

低不快味大豆育種を目的とした
Aグループサポニン生合成酵素に関する研究

白岩雅和*

茨城大学農学部

**Study on Biosynthetic Enzymes of Group-A Saponin for the Breeding of
Low Unpleasant Taste Soybean Variety**

Masakazu SHIRAIWA

School of Agriculture, Ibaraki University, Ibaraki 300-0393

ABSTRACT

While group-A saponin is the main substance responsible for the unpleasant taste in soybean, group-DDMP saponin has various medicinal action. Therefore, it is expected that elucidation and characterization of the enzymes which catalyze biosynthetic reaction of saponins will be useful to the breeding of the value-added soybean variety in the future. This research was aimed at cDNA cloning of the key enzymes (glucuronosyltransferase and hydroxylase) of group-A saponin biosynthesis that we had discovered, previously. Some soybean EST clones that showed high similarities to glucuronosyltransferase (PsUGT1) from pea were found in the DNA databases. An open reading frame (ORF) was generated based on the nucleotide sequences of these EST, showing a homology to PsUGT1 with 69%. We presumed that the putative sequences encodes a glucuronosyltransferase in soybean. On the other hand, sixteen cDNA clones for hydroxylase were also found. Comparing the converted amino acid sequences among them, the conserved region in all was found. In addition, when group-A saponin in 18 wild relatives of soybean was analyzed, three species (*G. tabacina*, *G. tomentella*, and *G. wightii*) that group-A saponin is deleted was revealed. These findings suggest the possible use of plant materials for cDNA cloning of hydroxylase involved in biosynthesis of group-A saponin in soybean. *Soy Protein Research, Japan* **8**, 11-18, 2005.

Key words : BLAST search, glucuronosyltransferase, hydroxylase, wild relatives of soybean, saponin biosynthesis, soybean

* 〒300-0393 茨城県稲敷郡阿見町中央3-21-1

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。ビスデスモサイド型サポニンである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¹⁾一方、モノデスモサイド型サポニンであるDDMPグループサポニンおよびそのアーティファクトとされているBおよびEグループサポニンは様々な薬理作用（抗ウイルス活性²⁻⁴⁾、抗がん活性^{5,6)}、肝機能障害に対する保護作用⁷⁻⁹⁾、多嚢胞性腎臓病の進行遅延作用¹⁰⁾、ラジカルスカベンジャー活性¹¹⁾、抗酸化性¹²⁾、カルシウム依存性K⁺チャネル活性化作用¹³⁾、シアリルトランスフェラーゼに対する特異的阻害活性¹⁴⁾、抗補体活性¹⁵⁾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、低不快味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。昨年度、登熟期大豆種子から全サポニン生合成のKey enzymeであるグルクロン酸転移酵素 (Fig. 1) の検索を行い、その性質を調べた結果、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ことを明らかにし、大豆の栽培条件を同酵素の性質に基づいて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を示唆した¹⁶⁾。さらに、Aグループサポニンの生合成にのみ関与する経路的に絞りを、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活性 (β -amyrin-21 hydroxylase, sophoradiol-21 hydroxylase) を見出し (Fig. 1)、その性質を明らかにした¹⁶⁾。そこで本年度は、これらの酵素をターゲットとした低不快味・高機能大豆品種の開発に向けて同上酵素のcDNAをクローニングすることを目的とした。

方 法

材 料

サポニン生合成に関与するグルクロン酸転移酵素の精製には、大豆栽培種 (品種: エンレイ) の登熟時期の種子を用いた。Aグループサポニン欠失大豆近縁種の検索には、*G. soja koushureiyaseidaizu*, *G. soja* 4, *G. soja* 36, *G. soja* 55, *G. soja* 85, *G. soja* 86, *G. soja* 96, *G. soja* 100, *G. soja* 137, *G. gracillis* P.I. 135-590, *G. wightii* Soja Perene, *G. latifolia*, *G. tomentella* Mopiton, *G. tomentella* Lindeman, *G. clandestine*, *G. canescens* White elige, *G. tabacina* Giken, *G. tabacina* Miyakojima-turumameの完熟種子を用いた。

登熟期大豆種子のグルクロン酸転移酵素の精製

グルクロン酸転移酵素の精製は、発芽期大豆種子のグルクロン酸転移酵素の精製法^{17, 18)}に準じて行った。

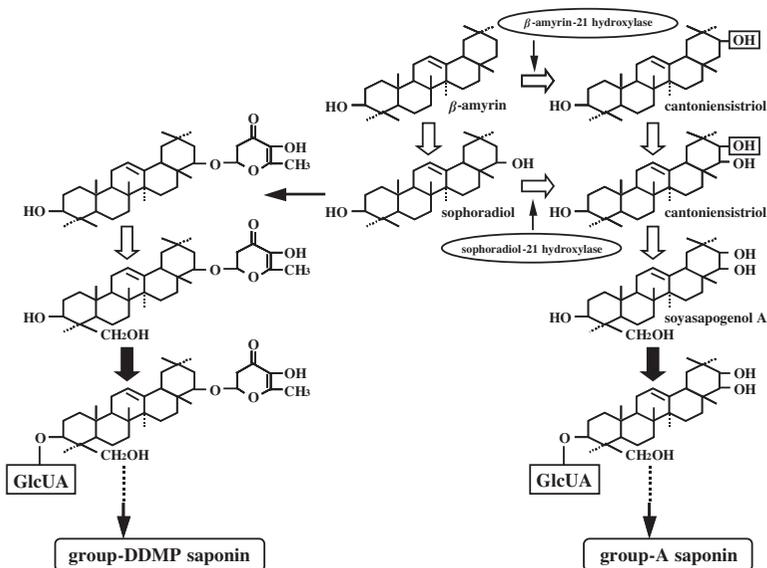


Fig. 1. Proposed pathway of saponin biosynthesis in soybean. The reactions catalyzed with hydroxylase and glucuronosyltransferase are shown with open and closed solid arrows, respectively.

グルクロン酸転移酵素および水酸化酵素群をコードする大豆遺伝子情報の検索

グルクロン酸転移酵素をコードする大豆遺伝子の配列情報を見出すために、エンドウ由来グルクロン酸転移酵素PsUGT1¹⁷⁾ (AF034743) のアミノ酸配列を利用してGenBank/DDBJ/EMBLデータベース上に登録された大豆EST配列に対するBLAST検索を行った。一方、大豆水酸化酵素群に関する配列情報は、DDBJの検索システムを利用することで取得した。遺伝子情報に対する種々の配列解析は、遺伝子解析ソフトウェアGenetyx-Win (ver. 7.0.3; Genetyx Corporation) を用いて行った。なお、各酵素遺伝子に関する系統樹の作成は、UPGMA法に従って行った。

大豆近縁種のサポニン成分分析

大豆近縁種の種子を凍結乾燥した後、胚軸、子葉および種皮に分け、胚軸を乳鉢中で粉砕し、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 x g、5分間遠心分離して、その上清をHPLCおよびTLCにより分析した。HPLCによる分析は、カラムにYMC-Pack ODS AM-303 (5 μ m, 250 x 4.6 mm I.D., YMC社)、移動相にアセトニトリル：1-プロパノール：水=32.3：4.2：63.5 (v/v) を用い、検出波長205 nm、流速0.5 mL/minとして行った。TLCによる分析は、プレートにKieselgel 60 F₂₅₄ (メルク社)、展開溶媒にクロロホルム：メタノール：水=65：35：10 (v/v) の下層を用いてサポニン成分を分離し、10%硫酸を噴霧し、加熱発色させることにより行った。

結果と考察

登熟期大豆種子に存在するグルクロン酸転移酵素および水酸化酵素の精製

低不快味・高機能大豆品種の開発に向けて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水酸化酵素のcDNAをクローニングする方法の一つとして同酵素のアミノ酸配列に基づいた標識プローブを用いて登熟大豆種子におけるcDNAライブラリーからスクリーニングを行う方法が考えられる。そこで、同酵素のアミノ酸配列情報を得るために酵素の精製を試みた。まず、グルクロン酸転移酵素の精製については、筆者らが確立した発芽期大豆種子からの同酵素の精製法^{17, 18)}に準じて行った。しかし、発芽期大豆種子に比較して登熟期大豆種子の量的な安定な供給が困難であったため、アミノ酸配列情報を得る程度まで精製することはできなかった。また、水酸化酵素に関しては、膜結合性酵素で不安定であることに加えて、

同酵素が存在する登熟期大豆種子胚軸の量的な安定な供給が困難であったため、同酵素を精製することはできなかった。

大豆ESTクローンからのグルクロン酸転移酵素の検索

グルクロン酸転移酵素のcDNAクローニングに向けたたん白質側からのアプローチが極めて困難であることがわかったので、次に遺伝子情報を基にしたアプローチを試みた。既に他の植物から得られているグルクロン酸転移酵素のアミノ酸配列を基に大豆ESTクローンから相同性の高いクローンの検索を行った。その結果、エンドウ由来グルクロン酸転移酵素PsUGT1¹⁹⁾ に対して高い相同性を示す大豆ESTクローンを複数見つけた。そのクローンの中から最も高い相同性を示すクローンについて整列した結果、1つのオープンリーディングフレーム (ORF) を組むことができた。このORFとPsUGT1との相同性を調べた結果、69%の相同性がみられた。このことからこの遺伝子は、大豆のグルクロン酸転移酵素をコードしているものと推測し、soyUGTと仮称した。また、他の植物由来の糖転移酵素群とsoyUGTのアミノ酸レベルでの相同性を基に系統樹を作成したところ (Fig. 2), soyUGTは植物由来の糖転移酵素群の中でPsUGT1に最も高い相同性を示すことが明らかとなった。今後、このsoyUGTを発芽期大豆種子からクローニングし、その全長塩基配列を解析する予定である。

大豆ESTクローンにおける水酸化酵素の検索

水酸化酵素に関しても、そのcDNAを酵素のアミノ酸配列情報からアプローチすることは困難であったので、遺伝子情報からのアプローチを試みた。水酸化酵素 (CYP) をコードする大豆cDNAおよびESTクローンを検索した結果、全部で311の配列情報を見いだした。そのうち、全長配列が明らかにされている16クローンについて系統樹を作成したところ (Fig. 3), CYPの種類により一部クラスターが形成されるものの、全体としては高い類似性をみられなかった。しかし、詳細な配列比較を行ったところ、高度に保存された領域をみつけることができた。今後、これらの領域を基に設計したプライマーを用いて同酵素のcDNAをクローニングする予定である。

大豆近縁種からのAグループサポニン欠損種の検索

上記のような方法で登熟期大豆種子から水酸化酵素のcDNAをクローニングしようとした場合、水酸化酵素はサポニン生合成だけでなく、他の多くの化合物の生合成にかかわる酵素であることより、数多くのクローンが得られる可能性が高い。これらの中からサポニン生合成、とりわけAグループサポニンの生合成にの

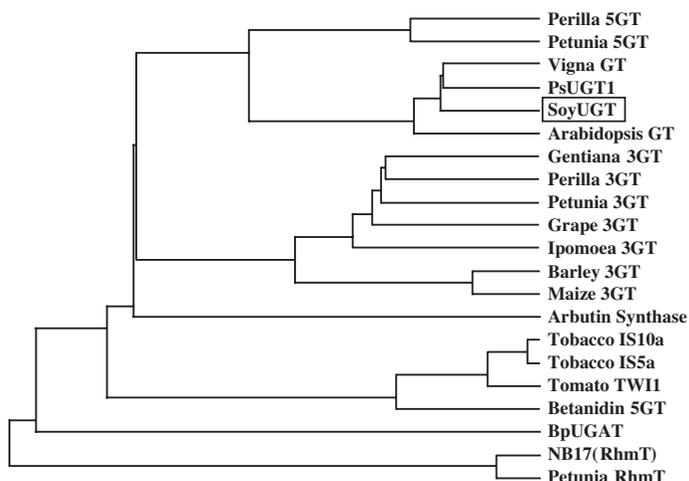


Fig. 2. Phylogenetic analysis of the glycosyltransferase family. Perilla 5GT, UDP-glucose: anthocyanin 5-*O*-glucosyltransferase of *perilla frutescens* (AB013596); Petunia 5GT, anthocyanin 5-*O*-glucosyltransferase of *P.hybrida* (AB027455); Vigna GT, glucosyltransferase-like genes from *Vigna angularis* (AB070753); PsUGT1, UDP-glucuronosyltransferase of *P.sativum* (AF034743); Arabidopsis GT, UDP-glucose glucosyltransferase homologue from *Arabidopsis thaliana* (AB016819); Gentiana 3GT, UDP-glucose: flavonoid 3-*O*-glucosyltransferase *Gentiana triflora* (D85186); Perilla 3GT, flavonoid 3-*O*-glucosyltransferase of *P.frutescens* (AB002818); Petunia 3GT, anthocyanidin 3-*O*-glucosyltransferase of *P.hybrida* (AB027454); Grape 3GT, UDP-glucose: flavonoid 3-*O*-glucosyltransferase of *Vitis vinifera* (AF000371); Ipomoea 3GT, UDP-glucose: flavonoid 3-*O*-glucosyltransferase of *Ipomoea purpurea* (AF028237); Barley 3GT, UDP-glucose: flavonol 3-*O*-glucosyltransferase (*bronze 1* homolog) of *Hordeum vulgare* subsp.*vulgare* (X15694); Maize3 GT, UDP-glucose: flavonol 3-*O*-glucosyltransferase (*bz1* gene product) of *Zea mays* (X13501 and M37640); Arbutin synthase, arbutin synthase of *Rauvolfia serpentina* (AJ310148); Tobacco Is10a, salicylate-induced glucosyltransferase (IS10a) of *N.tabacum* (U32643); Tobacco IS5a, salicylate-induced glucosyltransferase (IS5a) of *N.tabacum* (U32644); Tomato TWI1, a wound-induced gene product (*twi1*) of *Lycopersicon esculentum* (X85138); Betanidine 5GT, betanidin 5-*O*-glucosyltransferase of *Dorotheanthus bellidiformis* (Y18871), BpUGAT, UDP-glucuronic acid: anthocyanidin 3-*O*-glucoside 2''-*O*- β -glucuronosyltransferase from *Bellis perennis* (AB190262); NB17 (RhmT), rhamnosyltransferase of *Nierembergia* sp. (AB078511); Petunia RhmT, UDP-rhamnose: anthocyanidin 3-*O*-glucoside rhamnosyltransferase of *Petunia x hybrida* (EBI accession numbers X71059 and X71060).

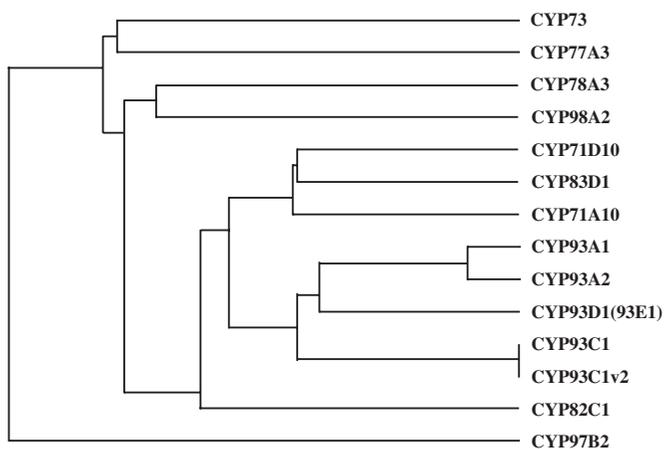


Fig. 3. Phylogenetic analysis of soybean CYP family for above genes. CYP73 (X92437); CYP77A3 (AF022464); CYP78A3 (AF022463); CYP98A2 (AF022458); CYP71D10 (AF022459); CYP83D1 (AF022460); CYP71A10 (AF022157); CYP93A1 (D83968); CYP93A2 (D86351); CYP93D1 (93E1) (AF135485); CYP93C1 (AF022462); CYP93C1v2 (AF135484); CYP82C1 (AF022461); CYP97B2 (AF022457).

み関与する水酸化酵素をピックアップする手段が必要である。その方法の一つとして品種間の遺伝子発現の差を比較できるcDNA-AFLP法による解析が有効であると考えられる。すなわち、Aグループサポニンの生合成が正常に行われている種とAグループサポニンが欠失した種の遺伝子群を解析し、その差から同酵素の候補遺伝子をピックアップするという方法である。筆者らは既に400種を超える大豆栽培種におけるサポニン成分を分析しているが、Aグループサポニンが欠失した品種を見つけることができなかった²⁰⁾。そこでさらに分析範囲を大豆近縁種まで広げ、それらのAグループサポニン成分をHPLCによって分析した。その結果、*G.soja*の9系統すべてと*G.gracilis* P.I. 135-59にAグループサポニンの存在が確認されたが、その他の大豆近縁種にはAグループサポニンは存在しなかった (Fig. 4)。また、Aグループサポニンが存在した大豆近縁種におけるAグループサポニンの組成で特徴的だったのは、大豆栽培品種の大部分 (76.1%) がAb型に属していた²⁰⁾のに対して、大豆近縁種にはAb型は全く存在せず、Aa型あるいはAa-Ab型のいずれかに属していることであった (Fig. 4)。

HPLCによる分析では、アセチル化されたAグループサポニンの存在の有無とAグループサポニンの型を調べたが、Aグループサポニン生合成系の有無を考える場合、脱アセチル化されたAグループサポニンの存在の有無も調べることが必要である。そこで、さらに大豆近縁種のAグループサポニンを網羅的に調べるた

めにTLCによって分析した。その結果、*G.soja*の9系統すべてと*G.gracilis* P.I. 135-59にAグループサポニン、*G.latifolia*, *G.clandestine* P.I. 233138および*G.canescens* White elifeに脱アセチルAグループサポニンに相当するバンドが検出されたが、他の大豆近縁種には脱アセチル化されたタイプのサポニンも含めてAグループサポニンに相当するバンドは検出されなかった (Fig. 5)。

以上の結果とこれらの大豆近縁種の起源や分化に関する情報から以下のようなことが考察される。現在食用として扱われている“大豆”は、学名で大豆 (*Glycine max*(L.) Merrill) と呼ばれており、植物分類学上*Glycine*属の*Soja*亜属に属する。1873年、この大豆の祖先種はツルマメ (*G.soja*) であるという提唱が Maximowiczによってなされて以来、この説は多くの研究者によって吟味されてきたが、現在ではほぼ定説になっている。また、この*G.Max*, *G.Soja*を含めた *Glycine*属の分類についてみると、3亜属9種3亜種5変種に分類されている。3亜属は、それぞれ特異的な地理的分布を示し、*Glycine*, *Bracteata*, および *Soja*亜属の分布中心は、それぞれオセアニア、アフリカ、および東アジアである。このような*Glycine*属の分類学的位置付けとそれぞれの種子中のサポニン成分組成の分析結果を比較してみると、*G.max*と*G.soja*にAグループサポニンが存在したが、この結果はこの2種が同じ*G.Soja*亜属に属し、極めて密接な近縁関係にあることと一致している。また、Aグループサポニンが存在したもう一つの種である*G.gracillist*は、1927年に

Species	Saponin type
<i>G.soja</i> koushureiyaseidaizu	Aa
<i>G.soja</i> 4	Aa
<i>G.soja</i> 36	Aa-Ab
<i>G.soja</i> 55	Aa
<i>G.soja</i> 85	Aa
<i>G.soja</i> 86	Aa
<i>G.soja</i> 96	Aa-Ab
<i>G.soja</i> 100	Aa
<i>G.soja</i> 137	Aa
<i>G.gracilis</i> P.I.135-590	Aa
<i>G.wightii</i> Soja Perene	—
<i>G.latifolia</i>	—
<i>G.tomentella</i> Mopiton	—
<i>G.tomentella</i> Lindeman	—
<i>G.clandestina</i>	—
<i>G.canescens</i> White elige	—
<i>G.tabacina</i> Giken	—
<i>G.tabacina</i> Miyakojima-turumame	—

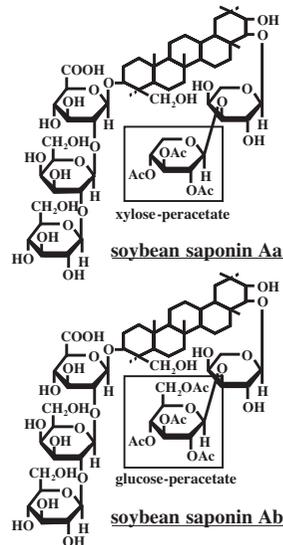


Fig. 4. Structures of soybean saponins Aa and Ab, and type of group-A saponin in seed hypocotyls of wild relatives of soybean.

Skvortzowが中国東北部に分布していたツルマメと大豆の中間的形態を有する半栽培型の種に命名したものである。その後、*G.gracillis*は、独立した種として扱うことも考えられた。しかし、ツルマメと大豆の両方が分布するところで随伴的に見いだされることもあるが、その種の独自の分布は認められないこと、大豆とツルマメの交配子孫から同型のものが容易に分離し固

定できることなどから判断して、*G.gracillis*を独立種と考えるよりツルマメと大豆の自然交雑に由来するという考えが主流になっている。*G.gracillis*の種子におけるAグループサポニンの存在は、この仮説を支持する1つの要因になると考えられる。

最後に大豆近縁種および栽培種におけるAグループサポニンの分布をまとめるとFig. 6のようになる。す

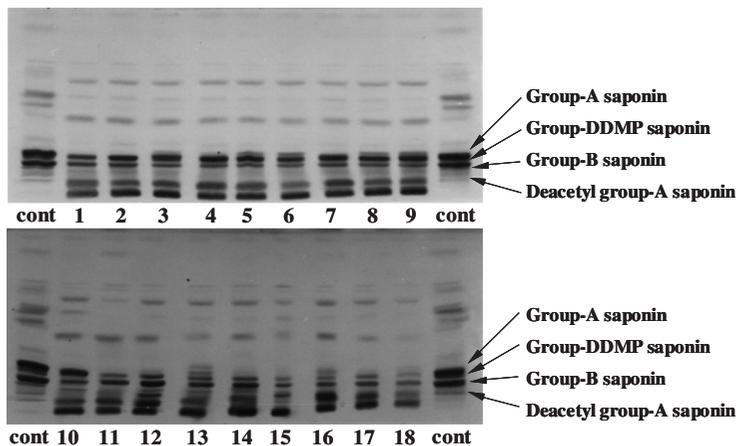


Fig. 5. TLC Patterns of the Ethanol Extract of Seed Hypocotyls from 18 Wild Relatives of Soybean. Cont, 11U fraction from the seed hypocotyls of soybean; lane 1, *G.soja* koushureiyaseidaizu; lane 2, *G.soja* 4; lane 3, *G.soja* 36; lane 4, *G.soja* 55; lane 5, *G.soja* 85; lane 6, *G.soja* 86; lane 7, *G.soja* 96; lane 8, *G.soja* 100; lane 9, *G.soja* 137; lane 10, *G.gracillis* P.I. 135-590; lane 11, *G.wightii* Soja Perene; lane 12, *G.latifolia*; lane 13, *G.tomentella* Mopiton; lane 14, *G.tomentella* Lindeman; lane 15, *G.clandestina*; lane 16, *G.canescens* White elige; lane 17, *G.tabacina* Giken; lane 18, *G.tabacina* Miyakojima-turumame.

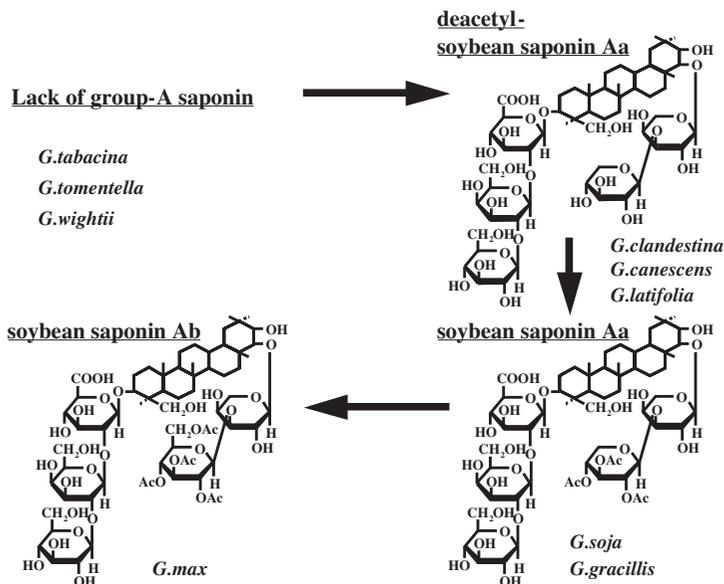


Fig. 6. Distribution of group-A saponins in soybean and wild relatives of soybean.

なわち、Aグループサポニンが全く存在しない種 (*G.tabacina*, *G.tomentella*, *G.wightii*) から脱アセチルサポニンAaが存在する種 (*G.clandestine*, *G.canescens*, *G.latifolia*)、アセチルサポニンAaが存在する種 (*G soja*, *G.gracillia*)、アセチルサポニンAbが存在する種 (*G.max*) へと変遷しているようにみえる。その流れからするとAグループサポニンの生合成にのみ関与する水酸化酵素のcDNAクローニングを行

う場合、Aグループサポニンが全く存在しない種 (*G.tabacina*, *G.tomentella*, *G.wightii*) と脱アセチルサポニンAaが存在する種 (*G.clandestine*, *G.canescens*, *G.latifolia*) の比較、特に同じGlycine亜属に属する *G.tabacina*, *G.tomentella* と *G.clandestine*, *G.canescens*, *G.latifolia* の比較が有効であろうと考えられる。

要 約

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。本研究課題では、著者らが発見したAグループサポニン生合成の鍵酵素(グルクロン酸転移酵素と水酸化酵素)をターゲットとした低不快味・高機能大豆品種の開発に向けて同上酵素のcDNAをクローニングすることを目的とした。まず、たん白質側からのアプローチとして同酵素の精製を試みたが、両酵素ともに膜結合性酵素であり、不安定であること、Aグループサポニンの生合成が行われている登熟期大豆種子胚軸の量的な安定供給が困難であることなどの理由から同酵素を精製することはできなかった。そこで次に、遺伝子情報を基にしたアプローチとして大豆cDNAおよびESTクローンからの検索を行った。まずエンドウ由来グルクロン酸転移酵素PsUGT1に対して高い相同性を示す大豆ESTクローンを複数見つけ、それらのクローンのうち最も相同性が高いクローンを整理した結果、1つのオープンリーディングフレーム(ORF)を組むことができた。このORFとPsUGT1との相同性は69%であった。このことからこの遺伝子は、大豆のグルクロン酸転移酵素をコードしているものと推測した。また、水酸化酵素をコードする大豆cDNAおよびESTクローンを検索した結果、全長配列が明らかにされている16クローンを見出し、それらの中に高度に保存された領域を見つけることができた。さらに、大豆近縁種におけるAグループサポニンを分析したところ、Aグループサポニンが欠失した種 (*G.tabacina*, *G.tomentella*, *G.wightii*) を見出した。この種に関する知見は、Aグループサポニンの生合成にのみ関与する水酸化酵素のcDNAをクローニングするための材料として有効に利用されると考えられる。今後、これらの情報を基にAグループサポニンの生合成に関与するグルクロン酸転移酵素と水酸化酵素のcDNAのクローニングを進める予定である。

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) Shiraiwa M, Nakashima H, Yamamoto N, Tamura T, Matsuda S and Okubo K (1991): Soybean saponin; structures and physiological properties, especially antiviral activity on HIV *in vitro*. *Proceedings of the International Conference of Soybean Processing and Utilization*, 95-101.
- 3) Hayashi K, Hayashi H, Hiraoka N and Ikeshiro Y (1997): Inhibitory activity of soyasaponin II on virus replication *in vitro*. *Planta Med*, **63**, 102-105.
- 4) Kinjo J, Yokomizo K, Hirakawa T, Shii Y, Nohara T and Uyeda M (2000): Anti-herpes virus activity of fabaceous triterpenoidal saponins. *Biol Pharm Bull*, **23**, 887-889.
- 5) Gurfinkel DM and Rao AV (2003): Soyasaponins: the relationship between chemical structure and colon anticarcinogenic activity. *Nutr cancer*, **47**, 24-33.
- 6) Rowlands JC, Berhow MA and Badger TM (2002): Estrogenic and antiproliferative properties of soyasapogenols in human breast cancer cells *in vitro*. *Food Chem Toxicol*, **40**, 1767-1774.

- 7) Miyao H, Arao T, Udayama M, Kinjo J, 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.
- 8) Ikeda T, Udayama M, Okawa M, Arao T, Kinjo J and Nohara T (1998): Partial hydrolysis of soyasaponin I and the hepatoprotective effects of the hydrolytic products. Study of the structure-hepatoprotective relationship of soyasapogenol B analogs. *Chem Pharm Bull*, **46**, 359-361.
- 9) Kinjo J, Imagire M, Udayama M, Arao T and Nohara T (1998): Structure-hepatoprotective relationships study of soyasapogenols I-IV having soyasapogenol B as aglycone. *Planta Med*, **64**, 233-236.
- 10) Philbrick DJ, Bureau DP, Collins FW and Holub BJ (2003): Evidence that soyasaponin Bb retards disease progression in a murine model of polycystic kidney disease. *Kidney Int*, **63**, 1230-1239.
- 11) Yoshiki Y, Kahara T, Okubo K, Sakabe T and Yamasaki T (2001): Superoxide- and 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical-scavenging activities of soyasaponin β g related to gallic acid. *Biosci Biotech Biochem*, **65**, 2162-2165.
- 12) Tsujino Y, Tsurumi S, Yoshida Y and Niki E (1994): Antioxidative effects of dihydro- γ -pyronyl-triterpenoid saponin (chromosaponin I). *Biosci Biotech Biochem*, **58**, 1731-1732.
- 13) McManus OB, Harris GH, Giangiacomo KM, Feigenbaum P, Reuben JP, Addy ME, Burka JF, Kaczorowski GJ and Garcia ML (1993): An activator of calcium-dependent potassium channels isolated from a medicinal herb. *Biochemistry*, **32**, 6128-6133.
- 14) Wu CY, Hsu CC, Chen ST and Tsai YC (2001): Soyasaponin I, a potent and specific sialyltransferase inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun*, **284**, 466-469.
- 15) Oh SR, Kinjo J, Shii Y, Ikeda T, Nohara T, Ahn KS, Kim JH and Lee HK (2000): Effects of triterpenoids from *Pueraria lobata* on immunohemolysis: β -D-gulucuronic acid play an active role in anticomplementary activity *in vitro*. *Planta Med*, **66**, 506-510.
- 16) 白岩雅和, 安田一美 (2004): 「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」大豆たん白質研究, **7**, 32-41.
- 17) Kurosawa Y, Takahara H and Shiraiwa M (2002): UDP-glucuronic acid: soyasapogenol glucuronosyltransferase involved in saponin biosynthesis in germinating soybean seeds. *Planta*, **215**, 620-629.
- 18) 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.
- 19) Woo HH, Orbach M, Hirsch AM and Hawes MC (1999): Meristem-localized inducible expression of an UDP-glycosyltransferase gene is essential for growth and development in pea and alfalfa. *Plant Cell*, **11**, 2303-2315.
- 20) 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.