

	ソノ ヘリヨソ
氏 名	孫 慧練
本籍（国籍）	大韓民国
学位の種類	博士（農学）
学位記番号	連研第 803 号
学位授与年月日	令和 3 年 9 月 2 4 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当課程博士
研究科及び専攻	連合農学研究科 生物資源科学専攻
学位論文題目	Efficient profiling base on the database to elucidate chemical structure and biosynthetic pathway of soyasaponins (大豆サポニンの化学構造と生合成経路解明のための効率的なデータベース構築とプロファイル解析)
学位審査委員	主査 岩手大学教授 塚本 知玄 副査 岩手大学教授 三浦 靖 副査 山形大学准教授 笹沼 恒男 副査 弘前大学准教授 濱田 茂樹

論 文 の 内 容 の 要 旨

Soyasaponins are complex molecules consisting of more than 100 structural variations that show various health beneficial and taste characteristics depending on the chemical structure. Soyasaponins contain sugar chains in the molecule but sugar chain sequences having the same molecular mass like a hexose-hexose sequence can not be elucidated by LC-MS analysis. Therefore, time consuming purification steps and instrumental analysis, such as HI-MS, IR, NMR, have always been required.

This research has demonstrated that the chemical structures and biosynthetic pathway of soyasaponins can be elucidated by using a new method called "profiling base on the database" without purification and instrumental analysis.

First, a set of database (LC-MS, genetic information, etc.) of major 36 soyasaponins was created. Among 36 soyasaponins, chemical structures of 20 components have been reported by purification and instrumental analysis. It is also reported that the sugar chain sequences of soyasaponins are strictly regulated by the combination of some genes on independent loci relating to soyasaponin biosynthesis. Thus, by using LC-MS and genetic information without purification and instrumental analysis, we were able to detect the sugar chain sequences containing a glucose and a galactose residue of the remaining 16 soyasaponins.

Second, we evaluated if the profiling based on the database can elucidate the chemical structures of unknown soyasaponins produced by additional enzymatic modification (the other gene is expressed) of aglycone parts other than sugars. The estimated chemical structures of newly discovered Sg-6 saponins found in the wild soybeans were completely consistent with the chemical structures elucidated by purification and instrumental

analysis afterwards.

These results strongly suggest that this newly developed "profiling base on the database" in this research is a very effective tool to elucidate the chemical structure and biosynthetic pathway of soyasaponins. The database can be expanded by adding new soyasaponin information, and it enriches the profiling procedure.

【要旨】大豆サポニンには 100 種類以上にもなる複雑な分子種からなり、化学構造に依存した健康機能性と呈味性を示す。大豆サポニンは分子内に糖鎖を持つが、グルコースとガラクトースのような同じ質量の糖が並んだ場合、LC-MS 分析では糖鎖配列を決定できない。そのため、大豆サポニンの化学構造決定には、多大な時間と労力を要する単利精製操作と精密質量分析、近赤外分析、核磁気共鳴分析などの機器分析が必要であった。

本研究は、単利精製や機器分析無しでも、新手法すなわち「データベース構築とプロファイル解析」により大豆サポニンの化学構造や生合成経路が決定できることを提案するものである。

始めに主要 36 種類の大豆サポニンのデータベース (LC-MS データや遺伝情報等) を構築した。20 種類は既に単利精製物の機器分析結果に基づき化学構造が決定されている。また、大豆サポニン糖鎖配列は生合成に関与するいくつかの独立遺伝子座に座乗する遺伝子の組み合わせで厳密に制御されていることも報告されている。すなわち、遺伝情報を加味することで、単利精製や機器分析無しでも、グルコースとガラクトースを含む残る 16 種類の大豆サポニンの糖鎖配列を LC-MS 情報から決定できる。

次に、データベースに基づくプロファイル解析により、糖以外のアグリコン部位が別遺伝子の発現により酵素修飾された新規サポニンの化学構造を決定できるかどうか評価した。野生大豆から発見されたアグリコン部位が異なる新規 Sg-6 サポニンの推定化学構造は、単利精製して構造解析して決定された化学構造と完全に一致していた。

これらの結果は、本研究で新たに開発した「データベース構築とプロファイル解析」の手法が、大豆サポニンの化学構造と生合成経路の解明に非常に役立つ手法であることを強く示唆している。データベースは新規サポニン情報を追加することで拡張され、それによりプロファイル解析もより精度が上がることになる。

論文審査の結果の要旨

Soyasaponins are complex molecules consisting of more than 100 structural variations that show various health beneficial and taste characteristics depending on the chemical structure. Soyasaponins contain sugar chains in the molecule but sugar chain sequences having the same molecular mass like a hexose-hexose sequence can not be elucidated by LC-MS analysis. Therefore, time consuming purification steps and instrumental analysis,

such as HI-MS, IR, NMR, have always been required.

This research has demonstrated that the chemical structures and biosynthetic pathway of soyasaponins can be elucidated by using a new method called "profiling base on the database" without purification and instrumental analysis.

First, a set of database (LC-MS, genetic information, etc.) of major 36 soyasaponins was created. Among 36 soyasaponins, chemical structures of 20 components have been reported by purification and instrumental analysis. It is also reported that the sugar chain sequences of soyasaponins are strictly regulated by the combination of some genes on independent loci relating to soyasaponin biosynthesis. Thus, by using LC-MS and genetic information without purification and instrumental analysis, we were able to detect the sugar chain sequences containing a glucose and a galactose residue of the remaining 16 soyasaponins.

Second, we evaluated if the profiling based on the database can elucidate the chemical structures of unknown soyasaponins produced by additional enzymatic modification (the other gene is expressed) of aglycone parts other than sugars. The estimated chemical structures of newly discovered Sg-6 saponins found in the wild soybeans were completely consistent with the chemical structures elucidated by purification and instrumental analysis afterwards.

These results strongly suggest that this newly developed "profiling base on the database" in this research is a very effective tool to elucidate the chemical structure and biosynthetic pathway of soyasaponins. The database can be expanded by adding new soyasaponin information, and it enriches the profiling procedure.

【要旨】大豆サポニンには 100 種類以上にもなる複雑な分子種からなり、化学構造に依存した健康機能性と呈味性を示す。大豆サポニンは分子内に糖鎖を持つが、グルコースとガラクトースのような同じ質量の糖が並んだ場合、LC-MS 分析では糖鎖配列を決定できない。そのため、大豆サポニンの化学構造決定には、多大な時間と労力を要する単利精製操作と精密質量分析、近赤外分析、核磁気共鳴分析などの機器分析が必要であった。

本研究は、単利精製や機器分析無しでも、新手法すなわち「データベース構築とプロファイル解析」により大豆サポニンの化学構造や生合成経路が決定できることを提案するものである。

始めに主要 36 種類の大豆サポニンのデータベース (LC-MS データや遺伝情報等) を構築した。20 種類は既に単利精製物の機器分析結果に基づき化学構造が決定されている。また、大豆サポニン糖鎖配列は生合成に関与するいくつかの独立遺伝子座に座乗する遺伝子の組み合わせで厳密に制御されていることも報告されている。すなわち、遺伝情報を加味することで、単利精製や機器分析無しでも、グルコースとガラクトースを含む残る 16 種類の大豆サポニンの糖鎖配列を LC-MS 情報から決定できる。

次に、データベースに基づくプロファイリングにより、糖以外のアグリコン部位が別遺伝子の発現により酵素修飾された新規サポニンの化学構造を決定で

きるかどうか評価した。野生大豆から発見されたアグリコン部位が異なる新規 Sg-6 サポニンの推定化学構造は、単利精製して構造解析して決定された化学構造と完全に一致していた。

これらの結果は、本研究で新たに開発した「データベース構築とプロファイル解析」の手法が、大豆サポニンの化学構造と生合成経路の解明に非常に役立つ手法であることを強く示唆している。データベースは新規サポニン情報を追加することで拡張され、それによりプロファイリングもより精度が上がることになる。

以上より、本審査委員会は、「岩手大学大学院連合農学研究科博士学位論文審査基準」に則り審査した結果、本論文を博士（農学）の学位論文として十分価値のあるものと認めた。

学位論文の基礎となる学術論文

< 主論文 >

1. Haereon Son, Kyosuke Mukaiyama, Yohei Omizu and Chigen Tsukamoto (2021). A fragmentation database of soyasaponins by liquid chromatography with a photodiode array detector and tandem mass spectrometry. *Analytical Science and Technology*, 34(4): 172-179.

< 参考論文 >

1. Hae-Reon Son, Sun-Kyung Oh, Sang-Ok Bae, and Myeong-Rak Choi (2015). Analysis of physicochemical and sensory properties of dolsan leaf mustard pickles. *Journal of Life Science* 25(8): 936-941.
2. Hae-Reon Son, Sun-Kyung Oh, Chigen Tsukamoto, and Myeong-Rak Choi (2016). Quality characteristics of dolsan leaf mustard according to various blanching conditions and liquid chromatography with photodiode array and tandem mass spectrometry analysis. *Korean Society for Biotechnology and Bioengineering Journal* 31(1): 20-26.
3. Hae-Reon Son, Sun-Kyung Oh, and Myeong-Rak Choi (2016). Total polyphenol, flavonoid contents and antioxidant activities of dolsan leaf mustard pickle during storage. *Korean Society for Biotechnology and Bioengineering Journal* 31(2): 100-104.
4. Hae-Reon Son, Sun-Kyung Oh, Sang-Ok Bae, and Myeong-Rak Choi (2016). Analysis of the physicochemical properties and antioxidative activity of napa cabbage pickle. *Journal of Life Science* 26(11): 1275-1281.
5. Hae-Reon Son, Sun-Kyung Oh, Chigen Tsukamoto, and Myeong-Rak Choi (2016). ACE and α -glucosidase inhibitory activity of the glucosinolates in dolsan leaf mustard pickle during storage. *Korean Society for Biotechnology and Bioengineering Journal* 31(3): 165-170.
6. Sun-Kyung Oh, Hae-Reon Son, Ki-Woong Kim, Sang-Ok Bae, Sung-Young Kim, and Myeong-Rak Choi (2017). Quality characteristics of mackerel immersed in sea wind mugwort extract. *Journal of Life Science* 27(9): 1011-1019.
7. Panneerselvam Krishnamurthy, Yukiko Fujisawa, Yuya Takahashi, Hanako Abe, Kentaro Yamane, Kyosuke Mukaiyama, Hae-Reon Son, Susumu Hiraga, Akito Kaga, Toyoaki Anai, Chigen Tsukamoto, and Masao Ishimoto (2019). High throughput screening and characterization of a high-density soybean mutant library elucidate the biosynthesis pathway of triterpenoid saponins. *Plant Cell Physiology* 60(5): 1082-1097.
8. Jagadeesh Sundaramoorthy, Gyu Tae Park, Hae Reon Son, Chigen Tsukamoto, Jeong-Dong Lee, Hak Soo Seo, Jong Tae Song (2019). Molecular analysis of two novel missense mutations in the *Sg-1* gene associated with group A saponin biosynthesis in soybean. *Crop Science* 59(6): 2634-2641.
9. Jagadeesh Sundaramoorthy, Sampathkumar Palanisamy, Gyu Tae Park, Hae Reon Son, Chigen Tsukamoto, Jeong-Dong Lee, Jeong Hoe Kim, Hak Soo Seo, Jong Tae Song (2019). Characterization of a new sg-5 variant with reduced biosynthesis of group A saponins in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]. *Molecular Breeding* 39(11): Article 144.