

令和 2 年 7 月 1 日現在

機関番号：23401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K07742

研究課題名(和文)大豆サポニン分子種の迅速・高効率精製ならびに亜鉛欠乏改善効果など健康機能性の解析

研究課題名(英文)Rapid and efficient purification method of soyasaponin species and investigation of their potential health-promoting effects such as zinc uptake improvement

研究代表者

高橋 正和 (Takahashi, Masakazu)

福井県立大学・生物資源学部・准教授

研究者番号：80315837

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：大豆には多様な生理活性サポニンが含まれているが、その多くは微量であるため機能解析が遅れている。本研究では、大豆サポニンを全粒粉末から簡便迅速に単離する手法の開発に取り組み、ホウ砂を利用することで、特定のB型サポニンならびに関連のDDMP型サポニンを短時間に効率よく分離することに成功した。最終的には、逆相HPLCを利用することで、大豆全粒粉末 44 g からBb 6.7 mg, Bc 4.5 mg, g 18 mg, a 13 mg, g 1.8 mgの単離に成功し、これらが亜鉛トランスポーター-ZIP4に対してほぼ同等の発現増強効果を示し、亜鉛取込み増強作用が期待できることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で開発した精製法は、大豆サポニン分子の糖鎖に存在するcis-diol構造においてホウ酸エステルが可逆的に形成されることにより、水に難溶性大豆サポニンを溶解度によって効率よく濃縮する手法であり、大豆全粒粉末からの迅速簡単な単離を可能とした。この手法は汎用性の高い原理に基づくことから、他の天然化合物にも応用可能であると期待される。このため、これまで希少なために生理機能解析が遅れている天然生理活性化合物の解析や、天然資源の有効活用・付加価値の高い製品の開発に役立つ可能性がある。またこのような手法で新たに見いだされたZIP4増強活性化合物は、亜鉛の潜在的欠乏の予防改善に役立つと期待される。

研究成果の概要(英文)：Although soybean contains many soyasaponin species, most of them are in low content. Thus, most of soyasaponin species are commercially-unavailable and the functional analyses of soyasaponins have been performed with limited molecular species. In this study, solubility-based separation method of specific soyasaponin species from the whole soybean flour was developed. By this method, specific B- and DDMP-type soyasaponin species were successfully separated by using borax solution. After final reversed-phase HPLC, Bb 6.7 mg, Bc 4.5 mg, g 18 mg, a 13 mg and g 1.8 mg were isolated from 44 g of whole soybean flour. Because these isolated molecules showed ZIP4 protein-enhancement activity at similar level, they can be expected to potentiate cellular zinc incorporation.

研究分野：食品科学

キーワード：大豆サポニン 選択的沈殿法 ホウ酸ナトリウム 新規精製法 亜鉛トランスポーター ZIP4発現増強活性

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

必須金属元素である亜鉛には、タンパク質構造因子（例：zinc finger protein）や酵素補因子（例：金属プロテアーゼ）など多様な生理的役割があり、亜鉛欠乏になると味覚障害、皮膚疾患、免疫不全など様々な疾患を発症する。欠乏症の予防には食事からの亜鉛摂取が最も重要であるが、腸管からの亜鉛吸収効率は約 30%と低く、近年では偏った食事などによる潜在的な亜鉛欠乏の広がり懸念されている。そこで亜鉛の腸管吸収に必須な役割を果たすトランスポーター ZIP4 に対して発現増強作用を示す食由来因子は、食事に含まれる亜鉛の吸収を効果的に高めるために有益であると期待される（図 1）。このような食素材を探索した結果、大豆抽出物や大豆標品類に顕著な活性が見いだされた。申請者らはその有効成分として大豆サポニン Bb（以下 Bb と略す）を単離同定するとともに、Bb による ZIP4 増加が細胞内亜鉛濃度を高めることを確認した（Biochem. J., 472, 183-193 (2015)）（図 2）。

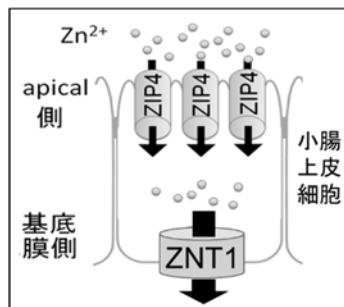


図1. 亜鉛トランスポーター-ZIP4とZNT1の機能

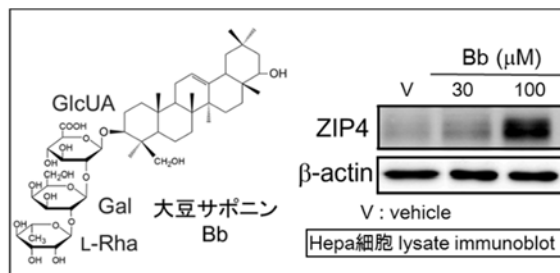


図2. Bbの構造(左)とZIP4発現増強活性(右)

大豆サポニン類には抗炎症活性・抗がん活性・肝臓保護作用などが報告されているが、大豆には約 40 種以上のサポニン分子種（グループ A, B, E, DDMP の 4 種類に大別される）が報告されており、その含有量の少なさをゆえに生理機能解析が不十分な分子種も多い。このような希少な分子種の市販標品はほとんど入手不可能であり、主要分子である Ba や Bb ですら市販標品は高価であり、構造機能解析や生理活性等の解析が不十分な分子種は多い。申請者らは水-有機混合溶媒系（30%アセトン）による選択的沈殿法を用いて粗精製サポニン標品（サポニン含有率約 50%）から大豆サポニン Bb を迅速・簡便に取得可能な精製法の開発に成功した（Anal. Sci., 31, 85-89 (2015)）。革新的な精製法の開発は、未利用天然資源の有効活用や、希少で解析が遅れている天然生理活性化合物の機能解析を可能にすると期待される。また解析の結果見いだされた ZIP4 発現増強化合物は潜在的な亜鉛欠乏の予防改善に役立つものと期待される。

2. 研究の目的

(1) 新たな単離精製法の開発

本研究では、水-有機混合溶媒などによる選択的沈殿法を大豆全粒粉末からの直接的な抽出精製に応用し、より簡便で新たな精製手法の開発を目指した。

(2) 新たな活性測定法の開発

大豆サポニン Bb は亜鉛トランスポーター-ZIP4 の誘導活性を示すが、この活性測定には肝臓細胞株 Hepa 細胞を用いてきた。これは、代表的な腸管系培養細胞株（Caco-2 など）では ZIP4 タンパク質の発現が確認できず、活性評価に使用できないためである。そこで本研究では、Hepa 細胞による ZIP4 発現増強活性に加え、ZIP4 とは別のトランスポーターに着目するなど、新たな評価系の開発も試みた。

3. 研究の方法

(1) 新たな精製法の開発①：ホウ砂の利用

大豆サポニン分子が多様な糖鎖構造を有していることに注目し、ホウ砂の利用を試みた。ホウ砂は cis-diol とホウ酸エステルを可逆的に形成し、水に難溶性大豆サポニン分子のうち、cis-diol 構造を持つ分子種は、水に溶解するようになるが、酸を加えると結合が壊れて水中で析出すると期待される（図 3）。この操作を繰り返すことで、cis-diol を含む Bb など特定の大豆サポニン分子を大豆全粒粉末から精製する手法の開発を試みた。

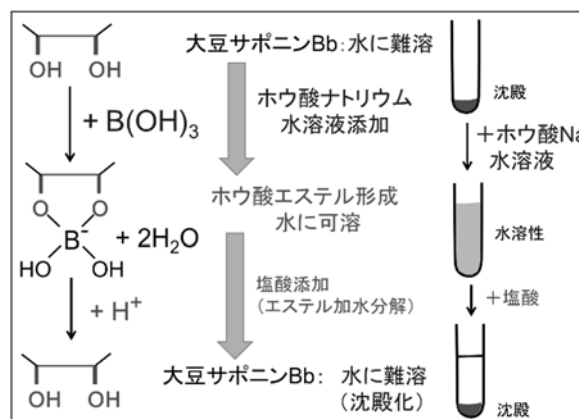


図3. ホウ酸ナトリウムによる選択的沈殿の原理

(2) 新たな精製法の開発②：マイクロウェーブ分解装置の利用

マイクロ波試料前処理装置 Multiwave Pro(アントンパールジャパン社)は、マイクロ波を照射して目的成分を積極的に加熱分解処理することで、目的成分の分析・精製を容易にする装置である。大豆全粒粉末をアルコールなどの有機溶媒で抽出する際に本装置を使用し、抽出と

同時に不要成分を分解することで、新しい精製法の開発を試みた。

(3) 単離した大豆サポニン分子の ZIP4 発現増強活性の確認

抗 ZIP4 モノクローナル抗体を用いて Hepa 細胞株における ZIP4 発現増強効果を調べた。

(4) 新たな評価系の開発

ZNT-1 は、小腸上皮では上皮細胞から体内側への亜鉛輸送をつかさどる亜鉛トランスポーターである (図 1)。ZNT-1 は Caco-2 でも発現しており、その発現レベルは細胞内亜鉛濃度の上昇によって高まる。そこで ZNT-1 を亜鉛取込み増強活性の評価に使用できるか、特異的モノクローナル抗体を構築して、Western 解析にて検討した。

4. 研究成果

(1) 新たな精製法の開発①：ホウ砂の利用

大豆全粒粉末 5 g にメタノール 50 mL を加えてメタノール抽出液を調製し、ホウ酸ナトリウムを利用して選択的沈殿法による精製系開発を試みた。試行錯誤の結果、図 4 に示す手順で精製すれば、cis-diol 構造を持つ Bb ($m/z = 943.52$), Bc ($m/z = 913.51$) に加えて、その DDMP 型である βg ($m/z = 1069.56$), βa ($m/z = 1039.54$) が選択的に効率よく濃縮されることが確認された (カッコ内は LC/MS 分析(positive ion mode)の分析結果) (図 4, 5) (図 5 は引用文献①より)。逆相 HPLC クロマトにて βa の後ろに溶出しているのは、 γg (βg より糖が 1 つ少ない) であり、cis-diol 構造が 1 つの分子種でもこの方法で効率よく単離できることが示された。改めて大豆全粒粉末 44 g から同様に精製を行い、逆相 preparative HPLC によって、Bb 6.7 mg, Bc 4.5 mg, βg 18 mg, βa 13 mg, γg 1.8 mg の単離に成功した。またこの精製法は cis-diol 構造を持つ他の生理活性化合物への利用も可能であると期待された。

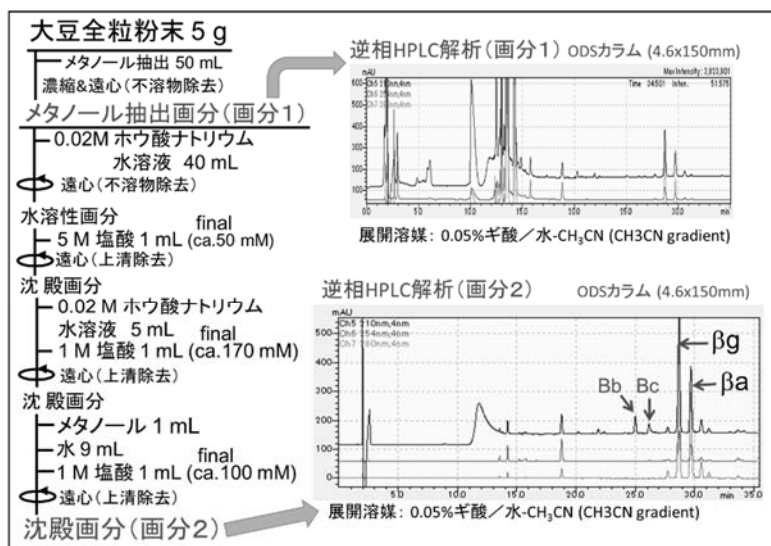


図4. ホウ砂を用いた選択的沈殿法による大豆サポニンの分離

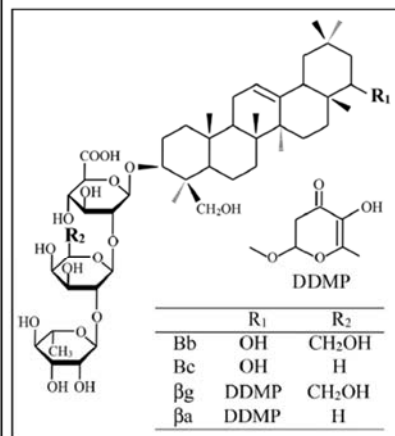


図5. 大豆サポニン分子種の構造模式図 (Anal.Sci., 35, 935-937 (2019)より)

(2) 新たな精製法の開発②：

マイクロウェーブ分解装置の利用

大豆全粒粉末 0.3 g に MeOH, EtOH, 2-プロパノールのいずれかを 1 mL 加えて 850W, 30 min マイクロウェーブ処理を行った。得られた抽出物について逆相 HPLC にて比較したところ、図 6 に示すようにいずれも Bb, Bc が選択的に抽出されていることが確認され、特に本法においては EtOH が抽出溶媒として適していることが示唆された。このマイクロウェーブ法は、熱安定性の低い不純物を除去する場合に適していると考えられた。また、このような激しい処理をかけても Bb, Bc は選択的に効率よく単離されることから、これらの分子種は、構造的に安定な分子種であることが示唆された。

なお、DDMP 型は、DDMP 基が外れて Bb や Bc に変化しやすいこと、またスケールアップは、前述の (1) のほうが容易であるため、大量調製には (1) の手法を採用した。

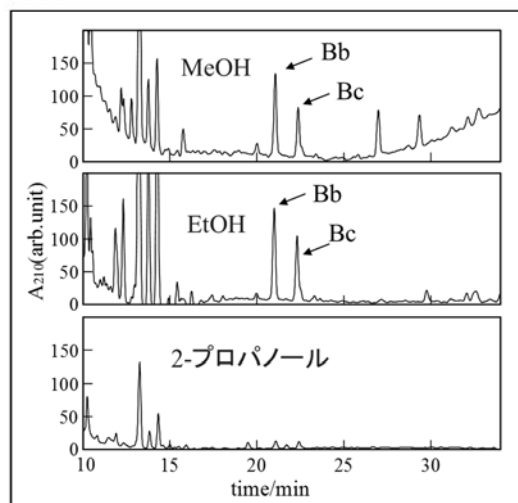


図6. マイクロ波処理による大豆全粒粉末からの大豆サポニン抽出

(3) 単離した大豆サポニン分子の ZIP4 発現増強活性の確認

(1) の手法で大量調製した 5 種類の大豆サポニン分子種について、Hepa 細胞培養系にて ZIP4 発現増強活性を検討したところ、いずれもほぼ同等の活性を 30, 100 μM にて示したことから、これら Bb 以外の分子種にも亜鉛取込み増強活性が期待された。

(4) 新たな評価系の開発

新たな活性測定系を開発するため、ZNT-1 の特異的モノクローナル抗体を作成し、Caco-2 細胞を用いて粗精製大豆サポニンの効果を解析した。しかし、内在性の発現レベルが高いため、有意な差を検出するには、内在性レベルを落とす必要があり、亜鉛取込み増強活性の評価には使いにくいことが判明した。また挑戦的な試みとして、小腸上皮細胞の三次元培養（オルガノイド培養）を試み、得られたオルガノイドの内腔側（消化管側）へ各種サポニン分子をマイクロインジェクションして、亜鉛取込上昇を特異蛍光プローブで評価することを考えた。しかし、定量的なインジェクションに高い技術が必要であり、評価系への利用は困難であった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 H. Katano, S. Noba, S. Taira, T. Kambe, and M. Takahashi	4. 巻 35
2. 論文標題 A Solubility-Based Separation of Group B Soyasaponins from the Whole Soybean Flour	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Anal. Sci.	6. 最初と最後の頁 935-937
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2116/analsci.19N009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 西藤有希奈, 直木志保, 神戸大朋	4. 巻 35
2. 論文標題 生体内の亜鉛代謝制御における亜鉛輸送体の役割	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Trace Nutrients Research-微量栄養素研究-	6. 最初と最後の頁 92-97
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 神戸大朋	4. 巻 2
2. 論文標題 亜鉛栄養とヒトの健康	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 1154-1158
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nishito Y and Kambe T	4. 巻 64
2. 論文標題 Absorption mechanisms of iron, copper, and zinc: An overview	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Nutr Sci Vitaminol.	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3177/jnsv.64.1.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 西藤有希奈、神戸大朋	4. 巻 39
2. 論文標題 消化管での微量金属の吸収調節機構 -鉄、銅、亜鉛の吸収に関わる分子-	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 消化と吸収	6. 最初と最後の頁 122-127
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 神戸大朋	4. 巻 74
2. 論文標題 亜鉛トランスポーターを標的にした亜鉛栄養改善	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 日本臨牀	6. 最初と最後の頁 1234-1238
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計20件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 大川楓佳, 山内遥菜, 金田啓太郎, 杉本雅俊, 神戸大朋, 片野 肇, 高橋正和
2. 発表標題 農産物に含まれる亜鉛トランスポーターZIP4増強化合物の評価・探索
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大川楓佳, 山内遥菜, 金田啓太郎, 杉本雅俊, 神戸大朋, 片野 肇, 高橋正和
2. 発表標題 in vitro評価系による農産物由来のZIP4増強化合物の評価・探索
3. 学会等名 日本食品科学工学会2019年度中部支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 M. Takahashi, K. Kaneda, F. Okawa, H. Yamauchi, T. Kambe, and H. Katano
2. 発表標題 A solubility-based separation of group B soyasaponins with Zinc transporter protein (ZIP4)-enhancement activity from whole Soybean Flour.
3. 学会等名 2019 International Conference on Food Factors (ICoFF2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大川楓佳, 山内遥菜, 金田啓太郎, 杉本雅俊, 神戸大朋, 片野 肇, 高橋正和
2. 発表標題 亜鉛トランスポーターZIP4を増強する農産物由来化合物の評価
3. 学会等名 北陸合同バイオシンポジウム第12回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋正和, 金田啓太郎, 高田佳亮, 神戸大朋, 片野 肇
2. 発表標題 選択的沈殿法を用いた大豆全粒粉末からのDDMP型大豆サポニンの単離ならびに亜鉛トランスポーターZIP4誘導活性の検証
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 M. Takahashi, Y. Uchida, T. Kambe, and H. Katano
2. 発表標題 A Solubility-Based Separation of Group B Soyasaponins with Zinc Transporter Protein (ZIP4)-Enhancement Activity from Whole Soybean Flour
3. 学会等名 The 31st Annual and International Meeting of the Japanese Association for Animal Cell Technology (JAACT2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高橋正和, 片野 肇, 神戸大朋
2. 発表標題 大豆サポニン分子は亜鉛トランスポーターZIP4誘導機能を示す食由来因子である
3. 学会等名 食品酵素化学研究会第18回学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 神戸大朋
2. 発表標題 亜鉛の吸収を調節するメカニズム：亜鉛輸送体の巧妙な発現制御
3. 学会等名 第72回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 神戸大朋
2. 発表標題 亜鉛欠乏症の発症に関わる亜鉛トランスポーター
3. 学会等名 第18回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 野場翔太, 平 修, 高橋正和, 片野 肇
2. 発表標題 ソヤサポニンB種および長鎖長キチンオリゴ糖の簡易迅速な単離精製法
3. 学会等名 第36回分析化学中部夏期セミナー
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 野場翔太, 平 修, 高橋正和, 片野 肇
2. 発表標題 ソヤサポニンB種および長鎖長キチンオリゴ糖の簡易迅速な単離精製法
3. 学会等名 日本化学会近畿支部平成29年度北陸地区講演会と研究発表会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 神戸大朋
2. 発表標題 香辛料を用いた亜鉛欠乏予防因子の探索
3. 学会等名 第26回スパイス&ハーブ研究成果セミナー（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 神戸大朋
2. 発表標題 亜鉛欠乏の予防と亜鉛栄養の改善に向けたアプローチ
3. 学会等名 メディカルジャパン2018大阪（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高橋正和, 打田慶明, 野場翔太, 神戸大朋, 片野 肇
2. 発表標題 大豆全粒粉末からの大豆サポニンBbの迅速精製法開発ならびに亜鉛トランスポーターZIP4誘導活性の検証
3. 学会等名 日本農芸化学会2018年度大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 神戸大朋
2. 発表標題 哺乳類亜鉛トランスポーターの発現制御と生理機能
3. 学会等名 日本農芸化学会2018年度大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 野場翔太, 平 修, 高橋正和, 片野 肇
2. 発表標題 粗精製サポニンおよび大豆からのソヤサポニンBbの単離精製
3. 学会等名 第76回 分析化学討論会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 野場翔太, 平 修, 高橋正和, 片野 肇
2. 発表標題 粗精製サポニンおよび大豆からのソヤサポニンBbの単離精製
3. 学会等名 第35回 分析化学 中部夏期セミナー
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 野場翔太, 平 修, 高橋正和, 片野 肇
2. 発表標題 粗精製サポニンおよび大豆からのソヤサポニンBbの単離精製
3. 学会等名 第177回 日本農芸化学会 中部支部例会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 野場翔太, 平 修, 高橋正和, 片野 肇
2. 発表標題 粗精製サポニンおよび大豆からのソヤサポニンBbの単離精製
3. 学会等名 「分析中部・ゆめ21」若手交流会 第15回高山フォーラム
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 高橋正和, 野場翔太, 神戸大朋, 片野 肇
2. 発表標題 亜鉛トランスポーターZIP4誘導活性を示す大豆サポニンBグループの大豆全粒粉末からの迅速精製法開発
3. 学会等名 第39回 日本分子生物学会 大会
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Taiho Kambe & Masakazu Takahashi	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Elsevier	5. 総ページ数 577
3. 書名 Nuts and Seeds in Health and Disease, 2nd Ed.	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	片野 肇 (Katano Hajime) (50264685)	福井県立大学・生物資源学部・教授 (23401)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	神戸 大朋 (Kambe Taiho) (90303875)	京都大学・生命科学研究科・准教授 (14301)	