された受容体を有する細胞は、ネガティブコントロールを有意に上回るシグナル ( R F U ) によって同定した。

【 0 1 5 9 】

#### 例 2 a

##### C S R : : T 1 R 2 - a ベクター構築物の調製

C S R : : T 1 R 2 - a キメラ c D N A ベクター構築物は、P C R によって生成された 2 つの D N A 断片を、両方の P C R 産物、すなわち h C a S R の細胞外アミノ末端ドメイン ( A T D ) ( 1 ~ P h e <sup>539</sup> ) を表す P C R 産物およびシステインリッチドメイン (

10

20

30

40

50

CRD)、膜貫通ドメイン(TMD)およびSer<sup>493</sup>から始まるC末端を含むT1R2の「-a」断片(T1R2-a、配列番号1(核酸)および2(タンパク質))を表すPCR産物、にある共通の制限酵素部位を介して連結することによって作出した。

【0160】

CSR::T1R2-aキメラDNAの作製を容易にするために、SacII部位を、上述の2つの断片を形成するために利用したプライマーに導入した。これらの導入部位および適した制限酵素を当該技術分野で周知のバッファーおよび条件下で利用し、断片を酵素ライゲーションによって連結した。

【0161】

形成されたPCR産物/断片中のこれらのSacII部位は、hCaSRのATD断片のC末端およびT1R2-a断片のN末端にそれぞれ位置し、キメラDNAの2つのPCR産物/断片のライゲーションを可能にする。このSacII部位の組み込みは、hCaSR中のPhe<sup>539</sup>をアルギニン残基に変換する。CSR::T1R2-aキメラcDNA断片を含む断片を、以下に与えられる配列番号13~16の特異的プライマーを用いて、Platinum Taq High Fidelity Polymeraseを用いたPCRを利用して増幅した。Fはフォワードプライマーを示し、Rはリバースプライマーを示す。

下線文字は、後続するPCR産物のサブクローニングのための、プライマー内に存在する制限部位を示す。

【0162】

hCaSR-ATDプライマーF(配列番号13)  
 C A C C A A G C T T A T G G C A T T T T A T A G C T G C  
 hCaSR-ATDプライマーR(配列番号14)  
 A T A T C C G C G G C A C C T C C C T G G A G A A C C C  
 T1R2-断片プライマーF(配列番号15)  
 A T A T C C G C G G T C C A T G T G T T C C A A G A G G  
 T1R2-断片プライマーR(配列番号16)  
 A T A T G C G G C C G C A G T C C C T C C T C A T G G T

【0163】

PCR増幅のための鋳型は、ヒトCaSRをコードする全長cDNA(Origene Inc., USAから商業的に入手可能)、またはヒト茸状乳頭味覚組織から作出したcDNAライブラリーから単離したヒトT1R2をコードする全長cDNAであった。PCR反応パラメータは、94で5分の後、94で45秒、54で15秒および72で2分を35サイクル、その後最終伸張サイクルとして72で10分であった。

【0164】

得られた核酸断片はゲル電気泳動によって分離し、精製し、およびpCR-Topo-IIIベクター(Invitrogen)にサブクローニングし、PCR増幅によって起こった変異が無いことを保証するために、得られたクローンをDNAシーケンシングによって確認した。

シーケンシングの後、挿入物をpcDNA4/TO(Invitrogen, USAから購入)に基づく発現カセットベクター構築物に3ピースライゲーションによりサブクローニングし、ベクター構築物においてCSR::T1R2-aキメラcDNA断片のアッセムブリを可能にした。

【0165】

得られた挿入物のC末端は単純ヘルペスウイルス(HSV)糖タンパク質Dエピトープをコードしており、このエピトープに結合する特異抗体を利用した免疫細胞化学研究に利用可能である。CSR:T1R2-a cDNAを有する得られたCSR:T1R2-aベクター構築物は、(アミノ末端からC末端方向に)配列番号6(HSVエピトープ)が後続する配列番号2(CSR:T1R2-a)の連結アミノ酸配列であるCSR:T1R2-a:HSVタンパク質の発現を可能にする。

【0166】

10

20

30

40

50

## 例 2 b

C S R : : T 1 R 2 - bベクター構築物の調製

C S R : : T 1 R 2 - bキメラ c D N Aベクター構築物は、P C Rによって生成された2つのD N A断片を、両方のP C R産物、すなわちh C a S Rの細胞外アミノ末端ドメイン(A T D)およびシステインリッチドメイン(C R D)(1 ~ I l e<sup>603</sup>)を表すP C R産物ならびに膜貫通ドメイン(T M D)およびV a l<sup>557</sup>から始まるC末端を含むT 1 R 2の「- b」断片(T 1 R 2 - b、配列番号19(核酸)および20(タンパク質))を表すP C R産物、にある共通の制限酵素部位を介して連結することによって作出した。

## 【0167】

C S R : : T 1 R 2 - bキメラD N Aの作製を容易にするために、B s i W I部位を、上述の2つの断片を形成するために利用したプライマーに導入した。これらの導入部位および適した制限酵素を当該技術分野で周知のバッファーおよび条件下で利用し、断片を酵素ライゲーションによって連結した。

## 【0168】

形成されたP C R産物/断片中のこれらのB s i W I部位は、h C a S RのA T D断片のC末端およびT 1 R 2 - b断片のN末端にそれぞれ位置し、キメラD N Aの2つのP C R産物/断片のライゲーションを可能にする。このB s i W I部位の組み込みは、h C a S R中のG l u<sup>602</sup>/I l e<sup>603</sup>をA r g /T h r残基に変換する。C S R : T 1 R 2 - bキメラ c D N A断片を含む断片を、以下に与えられる配列番号13、16、23および24の特異的プライマーを用いて、Platinum Taq High Fidelity Polymeraseを用いたP C Rを利用して増幅した。Fはフォワードプライマーを示し、Rはリバースプライマーを示す。

下線文字は、後続するP C R産物のサブクローニングのための、プライマー内に存在する制限部位を示す。

## 【0169】

h C a S R - A T DプライマーF(配列番号13)  
 C A C C A A G C T T A T G G C A T T T T A T A G C T G C  
 h C a S R - A T DプライマーR(配列番号23)  
 A T A T C G T A C G C T T G G C A A T G C A G G A G G T  
 T 1 R 2 - 断片プライマーF(配列番号24)  
 A T A T C G T A C G G T C T T C C T G G A A T G G C A T  
 T 1 R 2 - 断片プライマーR(配列番号16)  
 A T A T G C G G C C G C A G T C C C T C C T C A T G G T

## 【0170】

P C R増幅のための鋳型は、ヒトC a S Rをコードする全長c D N A(Origene Inc., USAから商業的に入手可能)、またはヒト茸状乳頭味覚組織から作出したc D N Aライブラリーから単離したヒトT 1 R 2をコードする全長c D N Aであった。P C R反応パラメータは、94 で5分の後、94 で45秒、54 で15秒および72 で2分を35サイクル、その後最終伸張サイクルとして72 で10分であった。

## 【0171】

得られた核酸断片はゲル電気泳動によって分離し、精製し、およびp C R - T o p o - I Iベクター(Invitrogen)にサブクローニングし、P C R増幅によって起こった変異が無いことを保証するために、得られたクローンをD N Aシーケンシングによって確認した。

シーケンシングの後、挿入物をp c D N A 4 / T O(Invitrogen, USAから購入)に基づく発現カセットベクター構築物に3ピースライゲーションによりサブクローニングし、ベクター構築物においてC S R : : T 1 R 2 - bキメラ c D N A断片のアッセムブリを可能にした。

## 【0172】

10

20

30

40

50

得られた挿入物のC末端は単純ヘルペスウイルス(HSV)糖タンパク質Dエピトープをコードしており、このエピトープに結合する特異抗体を利用した免疫細胞化学研究に利用可能である。CSR:T1R2-b cDNAを有する得られたCSR:T1R2-bベクター構築物は、(アミノ末端からC末端方向に)配列番号6(HSVエピトープ)が後続する配列番号20(CSR:T1R2-b)の連結アミノ酸配列であるCSR:T1R2-b:HSVタンパク質の発現を可能にする。

【0173】

### 例3a

#### CSR::T1R3-aベクター構築物の調製

CSR::T1R3-aキメラcDNAベクター構築物は、PCRによって生成された2つのDNA断片を、両方のPCR産物にある共通の制限酵素部位を介して連結、すなわちhCaSRの細胞外アミノ末端ドメイン(ATD)(1~Phe<sup>539</sup>)を表すPCR産物およびシステインリッチドメイン(CRD)、膜貫通ドメイン(TMD)およびSer<sup>493</sup>から始まるC末端を含むT1R3の断片を連結することによって作出した。

CSR::T1R3-aキメラDNAの作製を容易にするために、SacII部位を、上述の2つの断片を形成するために利用したプライマーに導入した。

【0174】

形成されたPCR産物/断片中のこれらのSacII部位は、hCaSRのATD断片のC末端およびT1R3-a断片のN末端にそれぞれ位置し、2つの断片のライゲーションを可能にする。このSacII部位の組み込みは、前のhCaSRのPhe<sup>539</sup>をアルギニン残基に変換する配列を含むベクター構築物をもたらす。これらの導入ライゲーション部位および適した制限酵素を当該技術分野で周知のバッファーおよび条件下で利用し、断片を酵素ライゲーションによって連結した。

【0175】

CSR::T1R3-aキメラcDNA断片を含む断片を、以下に列挙した配列番号17および配列番号18の特異的プライマーを用いて、Platinum Taq High Fidelity Polymeraseを用いたPCRを利用して増幅した。その後、T1R3-aの増幅PCR産物およびhCaSRの増幅PCR産物(後者は上記例2に記載されているように形成)を、以下に列挙されているプライマー内に導入された制限酵素部位を介してライゲーションした。Fはフォワードプライマーを示し、Rはリバースプライマーを示す。下線文字は、後続するPCR産物のサブクローニングのための、プライマー内に存在する制限部位を示す。

【0176】

hCaSR-ATDプライマーFおよびhCaSR-ATDプライマーR  
上記例2aに示されている配列番号13および配列番号14

T1R3-断片プライマーF(配列番号17)  
A T A T C C G C G G T C C C G G T G C T C G C G G C A G

T1R3-断片プライマーR(配列番号18)  
A T A T G C G G C C G C A C T C A T G T T T C C C C T G A T T

【0177】

PCR増幅のための鋳型は、hCaSRをコードする全長cDNA(Origene Inc., USAから購入)、またはヒト茸状乳頭味覚組織から作出したcDNAライブラリーから単離したhT1R3をコードする全長cDNAであった。PCR反応パラメータは、94で5分の後、94で45秒、54で15秒および72で2分を35サイクル、その後最終伸張サイクルとして72で10分であった。

【0178】

得られた核酸断片(ライゲーションは断片が確認された後に行われる)はゲル電気泳動によって分離し、精製し、およびpCR-Topo-IIIベクター(Invitrogen, USA)にサブクローニングした。PCR増幅によって起こった変異が無いことを保証するために、得られたクローンをDNAシーケンシングによって確認した。

【0179】

10

20

30

40

50

シーケンシングの後、p c D N A 4 / T O (Invitrogen, USAから購入)に基づく発現カセットベクター構築物に3ピースライゲーションによりサブクローニングし、C S R : : T 1 R 3 - aベクター構築物を形成した。形成されたベクター構築物のC末端は単純ヘルペスウイルス(H S V)糖タンパク質Dエpiteープをコードしており、このエpiteープに結合する特異抗体を利用した免疫細胞化学研究に利用可能である。得られたベクター構築物は、(アミノ末端からC末端方向に)配列番号6(H S Vエpiteープ)が後続する配列番号4(C S R : : T 1 R 3 - a)の連結アミノ酸配列であるC S R : : T 1 R 3 - a : : H S Vタンパク質の発現を可能にする。

【0180】

### 例3b

#### C S R : : T 1 R 3 - bベクター構築物の調製

C S R : : T 1 R 3 - bキメラc D N Aベクター構築物は、P C Rによって生成された2つのD N A断片を、両方のP C R産物にある共通の制限酵素部位を介して連結、すなわちh C a S Rの細胞外アミノ末端ドメイン(A T D)およびシステインリッチドメイン(C R D)(1 ~ I l e<sup>603</sup>)を表すP C R産物ならびに膜貫通ドメイン(T M D)およびA r g<sup>560</sup>から始まるC末端を含むT 1 R 3の断片を表すP C R産物を連結することによって作出した。

C S R : : T 1 R 3 - bキメラD N Aの作製を容易にするために、B s i W I部位を、上述の2つの断片を形成するために利用したプライマーに導入した。

【0181】

形成されたP C R産物/断片中のこれらのB s i W I部位は、h C a S RのA T D断片のC末端およびT 1 R 3 - b断片のN末端にそれぞれ位置し、2つの断片のライゲーションを可能にする。このB s i W I部位の組み込みは、前のh C a S RのP h e<sup>539</sup>をアルギニン残基に変換する配列を含むベクター構築物をもたらす。これらの導入部位および適した制限酵素を当該技術分野で周知のバッファーおよび条件下で利用し、断片を酵素ライゲーションによって連結した。

【0182】

C S R : : T 1 R 3 - bキメラc D N A断片を含む断片を、以下に列挙した配列番号25および配列番号18の特異的プライマーを用いて、Platinum Taq High Fidelity Polymeraseを用いたP C Rを利用して増幅した。その後、T 1 R 3 - bの増幅P C R産物およびh C a S Rの増幅P C R産物(後者は上記例2bに記載されているように形成)を、以下に列挙されているプライマー内に導入された制限酵素部位を介してライゲーションした。Fはフォワードプライマーを示し、Rはリバースプライマーを示す。下線文字は、後続するP C R産物のサブクローニングのための、プライマー内に存在する制限部位を示す。

【0183】

h C a S R - A T DプライマーFおよびh C a S R - A T DプライマーR

上記例2bに示されている配列番号13および配列番号23

T 1 R 3 - 断片プライマーF(配列番号25)

A T A T C G T A C G C G G T T C C T G G C A T G G G G C

T 1 R 3 - 断片プライマーR(配列番号18)

A T A T G C G G C C G C A C T C A T G T T T C C C C T G A T T

【0184】

P C R増幅のための鋳型は、h C a S Rをコードする全長c D N A(Origene Inc., USAから購入)、またはヒト茸状乳頭味覚組織から作出したc D N Aライブラリーから単離したh T 1 R 3 - bをコードする全長c D N Aであった。P C R反応パラメータは、94で5分の後、94で45秒、54で15秒および72で2分を35サイクル、その後最終伸張サイクルとして72で10分であった。

【0185】

得られた核酸断片(ライゲーションは断片が確認された後に行われる)はゲル電気泳動によって分離し、精製し、およびp C R - T o p o - I Iベクター(Invitrogen, USA)に

10

20

30

40

50

サブクローニングした。PCR増幅によって起こった変異が無いことを保証するために、得られたクローンをDNAシーケンシングによって確認した。

【0186】

シーケンシングの後、挿入物をpcDNA4/TOベクター(Invitrogen, USAから購入)に基づく発現カセットベクター構築物に3ピースライゲーションによりサブクローニングし、CSR::T1R3-bベクター構築物を形成した。形成されたベクター構築物のC末端は単純ヘルペスウイルス(HSV)糖タンパク質Dエピトープをコードしており、このエピトープに結合する特異抗体を利用した免疫細胞化学研究に利用可能である。得られたベクター構築物は、(アミノ末端からC末端方向に)配列番号6(HSVエピトープ)が後続する配列番号22(CSR::T1R3-b)の連結アミノ酸配列であるCSR::T1R3-b::HSVタンパク質の発現を可能にする。

10

【0187】

例4

T1R2、T1R3ベクター構築物(比較のための野生型受容体)の調製

T1R2およびT1R3ベクター構築物の形成のため、ヒトT1R2およびT1R3の全タンパク質コード配列を含むcDNA断片をヒト茸状乳頭cDNAライブラリから単離し、完全にシーケンスし、そしてpcDNA3.1(Invitrogen)にサブクローニングした。

【0188】

例5

CSR::T1R2/CSR::T1R3のトランスフェクション、およびT1R2/T1R3の異種発現

トランスフェクトされたベクター構築物は、上記のとおり形成した例2aおよび3a、または2bおよび3b、ならびに4に記載されているものを利用した。hCaSRについては、全長cDNAに基づく、商業的に入手可能なpCMVベースのベクター構築物を利用した(TRUECLONE collection, Origene Inc., USA)。

20

【0189】

安定的にG16-ガストデューシン44を発現するHEK293T細胞(WO2004/055048に記載されているように形成した)に、CSR::T1R2およびCSR::T1R3ベクター構築物、またはT1R2およびT1R3、またはhCaSRを次のようにトランスフェクトした：

30

0日目に、HEK293T/G16-ガストデューシン44細胞を96ウェルの黒い、透明底のプレートに、ウェルあたり8500細胞の密度で播種し、選択的成長培地で一晚成長させた。1日目に、培地を抗生物質不含かつ血清不含の成長培地に変更し、細胞をそれぞれ75ngのCSR:T1R2(-aまたは-b)およびCSR:T1R3(合計150ng)(-aまたは-b)、T1R2およびT1R3(合計150ng)、または75ngのhCaSRベクター構築物DNAおよび0.3μlのリポフェクタミン2000(Invitrogen)を利用してトランスフェクトした。

【0190】

hCaSRベクターは、カルシウムに感受性であり、カルシウム結合部位が、キメラのVFTが由来するこの受容体のVFTに存在するため、カルシウムに感受性のGPCRのポジティブコントロールとして利用した。

40

CSR:T1R2/CSR:T1R3(CSR:T1R2-a/CSR:T1R3-aまたはCSR:T1R2-b/CSR:T1R3-b)またはT1R2/T1R3ヘテロダイマーのトランスフェクションのため、それぞれ75ngのベクター構築物を、ペア毎に合計150ngになるように組み合わせ、0.3μlのリポフェクタミン2000と一緒に利用した。75ngのhCaSRベクターDNAは、このカルシウム感知モノマーGPCRに利用した。

【0191】

上述のリポフェクタミン/DNA混合物を細胞上で3~4時間インキュベートし、その

50

後抗生物質不含の血清含有成長培地に交換した。細胞は一晩成長させ、Fluo-4カルシウムアッセイを例1に記載したように行った。

上記ベクター構築物のうちの1つを一過性にトランスフェクトした細胞を、例1に記載したように蛍光イメージングプレートリーダー (FLIPR-Tetra, Molecular Devices) を利用して同定した。

【0192】

例5.2

CSR::T1R2-a / CSR::T1R3-aヘテロダイマーを発現する安定細胞株の調製

CSR::T1R3-aが、テトラサイクリン調節CSR::T1R2-aの存在下において、両タンパク質の構成的過剰発現の細胞毒性効果の可能性を回避するために構成的に過剰発現するように、安定細胞系を作出した。ヘテロダイマー (CSR::T1R2-a) の1つのサブユニットをテトラサイクリン調節ベクター内に置くことにより、その発現レベルを調節し、その結果、安定クローン株の生存率および機能性を最適化することが可能となる。

10

【0193】

キメラヒトCSR::T1R2-a / CSR::T1R3-aヘテロダイマーを安定的に発現するヒト細胞系は、まずヒトCSR::T1R2-aを含む線状化pcDNA4-TOベクター (Invitrogen) を、WO2004/055048に記載されているように形成したG16gust44発現細胞系にトランスフェクトすることで作出する。G16gust44発現細胞系は、味覚受容体への増強された結合を示し、テトラサイクリンによって誘導され、非特異的Gタンパク質G16gust44を安定的に発現し、HEK-293-T-Rex細胞系 (Invitrogen, USAから商業的に入手可能) に基づいている。CSR::T1R2-aを発現するクローン細胞系を同定し、ヒトCSR::T1R3-a cDNAを含む線状化pcDNA3.1-Hygroベクター (Invitrogen) をトランスフェクトして、CSR::T1R2-aおよびCSR::T1R3-aを両方発現する二重安定クローン細胞系を得た。

20

【0194】

4マイクログラムの線状化CSR::T1R2-a / pcDNA4TO構築物および0.3μlのリポフェクタミン2000 (Invitrogen) のトランスフェクションの24時間後、細胞を、10% FBS、0.005mg/mlのブラスチジン、0.36mg/mlのG418、および0.2mg/mlのゼオシンを添加したDMEM (Invitrogen) を含有する選択培地に、1:150,000までの10x希釈で37にて再播種した。2~3週間後、ゼオシン耐性コロニーを、個々に拡大し、CSR::T1R2-a cDNAの発現を可能にする10μg/mlのテトラサイクリンによる4時間の誘導後に、50マイクロモラーのペリラルチンに対する機能的応答に基づいて安定クローンを選択した。我々はCSR::T1R2-a cDNAの最小の基底発現を呈する個別クローン (#17) を同定し、ヘテロダイマー受容体複合体の安定細胞系を作出するために、これをCSR::T1R3-a構築物のレシピエントとして利用した。

30

【0195】

誘導可能なCSR::T1R2-aを含むクローン17に、4μgの線状化CSR::T1R3-a / pcDNA3.1-Hygroベクター構築物DNAおよび0.3μlのリポフェクタミン2000 (Invitrogen) をトランスフェクトした。リポフェクタミン/DNA混合物を細胞上で3~4時間インキュベートし、その後抗生物質不含の血清含有成長培地に移した。24時間後、細胞を10% FBS、0.005mg/mlのブラスチジン、0.36mg/mlのG418、および0.2mg/mlのゼオシン (Invitrogen)、および0.2mg/mlのハイグロマイシンを添加したDMEMを含有する選択培地に37で再播種した。

40

【0196】

耐性コロニーを拡大し、例1に記載されている方法を利用してFLIPR-Tetra

50

装置 (Molecular Devices) 上での自動化蛍光イメージングにより決定される、ペリラルチン (CSR: T1R2 - a の結合 / 活性化が寄与する) およびサイクラミン酸ナトリウム (CSR: T1R3 - a の結合 / 活性化が寄与する) の両方に対する応答に基づいて、CSR: T1R2 - a / CSR: T1R3 - a ヘテロダイマーを含むものとして同定した。全ての潜在的なクローンを、10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  のテトラサイクリンによる誘導 (CSR: T1R2 - a の過剰発現を誘導するため) の後、甘味物質に対する機能応答について評価した。

## 【0197】

潜在的クローンはまた、T1R2 - a を低レベルで基底的に発現するが、CSR: T1R3 - a と合わせり機能的ヘテロダイマー複合体をもたらすことができる CSR: T1R2 - a 受容体の十分な発現を有しているあらゆるクローンを同定するために、テトラサイクリン誘導無しでも試験した (T-Rex HEK-293 (Invitrogen) などのテトラサイクリン調節システムは、システム固有の漏れやすさに起因して、導入遺伝子が基底的に低レベルで発現していることが知られている)。誘導性の機能的 CSR: T1R2 - a / CSR: T1R3 - a ヘテロダイマーを発現する安定クローンは、50 マイクロM のペリラルチンおよび 5 mM (ミリM) のサイクラミン酸ナトリウムの両方に対する応答に基づいて同定した。複数の甘味物質に対して最も大きなテトラサイクリン誘導性の応答を呈した 1 つのクローン細胞系を増殖させ、続く比較に利用した。様々なリガンド / 甘味物質による試験の結果を下表に示す。

## 【0198】

## 【表1】

		CSR:T1R2-a/CSR:T1R3-a		T1R2/T1R3		G16gust44 (ネガティブコントロール)	
		AVG (dF/F)	S.D. (dF/F)	AVG (dF/F)	S.D. (dF/F)	AVG (dF/F)	S.D. (dF/F)
p-ETBZ	100 マイクロM	1.11	0.05	1.029	0.1	0.16	0.01
NDHC	1 mM	1.64	0.23	1.71	0.05	0.23	0.01
NarDHC	1 mM	1.43	0.23	1.40	0.15	0.22	0.07
サイクラミン酸塩	5 mM	1.28	0.063	1.60	0.08	0.17	0.06

表1

## 【0199】

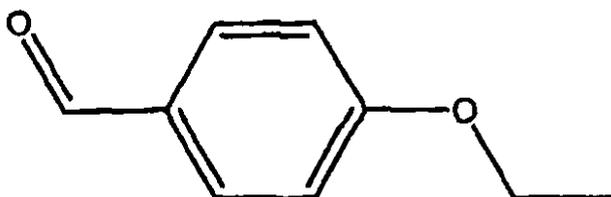
データは、次の方程式を利用した、刺激後における基準値以上の蛍光の標準化された増大 ( $F/F_0$ ) を示す:  $F/F_0 = (F - F_0) / F_0$ 、式中  $F$  はピーク蛍光シグナル、および  $F_0$  はリガンドの添加前に計測された蛍光シグナルの平均から決定した基準値蛍光シグナルである。得られた  $F/F_0$  値は、トランスフェクトされた受容体との直接的または間接的な相互作用に反応した細胞カルシウムの増加 (「シグナル」) に対応する (3 回の反復実験の平均値 (AVG) および標準偏差 (S.D.) が与えられている)。

## 【0200】

リガンドの化学構造を下記に示す。

p - E T B Z = p - エトキシベンズアルデヒド

## 【化1】



10

20

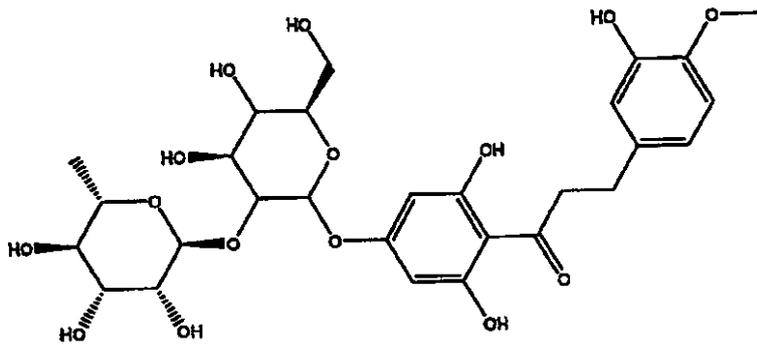
30

40

50

NDHC

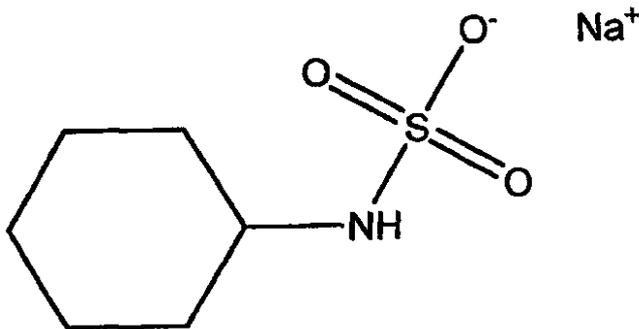
【化2】



10

【0201】

【化3】



20

サイクラミン酸ナトリウム（サイクラミン酸は甘味物質である。ナトリウムイオンの付加的な存在は、水への可溶性を上昇させるが、甘味にさらなる貢献はしない。）

【0202】

例6a

CSR::T1R2-a / CSR::T1R3-aの活性化

30

様々なリガンドによる刺激後の細胞内カルシウム応答は、G16-ガストデューシン44を安定して発現し、かつCSR::T1R2-a / CSR::T1R3-aキメラヘテロダイマーをトランスフェクトされたHEK293T細胞において決定した。結果は、(T1R2 / T1R3甘味ヘテロダイマーを形成するために)例4に記載のT1R2ベクター構築物およびT1R3ベクター構築物の両方、または(モノマーhCaSRを形成するために)例5に記載のhCaSRベクター構築物をトランスフェクトした細胞から得られた結果と比較した。

【0203】

トランスフェクトは例4に記載されているように実施した。結果は例1に記載されているように計算した(データは刺激後の蛍光の基準値以上の正味の増大(相対蛍光単位またはRFU)を示し、6回の反復実験の平均(AVG)および±標準偏差(S.D.)が与えられている)。次のリガンドを、括弧内に示されている濃度でトランスフェクト細胞を刺激するのに利用した:塩化カルシウム(2mM)、スクラロース(0.5mM)、アスパルテム(0.85mM)、ペリラルチン(50μM)、シンナモニトリル(100μM)、サイクラミン酸塩(1mM)、ネオヘスペリジンジヒドロカルコン(NDHC)(0.33mM)。

40

得られたシグナルは、トランスフェクトされた受容体との直接的または間接的な相互作用に应答した細胞のカルシウム増大(「シグナル」)に対応するRFU表示の蛍光である。

【0204】

50

甘味受容体を発現しない、構築物なしでトランスフェクトされた、モックトランスフェクションされたHEK293T/G16-ガストデューシン44細胞は、単にバックグラウンドに対応するシグナルを決定するためにネガティブコントロールとして利用した。

トランスフェクト細胞は、示された甘味料およびカルシウム感知ドメインを含むタンパク質のポジティブコントロール(カルシウム)、およびネガティブコントロール(C1緩衝液)に曝露した。

【0205】

結果は下表に示されている。

AVG欄は平均蛍光を与え、STD欄は標準偏差を与える。下表は、試験した様々なベクター構築物の各々における、6回の反復実験におけるRFU+/-STDの平均変化を示す。

【表2】

	CSR::T1R2-a/ CSR::T1R3-a		hCaSR		T1R2/T1R3		ネガティブコントロール (モックトランスフェクション)	
	平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差
ポジティブコントロール (カルシウム)	3912	295	7610	1776	1361	426	1570	509
アスパルテーム	72	78	41	97	531	154	-125	116
スクラロース	-75	130	22	92	601	173	-186	36
ベリラルチン	2400	466	73	354	1840	333	-379	327
シンナモニトリル	1501	194	197	33	632	484	-998	36
サイクラミン酸塩	370	213	196	79	341	132	-324	297
<b>NDHC</b>	<b>631</b>	<b>233</b>	<b>-257</b>	<b>53</b>	<b>331</b>	<b>129</b>	<b>-524</b>	<b>44</b>
ポジティブコントロール (C1緩衝液)	-115	70	57	101	-63	131	-217	204

表2a結果

【0206】

ネガティブコントロール/モックトランスフェクションはバックグラウンドシグナルに対応するシグナルレベルを示す。

ポジティブコントロール(カルシウム)が示すように、カルシウム感知ドメインを有する全てのトランスフェクト細胞はカルシウムに反応した(CSR::T1R2-a/CSR::T1R3-aヘテロダイマーおよびhCaSR)。

キメラヘテロダイマーのカルシウムに対する応答は、甘味ヘテロダイマーから得られたそれと比較できない。カルシウムはT1R2/T1R3甘味ヘテロダイマーのアゴニストではないので、G16ガストデューシン44gタンパク質のみを発現するモックトランスフェクションした細胞よりも大きなシグナルを与えない。

【0207】

アスパルテームおよびスクラロースについて、シグナルはT1R2/T1R3ヘテロダイマーをトランスフェクトした細胞でのみ検出された。スクラロースおよびアスパルテームはCSR:T1Rキメラには欠損しているT1R2のVFTに結合すると考えられており、そのことはCSR::T1R2-a/CSR::T1R3-aヘテロダイマーにおけるシグナルの欠如を説明する。

hCaSRは塩化カルシウムのみに応答し、試験したどの甘味物質によっても活性化されなかった。

【0208】

塩化カルシウム、ペリラルチン、シンナモニトリル、サイクラミン酸塩およびNDHCについては、シグナルの顕著な増大が、CSR::T1R2-a/CSR::T1R3-aキメラヘテロダイマーを発現する細胞で観察された。

ペリラルチン、シンナモニトリル、サイクラミン酸塩およびNDHCについて、これらのシグナルはT1R2/T1R3ヘテロダイマーで検出されたシグナルの強度に匹敵するものであった。

#### 【0209】

キメラCSR::T1R2-a/CSR::T1R3-aヘテロダイマーをトランスフェクトされた細胞で検出されたこれらのシグナルは、T1R2/T1R3ヘテロダイマーのシグナルおよびネガティブコントロール（モックトランスフェクションされたHEK293T/G16ガストデューシン44細胞）から得られたバックグラウンドの両方よりも顕著に高く、hCaSR受容体をトランスフェクトした細胞から得られたシグナルの約50%の規模であった。

結果は、CSR::T1R2-a/CSR::T1R3-aが、カルシウム、ペリラルチン、サイクラミン酸塩、シンナモニトリル、およびネオヘスペリジンジヒドロカルコン（NDHC）によって活性化されるが、スクラロースまたはアスパルテムでは活性化されないことを明示している。

#### 【0210】

##### 例6b

#### CSR::T1R2-b/CSR::T1R3-bの活性化

様々なリガンドによる刺激後の細胞内カルシウム応答は、G16-ガストデューシン44を安定して発現し、かつCSR::T1R2-b/CSR::T1R3-bキメラヘテロダイマーをトランスフェクトされたHEK293T細胞において決定した。結果は、(T1R2/T1R3甘味ヘテロダイマーを形成するために)例4に記載のT1R2ベクター構築物およびT1R3ベクター構築物の両方、または(モノマーhCaSRを形成するために)例5に記載のhCaSRベクター構築物をトランスフェクトした細胞から得られた結果と比較した。

#### 【0211】

トランスフェクトは例4に記載されているように実施した。結果は例1に記載されているように計算した(データは刺激後の蛍光における基準値以上の標準化された増大( $F/F_0$ ))を示し、6回の反復実験の平均(AVG)および±標準偏差(STD)が与えられている)。塩化カルシウム(2mM)、スクラロース(0.5mM)、ペリラルチン(50μM)を試験リガンドとして利用した。

得られたカルシウム可動化シグナルは、基準蛍光( $F_0$ )によって標準化されたピーク蛍光( $F$ )における増大である。データは次の方程式を用いて標準化される： $F/F_0 = (F - F_0)/F_0$ 、式中Fはピーク蛍光シグナルおよび $F_0$ はリガンド添加の前に計測される平均蛍光シグナルによって決定される基準蛍光シグナルである。得られた $F/F_0$ 値は、トランスフェクトされた受容体との直接的または間接的な相互作用に反応した細胞のカルシウム増大(「シグナル」)に対応する。

#### 【0212】

甘味受容体を発現しない、構築物なしでトランスフェクトされた、モックトランスフェクションされたHEK293T/G16-ガストデューシン44細胞は、単にバックグラウンドに対応するシグナルを決定するためにネガティブコントロールとして利用した。

トランスフェクト細胞は、示された甘味料およびカルシウム感知ドメインを含むタンパク質のポジティブコントロール(カルシウム)、およびネガティブコントロール(C1緩衝液)に曝露した。

#### 【0213】

結果は下表に示されている。

AVG欄は平均 $F/F_0$ を与え、STD欄は標準偏差を与える。下表は、試験した様々なベクター構築物の各々における、6回の反復実験における $F/F_0 \pm STD$ の平均

10

20

30

40

50

変化を示す。

【表 3】

	CSR::T1R2-b/ CSR::T1R3-b		CSR::R2-b 単独		T1R2/T1R3		ネガティブ コントロール ( モック トランスフェクション)	
	AVG	STD	AVG	STD	AVG	STD	AVG	STD
ポジティブコントロール (カルシウム)	0.46	0.11	0.424	0.02	0.19	0.001	0.20	0.01
スクラロース	0.017	0.006	0.016	0.001	0.12	0.006	0.03	0.00
ペリラルチン	0.169	0.04	0.11	0.02	0.5	0.02	0.06	0.02
ネガティブコントロール (C1 緩衝液)	0.017	0.001	0.036	0.008	0.03	0.01	0.03	0.002

表 2b 結果

【 0 2 1 4 】

ネガティブコントロール / モックトランスフェクションはバックグラウンドシグナルに対応するシグナルレベルを示す。

ポジティブコントロール (カルシウム) が示すように、カルシウム感知ドメインを有する全てのトランスフェクト細胞はカルシウムに反応した (CSR::T1R2-b / CSR::T1R3-b ヘテロダイマーおよび hCaSR)。

キメラヘテロダイマーのカルシウムに対する応答は、甘味ヘテロダイマーから得られたそれと比較することができない。カルシウムは T1R2 / T1R3 甘味ヘテロダイマーのアゴニストではないので、G16 ガストデューシン 44 g タンパク質のみを発現するモックトランスフェクションした細胞よりも大きなシグナルを与えなかった。

【 0 2 1 5 】

スクラロースについて、シグナルは T1R2 / T1R3 ヘテロダイマーをトランスフェクトした細胞 (野生型) でのみ検出された。スクラロースは CSR::T1R キメラには欠損している T1R2 の VFT に結合すると考えられており、そのことは CSR::T1R2-a / CSR::T1R3-a ヘテロダイマーにおけるシグナルの欠如を説明する。

hCaSR は塩化カルシウムのみに応答し、試験したどの甘味物質によっても活性化されなかった。

【 0 2 1 6 】

塩化カルシウム、ペリラルチンについては、シグナルの顕著な増大が、あらゆる T1R3 構築物またはその変異体の非存在下で CSR::T1R2-b ホモマーを発現する細胞と同様に CSR::T1R2-b / CSR::T1R3-b キメラヘテロダイマーを発現する細胞で観察された。

【 0 2 1 7 】

キメラ CSR::T1R2-b / CSR::T1R3-b ヘテロダイマーをトランスフェクトされた細胞で検出されたこれらのシグナルは、ネガティブコントロール (モックトランスフェクションされた HEK293T / G16 ガストデューシン 44 細胞) から得られたバックグラウンドよりも顕著に高かった。

結果は、CSR::T1R2-b / CSR::T1R3-b が、カルシウム、ペリラルチンによって活性化されるが、スクラロースでは活性化されないことを明示している。

【 0 2 1 8 】

受容体、核酸、ポリペプチド、方法およびキットは、上記においてある例示的な態様に関して記載されているが、同様の機能を実施するために、他の同様の態様が利用されてよく、または記載の態様に改変および付加が加えられてもよいと理解されるべきである。さらに、全ての開示された態様は必ずしも互いに排他的ではなく、様々な態様は必要な特性を提供するために組み合わせてもよい。当業者は、本開示の精神と範囲から離れることな

10

20

30

40

50

く変更を加えることができる。したがって、本方法およびキットはいかなる単一の態様に限定されるべきではなく、むしろ請求項の記載にしたがった幅および範囲をもって解釈されるべきである。

【配列表】

0005225986000001.xml

フロントページの続き

(51) Int.Cl.			F I		
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/00	1 0 1
C 1 2 P	21/02	(2006.01)	C 1 2 P	21/02	C
C 1 2 Q	1/02	(2006.01)	C 1 2 Q	1/02	

(56) 参考文献 国際公開第 2 0 0 3 / 0 0 4 9 9 2 ( W O , A 1 )  
国際公開第 2 0 0 5 / 0 1 5 1 5 8 ( W O , A 1 )

(58) 調査した分野 (Int.Cl. , DB名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0  
C 0 7 K 1 9 / 0 0  
GenBank / EMBL / DDBJ / GeneSeq  
UniProt / GeneSeq  
PubMed  
JSTPlus / JMEDPlus / JST7580 (JDreamII)  
CAplus / BIOSIS / WPIDS (STN)