

低不快味大豆育種を目的としたAグループサポニンの生合成に関与する 水酸化酵素に関する研究

白岩雅和*・橋浦 淳

茨城大学農学部

Study on Hydroxylase Involved in Biosynthesis of Group-A Saponin for the Breeding of Low Unpleasant Taste Soybean Variety

Masakazu SHIRAIWA and Jun HASHIURA

School of Agriculture, Ibaraki University Ibaraki 300-0393

ABSTRACT

In the soybean seed, group-A and -DDMP saponins exist as intact saponins. Group-A saponin is the main cause substance for the unpleasant taste in a soybean. On the other hand, group-DDMP saponin has various pharmacodynamic properties. Therefore, it is expected that the elucidation and characterization of the enzymes which catalyze biosynthetic reactions 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 hydroxylases, which are the key enzymes of group-A saponin biosynthesis. From the content of group-A saponin and the activities of glucuronosyltransferase and hydroxylases involved in group-A saponin biosyntheses in soybean seeds during development, it has been understood that biosyntheses of soyasapogenol A, which is an aglycon of group-A saponin, are most actively done at the R6 stage. When RT-PCR was done by using degenerate primers for single-stranded cDNA made from soybean seed hypocotyls at the R6 stage, some PCR products were obtained. Sequence analysis will be done for these PCR products. Homology with the known CYPs based on sequence information will be examined for the obtained sequence, the transcript characteristics will be compared by the northern analysis, and the hydroxylase involved only in group-A saponin biosyntheses will be specified. *Soy Protein Research, Japan* **9**, 17-23, 2006.

Key words : soybean, saponin biosynthesis, glucuronosyltransferase, hydroxylase

* 〒300-0393 茨城県稲敷郡阿見町中央3-21-1

大豆種子には、乾燥重量当たり0.2~0.3%のサポニン成分が含まれている。大豆のサポニン成分は、そのアグリコン部分（非糖部）の構造により4つのグループ（A, DDMP, B, Eグループ）に分類されている¹⁻³。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⁴一方、DDMPグループサポニンおよびその派生物であるB, Eグループサポニンは様々な薬理作用（抗ウイルス活性⁵⁻⁷、抗がん活性^{8,9}、肝機能障害に対する保護作用¹⁰⁻¹²）、ラジカルスカベンジャー活性¹³、抗酸化性¹⁴などを有することから、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る。筆者らは登熟期大豆種子中においてAグループサポニンの生合成を抑制し、DDMPグループサポニンの生合成を高めて高付加価値大豆を開発するためのKey enzymeとしてグルクロン酸転移酵素（soyasapogenol glucuronosyltransferase）と水酸化酵素（ β -amyrin-21 hydroxylaseと sophoradiol-21 hydroxylase）を見出した¹⁵（Fig. 1）。グルクロン酸転移酵素に関しては、同酵素のAおよびB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、遺伝子組換え技術を用いずに大豆種子における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¹⁵。実際にグルクロン酸転移酵素の基質特異性に関してBグループサポニンのアグリコンであるsoyasapogenol Bに適した種々の条件で大豆を生育させた時、DDMPおよびBグループサポニン含量が増加し、Aグループサポニン含量が減少する傾向を示す条件も見出されつつある。このような栽培条件によるサポニン成分組成の改変は遺伝子組換え技術を用いないという利点を持つが、Aグループサポニンの生合成を完全に阻害することはできない。そこで本研究課題では、Aグループサポニン完全欠失大豆の開発に向けてAグループサポニンの生合成のみに関与する水酸化酵素のcDNAクローニングを試みた。

方 法

材 料

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、使用するまで-80℃のストック

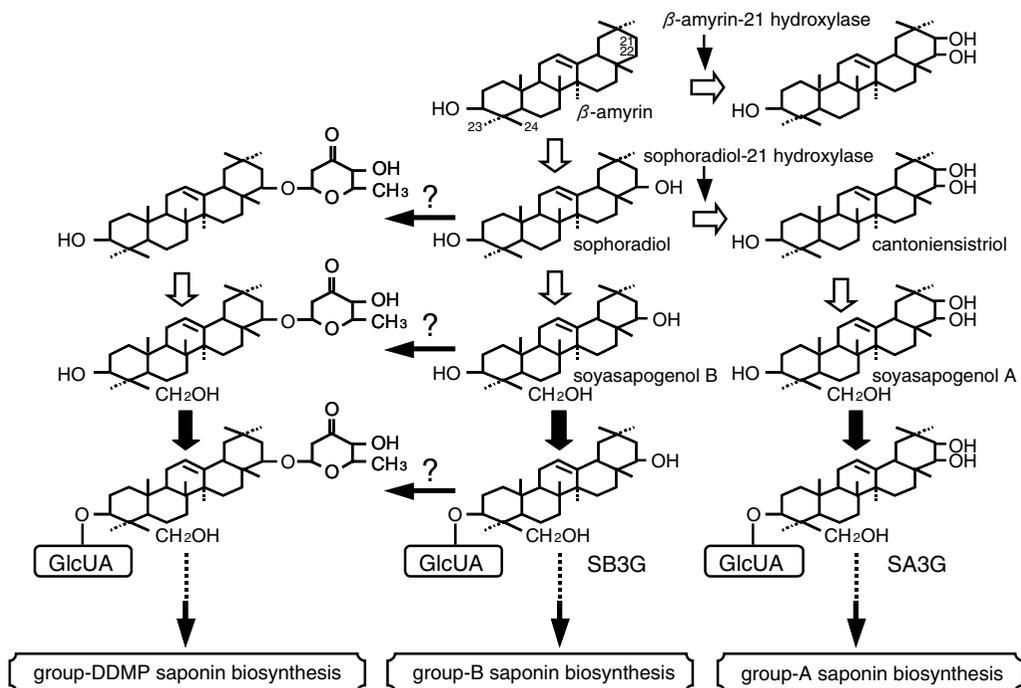


Fig. 1. Proposed pathway of saponin biosynthesis in soybean. The reactions catalyzed with hydroxylase and glucuronosyltransferase are shown with open and closed solid arrows, respectively.

ーで保存した。登熟大豆のステージは、Fehrらの方法¹⁶⁾を用い以下の3段階とした。

- ①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)
- ②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)
- ③大豆種子が完熟した時期
(Reproductive stage 8, 以下R8と略す)

発芽期大豆および登熟期大豆種子のサポニン分析

各時期の大豆を凍結乾燥した後、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 x 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。

登熟期大豆種子におけるグルクロン酸転移酵素および水酸化酵素の活性測定

グルクロン酸転移酵素の活性は以下のように行った。糖受容体として50 μM soyasapogenol A, 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 A-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。

ヒドロキシラーゼ活性の測定は、グルクロン酸転移酵素活性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ミクロソーム画分に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。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。

CYPsの共通部分cDNAのクローニング

サポニン組成分析、グルクロン酸転移酵素および水酸化酵素の活性測定の結果、Aグループサポニンのアグリコンの生合成が盛んに行われていることが推測された大豆未成熟種子 (R6期) からtotal RNAを調製し、cDNAを合成した。次に、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。そこでCoptis (オウレン) から水酸化酵素CYP719を得た際に用いられたプライマー¹⁷⁾を参考に、大豆により適応させたプライマーを新たにデザインした。そのプライマーを用い、cDNAを鋳型としてRT-PCRを行った。さらに増殖断片をTAクローニングし、配列解析を行った。

結果と考察

登熟期大豆のサポニン分析

登熟期におけるサポニン含量の変動をHPLCで分析した。その結果、Aグループサポニンは胚軸のみで検出された。そこで胚軸におけるAおよびBグループサポニンの変動を調べた結果 (Fig. 2), Bグループサポ

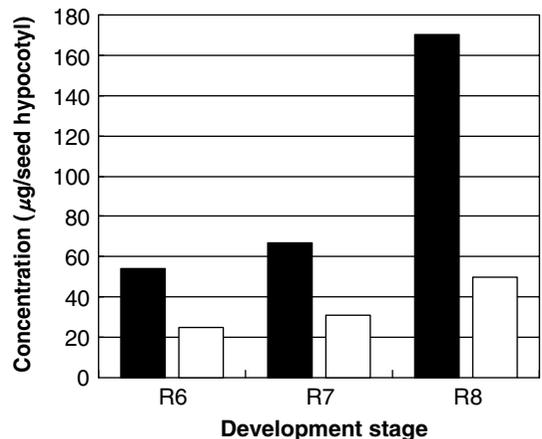


Fig. 2. Saponin contents in soybean seed during development stage. Closed bar, soybean saponin Ab; open bar, soybean saponin Bb.

ニンがR6からR8までの間徐々に増加していったのに対して、Aグループサポニン(R6からR7にかけてわずかに増加した後、R8で急激に上昇した。R8でAグループサポニンの含量が急激に上昇した理由として、アグリコンであるsoyasapogenol AのC-3位に結合する糖鎖に対してC-22位に結合するもう1本の糖鎖が、R7からR8にかけて生合成されていることが推測された。

登熟期大豆におけるグルクロン酸転移酵素活性の変動

登熟期におけるグルクロン酸転移酵素活性の変動について検討した。酵素活性はR6の段階で最も高い値を示し、R7ではR6と比較すると少し活性が落ちたも

の活性はほぼ維持され、R8で種子が完熟するとその活性はほとんど検出されなかった (Fig. 3)。

登熟期大豆における水酸化酵素活性の変動

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. 4)。酵素反応生成物であるSA3Gの生成量は、R6の段階で既に高い値を示し、R7でその値は半分まで減少し、R8ではほとんどなくなっていた。一方SB3Gの生成量は、R6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Aグループサポニン生合成へのバイパスとなる反応経路を触媒するsophoradiol-21 hydroxylase活性とAおよびB

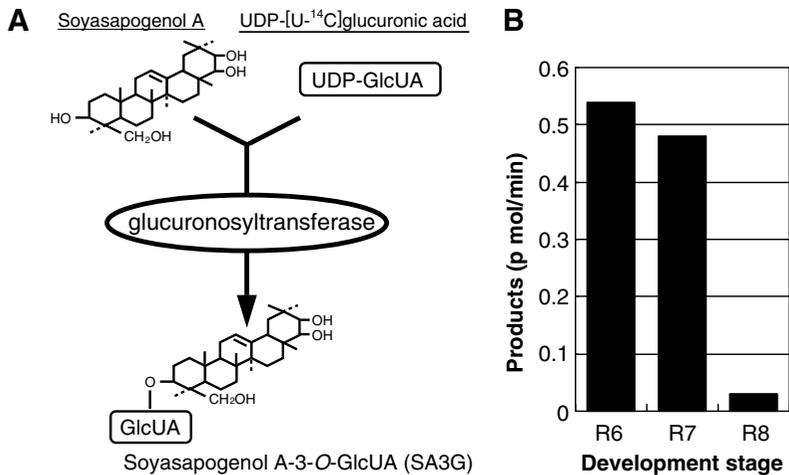


Fig. 3. Glucuronosyltransferase activity in soybean seed during development stage.

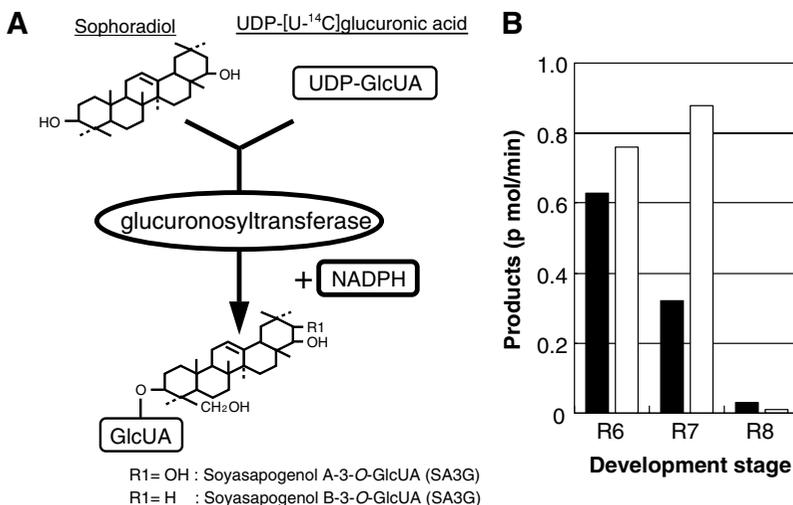


Fig. 4. Hydroxylase activity in soybean seed during development stage. Closed bar enzyme activity was measured by the amount of formation of SB3G. Open bar, enzyme activity was measured by the amount of formation of SA3G.

行った。このうち300 bpのバンドの配列解析の結果、Fig. 6に示したようなC末端側共通配列部分の配列が得られた。この配列に対してBlastを用いて相同性検索を行った結果、得られた配列がCYP73AファミリーであるTrans-cinnamate 4-monooxygenaseであることがわかった。Trans-cinnamate 4-monooxygenaseは、植物の木部に多量に含まれ、植物体の支持に重要なリグニンの生合成に関与する水酸化酵素であるため、大豆植物体中で比較的少量に発現している主な水酸化酵素であることが考えられる。このTrans-cinnamate 4-monooxygenaseの配列が拾えたことから、今回作成し

たディジェネレートプライマーが未知の水酸化酵素の配列を検索するのに利用可能であることが示された。現在、他のPCR産物に対しても配列解析を行っている。今後は得られた配列に対して、一次選抜として配列情報に基づく既知CYP群との相同性を調べ、次に二次選抜としてノーザン解析による転写特性を比較(①登熟時期の異なる胚軸、②登熟期の子葉と胚軸、③発芽期胚軸と登熟期胚軸、④栽培種とAグループサポニン欠損野生種¹⁸⁾)し、Aグループサポニン生合成に関与する水酸化酵素を特定していく予定である。

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に関する研究は、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である水酸化酵素のcDNAをクローニングすることを目的とした。まず、登熟期大豆種子におけるAグループサポニン含量、およびAグループサポニン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活性を調べた結果、Aグループサポニンのアグリコン部分の生合成は登熟R6期に最も盛んに行われていることがわかった。次に、水酸化酵素をコードするダイズcDNAおよびESTクローンの中に高度に保存された領域の配列を基にディジェネレートプライマーをデザインし、R6期の大豆種子の胚軸から調製した一本鎖cDNAに対してRT-PCRを行った結果、いくつかのPCR産物が得られた。現在、これらのPCR産物に対して配列解析を行っており、今後は得られた配列に対して配列情報に基づく既知CYP群との相同性を調べるとともに、ノーザン解析による転写特性を比較することによって、Aグループサポニン生合成にのみ関与する水酸化酵素を特定していく予定である。

文 献

- 1) 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.
- 2) Shiraiwa M, Harada K and Okubo K (1991): Composition and structure of "group B saponin" in soybean seed. *Agric Biol Chem*, **55**, 911-917.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) Hayashi K, Hayashi H, Hiraoka N and Ikeshiro Y (1997): Inhibitory of soyasaponin II on virus replication *in vitro*. *Planta Med*, **63**, 102-105.
- 7) 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.
- 8) Gurfinkel DM and Rao AV (2003): Soyasaponins: the relationship between chemical structure and colon anticarcinogenic activity. *Nutr cancer*, **47**, 24-33.

- 9) 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.
- 10) Miyao H, Arao 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.
- 11) Ikeda T, Udayama M, Okawa M, Arao T, Kinjo J and Nohara T (1998): Partial hydrolysis of soyasaponin I and the hepatoprotective effects of hydrolytic products. Study of the structure-hepatoprotective relationship of soyasapogenol B analogs. *Chem Pharm Bull*, **46**, 359-361.
- 12) 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.
- 13) 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.
- 14) 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.
- 15) 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.
- 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) Ikezawa N, Tanaka M, Nagayoshi M, Shinkyō R, Sakaki T, Inouya K and Sato F (2003): Molecular Cloning and Characterization of CYP719, a Methylenedioxy Bridge-forming Enzyme That Belongs to a Novel P450 Family, from cultured *Coptis japonica* Cells. *J Biol Chem*, **278**, 38557-38565.
- 18) 白岩雅和 (2005): 「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」大豆たん白質研究, **8**, 11-18.