

大豆サポニンの生理機能性に関する研究

森山達哉

はじめに

わが国をはじめ、世界の先進国諸国では、生活習慣の変化に伴い肥満や高血圧、糖尿病、高脂血症などの生活習慣病が急増しており、社会問題の1つとなっている。内臓肥満を基盤として、耐糖能異常、高脂血症、高血圧といった危険因子が集積することにより脳心血管疾患を起こすリスクが高くなる病態として、メタボリックシンドロームが近年注目されている。メタボリックシンドロームは肥満、とりわけ、体内の脂肪分布（腹部肥満、内臓肥満）とのかかわりが特徴である。内臓脂肪が蓄積することにより腹部肥満になり、代謝異常の発症と関連する。肥満症の研究を基盤にして、メタボリックシンドロームが代謝異常と動脈硬化症に結びつく機序に、内臓領域に蓄積した脂肪細胞とインスリン抵抗性とのかかわりが挙げられる。内臓領域に蓄積した脂肪は皮下脂肪とは異なった機能を呈し、インスリン抵抗性を惹起するサイトカインの分泌を制御することが一因として挙げられる。すなわち、メタボリックシンドロームは肥満症の特徴である内臓蓄積脂肪におけるサイトカインの調節障害を介して筋肉などのインスリン感受性を低下させ、耐糖能異常、脂質代謝異常、血圧異常等を合併し動脈硬化の進みやすい病態を形成していく^(1, 2)。

このような背景の中、肥満や脂質代謝を改善する食品成分の研究が進んでおり、多くの食品成分が脂質代謝を改善する作用をもつとして注目されている。またそれに対するニーズが増大していることから、様々な食品の機能性成分を探索し、その作用機構を解明することは重要である。

脂質代謝を改善する効果を有する食品としては大豆が有名であり、大豆タンパク質やインフラボン類、大豆ペプチド、 β -コングリシニンなどの様々な生理活性物質が含まれ、これら

は主にコレステロールやTG低下作用など脂質代謝調節能を有している⁽³⁻¹⁷⁾。他にも大豆にはレクチンやトリプシンインヒビター、レシチン、トコフェロール、サポニンなど、健康の予防・維持に役立つ成分があることが解明されている。このように、食品中に含まれる成分には身体の脂質代謝機能を予防・改善する効果が多数報告されている一方で、未知の成分や機能が多数あることも事実であり、食品の機能性成分の探索と作用機構を明らかにすることが求められている。大豆サポニンには、抗酸化効果や過酸化脂質の生成を抑制する働き⁽¹⁸⁻²¹⁾、レニン阻害作用による高血圧改善効果⁽²²⁾、抗ガン・抗腫瘍効果⁽²³⁻²⁷⁾、抗炎症作用⁽²⁸⁾抗変異原性⁽²⁹⁾、肝機能保護作用⁽³⁰⁾、アポトーシス誘導^(31, 32)、コレステロール低下⁽³³⁻⁴¹⁾、抗肥満^(42, 43)などが報告・示唆されているが、その他の機能性や詳細な作用機序については十分に明らかになっていない。

そこで本研究では、脂質代謝や抗肥満効果に焦点を当て、大豆サポニンの肥満・糖尿病モデルマウスに及ぼす影響を検証した。

実験方法

実験動物

6週齢雄性の肥満・糖尿病モデルマウスKK-A^y/TaJc1(日本クレア株式会社)を7日間実験動物用固形飼料(オリエンタル酵母工業株式会社)で馴化後、高脂肪食(Control群)あるいは高脂肪食に大豆サポニン配糖体((株)J-オイルミルズ社より供与)を0.4%含む試料(Saponin群)を与えて22±2℃、12時間の明暗サイクルの環境下で10週間飼育した。なお、水は水道水を自由摂取させた。飼育最終日に4時間絶食後、解剖を行い(各n=10)、血清、肝臓、脂肪(精巣周囲、腎臓周囲、腸間膜)を採取した。

なお本動物実験は近畿大学の実験動物委員会の承認を得て行った。

食餌組成

餌は右記の表の通り作製した。サポニンは固形飼料100gあたり0.4g添加した。添加量はごく僅かな量であるためサポニンを加えたことによる栄養素の補正は行わなかった。各飼料サンプルは(株)オリエンタルバイオサービスより購入した。

	Control 群	Saponin 群
カゼイン(純度90%)	22.222	22.222
シュークロース	10	10
AIN-93Gミネラルミックス	3.5	3.5
AIN-93Gビタミンミックス	1	1
コレステロール	0.2	0.2
セルロースパウダー	7.5	7.5
α化-コーンスターチ	40.578	40.178
ラード	10	10
サフラワー油	5	5
サポニン(配糖体)	0	0.4
計 (g)	100	100
水 (ml)	100	100
合計 (g)	200	200

解剖とサンプル採取

採血は麻酔下で尾静脈より行い、血餅分離促進剤の含まれているセパラピットチューブに血液を採取し、3000rpm、4℃で15分間遠心分離し血清を採取した。解剖は試験食投与10週後の16週齢で行った。肝臓と脂肪は摘出後、湿重量を測定した。

血中パラメータの測定

解剖にて採取した血液を3000rpm、4℃で15分間遠心分離して血清を採取した。

血清中のグルコース(和光純薬)、中性脂肪(和光純薬)、総コレステロール(和光純薬)、リン脂質(和光純薬)、レジスチン、アディポネクチン、高分子アディポネクチン(シバヤギ/レビス高分子アディポネクチン-マウス/ラット)、レプチン(モリナガ/ラットレプチン測定キット)、インスリン(モリナガ/マウスインスリン測定キット)を測定した。使用したキットのメーカーは()内に示した。

肝臓脂質の分析

解剖にて採取した肝臓にLysis bufferを添加し、ホモジネートした。肝臓の中性脂肪(和光純薬)、総コレステロール(和光純薬)を測定した。

肝臓タンパク質抽出、定量、Western Blotting法

Lysis Bufferにて肝臓をホモジナイズし遠心分離後、タンパク質を抽出した。抽出サンプルはBCA protein assay(Thermo scientific Pierce)にてタンパク質定量を行い、定法通りSDS化し⁽⁴⁴⁾ Western Blottingに用いた。Western Blottingの転写はセミドライ方式を用い、PVDF膜に転写した。転写後、定法通りブロッキング、1次抗体反応、2次抗体反応を行い、最終的にはECLケミルミネセンス法にて発光検出し、X線フィルムへ露光した。得られたバンドの濃さ(デンストメトリー)の解析は、Alpha Innotech社の FluorChem™ for Windows 2000/XPを用いた。

Real time PCR

セパゾールRNA I Super G(nacalai tesque)を用いて臓器サンプルからTotal RNAを抽出し、抽出したTotal RNAをTURBO DNA-free™(ambion)を用いてDNase処理し、ゲノムDNAを消化した。続いてSuperScript III First-Strand Synthesis for qRT-PCR(invitrogen)を用いて逆転写反応を行い、cDNAを合成した。これをテンプレートとしてSYBR® Premix Ex Taq™ II (TaKaRa)を用いて相対的リアルタイムPCR解析を行った。使用したリアルタイムPCR装置はThermal Cycler Dice® Real Time System(TaKaRa)を用いた。

統計処理

一元配置分散分析のDunnett法とWilliams法を用いた。

結果

1. 体重と摂餌量

摂餌量に差はなかったが、最終体重及び体重増加量はサポニン群において有意に約3g程度低値を示した。

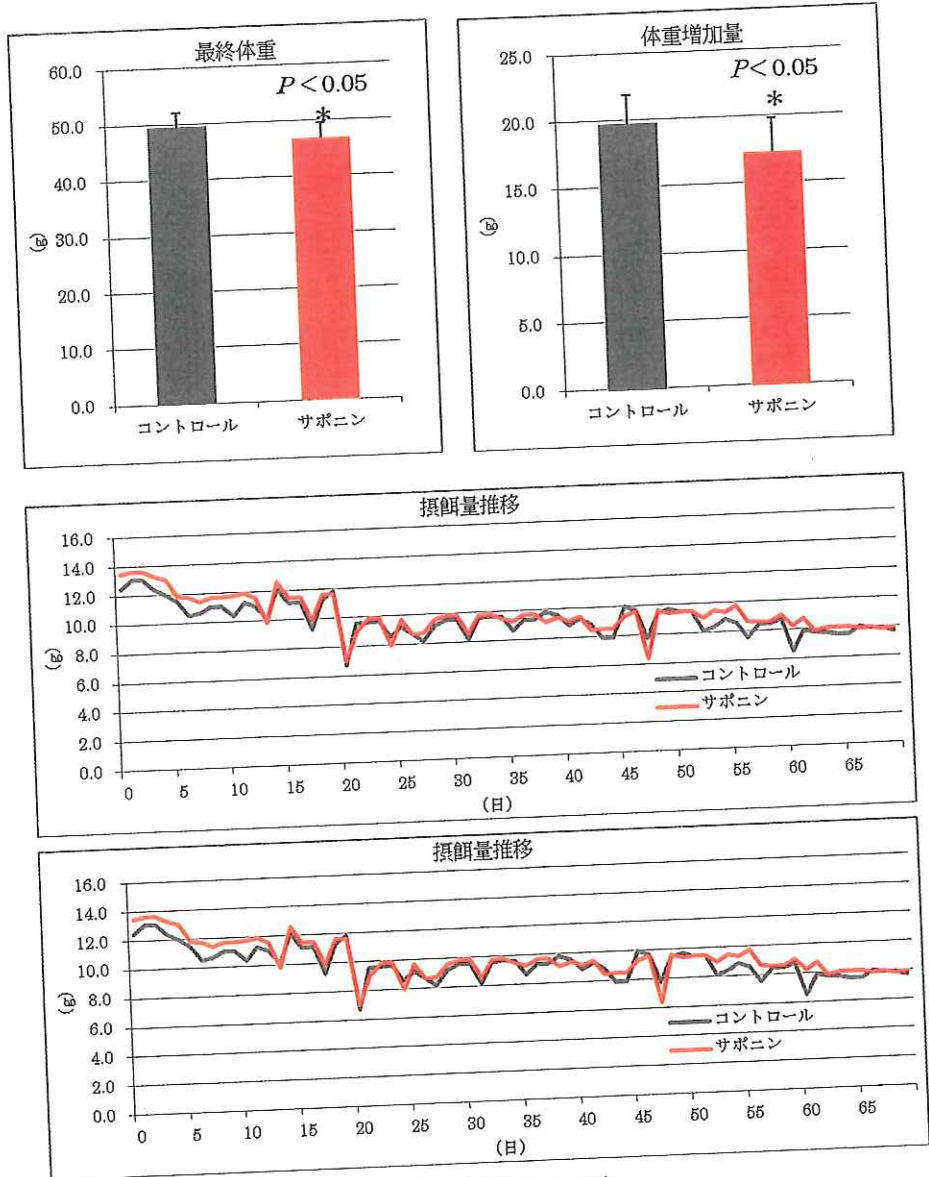


図1. 体重及び摂餌量(n=10)

2. 肝臓重量と各臓器周囲脂肪量

肝臓重量、腎臓周囲脂肪量、腸間膜脂肪量については、有意差はなかったが、精巣周囲脂肪以外はサポニン群にて低値傾向を示した。

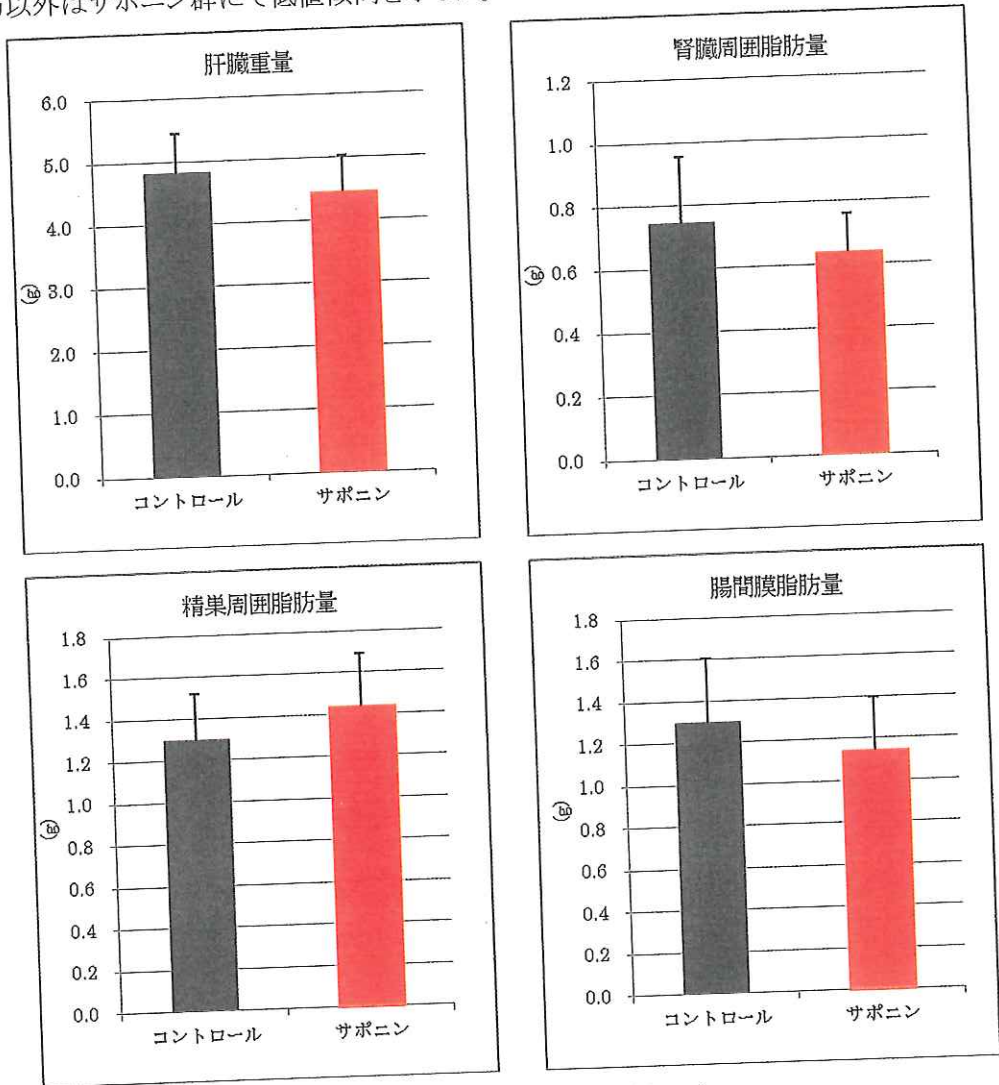


図2. 肝臓及び内臓周囲脂肪量(n=10)

3. 血清パラメーター(1)及び肝臓脂質

血中パラメータでは、TGは変化なく、総コレステロールはサポニン群で低値傾向を示した。サポニン群において肝臓TG量が有意に減少した。

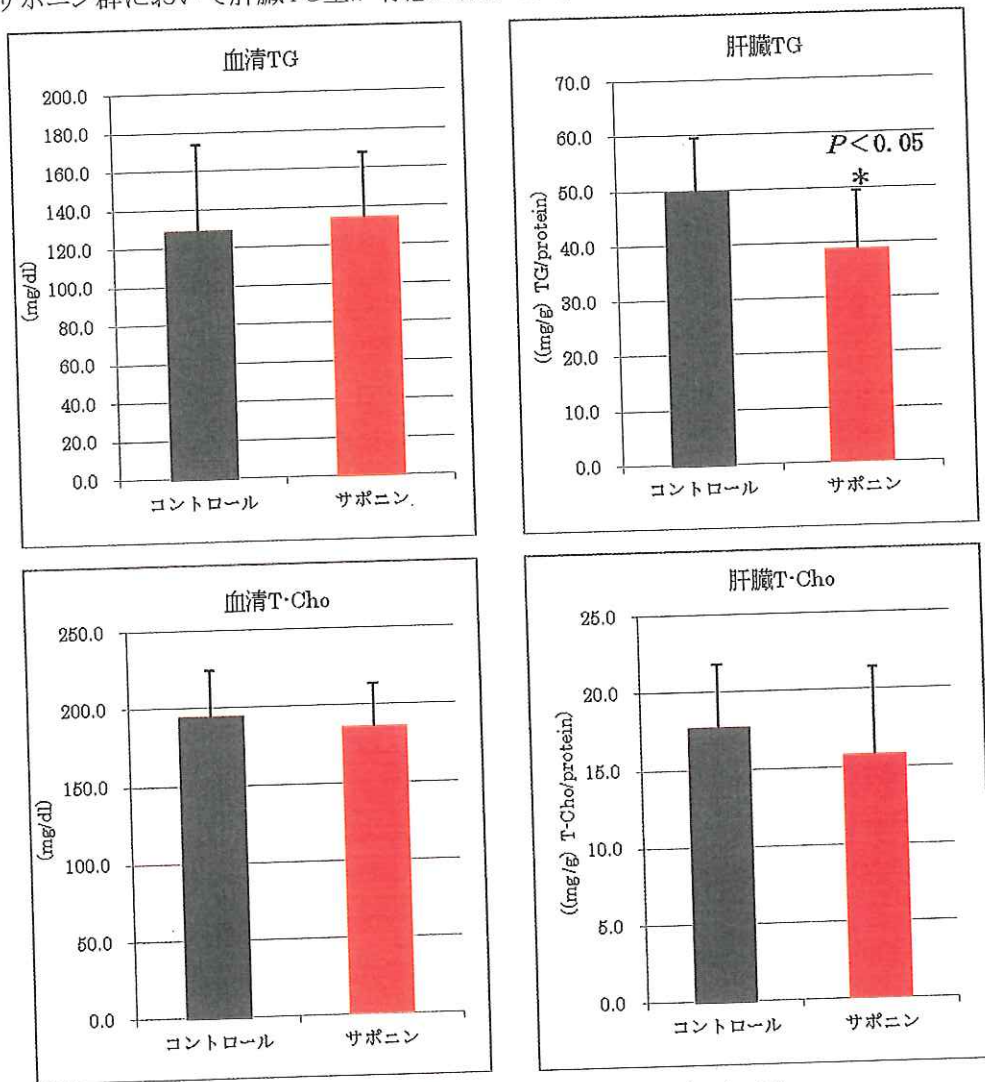


図3. 血清及び肝臓のTG、コレステロールレベル(n=10)

4. 血清パラメーター(2)

サポニン群において、リン脂質は有意に減少し、インスリンは低値傾向を示した。
一方、HDL-コレステロールは高値傾向を示した。

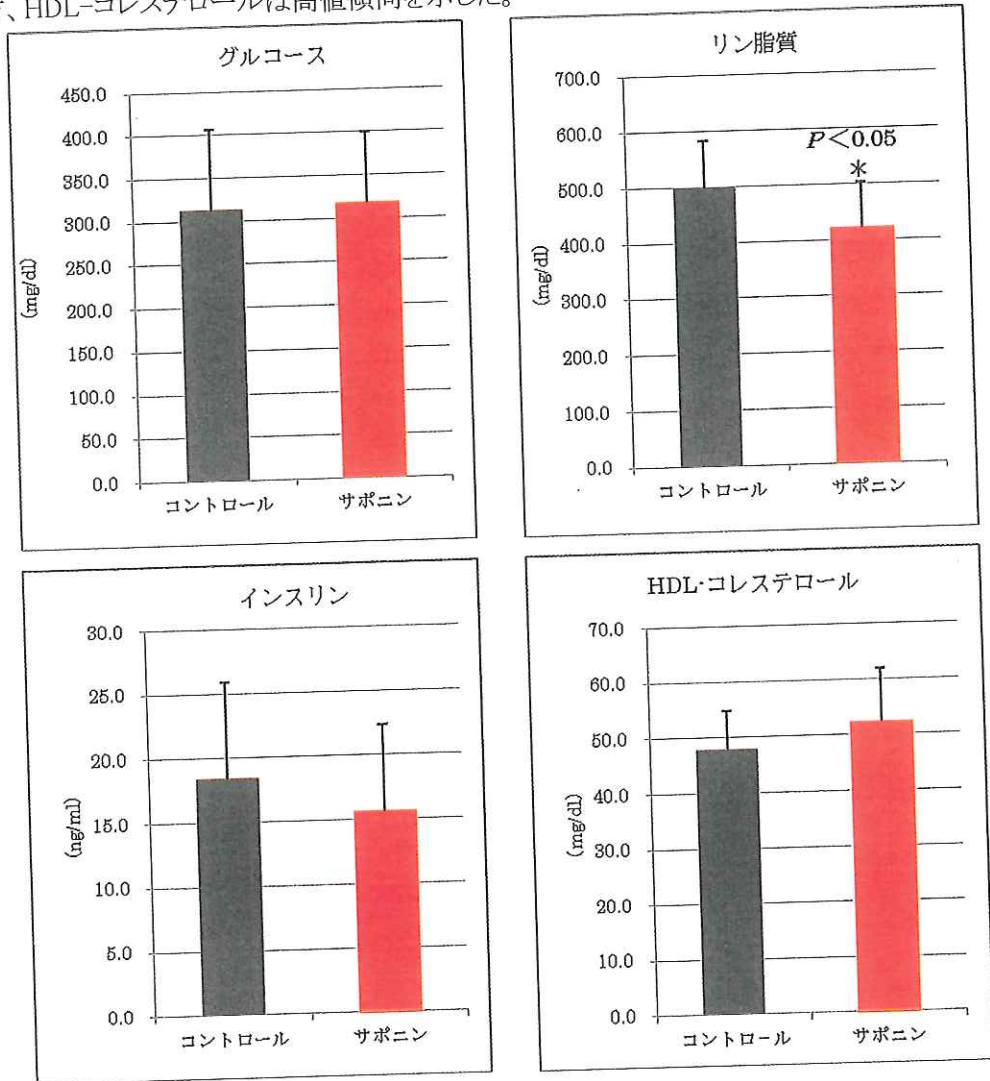


図4. グルコース、リン脂質、インスリン、HDL-Cレベル(n=10)

5. 血清アディポサイトカイン

サポニン群において、善玉アディポサイトカインとして知られる高分子アディポネクチンは有意に高値を示し、内臓脂肪量と関連するレプチン、レジスチンについては低値傾向を示した。

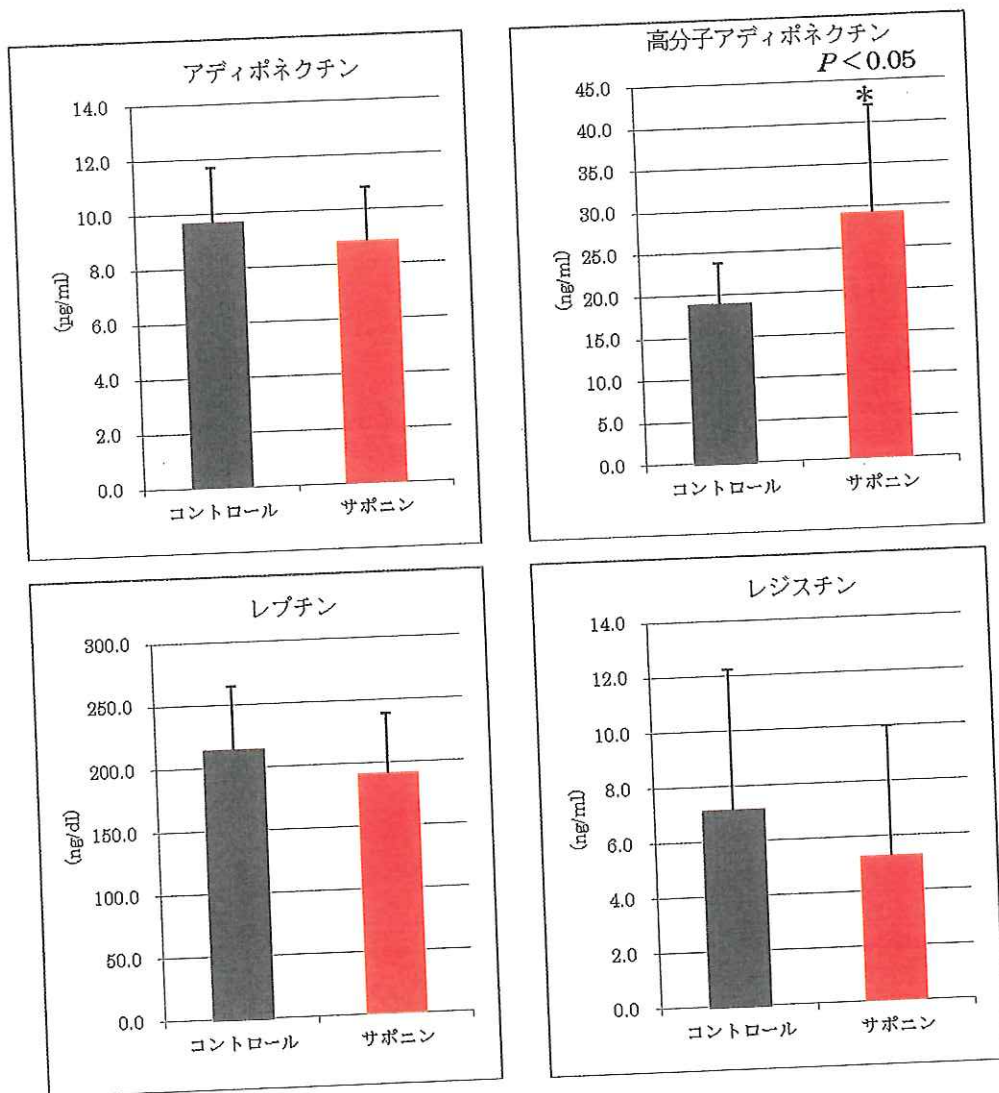


図5. 血清アディポサイトカインレベル(n=10)

6. 肝臓でのPPAR γ 発現

PPAR γ は脂質代謝や糖代謝に関連する核内受容体である。肝臓ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 γ (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ :PPAR γ)の発現は、脂肪肝のモデル動物で増加する。またPPAR γ の肝臓特異的ノックダウンは、肝臓TG濃度を減らし、脂肪肝を防ぐことができるとの報告がある。PPAR γ の標的遺伝子である肝臓脂肪酸転位酵素(Cluster of Differentiation 36:CD36)の発現増加は、脂肪肝を導き、同じくPPAR γ の標的遺伝子である脂肪滴関連タンパク質(Adipose Differentiation-Related Protein:ADRP)の発現増加は、初代ラット肝細胞においてTG蓄積や細胞内油滴を増加させる。これらのことから、PPAR γ は脂肪の摂取の増加に応じて脂肪肝形成に貢献する可能性がある。そこで、肝臓における脂質代謝関連転写因子であるPPAR γ の発現レベルをWestern Blotting法やReal time PCR法を用いて検討を行った。

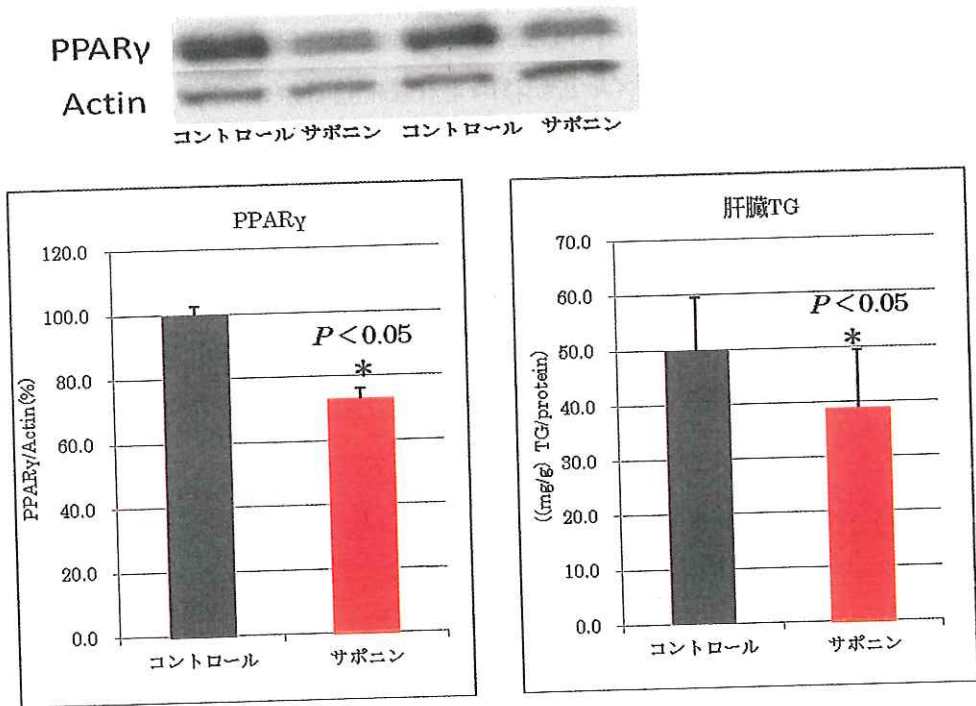


図6. ウェスタンブロットによる肝臓PPAR γ レベル(n=10)

7. 肝臓における遺伝子発現

肝臓TG量の減少のメカニズムを特定するために、Real time PCR法を用いて脂質合成や脂肪分解に関わる遺伝子の発現の変動解析を行った。その結果、Western Blottingの結果と同様にPPAR γ の発現は低下した。しかしPPAR γ の直接標的遺伝子であり、肥満関連脂肪肝への主要な役割を果たす脂肪特異的タンパク質(Fat Specific Protein 27:Fsp27)の発現に変化はなかった。

ステロール調節配列結合タンパク質(Sterol Regulatory Element Binding Protein: SREBP-1c)は、脂肪酸合成酵素(Fatty Acid Synthase:FAS)やアセチルCoAカルボキシラーゼ(Acetyl-CoA Carboxylase:ACC)の脂肪酸合成遺伝子の発現を増加させ脂肪肝を導くことが報告されている。

Control群と比較してSaponin群はSREBP-1c、FAS、ACCの発現が減少した。

脂肪分解に関与するペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 α (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- α :PPAR α)やその調節遺伝子である脂肪酸 β 酸化の律速酵素であるカルニチンパルミトイル基転移酵素(Carnitine Palmitoyl Transferase 1:CPT1a)に変化はなかった。

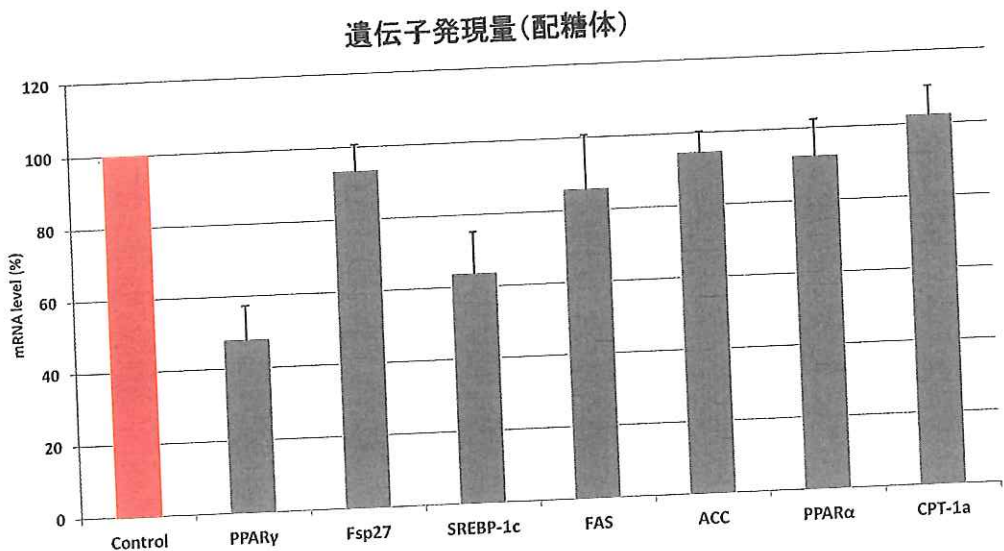


図7. リアルタイムPCRによる肝臓脂質代謝関連遺伝子の発現解析(n=10)

考 察

近年、メタボリック症候群の増加に伴って、脂質代謝を改善する食品成分の研究が進んでいる。中でも、大豆は食経験も豊富で、そのタンパク質が優れたアミノ酸組成だけでなく、さまざまな脂質代謝調節能などの生理機能性を有している。大豆には多くの機能性成分が含まれているが、大豆サポニンに関しては十分な研究が進んでいないため、未だ不明な点が多い。そこで本研究では、メタボリック症候群や脂質代謝に関連する生活習慣病の予防効果に着目し、高脂肪食条件下で大豆サポニン配糖体の肥満・糖尿病モデルマウスKK-A^y/TaJc1に及ぼす影響を検討した。

サポニンは疎水性部分と親水性部分が共存するため界面活性作用をもっており、その溶液を振盪したときに、持続性のある泡沫が生じる物質群の総称である。また、サポニンは多くの動植物に含まれており、その化学構造から主にステロイドサポニンとトリテルペノイドサポニンに分類されている。サポニンを含む植物は生薬としても用いられており、抗炎症、抗潰瘍、抗アレルギーなど、数多くの機能性が報告されている。大豆中に含まれているサポニンである大豆サポニンにはA、B、E、DDMP(2,3-dihydro-2,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one)グループの4種類が存在する。これらの中でEグループは熱に対して不安定であり、Bグループに変換されやすいことが推測されている。また、DDMP配糖体は緩やかな条件で抽出した場合に検出されるが、熱や酸・アルカリによってDDMPは外れやすく、Bグループに変換される。つまり、Eグループ、DDMPグループは不安定さゆえにBグループに変換されやすいため、食品素材として使用できる大豆サポニンは主にAグループ、Bグループで構成されていると考えられる。また苦味、えぐ味などで表される大豆中の不快味成分の一つとして大豆サポニンが挙げられることがあるが、Bグループと比較してAグループにおいて、不快味が強いことが報告されている。また、配糖体にアセチル基が付加することにより不快味が強くなることが推測されている。従って、食品素材という観点からは、Bグループサポニンに富む素材が有望である。今回の研究では、Bグループのリッチなサポニン配糖体を用いた。実際に、マウスにおいては0.4%の混餌では摂餌量に大きな変化はなく(図1)、この程度の混入では味覚的にも問題がなかったと考えられる。

両群ともに平均体重は経時的に増加したが、飼育16日目でControl群と比較しSaponin群

では有意に低値となり、その後ほぼ一定の体重差を維持した(図1)。最終体重や体重増加量に関してもControl群と比較しSaponin群では有意に低値となった(図1)。1日平均摂餌量に関しては、有意な差はなかった。この結果は、サポニン含有することにより飼料効率が低下することを意味しており、糖や脂質の吸収抑制や代謝亢進などが関与していることを示唆している。体重の有意な低下と関連して、肝臓重量、腎臓周囲脂肪量、腸間膜脂肪量などは、Control群と比較してSaponin群で減少傾向であった(図2)。脂肪量の低下はまた、CT解析の結果(データ省略)からも示唆され、Saponin群は皮下脂肪や内臓脂肪がControl群よりも減少(傾向)していることが示唆された。

血清パラメーターでは、血糖値やコレステロールには差はなかったが、Saponin群でリン脂質(PL)が有意な低値を示した(図4)。血中のリン脂質はリポタンパク質の低下を示唆しており、カイロミクロンやLDLなどのリポタンパク質が低下している可能性を示唆している。しかしながら、血中の中性脂肪(TG)では、有意差はなかった(図3)。2型糖尿病モデルマウスにおいて特徴的な血中の高インスリン濃度、高レジスチン濃度、また内臓脂肪量と関連するレプチンに関しては、Saponin群で有意差はなかったが低値傾向を示した(図5)。反対にインスリン感受性や抗炎症作用を有する善玉アディポサイトカインであるアディポネクチンの活性型、高分子アディポネクチン濃度はSaponin群で有意に高値を示した(図5)。これらの結果は、内臓脂肪の低下によるアディポサイトカイン分泌プロファイルの改善を示唆している。また、食餌誘発性脂肪肝に関連する肝臓中の中性脂肪(TG)濃度がSaponin群で有意に低値を示し(図3)、肝臓でのPPAR γ の発現も抗体を用いたタンパク質レベル(図6)、リアルタイムPCRによる遺伝子レベル(図7)ともにSaponin群で有意に低下していた。さらに肝臓TG量の減少のメカニズムを特定するために、Real time PCR法を用いて脂質合成や脂肪分解に関わる遺伝子群の発現の変動解析を行ったところ、PPAR γ の他にも脂肪合成に関わるSREBP-1cが減少傾向であった(図7)。しかしながら、脂肪酸の分解(β -酸化)に関わる転写因子PPAR α や、その下流遺伝子であるCPT-1aなどの発現は変化なく、脂肪酸の異化にはサポニンは影響しないことが示唆された。むしろ、SREBP-1cやPPAR γ の発現抑制から、脂肪酸の合成や蓄積に対して抑制的な作用を示すことが示唆された。

ある種の大豆タンパク質(β -コングリシニン)食によって、肝臓PPAR γ が発現抑制され、肝臓TG量が低下したという知見が報告⁽⁴⁵⁾されており、今回のサポニンの結果と類似してい

る点に興味深い。しかしながらどのような機構で肝臓PPAR γ が発現抑制が引き起こされるかという点は詳細は不明である。

すなわち、体内に吸収されたサポニン(アグリコン)またはその代謝物が、標的臓器のなんらかのターゲット分子(転写因子など)に作用して機能が発揮される可能性の他に、糖や脂肪の吸収抑制、ホルモンレベルの変化などが引き金となって間接的に効果が発揮される可能性もあるため、今後は慎重に検討していく必要がある。

結果として肥満モデルマウスKK-A γ を用いた実験において、コントロール群と比較して大豆サポニン群は、最終体重と血清リン脂質において有意に低値を示した。また、高分子アディポネクチンが有意に高値を示した。肝臓TGにおいても有意に低下させ、PPAR γ 発現を抑制する効果がみられた。したがって大豆サポニン食は肥満時の体重抑制、インスリン抵抗性抑制、脂肪肝抑制などの効果があることが示唆された。

今後は、これらの生理作用の発揮メカニズムをより詳細に解析する必要がある。そのためには培養細胞などを用いた実験の必要があり、現在研究を進めている。また、大豆サポニンの分子多様性が異なる生理機能性を発揮することを示唆する予備的知見を得ており、今後は各分子種ごとに吸収性^(46, 47)や機能性を評価することが望まれる。

謝 辞

本研究を進めるにあたり、ご支援頂きました一般財団法人 杉山産業化学研究所 及びサンプルをご提供頂きました(株)J-オイルミルズファイン研究所に心から御礼申し上げます。

成果発表

1. 学会発表

①「肥満・糖尿病モデルマウスに対する大豆サポニンの影響」

小林知世、臼井恵津子、高橋賢次、吉村征浩、財満信宏、森山達哉、河村幸雄
第51回日本栄養・食糧学会近畿支部大会(宝塚:甲子園大学)(2012.10.20)

②「肥満・糖尿病モデルマウスに対する大豆サポニンの抗肥満効果」

小林知世、境野眞善、山下貴稔、加茂修一、佐藤俊郎、財満信宏、森山達哉、

河村幸雄

日本食品科学工学会第60回記念大会(東京:実践女子大学)(2013.8.30)

2. 原著論文 (執筆中)

参考文献

- 1) 宮崎滋 『メタボリックシンドローム教室』中外医学社 2009
- 2) 岩本康彦 『メタボリックシンドローム up to date 日本医師会生涯教育シリーズ』
日本医師会 2006
- 3) Sirtori, C. R., Agradi, E., Conti, F., Mantero, O., and Gatti, E., Soybean-protein diet
in the treatment of type-II hyperlipoproteinaemia. *Lancet*, **1**, 275-277 (1977).
- 4) Nagata, Y., Ishiwaki, N., and Sugano, M., Studies on the mechanism of
antihypercholesterolemic action of soy protein and soy protein-type amino acid
mixtures in relation to the casein counterparts in rats. *J. Nutr.*, **112**, 1614-1625
(1982).
- 5) Sugano, M., and Koba, K., Dietary protein and lipid metabolism: a multifunctional
effect. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **676**, 215-222 (1993).
- 6) Anderson, J. W., Johnstone, B. M., and Cook-Newell, M. E., Meta-analysis of the
effects of soy protein intake on serum lipids. *N. Engl. J. Med.*, **333**, 276-282 (1995).
- 7) Kito, M., Moriyama, T., Kimura, Y., and Kambara, H., Changes in plasma lipid levels
in young healthy volunteers by adding an extruder-cooled soy protein to conventional
meals. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **57**, 354-355 (1993).
- 8) Potter, S. M., Soy protein and cardiovascular disease: the impact of bioactive
components in soy. *Nutr. Rev.*, **56**, 231-235 (1998).
- 9) Clarkson, T. B., Soy, soy phytoestrogens and cardiovascular disease. *J. Nutr.*, **132**,
566S-569S (2002).

- 10) Sugano, M., Yamada, Y., Yoshida, K., Hashimoto, Y., Matsuo, T., and Kimoto, M.,
The hypocholesterolemic action of the undigested fraction of soybean protein in rats.
Atherosclerosis, **72**, 115-122 (1988).
- 11) Ogawa, T., Gatchalian-Yee, M., Sugano, M., Kimoto, M., Matsuo, T., and Hashimoto,
Y., Hypocholesterolemic effect of undigested fraction of soybean protein in rats fed no
cholesterol. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **56**, 1845-1848 (1992).
- 12) Anthony, M. S., Clarkson, T. B., Hughes, C. L., Morgan, T. M., and Burke, G. L.,
Soybean isoflavones improve cardiovascular risk factors without affecting the
reproductive system of peripubertal rhesus monkeys. *J. Nutr.*, **126**, 43-50 (1996).
- 13) Tovar-Palacio, C., Potter, S. M., Hafermann, J. C., and Shay, N. F., Intake of soy
protein and soy protein extracts influences lipid metabolism and hepatic gene
expression in gerbils. *J. Nutr.*, **128**, 839-842 (1998).
- 14) Fukui, K., Tachibana, N., Wanezaki, S., Tsuzaki, S., Takamatsu, K., Yamamoto, T.,
Hashimoto, Y., and Shimoda, T., Isoflavone-free soy protein prepared by column
chromatography reduces plasma cholesterol in rats. *J. Agric. Food Chem.*, **50**,
5717-5721 (2002).
- 15) Aoyama, T., Fukui, K., Takamatsu, K., Hashimoto, Y., and Yamamoto, T., Soy protein
isolate and its hydrolysate reduce body fat of dietary obese rats and genetically obese
mice (yellow KK). *Nutrition*, **16**, 349-354 (2000).
- 16) Lucas, E. A., Khalin, D. A., Daggy, B. P., and Arjmandi, B. H., Ethanol-extracted soy
protein isolate does not modulate serum cholesterol in golden Syrian hamsters: a model
of postmenopausal hypercholesterolemia. *J. Nutr.*, **131**, 211-214 (2001).
- 17) Moriyama T. Kishimoto K. Nagai, K. Urade, R. Ogawa, T Utsumi, S. Maruyama, N.
and Maebuchi, M. Soybean β -conglycinin diet suppresses serum triglyceride levels in
normal and genetically obese mice by induction of β -oxidation, downregulation of fatty
acid synthase, and inhibition of triglyceride absorption. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*,
68, 352-359 (2004)
- 18) Quan J, Yin X, Kanazawa T. Effect of Soybean Hypocotyl Extract on Lipid

- Peroxidation in GK Rats. *J Clin Biochem Nutr.* May;44(3):212-7. (2009)
- 19) Ishii Y, Tanizawa H. Effects of soyasaponins on lipid peroxidation through the secretion of thyroid hormones. *Biol Pharm Bull.* Aug;29(8):1759-63(2006).
- 20) Rodrigues HG, Diniz YS, Faine LA, Galhardi CM, Burneiko RC, Almeida JA, Ribas BO, Novelli EL. Antioxidant effect of saponin: potential action of a soybean flavonoid on glucose tolerance and risk factors for atherosclerosis. *Int J Food Sci Nutr.* Mar;56(2):79-85(2005).
- 21) Yoshikoshi M, Yoshiki Y, Okubo K, Seto J, Sasaki Y. Prevention of hydrogen peroxide damage by soybean saponins to mouse fibroblasts. *Planta Med.* Jun;62(3):252-5(1996).
- 22) Hiwatashi K, Shirakawa H, Hori K, Yoshiki Y, Suzuki N, Hokari M, Komai M, Takahashi S. Reduction of blood pressure by soybean saponins, renin inhibitors from soybean, in spontaneously hypertensive rats. *Biosci Biotechnol Biochem.*;74(11):2310-2(2010).
- 23) Tsai CY, Chen YH, Chien YW, Huang WH, Lin SH. Effect of soy saponin on the growth of human colon cancer cells. *World J Gastroenterol.* Jul 21;16(27):3371-6. (2010)
- 24) Kang JH, Han IH, Sung MK, Yoo H, Kim YG, Kim JS, Kawada T, Yu R. Soybean saponin inhibits tumor cell metastasis by modulating expressions of MMP-2, MMP-9 and TIMP-2. *Cancer Lett.* Mar 8;261(1):84-92(2008).
- 25) MacDonald RS, Guo J, Copeland J, Browning JD Jr, Sleper D, Rottinghaus GE, Berhow MA. Environmental influences on isoflavones and saponins in soybeans and their role in colon cancer. *J Nutr.* May;135(5):1239-42.(2005).
- 26) Kim HY, Yu R, Kim JS, Kim YK, Sung MK. Antiproliferative crude soy saponin extract modulates the expression of IkappaBalpha, protein kinase C, and cyclooxygenase-2 in human colon cancer cells. *Cancer Lett.* Jul 8;210(1):1-6(2004).
- 27) Rao AV, Sung MK. Saponins as anticarcinogens. *J Nutr.* Mar;125(3 Suppl):717S-724S. Review. (1995)

- 28) Kang JH, Sung MK, Kawada T, Yoo H, Kim YK, Kim JS, Yu R. Soybean saponins suppress the release of proinflammatory mediators by LPS-stimulated peritoneal macrophages. *Cancer Lett.* Dec 18;230(2):219-27(2005).
- 29) Berhow MA, Wagner ED, Vaughn SF, Plewa MJ. Characterization and antimutagenic activity of soybean saponins. *Mutat Res.* Mar 14;448(1):11-22. (2000).
- 30) Yang X, Dong C, Ren G. Effect of soyasaponins-rich extract from soybean on acute alcohol-induced hepatotoxicity in mice. *J Agric Food Chem.* Feb 23;59(4):1138-44. (2011)
- 31) Zhang W, Popovich DG. Group B oleanane triterpenoid extract containing soyasaponins I and III from soy flour induces apoptosis in Hep-G2 cells. *J Agric Food Chem.* May 12;58(9):5315-9. (2010).
- 32) Xiao JX, Huang GQ, Zhang SH. Soyasaponins inhibit the proliferation of Hela cells by inducing apoptosis. *Exp Toxicol Pathol.* Sep;59(1):35-42(2007).
- 33) Cohn JS, Kamili A, Wat E, Chung RW, Tandy S. Reduction in intestinal cholesterol absorption by various food components: mechanisms and implications. *Atheroscler Suppl.* Jun;11(1):45-8. (2010).
- 34) Lin CY, Tsai CY, Lin SH. Effects of soy components on blood and liver lipids in rats fed high-cholesterol diets. *World J Gastroenterol.* Sep 21;11(35):5549-52.(2005).
- 35) Lee SO, Simons AL, Murphy PA, Hendrich S. Soyasaponins lowered plasma cholesterol and increased fecal bile acids in female golden Syrian hamsters. *Exp Biol Med (Maywood).* Jul;230(7):472-8. (2005).
- 36) Oakenfull D. Soy protein, saponins and plasma cholesterol. *J Nutr.* Nov;131(11):2971-2. (2001).
- 37) Lucas EA, Khalil DA, Daggy BP, Arjmandi BH. Ethanol-extracted soy protein isolate does not modulate serum cholesterol in golden Syrian hamsters: a model of postmenopausal hypercholesterolemia. *J Nutr.* Feb;131(2):211-4.(2001).
- 38) Pathirana C, Gibney MJ, Taylor TG. The effect of dietary protein source and saponins on serum lipids and the excretion of bile acids and neutral sterols in rabbits.

- Br J Nutr.* Nov;46(3):421-30. (1981).
- 39) Calvert GD, Blight L, Illman RJ, Topping DL, Potter JD. A trial of the effects of soya-bean flour and soya-bean saponins on plasma lipids, faecal bile acids and neutral sterols in hypercholesterolaemic men. *Br J Nutr.* Mar;45(2):277-81. (1981).
- 40) Pathirana C, Gibney MJ, Taylor TG. Effects of soy protein and saponins on serum and liver cholesterol in rats. *Atherosclerosis.* Aug;36(4):595-6. (1980).
- 41) Sautier C, Doucet C, Flament C, Lemonnier D. Effects of soy protein and saponins on serum, tissue and feces steroids in rat. *Atherosclerosis.* Nov;34(3):233-41. (1979).
- 42) Velasquez MT, Bhathena SJ. Role of dietary soy protein in obesity. *Int J Med Sci.* Feb 26;4(2):72-82. (2007).
- 43) Kawano-Takahashi Y, Ohminami H, Okuda H, Kitagawa I, Yoshikawa M, Arichi S, Hayashi T. Effect of soya saponins on gold thioglucose (GTG)-induced obesity in mice. *Int J Obes.*; 10(4):293-302(1986).
- 44) Laemmli, U. K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685 (1970).
- 45) Tomomi Yamazaki. *et al.* Dietary β -conglycinin prevents fatty liver induced by a high-fat diet by a decrease in peroxisome proliferator-activated receptor γ 2 protein. *Journal of Nutritional Biochemistry* 23 123-132 (2012).
- 46) Hu J, Reddy MB, Hendrich S, Murphy PA. Soyasaponin I and saponogenol B have limited absorption by Caco-2 intestinal cells and limited bioavailability in women. *J Nutr.* Aug;134(8):1867-73. (2004)
- 47) Kamo S., Suzuki S., Sato T., Comparison of bioavailability (I) between soyasaponins and soyasapogenols, and (II) between group A and B soyasaponins, *Nutrition*, in press