大豆サポニンの有する細胞膜抗酸化作用の基礎研究（第二報）
―膜脂質との相互作用解析―

村田道雄*・蓬台俊宏・山本寛子・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
－Analysis of Biomembrane Interaction－

Michio MURATA, Toshihiro HOUDAI, Hiroko YAMAMOTO,
Nobuaki MATSUMORI and Tohru OISHI

Graduate School of Science, Osaka University Toyonaka 560-0041

ABSTRACT

Soyasaponins are reported to possess pharmacological or health-promoting effects such as antioxidation, liver-protecting actions, and anti-hypercholestelemia. To gain a better understanding of the molecular basis for these biological activities, we attempted to investigate the molecular interactions between soyasaponin (Soyhealth SA) and membrane lipids. In a previous study, the broad band solid-state NMR spectra of these membrane preparations revealed that cholesterol becomes mobile by the saponin in phosphatidylcholine bilayers on the basis of NMR signals characteristic of less oriented and flexible membrane entities. To examine the membrane permeabilizing effects by saponins, we carried out the NMR-based ion flux experiments. In K^+ flux assays based upon ^{31}P NMR chemical shifts, soyasaponin Bb(1) revealed a marginal increase of the ion flux through egg-phospahtidylcholine large unilamellar vesicles (eggPC LUV). This partial permeabilizing activity was not affected by the addition of cholesterol. In Mn^{2+} flux experiments, the soyasaponin did not virtually show any activity, whereas quillajasaponin revealing the significant ion flux at 1 mol% in the PC membrane. Further studies for evaluating the molecular interaction of soyasaponins with unsaturated phospholipid bilayers are currently underway. *Soy Protein Research, Japan* **9**, 82-86, 2006.

Key words：soyasaponins, membrane permeabilizing activity, solid state NMR, ion flux through membranes

*〒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て，サポニンと生体膜モデルとの分子間相互作用についての基礎的知見を得ることを目的とした．大豆サポニンは健康に役立つ抗酸化作用を有することが明らかとなってきた[1]．本年度は，昨年度[2]と視点を変えて，リン脂質や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，植物サポニンに特徴的な生物作用である生体膜の透過性の増大という視点から研究することによって基礎的知見の集積を図った．

方　　法

試料調製：

試料の調製は，昨年度報告した方法に従って行った．すなわち，財団から恵与頂いたソイヘルスSAを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．これを以下のNMR測定に用いた．重水素化コレステロールのNMRについては昨年度報告した通りである[2, 3]．なお，試料の純度は，水素核NMRおよびイオンスプレー質量分析法によって検定し，90%以上であると推定した．また，比較に用いた溶血性植物サポニンとしては，バラ科のキレイ由来のサポニン（quillajasaponin）を粗精製したものを用いた．このサポニン画分の主成分は一種はquillajasaponin 1（Fig. 1）である[4]．

イオン透膜過活性試験：

Fig. 3に示すスキームに従って卵黄フォスファチジルコリンからLUV（大型一重膜リポソーム）を調製した．このリポソームの懸濁液に，塩化マンガンを添加して，外側のリン酸由来のNMR信号を消去して，リポソーム内側のリン酸の^{31}P NMRシグナルを測定した．測定の原理はFig. 3の説明文に記した．また，同様の条件でリン酸塩の^{31}P NMR信号を測定することによって，リポソーム中に侵入するMn^{2+}イオンを観測した．

結果と考察

昨年度の研究によって，ソイヘスル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れず，また，大豆サポニンは脂質二重膜に結合し，重水素標識ステロールの運動性および配向を変化させるが，膜破壊活性が弱いことが固体NMR実験によって示唆された（Fig. 2）[2]．今回は，生体類似膜である卵黄フォスファチジルコリンを用いてイオン透過性に与える影響を調べた．本実験では，脂質二重膜を介した金属イオン（K^+およびMn^{2+}）の透過性を，リポソームに添加したリン酸塩の^{31}P NMRシグナルを指標として膜作用の評価を試みた．大豆サポニンには，膜透過化作用が若干認められたが，抗生物質（アンフォテリシンB）に比べると顕著に弱く，その様式も抗生物

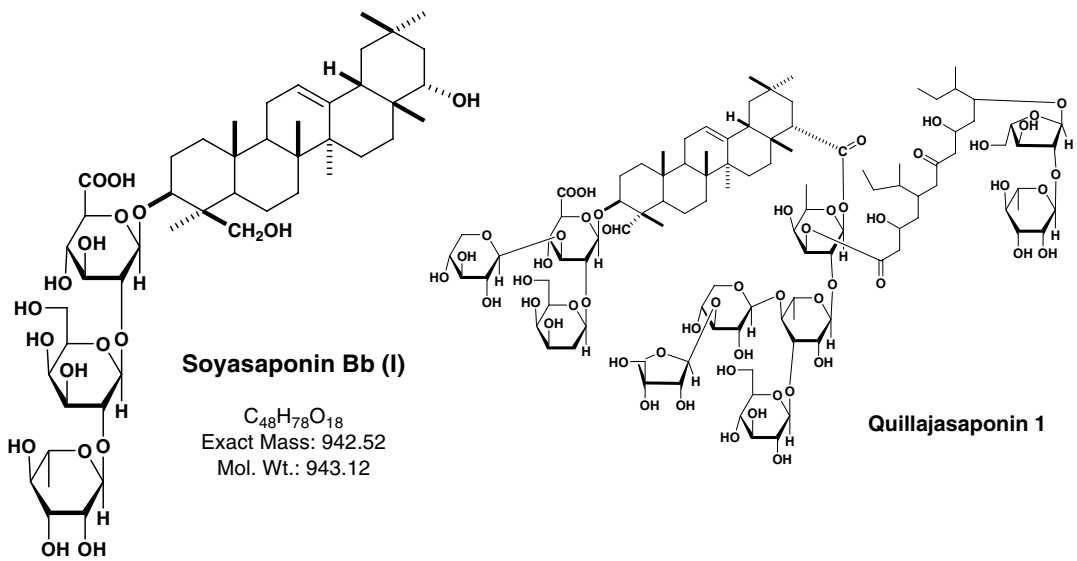

Fig. 1. Major saponin constituents used in the present experiment, soyasaponin Bb (I), and typical hemolytic plant saponin, quillajasaponin 1 used as a positive control.

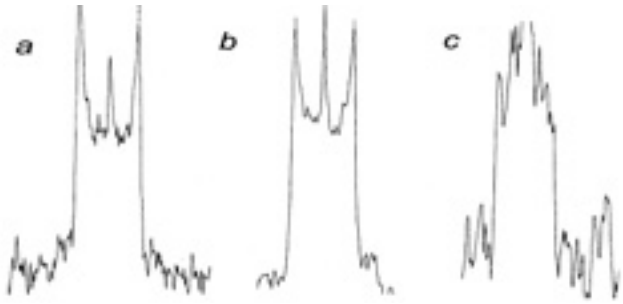

Fig. 2. Broad band solid-state ^{2}H-NMR spectra of 3-deuterocholesterol (2). Spectra of egg-phosphatidylcholine only (*a*), plus 10% cholesterol (*b*), and plus soyasaponins (*c*). The spectra *b* and *c* were cited from the previous report.[2)]

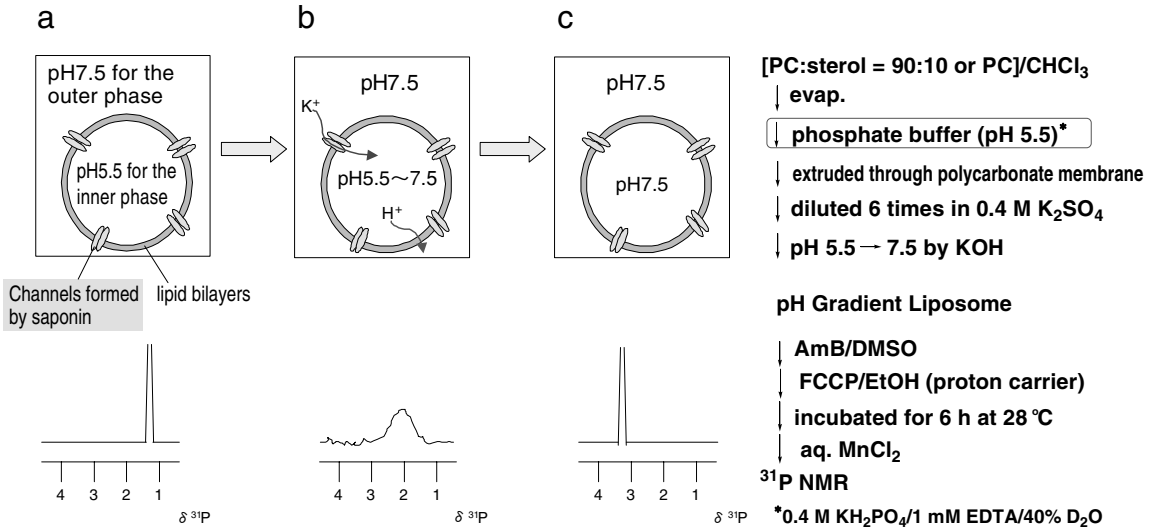

Fig. 3. Schematic illustration of ion channel assays using ^{31}P NMR chemical shift changes.
The peak around δ 1.2 corresponds to HPO_4^{2-} at pH 5.5 of intact liposomes, and that around 3.1 ppm corresponds to PO_4^{3-} at pH 7.5 of the buffer. **a**: at the initial state, a single sharp peak is observed at δ 1.2, showing that liposomes stayed intact. **b**: pH inside the liposome raises gradually due to influx of K^+ coupled with efflux of H^+, which broadens the ^{31}P NMR peak. **c**: finally, the inside pH becomes 7.5 by K^+ influx, which gives rise to the shifted peak the at around 3.1 ppm.

質の大きな流入活性（all-or-none型）に比較すると漸進的な流入（graded型）が主体であることが明らかとなった（Fig. 4）．この弱い活性が，直接膜を障害しているのか，リポソームの融合などを介しているのかはまだ明らかではない．また，膜構成成分としてコレステロールを添加した場合においても大きな変化は認められなかった（Fig. 5）．一方で，バラ科のキレイ由来のサポニン（quillajasaponin）に関してMn^{2+}の流入活性試験を行ったところ，顕著な透過性促進活性が認められた（Fig. 6）．大豆サポニンは前回の報告によって示されたように，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可能性が示唆されたが，膜の透過性を上昇させる活性は著しく弱いことが示唆され，他のサポニンとは異なる膜結合様式を有することが示唆された．これが，生体膜に対する抗酸化作用に関連しているかどうかは今後の検討を待たなければならない．

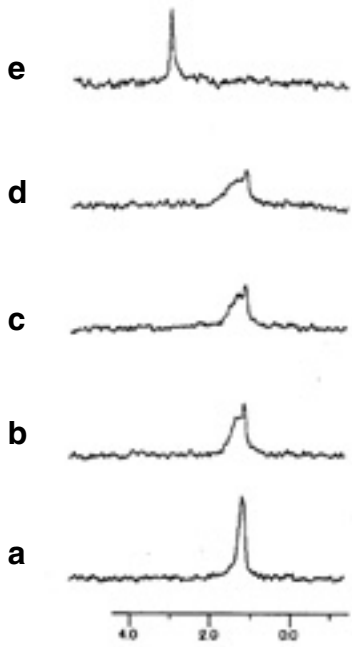

Fig. 4. Time-dependence on ^{31}P NMR signal changes in the presence of 1 mol% soysaponin.
a: 0 h. b: 1 h. c: 1.5 h. d: 2.5 h. e: 100% permeabilized LUV by triton-X. The broadening of the peak toward the down field observed for b, c and d is due to the "graded" type leakage of liposomes.

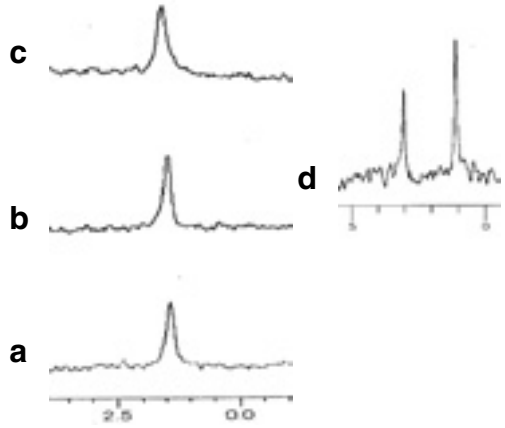

Fig. 5. Effect of 10% cholestreol in PC on ^{31}P NMR signal.
a: control. b: 0.1 mol% soyasaponin. c: 1 mol% soyasamponin. d: amphotericin B causing a typical all-or-none type permeabilization.

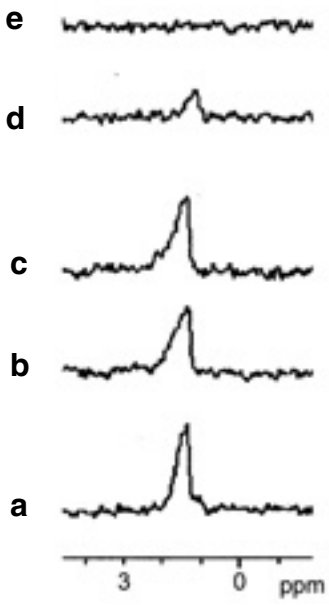

Fig. 6. Mn^{2+} flux in liposomes by soyasaponin and quillajasaponin monitored by ^{31}P NMR singal.
a: control. b: soyasampoin 1 mol%. c: soyasampoin 10 mol%. d: quillajasampoin 1 mol%. e: quillajasampoin 10 mol%. In d and e, the phosphate peak disappear or decrease due to influx Mn^{2+}.

要　　約

大豆サポニン（主成分soyasaponin Bb (I)）について，リン脂質である卵黄フォスファチジルコリンからなるリポソーム膜に対する透過化活性を指標にし，生体膜との相互作用を評価した．以前の固体NMR実験によって示唆されたように，大豆サポニンは脂質二重膜に結合し，重水素標識ステロールの運動性および配向を変化させるが，膜破壊活性が弱いことが示唆された．膜を介した金属イオン（Mn^{2+}）の透過性を指標として膜作用の評価を試みたところ，リン脂質に対して10%モルの添加によって若干のイオン透過化活性が認められたに過ぎなかった．また，膜構成成分としてコレステロールを添加した場合においても大きな変化は認められなかった．一方で，バラ科のキレイ由来のサポニン（qullajasaponin）に関して同様の実験を行ったところ，顕著な透過性促進活性が認められた．大豆サポニンは，膜の透過性を上昇させる活性は著しく弱いことが示唆され，他のサポニンとは異なる様式で膜に結合し，抗酸化作用を示している可能性が示唆された．

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) 村田道雄，蓬台俊宏，諸岡　篤，松森信明，大石徹 (2005): 大豆サポニンの有する細胞膜抗酸化作用の基礎研究，大豆たん白質研究，**26 (8)**, 81-85.
3) Murari R, Murari MP and Baumann WJ (1986): Sterol orientations in phosphatidylcholine liposomes as determined by deuterium NMR. *Biochemistry*, **25**, 1062-1067.
4) Higuchi R, Komori T (1987): Structures of compounds derived from the acyl moieties of quillajasaponin. *Phytochemistry*, **26**, 2357-2360.
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.