# 明　細　書

## 発明の名称 ： フレッシュ感及び／又は嗜好性の評価方法

## 技術分野

[0001]　本発明は、フレッシュ感及び／又は嗜好性の評価方法等に関する。

## 背景技術

[0002]　近年、フレッシュな感覚への嗜好性が高まっており、「生」感覚を謳った商品が増加している。その訴求範囲は非常に幅広く、フルーツの生絞り感を謳ったジュースや酎ハイ類にとどまらず、フレッシュチーズやフレッシュバター等の乳製品、ひいては、焼き加工を含むパンや菓子類における「生」食パンや「生」クッキーに至るまで多岐にわたる。

[0003]　フレッシュ感は、広義には、作り立てや出来立てに伴う感覚とも考えることができ、例えば、パンの香ばしい焼き立て感や、炊飯米の甘い炊き立て感、コーヒーの芳醇な淹れたて感は一種のフレッシュ感と捉えることができる。即ち、食品におけるフレッシュ感は、非加熱は必ずしも重要ではなく、作り立てや出来立てによってもたらされる新鮮さを惹起する感覚と捉えることができ、食嗜好性に非常に重要な役割を担っている。

[0004]　フレッシュ感の付与又は増強に関連する物質として、アセトアルデヒド、ブチルアルデヒド、イソブチルアルデヒド等が挙げられる。食品安全委員会のウェブサイトによれば、これらアルデヒド類は、発酵や加熱によっても容易に生成され、果実、野菜、豆類、酒類、茶葉、パン類、焼き菓子、清涼飲料、食肉類、乳製品など、様々な食品に含まれている。特にアセトアルデヒドは、非常に揮発性の高い化合物であり、フルーツの他の香気成分と共に揮発することで、フルーツの新鮮な香りをより強く感じさせ（特許文献１）、パン、バター及びチーズ等の発酵食品においては、出来立て感やフレッシュな発酵感に寄与する成分とされる（非特許文献１、特許文献２）。また、アルデヒド類だけでなく、２，３－ペンタンジオンやジアセチルのようなケトン化合物、３，６－ノナジエノールのようなアルコール化合物、フェヌグリ

ークのような香辛料抽出物まで、多様な化合物がフレッシュ感や出来立て感の付与又は増強に関連するとされる（特許文献３、４）。

[0005] このように、フレッシュ感の付与又は増強関連素材は多数報告されてはいるが、特許文献４に記述されているようなフルーツのフレッシュ感の例では、「果実の香気自体を再現する素材は多数見出されてはいるものの、果実のフレッシュ感部分を明確に表現する素材が正確には見出されていない」のが現状である。これは、フレッシュ感を客観的に評価する生物学的な指標がなく、フレッシュ感評価が、曖昧さのある主観的な官能評価によってのみ評価されていることが主因と思われる。

[0006] 近年、ヒトの持つ全嗅覚受容体約４００種類に対し、あらゆる匂い物質の応答を網羅的にスクリーニングすることで、どのような香調がどのような嗅覚受容体に応答するのか大まかに分かってきた（非特許文献２、特許文献５）。特に、ムスク香を有する匂い物質では、嗅覚受容体ＯＲ５ＡＮ１に極めて特異的に応答する事が知られており、強いムスク香ほどＯＲ５ＡＮ１に強く応答することから、ＯＲ５ＡＮ１応答をムスク香の客観的な匂い強度の指標として利用できるようになっている（非特許文献３）。

[0007] また、一部の嗅覚受容体は、その応答が好きや嫌い、又は誘引や忌避といった情動や行動を引き起こすことが分かっている（非特許文献４）。数十万人規模のヒト集団を対象としたゲノムワイド関連解析（Ｇｅｎｏｍｅ－Ｗｉｄｅ　Ａｓｓｏｃｉａｔｉｏｎ　Ｓｔｕｄｙ；ＧＷＡＳ）では、特定の食習慣や食嗜好と嗅覚受容体遺伝子の関連が指摘されていることから（非特許文献５、６）、一部の嗅覚受容体は、特定の感情又は感覚を惹起することで食習慣や食嗜好の形成に関与していると思われる。

[0008] 現在までに、フレッシュ感の認識と明確な「因果関係」が示された嗅覚受容体は存在しない。特許文献５には、フレッシュ香気と関連付けられる嗅覚受容体として、ＯＲ１Ｄ２、ＯＲ１０Ａ２、ＯＲ９Ａ４が開示されているものの、該文献では「相関関係」による関連付けにとどまっており、疑似相関や交絡因子が排除されていない。例えば、特許文献５でフレッシュ香気と関

連付けられているＯＲ１Ｄ２は、フルーツに含まれるラクトン化合物やシトラス化合物のような広範な化合物に応答するため（非特許文献６）、結果、ｓｗｅｅｔ，ｆｒｅｓｈ，ｆｒｕｉｔｙ，ａｐｒｉｃｏｔ，ｐｉｎｅａｐｐｌｅ，ｐｅａｃｈ，ｏｒａｎｇｅｆｌｏｗｅｒ，ｓｕｌｆｕｒｏｕｓのようなフルーツと関係する様々な香気表現と交絡してしまい、真にフレッシュ香気と関係しているのか不明確になっている。この特許文献５では、Ｂｒｅａｄｙ香気がＯＲ６Ｂ１と関連していることも記載されている。

[0009] 特許文献６には、悪臭物質とされるアセトアルデヒド、プロパナール、ブタナール、ペンタナールがＯＲ６Ｂ１に応答する事が開示されているが、ＯＲ６Ｂ１の応答阻害剤（アンタゴニスト）によりアセトアルデヒド臭が抑制されないため、ＯＲ６Ｂ１が実際にはアルデヒド臭の認識に関わっていない可能性が指摘されており（非特許文献７）、ＯＲ６Ｂ１の機能は依然不明なままである。また、特許文献７にはイソブチルアルデヒド等のアルデヒド類がＯＲ６Ｂ２に応答する事が開示されている。非特許文献５には、ＯＲ６Ｂ１遺伝子を含むゲノム領域がフルーツの摂食量と強い相関があることが記載されているが、このゲノム領域がなぜフルーツの摂食と関連付けられるのか全く言及されておらず、因果関係は不明である。

## 先行技術文献

### 特許文献

[0010] 特許文献1：特開２０１５－２７３１１号公報

特許文献2：特開２０１４－８０４９号公報

特許文献3：特開２０１９－１０６５１８号公報

特許文献4：特開２０１６－１９８０２５号公報

特許文献5：ＷＯ２０２３／０１３７９２Ａ１

特許文献6：特開２０２３－１１７１３０号公報

特許文献7：特開２０２３－８４４７８号公報

### 非特許文献

[0011] 非特許文献1：東洋食品研究所　研究報告書,30,79-85,（2014）

非特許文献2：Flavor and Fragrance Journal, 2015, 30, 342-361

非特許文献3：The Journal of Neuroscience, April 20, 2016, 36(16):4482-44

非特許文献4：Nature Communications 10:209 (2019)

非特許文献5：Nature Communications 11:1467 (2020)

非特許文献6：Nature Communications 13:2743 (2022)

非特許文献7：ECRO XXIV DIJON: “OR1D2 IS A BROADLY TUNED HUMAN OLFACTORY RECEPTOR”. September 19, 2014, Posters

非特許文献8：第95回日本生化学会大会.[1P-370]アルデヒド応答嗅覚受容体間の機能発現性の違いを生む重要アミノ酸残基の同定

## 発明の概要

## 発明が解決しようとする課題

[0012] フレッシュ感は食嗜好性において非常に重要な感覚であるにも関わらず、主観的で曖昧な感覚であり、その生物学的な実体は不明瞭であった。また、フレッシュ感を付与する化合物は知られてはいるものの、フレッシュ感が生物学的にどのように認知されているのか、食習慣や食嗜好の形成とどのように関連があるのか、これまで全く解明されていなかった。

このような状況の下、フレッシュ感の生物学的な実体を明らかにし、フレッシュ感を定性的及び／又は定量的に評価することが望まれている。

## 課題を解決するための手段

[0013] 本発明は、上記状況を考慮してなされたもので、以下に示す、フレッシュ感及び／又は嗜好性の評価方法等を提供するものである。

[0014] ［１］フレッシュ感及び／又は嗜好性を評価する方法であって、嗅覚受容体ＯＲ６Ｂ１、及び前記ＯＲ６Ｂ１が有するアミノ酸配列と少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドのうちの少なくとも１種の嗅覚受容体ポリペプチドに、評価対象物質を添加又は暴露し、前記嗅覚受容体ポリペプチドの応答を測定すること、及び、測定された応答に基づいて前記評価対象物質のフレッシュ感及び／又は嗜好性を評価することを含む

、前記方法。

[0015] ［２］フレッシュ感及び／又は嗜好性を付与、増強、あるいは抑制する物質のスクリーニング方法であって、

前記付与する物質のスクリーニングにおいては、嗅覚受容体ＯＲ６Ｂ１、及び前記ＯＲ６Ｂ１が有するアミノ酸配列と少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドのうちの少なくとも１種の嗅覚受容体ポリペプチドに、試験物質を添加又は暴露し、前記嗅覚受容体ポリペプチドの応答を測定すること、及び、測定された応答に基づいて前記試験物質がフレッシュ感及び／又は嗜好性を付与する物質であると同定することを含み、

前記増強する物質のスクリーニングにおいては、嗅覚受容体ＯＲ６Ｂ１、及び前記ＯＲ６Ｂ１が有するアミノ酸配列と少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドのうちの少なくとも１種の嗅覚受容体ポリペプチドに、ＯＲ６Ｂ１応答性物質と共に試験物質を添加又は暴露し、前記嗅覚受容体ポリペプチドの応答を測定すること、及び、測定された応答に基づいて前記試験物質がフレッシュ感及び／又は嗜好性を増強する物質であると同定することを含み、

あるいは

前記抑制する物質のスクリーニングにおいては、嗅覚受容体ＯＲ６Ｂ１、及び前記ＯＲ６Ｂ１が有するアミノ酸配列と少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドのうちの少なくとも１種の嗅覚受容体ポリペプチドに、ＯＲ６Ｂ１応答性物質と共に試験物質を添加又は暴露し、前記嗅覚受容体ポリペプチドの応答を測定すること、及び、測定された応答に基づいて前記試験物質がフレッシュ感及び／又は嗜好性を抑制する物質であると同定することを含む、

前記方法。

[0016] ［３］前記フレッシュ感が、フルーツのフレッシュ感、又は加工食品の出来立て感である、前記［１］又は［２］に記載の方法。

［４］前記嗅覚受容体ポリペプチドの応答を、前記嗅覚受容体ポリペプチドを内因的に発現する細胞上、又は前記嗅覚受容体ポリペプチドを遺伝子操作により人為的に発現させた細胞上で測定する、前記［１］又は［２］に記載の方法。

［５］前記嗅覚受容体ポリペプチドの応答を、レポーターアッセイ又はカルシウムイメージングにより測定する、前記［１］又は［２］に記載の方法。

［６］前記［２］の方法により同定される、フレッシュ感及び／又は嗜好性を付与又は増強する物質を含む、フレッシュ感及び／又は嗜好性の付与又は増強剤。

［７］前記フレッシュ感及び／又は嗜好性を付与又は増強する物質が、メチルイソオイゲノールである、前記［６］に記載の付与又は増強剤。

## 発明の効果

[0017] 本発明によれば、主観的で曖昧な感覚であったフレッシュ感及び／又は嗜好性を、ＯＲ６Ｂ１応答を利用して定性的かつ定量的に評価する方法を提供することができる。また、フレッシュ感及び／又は嗜好性を付与、増強、又は抑制する物質のスクリーニング方法を提供することができ、当該方法により同定される物質により、例えば、フレッシュ感をコントロールし、食嗜好性を向上等させることができる。

## 図面の簡単な説明

[0018] [図1]ａ）各種フルーツに対する嗅覚受容体ＯＲ６Ｂ１の気相応答を示す図である。ｂ）ピンクグレープフルーツに対する全ヒト嗅覚受容体４５４種類の気相スクリーニング結果を示す図である。

[図2]嗅覚受容体ＯＲ６Ｂ１に応答するフレーバー原料のスクリーニング結果を示す図である。

[図3]焼き立てパン、バター及びクリームチーズに対する嗅覚受容体ＯＲ６Ｂ１の気相応答を示す図である。

[図4]各種フレッシュ感供与素材の全ヒト嗅覚受容体４５４種類の液相スクリーニング結果を示す図である。

[図5]各種フレッシュ感供与素材の濃度依存的な嗅覚受容体ＯＲ６Ｂ１応答抑制の測定結果を示す図である。

[図6]嗅覚受容体ＯＲ６Ｂ１の応答増強剤による、経時的な嗅覚受容体ＯＲ６Ｂ１応答増強の測定結果を示す図である。

[図7]嗅覚受容体ＯＲ６Ｂ１の応答抑制剤による、経時的な嗅覚受容体ＯＲ６Ｂ１応答抑制の測定結果を示す図である。

[図8]各種オレンジフレーバーに対する嗅覚受容体ＯＲ６Ｂ１応答強度の違いを示す図である。

[図9]各種オレンジフレーバーに対するフレッシュ感の官能評価試験結果を示す図である。

## 発明を実施するための形態

[0019] 本発明の概要

以下、本発明を詳細に説明する。本発明の範囲はこれらの説明に拘束されることはなく、以下の例示以外についても、本発明の趣旨を損なわない範囲で適宜変更し実施することができる。

なお、本明細書は、本願優先権主張の基礎となる、特願２０２４－０２９８２４号明細書（令和６年（２０２４年）２月２９日出願）の全体を包含する。また、本明細書において引用される全ての刊行物、例えば先行技術文献、及び公開公報、特許公報その他の特許文献は、参照として本明細書に組み込まれる。

[0020] 本発明においては、嗅覚受容体ＯＲ６Ｂ１の応答を指標とすることで定性的かつ定量的にフレッシュ感及び／又は嗜好性を評価する方法を提供することができる。また、嗅覚受容体ＯＲ６Ｂ１の応答を指標とすることでフレッシュ感及び／又は嗜好性を付与、増強、又は抑制する物質をスクリーニングする方法を提供することができ、当該方法により同定される物質により、例えば、フレッシュ感をコントロールし、食嗜好性を向上等させる（すなわちフレッシュ感及び／又は嗜好性を調節する）ことができる。

[0021] 本発明者は、数十万人規模のヒト集団を対象としたゲノムワイド関連解析

（ＧＷＡＳ）のデータを精査する中で、フレッシュフルーツの摂食にはＯＲ６Ｂ１を含むゲノム領域（ＱＴＬ：Ｑｕａｎｔｉｔａｔｉｖｅ　Ｔｒａｉｔ　Ｌｏｃｕｓ）が強く関連しているがドライフルーツの摂食には該領域の関連が見られないことに気付き、ＯＲ６Ｂ１がフレッシュ要素の認識に関連していると推測した（表１）。各種フルーツ香気はＯＲ６Ｂ１に応答することから（図１a）、実際のフレッシュフルーツにはＯＲ６Ｂ１の応答成分が含まれることが分かり、さらにＯＲ６Ｂ１はヒトの全嗅覚受容体の中で最も強くフルーツ香気に応答したことから（図１ｂ）、ＯＲ６Ｂ１がヒト嗅覚において強い影響力のある受容体であることを示した。

[0022] ＯＲ６Ｂ１に応答する物質スクリーニングしたところ、ＯＲ６Ｂ１は、フルーツに共通して存在するアルデヒド等のフレッシュ感付与物質群だけでなく、パンの焼き立て感やバターのフレッシュ感付与物質群にも応答した（図２・表２）。ゲノムワイド関連解析を再度精査してみると、ＯＲ６Ｂ１と優位に関連性の高い食習慣上位３つには、フルーツ、パン及びバターの摂食が挙がっており（表３）、ＯＲ６Ｂ１応答スクリーニングと完全に一致していた。このことから、ＯＲ６Ｂ１に「応答」することで、フレッシュ感が「付与」され、フルーツ、パン及びバターの嗜好性が形成されるという因果関係が示された。

[0023] さらに、フレッシュ感付与物質群はＯＲ６Ｂ１にのみ共通して応答していることから、ＯＲ６Ｂ１以外に共通応答する嗅覚受容体を介してフレッシュ感を付与している可能性は排除できた（図４）。また、フレッシュ感付与物質群のＯＲ６Ｂ１応答は濃度依存的であり（図５）、これは、アセトアルデヒド等のフレッシュ感供与素材の含有量が多いほど喫飲者が感じる「果物の新鮮な香り」が強くなる（特許文献１）ことの裏付けにもなっていると思われた。

[0024] また、本発明者は、ＯＲ６Ｂ１応答増強剤およびＯＲ６Ｂ１応答抑制剤のスクリーニングを実施することで、メチルイソオイゲノールやシンナミックアルデヒドに代表されるＯＲ６Ｂ１応答調節物質を特定した（図６・図７）

。

[0025] 本発明者は、ＯＲ６Ｂ１応答強度とフレッシュ感の感じ方の関係を明確にするべくさらに検討を進め、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ試験と官能評価試験により、ＯＲ６Ｂ１応答が強いほどフレッシュ感を強く感じることを示した（図８・図９：フレーバー１～３の比較）。また、ＯＲ６Ｂ１応答抑制剤であるシンナミックアルデヒドを添加または暴露させたフレーバーではフレッシュ感が明確に損なわれた（図８・図９：フレーバー２と４の比較）。このように、ＯＲ６Ｂ１応答抑制剤によりフレッシュ感の抑制効果を示せたことで初めて、フレッシュ感がＯＲ６Ｂ１応答を介して認識及び／又は調節されていることが示された。これらにより、フレッシュ感とはＯＲ６Ｂ１応答を介して惹起される感覚であり、パンやバターのような加熱を伴う加工食品における作り立て感や出来立て感は、フルーツのフレッシュ感と生物学的に等価な広義のフレッシュ感であることが明らかとなった。

本発明はこれらの新規知見に基づいて見出されたものである。

[0026] 以下、本発明に係るフレッシュ感及び／又は嗜好性の評価方法（以下、「本発明の評価方法」という）について具体的に説明する。

本発明の評価方法は、評価対象物質（特に限定はされないが、例えば、食品自体及び香料組成物等の各種化合物、組成物、混合物等）に対する、嗅覚受容体ＯＲ６Ｂ１、又は前記ＯＲ６Ｂ１が有するアミノ酸配列と少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドのうちの少なくとも１種の嗅覚受容体ポリペプチド（以下、本明細書において「嗅覚受容体ＯＲ６Ｂ１等」ともいう）の応答を指標として、フレッシュ感及び／又は嗜好性を評価する方法である。

[0027] 詳しくは、本発明の評価方法は、前述したとおり、フレッシュ感及び／又は嗜好性を評価する方法であって、嗅覚受容体ＯＲ６Ｂ１等に、評価対象物質を添加又は暴露し、前記嗅覚受容体ポリペプチドの応答を測定すること、及び、測定された応答に基づいて前記評価対象物質のフレッシュ感及び／又は嗜好性を評価することを含む方法である。

[0028] 本発明においてフレッシュ感は、上記方法によって評価しうる感覚であって、より好ましくはフルーツのフレッシュ感及び加工食品における出来立て感を意味する。また、本発明において加工食品における出来立て感は、発酵や加熱処理を伴う調理完了後数分以内の食品より揮発する成分により惹起される感覚を意味し、例えば、焼き立てのパンの香り、みずみずしい作り立てのクリームチーズの香り、又は淹れたてのコーヒーの香りなどにより惹起される、フレッシュで新鮮な感覚を意味する。本発明の評価方法は、例えば、以下の実施形態にしたがって実施することができる。

[0029] すなわち、本発明の一実施形態として、評価対象物質としての試験検体（食品又は香料組成物等）に対する、嗅覚受容体ＯＲ６Ｂ１等の応答を測定することでフレッシュ感及び／又は嗜好性を評価する方法であって、

（ｉ） 嗅覚受容体ＯＲ６Ｂ１等に、評価対象物質となる試験検体の香気を接触させ、試験検体の香気を接触させる前の嗅覚受容体の基礎活性応答（T0）及び試験検体の香気接触以後の任意の時間での試験検体の香気に対する嗅覚受容体の応答（Ｔｘ）を測定する工程と、

（ｉｉ） 工程（ｉ）における測定結果の試験検体の香気を接触させる前の嗅覚受容体の基礎活性応答（T0）と試験検体の香気接触以後の任意の時間での試験検体の香気に対する嗅覚受容体の応答（Ｔｘ）とを比較して、応答性の変化値を計算して求める工程

を含む方法が挙げられる。

[0030] ここで、応答性の変化値は、一実施形態として、工程（ｉ）における試験検体の香気接触以後の任意の時間での試験検体の香気に対する嗅覚受容体の応答（Ｔｘ）を、試験検体の香気を接触させる前の嗅覚受容体の基礎活性応答（T0）における測定結果で除すことで求められるＦｏｌｄ Ｉｎｃｒｅａｓｅ値を指標として評価してもよい。例えば、ルシフェラーゼなどの発光物質を用いたレポーターアッセイ法により嗅覚受容体の応答を測定する場合、Ｆｏｌｄ Ｉｎｃｒｅａｓｅ値が好ましくは１以上、より好ましくは1.2以上、さらに好ましくは2以上となる場合応答があると判断することができ、Ｆｏｌ

ｄ　Ｉｎｃｒｅａｓｅ値の値が大きいほど強い応答としてフレッシュ感が強く嗜好性の高い試験検体として評価することができる。

[0031] 以下、本発明に係るフレッシュ感及び／又は嗜好性を付与する物質のスクリーニング方法について具体的に説明する。

当該スクリーニング方法は、詳しくは、前述したとおり、嗅覚受容体ＯＲ６Ｂ１等に、試験物質を添加又は暴露し、前記嗅覚受容体ポリペプチドの応答を測定すること、及び、測定された応答に基づいて前記試験物質がフレッシュ感及び／又は嗜好性を付与する物質であると同定することを含む方法である。

[0032] なお、当該スクリーニング方法において、「試験物質」とは、特に限定するものではないが、嗅覚受容体ＯＲ６Ｂ１等の応答を惹起する効果を有する物質としての、化合物、組成物、混合物又は試験検体（食品自体又は香料組成物等）をいうものとする。

[0033] また、当該スクリーニング方法の一実施形態として、

（ｉ）　嗅覚受容体ＯＲ６Ｂ１等に試験物質を接触させ、試験物質を接触させる前の嗅覚受容体の基礎活性応答（T0）及び試験物質接触以後の任意の時間での試験物質に対する嗅覚受容体の応答（Ｔｘ）を測定する工程と、

（ｉｉ）　工程（ｉ）における測定結果の試験物質を接触させる前の嗅覚受容体の基礎活性応答（T0）と試験物質接触以後の任意の時間での試験検体の香気に対する嗅覚受容体の応答（Ｔｘ）とを比較して、応答性の変化値を計算して求める工程

を含む方法が挙げられる。

[0034] ここで、応答性の変化値は、一実施形態として、工程（ｉ）における試験検体の香気接触以後の任意の時間での試験検体の香気に対する嗅覚受容体の応答（Ｔｘ）を、試験検体の香気を接触させる前の嗅覚受容体の基礎活性応答（T0）における測定結果で除すことで求められるＦｏｌｄ　Ｉｎｃｒｅａｓｅ値を指標として評価してもよい。例えば、ルシフェラーゼなどの発光物質を用いたレポーターアッセイ法により嗅覚受容体の応答を測定する場合、Ｆ

ｏｌｄ　Ｉｎｃｒｅａｓｅ値が好ましくは１以上、より好ましくは1.2以上、さらに好ましくは2以上となる場合、応答のあるＯＲ６Ｂ１応答性物質であると判断することができ、Ｆｏｌｄ　Ｉｎｃｒｅａｓｅ値がＯＲ６Ｂ１応答性物質ほど優れたフレッシュ感付与物質及び／又は嗜好性付与物質として選択することができる。

[0035] 以下、本発明に係るフレッシュ感及び／又は嗜好性を増強又は抑制する物質のスクリーニング方法について具体的に説明する。

当該スクリーニング方法は、詳しくは、前述したとおり、嗅覚受容体ＯＲ６Ｂ１等に、に、ＯＲ６Ｂ１応答性物質と共に試験物質を添加又は暴露し、前記嗅覚受容体ポリペプチドの応答を測定すること、及び、測定された応答に基づいて前記試験物質がフレッシュ感及び／又は嗜好性を増強又は抑制する物質であると同定することを含む方法である。

[0036] なお、当該スクリーニング方法において、「試験物質」とは、特に限定するものではないが、嗅覚受容体ＯＲ６Ｂ１等の応答を増強又は抑制する効果を有する物質としての、化合物、組成物、混合物又は試験検体（食品自体又は香料組成物等）をいうものとする。

[0037] さらに、当該スクリーニング方法の一実施形態として、

（ｉ） 嗅覚受容体ＯＲ６Ｂ１等にＯＲ６Ｂ１応答性物質を接触させる前の嗅覚受容体の基礎活性応答（T0）及びＯＲ６Ｂ１応答性物質接触以後の任意の時間での試験物質に対する嗅覚受容体の応答（Ｔｘ）を測定する工程と、

（ｉｉ） 工程（ｉ）における測定結果のＯＲ６Ｂ１応答性物質を接触させる前の嗅覚受容体の基礎活性応答（T0）とＯＲ６Ｂ１応答性物質接触以後の任意の時間でのＯＲ６Ｂ１応答性物質に対する嗅覚受容体の応答（Ｔｘ）とを比較して、応答性の変化値を計算して求める工程と、

（ｉｉｉ） 工程（ｉ）においてＯＲ６Ｂ１応答性物質に試験物質を混合して、工程（ｉｉ）と同様に応答性の変化値を計算して求める工程と、

（ｉｖ） 工程（ｉｉ）と比較して工程（ｉｉｉ）の値が増加もしくは低減した試験物質を、フレッシュ感及び嗜好性を増強又は抑制する物質として選

択する工程と

を含む方法が挙げられる。

[0038] ここで、応答性の変化値は、一実施形態として、工程（ｉ）及び工程（ｉｉｉ）において、Ｔｘでの測定結果をＴ０における測定結果で除すことで求められるＦｏｌｄ　Ｉｎｃｒｅａｓｅ値を指標として評価してもよい。例えば、ルシフェラーゼなどの発光物質を用いたレポーターアッセイ法により嗅覚受容体の応答を測定する場合、工程（ｉ）におけるＦｏｌｄ　Ｉｎｃｒｅａｓｅ値の最大値を１に標準化した際の、工程（ｉｉｉ）におけるＦｏｌｄ　Ｉｎｃｒｅａｓｅ値の最大値の相対値が、１以上、より好ましくは1.2以上、さらに好ましくは2以上となる場合、ＯＲ６Ｂ１応答増強物質と判断することができ、相対値が１以下、より好ましくは０．８以下、さらに好ましくは０．５以下となる場合、ＯＲ６Ｂ１応答抑制物質と判断することができ、各々、フレッシュ感及び／又は嗜好性を増強又は抑制する物質として選択することができる。

[0039] 以下、上述した各スクリーニング方法における各工程（工程（ｉ）～（ｉｖ））についてさらに具体的に説明する。

[0040] ＜工程（ｉ）＞

工程（ｉ）では、嗅覚受容体ＯＲ６Ｂ１等と試験物質を接触させ、試験物質を接触させる前の嗅覚受容体の基礎活性応答（T0）及び試験検体の香気接触以後の任意の時間での試験検体の香気に対する嗅覚受容体の応答（Ｔｘ）を測定する。

[0041] 嗅覚受容体ＯＲ６Ｂ１の塩基配列及びアミノ酸配列は、NCBI（GenBank）のウェブサイト（http://www.ncbi.nlm.nih.gov/）に「Accession number：NM_001005281.1」及び「Accession number：NP_001005281.1」として登録されており、配列番号１で示される塩基配列の第１番目から第９３６番目のＤＮＡによってコードされるアミノ酸配列（配列番号２）からなるタンパク質（ポリペプチド）が嗅覚受容体ＯＲ６Ｂ１である。

[0042] 嗅覚受容体ＯＲ６Ｂ１は、フレッシュ感の認識を介してフレッシュ感を含

む食品の摂取量を増加させることから、ＯＲ６Ｂ１の応答を指標として測定したり、ＯＲ６Ｂ１応答を惹起、増強又は抑制する物質のスクリーニングをすることは、フレッシュ感及び嗜好性の評価や調節に貢献できるものである。

[0043] 嗅覚受容体ポリペプチドとしては、嗅覚受容体ＯＲ６Ｂ１のみならず、嗅覚受容体ＯＲ６Ｂ１とは別に、又は嗅覚受容体ＯＲ６Ｂ１と共に、嗅覚受容体ＯＲ６Ｂ１が有するアミノ酸配列と９０％以上、好ましくは９５％以上、より好ましくは９８％以上、さらに好ましくは９９％以上の同一性を有するアミノ酸配列を含むタンパク質（ポリペプチド）を用いることができるが、当該同一性が８０％以上、好ましくは８５％以上のアミノ酸配列を含むタンパク質（ポリペプチド）を用いてもよい。なお、本明細書においてアミノ酸配列の配列同一性は、ＢＬＡＳＴ検索アルゴリズム（ＮＣＢＩより公に入手できる）によって算出される。

[0044] 本発明において嗅覚受容体ＯＲ６Ｂ１等と試験物質とを接触させ、嗅覚受容体の応答を測定する方法は特に制限されない。例えば、嗅覚受容体を発現している生体から単離された細胞上で試験物質と接触させ、嗅覚受容体の応答を測定してもよいし、嗅覚受容体を遺伝子操作により人為的に発現させた細胞上で試験物質と接触させ、嗅覚受容体の応答を測定してもよい。嗅覚受容体と試験物質を接触させる時間は、試験物質の濃度や測定方法にも依存するため一概には言えないが、本発明におけるルシフェラーゼアッセイ法においては０～６０分、好ましくは０～３０分、カルシウムイメージング法では数秒から数分程度である。

[0045] 嗅覚受容体ＯＲ６Ｂ１等を遺伝子操作により人為的に発現させた細胞は、嗅覚受容体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。

[0046] 本発明の好ましい態様では、嗅覚受容体ＯＲ６Ｂ１等と共に、ウシロドプシンのＮ末端２０アミノ酸残基を組み込んでもよい。ウシロドプシンのＮ末端２０アミノ酸残基を組み込むことにより、嗅覚受容体の細胞膜発現を促進

することができる。

[0047] ウシロドプシンの塩基配列及びアミノ酸配列は、NCBI（GenBank）のウェブサイトに「Accession number：NM_001014890.2」及び「Accession number：NP_001014890.1」として登録されている。ウシロドプシンは、配列番号３で示される塩基配列の第１番目から第１０４７番目のＤＮＡによってコードされるアミノ酸配列（配列番号４）からなるタンパク質（ポリペプチド）である。

[0048] また、ウシロドプシンに代えて、又はウシロドプシンと共に、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、特に好ましくは９８％以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ嗅覚受容体の細胞膜発現を促進することができるタンパク質（ポリペプチド）を用いてもよい。

[0049] なお、嗅覚受容体ＯＲ６Ｂ１等の細胞膜発現を促進できるものであれば、ウシロドプシンに限らず、他のタンパク質（ポリペプチド）のアミノ酸残基を用いてもよい。

[0050] 嗅覚受容体ＯＲ６Ｂ１等の応答を測定する方法は特に制限されず、当分野で用いられている任意の方法を用いることができる。例えば、香気化合物が嗅覚受容体へ結合すると、細胞内のＧタンパク質を活性化し、Ｇタンパク質がアデニル酸シクラーゼを活性化して、ＡＴＰを環状ＡＭＰ（ｃＡＭＰ）へと変換し、細胞内のｃＡＭＰ量を増加させることが知られている。したがって、ｃＡＭＰ量を測定することで嗅覚受容体の応答を測定することができる。ｃＡＭＰ量を測定する方法としては、ＥＬＩＳＡ法やレポーターアッセイ法等が用いられる。中でも、ルシフェラーゼなどの発光物質を用いたレポーターアッセイ法により嗅覚受容体の応答を測定することが好ましい。その他、嗅覚受容体のシグナル伝達に関わる物質であれば、その量が応答により増減するために測定の対象となり得る。

[0051] ＜工程（ｉｉ）＞

工程（ｉｉ）では、工程（ｉ）における測定結果の試験物質を接触させる前

の嗅覚受容体ＯＲ６Ｂ１等の基礎活性応答（T0）と試験物質接触以後の任意の時間での試験物質に対する嗅覚受容体の応答（Ｔｘ）とを比較して、応答性の変化値を計算して求める。

[0052] 本発明の一実施態様によれば、応答性の変化は、工程（ｉ）における試験物質接触以後の任意の時間での試験物質に対する嗅覚受容体の応答（Ｔｘ）を、試験物質を接触させる前の嗅覚受容体の基礎活性応答（T0）における測定結果で除すことで求められるＦｏｌｄ　Ｉｎｃｒｅａｓｅ値を指標として評価してもよい。例えば、ルシフェラーゼなどの発光物質を用いたレポーターアッセイ法により嗅覚受容体の応答を測定する場合、Ｆｏｌｄ　Ｉｎｃｒｅａｓｅ値が好ましくは１以上、より好ましくは1.2以上、さらに好ましくは2以上となる場合、ＯＲ６Ｂ１に対する応答があると判断でき、ＯＲ６Ｂ１応答性物質、ひいては、フレッシュ感付与物質もしくは嗜好性付与物質と評価することができる。

[0053] ＜工程（ｉｉｉ）＞

工程（ｉｉｉ）では、工程（ｉ）及び（ｉｉ）における試験物質が特定のＯＲ６Ｂ１応答性物質である場合に、特定のＯＲ６Ｂ１応答性物質と試験物質を混合して、工程（ｉｉ）と同様に応答性の変化値を計算して求める。

[0054] ＜工程（ｉｖ）＞

工程（ｉｖ）では、工程（ｉ）及び（ｉｉ）における試験物質が特定のＯＲ６Ｂ１応答性物質である場合に、工程（ｉｉ）で求めた特定のＯＲ６Ｂ１応答性物質単独での変化値と比較して、工程（ｉｉｉ）で求めた特定のＯＲ６Ｂ１応答性物質に試験物質を混合した際の変化値が増加もしくは低減した試験物質を、フレッシュ感及び／又は嗜好性を増強又は抑制する物質として選択する。

[0055] 本発明の一実施態様によれば、応答性の変化は、工程（ｉ）及び（ｉｉｉ）における、試験物質接触以後の任意の時間での試験物質に対する嗅覚受容体の応答（Ｔｘ）を、試験物質を接触させる前の嗅覚受容体の基礎活性応答（T0）における測定結果で除すことで求められるＦｏｌｄ　Ｉｎｃｒｅａｓｅ

値を指標として評価してもよい。例えば、ルシフェラーゼなどの発光物質を用いたレポーターアッセイ法により嗅覚受容体の応答を測定する場合、工程（ｉ）におけるＦｏｌｄ　Ｉｎｃｒｅａｓｅ値の最大値を１に標準化した際の、工程（ｉｉｉ）におけるＦｏｌｄ　Ｉｎｃｒｅａｓｅ値の最大値の相対値が、１以上、より好ましくは1.2以上、さらに好ましくは2以上となる場合、ＯＲ６Ｂ１応答増強物質と判断することができ、相対値が１以下、より好ましくは０．８以下、さらに好ましくは０．５以下となる場合、ＯＲ６Ｂ１応答抑制物質と判断することができ、おのおの、フレッシュ感および嗜好性を増強又は抑制する物質として選択する。

[0056] なお、前述した工程（ｉ）及び（ｉｉ）に関する具体的説明は、本発明の評価方法においても適宜採用し得る。

[0057] 本発明では、様々な試験物質を工程（ｉｉ）の測定結果として応答性の変化値を算出することで、ＯＲ６Ｂ１応答の強さをフレッシュ感の強さ、もしくは嗜好性の高さの指標として評価することができ、応答性の変化値の増加が見られた場合、該試験物質をＯＲ６Ｂ１応答性物質、ひいては、フレッシュ感付与物質もしくは嗜好性付与物質と評価することもできる。また、本発明では、工程（ｉ）及び（ｉｉ）における試験物質が特定のＯＲ６Ｂ１応答性物質である場合に、工程（ｉｉ）及び（ｉｉｉ）における測定結果を比較して応答性の変化値の増加又は減少が見られた場合、工程（ｉｉｉ）で用いた試験物質を、フレッシュ感および嗜好性を増強又は抑制する物質として評価することができる。

[0058] 上記のようにして、試験物質のフレッシュ感及び嗜好性をＯＲ６Ｂ１応答として定性的かつ定量的に評価することができる。また、試験物質の中から、ＯＲ６Ｂ１応答を付与、増強又は抑制する物質を選択することができ、選択された物質は、フレッシュ感及び／又は嗜好性を付与、増強又は抑制する物質として、食品に添加することでフレッシュ感及び／又は嗜好性の調節に利用することができる。選択された物質を基に必要に応じてＯＲ６Ｂ１に対する応答性の改変等を行い、最適な匂いのする新規な化合物を開発すること

もできる。さらには、選択された物質を他の香料素材とブレンドすることができ、最適な匂いのするフレッシュ感及び／又は嗜好性向上機能を謳った香料素材を開発することも可能である。本発明の評価方法や各スクリーニング方法を用いることにより、フレッシュ感及び／又は嗜好性を向上させた新しい香料素材の開発や評価を行うことができる。

[0059] また、本発明においては、本発明の各スクリーニング方法により得られる、上述したフレッシュ感及び／又は嗜好性を付与、増強又は抑制する物質を含む、フレッシュ感及び／又は嗜好性の付与剤、増強剤又は抑制剤も提供され得る。ここで、当該付与剤又は増強剤としては、限定はされないが、例えば、メチルイソオイゲノール等が挙げられ、当該抑制剤としては、限定はされないが、例えば、シンナミックアルデヒド等が挙げられる。

当該付与剤、増強剤又は抑制剤を利用することにより、例えば、所望の食品及び香料組成物等に対して、フレッシュ感及び／又は嗜好性の調節（フレッシュ感及び／又は嗜好性の付与、増強又は抑制）を行うことができる。

## 実施例

[0060] 以下、実施例を挙げて本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に何ら制限されるものではない。

[0061] ［実施例１］フレッシュ感に関わる遺伝子の抽出・推定

（１－１）表１には、前掲の非特許文献５により解析されたバックデータより抽出して得られた、「毎日フレッシュフルーツを摂食する集団」と最も優位に関連付けられたゲノム領域（ＱＴＬ）のリードＳＮＰ、そのp-value、最近接する嗅覚受容体遺伝子名を示す。また、対比のため、同リードＳＮＰにおける「毎日ドライフルーツを摂食する集団」の情報も付した。加えて、前掲の非特許文献６により解析されたバックデータより抽出して得られた、フルーツ各種の摂食と関連付けられたゲノム領域のリードＳＮＰ、そのp-value、及び最近接する嗅覚受容体遺伝子名を示す。

[0062]

[表1]

| Trait | Lead SNP | P-value | Nearest Gene | Reference |
|---|---|---|---|---|
| pieces of fresh fruit per day | rs10249294 | 5.70E-65 | OR6B1 | 非特許文献５ |
| pieces of dried fruit per day | rs10249294 | no significance (<E-5) | OR6B1 | |
| Cherries | rs7789218 | 1.67E-31 | OR6B1 | 非特許文献６ |
| Plums | rs10249294 | 2.37E-29 | OR6B1 | |
| Fruit | rs7787699 | 3.85E-24 | OR6B1 | |
| Banana | rs7787699 | 4.78E-18 | OR6B1 | |
| Kiwi | rs6965087 | 1.32E-15 | OR6B1 | |
| Strawberries | rs768798559 | 2.06E-11 | OR6B1 | |

[0063] ［実施例２］ＯＲ６Ｂ１への「応答」がフレッシュ感を「付与」することの証明

（２－１）嗅覚受容遺伝子クローニング

各ヒト嗅覚受容体遺伝子は前述したNCBI(GenBank)のウェブサイトに登録されている塩基配列情報を基に、Ｈｕｍａｎ Ｇｅｎｏｍｉｃ ＤＮＡ： Ｆｅｍａｌｅ（Ｐｒｏｍｅｇａ社）よりＰＣＲ法にてクローニングすることで得た。ＯＲ６Ｂ１遺伝子は配列番号１（NM_001005281.1）の配列を用いた。ｐＭＥ１８Ｓベクターにウシロドプシンのｎ末端２０アミノ酸残基をコードするＤＮＡ（配列番号３の塩基配列の第１番目～第６０番目の塩基からなるＤＮＡ）を組み込み、さらにその下流に、得られたヒト嗅覚受容体遺伝子を組み込むことで、ヒト嗅覚受容体遺伝子発現ベクターを得た。

[0064] （２－２）ルシフェラーゼアッセイ

ヒト嗅覚受容体遺伝子発現ベクター０．０５μｇ、ＲＴＰ１Ｓベクター０．０１μｇ、ＣＭＶプロモーターを含むホタルルシフェラーゼベクターｐＧｌｏＳｅｎｓｏｒＴＭ－２２Ｆ ｃＡＭＰ Ｐｌａｓｍｉｄ（Ｐｒｏｍｅｇａ社）０．０１μｇをＯｐｔｉ－ＭＥＭ Ｉ（ｇｉｂｃｏ社）１０μＬに溶解して遺伝子溶液（１穴分）とした。ＨＥＫ２９３Ｔ細胞を、２４時間後にサブコンフルエントに達する細胞数で９６穴プレート（Ｂｉｏｃｏａｔ、Ｃｏｒｎｉｎｇ社）に１００μＬずつ播種し、Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ

３０００の使用法に従ってリポフェクション法によって遺伝子溶液を各穴に添加又は暴露させて、細胞に遺伝子導入を行い、３７℃、５％二酸化炭素雰囲気下で２４時間培養した。培養液を除去後、ＨＥＰＥＳバッファーで１回洗浄し、ＦＢＳ含有ＨＥＰＥＳバッファーにて所定濃度に調整したＧｌｏＳｅｎｓｏｒＴＭ　ｃＡＭＰ　Ｒｅａｇｅｎｔ（Ｐｒｏｍｅｇａ社）３０μＬ（気相測定時）もしくは１００μＬ（液相測定時）を各穴に添加又は暴露させ、直ちにプレート上面をシールで密閉し、室温下で２時間静置した。その後、匂い暴露直前の各ウェルの応答値（Ｔ０）をプレートリーダーにて測定しておき、匂い刺激直後から１分毎に応答値（Ｔｘ）を測定することで発光値を測定した。

[0065] （２－３）フレッシュフルーツの嗅覚受容体気相応答測定

ルシフェラーゼアッセイにおいて、測定対象物をプレートの蓋の裏面にあらかじめ敷き詰めておいたものでプレート上面を覆いながら蓋をすることで、各ウェルを測定対象物の香気で飽和させ密閉した。密閉暴露後１０分後（Ｔ１０）に再度プレートリーダーにて各ウェルの応答値を測定した。嗅覚受容体の応答強度は、ピンクグレープフルーツに対するヒト嗅覚受容体全４５４種類のスクリーニングはＴ１０/Ｔ０で表されるＦｏｌｄ　Ｉｎｃｒｅａｓｅにて評価し（図１ａ）、ヒト嗅覚受容体ＯＲ６Ｂ１に対する各種フルーツの応答は（Ｔ１０－Ｔ０）/Ｔ０で表されるΔＦ/Ｆ０値で評価した（図１ｂ）。

[0066] （２－４）ＯＲ６Ｂ１に応答するフレーバー原料のスクリーニング

ヒト嗅覚受容体ＯＲ６Ｂ１遺伝子発現ベクターを用いたルシフェラーゼアッセイを実施した。ＨＥＰＥＳバッファーにて１０×３０ｐｐｍに調製したフレーバー原料ライブラリーの各溶液を各穴に１０μＬずつ添加又は暴露させ、添加前（Ｔ０）と添加直後から1分毎にＴ１，Ｔ２，・・・,Ｔ２０のようにルシフェラーゼ活性の応答値の経時変化を測定することで、各フレーバー原料に対するヒト嗅覚受容体ＯＲ６Ｂ１の応答値を取得した。嗅覚受容体の応答強度は、まず、各ウェルの各フレーバー原料による刺激後に生じたル

シフェラーゼ活性の最大応答値を、各フレーバー原料の刺激前のルシフェラーゼ活性で割ることで求められるＦｌｓａｍｐｌｅ（ＭＡＸ）値を計算し、各プレートに設置した溶剤刺激のみのコントロール平均Ｆｌｃｏｎｔｒｏｌ（ＭＡＸ）で除した値をＮｏｒｍａｌｉｚｅｄ　Ｒｅｓｐｏｎｓｅ値として評価した。スクリーニングを実施した全７４６種類のフレーバー原料の応答結果を図２に示し、所定以上の応答を得られた上位原料を抽出して香調情報を付したものを表２に示す。

[0067] [表2]

| ITEM Name | odor description | 6B1 response |
|---|---|---|
| ACETALDEHYDE | Fresh aldehydic green pungent. Exist in fruity odor foods. | 31.7 |
| Fenugreek Extract | Caramellic, Bready, Raosted grainy with savory, vegetative and whiskey nuances | 18.3 |
| Butyl Aldehyde | Fresh, Fruity, pungent cocoa musty green malty, Caramellic, Bready, grainy fermented. | 8.0 |
| 2,4,5-trimethyl-3-oxazoline | Bready and Caramellic, Fresh confectionery, Musty, nutty, vegetative, cocoa, brown | 6.5 |
| Cyclotene | Bready maple sweet burnt,caramellic coffee | 6.0 |
| Isobutyl Aldehyde | Fresh aldehydic herbal green malty. Exist in fruity odor foods. | 4.8 |
| ALDEHYDE C-6 | Fresh green fatty aldehydic grassy leafy fruity sweaty | 4.6 |
| 3,6-NONADIENOL | Fresh green violet cucumber | 3.5 |
| 3,4-HEXANEDIONE | Buttery toasted almond nutty caramellic | 3.0 |
| 2,3-PENTANDIONE | Buttery nutty toasted caramellic | 2.7 |
| DIACETYL | Sweet Buttery creamy milky | 2.7 |

[0068] （２－５）ＯＲ６Ｂ１を含むゲノム領域の影響が推測される食習慣の抽出

表３には、前掲の非特許文献５及び非特許文献６により解析されたバックデータより抽出して得られた、ＯＲ６Ｂ１遺伝子を含むゲノム領域と優位に関連性の高い食習慣、リードＳＮＰ、p-valueを示す。

[0069] [表3]

| Trait | Lead SNP | P-value | Nearest Gene | Reference |
|---|---|---|---|---|
| pieces of fresh fruit per day | rs10249294 | 5.70E-65 | OR6B1 | 非特許文献５ |
| slices of bread per week | rs7802468 | 2.90E-30 | OR6B1 | |
| spread type: butter vs. never | rs6978121 | 4.10E-09 | OR6B1 | |
| Butter on bread | rs10680869 | 9.52E-10 | OR6B1 | 非特許文献６ |

[0070] （２－６）焼き立てパン、バター及びチーズのＯＲ６Ｂ１気相応答測定

ルシフェラーゼアッセイにおいて、測定対象物をプレートの蓋の裏面にあらかじめ敷き詰めておいたものでプレート上面を覆いながら蓋をすることで、各ウェルを測定対象物の香気で飽和させ密閉した。密閉暴露後１０分後（Ｔ１０）に再度プレートリーダーにて各ウェルの応答値を測定し、ヒト嗅覚

受容体ＯＲ６Ｂ１に対する各種フルーツの応答は（Ｔ１０－Ｔ０）/Ｔ０で表されるΔＦ/Ｆ０値で評価した。結果を図３に示す。

[0071] ［実施例３］

嗅覚受容体ＯＲ６Ｂ１は唯一のフレッシュ感供与受容体であることの証明

（３－１）フレッシュ感供与素材の嗅覚受容体スクリーニング

ヒト嗅覚受容体遺伝子計４５４種類の各発現ベクターをクローニングし、ＨＥＫ２９３Ｔ細胞に嗅覚受容体各遺伝子を発現させた細胞を用いてルシフェラーゼアッセイを実施した。図２にて示されたＯＲ６Ｂ１応答性化合物であるフレッシュ感供与素材の代表検体：ａ）Ａｃｅｔａｌｄｅｈｙｄｅ、ｂ）Ｂｕｔｙｌａｌｄｅｈｙｄｅ、ｃ）２，４，５－ｔｒｉｍｅｔｈｙｌ－３－ｏｘａｚｏｌｉｎｅ、ｄ）Ｉｓｏｂｕｔｙｌａｌｄｅｈｙｄｅ、ｅ）Ｄｉａｃｅｔｙｌを１０×１ｍＭもしくは１０×３ｍＭとなるように３００μＭ$CuCl_2$及びＦＢＳ含有ＨＥＰＥＳバッファーにて調製し、各穴に１０μＬずつ添加又は暴露させ、添加直後から1分毎にルシフェラーゼ活性の経時変化を測定することで、前記各ヒト嗅覚受容体の経時応答を取得した。嗅覚受容体の応答強度は、香気化合物の刺激によって生じたルシフェラーゼ活性を、香気化合物の刺激前のルシフェラーゼ活性で除すことで求められるＦｏｌｄ Ｉｎｃｒｅａｓｅ値の最大値を用いて評価した。結果を図４に示す。

[0072] （３－２）フレッシュ感供与素材の濃度依存的ＯＲ６Ｂ１応答の測定

ヒト嗅覚受容体ＯＲ６Ｂ１遺伝子発現ベクターをクローニングし、ＨＥＫ２９３Ｔ細胞に嗅覚受容体ＯＲ６Ｂ１遺伝子を発現させた細胞を用いてルシフェラーゼアッセイを実施した。図２にて示されたＯＲ６Ｂ１応答性化合物であるフレッシュ感供与素材の代表検体として、ａ）Ａｃｅｔａｌｄｅｈｙｄｅ、ｂ）Ｆｅｎｕｇｒｅｅｋ ｅｘｔｒａｃｔ、ｃ）Ｂｕｕｔｙｌａｌｄｅｈｙｄｅ、ｄ）Ｉｓｏｂｕｔｙｌａｌｄｅｈｙｄｅ、ｅ）３，６－ｎｏｎａｄｉｅｎｏｌ、ｆ）Ｄｉａｃｅｔｙｌを終濃度が１ｍＭ、７００μＭ、３００μＭ、１００μＭ、０μＭもしくは７００μＭ、３００μＭ、７０μＭ、３０μＭ、０μＭ、もしくは１００ｐｐｍ、７０ｐｐｍ、３０ｐｐｍ、１

０ｐｐｍ、０ｐｐｍとなるように添加又は暴露させ、添加直後から1分毎にルシフェラーゼ活性の経時変化を測定することで、嗅覚受容体ＯＲ６Ｂ１の経時応答を取得した。嗅覚受容体ＯＲ６Ｂ１の応答強度は、香気化合物の刺激によって生じた各時間でのルシフェラーゼ活性を、香気化合物の刺激前のルシフェラーゼ活性で除すことで求められるＦｏｌｄ　Ｉｎｃｒｅａｓｅ値を算出後、０μM添加ウェルの各時間でのＦｏｌｄ　Ｉｎｃｒｅａｓｅ値を減ずることで求められるΔＦｏｌｄ　Ｉｎｃｒｅａｓｅ値を評価した。結果を図５に示す。

[0073] （３－３）ＯＲ６Ｂ１応答増強フレーバー原料スクリーニング

ＨＥＫ２９３Ｔ細胞に嗅覚受容体ＯＲ６Ｂ１遺伝子を発現させた細胞を用い、量のＡｃｅｔａｌｄｅｈｙｄｅ存在下でＯＲ６Ｂ１応答を増強するフレーバー原料を、ルシフェラーゼアッセイによってスクリーニングした。２７５μM　Ａｃｅｔａｌｄｅｈｙｄｅに対し、８２７種類の試験物質を終濃度３０ｐｐｍとなるように各穴に添加又は暴露させ、添加直後から1分毎にルシフェラーゼ活性の経時変化を測定することで、前記各ヒト嗅覚受容体の経時応答を取得した。各試験物質を混合しなかった２７５μM　Ａｃｅｔａｌｄｅｈｙｄｅのみ添加又は暴露させたコントロール試験でのＦｏｌｄ　Ｉｎｃｒｅａｓｅ値の最大値を１とした時の、各試験物質を混合した試験でのＦｏｌｄ　Ｉｎｃｒｅａｓｅ値の相対値をＦｏｌｄ　Ｉｎｃｒｅａｓｅ　Ｅｎｈａｎｃｅｍｅｎｔ値（ＦＩＥ値）をとして求めた。実施例２の（２－４）にて同定したフレーバー原料単品それ自体ではＯＲ６Ｂ１の応答を惹起しないＦＩＥ値が１．５以上のフレーバー原料をＯＲ６Ｂ１応答増強剤とし、その一例としてＭｅｔｈｙｌ　ｉｓｏｅｕｇｅｎｏｌの経時応答増強結果を図６に示す。

[0074] （３－４）ＯＲ６Ｂ１応答抑制フレーバー原料スクリーニング

ＨＥＫ２９３Ｔ細胞に嗅覚受容体ＯＲ６Ｂ１遺伝子を発現させた細胞を用い、試験物質がＯＲ６Ｂ１の応答を抑制する効果を、ルシフェラーゼアッセイによって測定するスクリーニングを実施した。６００μM　Ａｃｅｔａｌ

ｄｅｈｙｄｅに対し、８２７種類の試験物質を終濃度３０ｐｐｍとなるように各穴に添加又は暴露させ、添加直後から1分毎にルシフェラーゼ活性の経時変化を測定することで、前記各ヒト嗅覚受容体の経時応答を取得した。各試験物質を混合しなかった６００μＭ　Ａｃｅｔａｌｄｅｈｙｄｅのみ添加又は暴露させたコントロール試験でのＦｏｌｄ　Ｉｎｃｒｅａｓｅ値の最大値を１とした時の、各試験物質を混合した試験でのＦｏｌｄ　Ｉｎｃｒｅａｓｅ値の相対値をＲｅｌａｔｉｖｅ　Ｓｕｐｐｒｅｓｓｉｏｎ値（ＲＳ値）として求めた。ＲＳ値が０．５以下のフレーバー原料をＯＲ６Ｂ１応答抑制剤とし、その一例としてＣｉｎｎａｍｉｃ　Ａｌｄｅｈｙｄｅの経時応答抑制結果を図７に示す。

[0075] （３－５）オレンジフレーバーのＯＲ６Ｂ１応答評価

[0076] [表4]

| | 配合量（質量部） | | | |
|---|---|---|---|---|
| 処方 | FLAVOR - 1 | FLAVOR - 2 | FLAVOR - 3 | FLAVOR - 4 |
| オレンジピールオイル | 4 | 4 | 4 | 4 |
| アセトアルデヒド | 0.4 | 2 | 2 | 2 |
| メチルイソオイゲノール | — | — | 0.1 | — |
| シンナミックアルデヒド | — | — | — | 0.1 |
| エタノール | 71 | 71 | 71 | 71 |
| 水 | 24.6 | 23 | 22.9 | 22.9 |
| TOTAL | 100 | 100 | 100 | 100 |

[0077] ＨＥＫ２９３Ｔ細胞に嗅覚受容体ＯＲ６Ｂ１遺伝子を発現させた細胞を用い、上記表４に示す処方に従って調整したオレンジフレーバー１～４のＯＲ６Ｂ１の応答を、ルシフェラーゼアッセイによって測定した。各オレンジフレーバー１～４を終濃度が０．１％となるように各穴に添加又は暴露させ、添加直後から1分毎にルシフェラーゼ活性の経時変化を測定することで、前記各ヒト嗅覚受容体の経時応答（Ｆｏｌｄ　Ｉｎｃｒｅａｓｅ値）を算出した。結果を図８に示す。

[0078] （３－６）オレンジフレーバーのフレッシュ感官能評価試験

ＯＲ６Ｂ１応答強度と感覚の関係性を明らかにするために官能評価を行っ

た。上記オレンジフレーバー１～４を０．１％配合した水を飲み、飲んだ直後に感じるオレンジのフレッシュ感について９名の一般パネルにて官能評価試験を行い、フレッシュ感の強さを０（感じない）から９（非常に強く感じる）の１０段階で評価した。結果を図９に示す。

[0079] 実施例の結果

フレッシュフルーツの摂食にはＯＲ６Ｂ１を含むゲノム領域が強く関連しているが、ドライフルーツの摂食には該領域の関連が見られないことから、フルーツのフレッシュ感の認識にＯＲ６Ｂ１が強く関連していると推定できた（表１）。各種フルーツ香気はＯＲ６Ｂ１に応答することから（図１a）、実際のフレッシュフルーツにはＯＲ６Ｂ１の応答成分が含まれることが分かり、ヒトの全嗅覚受容体の中で最も強く応答する受容体であることから（図１ｂ）、ＯＲ６Ｂ１はヒトのフルーツ香気の認識において最も強い影響力のある嗅覚受容体であることが示された。

[0080] ＯＲ６Ｂ１に応答する物質スクリーニングにより、ＯＲ６Ｂ１は、フルーツに共通して存在するアルデヒド等のフレッシュ感付与物質群だけでなく、パンの焼き立て感やバターのフレッシュ感付与物質群にも応答した（図２・表２）。この結果は、ＯＲ６Ｂ１と優位に関連性の高い食習慣上位がフルーツ、パン及びバターの摂食であることを示す集団ゲノム解析データと完全に一致した（表３）。これにより、ＯＲ６Ｂ１に「応答」することで、フレッシュ感が「付与」され、フルーツ・パン・バターの嗜好性が形成される因果関係が示された。

[0081] フレッシュ感付与物質群はＯＲ６Ｂ１応答のみ共通していることからＯＲ６Ｂ１以外に共通応答する嗅覚受容体を介してフレッシュ感を付与している可能性はない（図４）。フレッシュ感付与物質群のＯＲ６Ｂ１応答は濃度依存的であった（図５）。ＯＲ６Ｂ１応答増強剤及びＯＲ６Ｂ１応答抑制剤のスクリーニングを実施することで、メチルイソオイゲノールやシンナミックアルデヒドに代表されるＯＲ６Ｂ１応答調整物質を特定した（図６・図７）。これらを用い、ＯＲ６Ｂ１応答を増強したフレーバーでは官能評価試験に

おいてフレッシュ感が増大し、ＯＲ６Ｂ１応答を抑制したフレーバーではフレッシュ感が抑制された（図８・図９）。このように、ＯＲ６Ｂ１応答抑制剤によりフレッシュ感抑制効果を示せたことで初めて、フレッシュ感がＯＲ６Ｂ１応答を介して認識されていることが示され、パンやバターのような加熱を伴う加工食品における作り立て感や出来立て感も、フルーツのフレッシュ感と生物学的に等価な広義のフレッシュ感であることが明らかとなった。

## 産業上の利用可能性

[0082] 本発明によれば、主観的で曖昧な感覚であったフレッシュ感及び／又は嗜好性を、ＯＲ６Ｂ１応答を利用して定性的かつ定量的に評価する方法を提供することができる。また、フレッシュ感及び／又は嗜好性を付与、増強、又は抑制する物質のスクリーニング方法を提供することができ、当該方法により同定される物質により、例えば、フレッシュ感をコントロールし、食嗜好性を向上等させることができ、さらには食嗜好性向上技術の開発に貢献できるものと期待される。

# 請求の範囲

[請求項1] フレッシュ感及び／又は嗜好性を評価する方法であって、嗅覚受容体ＯＲ６Ｂ１、及び前記ＯＲ６Ｂ１が有するアミノ酸配列と少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドのうちの少なくとも１種の嗅覚受容体ポリペプチドに、評価対象物質を添加又は暴露し、前記嗅覚受容体ポリペプチドの応答を測定すること、及び、測定された応答に基づいて前記評価対象物質のフレッシュ感及び／又は嗜好性を評価することを含む、前記方法。

[請求項2] フレッシュ感及び／又は嗜好性を付与、増強、あるいは抑制する物質のスクリーニング方法であって、

前記付与する物質のスクリーニングにおいては、嗅覚受容体ＯＲ６Ｂ１、及び前記ＯＲ６Ｂ１が有するアミノ酸配列と少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドのうちの少なくとも１種の嗅覚受容体ポリペプチドに、試験物質を添加又は暴露し、前記嗅覚受容体ポリペプチドの応答を測定すること、及び、測定された応答に基づいて前記試験物質がフレッシュ感及び／又は嗜好性を付与する物質であると同定することを含み、

前記増強する物質のスクリーニングにおいては、嗅覚受容体ＯＲ６Ｂ１、及び前記ＯＲ６Ｂ１が有するアミノ酸配列と少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドのうちの少なくとも１種の嗅覚受容体ポリペプチドに、ＯＲ６Ｂ１応答性物質と共に試験物質を添加又は暴露し、前記嗅覚受容体ポリペプチドの応答を測定すること、及び、測定された応答に基づいて前記試験物質がフレッシュ感及び／又は嗜好性を増強する物質であると同定することを含み、

あるいは

前記抑制する物質のスクリーニングにおいては、嗅覚受容体ＯＲ６Ｂ１、及び前記ＯＲ６Ｂ１が有するアミノ酸配列と少なくとも９０％

の同一性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドのうちの少なくとも１種の嗅覚受容体ポリペプチドに、ＯＲ６Ｂ１応答性物質と共に試験物質を添加又は暴露し、前記嗅覚受容体ポリペプチドの応答を測定すること、及び、測定された応答に基づいて前記試験物質がフレッシュ感及び／又は嗜好性を抑制する物質であると同定することを含む、
前記方法。

[請求項3] 前記フレッシュ感が、フルーツのフレッシュ感、又は加工食品の出来立て感である、請求項１又は２に記載の方法。

[請求項4] 前記嗅覚受容体ポリペプチドの応答を、前記嗅覚受容体ポリペプチドを内因的に発現する細胞上、又は前記嗅覚受容体ポリペプチドを遺伝子操作により人為的に発現させた細胞上で測定する、請求項１又は２に記載の方法。

[請求項5] 前記嗅覚受容体ポリペプチドの応答を、レポーターアッセイ又はカルシウムイメージングにより測定する、請求項１又は２に記載の方法。

[請求項6] 請求項２の方法により同定される、フレッシュ感及び／又は嗜好性を付与又は増強する物質を含む、フレッシュ感及び／又は嗜好性の付与又は増強剤。

[請求項7] 前記フレッシュ感及び／又は嗜好性を付与又は増強する物質が、メチルイソオイゲノールである、請求項６に記載の付与又は増強剤。