

低不快味大豆育種を目的とした大豆サポニン生合成酵素に関する研究

白岩雅和*・安田一美

茨城大学農学部

Studies on Biosynthetic Enzymes of Soybean Saponins for the Breeding of Low Unpleasant taste Soybean Variety

Masakazu SHIRAIWA and Kazumi YASUDA

School of Agriculture, Ibaraki University, Ibaraki 300-0393

ABSTRACT

Group-A and -DDMP saponins exist in the soybean seed as intact saponins. While group-A saponin is the main cause of the unpleasant taste of the soybean, the group-DDMP saponin has various medicinal properties. Therefore, it is thought that the elucidation of characteristics of the enzymes which catalyze biosynthetic reaction of saponins will be useful toward the breeding of the value-added soybean variety in the future. In this research, we have characterized the glucuronosyltransferase and hydroxylase which is the key enzyme of group-A saponin biosynthesis. The substrate specificity of glucuronosyltransferase for each aglycon of group-A and -DDMP saponins changed with metal, reaction temperature and pH. The possibility that by controlling the cultivation conditions of soybeans based on the characteristics of this enzyme, the composition of group-A and -DDMP saponins in an soybean seed might be controlled, is suggested. Furthermore, we searched for the catalytic enzyme in the biosynthetic pathway which could stop only the biosynthesis of group-A saponin. Instead, we found a new hydroxylase, and characterized it. The finding of this hydroxylase has enabled us to depress biosynthesis of group-A saponin and raise biosynthesis of group-DDMP saponin relatively. The result is considered to contribute to development of low unpleasant taste and high functional soybean variety. *Soy Protein Research, Japan* **7**, 32-41, 2004.

Key words : soybean, saponin biosynthesis, glucuronosyltransferase, hydroxylase

大豆はたん白質生産性、栄養価ともに優れた食糧資源であるが、苦味・収斂味といった不快味を示すために、量的摂取が妨げられていると考えられている。大

久保らは、大豆のこれらの不快味が主に大豆に含まれるサポニンによるものであることを報告している¹⁾。一方、大豆サポニンは、様々な薬理作用（抗脂血²⁾、抗酸化²⁾、抗コレステロール²⁾、抗トロンピン²⁾、肝機

*〒300-0393 茨城県稲敷郡阿見町中央3-21-1

能障害の改善³、抗腫瘍活性⁴、抗HIV活性^{5,6}、SOD様活性⁷など)を示し、現在大変注目されている成分である。したがって、これらのサポニンの生合成酵素群の機能を人為的にコントロールし、サポニンの生合成を大豆植物体中で制御することが可能になれば、低不快感および食品機能性の観点から食糧資源としての大豆の付加価値を大いに向上させるものと期待される。著者らは、現在までにこれらのサポニン成分の簡便な分析法および単離法を確立し、その構造^{8,9}、大豆品種間における種類および含量の差異¹⁰、遺伝性¹¹などを明らかにしてきた。さらに、サポニン生合成を制御した付加価値の高い大豆品種の育種という目標を掲げ、その第一段階としてすべてのサポニンの生合成に共通に関与し、サポニン生合成の中心酵素と推測されるグルクロン酸転移酵素を発芽大豆から精製し、その酵素化学的性質を明らかにした^{12,13}。本研究課題では、サポニンの中でも最も不快感が強い「Aグループサポニン」⁸の生合成のkey enzymeと推測されるグルクロン酸転移酵素およびヒドロキシラーゼ (Fig. 1) を登熟期大豆種子から検索し、さらにその酵素化学的性質を明らかにすることにより、大豆の不快感の主要因物質である「Aグループサポニン」が欠失し、様々な薬理作用を有する「DDMPグループサポニン」^{14,15}が高発現した低不快感・高機能性大豆育種に向けての基礎を築くことを目的とした。

方 法

植物材料

大豆種子 (品種:エンレイ) は畑地に株間30 cm, 1株2粒ずつ播種した。大豆開花後、登熟各段階に到達した大豆種子を順次液体窒素で凍結させ、-80℃のストッカーで保存した。登熟大豆のステージは、Fehrらの方法¹⁶に従い、以下の4段階とした。

- ①大豆種子の長さが3 mmの種子の出来始めの時期 (Reproductive stage 5, 以下R5と略す)
- ②緑色の大豆種子が莢に満たされた時期 (Reproductive stage 6, 以下R6と略す)
- ③大豆種子が熟し始めて薄く黄色を帯びた時期 (Reproductive stage 7, 以下R7と略す)
- ④大豆種子が完熟した時期 (Reproductive stage 8, 以下R8と略す)

グルクロン酸転移酵素活性の測定

糖受容体として50 μM 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

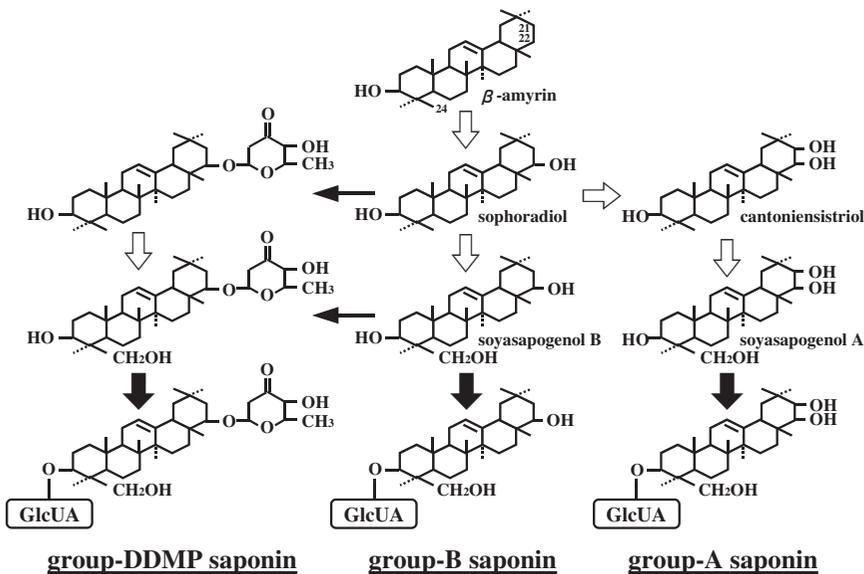


Fig. 1. Proposed pathway of saponin biosynthesis in soybean. The reactions catalyzed with hydroxylase and glucuronosyltransferase are shown with open and closed solid arrows, respectively.

B-3-O-glucuronide (SB3G) 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。

栽培温度をかえた大豆の栽培法

市販のプランターに水分を含んだパーミキュライトを約20 cmの厚さになるよう敷き、1プランターに18個の深さ約4 cmの穴をあけた。その穴1つにつき大豆種子1粒植えてパーミキュライトで覆った。種子は播種後、明期14.5時間、暗期9.5時間、気温25℃、湿度50%の条件下で栽培した。第5葉展開後、大豆18検体の中から4検体選抜し、直径30 cmのポットに植え変えた。その中から2検体を、明期14.5時間、暗期9.5時間、気温18℃、湿度50%の条件下に移し、開花後の栽培温度を変えて大豆種子が完熟するまで栽培した。

栽培温度をかえて栽培した登熟期大豆のサポニン含量の定量

栽培温度18℃と25℃で栽培して得られた大豆完熟種子を胚軸と子葉に分け、凍結乾燥した後、乳鉢中で粉碎し、10倍量の70%エタノールを加えて、80℃で15時間、抽出した。得られた抽出液を、17,400 × g、5分間遠心して、その上清をHPLCにより分析した。HPLC分析条件は、検出波長205 nm、流速0.5 mL/minとした。またAグループサポニンの移動相として、アセトニトリル：1-プロパノール：水=32.3：4.2：63.5 (v/v)、Bグループサポニンの移動相としてメタノール：1-プロパノール：水=70：6：24 (v/v) を用いた。AおよびDDMPグループサポニン (DDMPグループサポニンは熱などに不安定なため、80℃で抽出してBグループサポニンに変換して定量) の含量をHPLCにて定量した。

ヒドロキシラーゼ活性の測定

Soyasapogenolの生合成に関わるNADPH依存性のヒドロキシラーゼ活性の測定は、RIや蛍光ラベルを用いた直接的な測定法が行えないため、以下のグルクロン酸転移酵素を利用した間接的な測定法を用いた。すなわち、登熟期大豆種子から調製したマイクロソーム画分に2 mM sophoradiol (90%エタノールに溶解したもの) 1 μL、UDP-[U-¹⁴C]グルクロン酸2 μL (1.48 kBq)、400 mM MgCl₂、200 mM NADPH (水に溶解したもの) 1 μL、および粗酵素液45 μLを混合し、液量が50 μLになるように調製した。ただし、2 mM β-amyrin (90%エタノールに溶解したもの) 1 μLが基質の場合、ヒドロキシラーゼ活性の検出がわずかであったため、

添加するUDP-[U-¹⁴C]グルクロン酸を4 μL (2.96 kBq) とした。この混合溶液を40℃、3時間インキュベートした後、反応液に15 μLと1-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。静置後、ブタノール層20 μLをエッペンドルフチューブに分注し、薄層プレートにガラスキャピラリーでスポットした。続いて、展開溶媒にクロロホルム：メタノール：水=65：35：10 (v/v) の下層を用い、展開層内で展開した。展開後、溶媒を蒸発させ、AMBIS 4000 (AMBIS社) を用いて、各反応生成物のスポットの放射活性を測定した。

ヒドロキシラーゼのNADPH依存性

シトクロムP450モノオキシゲナーゼは、その反応にNADPHとO₂が必要である。そこでまず、NADPH依存性の検討を行った。NADPH依存ヒドロキシラーゼ反応系で、200 mM NADPH 1 mLの代わりにH₂O 1 mLを加えた系をNADPH非存在条件下とした。酵素活性測定はNADPH依存ヒドロキシラーゼの標準反応系を用いた。

大豆種子の各登熟段階におけるヒドロキシラーゼ活性の変動

登熟期各段階 (R5, R6, R7, R8) の大豆種子からマイクロソーム画分を調製した。酵素活性測定は、NADPH依存ヒドロキシラーゼの標準反応系で行い、基質としてsophoradiolを用いた。

シトクロムP450阻害剤のヒドロキシラーゼ活性に対する影響

シトクロムP450の阻害剤は、強い阻害作用を持つcytochrome c¹⁷⁾と、植物由来のP450に対して阻害作用の見られるancymidol¹⁸⁾を用いた。またP450と結合して酵素反応を阻害するCO¹⁹⁾も用いた。酵素活性測定は、前述のNADPH依存ヒドロキシラーゼの標準反応系を用いた。Ancymidol, cytochrome cについては、酵素反応系にそれぞれ終濃度が1 mM、200 μg/mLになるよう添加した。COについては、CO：O₂ (9：1) をシリンジで粗酵素液に3 mL通気した後、NADPHを添加して酵素反応を開始した。

結果と考察

登熟期大豆種子におけるグルクロン酸転移酵素活性の検出

登熟大豆種子より抽出した粗酵素液に、糖受容体として精製したsoyasapogenol AとB、糖供与体としてUDP-[U-¹⁴C]グルクロン酸を添加し、40℃、60分間インキュベートした後、反応液をTLCによって分離し、

RIイメージアナライザーによって分析した。反応生成物のマーカーとして、発芽期の粗酵素で基質をそれぞれsoyasapogenol AとBとした時、酵素反応生成物としてすでに確認されている、SA3GとSB3Gを用いた。その結果、登熟期の酵素反応生成物として、糖受容体をsoyasapogenol Aおよびsoyasapogenol Bとしたとき、それぞれRf値0.32、およびRf値0.35のバンドを検出した (Fig. 2-A)。このバンドは発芽期のマーカーと一致した (Fig. 2-B) ことから、登熟期大豆のミクロソーム画分に、グルクロン酸転移酵素活性の存在を確認した。

登熟期グルクロン酸転移酵素の諸性質

基質特異性の検討では、Tris-HCl buffer (pH 8.0) の系において40℃、1時間の反応条件で、基質として大豆サポニンのトリテルペン系アグリコンであるsoyasapogenol A、BおよびEと甘草由来のサポニンであるglycyrrhetic acid、soyasapogenol生合成系で前駆体と推定されるβ-amyrinやsophoradiol、グルクロン酸を糖鎖として持つフラボノイド系アグリコンであるluteolinとbaicaleinを用いた。その結果 (Table 1)、発芽期同酵素と同様にsoyasapogenol A、B、Eに対して活性を示したが、発芽期同酵素と違いsoyasapogenol E

を基質とした場合、最も相対活性が高かった。しかし、同じオレアナン型のトリテルペンであるβ-amyrinとsophoradiolおよびglycyrrhetic acidに対しては活性を示さず、フラボノイド系アグリコンでも同様に活性を示さなかった。これらの結果、登熟期のグルクロン酸転移酵素は、発芽期同酵素と同様に大豆のsoyasapogenolに対して極めて特異性の高い酵素であることが明らかとなった。

金属要求性の検討では、Tris-HCl buffer (pH 8.0) の系において40℃、1時間の反応条件でEDTAの終濃度が5 mM、各カチオン (NaCl, KCl, MgCl₂, MnCl₂, CaCl₂) の濃度が10 mMとなるよう酵素反応bufferを調製した。その結果 (Table 2)、5 mM EDTA、10 mMのNa⁺、K⁺では活性が検出されなかったが、10 mMのMg²⁺、Mn²⁺、Ca²⁺では活性がみられた。登熟期グルクロン酸転移酵素は、その活性に2価カチオンが必要であり、発芽期同粗酵素と同様の結果となった。Table 1に示したようにグルクロン酸転移酵素の基質がsoyasapogenol AとBの場合、相対活性は基質がsoyasapogenol Aのときよりもsoyasapogenol Bのときのほうが高かった。しかし同基質内での相対活性は、カチオンによって異なり、基質がsoyasapogenol Bの時Mn²⁺で活性が高いのに対し、soyasapogenol AではMg²⁺で活性が高かった。

至適温度の検討は、Tris-HCl (pH 8.0) の系において、基質としてsoyasapogenol AとBをそれぞれ用い、温度を15℃～50℃の間、5℃おきに設定し、1時間反応後、酵素活性を測定することによって行った。その結果 (Fig. 3-A)、soyasapogenol Aを基質とした場合の至適温度は30℃で、soyasapogenol Bを基質とした場合の至適温度は20℃であり、基質によって至適温度

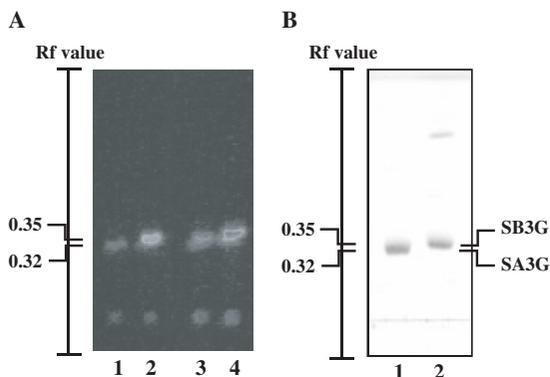


Fig. 2. Autoradiogram of glucuronosyltransferase assay in soybean seed in development stage. **A**, TLC patterns of enzyme products. Lane 1, microsomal fraction from germinating soybean and soyasapogenol A added; Lane 2, microsomal fraction from germinating soybean and soyasapogenol B added; Lane 3, microsomal fraction from soybean seed in development stage and soyasapogenol A added; Lane 4, microsomal fraction from soybean seed in development stage and soyasapogenol B added. **B**, Lane 1, soyasapogenol A-3-*O*-β-glucuronide (SA3G) standard; Lane 2, soyasapogenol B-3-*O*-β-glucuronide (SB3G) standard.

Table 1. Substrate specificity of glucuronosyltransferase

Acceptor	Activity (%)	
	development	germinating
<u>Oleanane-type triterpens</u>		
soyasapogenol A	40.9	40.6
soyasapogenol B	100	100
soyasapogenol E	224	79.1
β-amyrin	nd	nd
sophoradiol	nd	nd
glycyrrhetic acid	nd	nd
<u>Flavonoids</u>		
luteolin	nd	nd
baicalein	nd	nd

The enzyme activity using soyasapogenol B as an acceptor was set as 100%. nd, enzyme activity was not detected.

が異なることがわかった。

至適pHの検討は、100 mM MES-NaOH buffer (pH 5.0~7.0), 100 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0~9.0) の系で40℃, 1時間反応後、酵素活性を測定することによって行った。酵素の基質としてsoyasapogenol AとBをそれぞれ用いた。その結果 (Fig. 3-B), soyasapogenol Aを基質とした場合の至適pHが8.0であるのに対し, soyasapogenol Bを基質とした場合の至適pHは6.0であり, 至適pHも基質によって異なることが明らかになった。

登熟期のグルクロン酸転移酵素は, soyasapogenol に対して特異的な酵素であるが, 基質によって性質が異なった。Soyasapogenol Aが基質の場合, 至適温度30℃, 至適pH8.0, 10 mM Mg²⁺の添加で活性が最大となった。一方, soyasapogenol Bが基質の場合, 至適

Table 2. Effect of cation on glucuronosyltransferase activity

Cation	Conc. (mM)	Activity (%)	
		Soyasapogenol A	Soyasapogenol B
None	—	5.9	19.1
EDTA	5	nd	nd
Mn ²⁺	10	12.4	100
Mg ²⁺	10	15.7	28.0
Ca ²⁺	10	2.7	51.5
K ⁺	10	nd	nd
Na ⁺	10	nd	nd

The enzyme activity using soyasapogenol B as an acceptor and 10 mM Mn²⁺ as a cation was set as 100%. nd, enzyme activity was not detected.

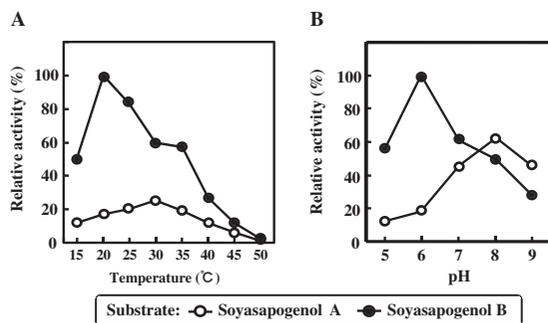


Fig. 3. Effect of temperature and pH on glucuronosyltransferase activity in soybean seeds in development stage. **A**, Effect of temperature on enzyme activity. The enzyme activity using soyasapogenol B as an acceptor at 20℃ was set as 100%. **B**, Effect of pH on enzyme activity. The enzyme activity using soyasapogenol B as an acceptor in MES-NaOH buffer (pH 6.0) was set as 100%.

温度20℃, 至適pH 6.0, 10 mM Mn²⁺の添加で活性が最大となった。基質によって異なる性質を示す, 本酵素の特徴を大豆栽培法に利用すれば, 大豆サポニンのAグループサポニンの含量を減らし, Bグループサポニン (実際にはDDMPグループサポニン) の含量を増加させて, 低不快感大豆を作出できる可能性が示された。

登熟期グルクロン酸転移酵素の基質競合性

登熟期のグルクロン酸転移酵素は, 基質が soyasapogenol AかBの違いにより, 異なる性質を示すユニークな知見が得られた。今回粗酵素を用いて性質を比較したため, 登熟期のグルクロン酸転移酵素は, 基質がsoyasapogenol AかBの違いで2種類存在するのか, 1酵素が2基質を触媒するのか明らかではない。本来であれば, 登熟期のグルクロン酸転移酵素を精製して性質を比較する必要があるが, 酵素精製には大量の登熟期大豆種子が必要であるため精製は困難であった。そこで登熟期の粗酵素液を用いて, グルクロン酸転移酵素の数を推測するため, 基質である soyasapogenol AとBを様々な濃度に設定して, 反応 buffer 中に加え, 基質を競合させることにした。Tris-HCl (pH 8.0) の系において, 両基質の終濃度の和が100 μMの濃度に反応系の液量が40 μLになるよう調製した。基質の濃度比は soyasapogenol A : soyasapogenol B=100 : 0, 75 : 25, 50 : 50, 25 : 75 および 0 : 100とした。その結果 (Fig. 4), soyasapogenol Aの濃度が100 μMの時, soyasapogenol Aに対する酵素活性が, 178.5 μUであった。基質の濃度比が soyasapogenol A : soyasapogenol B=75 : 25の時, soyasapogenol Aに対する酵素活性が45.7 μUに減少したのに対し, soyasapogenol Bに対する酵素活性は222 μUとなった。soyasapogenol Aの濃度が100 μMから75 μMへ4分の3になると, 酵素活性が約4分の1となった。基質濃度に占める soyasapogenol Aの比が減少し, soyasapogenol Bの比が増すと, soyasapogenol Aに対する酵素活性はほとんど変わらなかったが, soyasapogenol Bに対する酵素活性は増加し, 基質比が soyasapogenol A : soyasapogenol B=25 : 75の時, 生成したSA3GとSB3Gの比は9.5 : 100であった。基質を別々に反応させた場合, 生成したSA3GとSB3Gの比は40 : 100であることから, 登熟期のグルクロン酸転移酵素は一つで, soyasapogenol Aとsoyasapogenol Bで基質の競合が起きていることが示唆された。登熟期のグルクロン酸転移酵素は, 基質特異性が大豆サポニンのアグリコンである soyasapogenol A, BおよびEに特異的な酵素であるこ

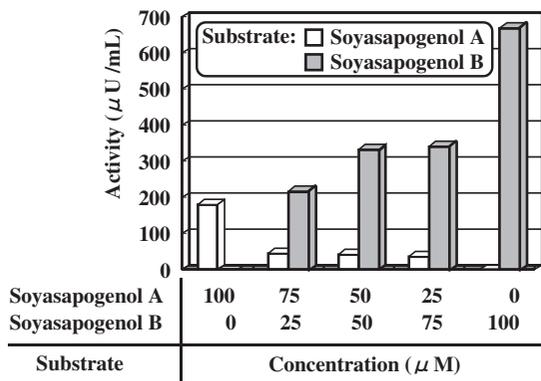


Fig. 4. Effect of substrate ratio on glucuronosyltransferase activity. The enzyme activity was detected at 40°C in Tris-HCl buffer (pH 8.0).

と, soyasapogenol Aとsoyasapogenol Bで基質の競合が起きていることから登熟期のグルクロン酸転移酵素は一つであることが推測された。

登熟期の栽培温度とサポニン含量の関係

これまでの結果から, 登熟期のグルクロン酸転移酵素は一つであることが推測された。したがって遺伝工学的手法を用いて, 同酵素の欠損変異体を作成すればAおよびB(大豆植物体内での真性型はDDMP)グループサポニンが生合成されず, BおよびDDMPグループサポニンのもつ薬理作用が失われてしまうと推測される。しかし登熟期のグルクロン酸転移酵素は, 基質の違いによって至適温度, 至適pH, 金属要求性が異なるユニークな性質をもつことが明らかとなったことから, この性質を大豆栽培法に生かせれば, 大豆種子中のAグループサポニンの含量を減少させ, BおよびDDMPグループサポニンの含量を増加させることができる可能性がある。

そこで登熟期のグルクロン酸転移酵素の性質の中から, 至適温度が, 基質がsoyasapogenol Aで30°C, 基質がsoyasapogenol Bで20°Cになることに注目し, 大豆開花後から完熟するまでの間, 栽培温度を変えて完熟種子胚軸・子葉のサポニン含量とその組成について調べることにした。Aグループサポニンの含量を減らすためには, グルクロン酸転移酵素の基質がsoyasapogenol Aの時の至適温度30°Cよりもできるだけ低温にすることが望ましい。しかし大豆の開花期前後の低温(15°C)により, 落花・落莢が起きることから²⁰⁾, 大豆の栽培温度を18°Cと25°Cに設定した。その結果(Fig. 5), 大豆種子中に含まれるサポニン含量は, 18°Cでは25°Cと比べAグループサポニンで16%, Bグループサポニンで20%含量が多かった。また, 大豆の

不快味度を示すサポニンAb/サポニンBbの比は, 18°Cで1.46, 25°Cで1.50と若干Aグループの比率を低くすることがわかった。反応基質によるグルクロン酸転移酵素の性質の違いは, 至適温度以外に至適pHやカチオン要求性にもみられたことより, 今後はさらにpHやカチオンといった他の栽培条件についても検討する必要がある。

β-amyrinおよびsophoradiolを基質としたNADPH依存性ヒドロキシラーゼの活性測定

筆者らはアグリコンの生合成が, soyasapogenolの基本骨格であるβ-amyrinを起点に, 一連のヒドロキシラーゼが触媒する水酸基付加反応によって進行すると推測している(Fig. 1)。また, 大豆の発芽期では, sophoradiolのC-21位を触媒するヒドロキシラーゼが発現していないため, Aグループサポニンが生合成されないことを明らかにしている。AグループサポニンとBグループサポニンの生合成の分岐点となるのは, このsophoradiolのC-21位に水酸基を転移するsophoradiol-21 hydroxylaseであると推測される。植物の2次代謝産物であるフラボノイドやテルペノイドなどに関して, シトクロムP450モノオキシゲナーゼがこれらの生合成に関与していることが知られている^{21, 22)}。そのため登熟期のアグリコン生合成に関わるヒドロキシラーゼは, P450である可能性は高く, また筆者らは発芽期大豆におけるヒドロキシラーゼ群はNADPH依存性であることを既に明らかにしている。そこで次に, シトクロムP450モノオキシゲナーゼの性質をもとに,

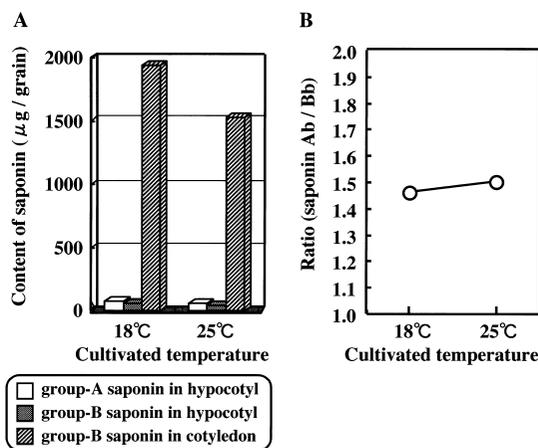


Fig. 5. Effect of cultivated temperature on saponin contents and composition in soybean seeds. **A**, Contents of group-A and B saponin in soybean seed. **B**, Ratio of group-B saponin to group-A saponin in soybean seed.

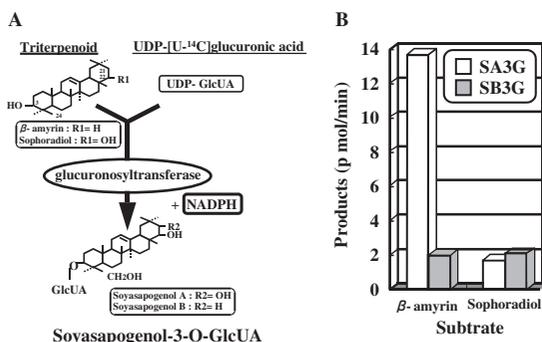


Fig. 6. Hydroxylase activity in soybean seeds in development stage. **A**, Detection method of hydroxylase activity. **B**, Hydroxylase activity in soybean seeds.

登熟期大豆におけるアグリコン生合成経路を明らかにすることとした。

登熟期R6の大豆種子サンプルを用いて、基質 β -amyrinおよびsophoradiolにおけるNADPH依存性ヒドロキシラーゼの活性測定を行った。その結果、 β -amyrinあるいはsophoradiolを基質にした場合、発芽期では検出されなかったSA3Gのバンドが検出された。したがって登熟期大豆では発芽期大豆で発現していなかったsophoradiolのC-21位の水酸化を触媒するヒドロキシラーゼ活性が発現していることが示唆された。

また、 β -amyrinとsophoradiolをそれぞれ基質としたときのヒドロキシラーゼ活性を比較すると (Fig. 6), β -amyrinが基質の場合、SA3Gの反応生成量がSB3Gより約6.6倍高く、一方sophoradiolが基質の場合、SA3Gの反応生成量がSB3Gとほぼ同じ値であった。発芽期大豆のミクロソームでは β -amyrinからSB3Gのみが生成すること、 β -amyrinとsophoradiolでは、SA3GとSB3Gの生成量に開きがあることから、予測していたsophoradiolのC-21位の水酸化を触媒するヒドロキシラーゼ (sophoradiol-21 hydroxylase) 以外に β -amyrinのC-21位の水酸化を触媒するヒドロキシラーゼ (β -amyrin-21 hydroxylase) が存在する可能性が示唆された。すなわち登熟期ではsoyasapogenol Aを生合成する経路は2種類あることが推測された。

ヒドロキシラーゼのNADPH依存性

ヒドロキシラーゼ活性がNADPH依存性であるか検討するため、コントロールとして200 mM NADPHの代わりにH₂Oを添加した。その結果、基質が β -amyrinの時、NADPH非存在下でSA3Gの生成量が大きく減少したことから、 β -amyrinのC-21位の水酸化を触媒するヒドロキシラーゼ (β -amyrin-21

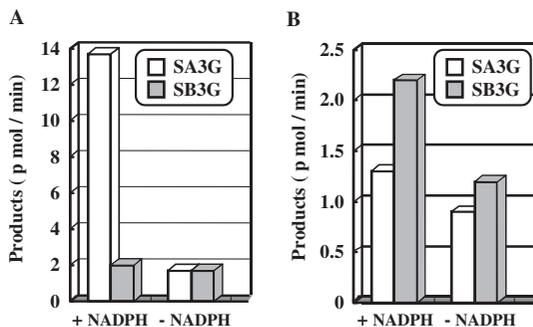


Fig. 7. NADPH requirement of hydroxylase in soybean seeds in development stage. **A**, The enzyme activity was measured using β -amyrin as a substrate. **B**, The enzyme activity was measured using sophoradiol as a substrate.

hydroxylase) と、21-hydroxy- β -amyrinのC-22位の水酸化を触媒するヒドロキシラーゼ (21-hydroxy- β -amyrin 22-hydroxylase) の両方あるいは一方を、NADPH依存性ヒドロキシラーゼが触媒していることが推測された (Fig. 7-A)。一方、基質がsophoradiolの時、NADPH非存在下では反応生成物であるSB3Gの生成量が減少し、SA3Gの生成量はほとんど変化しなかった (Fig. 7-B)。このことからsophoradiolのC-24位を触媒するヒドロキシラーゼ (sophoradiol-24 hydroxylase) がNADPH依存性であり、sophoradiol-21 hydroxylaseとcantoniensistriol-24 hydroxylaseの両方または一方がNADPH非依存性のヒドロキシラーゼであることが推測された。

大豆種子の各登熟段階におけるヒドロキシラーゼ活性の変動

Sophoradiolを経由したAグループサポニンの生合成経路をさらに詳しく調べるために、sophoradiolを基質にして、登熟期におけるヒドロキシラーゼ活性の変動について検討した (Fig. 8)。反応生成物であるSA3Gの生成量は、R5をピークに徐々に減少し、R8ではほとんど検出されなかった。一方SB3Gの生成量は、R5からR7にかけて上昇し、R8で急激に減少した。この酵素活性測定法がsophoradiol-21 hydroxylase活性とsophoradiol-24またはcantoniensistriol-24 hydroxylase活性の両方を同時に測定していることと、上記の結果から考えると、登熟の初期にsophoradiol-21 hydroxylase活性が強く、登熟が進むにつれてその活性が減少していくことが推測された。

シトクロムP450阻害剤のヒドロキシラーゼ活性に対する影響

Sophoradiolを基質とし、シトクロムP450各種阻害

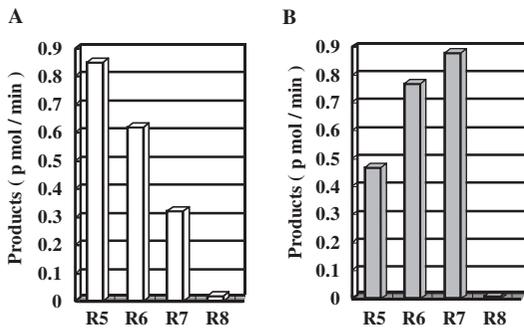


Fig. 8. Change of hydroxylase activity in soybean seed in development stages. The enzyme activity was measured using sophoradiol as a substrate. **A**, Enzyme activity was measured by the amount of formation of SA3G. **B**, Enzyme activity was measured by the amount of formation of SB3G.

Table 3. Effects of cytochrome P-450 inhibitors on hydroxylase activity in soybean seeds

Cytochrome P-450 inhibitor	Relative amount (%)	
	SA3G	SB3G
None	100	100
CO : O ₂ (9:1)	115	83.6
Ancymidol (1 mM)	99.7	91.1
Cytochrome c (200 mg/mL)	85.1	62.7

剤をbufferに添加してその影響を検討した (Table 3). ヒドロキシラーゼの最終生成物の一つであるSA3Gの生成量は, CO, ancymidolの添加で活性に阻害は見られなかった. しかし, シトクロムP450の強い阻害剤であるcytochrome cでは活性の減少が見られた. このことからsophoradiol経由でsoyasapogenol Aを生合成する経路を担う2つのhydroxylase, sophoradiol 21-hydroxylaseとcantoniensistriol 24-hydroxylaseのいずれかが, シトクロムP450であることが示唆された. 一方反応生成物がSB3Gの場合, CO, ancymidolおよびcytochrome cで阻害作用が見られ, 特にcytochrome cで阻害作用が高かった. このことからsophoradiol 24-hydroxylaseがシトクロムP450であることが示唆された.

以上の結果から, 大豆におけるAグループサポニンのアグリコンの生合成経路とその反応を触媒するヒドロキシラーゼに関して以下のように推測された (Fig. 9). すなわち, β -amyrinからAグループサポニンのアグリコンであるsoyasapogenol Aを生合成する経路には, sophoradiolを経由する経路と21-hydroxy- β -amyrinを経由する経路の2つの経路が存在し, それらの経路に関与する5つのヒドロキシラーゼのうち4つがcytochrome P-450 mono oxygenaseで, sophoradiol-21-hydroxylaseだけがcytochrome P-450 mono oxygenaseでないことが推測された.

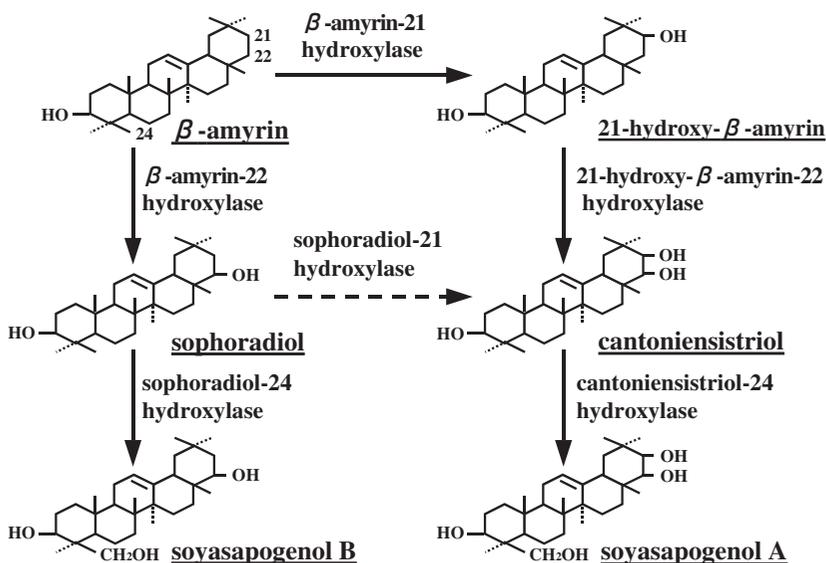


Fig. 9. Proposed biosynthesis pathway of aglycons of saponin in soybean seed in development stage. The reactions catalyzed with hydroxylase (cytochrome P-450 mono oxygenase) and hydroxylase (non cytochrome P-450 mono oxygenase) are shown with solid and dashed arrows, respectively.

要 約

大豆種子には、真性サポニンとしてAグループサポニンとDDMPグループサポニンが存在している。Aグループサポニンが大豆における不快味の主要原因物質である一方、DDMPグループサポニンは様々な薬理作用を有することから、その生合成経路やその各代謝反応を触媒する酵素群の性質の解明は、将来的に付加価値の高い大豆品種の育種に役立つものと期待されている。本研究課題は、その研究の一環としてAグループサポニン生合成のkey enzymeであるグルクロン酸転移酵素とヒドロキシラーゼの性質を解明したものである。まず、Aグループサポニンが生合成される登熟期の種子に存在するグルクロン酸転移酵素の酵素化学的性質を調べた結果、AグループサポニンおよびDDMPグループサポニンの両方のアグリコン（非糖部）に対してグルクロン酸を転移することが明らかとなり、この酵素の機能を遺伝子工学的手法によって抑制しても、Aグループサポニンの生合成を選択的に停止することはできないことが分かった。しかし、同酵素のAグループサポニンおよびDDMPグループサポニンのそれぞれのアグリコンに対する基質特異性の程度が反応温度、pH、金属によって変化するという興味深い知見を得た。この酵素化学的性質に基づいて大豆の栽培条件を制御することによって、大豆種子におけるAグループサポニンとDDMPグループサポニンの生合成の割合をコントロールできる可能性が示唆された。さらに、Aグループサポニンの生合成のみを選択的に停止することが可能な生合成経路の絞りを、その反応を触媒する酵素を検索した結果、新規なヒドロキシラーゼを発見し、その性質を明らかにした。このヒドロキシラーゼの発見は、Aグループサポニンの生合成を抑制し、相対的にDDMPグループサポニンの生合成を高めた低不快味・高機能大豆品種の開発に大きく貢献すると考えられる。

文 献

- 1) 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.
- 2) 北川 勲, 吉川雅之 (1984): 食物の中の生物活性物質—大豆サポニンと脂質代謝. 化学と生物, **21**, 224-232.
- 3) Miyao H, Arai T, Udayama M, Kinjo J and Nohara T (1998): Kaikasaponin III and soyasaponin I, major triterpene saponins of *Abrus cantoniensis*, act on GOT and GPT: Influence on transaminase elevation of rat liver cells concomitantly exposed to CCl₄ for one hour. *Planta Med*, **64**, 5-7.
- 4) Kinjo J, Imagire M, Udayama M, Arai T and Nohara T (1998): Structure-hepatoprotective relationships study of soyasaponins I-IV having soyasapogenol B as aglycone. *Planta Med*, **64**, 233-236.
- 5) Nakashima H, Okubo K, Honda Y, Tamura T, Matsuda S and Yamamoto N (1989): Inhibitory effect of glycosides like saponin from soybean on the infectivity of HIV *in vitro*. *AIDS (London)*, **3**, 655-658.
- 6) 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.
- 7) Yoshiki Y and Okubo K (1995): Active oxygen scavenging activity of DDMP (2,3-dihydro-2,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one) saponin in soybean seed. *Biosci Biotech Biochem*, **59**, 1556-1557.
- 8) Shiraiwa M, Kudou 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.
- 9) Shiraiwa M, Harada K and Okubo K (1991): Composition and structure of "group B saponin" in soybean seed. *Agric Biol Chem*, **55**, 911-917.
- 10) Shiraiwa M, Harada K and Okubo K (1991): Composition and content of saponins in soybean seed according to variety, cultivation year and maturity. *Agric Biol Chem*, **55**, 323-331.
- 11) Shiraiwa M, Harada K and Okubo K (1990):

- Inheritance of "group A saponin" in soybean seed. *Agric Biol Chem*, **54**, 1347-1352.
- 12) Kurosawa Y, Takahara H and Shiraiwa M (2002): UDP-glucuronic acid: soyasapogenol glucuronosyl-transferase involved in saponin biosynthesis in germinating soybean seeds. *Planta*, **215**, 620-629.
 - 13) 白岩雅和, 黒澤康紀 (2001): 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. 大豆たん白質研究, **4**, 1-10.
 - 14) Kudou S, Tonomura M, Tsukamoto C, Uchida T, Sakabe T, Tamura N and Okubo K (1993): Isolation and structural elucidation of DDMP-conjugated soyasaponin as genuine saponins from soybean seeds. *Biosci Biotech Biochem*, **57**, 546-550.
 - 15) Yoshiki Y, Kim JH and Okubo K (1994): Saponins conjugated with 2,3-dihydro-2,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one from *Phaseolus coccineus*. *Phytochemistry*, **36**, 1009-1012.
 - 16) Fehr WR, Caviness CE, Burmood DT and Pennington JS (1971): Stages of development descriptions for soybeans, *Glycine max* (L.) Merrill. *Crop sci*, **11**, 929-931.
 - 17) Clemens S, Hinderer W, Wittkamp U and Barz W (1993): Characterization of cytochrome P450-dependent isoflavone hydroxylase from chickpea. *Phytochemistry*, **32**, 653-657.
 - 18) Bolwell GP, Bozak K and Zimmerin A (1994): Plant cytochrome p450. *Phytochemistry*, **37**, 1491-1506.
 - 19) Donaldson RP and Luster D (1991): Multiple forms cytochromes P-450. *Plant physiol*, **96**, 669-674.
 - 20) 黒崎英樹, 湯本節三 (2003): 耐冷性育種, 我が国における食用マメ類の研究. 総合農業叢書, p135-146.
 - 21) 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.
 - 22) Yamamoto H, Inoue K, Li S and Heide L (2000): Geranylhydroquinone 3"-hydroxylase, a cytochrome P-450 monooxygenase from *Lithospermum erythrorhizon* cell suspension cultures. *Planta*, **210**, 312-317.