

大豆と野生ツルマメで見い出された種子サポニン成分組成自然変異体を活用して食品用非遺伝子組換え高機能性大豆を作出するための基礎研究

塚本知玄^{*1}・龍崎菜々¹・田山一平¹・笹間博子¹
高田吉丈²・加藤 信³・菊池彰夫³・石本政男⁴・喜多村啓介⁵

¹岩手大学農学部 ²(独)農業研究機構・近畿中国四国農業研究センター

³同・東北農業研究センター ⁴同・北海道農業研究センター ⁵北海道大学大学院農学研究院

Production of Non-Genetically Modified Food-Use Soybeans with High Functional Properties Using Soybean- and Wild Soybean-Natural Variants with Different Composition of Seed Saponin Components

Chigen TSUKAMOTO¹, Nana TATSUZAKI¹, Ippei TAYAMA¹, Hiroko SASAMA¹,
Yoshitake TAKADA², Shin KATO³, Akio KIKUCHI³,
Masao ISHIMOTO⁴ and Keisuke KITAMURA⁵

¹Faculty of Agriculture, Iwate University, Morioka 020-8550,

²National Agricultural Research Center for Western Region

³Tohoku Region and ⁴Hokkaido Region

⁵Graduate School of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo 060-8559

ABSTRACT

Soybean saponins are divided into two groups: Group A saponins which are the primary cause of undesirable tastes, and DDMP saponins which possess health beneficial characteristics. The degree of the taste characteristics and functional properties of saponin components depend on their chemical structures and density in the seeds. Genetic improvement of the saponin composition and density of food-use soybeans is expected to spread rapidly worldwide; however, the relationship between genetic modification of saponin composition and accompanying changes in saponin contents is not yet clearly understood. Therefore, in this study, some mutants discovered in *G. max* collections and wild *G. soja* accessions in Japan which carry different saponin compositions were used to prepare hybrid F₁ seeds, progeny F₂ and F₃ seeds, and recombinant inbred lines (RILs). Saponin compositions and contents having different combinations of genes controlling the sugar chain sequences at the C-3 and C-22 positions of soyasapogenol glycosides were determined by LC/PDA/MS/MS analysis and were evaluated by statistical analysis. Different combinations of the genes (phenotypes) did not change seed

*〒020-8550 盛岡市上田3-18-8

saponin contents even though their saponin composition was changed according to the combinations of the genes. These results suggest that the supply of common precursors (soyasapogenols A and B) in saponin biosynthesis is not changed by the combination of these genes, and that saponin precursors (soyasapogenol glycosides) are competitively used as the substrates of some glycosyltransferases according to the recombination of the genes. Production of expected, specific, or sole saponin component in soybean seeds by using soybean- and wild soybean-natural variants would be possible. *Soy Protein Research, Japan* **13**, 43-50, 2010.

Key words : *Glycne max*, *Glycine soja*, saponin polymorphism, sugar chain sequence, Non-GMO soybeans

大豆サポニンとはオレアナントリテルペン（アグリコン基本骨格）配糖体の総称であり、50種類にも及ぶ多種多様な分子種が存在する¹⁾。ソヤサポゲノールAをアグリコンとするグループAサポニン類は不快味原因成分であると報告されている²⁾が、ソヤサポゲノールBをアグリコンとするDDMPサポニンとその分解産物類では、日常的な大豆摂取量レベルにおいて抗高脂血症作用³⁾、ヒト大腸がん細胞増殖抑制作用^{4, 5)}、甲状腺ホルモン分泌促進作用⁶⁾等、人々の健康維持に有用と示唆される生理活性が報告されている。これらの特性は、サポニンの化学構造の差異と摂取量とに依存しているため、大豆種子中のサポニン組成と含量を人為的に制御することができれば、大豆の食品機能性と味もまた人為的に改変できると考えられる。これまでに、種子サポニン組成変異大豆とツルマメとの交配実験から、サポニンの化学構造決定に関わるいくつかの遺伝子座が報告され⁷⁾、種子サポニン組成の改変は遺伝育種的手法での制御がある程度可能となっている。しかしながら、これらの遺伝子座に座乗する遺伝子の組み合わせの違いが種子サポニン量に影響を与えるかどうかは不明であった。そこで本研究では、これら遺伝因子の組み合わせの違いが種子サポニン含量に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

方 法

サポニン組成が異なる交配後代および組換え自殖系統 (RIL) の育成

アグリコンC-3位糖鎖へのグルコースとアラビノース付加にそれぞれ関与する*Sg-3*、*Sg-4*遺伝子座と、C-22位糖鎖末端糖の多型性に関与する*Sg-1*遺伝子座の遺伝子型が異なる品種系統（おおすず、御厨青、col/

熊本/1983/芹口-1、茨城豆7号、きぬさやか）間の交配から、これらの遺伝子型を種々の組み合わせで有する後代系統（F1, F2, F3種子）あるいは組換え自殖系統（RIL）を東北農研センターで育成し、種子を得た。

サポニン成分の定性・定量分析

サポニン成分は、種子を子葉と胚軸に分け80%メタノールを加え室温（20℃）にて24時間、時々攪拌しながら抽出した。アセトニトリル-水系溶媒を用いたODSカラム装着LC/PDA/MS/MS（ESI+）分析装置を用い、溶出時間と各サポニン成分が示す特徴的なMSとMS/MSフラグメントのパターン（プロファイル）から各サポニン成分を同定した。グループAサポニン類は精製サポニンAbあるいは脱アセチルAbを、またDDMPサポニン類は精製サポニンBbを標準物質とし、UV205 nmの吸収で得られる検量線のピーク面積から定量し、乾物100 g当りの μmol 数で示した。

種子胚軸サポニンアグリコンの定量分析

種子胚軸（個体別）に50倍量（w/v）の80%メタノールを加えてサポニン成分を抽出した。抽出液44 μL に濃塩酸4 μL を加え、PCRサーマルサイクラーを用い、85℃、3時間、塩酸加水分解してアグリコンを得た。また、精製したAb、脱アセチルAbならびにBbを用いて同一条件で加水分解し、アグリコン回収率を求めた。アグリコンの定量は、ODSカラム装着HPLC/UV分析装置を用い、精製ソヤサポゲノールAとBのUV205 nmの吸収による検量線を用いて加水分解液中のアグリコン量を求めた後、精製サポニン類のアグリコン回収率を考慮して種子胚軸アグリコン量を算出し、乾物100 g当りの μmol 数で示した。

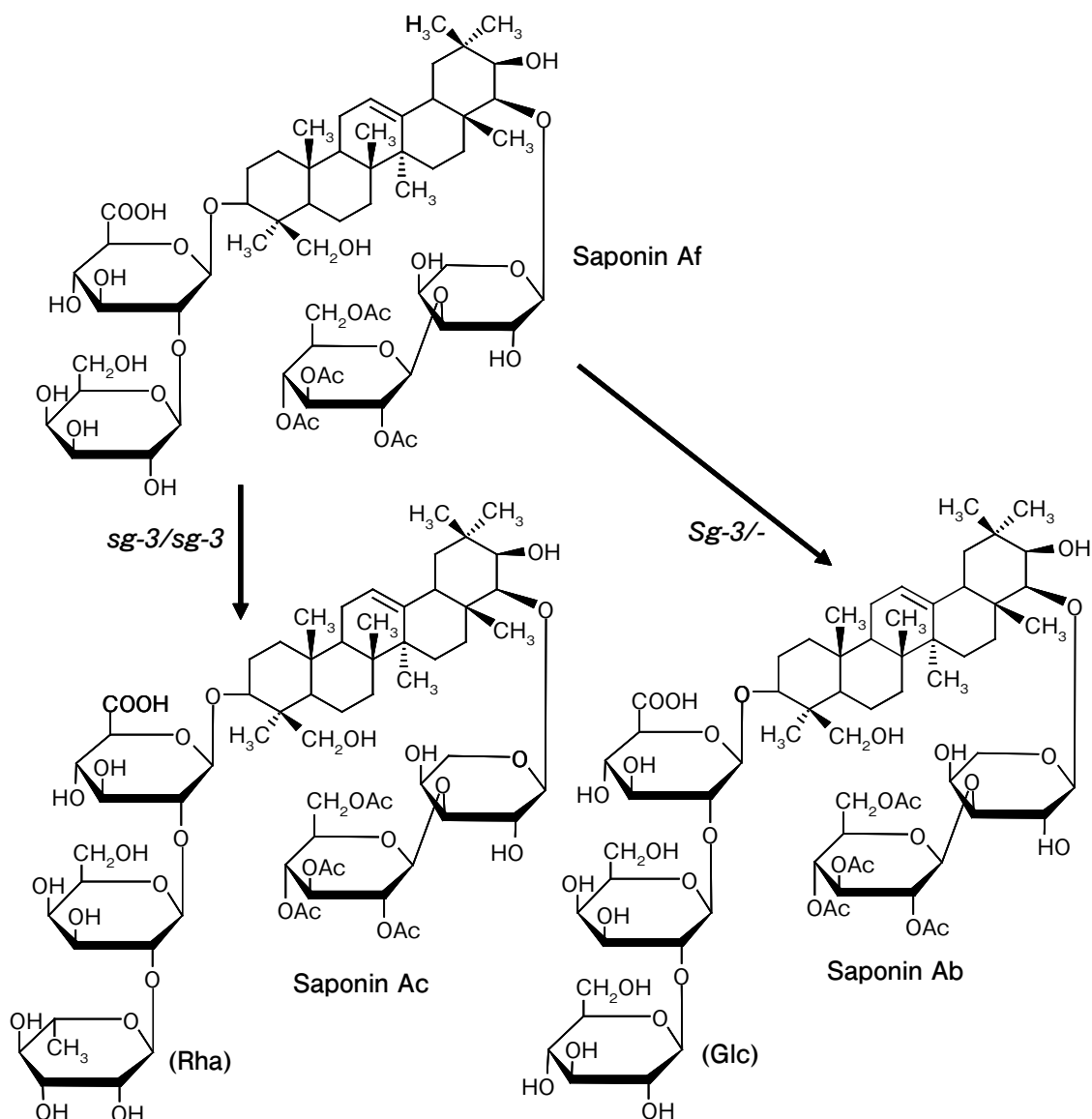


Fig. 1. Biosynthetic pathway of group A saponins Ac and Ab from saponin Af and their related genes (estimation). Genotype *sg-3/sg-3* at the *Sg-3* locus accumulate saponins Af and Ac in the seed hypocotyls. Genotype *Sg-3/-* accumulates saponin Ab in addition to saponins Af and Ac synthesis.

統計解析

二集団の平均値の差は、両者の分散が等しいと仮定して t -検定し、有意水準5%で判別した。

結果と考察

C-3位結合糖鎖の多型性とサポニン量の関係

*Sg-3*遺伝子座にはアグリコンC-3位結合糖鎖末端グルコースの付加に関与する遺伝子が座乗しており、優

性遺伝子 (*Sg-3*: 表現型はAb型, Ac, Afを合成しAbを蓄積) と劣性遺伝子 (*sg-3*: 表現型はAcAf型, Abを合成できず, その前駆体であるAfに加え, 末端糖がラムノースのAcを蓄積) が座乗する (Fig. 1). 劣性AcAf型「御厨青」に優勢Ab型「おおすず」を交配して得られたF₁種子を播種し着生した自家交雑F₂種子191粒の胚軸サポニン組成と含量を分析した。F₂種子の表現型はAb型とAcAf型が150:41に分離した。これら2集団の胚軸中の総グループAサポニン量 (Ab,

Table 1. Group A saponin contents of phenotypes Ab and AcAf in the F₂ seed hypocotyls derived from F₁ hybrid seed obtained by the cross between Mikuriyao (AcAf type) and Osuzu (Ab type).

Phenotype	Genotypes	Seed number	Saponin contents in the hypocotyls [$\mu\text{mol}/100\text{ g}$]			
			Af	Ac	Ab	Total*
Ab	<i>Sg-3/-</i>	150	2.5	8.3	239	250 $\pm$ 56.9
AcAf	<i>sg-3/sg-3</i>	41	111	121	-	232 $\pm$ 50.8

*No significant difference ($p < 0.05$)

-, Not detected.

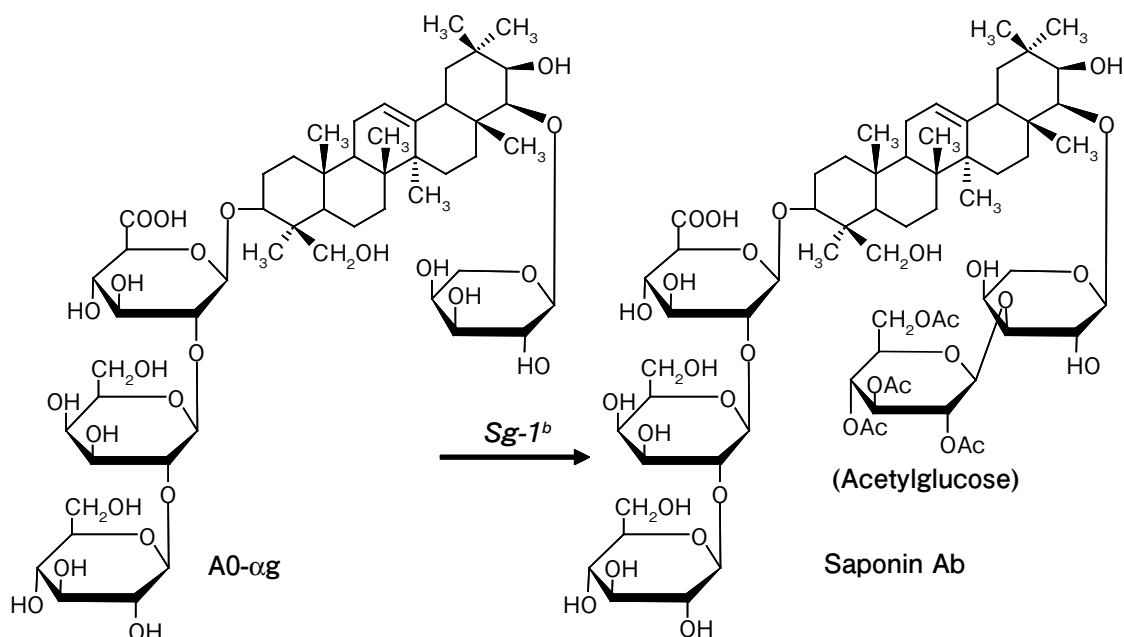


Fig. 2. Biosynthetic pathway of group A saponin Ab from saponin A0- α g and its related gene (estimation). Genotype *sg-1^o/sg-1^o* at the *Sg-1* locus accumulate saponin A0- α g and genotypes *Sg-1^b/Sg-1^b* and *Sg-1^b/sg-1^o* accumulate saponin Ab in the seed hypocotyls.

Ac, Afの総和量)を定量した結果, Ab型とAcAf型の平均値はそれぞれ250 $\pm$ 56.9, 232 $\pm$ 50.8 ($\mu\text{mol}/100\text{ g}$)となり, 両者に差は見られなかった (Table 1).

アグリコンC-3位結合糖鎖の多型性発現に関与するもう一つの遺伝子座*Sg-4* (アグリコンC-3位結合糖鎖へのアラビノース付加に関与) について調べた先行研究⁸⁾でも, 種子サポニン組成の変化はサポニン含量に影響を与えなかった. これらの結果を総合するとC-3位結合糖鎖配列の遺伝的変化は種子サポニン含量に影響を与えないものと考えられる.

C-22位結合糖鎖の多型性とサポニン量の関係

*Sg-1*遺伝子座にはアグリコンC-22位結合糖鎖末端へのアセチル化糖の付加に関与する遺伝子が座乗しており, 優勢遺伝子 (*Sg-1^b*; 表現型はAb型で, サポニンAbを蓄積) や劣勢遺伝子 (*sg-1^o*; 表現型はA0型で,

Abを合成できず, Abの前駆物質であるA0- α gを蓄積) などが座乗する (Fig. 2). 優勢Ab型「おおすず」と劣勢A0型「きぬさやか」のRIL-F₄植物40系統に着生したF₅種子5粒づつを分析した結果, F₄植物40系統の表現型はAb型:A0型=22:18に, またF₅種子192粒の表現型はAb型:A0型=105:87に分離した.

胚軸のDDMPサポニン量はAb型300 $\pm$ 69, A0型264 $\pm$ 43 ($\mu\text{mol}/100\text{ g}$) で両者に有意差はなかったが, グループAサポニン量はAb型248 $\pm$ 69, A0型436 $\pm$ 69 ($\mu\text{mol}/100\text{ g}$) と差が見られた (Table 2). この結果は, 茨木豆7号 $\times$ 野生種ツルマメ (col/熊本/1983/芹口-1) の交配F₂, F₃種子による実験でも同様であった.

これらの結果は, *Sg-1*座に座乗する遺伝子の違いが種子胚軸サポニン含量に影響を与えることを示唆するため, 子葉のサポニン量にも差があるかどうか調べた.

Table 2. Group A saponin contents of phenotypes Ab and A0 in the hypocotyls of RIL-F₅ seeds derived from F₁ hybrid seed obtained by the cross between Osuzu (Ab type) and Kinusayaka (A0 type), F₂ and F₃ seeds from Ibarakimame No.7 (Ab type) and wild soybean *G. soja* (col/Kumamoto/1983/Seriguchi-1; A0 type).

	Phenotype	Genotypes	Seed number	Saponin contents in the hypocotyls [$\mu\text{mol}/100\text{ g}$]		
				Group A saponins*	DDMP saponins	Total*
RIL-F ₅	Ab	<i>Sg-I^b/-</i>	105	248 $\pm$ 69	300 $\pm$ 69	548 $\pm$ 135
(Os x Ki)	A0	<i>sg-I⁰/sg-I⁰</i>	87	436 $\pm$ 69	264 $\pm$ 43	700 $\pm$ 81
F ₂ seeds	Ab	<i>Sg-I^b/Sg-I^b</i>	42	385 $\pm$ 64	596 $\pm$ 90	1060 $\pm$ 319
(Ib7 x soja)	A0	<i>sg-I⁰/sg-I⁰</i>	41	591 $\pm$ 127	626 $\pm$ 129	1216 $\pm$ 232
F ₃ seeds	Ab	<i>Sg-I^b/Sg-I^b</i>	49	124 $\pm$ 33	408 $\pm$ 86	532 $\pm$ 115
(Ib7 x soja)	A0	<i>sg-I⁰/sg-I⁰</i>	49	406 $\pm$ 89	514 $\pm$ 160	920 $\pm$ 235

*Significantly different ($p < 0.05$) between Ab and A0 phenotypes.

Table 3. DDMP saponin contents of phenotypes Ab and A0 in the cotyledons of RIL-F₅ seeds derived from F₁ hybrid seed obtained by the cross between Osuzu (Ab type) and Kinusayaka (A0 type).

	Phenotype	Genotypes	Seed number	Saponin contents in the cotyledons [$\mu\text{mol}/100\text{ g}$]				
				$\beta\text{ g}$	$\beta\text{ a}$	$\gamma\text{ g}$	$\gamma\text{ a}$	Total*
RIL-F ₅	Ab	<i>Sg-I^b/-</i>	105	191	81.5	6.30	5.31	284 $\pm$ 55.1
(Os x Ki)	A0	<i>sg-I⁰/sg-I⁰</i>	89	196	89.6	7.43	6.51	299 $\pm$ 56.0

*No significant difference ($p < 0.05$)

Table 4. Aglycone contents of phenotypes Ab and A0 in the hypocotyls of RIL-F₅ seeds derived from F₁ hybrid seed obtained by the cross between Osuzu (Ab type) and Kinusayaka (A0 type).

	Phenotype	Genotypes	Seed number	Saponin contents in the hypocotyls [$\mu\text{mol}/100\text{ g}$]		
				soyasapogenol A	soyasapogenol B	Total*
RIL-F ₅	Ab	<i>Sg-I^b/-</i>	88	186 $\pm$ 30.5	143 $\pm$ 19.2	329 $\pm$ 37.3
(Os x Ki)	A0	<i>sg-I⁰/sg-I⁰</i>	88	182 $\pm$ 31.5	135 $\pm$ 20.7	318 $\pm$ 41.4

*No significant difference ($p < 0.05$)

その結果、子葉ではサポニン組成多型性は見られず、4種類のDDMPサポニン ($\beta\text{ g}$, $\beta\text{ a}$, $\gamma\text{ g}$, $\gamma\text{ a}$) と微量の分解産物（グループBサポニン成分）が一様に検出され、総和の平均値はAb型284 $\pm$ 55.1, A0型299 $\pm$ 56.0 ($\mu\text{mol}/100\text{ g}$) で両者に差は見られなかった (Table 3)。また、胚軸と子葉のサポニン含量の相関関係も観察されなかった。加えて、Ab型とA0型の胚軸アグリコン総量はそれぞれ329 $\pm$ 37.3, 318 $\pm$ 41.4 ($\mu\text{mol}/100\text{ g}$) となり、両者にも差は観察されなかった (Table 4)。従って、C-3位と同様にC-22位結合糖鎖配列の遺伝的变化も種子サポニン含量に影響を与えないものと考えられる (Fig. 3)。

MS分析によるサポニン合成中間産物の検出

子葉サポニン量と胚軸アグリコン量に差がないにもかかわらず胚軸グループAサポニン量に差が出たことから、全てのA0-agがAbに生合成されるわけではなく、これまで定量されていない別のサポニン成分とし

て種子胚軸中に蓄積している可能性が考えられた。そこで、A0-agからAbに至るまでの中間代謝産物の蓄積の有無を、LC/PDA/MS、MS分析データのプロファイル解析で検索した。Ab型の分析データを脱アセチルAbの分子イオン[M+H]⁺=m/z 1269.6でスクリーニング (SEI-MS) しても17.6分に脱アセチルAbが検出されるだけであるが、A0-agの分子イオン[M+H]⁺=m/z 1107.5でスクリーニングすると、溶出時間15～35分にかけて、1107.5に加えてソヤサポゲノールAのC-22位糖鎖の脱離で見られるm/z=975.5のフラグメントイオンを伴うピークが10⁷のオーダーで多数検出された (Fig. 4)。この結果は、Ab型の抽出液にはA0-agと同じ骨格を持ちながらAbや脱アセチルAbとは糖鎖構造の異なる分子種 (サポニンAbの前駆物質) が多種類、しかもかなりの量で蓄積していることを示唆しているが、詳細については今後の検討が必要である。

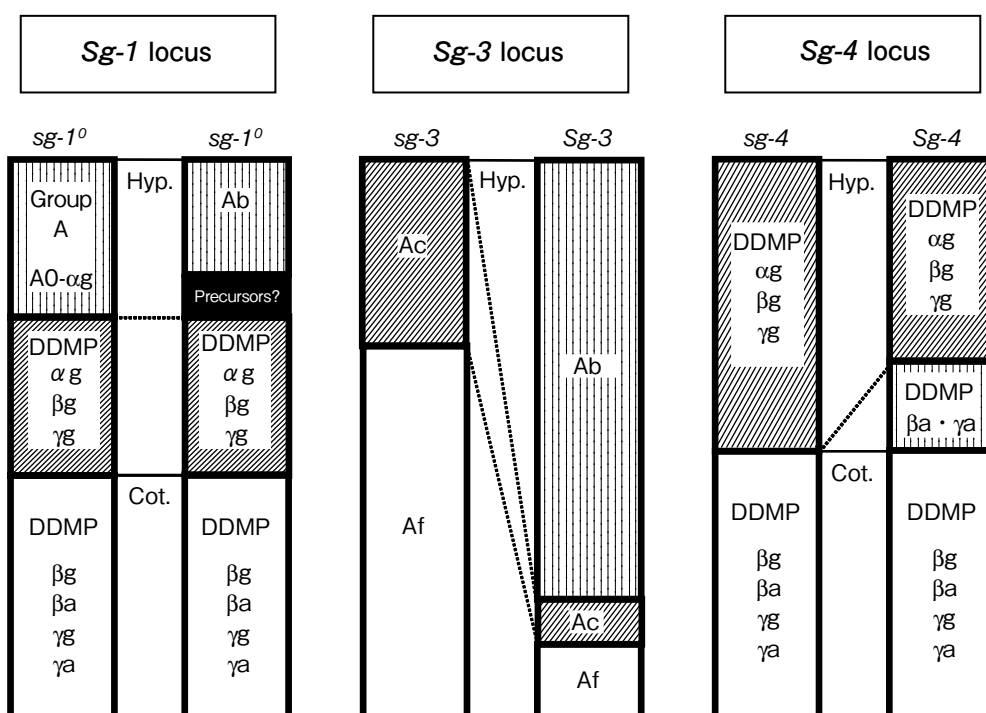


Fig. 3. A conceptual diagram of the relationship between genetic modification of saponin composition and accompanying changes of saponin contents. Supply of common precursors (soyasapogenols A and B) in saponin biosynthesis is not changed by the combination of the genes on the *Sg-1*, *Sg-3* and *Sg-4* loci, and saponin precursors (soyasapogenol glycosides) are competitively used as the substrates of some glycosyltransferases according to the recombination of the genes. Total saponin contents in the seed hypocotyls and cotyledons are independently controlled.

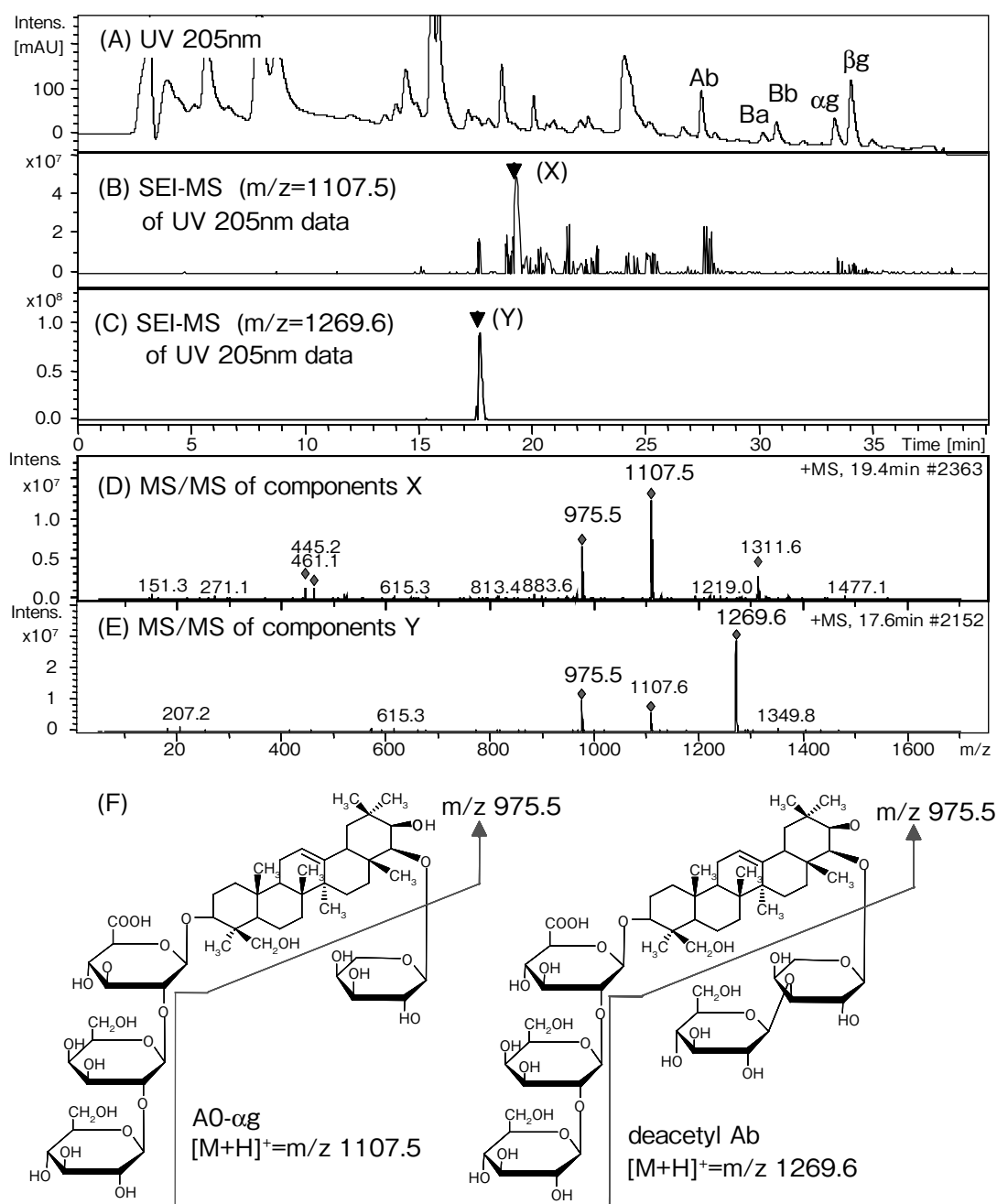


Fig. 4. LC/PDA/MS/MS analysis data of saponin extract from the hypocotyl of an F_3 seed which shows phenotype Ab. (A) UV chromatography at 205 nm. (B) and (C) Screening by selected ion (SEI) mode at m/z =1107.5 and 1269.6, respectively. (D) and (E) MS/MS spectrums of detected components X and Y, respectively, by SEI. (F) Fragmentation of saponins A0- α g and deacetyl Ab.

要 約

大豆種子サポニン糖鎖組成の遺伝的多型に関与する遺伝子座に座乗する共優性・優勢・劣勢遺伝子の組合わせを遺伝育種的手法で変化させた場合、遺伝子の組み合わせに依存したサポニン合成基質分子の奪い合いが起こり、その結果として、個々のサポニン成分は品種特異的かつ種子の部位特異的に変化する（サポニン組成多型性を示す）が、アグリコン合成量は影響を受けないため種子総サポニン量（モル数）は変化しないと考えられる。単一の有用サポニン成分のみを合成・蓄積するような大豆育種は十分に可能であることが示唆された。

文 献

- 1) 塚本知玄 (2010): 配糖体成分 (サポニン, イソフラボン), 大豆のすべて, 喜多村啓介, 他編, (株)サイエンスフォーラム, 東京, pp.145-149.
- 2) 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.
- 3) Murata M, Hodai T, Yamamoto H, Matsumori N and Oishi T (2005): Membrane interaction of soyasaponins in association with their antioxidation effect, *Soy Protein Research*, **8**, 81-85.
- 4) Ellington AA, Berhow M and Singletary KW (2005): Induction of macroautophagy in human colon cancer cells by soybean B-group triterpenoid saponins, *Carcinogenesis*, **26**, 159-167.
- 5) Ellington AA, Berhow M and Singletary KW (2006): Inhibition of Akt signaling and enhanced ERK1/2 activity are involved in induction of macroautophagy by triterpenoid B-group soyasaponins in colon cancer cells, *Carcinogenesis*, **27**, 298-306.
- 6) Ishii Y and Tanizawa H (2006): Effects of soyasaponins on lipid peroxidation through the secretion of thyroid hormones, *Biol. Pharm. Bull.*, **29**, 1759-1763.
- 7) Tsukamoto C, Kikuchi A, Harada K, Kitamura K and Okubo K (1993): Genetic and chemical polymorphisms of saponins in soybean seed, *Phytochemistry*, **34**, 1351-1356.
- 8) 田山一平, 高田吉丈, 鎌田美希子, 湯本節三, 高畑義人, 塚本知玄 (2005): 高サポニン大豆の開発: サポニン組成多型性を制御する遺伝子とサポニン含量の関係. 日本食品科学工学会第52回大会講演集, p.139.