

大豆サポニンの生理的役割の解明および付加価値の高い大豆品種の育種を目的としたグルクロン酸転移酵素の精製と性質の解明

白岩雅和*・黒澤康紀

茨城大学農学部

Purification and Characterization of Glucuronosyltransferase for the Elucidation of Physiological Role of Saponin in Soybean Plant and the Breeding of a Value-added Soybean Variety

Masakazu SHIRAIWA and Yasunori KUROSAWA

School of Agriculture, Ibaraki University, Ami-machi 300-0393

ABSTRACT

We solubilized and purified microsomal glucuronosyltransferase from soybean, and elucidated its enzymatic properties. A microsome fraction was isolated from germinating soybean seed and treated with various detergents to solubilize the enzyme. The enzyme activity was monitored throughout purification using [¹⁴C]-UDP GlcA and soyasapogenol B as substrates. Purification of glucuronosyltransferase was achieved by HiTrap Q, Superdex 200, HiTrap Blue chromatography procedures. This resulted in an enrichment >130-fold relative to the starting homogenate. Purified enzyme was found to require cation for activity. Studies of the substrate specificity of the purified enzyme demonstrated that the specificity for the sugar residue transferred was very high, as no activity was found when UDP-GlcA was replaced by other UDP sugars:UDP-Glc and UDP-Gal. Soyasapogenols which are aglycone of soybean saponin are usable acceptors but glycyrrhetic acid or flavonone is not. These findings suggest that this glucuronosyltransferase was a specific enzyme for UDP-GlcA as donor and soyasapogenols as acceptor, and it was related to biosynthesis of the sugar chain in soybean saponin. This study provides a basis for molecular characterization of key enzyme in saponin biosynthesis in soybean. The isolation of the gene may enable its use in the elucidation of the biosynthesis and physiological role of saponins in soybean. *Soy Protein Research, Japan* 4, 1-10, 2001.

Key words : soybean, saponin biosynthesis, glucuronosyltransferase

*〒 300-0393 茨城県稲敷郡阿見町中央 3-21-1

大豆種子には、多くの種類のサポニンが存在し¹⁻⁹⁾、これらは様々な薬理活性を有する¹⁰⁻¹³⁾一方、大豆食品の不快味の原因物質でもあること¹⁴⁾が報告されている。しかし、大豆におけるサポニンの生合成経路および生理的役割については全く不明である。これらのサポニン成分の大豆における生理的役割を解明するためには、まず化合物の生合成反応系列の大綱を明らかにし、次に各段階の酵素的証明を行って生合成の全貌を確定し、続いて代謝の調節・制御の解明を行う手順が必要である。現在著者らは、化合物側からの大豆サポニンの生合成反応系列に関する予測をしているが、サポニンの生合成系に関する酵素群については、全く未知である。これらサポニンの生合成酵素群の機能を遺伝子工学的手法を用いてコントロールし、サポニンの生合成を制御することが可能になれば、大豆におけるサポニンの生理機能を解明でき、それに伴い食品機能性および低不快味の観点から食糧資源としての大豆の付加価値を向上させることが期待できる。大豆サポニンは、アグリコン（非糖部）の構造によって4つのグループ（A, B, E, および DDMP グループ）に分類でき、すべてのグループのサポニンが多種多様な糖鎖構造を有する一方で、全てのサポニンにおいて糖鎖生合成の起点となると推測されるアグリコンのC-3位に結合する糖がグルクロン酸であるという構造的特徴をもっている（Fig. 1）。

そこで本研究では、大豆植物体におけるサポニンの生理的役割の解明および付加価値の高い大豆品種の育種を目的とする研究の一環として、大豆サポニンの糖鎖生合成の key enzyme と推測されるグルクロン酸転移酵素に注目し、同酵素を精製するとともに、その性質を明らかにすることを目的とした。

方 法

植物材料

プランターに水を含んだバーミキュライト（バーミキュライト：水＝1：2，w/v）を約10 cmの厚さに敷き、大豆種子（品種：エンレイ）を胚軸が下を向くように並べ、同様に水を含んだバーミキュライトを薄く重層した。明期（16時間）においては気温25℃、湿度70%、暗期（8時間）においては気温20℃、湿度65%の条件下で約2週間栽培した。発芽大豆をその生長に応じて5段階（Fig. 2A）に分け、液体窒素で凍結させ、使用するまで－80℃のストッカー中で保存した。

酵素活性測定

糖受容体として50 μ M soyasapogenol B、糖供与体

として1.85 kBq UDP-[¹⁴C]-D-glucuronic acid、10 mM MgCl₂および精製各段階の酵素液からなる混合液を40℃、60分間インキュベートした。反応液に1N HClとブタノールを加え、攪拌することによって反応を停止した後、ブタノール層をTLCに供し、クロロホルム：メタノール：水＝65：35：10（v/v、下層）によって展開し、酵素反応によって生成したsoyasapogenol B-3-O-glucuronideのRI活性をAMBIS 4000によって算出し、グルクロン酸転移活性を測定した。なお、精製酵素の性質については、上記の活性測定法を基本にして、反応pH、反応温度、金属イオンの有無、糖供与体および糖受容体の種類などをかえて酵素活性を測定することによって解析した。

酵素の抽出と可溶性化

生長初期段階（Fig. 2A, stage 2）の大豆（子葉を除去したもの）を液体窒素中で粉碎し、3倍量のBuffer A（100 mM Tris-HCl（pH 8.0）、14 mM 2-ME、5 mM EDTA、1 mM PMSF）によって抽出し、遠心分離（8,000 $\times g$ 、5 min）後、上清を遠心分離（143,000 $\times g$ 、70 min）し、上清と沈澱（ミクロソーム画分）に分けた。ミクロソーム画分にBuffer B（CMC濃度の各種界面活性剤を含む10 mM Tris-HCl（pH 8.0）、5%（v/v）glycerol）を加えて酵素を可溶性化し、酵素の可溶性化に及ぼす各種界面活性剤の影響を比較した。

酵素の精製

可溶性化した酵素画分を種々のカラム（HiTrap Q, Superdex 200, HiTrap Blue, HiTrap HIC, Mono P, UDP-ヘキサノールアミンアフィニティー、UDP-グルクロン酸アフィニティークロマトグラフィー）に供し、それぞれのカラムにおける最適溶出条件を検討した。このうち精製に有効だった3つカラムを選択し、以下の溶出条件で精製を行った。

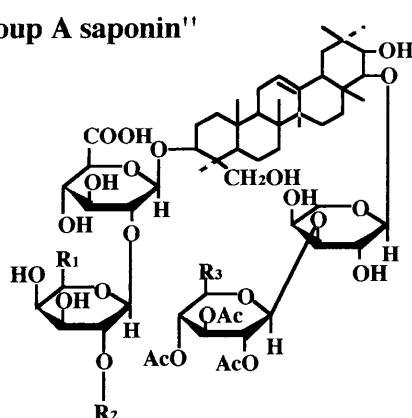
【HiTrap Q】Buffer B'（10 mM Tris-HCl（pH 8.0）、5%（v/v）glycerol、4 mM CHAPS）で可溶性化した酵素画分をBuffer B'で平衡化したカラムに供し、250 mM NaClを含むBuffer B'で洗浄した後、1 M NaClを含むBuffer B'で1 mL/minの流速で溶出した。

【Superdex 200（1st）】HiTrap Qからの酵素活性画分を150 mM NaClを含むBuffer B'で平衡化したカラムに供し、0.2 mL/minの流速で溶出し、0.4 mLずつ分画した。

【HiTrap Blue】Superdex 200（1st）からの酵素活性画分を20 mM MgCl₂を含むBuffer B'で平衡化したカラムに供し、Buffer B'で洗浄した後、2 M NaClを含むBuffer B'で0.5 mL/minの流速で溶出した。

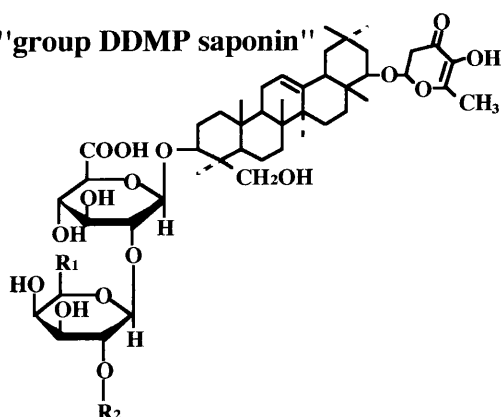
【Superdex 200（2nd）】HiTrap Blueからの酵素活性

"group A saponin"



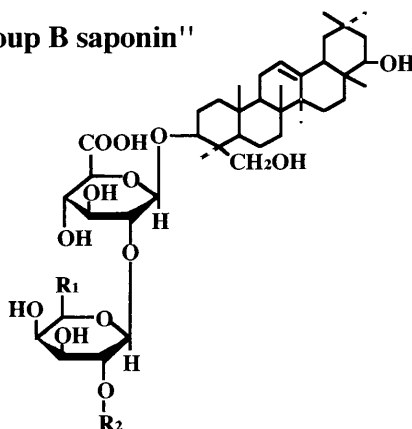
	R ₁	R ₂	R ₃
Soybean Saponin Aa	CH ₂ OH	β-D-glc	H
Soybean Saponin Ab	CH ₂ OH	β-D-glc	CH ₂ OAc
Soybean Saponin Ac	CH ₂ OH	α-L-rham	CH ₂ OAc
Soybean Saponin Ad	H	β-D-glc	CH ₂ OAc
Soybean Saponin Ae	CH ₂ OH	H	H
Soybean Saponin Af	CH ₂ OH	H	CH ₂ OAc
Soybean Saponin Ag	H	H	H
Soybean Saponin Ah	H	H	CH ₂ OAc

"group DDMP saponin"



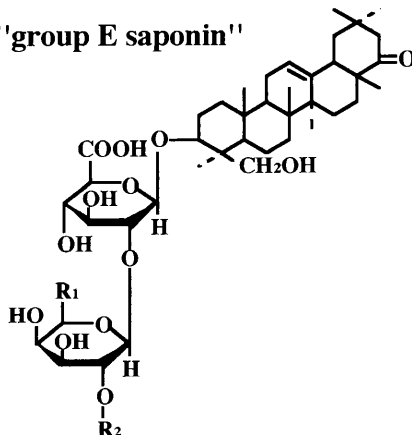
	R ₁	R ₂
Soyasaponin αg	CH ₂ OH	β-D-glc
Soyasaponin βg	CH ₂ OH	α-L-rham
Soyasaponin βa	H	α-L-rham
Soyasaponin γg	CH ₂ OH	H
Soyasaponin γa	H	H

"group B saponin"



	R ₁	R ₂
Soybean Saponin Ba	CH ₂ OH	β-D-glc
Soybean Saponin Bb	CH ₂ OH	α-L-rham
Soybean Saponin Bb'	CH ₂ OH	H
Soybean Saponin Bc	H	α-L-rham
Soybean Saponin Bc'	H	H

"group E saponin"



	R ₁	R ₂
Soybean Saponin Bd	CH ₂ OH	β-D-glc
Soybean Saponin Be	CH ₂ OH	α-L-rham

Fig. 1. Structures of saponins in soybean seeds. Isolation and structural characterization of various saponins in soybeans have been reported by many researchers¹⁻⁹⁾. Some of the above soybean saponins have sometimes been called the following names: soybean saponin Aa=acetyl-soyasaponin A4; soybean saponin Ab=acetyl-soyasaponin A1; soybean saponin Ae=acetyl-soyasaponin A5; soybean saponin Af=acetyl-soyasaponin A2; soybean saponin Ag=acetyl-soyasaponin A6; soybean saponin Ah=acetyl-soyasaponin A3; soybean saponin Ba=soyasaponin V; soybean saponin Bb=soyasaponin I; soybean saponin Bb'=soyasaponin III; soybean saponin Bc=soyasaponin II; soybean saponin Bc'=soyasaponin IV.

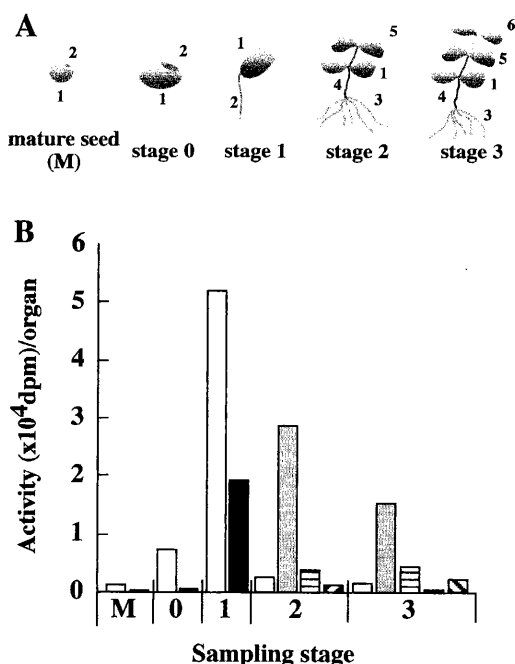


Fig. 2. Distributions of glucuronosyltransferase activity in soybeans during the germination and early development stages. **A**, Sampling stages of soybean plant. Germination and development stages were classified into five stages. The enzyme proteins were prepared from plant organs as shown in drawing **A**. 1, cotyledon; 2, hypocotyl; 3, root; 4, stem; 5, first leaf; 6, second leaf. **B**, Distributions of glucuronosyltransferase activity. Enzyme activity was estimated as described in "Materials and Methods." Legend as follows: □, cotyledon; ■, hypocotyl; ▨, root; ▤, stem; ▧, first leaf; ▩, second leaf. Each data point represents the average value from two independent experiments.

画分を 150 mM NaCl を含む Buffer B' で平衡化したカラムに供し、0.2 mL/min の流速で溶出し、0.4 mL ずつ分画した。

結 果

大豆植物体におけるグルクロン酸転移酵素の分布

効率的な酵素精製を行うために、まず大豆植物体における酵素の分布について検討した。発芽大豆をその生長に応じて 5 段階 (Fig. 2A) に分け、部位毎に酵素活性を測定した結果、発芽時 (stage 1) の子葉と生長初期段階 (stage 2) の根に酵素活性が多く分布してい

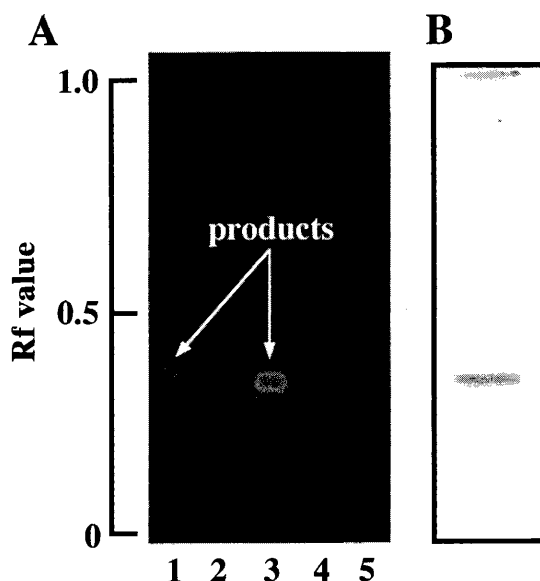


Fig. 3. Autoradiogram of glucuronosyltransferase assay in the germinating soybean seeds. **A**, TLC patterns of enzyme products. Each enzyme fraction was incubated at 40°C for 1 h and an aliquot of the butanol extract from the reaction mixture was separated by TLC as described in "Materials and Methods". Lane 1, extract from germinating soybean seeds and soyasapogenol B added; lane 2, supernatant of ultracentrifugation of the extract and soyasapogenol B added; lane 3, precipitate (microsome fraction) of ultracentrifugation of the extract and soyasapogenol B added; lane 4, only precipitate (microsome fraction) of ultracentrifugation of the extract added (without soyasapogenol B added); lane 5, precipitate (microsome fraction) of ultracentrifugation of the extract inactivated by boiling for 3 min and soyasapogenol B added. **B**, soyasapogenol B-3-O-b-glucuronide standard.

ることが明らかとなった (Fig. 2B)。子葉は脂質成分を多く含むために、酵素抽出の際、取扱が煩雑になることを考慮し、stage 2 の子葉以外の部分から酵素を抽出することにした。

グルクロン酸転移酵素の抽出と可溶化

生長初期段階の大豆 (stage 2 の子葉を除去したもの) を液体窒素中で粉碎し、3 倍量の Buffer A によって抽出し、遠心分離後、上清を遠心分離し、上清と沈澱 (ミクロソーム画分) に分け、それぞれの酵素活性を測定した結果、酵素活性はミクロソーム画分に分布

していることが明らかとなった (Fig. 3A). そこでまず, 15 種類の界面活性剤を用いて, その CMC 濃度において酵素の可溶化率を比較した結果, 本酵素を効果的に可溶化する界面活性剤として 3 つの界面活性剤 (MEGA-10, SM-1000, CHAPS) を選抜した (Fig. 4A). さらに濃度を変えて可溶化条件を検討した結果, 4 mM の CHAPS で酵素を最も効果的に可溶化することができた (Fig. 4B).

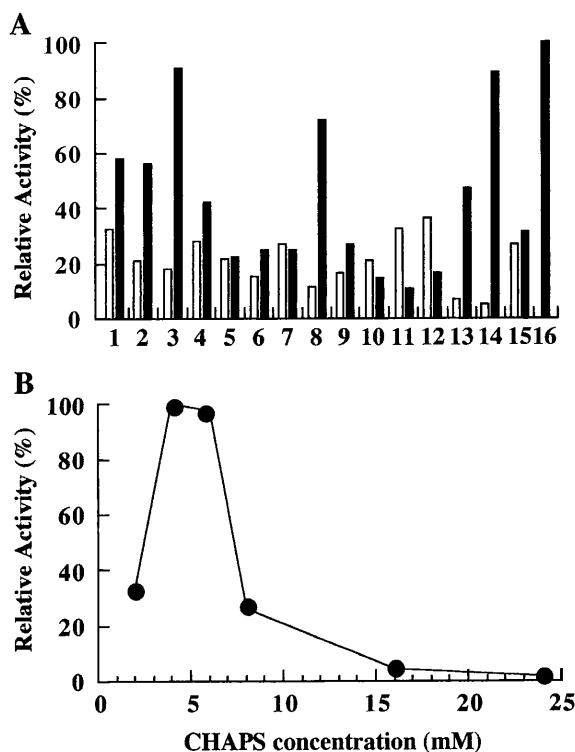


Fig.4. Solubilization of glucuronosyltransferase with various detergents. A, Effects of various detergents on solubilization of glucuronosyltransferase from membrane. 1, CHAPS; 2, CHAPSO; 3, BIGCHAP; 4, deoxy-BIGCHAP; 5, n-Octyl- β -D-glucoside; 6, n-Octyl- β -D-thioglucoside; 7, n-Heptyl- β -D-thioglucoside; 8, n-Dodecyl- β -D-maitoside; 9, MEGA-8; 10, MEGA-9; 11, MEGA-10; 12, SM-1000; 13, SM-1200; 14, Sodium cholate; 15, Digitonin; 16, suspension without detergent. □, supernatant; ■, precipitate. The activity measured against suspension without detergent was fixed at 100. B, Effect of CHAPS concentration on solubilization of glucuronosyltransferase from membrane. The maximum activity measured with 4 mM CHAPS was fixed to 100.

グルクロン酸転移酵素の精製

可溶化した酵素画分を種々のカラムに供し, 溶出条件などの種々の検討を行った. 陰イオン交換カラム, 色素をリガンドとした HiTrap Blue カラム, ゲル濾過, 疎水カラムは有効な分離を示したが, 多くの糖転移酵素の精製に用いられている UDP-ヘキサノールアミン, UDP-グルクロン酸アフィニティークロマトグラフィーおよび等電点クロマトグラフィーは本酵素の精製には有効ではなかった. これらの結果を基に, HiTrap Q 陰イオン交換カラム→Superdex 200 ゲル濾過カラム (1 回目)→HiTrap Blue 色素カラム→Superdex 200 ゲル濾過 (2 回目) の精製ステップにより, 抽出液に対して 138 倍まで精製できた (Table 1). また, Superdex 200 ゲル濾過 (2 回目) からの溶出画分の SDS-PAGE の結果, 銀染色レベルで二つのたん白質バンド (約 62 kDa と約 58 kDa) まで精製されていることが明らかとなった (Fig. 5A). このたん白質バンドの溶出パターン (Fig. 5A) と溶出画分の酵素活性 (Fig. 5B) の比較より, 62 kDa のバンドが本酵素と推測した. しかし, 62 kDa のたん白質バンドの濃さと酵素活性強度が相関しなかったため, Superdex 200 ゲル濾過 (2 回目) によって分離された酵素活性画分を集め, さらに二次元電気泳動に供した. その結果, 62 kDa のたん白質バンドは等電点と分子量が僅かに異なる 2 つの成分の混合物であることが明らかとなった (Fig. 5C, No. 1, 2)

グルクロン酸転移酵素の性質の解明

上記の精製酵素を用いて, その性質について検討した. まず, 本酵素の活性に及ぼす pH と温度の影響を調べた結果, 至適 pH は 8.0 (Fig. 6A), 至適温度は 40 °C (Fig. 6B) であることがわかった. また, 酵素活性発現には Mg^{2+} , Mn^{2+} などの二価のカチオンが必要であることが明らかになった (Fig. 6C). 本酵素は UDP-グルコースや UDP-ガラクトースを糖供与体とせず, UDP-グルクロン酸から GluA のみを転移した. さらに, 本酵素は大豆サポニンのアグリコンである soyaapogenol A, B, E に対しては活性を示したが, 同じトリテルペンで甘草にそのグルクロン酸配糖体が存在するグリチルレチン酸やフラボノイドでライ麦にそのグルクロン酸配糖体が存在するルテオリンにはグルクロン酸を転移しなかった (Fig. 7). この基質特異性から, 本酵素が大豆サポニンのアグリコンに高い特異性を持つ糖転移酵素であることが明らかとなった.

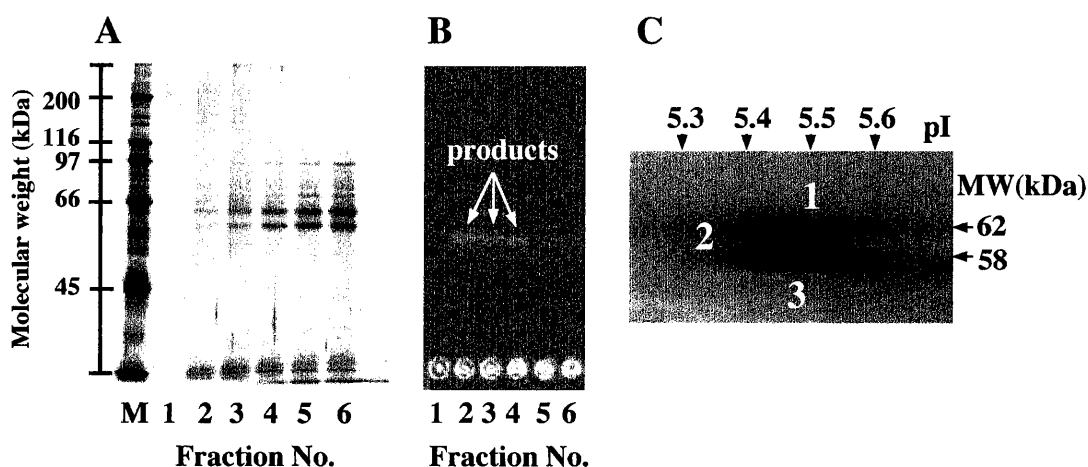


Fig. 5. Enzyme activity and of PAGE pattern of fractions eluted from superdex 200 (2nd). **A**, SDS-PAGE pattern of fractions eluted from superdex 200 (2nd). **B**, Enzyme activity fractions eluted from superdex 200 (2nd). **C**, 2D-PAGE pattern of fraction eluted from superdex 200 (2nd).

Table 1. Purification of glucuronosyltransferase from germinating soybean

Measurement	Total protein (mg)	Total activity (pmol/min)	Specific activity (pmol/min/mg protein)	Recovery (%)	Purification (-fold)
Crude extract	1272.7	433.2	0.3	100	1
Solubilized micrisome fraction	44.9	112.9	2.5	26.1	8.3
HiTrap Q	4.00	33.4	8.4	7.7	28.0
Superdex 200(1st)	0.95	5.4	5.7	1.3	19.0
HiTrap Blue	0.11	2.3	20.9	0.53	69.7
Superdex 200(2nd)	0.13	0.54	41.5	0.13	138.3

考 察

植物には種々のグルクロナイドサポニンが存在し、これらの成分が様々な薬理活性を示すことが報告されている。しかし、これらのサポニンの生合成に関与するグルクロン酸転移酵素に関する報告は極めて少ない。Wojciechowski¹⁵⁾が *Calendula officinalis* から、Hayashi¹⁶⁾が licorice の培養細胞からグルクロン酸転移酵素活性を検出したことを報告しているだけである。著者らは、本研究において発芽大豆種子からグルクロン酸転移酵素活性酵素を精製し、その性質（至適 pH, 至適温度, 金属要求性, 基質特異性）を解析した。それらの結果から、本酵素が上述の2つのグルクロン酸転

移酵素とは異なる新規な酵素であることと、大豆におけるサポニンの生合成に関与する糖転移酵素であることが示唆された。また、本研究で明らかにした大豆発芽時における本酵素活性の器官分布や経時的変動と以前の研究で明らかにした本酵素の産物である各種サポニンやその生合成中間体の分布・変動の両者の知見から、Fig. 8 に示したようなサポニン生合成経路が推測され、本酵素がその生合成経路の中心的役割をしていることが示唆された。さらに、本酵素はトリテルペンにグルクロン酸を転移する酵素として植物からはじめて精製された酵素であり、今後、この遺伝子を単離し、遺伝子工学的手法を用いてサポニンの生合成を制御することによって、大豆におけるサポニンの生理機能が解明されることが期待される。

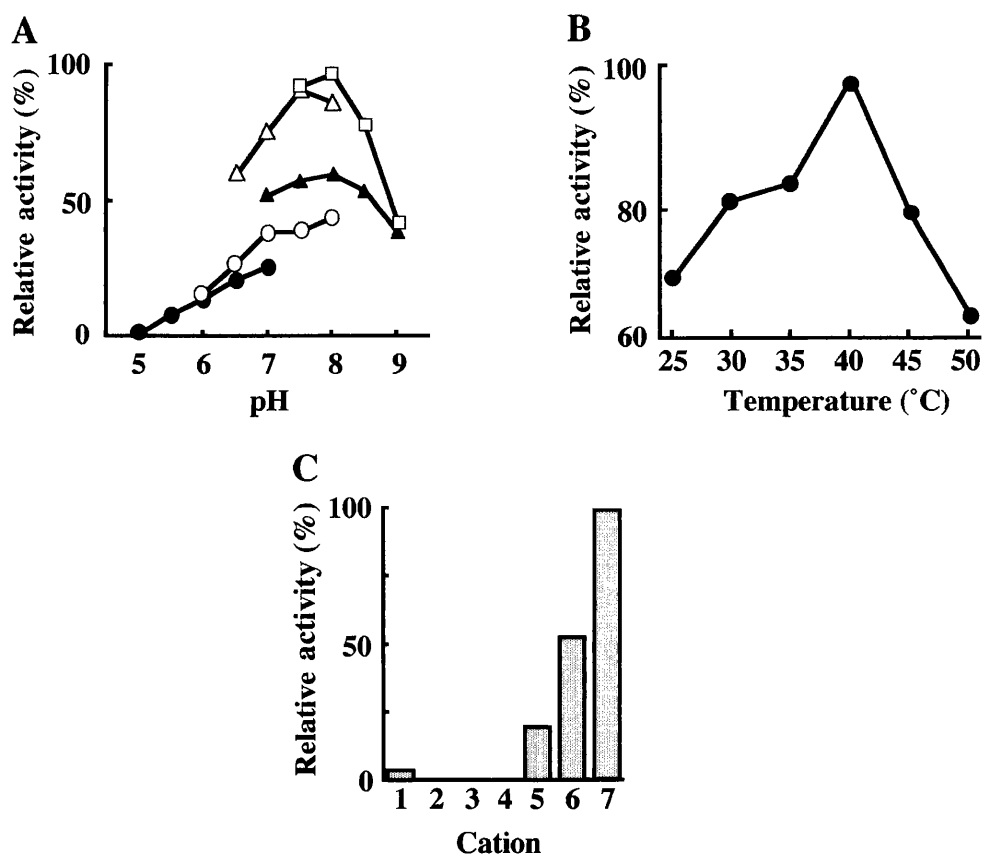


Fig. 6. Effects of pH, temperature, and cations on glucuronosyltransferase activity. **A**, Effect of pH on enzyme activity. Legend as follows: ○, MOPS-NaOH buffer; ●, MES-NaOH buffer; △, HEPES-NaOH buffer; ▲, Tris-HCl buffer; □, Bicine-NaOH buffer. **B**, Effect of temperature on enzyme activity. **C**, Effect of cations on enzyme activity. Lane 1, nothing added; lane 2, 1 mM EDTA added; lane 3, 1 mM EDTA and 10 mM K⁺ added; lane 4, 1 mM EDTA and 10 mM Na⁺ added; lane 5, 1 mM EDTA and 10 mM Ca²⁺ added; lane 6, 1 mM EDTA and 10 mM Mn²⁺ added; lane 7, 1 mM EDTA and 10 mM Mg²⁺ added.

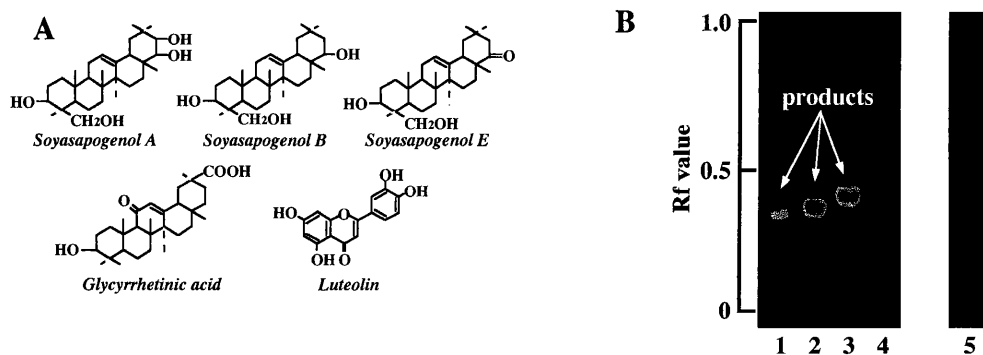


Fig. 7. Acceptor specificity of glucuronosyltransferase. **A**, Structures of substrates used as acceptors. **B**, TLC pattern of reaction mixture. Lane 1, soyasapogenol A added; lane 2, soyasapogenol B added; lane 3, soyasapogenol E added; lane 4, glycyrrhetic acid added; lane 5, luteolin added.

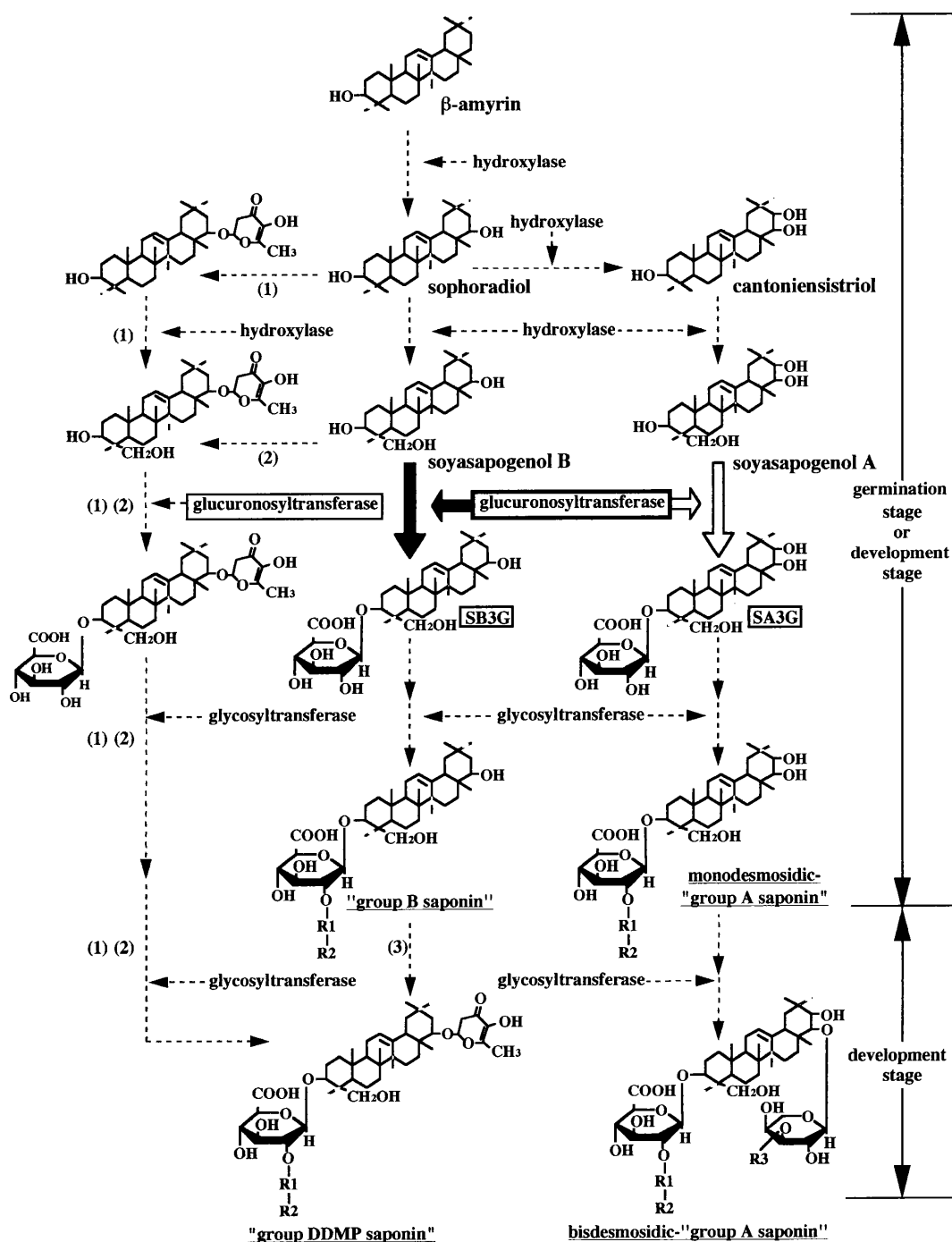


Fig. 8. Proposed pathway of saponin biosynthesis in soybeans. The glucuronidation steps found in this study are shown with solid arrows. The pathway with a direct relation between enzyme activity *in vitro* and saponin contents is shown with a closed solid arrow. The pathway in which only enzyme activity *in vitro* have been demonstrated is shown with an open solid arrow. Proposed pathways are shown with dashed arrows. Three proposed pathways of the biosynthesis of group DDMP saponins are shown with (1), (2), and (3). R1, β -D-galactopyranosyl or α -L-arabinopyranosyl; R2, β -D-glucopyranosyl, α -L-rhamnopyranosyl, or hydrogen; R3, 2, 3, 4, 6-tetra-O-acetyl- β -D-glucopyranosyl, 2, 3, 4-tri-O-acetyl- α -D-xylopyranosyl, or hydrogen.

要 約

本研究では、大豆植物体におけるサポニンの生理的役割の解明および付加価値の高い大豆品種の育種を目的とする研究の一環として、大豆サポニンの糖鎖生合成の key enzyme と推測されるグルクロン酸転移酵素を精製し、その性質を明らかにした。まず発芽大豆から調製した粗酵素画分を超速心分離により沈澱（ミクロソーム画分）と上清に分け、それぞれの画分の酵素活性を測定した結果、同酵素はミクロソーム画分に存在することがわかった。そこで、15 種類の界面活性剤を用いて、酵素の可溶化の条件を検討し、4mM の CHAPS で同酵素を効果的に可溶化することができた。続いて可溶化酵素液を種々のカラムに供し、溶出条件などの検討を行った結果を基に、HiTrap Q 陰イオン交換カラム→Superdex 200 ゲル濾過カラム→HiTrap Blue 色素カラム→Superdex 200 ゲル濾過カラムの精製ステップにより SDS-PAGE 上（銀染色）で二つのたん白質バンド（約 62 kDa と約 58 kDa）まで精製できた。本酵素は、至適 pH が 8.0、至適温度が 40℃ であり、二価のカチオン要求性であった。さらに本酵素の基質特異性を調べた結果、糖供与体として UDP-GlcA、糖受容体として soyasapogenol のみを基質とすることが明らかとなった。これらの結果から、本酵素は大豆においてサポニンの生合成にのみ関与する新規な糖転移酵素であることが示唆された。

文 献

- 1) Kitagawa I, Wang HK, Taniyama T and Yoshikawa M (1988) : Saponin and sapogenol XLI. Reinvestigation of the structures of soyasapogenol A, B, and E, oleanene-sapogenols from soybean. Structures of soyasaponins I, II, and III. *Chem Pharm Bull*, **36**, 153-161.
- 2) Kitagawa I, Taniyama T, Nagahama Y, Okubo K, Yamauchi F and Yoshikawa M (1988) : Saponin and sapogenol XLII. Structures of acetyl-soyasaponins A1, A2, and A3, astringent partially acetylated bisdesmosides of soyasapogenol A, from american soybean, the seeds of *Glycine max* MERRILL. *Chem Pharm Bull*, **36**, 2819-2828.
- 3) Taniyama T, Yoshikawa M and Kitagawa I (1988): Saponin and sapogenol. XLIV. Soyasaponin composition in soybeans of various origins and soyasaponin content in various organs of soybean. Structure of soyasaponin V from soybean hypocotyl. *Yakugaku Zasshi*, **108**, 562-571.
- 4) Taniyama T, Nagahama Y, Yoshikawa M and Kitagawa I (1988) : Saponin and sapogenol XLIII. Acetyl-soyasaponins A⁴, A⁵, and A⁶, new astringent bisdesmosides of soyasapogenol A, from Japanese soybean, the seeds of *Glycine max* MERRILL. *Chem Pharm Bull*, **36**, 2829-2839.
- 5) Burrows JC, Price KR and Fenwick GR (1987): Soyasaponin IV, an additional monodesmosidic saponin isolated from soybean. *Phytochemistry*, **26**, 1214-1215.
- 6) Shiraiwa M, Kudo S, Shimoyamada M, Harada K and Okubo K (1991) : Composition and structure of "group A saponin" in soybean seed. *Agric Biol Chem*, **55**, 315-322.
- 7) Shiraiwa M, Harada K and K and Okubo (1991): Composition and structure of "group B saponin" in soybean seed. *Agric Biol Chem*, **55**, 911-917.
- 8) Kudo S, Tonomura M, Tsukamoto C, Shimoyamada M, Uchida T and Okubo K (1992) : Isolation and structural elucidation of the major genuine soybean saponin. *Biosci Biotech Biochem*, **56**, 142-143.
- 9) Kudo S, Tonomura M, Tsukamoto C, Uchida T, Sakabe T, Tamura N and Okubo K (1993) : Isolation and structural elucidation of DDMP-conjugated soyasaponins as genuine saponins from soybean seeds. *Biosci Biotech Biochem*, **57**, 546-550.
- 10) Shiraiwa M, Nakashima H, Yamamoto N,

- Tamura T, Matsuda S and Okubo K (1991) : Soybean saponin ; Structure and physiological properties, especially antiviral activity on HIV *in vitro*. *International Conference of Soybean Processing and Utilization Proceeding*, 95-101.
- 11) Hayashi K, Hayashi H, Hiraoka N and Ikeshiro Y (1997) : Inhibitory activity of soyasaponin II on virus replication *in vitro*. *Planta Medica*, **63**, 102-105.
 - 12) Kinjo J, Imagire M, Udayama M, Arao T and Nohara T (1998) : Structure-hepatoprotective relationships study of soyasaponins I-IV having soyasapogenol B as aglycone. *Planta Medica*, **64**, 233-236.
 - 13) Yoshiki Y and Okubo K (1998) : Relationship between chemical structures and biological activities of triterpenoid saponins from soybean. *Biosci Biotech Biochem*, **62**, 2291-2299.
 - 14) Okubo K, Iijima M, Kobayashi Y, Yoshikoshi M, Uchida T and Kudou S (1992) : Components responsible for the undesirable taste of soybean seeds. *Biosci Biotech Biochem*, **56**, 99-103.
 - 15) Wojciechowski ZA (1975) : Biosynthesis of oleanolic acid glycosides by subcellular fractions of *Calendula officinalis* seedlings. *Phytochemistry*, **14**, 1749-1753.
 - 16) Hayashi H, Hanaoka S, Tanaka S, Fukui H and Tabata M (1993) : Glycyrrhetic acid 24-hydroxylase activity in microsomes of cultured licorice cells. *Phytochemistry*, **34**, 1303-1307.