

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：11201

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02149

研究課題名(和文) プロファイル解析による大豆加工食品中の各種サポニン化学構造の推定

研究課題名(英文) Estimation of saponin chemical structures in soyfoods by profile analysis

研究代表者

塚本 知玄 (TSUKAMOTO, CHIGEN)

岩手大学・農学部・教授

研究者番号：20312514

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,300,000円

研究成果の概要(和文)：これまで、大豆サポニンの化学構造は、単離精製して機器分析(HR-MS、IR、NMR分析等)しないと決定できないと言われてきた。しかし、化学構造解析に必要な量を単離精製するためには、多大な労力と時間を要する。本研究によるプロファイル解析(遺伝情報とLC-PDA/MS/MS分析結果による総合的判断)の手法を用いることで、単離精製や機器分析をすることなく、大豆サポニンの化学構造を決定できることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

天然有機化合物の化学構造は、その物質を単離精製して機器分析(HR-MS、IR、NMR分析等)しないと決定できないと言われてきた。しかし、食品や生体内で検出される多様な天然有機化合物の化学構造は単離精製が非常に困難な場合が多く、化学構造決定に至るまでに多大な労力と時間を要してきた。本研究は、蓄積されている膨大な遺伝子DNA情報と、極微量の試料で必要な情報が得られるLC-PDA/MS/MS分析とを活用することで、天然有機化合物の化学構造決定が可能になることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：It had been said that the chemical structures of soybean saponins could not be elucidated without purification step and instrumental analysis such as HR-MS, IR, NMR. However, it takes a lot of time with hard work in order to obtain sufficient amount for instrumental analysis. It turned out that we could elucidate the chemical structures of soybean saponins without doing the purification and instrumental analysis by using the profile analysis technique (general judgment by genetic information and the LC-PDA/MS/MS analysis) by this study.

研究分野：食品化学

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

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 大豆サポニンの健康機能性と呈味性は、化学構造の違いにより大きく異なる。しかし、100種類以上にもおよぶ多様な類縁分子種で構成されることに加え、大豆加工食品製造過程で化学構造が変化するため、個々の成分を単離精製して特性を解明することは困難であった。  
 (2) 申請者らはこれまでに、大豆種子サポニン組成は生合成に関与する遺伝子の共優勢・優勢・劣勢遺伝の組合せで説明できること、また遺伝解析と LC-PDA/MS/MS 分析によるサポニン化学構造解析とを組合せた「プロファイル解析」は、単離精製や NMR 分析をしなくとも大豆サポニンの化学構造を決定できる手段となり得ることを報告してきた。

2. 研究の目的

(1) 本研究は、プロファイル解析手法を応用し、任意のサポニンを高濃度で蓄積する大豆品種の育成を支援することで特定のサポニン成分の健康機能性と呈味性を明らかにする手段を提供する。  
 (2) 大豆加工食品製造過程で化学構造が変化した場合でもその化学構造を容易に推定する手段を提供する。

3. 研究の方法

(1) 大豆種子等から 80%メタノールでサポニンを抽出し、逆相カラムを装着した LC-PDA/MS/MS 分析を行い、36種類の主要大豆サポニンの中からどのサポニンが検出されるのか、その種類を明らかにする。検出されるサポニンの組合せに関するデータベースと照合することで、サポニン生合成遺伝子の組合せが確定される。  
 (2) データベースに存在しないサポニンが検出された場合は、サポニン生合成遺伝子に何らかの変異があると考え、LC-PDA/MS/MS 分析データから得られる情報を詳細に検討し、どのような機能を持つ遺伝子が変異したのかを推定する。  
 (3) 遺伝子変異処理を施した大豆系統の種子サポニン組成を LC-PDA/MS/MS 分析することで、サポニン生合成遺伝子に変異があると考えられる系統が探索できる。この変異系統は基本的に人口交配が可能であり、サポニン生合成に関する各種変異の組合せにより、任意のサポニンを高濃度で蓄積する大豆品種の育成が可能となる。  
 (4) 大豆サポニンの一部は、大豆加工食品の製造過程で化学構造が変化する。大豆加工食品から抽出したサポニンを LC-PDA/MS/MS 分析し、データベースと比較することで、化学構造が変化した未確認サポニンを探索できる。

4. 研究成果

(1) これまで、大豆サポニンの化学構造は、単離精製して機器分析 (HR-MS、IR、NMR 分析等) しないと決定できないと言われてきた。しかし、大豆サポニン生合成に関わる遺伝子や酵素の特性 (基質特異性など) の全容が明らかとなってきたことにより、大豆種子で観察される主要 36種類のサポニン (表1) の有無に関する遺伝的多様性は、サポニン生合成に関わる複数の遺伝子座に座乗する遺伝子の共優性、優性、劣性遺伝子の組み合わせでうまく説明できることを明らかにした。逆に、36種類のサポニンの中で鍵となる数種類の存否が分かれば、関与するサポニン生合成遺伝子の組み合わせが決定できることも明らかにした。これまで、36種類の主要サポニンのうち 20種類については、単離精製物の機器分析結果に基づき化学構造が決定されている。本研究により、それら以外の 16成分の化学構造は、単離精製や機器分析をすることなく、プロファイル解析 (LC-PDA/MS/MS データベースと遺伝情報とによる総合的判断) で決定できることが明らかとなった。

表1. 36種類の大豆サポニンの名称

C-3位結合糖鎖配列	3種類の基本骨格 (SS-A, B, E) と C-22位の化学構造の違い					
	SS-A			SS-B		SS-E
	Aa-series	Ab-series	A0-series	DDMP	Group-B	Group-E
	-Ara-acXyl	-Ara-acGlc	-Ara	-DDMP	-OH	=O
Glc-Gal-GlcUA-	Aa-αg	Ab-αg	A0-αg	DDMP-αg	B-αg	E-αg
Rham-Gal-GlcUA-	Aa-βg	Ab-βg	A0-βg	DDMP-βg	B-βg	E-βg
Gal-GlcUA-	Aa-γg	Ab-γg	A0-γg	DDMP-γg	B-γg	E-γg
Glc-Ara-GlcUA-	Aa-αa	Ab-αa	A0-αa	DDMP-αa	B-αa	E-αa
Rham-Ara-GlcUA-	Aa-βa	Ab-βa	A0-βa	DDMP-βa	B-βa	E-βa
Ara-GlcUA-	Aa-γa	Ab-γa	A0-γa	DDMP-γa	B-γa	E-γa

赤字の大豆サポニンの化学構造はNMR等の機器分析で決定された。

(2) 36 種類の大豆サポニンの LC-PDA/MS/MS 分析結果を詳細に解析し、化学構造と MS 及び MS/MS フラグメントパターン並びに大豆サポニン生合成遺伝子の組合せに関するデータベースを構築した。これにより、このデータベースで照合できない成分は化学構造が異なる大豆サポニンであること、並びにそのようなサポニンを蓄積する大豆はサポニン生合成遺伝子に変異があることが容易に判別できる。MS と MS/MS 分析データから、サポニンの基本骨格や結合糖鎖配列が異なる新規あるいは未確認大豆サポニンの化学構造を推定できる。そのため、そのような変化をもたらす変異遺伝子の機能も推定できる。

遺伝子変異処理を施した大豆 909 系統の種子サポニン組成を調べ、データベースと比較した結果、35 系統 (3.85%) がサポニン組成変異体で、それらの遺伝的多型は 7 カテゴリーに分類された。プロファイル解析の結果、サポニン基本骨格 C-3 位結合糖鎖に Gal を付加できないと考えられる新変異が 1 系統発見された。また、日本・中国・韓国の大豆とツルマメコレクションを調べた結果、中国に自生するツルマメ (*Glycine soja*) 3805 系統から、新規なサポニン組成を示す変異が 34 系統発見された。これら変異系統では通常の大豆サポニン生合成遺伝子とは別の遺伝子が発現し、新規サポニンを合成蓄積すると推定された。

このようにして、これまで不明であった大豆サポニン生合成に関与する各種遺伝子と酵素が明らかとなってきた (図 1)。

(3) 最近新たに発見された Sg-6 サポニン類 (既知サポニンが有する 3 種類の基本骨格 SS-A, SS-B, SS-E とは別の基本骨格を有する) について、プロファイル解析結果に基づいて推定化学構造を求め発表した。それら Sg-6 サポニンの化学構造は、その後、単離精製して機器分析で導かれた化学構造と完全に一致した。この結果は、プロファイル解析の手法は、36 種類の主要大豆サポニンとは化学構造が異なるものであっても、その化学構造推定に非常に有効な手段となることを強く示唆している。

(4) 新規化学構造を有する大豆サポニンの LC-PDA/MS/MS プロファイルデータベースが蓄積されてきたため、各種大豆加工食品で観察される未確認サポニンについても、それらの化学構造推定が可能となった。今後、加工処理条件等の違いによる原料大豆中のサポニンの化学構造変化を迫る見通しが得られた (Wanida 等, 2021)。

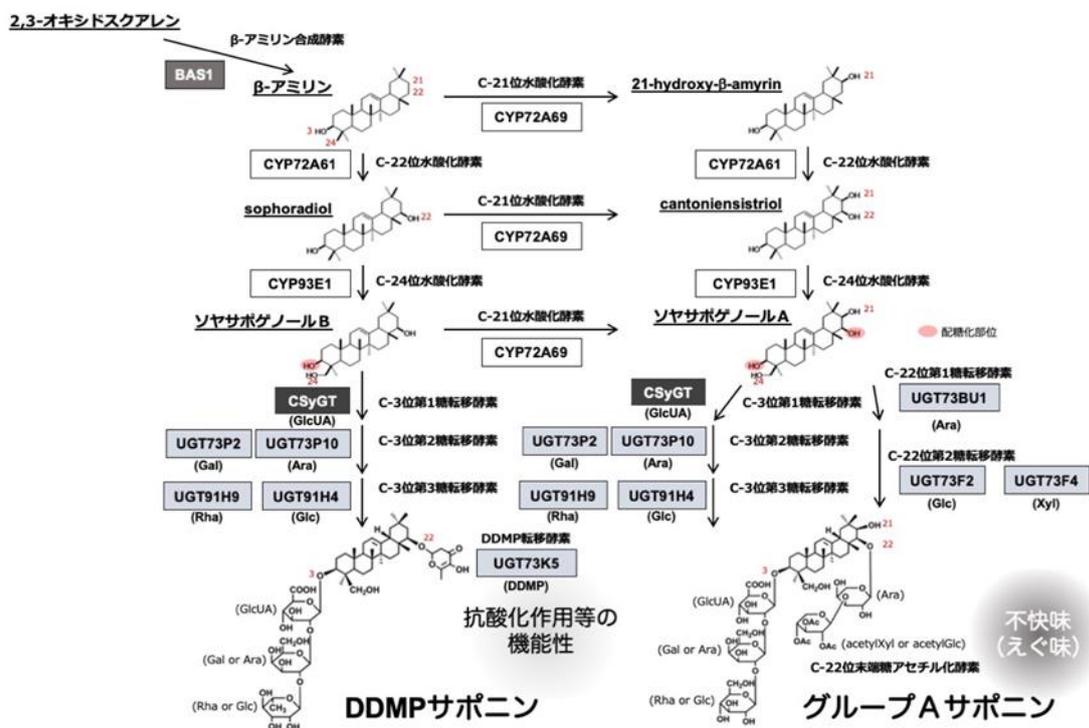


図 1. 大豆サポニン生合成経路とこれまでに明らかとなった関与酵素 (石本・塚本, 2020)

<引用文献>

1. Wanida T, Chitisanikul, Mei Itabashi, Haereon Son, Yuya Takahashi, Ayaka Ito, Warunee Varanyanond, Chigen Tsukamoto (2021). Soyasaponin composition complexities in soyfoods relating nutraceutical properties and undesirable taste characteristics. LWT-Food Science and Technology, 146: 111337.
2. 石本政男, 塚本知玄(2020). ダイズサポニンの生合成と機能. アグリバイオ, 4(11), 23-27.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 12件／うち国際共著 8件／うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Chitisankul Wanida T., Itabashi Mei, Son Haereon, Takahashi Yuya, Ito Ayaka, Varanyanond Warunee, Tsukamoto Chigen	4. 巻 146
2. 論文標題 Soyasaponin composition complexities in soyfoods relating nutraceutical properties and undesirable taste characteristics	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 LWT-Food Science and Technology	6. 最初と最後の頁 111337 (15ページ)
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.lwt.2021.111337	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 該当する
1. 著者名 石本政男、塚本知玄	4. 巻 4(12)
2. 論文標題 ダイズサポニンの生合成と機能	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 23-27
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 Krishnamurthy Panneerselvam, Tsukamoto Chigen, Ishimoto Masao	4. 巻 21
2. 論文標題 Reconstruction of the Evolutionary Histories of UGT Gene Superfamily in Legumes Clarifies the Functional Divergence of Duplicates in Specialized Metabolism	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1855 ~ 1855
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21051855	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 Sundaramoorthy Jagadeesh, Park Gyu Tae, Son Hae Reon, Tsukamoto Chigen, Lee Jeong-Dong, Seo Hak Soo, Song Jong Tae	4. 巻 59
2. 論文標題 Molecular Analysis of Two Novel Missense Mutations in the Sg-1 Gene Associated with Group A Saponin Biosynthesis in Soybean	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Crop Science	6. 最初と最後の頁 2634 ~ 2641
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2135/cropsci2019.06.0376	査読の有無 有
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 該当する

1. 著者名 Jagadeesh Sundaramoorthy, Sampathkumar Palanisamy, Gyu Tae Park, Hae Reon Son, Chigen Tsukamoto, Jeong-Dong Lee, Jeong Hoe Kim, Hak Soo Seo, Jong Tae Song	4. 巻 39
2. 論文標題 Characterization of a new sg-5 variant with reduced biosynthesis of group A saponins in soybean [Glycine max (L.) Merr.].	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Breeding	6. 最初と最後の頁 144
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11032-019-1066-4	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 該当する

1. 著者名 Krishnamurthy Panneerselvam, Fujisawa Yukiko, Takahashi Yuya, Abe Hanako, Yamane Kentaro, Mukaiyama Kyosuke, Son Hae-Reon, Hiraga Susumu, Kaga Akito, Anai Toyooki, Tsukamoto Chigen, Ishimoto Masao	4. 巻 0
2. 論文標題 High-Throughput Screening and Characterization of a High-Density Soybean Mutant Library Elucidate the Biosynthesis Pathway of Triterpenoid Saponins	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 1-16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcz025	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 Sundaramoorthy Jagadeesh, Park Gyu Tae, Komagamine Kumpei, Tsukamoto Chigen, Chang Jeong Ho, Lee Jeong Dong, Kim Jeong Hoe, Seo Hak Soo, Song Jong Tae	4. 巻 222
2. 論文標題 Biosynthesis of DDMP saponins in soybean is regulated by a distinct UDP glycosyltransferase	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 New Phytologist	6. 最初と最後の頁 261 ~ 274
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/nph.15588	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 該当する

1. 著者名 Takahashi Yuya, Li Xiang-Hua, Tsukamoto Chigen, Wang Ke-Jing	4. 巻 69
2. 論文標題 Phenotypic and genotypic signature of saponin chemical composition in Chinese wild soybean (Glycine soja): revealing genetic diversity, geographical variation and dispersal history of the species	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Crop and Pasture Science	6. 最初と最後の頁 1126
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1071/CP18214	査読の有無 有
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 該当する

1. 著者名 Takagi Kyoko, Yano Ryoichi, Tochigi Saeko, Fujisawa Yukiko, Tsuchinaga Hiroki, Takahashi Yuya, Takada Yoshitake, Kaga Akito, Anai Toyoaki, Tsukamoto Chigen, Seki Hikaru, Muranaka Toshiya, Ishimoto Masao	4. 巻 156
2. 論文標題 Genetic and functional characterization of Sg-4 glycosyltransferase involved in the formation of sugar chain structure at the C-3 position of soybean saponins	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Phytochemistry	6. 最初と最後の頁 96 ~ 105
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.phytochem.2018.09.002	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 Park Cheol Woo, Kulkarni Krishnanand P., Kim Minsu, Mukaiyama Kyosuke, Tsukamoto Chigen, Chung Gyuhwa, Song Jong Tae, Lee Jeong-Dong	4. 巻 214
2. 論文標題 Characterization of an EMS-induced soybean mutant with an increased content of Af saponin and a new component Ab- in the seed hypocotyl	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Euphytica	6. 最初と最後の頁 163
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10681-018-2242-z	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 該当する
1. 著者名 Takahashi Yuya, Li Xianghua, Tsukamoto Chigen, Wang Kejing	4. 巻 38
2. 論文標題 Allelic differentiation at the Sg-1 locus for the terminal sugar of the C-22 position of group A saponin in Chinese wild soybean ( <i>Glycine soja</i> Sieb. & Zucc.)	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Molecular Breeding	6. 最初と最後の頁 93
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11032-018-0851-9	査読の有無 有
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 該当する
1. 著者名 TSUKAMOTO Chigen, NAWAZ Muhammad Amjad, KUROSAKA Ayaka, LE Bao, LEE Jeong Dong, SON Eunho, YANG Seung Hwan, KURT Cemal, BALOCH Faheem Shehzad, CHUNG Gyuhwa	4. 巻 42
2. 論文標題 Isoflavone profile diversity in Korean wild soybeans ( <i>Glycine soja</i> Sieb. & Zucc.)	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 TURKISH JOURNAL OF AGRICULTURE AND FORESTRY	6. 最初と最後の頁 248 ~ 261
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3906/tar-1801-95	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 該当する

1. 著者名 Yano Ryoichi, Takagi Kyoko, Tochigi Saeko, Fujisawa Yukiko, Nomura Yuhta, Tsuchinaga Hiroki, Takahashi Yuya, Takada Yoshitake, Kaga Akito, Anai Toyoaki, Tsukamoto Chigen, Seki Hikaru, Muranaka Toshiya, Ishimoto Masao	4. 巻 59
2. 論文標題 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	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 797 ~ 810
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcy019	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 -

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Haereon Son, Genta Takahashi, Takehiro Mori, Minae Sasaki, Hiroki Muraoka, Susumu Hiraga, Masao Ishimoto and Chigen Tsukamoto
2. 発表標題 Structural elucidation of soybean saponins by LC-PDA/MS/MS profile analysis.
3. 学会等名 日本育種学会第139回講演会 (3月19-21日, 発表20日, P14-B, Web)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Panneerselvam Krishnamurthy, Ryoichi Yano, Saeko Tochigi, Kyoko Takagi, Yukiko Fujisawa, Chigen Tsukamoto and Masao Ishimoto
2. 発表標題 Reconstruction of the evolutionary histories of UGT gene superfamily clarifies the species-specific functional divergence of duplicates in specialized metabolism.
3. 学会等名 TERPNET 2019 -14th International Meeting on the Biosynthesis, Function and Synthetic Biology of Isoprenoids (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hae Reon Son, Kyosuke Mukaiyama and Chigen Tsukamoto
2. 発表標題 Relation between chemical structure and mass spectrum pattern of soyasaponins
3. 学会等名 2nd Food Chemistry Conference, P2.2.40. 17-19 September, Seville, Spain (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Chigen Tsukamoto, Hae Reon Son, Kumpei Komagamine, Kyosuke Mukaiyama, Jeong-Dong Lee and Jong Tae Song
2. 発表標題 Attempts for developing new soybeans which accumulate only group B saponins to enhance human health benefits
3. 学会等名 2nd Food Chemistry Conference, P.2.2.44. 17-19 September, Seville, Spain (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Panneerselvam Krishnamurthy, 藤澤由紀子, Soo-Yeon Chung, Hae-Reon Son, 下田宜司, 平賀 勸, 加賀秋人, 穴井豊昭, 塚本知玄, 關光, 村中俊哉, 石本政男
2. 発表標題 共発現解析に基づくダイズサポニン配糖化酵素の同定
3. 学会等名 日本育種学会第136回講演会 (9月6-7日, 発表6日401, 近畿大学)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Haereon Son, Yuya Takahashi, Hiroki Muraoka, Yukiko Fujisawa, Susumu Hiraga, Masao Ishimoto, Chigen Tsukamoto
2. 発表標題 Profile Analysis: New method to elucidate chemical structures of saponin in soybean
3. 学会等名 The International Conference on Research in Science, Engineering and Technology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山根健太郎, Son Haereon, 藤澤由紀子, 平賀 勸, 石本政男, 塚本知玄
2. 発表標題 マメ科モデル植物ミヤコグサのサポニン組成解析
3. 学会等名 第39回種子生理生化学研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 向山恭介, Son Haereon, 藤澤由紀子, 平賀 勸, 石本政男, 塚本知玄
2. 発表標題 LC-MSによるダイズサポニンプロファイル解析用データベースの構築
3. 学会等名 第39回種子生理生化学研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kumpei Komagamine, Kyosuke Mukaiyama, Haereon Son, Jong Tae Song, Jeong-Dong Lee, Chigen Tsukamoto
2. 発表標題 Relationship between saponin chemical structures and the interaction of two gene combination on sg-5/sg-9 allele
3. 学会等名 第39回種子生理生化学研究会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
韓国	韓国全南大学生命工学部	韓国慶北大学応用生物学部		
中国	中国農業科学院作物科学研究所			
タイ	カセットサート大学食品開発研究所			