

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：11201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07451

研究課題名(和文) LC-MS/MS分析による大豆サポニンの化学構造推定

研究課題名(英文) Estimation of Chemical Structures of Soybean Saponins by LC-MS/MS Analysis

研究代表者

塚本 知玄 (Tsukamoto, Chigen)

岩手大学・農学部・准教授

研究者番号：20312514

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：大豆種子に含まれる大豆サポニンは、多様な分子種の総称である。大豆サポニンの健康機能性や呈味性は、化学構造の違いにより大きく異なると報告されているが、不明な点が多く再評価が求められている。一方、各種大豆サポニンは、複数遺伝子の共優勢、優勢、劣勢遺伝の組み合わせで生合成されることが明らかとなってきた。

本研究では、微量、不安定、分離困難などの理由で構造解析できなかった各種大豆サポニンの化学構造を、遺伝解析とLC-PDA/MS/MS分析の総合判断で推定する新しい手法(プロフィール解析)を開発した。この新規手法で、今後、食品加工工程で変化した各種大豆サポニンの化学構造が推定できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Saponin contained in soybean seeds is a generic term for a various molecular species. It has been reported that the health and taste properties of soybean saponins differ greatly due to the difference in chemical structure, but there remained many unclear points and re-evaluation was required. On the other hand, it has been clarified that the soybean seed saponins are biosynthesized by the combination of co-dominant, dominant, and recessive acting multiple genes.

In this study, to estimate the chemical structure of various soybean saponins which could not be elucidated for reasons such as trace, instability, or separation difficulty, we developed a new method (profile analysis) which is comprised of the comprehensive judgment with a combination of instrumental analysis and genetic analysis. By using this new method, it is thought that the chemical structures of various soybean saponins which changed during the food processing can be presumed in the future.

研究分野：食品科学

キーワード：大豆 サポニン 化学構造解析 遺伝解析 プロファイル解析 LC-PDA/MS/MS 大豆加工食品

1. 研究開始当初の背景

大豆種子に含まれるサポニンには 50 種類以上にもおよぶ多様な分子種の総称であり、化学構造の違いにより健康機能性や呈味性が大きく異なると報告されている。50 種類にもおよぶ大豆サポニンの組成は、品種により異なるうえ、種子の子葉と胚軸でも異なり、種子サポニンの約 30% (w/w) は種子重量のわずかに 2% 程度にすぎない種子胚軸に高濃度で蓄積していると報告されている。

しかしながら、これまでの報告で用いられたサポニン分析技術は、単利精製した標準サポニン成分を用いた HPLC-UV 分析であり、近年の技術の進歩により、それらの結果が根底から覆る可能性が出てきた。また最近、複数の未知アグリコンに糖鎖が付加した数種類の未知サポニンを種子に多量に蓄積するサポニン組成変異ツルマメを見いだしたが、それら未知サポニンの一部は不安定であったり微量であり、化学構造の全容解明には至っていない。

近年のタンデムマススペクトロメトリー (MS/MS) 分析技術の向上により、遺伝的にサポニン組成が異なる各種大豆種子中の未確認サポニンを含む大豆種子サポニン組成と含量の再評価が求められている。

2. 研究の目的

本研究では、先ず、既知サポニンの化学構造と MS/MS フラグメントパターンに関するデータベースを構築し、MS/MS 分析により新規サポニンの化学構造を推定する。

次に、単利精製した新規サポニンの化学構造解析結果と MS/MS 分析による推定構造を照合し、データベースの再構築を行う。これにより、MS/MS 分析による微量サポニン成分の化学構造推定を可能にする。

3. 研究の方法

(1) 既知サポニンの化学構造と MS/MS フラグメントパターンに関するデータベースの構築

化学構造が異なる種々のサポニンは市販品を購入し、必要に応じて精製して用いる。未知サポニン含有変異ツルマメは岩手大学園場で栽培・増殖し種子を得る。サポニン成分は試料からアルコールで抽出し、岩手大学に設置されている LC-PDA-MS/MS (QTL Orbitrap, Thermo 社) で分析する。

(2) 未知サポニン合成に関与する遺伝子の遺伝解析

未知アグリコン (ソヤサポゲノール H, I, J と暫定的に命名) の合成は一因子優性遺伝子 *Sg-6* で制御されているため、*Sg-6* 型種子には未知アグリコンに糖鎖を付けた未知サポニンが複数存在すると推定される。既知サポニンの C-3 位糖鎖への Ara 転移は、一因子優性遺伝子 *Sg-4* が制御しているため、*Sg-4*/*sg-6* 型 (未知アグリコンを持たないが Ara を C-3

位に転移できる) と *sg-4*/*Sg-6* 型 (未知アグリコンを持つが Ara を C-3 位に転移できない) を交配して交雑後代種子を得る。雑種後代の中には、未知アグリコン C-3 位糖鎖に Ara を持った新規サポニンを合成する個体が出現すると予想される。それらの種子サポニン成分を LC-PDA/MS/MS 分析してフラグメントイオンパターンを解析することで、未知サポニンの糖鎖構造を確認する。

(3) 未知サポニンアグリコン (ソヤサポゲノール H, I, J) の単離精製と化学構造解析

未知サポニン蓄積ツルマメ変異体は、岩手大学園場で栽培・増殖する。種子 (数百グラム) を粉砕、アルコール抽出後、糖類を除去し、ODS カラムを装着した分取分画用 HPLC を用いて未知サポニン成分濃縮画分を得る。これを塩酸加水分解し、未知アグリコン成分をエーテル抽出し、再度、分取分画用 HPLC を用いて未知アグリコン (ソヤサポゲノール H) を単離精製する。単離精製した未知アグリコン (ソヤサポゲノール H) は、岩手大学に設置されている精密質量分析装置 (TOF-MS)、赤外吸収スペクトル分析装置 (IR)、核磁気共鳴スペクトル分析装置 (^1H , ^{13}C -NMR, DEPT, HMBC, HMQC 等) などで解析し、その化学構造を決定する。

(4) プロファイル解析手法を用いた大豆サポニン分析に関する妥当性の検討と評価

得られた結果に基づき、プロファイル解析による大豆サポニンの化学構造推定の妥当性を評価・検証する。

(5) プロファイル解析手法を用いた大豆種子並びに大豆加工食品のサポニン組成の再評価

これまで、大豆不快味サポニン成分 (グループ A アセチルサポニン類) は種子胚軸のみ局在すると報告されてきたが、脱胚軸して子葉のみを使った豆乳でも、不快味が感じられる。種子の子葉には、部分的にアセチル基が取れた脱アセチルグループ A サポニンが多量に検出されると推定される。

どのようなサポニンが、どのような濃度・含量で種子子葉に含まれるのか、豆腐加工時の浸漬処理や発芽 (大豆もやし製造) によりそれら成分が変化するのかなど、上記で得られる種々の情報を活用して、食品化学的立場から、大豆種子サポニン組成を再検討する。

4. 研究成果

(1) 化学構造が異なる種々の既知サポニンを含む大豆種子アルコール抽出液を薄層クロマトグラフィー (TLC) 並びに LC-PDA/MS/MS 分析し、得られた機器分析データ (TLC バンドの色と溶出位置, LC 溶出位置, UV スペクトル, MS と MS/MS フラグメントパターン) とアグリコン骨格並びに糖鎖配列との相

関関係をデータベース化した。

(2) 未知アグリコンの合成は一因子優性遺伝子 *Sg-6* で、また既知サポニン C-3 位結合糖鎖への Ara 転移は *Sg-4* 遺伝子でそれぞれ制御されている。遺伝子が *Sg-4/sg-6* 型と *sg-4/Sg-6* 型を交配して得られた交雑後代の *Sg-4/Sg-6* 型は、予想通り新規サポニンを蓄積した。

(3) サポニン組成変異体で観察される新規サポニンを単離精製し、精密質量分析、赤外吸収スペクトル分析、核磁気共鳴スペクトル分析 ($^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, DEPT, HMBC, HMQC 等) 等で解析した結果、これらの化学構造は全て、プロファイル解析で推定した結果と完全に一致した。

以上の結果より、プロファイル解析は、大豆種子サポニンの化学構造解析に有効であると考えられる。

(4) 化学変異原 Ethylmethan-sulfonate (EMS) 処理で得られた大豆系統群からサポニン組成変異系統を TLC で一次スクリーニングした結果、多様な変異が発見された。変異体に含まれる未確認サポニンの化学構造はプロファイル解析で予測できるため、変異遺伝子の機能解析 (推定) が容易となった。

(5) 今回得られた大豆サポニンに関するプロファイル解析のデータベースは、オレアナン型である大豆サポニン以外にも、各種トリテルペン型サポニンの化学構造解析に広く応用できる可能性がある。

(6) 種子子葉で部分的にアセチル基が取れた種々のグループ A 脱アセチルサポニンが確認された。プロファイル解析情報の活用で、食品化学的立場から各種大豆加工食品中のサポニン組成再検討が可能となった。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 11 件)

Yano, R., Takagi, K., Tochigi, S., Fujisawa, Y., Nomura, Y., Tsuchinaga, H., Takahashi, Y., Takada, Y., Kaga, A., Anai, T., Tsukamoto, C., Seki, H., Muranaka, T., and Ishimoto, M. Isolation and characterization of the soybean *Sg-3* gene that is involved in genetic variation in sugar chain composition at the C-3 position in soyasaponins. *Plant Cell Physiol.*, 査読有, 59, **2018**, pp.797-810.

Sundaramoorthy, J., Park, G. T., Mukaiyama, K., Tsukamoto, C., Chang, J. H., Lee, J. D., Kim, J. H., Seo, H. S., and Song, J. T. Molecular elucidation of a new allelic variation at the *Sg-5* gene associated with the absence of group A

saponins in wild soybean. *PLOS ONE*, 査読有, **2018**, DOI: 10.1371/journal.pone.0192150.

Chitisankul, W. T., Takada, Y., Takahashi, Y., Ito, A., Itabashi, M., Varayanond, W., Kikuchi, A., Ishimoto, M., and Tsukamoto, C. Saponin composition complexities in hypocotyls and cotyledons of nine soybean varieties. *LWT-Food Sci. Technol.*, 査読有, 89, **2018**, pp.93-103.

Takahashi, Y., Li, X. H., Qiu, L. J., Tsukamoto, C., and Wang, K. J. Identification of saponin composition and their geographical distribution in Chinese cultivated soybean (*Glycine max*). *Euphytica*, 査読有, 213, **2017**, 175. DOI: 10.1007/s10681-017-1956-7

Takahashi, Y., Li, X-H., Tsukamoto, C., and Wang, K. J. Categories and components of soyasaponin in the Chinese wild soybean (*Glycine soja* Sieb. & Zucc.) genetic resource collection. *Genet. Resour. Crop Evol.*, 査読有, 64, **2017**, pp.2161- 2171.

Yano, R., Takagi, K., Takada, Y., Mukaiyama, K., Tsukamoto, C., Sayama, T., Kaga, A., Sawai, S., Ohyama, K., Saito, K., and Ishimoto, M. Metabolic switching of astringent and beneficial triterpenoid saponins in soybean is achieved by a loss-of-function mutation in Cytochrome P450 72A69. *Plant J.*, 査読有, 89, **2016**, pp.527-539. Itabashi, M., Tsukamoto, C., Kurosaka, A., Krishnamurthy, P., Shin, T-S., Yang, S-H., Son, E., and Chung, G. Efficient method for large-scale preparation of two components H and I of *Sg-6* saponins from whole seeds of wild soybean (*Glycine soja* Sieb. and Zucc.). *J. Liquid Chromatogr. Related Technol.*, 査読有, 39, **2016**, pp.640-646.

Takahashi, Y., Ki, X. H., Tsukamoto, C., and Wang, K. J. Identification of a novel variant lacking group A soyasaponin in a Chinese wild soybean (*Glycine soja* Sieb. & Zucc.): implications for breeding significance. *Plant Breed.*, 査読有, 135, **2016**, pp.607-613.

Park, J., Kim, H., Krishnamurthy, P., Tsukamoto, C., Song, J. T., Chung, G., Shannon, G., and Lee, J. D.. Characterization of a new allele of the saponin-synthesizing gene *Sg-1* in soybean (Note). *Crop Sci.*, 査読有, 56, **2016**, pp.385-391.

Chitisankul, T. W., Shimada, K., Omizu, Y., Uemoto, Y., Varayanond, W., and Tsukamoto, C. Mechanism of DDMP-saponin degradation and maltol production in soymilk preparation.

LWT-Food Science and Technology, 査読有, 64, **2015**, pp.197-204.

Krishnamurthy, P., Lee, J. D., Ha, B. K., Chae, J. H., Tsukamoto, C., Singh, R. J., and Chung, G. Genetic characterization of group A acetylsaponin-deficient mutants from wild soybean (*Glycine soja* Sieb. and Zucc.). Plant Breed., 査読有, 134, **2015**, pp.316-321.

[学会発表](計 13 件)

Krishnamurthy, P., Takagi, K., Fujisawa, Y., Ito, A., Mukaiyama, K., Ishimoto, M., and Tsukamoto, C. A CYP450 gene located tandemly to CYP72A69 is responsible for Sg-6 saponin biosynthesis in wild soybean (*Glycine soja*). The 13th International Meeting on Biosynthesis, Function and Synthetic Biology of Isoprenoids (TERPNET 2017), **2017.7.16-20**, Dalian, China.

Chitisankul, W. T., Varayanond, W., and Tsukamoto, C. Saponin composition in Thai soybean (*Glycine max* cv. Chiang Mai 60). The 19th Food Innovation Asia Conference 2017 (FIAC 2017), **2017.1.15-17**, Bangkok, Thailand.

Krishnamurthy P., Fujisawa, Y., Abe, H., Ohashi, U., Yamane, K., Mukaiyama, K., Tsukamoto, C., Kaga, A., Anai, T., and Ishimoto, M. Identification of mutants in the soyasaponin biosynthetic pathway using a high-density soybean mutant library: an indispensable resource for functional genomics. Plant & Animal Genome XXV (PAG-XXV). Int. Conference on the Status of Plant and Animal Genome Res., **2017.1.14-18**, San Diego, CA, USA.

山根健太郎, 向山恭介, 木村祐太郎, 佐々木聡太, 石本政男, 藤澤由紀子, 加賀秋人, 穴井豊昭, 塚本知玄, ダイズ(*G. max* var. Enrei) EMS 処理系統で発見されたサポニン C-3 位結合糖鎖第二糖 Gal 付加能力喪失変異体のサポニン組成プロファイル解析. **2016.11.11-12**, 南淡路ロイヤルホテル, 兵庫県南あわじ市.

向山恭介, 大橋 麗, Park Cheol-Woo, Lee Jeong-Dong, Kim Tae-Song, 塚本知玄 (2016). 韓国大豆 EMS 処理系統で見られたサポニン組成変異のプロファイル解析. 第 37 回種子生理生化学研究会, **2016.11.11-12**, 南淡路ロイヤルホテル, 兵庫県南あわじ市.

Tsukamoto, C. Functional properties of ethnic fermented and non-fermented soybean foods of Japan. 7th Int. Soybean Processing and Utilization Conference (ISPUC VII), **2016.8.8-10**, Harbin, China.

Ohashi, U., Abe, H., Hitofuji, T., Maita, S., Kaga, A., Anai, T., Ishimoto, M., and Tsukamoto, C. Screening of saponin composition mutations from EMS treated

soybean seeds with TLC and LC-PDA/MS/MS analyses. 7th Int. Soybean Processing and Utilization Conference (ISPUC VII), **2016.8.8-10**, Harbin, China.

Takahashi, Y., Chitisankul, W. T., Ota, H., Muraoka, H., Varayanond, W., Wang, K. J. and Tsukamoto, C. Profile analysis on elucidating chemical structures of saponin components in soyfoods. 7th Int. Soybean Processing and Utilization Conference (ISPUC VII), **2016.8.8-10**, Harbin, China.

Krishnamurthy, P., Yano, R., Fujisawa, Y., Tochigi, S., Maita, S., Kaga, A., Anai, T., Tsukamoto, C., and Masao Ishimoto. Exploration of glycosyltransferases involved in soyasaponin biosynthesis by use of a high-density mutant library in soybean. 日本育種学会第 129 回講演会, **2016.3.21-22**, 横浜市立大学八景キャンパス, 横浜.

Itabashi, M., Chitisankul, T. W., Varayanond, W., Chung, G., and Tsukamoto, C. Changes of saponin composition and content during fermentation which affect to health benefits and taste characteristics of ethnic fermented soyfoods. International Conference on Ethnic Fermented Foods and Beverages: Microbiology and Health Benefits. **2015.11.20-21**, Hotel Dengzong Regency, Gangtok, Sikkim, India.

Tsukamoto, C. Saponins: Health Benefits and Taste Characteristics in Ethnic Fermented Soyfoods. International Conference on Ethnic Fermented Foods and Beverages: Microbiology and Health Benefits. **2015.11.20-21**, Hotel Dengzong Regency, Gangtok, Sikkim, India.

澤谷美咲, 米田咲子, 高橋祐也, 加賀秋人, 穴井豊昭, 王 克晶, 石本政男, 塚本知玄, 変異誘発剤 EMS 処理大豆集団ならびに中国在来ツルマメコレクションの種子サポニン組成変異の検索と LC/PDA/MS/MS プロファイル解析. 第 36 回種子生理生化学研究会, **2015.11.6-7**, 美ヶ原高原ホテル翔峰, 長野県松本市.

大橋 麗, 阿部華子, 板橋芽依, Jeong H. K., 米田咲子, 加賀秋人, 穴井豊昭, Jong T. S., Jeong D. L., Gyuhwa C., 石本政男, 塚本知玄, LC-PDA/MS/MS 解析で検出された変異誘発剤 EMS 処理大豆の種子サポニン組成変異, 日本育種学会第 128 回講演会, **2015.9.10-13**, 新潟大学, 新潟.

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

塚本 知玄 (TSUKAMOTO Chigen)

岩手大学・農学部・准教授

研究者番号 : 2 0 3 1 2 5 1 4