

大豆サポニンの有する細胞膜抗酸化作用の基礎研究

村田道雄*・蓬台俊宏・諸岡 篤・松森信明・大石 徹

大阪大学大学院理学研究科

Membrane Interaction of Soyasaponins in Association with Their Antioxidation Effect

Michio MURATA, Toshihiro HOUDAI, Atsushi MOROOKA,
Nobuaki MATSUMORI and Tohru OISHI

Graduate School of Science, Osaka University, Toyonaka 560-0041

ABSTRACT

Membrane interaction of soyasaponins, which are reported to possess nutrient and pharmacological effects such as antioxidation, liver-protecting actions, and anti-hypercholesteremia. To obtain the molecular basis for these soyasaponin activities, the present study attempted to investigate the molecular interactions between soyasaponin (Soyhealth SA) and membrane lipids, particularly cholesterol. NMR and MS analysis of the sample soyasaponins indicated the major constituent to be soyasaponin Bb (I). Two kinds of labeled sterols, 3-deutero- and 6-fluoro-cholesterol, which were chemically synthesized from cholesterol, were reconstituted in phosphatidylcholine membrane. The broad band solid-state NMR spectra of these membrane preparations revealed that cholesterol interacted with the saponin in phosphatidylcholine bilayers on the basis of NMR signals characteristic of less oriented and flexible membrane constituents. The NMR spectra of liposomes incorporated with the fluorinated cholesterol also inferred the possibility of their interaction although the high mobility of lipids in liposome membrane obscured their molecular recognition. Further studies for evaluating the molecular interaction of soyasaponins with membrane are currently underway. *Soy Protein Research, Japan* **8**, 81-85, 2005.

Key words : soy saponins, membrane activity, solid state NMR

* 〒560-0041 豊中市待兼山町1-16

本研究は、大豆たん白質とともに有効成分のひとつに数えられる大豆サポニンに着目した。大豆サポニンは抗酸化作用を有し、それによって健康に役立つ効果を有することが明らかとなってきた¹⁾。例えば、免疫的に障害を受けた肝細胞に対しては顕著な保護作用を示すことなどが知られている。本研究では、この保護作用を酸化ストレスに対する保護作用と関連づけるための基礎的研究を行った。すなわち、リン脂質と膜ステロールを含む膜脂質分子と大豆サポニンとの相互作用を精密に解析し、大豆サポニンの生理活性発現メカニズムについて基礎的知見の集積を図った。

われわれの研究室では、細胞膜における脂質分子や外来分子の相互作用を研究してきた。特に、固体NMRを含む物理化学的研究においては、相互作用を炭素-13同位体やフッ素で標識した生体分子の原子距離を指標として評価することに成功している²⁾。すなわち、大豆サポニンについて、膜脂質との相互作用を固体NMRなどで評価することによって、サポニンの生体膜に対する抗酸化作用の分子的機構について理解を深めることができると考えた。今後の研究によって膜脂質に対する相互作用の分子的基盤が解明できれば、大豆サポニンの疾病予防および健康増進における役割になんらかの科学的根拠を提示できるのではないかと期待している。

方 法

大豆サポニンの生物作用は、細胞膜の酸化予防と関連すると考えられる。すなわち、細胞膜脂質と相互作用することによって膜脂質の酸化や活性酸素の発生を防止する可能性を検討する必要があると考えられる。そこで、大豆サポニンとステロール・リン脂質二重膜

との相互作用を核磁気共鳴スペクトル (NMR) によって解析した。

成分分析

財団から恵与頂いたソイヘルスSAの成分を調べるために、水に対する溶解性によって分画を行い、水溶性画分および不溶性画分を得た。各々をDMSO溶液におけるNMRおよびエレクトロスプレーイオン化法による質量分析に供した。

固体NMR測定

生体膜に対する結合状態を調べる目的で、リン脂質二重膜であるDMPC (dimyristoylphosphatidylcholine) 膜系を用いて、大豆サポニンの膜構造に与える影響を固体NMRで評価した。サポニン試料は、財団から御恵与いただいたソイヘルスSAをそのまま用い、膜構造の変化は一般にサポニンと相互作用すると考えられているコレステロールを使用した。具体的には、コレステロールの3位を重水素化した標識体をMurariらの方法³⁾によって化学的に合成した。すなわち、コレステノン (コレステロール3位のケトン体) を重水素化ホウ素ナトリウムによって還元することによって、3 α 位に重水素置換したコレステロール(2)を調製した。DMPC、サポニンと混合して調製した脂質二重膜を二倍量の水で水和することによって調製した膜試料を固体NMR測定に供し、重水素シグナルの四極子分列幅の変化を観測した。

¹⁹F-コレステロールとの相互作用解析

フッ素は生体膜系にはまったく含まれていない元素であるので、フッ素標識すると高感度かつ選択的にNMRシグナルを観測することができる。われわれは、フッ素NMRの観測を通じて、膜結合分子とコレステロールの相互作用の新たな評価法を試みた。Scheme 1に示した方法によって、フッ素標識したコレステロー

EggPC (1×10^{-6} mol) + 6F-cholesterol (3) (1×10^{-4} mol)
 ↓ dissolved in CHCl₃
 ↓ evaporated and dried under vacuum for 10 h.
 ↓ added 200 mM Tris-HCl buffer (27.5 μ L) + D₂O (522.5 μ L)
 ↓ frozen and thawed twice
 ↓ sizing through Liposofast® (200 nm → 50 nm)
 1% 6F-cholesterol (3)-containing liposomes (50 nm)
 in 10 mM Tris-HCl buffer (550 μ L)
 ↓ ¹⁹F NMR measurements
 ↓ added soyasaponin or filipin (3 equivalent to 6F-cholesterol)
 ↓ incubated for 2 h
¹⁹F NMR measurements

Scheme 1. Preparation of 3-fluorocholesterol-containing liposomes for NMR measurements

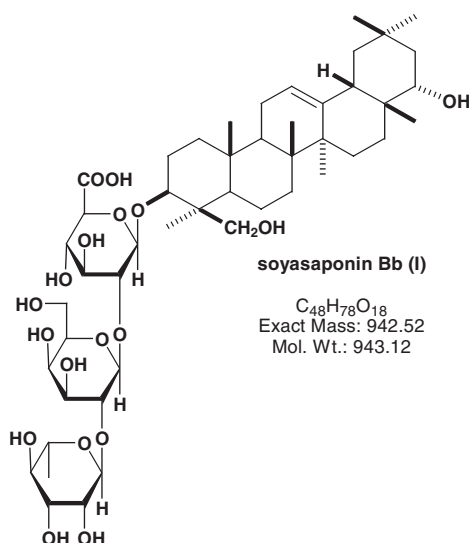


Fig. 1. Major Saponin Constituent, soyasaponin Bb (I) present in the precipitates.

ルを含む人工膜リポソームを作製し、大豆サポニンの影響を調べた。フッ化コlesteroールは、Williamらによって報告されているDAST (diethylaminosulfur trifluoride) を用いたルートによって調製した⁴⁾。

結果と考察

ソイヘルスSAは、数百ppmの濃度においてもヒト赤血球に対して溶血性は示さなかった。つぎに、ソイヘルスSAに含まれているサポニン成分の推定を行った。すなわち、水可溶性画分および不溶性画分を調製して、各々のNMRスペクトルを測定した (Fig. 2)。可溶性画分aは数種のサポニンの混合物であったが、不溶性画分bは比較的純度が高く、質量分析の結果 (Fig. 2) を考慮して、その主成分をsoyasaponin Bb (I) と推定した (Fig. 1)^{5,6)}。

重水素化コlesteroール (2, Fig. 3) の固体NMRス

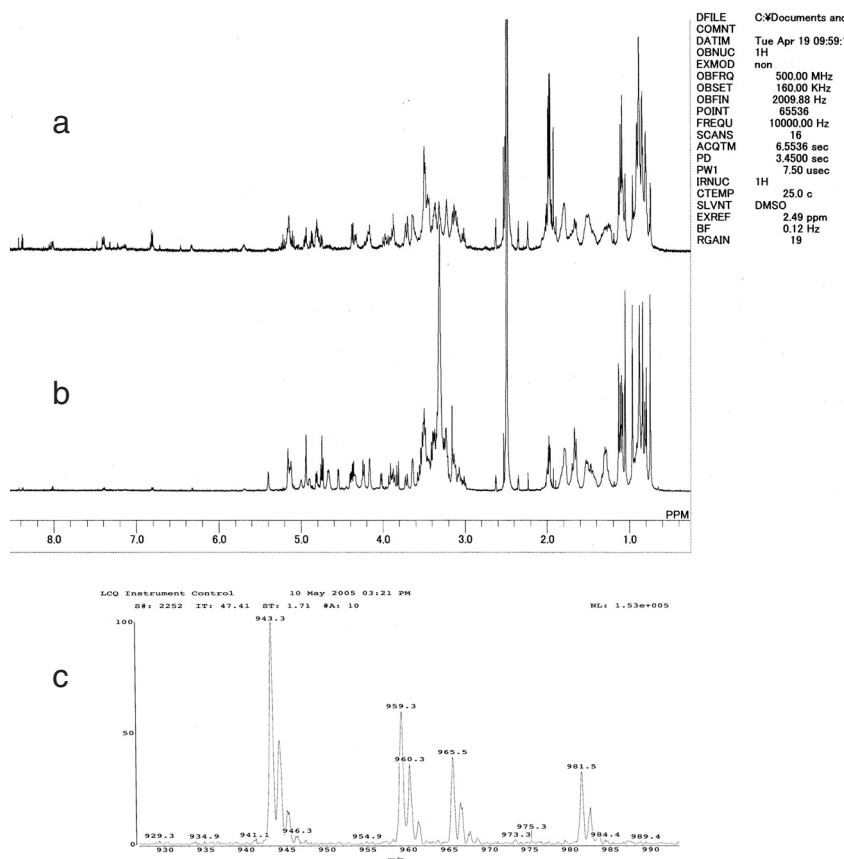


Fig. 2. Saponins present in the precipitates of SoyHealth SA examined by NMR and MS. (a) Water-soluble fraction of SoyHealth SA; (b) Insoluble fraction chiefly containing soyasaponin Bb (I). (c) Electrospray Ionization MS of the insoluble fraction indicating ion peaks as follows: m/z 943.3, soyasaponin Bb (I) + H^+ ; 959.3, soyasaponin Bb (I) (oxidation product?) + H^+ ; 965.5 soyasaponin Bb (I) + Na^+ ; 981.5, soyasaponin Bb (I) + K^+ .

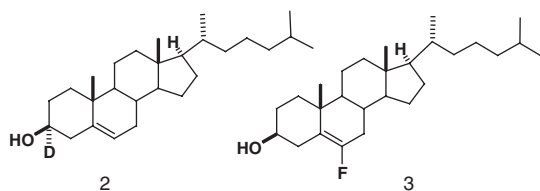


Fig. 3. 3-Deuterium (left) - and 6-fluorine (right) -labeled cholesterols used for NMR measurements.

ペクトルをFig. 4に示した。この膜調製試料は水和の程度が低いので、コレステロール分子は固体状態としての相互作用（磁気双極子相互作用）が観測されていると考えてよい。スペクトルBでは二重膜構造に沿って配向したコレステロールに特徴的なシグナル（図中の*）が認められている。一方で、大豆サポニンをリン脂質に約9%添加した場合に、コレステロールの重水素信号においてラメラ構造の崩壊を示す顕著な変化が認められた。すなわち、二重膜構造中に存在するコレステロールを表す信号が減衰し、ミセルなどに対応する等方的な信号が大部分を占めた。大豆サポニンがコレステロールと相互作用して膜の構造を改変していることが示唆された。

つぎに、より細胞膜に近い水和の程度が高いリポソームでのコレステロールとサポニンの相互作用解析を試みた。流動性の高い状態で高感度にコレステロールの状態を観測するためにフッ素を標識した化合物(3)を用いた。 ^{19}F NMRは敏感に周囲の環境を反映して、緩和時間（ピークの幅などで評価）や化学シフト（シグナルの位置）を変化させることが知られている⁷⁾。Fig. 5bに示したように、soyasaponin Bb (I)を添加した場合には若干のシグナルの広幅化が認められたが、変化の有意性は今後の再検討を待たなければならない。これはコレステロールと複合体を形成することが知られているfilipinを添加した時（Fig. 5c）にも微妙な変化しか認められなかったことを考慮すると、本実験条件（Scheme 1参照）では相互作用が顕著ではないと考えられる。現在、さらに測定法の改良などの検討を進めている。

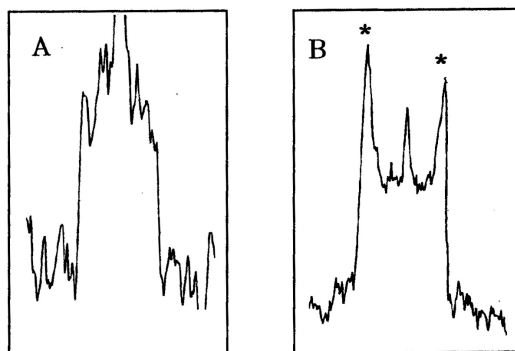


Fig. 4. Broad band solid-state ^2H -NMR spectra of 3-deuteriocholesterol (2). Spectra in the presence of soyasaponins (A) and the absence (B). *Typical pake doublet observed for bilayer membrane structures.

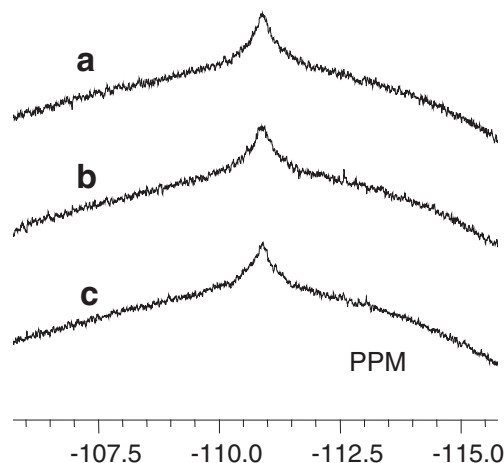


Fig. 5. ^{19}F NMR spectra of 6-fluorocholesterol (3) at 1 mol% bound in egg phosphatidylcholine liposomes. (a) PC only; (b) soyasaponin added (3 equivalent to 3); (c) filipin added (3 equivalent to 3).

要 約

本研究では、soyasaponin Bb (I)を主体する大豆サポニンについて、その膜相互作用をおもにNMRを用いて調べた。すなわち、標識化したコレステロールのNMRシグナルを観測することによって、サポニンと生体膜との相互作用評価を試みた。特に、重水素化コレステロールのNMRシグナルは、サポニンの添加によって顕著に変化し、大豆サポニンがコレステロールと相互作用して膜構造を改変している可能性が示された。その相互作用について、フッ素標識コレステロールとリポソームを用いたNMR実験によって検証を試みた。

文 献

- 1) Yoshiki Y, Kudou S and Okubo K (1998): Relationship between chemical structures and biological activities of triterpenoid saponins from soybean. *Biosci Biotechnol Biochem*, **62**, 2291-2299.
- 2) Matsuoka S, Ikeuchi H, Matsumori N and Murata M (2005): Dominant formation of a single-length channel by amphotericin B in dimyristoylphosphatidylcholine membrane evidenced by ^{13}C - ^{13}P rotational echo double resonance. *Biochemistry*, **44**, 704-710.
- 3) Murari R, Murari MP and Baumann WJ(1986): Sterol orientations in phosphatidylcholine liposomes as determined by deuterium NMR. *Biochemistry*, **25**, 1062-1067.
- 4) William G, Dauben BK and Alex R (1985): Synthesis of 6-fluorovitamin D3. *J Org Chem*, **50**, 2007-2010.
- 5) Kitagawa I, Yoshikawa M, Wang KH, Saito M, Tosirisuk V, Fujiwara T and Tomita T (1982): Revised structures of soyasapogenols A, B and E, oleanene-sapogenols from soybean. Structures of soyasaponins I, II and III. *Chem Pharm Bull*, **30**, 2294-2297.
- 6) Kitagawa I, Wang KH, Taniyama T and Yoshikawa M (1988): Saponin and sapogenol XXXVIII. Structure of soyasaponin A2, a bisdesmoside of soyasapogenol A. from soybean, the seeds of Glycine max MERRILL. *Chem Pharm Bull*, **33**, 598-608.
- 7) 旗野昌弘 (1983): F NMR: その化学への応用と展望, 化学, **38**, 551-557.