

質量分析イメージングを用いたマメ科発芽種子における
グルタミン酸脱炭酸酵素活性局在の可視化

大阪大学大学院 工学研究科

新聞 秀一

酵素組織化学について

生体内の酵素活性の局在を調査することは、生物の生命現象を理解するために重要である[1]。酵素分布の調査には免疫組織化学[2]や *in situ* ハイブリダイゼーション法[3]が広く用いられている。しかし、これらの手法は、酵素タンパク質そのものや酵素タンパク質のアミノ酸配列をコードする mRNA の局在を可視化する技術であり、酵素活性の局在を可視化することはできない。一方で酵素組織化学は、組織切片上で酵素活性の局在を可視化する手法である[1]。植物サンプルでは、1960年代より酵素活性の局在の調査にも用いられており、近年でも、de Ávilaらが、*Vitis vinifera* L.の果皮に含まれる酵素ペルオキシダーゼ(POD, EC: 1.11.1.7)の局在を可視化するために酵素組織化学手法が用いられている[4]。この手法では、組織切片上の酵素によって供給基質であるDAB(3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride)から生成された色素重合体を可視化する。このように酵素組織化学は、特異的に酵素活性の局在を調査することができるが、加水分解反応や酸化還元反応等の反応により発色する人工基質の設計が容易である酵素に標的が制限されるというデメリットがある。

MSIを用いた酵素組織化学

Mass spectrometry imaging (MSI)は近年注目されている化合物の分布可視化手法である。この手法では組織上の細分化した微小区画で質量分析を行い、標的化合物の局在を組織切片上で直接可視化することができる[5]。この質量分析イメージング (MSI)を用いた酵素組織化学が酵素活性の局在の可視化法として注目されている。この手法では従来の酵素組織化学同様、組織切片上に存在する酵素によって基質を酵素反応させたのちに生成物の検出・局在の可視化を行う。この手法は、従来の酵素組織化学と異なり、特異的な反応によって発色する基質を必要とせず、基質と生成物を同時に検出できるというメリットがある。この手法は、アンジオテンシン変換酵素(ACE, EC 3.4.15.1) およびアンジオテンシン変換酵素 2(ACE2, EC:3.4.17.23)によるアンジオテンシンの分解反応の可視化手法として初めて報告され[6]、Katrin Erich らは生成したペプチドを検出することで、プロテアーゼ活性の局在の可視化法を報告した[7]。近年では、より低分子量の代謝物を基質とする酵素コリンエステラーゼ(ChE) [8] やコリンアセチルトランスフェラーゼ(ChAT) [9] の活性局在や *rice koji* における Dipeptidyl peptidase B の活性局在の可視化にも成功している[10]。

本研究の標的酵素について

グルタミン酸脱炭素酵素(GAD, EC4.1.1.15)は、アミノ酸の一種である γ -aminobutyric acid (GABA)を L-グルタミン酸より脱炭酸反応によって生成する反応を触媒する酵素である。GABA の生合成の理解は食品化学の分野においても植物生理学の分野においても重要である。植物体内において GABA はシグナル伝達, pH の調整, C/N 比の調整, 生物的/非生物学的なストレスへの応答などの役割を担っている[11]。またダイズ[12], イネ[13], オオムギ[14]などの様々な植物の発芽段階で、増加することが報告されており、GABA は種子発芽段階にも

重要な役割を担っていると考えられている[11]。さらに近年、GABA は、人間の体内で中枢神経における抑制性の神経伝達物質の減少や血圧の低下を誘導し、ストレスを軽減させる効果があることが報告されている[15]。

そのため多くの GABA 高含有食品が注目されており、大豆などのマメ科植物の発芽種子は GABA 高含有食品として商業的に販売されている。以上の点から、発芽過程における GABA 生合成に関わる GAD 酵素の局在の分布の理解は発芽過程における GAD が植物種子の発芽過程にどのように寄与しているかの解明にもつながると考えられる。さらには GABA 高含有食品の開発に役立つ可能性がある。

本研究の目的

以上から植物中の GAD 酵素活性を調査することは重要であるが、植物種子中で組織特異的な GAD 酵素活性の局在を調査する手法は報告がない。そこで本研究では、MSI を用いた酵素組織化学の手法を用いて、植物種子の発芽過程における GAD 活性の局在を可視化する手法の開発を目的とした。さらに MSI を用いた酵素組織化学手法は動物サンプルにのみ適用されており、本報告が植物サンプルに適用した初めての研究である。対象サンプルとして、モデル植物としても食品としても幅広く利用されているマメ科植物であるダイズ(*Glycine max*)とアルファルファ(*Medicago sativa*)の種子を用いた。目的達成のために、まず MSI を用いたダイズの発芽種子切片上で GAD 酵素活性局在の可視化のために、酵素反応時間の最適化をおこなった後に、LCMS を用いて結果の評価をおこなった。さらに組織特異的な GAD 活性の局在を詳しく調査した。最後に、種子が 3 mm と小さく組織の分離・回収がより困難なアルファルファの発芽種子において本手法の適用可能性を確認した。

実験方法

Plant material and growth conditions

ダイズ種子はグリーンフィールドプロジェクト(熊本, 日本)より購入した。ダイズはバーミキュライト上に蒔き、軽くバーミキュライトを被せて 25°C の暗所で 5 日間インキュベートし発芽させた。アルファルファ種子は、ペトリディッシュ(プロピオペトリディッシュ 100 mm × 100 mm × 15 mm, アズワン, 大阪, 日本)に播種し、24 時間後に発芽種子を得た。回収した発芽種子は分析まで -80°C で凍結保存した。

Chemicals

L-Glutamic acid-¹⁵N は Sigma-Aldrich(Missouri, USA)より、L-Glutamic -2,4,4-d₃ acid(Glu-d₃) は CDN isotope(Pointe-Claire, Canada)より、Aminobutyric acid-¹⁵N(GABA-¹⁵N) Glutamate ¹⁵N(Glu-¹⁵N)は Santa Cruz Biotechnology 社(Texas, USA)より購入した。マトリックスである alpha-Cyano-4-hydroxycinnamic acid(CHCA)と 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB)は Merck

(Darmstadt, Germany)より購入した。GAD 基質溶液に用いる Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt (EDTA)は Dojindo Laboratories (熊本, 日本)より, Pyridoxal 5'-phosphate hydrate(PLP)は Sigma-Aldrich より, リン酸水素二カリウムはナカライテスク(京都, 大阪)より, リン酸二水素カリウムは富士フイルム和光純薬(大阪, 日本)より購入した。LC/MS の移動相に用いるアセトニトリルは関東化学(東京, 日本), エタノールとトリフルオロ酢酸は富士フイルム和光純薬より購入した。Ultrapure water は Genpure UV-TOC xCAD PLUS (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)より得た。

種子切片の作製

凍結切片作成のためにダイズ種子とアルファルファ発芽種子をモールド(Base mold A, Falma, 日本)に入れて 4% Carboxymethyl cellulose 溶液(CMC)で包埋し, -80°C で凍結した。OCT コンパウンド(Optimal cutting temperature compound)を用いて凍結サンプルを試料ホルダーへ装着し, Cryostat (CM1950, Leica Biosystems, Germany)を用いて凍結切片を作製した。作成した切片は, クライオフィルム (SECTION-LAB, 広島, 日本) を用いて回収した。サンプルが載ったクライオフィルムは導電性両面テープ(3M, 日本) を用いて Indium Tin Oxide (ITO)ガラススライド(Matsunami, 大阪, 日本)上に固定した。

組織内酵素反応

以下の終濃度で混合した溶液を GAD 基質溶液として用いた; 50 mM Glu-d3, 70 mM リン酸バッファー(pH 3.0, 5.8, 8.0), 2 mM EDTA, 0.2 mM PLP。切片 1 枚あたり 50 μL の GAD 基質溶液をエアブラシ(GSI クレオス, 東京, 日本)により切片全体に供給した。基質供給後は, $40-60^{\circ}\text{C}$ で加温した加湿チャンバー内で 0- 30 分反応させた。

マトリックス供給

真空蒸着装置 (iMLayer; 島津製作所, 京都, 日本)を用いて, CHCA は 250°C , 3 分間, DHB は 180°C , 5 分間, 組織切片を載せた ITO ガラスに蒸着した。

MALDI-MSI 分析

MALDI-MSI 分析は iMScope QT(島津製作所, 京都, 日本)を用いて行なった。MSI 分析において照射レーザー径は 25 μm および 10 μm に設定し, マススペクトルは全てポジティブイオンモードにて m/z 95-155 の範囲で取得した。分析後は解析ソフトウェアの IMAGEREVEAL MS(島津製作所, 京都, 日本)を用いた。

統計解析

GAD 酵素活性イメージを IMAGEREVEAL MS を用いて ROI(region of interest)解析を行なった。ROI 解析では, 顕微鏡写真により特定した部位ごとに一定の大きさで囲む作業を子葉と

胚軸における GAD 活性の比較のために $n=8$, 高解像度分析のために $n=3$ で繰り返し, 各部位より得た強度の平均値を元に棒グラフを作成した。対応のない 2 群の平均値の有意差の検討のためにスチューデントの t 検定を行い, 3 群以上の平均値の有意差を調べる場合, ANOVA を行い, 補正には Bonferoni 法を用いた。

LC/MS 分析

LC/MS を用いた GAD 活性測定は先行研究を参考にした[16]。大豆発芽種子をピンセットで幼芽胚軸幼根を含む部分と子葉部に分解し, 乳鉢にバッファーを 1.2 mL 加えた。乳棒を用いてすり潰し, 粗酵素液を作製した。その後遠心分離機で上清を回収した。上清 80 μL に 50 mM Glu- ^{15}N 溶液 40 μL を混合し, 40 $^{\circ}\text{C}$, 30 分間酵素反応を行った。酵素反応を停止させるために, 90 $^{\circ}\text{C}$, 10 分間インキュベートした。遠心分離後, 上清を 100 μL 回収し, メタノール抽出を用いて脂質成分を分離した。その後, メタノールを用いてタンパク質除去を行い, 移動相溶液で 5 倍希釈したものをバイアル用 250 μL インサートを挿入したバイアルへ 100 μL 移し, 分析を行った。GABA- ^{15}N は先行研究で確立されたメソッドに基づき選定されたパラメーターを用いて検出した[17]。

実験結果

GAD 酵素による Conversion の確認

初めに, GAD による酵素反応の確認するために, ダイズ種子切片上で基質から生成物への Conversion を確認した。基質 Glu-d3 をエアブランによって供給後 40 $^{\circ}\text{C}$, 15 分間インキュベーションした後, マトリックスとして CHCA を蒸着し, MSI 分析によってダイズ種子切片上において基質および生成物 GABA-d3 の検出を確認した。結果, Glu-d3 と GABA-d3 が平均マススペクトルにおいてそれぞれ m/z 151.08 及び m/z 107.09 で検出された(Fig. 1A)。さらにこの Conversion が切片上のダイズ GAD によって引き起こされたことを確認するために, オートクレーブによって不活化した切片上で同様の実験を行った。結果オートクレーブしていない種子切片上では GABA-d3 は検出されたが, オートクレーブした切片上では検出されなかった(Fig. 1B)。以上の結果より, ダイズ種子切片上の GAD による Glu-d3 から GABA-d3 への Conversion を大豆発芽種子切片上で確認することができた。また, 生成物である GABA-d3 を検出するために, より適したマトリックスを選択するために比較実験を行った。GABA を検出するために CHCA と DHB の使用例がそれぞれ報告されているため[18, 19], この 2 種類のマトリックスを比較した。結果, CHCA を使用した平均強度が優位に高く検出された。従って以降の実験ではマトリックスとして CHCA を用いた。

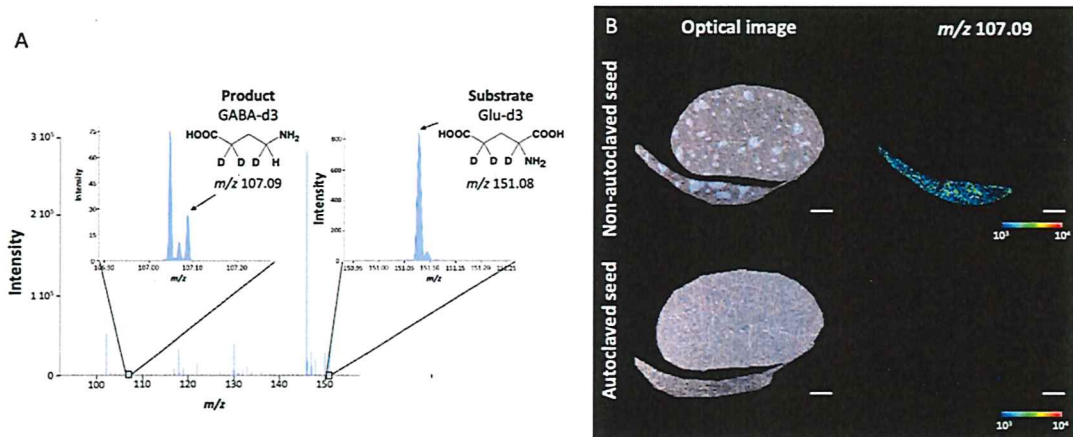


Fig. 1. Confirmation of substrate conversion by glutamate decarboxylase (GAD) in germinated soybean seeds. (A) The mass spectra of Glu-d3 sprayed as substrate on soybean sections and incubated at 40 °C for 15 min. (B) Optical image and GABA-d3 distribution (m/z 107.09) of non-autoclaved and autoclaved seed section. Scale bar is 2 mm.

GAD 酵素反応条件の検討

GAD 酵素活性可視化のために用いる基質溶媒の pH, 酵素反応温度, 酵素反応時間を検討した。結果, pH 5.8, pH 8.0 の条件下では pH 3.0 の酸性条件に比べて有意に活性が強く検出された(Fig. 2A)。有意な差は見られなかったが, pH 5.8 において最も活性が強かった。酵素反応温度に関しては, GAD の最適温度が 40 °C, 50 °C, 60 °C の条件で比較した。結果 60 °C のとき最も活性が強く検出された(Fig.2B)。さらに, 基質供給後の酵素反応のインキュベーション時間の検討をおこなった。0-15 分の間で異なるインキュベーション時間において検出された GABA-d3 の平均強度をプロットした結果を Fig. 2C に示した。

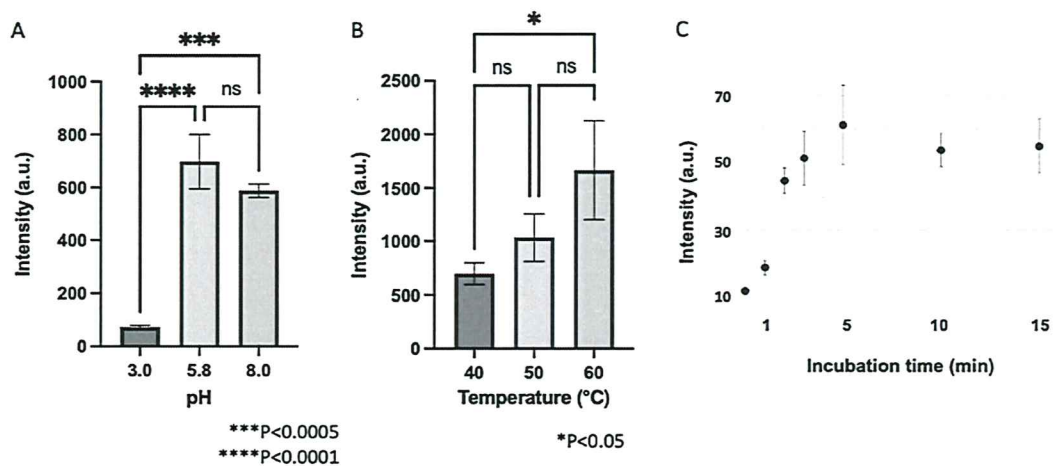


Fig. 2. Comparison of GABA-d3 intensity (A) under different pH levels, (B) at different reaction

temperatures, and (C) for different reaction times. n = 3.

未発芽種子と発芽種子における GAD 酵素活性可視化

未発芽ダイズ種子と発芽種子における GAD 活性の MSI 結果を Fig. 3A に示した。大豆切片 3 枚から得られた平均 GAD 活性値を比較すると、未発芽種子に比べて発芽種子において活性値が有意に高かった。さらに未発芽種子、発芽種子において子葉部と胚軸部において、ROI 分析を行った結果を Fig. 3B に示した。さらにこの結果の再現性を確認した。次に本研究の結果の妥当性を検証するためにダイズ種子の子葉部と胚軸部をピンセットで分離し LC/MS 分析を用いて GAD 活性を測定した。この結果より発芽種子においては子葉部ではなく主に胚軸部において GAD 活性が増加したことが示された。

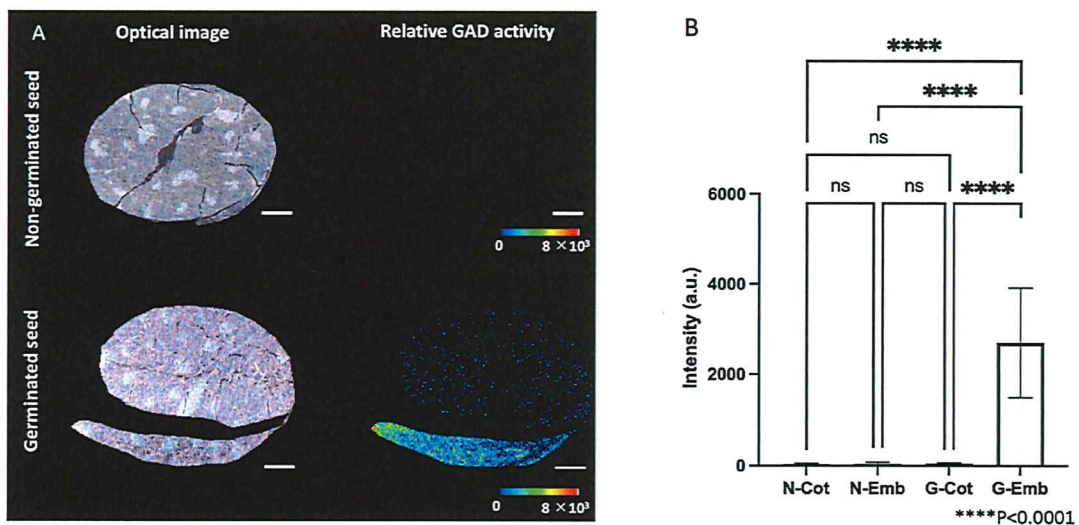


Fig. 3. (A) Optical images and relative glutamate decarboxylase (GAD) activity distributions in germinated and non-germinated soybean seeds. Scale bar is 3 mm. (B) Comparison of the GAD activity between cotyledon of non-germinated seeds (N-Cot), embryonic axis of non-germinated seeds (N-Emb), cotyledon of germinated seeds (G-Cot), and embryonic axis of germinated seeds (G-Emb). n = 8.

発芽種子の胚軸における GAD 活性

詳細にダイズ発芽種子の胚軸における GAD 活性の分布を調査するために、ダイズ発芽種子の胚軸のみを高解像度(レーザー照射間隔:15 μm)で分析した結果を Fig. 4A に示した。さらに ROI 分析の結果、胚軸内の Vascular system)や Root meristem が Root parenchyma に比べて GAD 相対活性が増加した(Fig. 4B)。さらにこの結果の再現性を確認した。

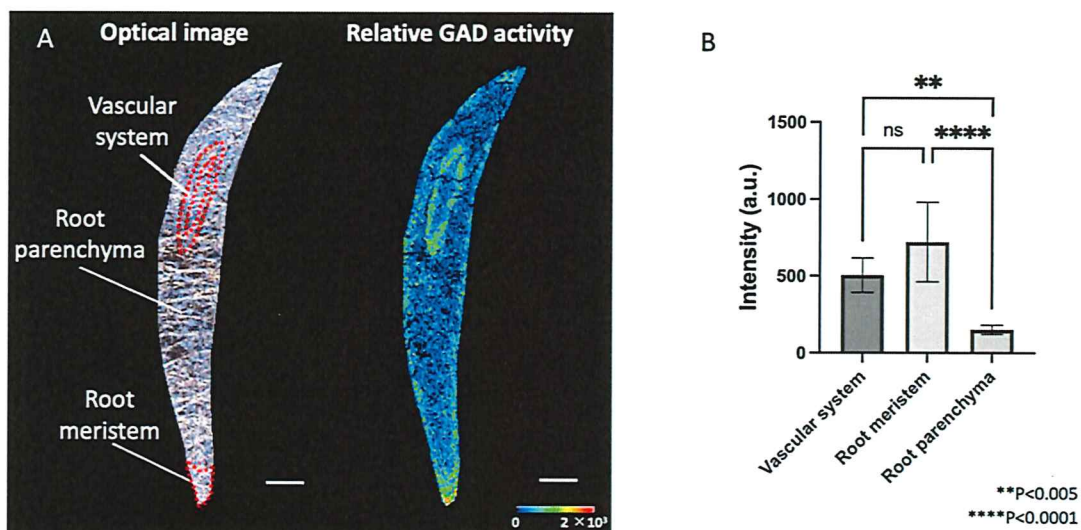


Fig. 4. (A) Optical image and relative glutamate decarboxylase (GAD) activity distribution in the embryonic axis of germinated soybean seed via high resolution analysis. (B) Comparison of the GAD activity between vascular system, root meristem, and root parenchyma. Scale bar is 1 mm. n = 8.

アルファルファ種子における GAD 活性の可視化

アルファルファ種子は大豆種子と異なり、直径 1-2mm であり吸水・発芽後の種子も 2-3 mm 程度である。このようなサンプルは子葉部と胚軸部を分離して分析することが困難である。そこで分離する必要のない MSI 分析によってアルファルファ発芽種子の GAD 活性を調査することが可能かを検討した。発芽したアルファルファにおいて、GAD 活性の局在を可視化した(Fig. 5A)。GAD 活性が子葉部や根の柔組織と比べて根の先端の部分で最も有意に高かった(Fig. 5B)。さらにこの結果の再現性を確認した。

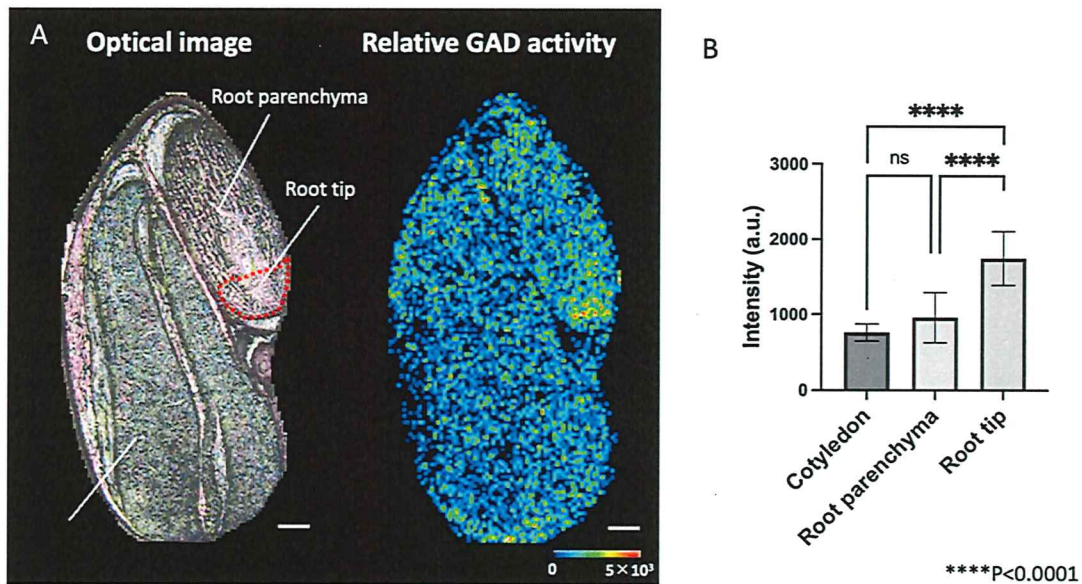


Fig. 5. (A) Optical image and relative glutamate decarboxylase (GAD) activity distribution in germinated alfalfa seed. (B) Comparison of the GAD activity between cotyledon, root parenchyma and root tip. Scale bar is 200 μ m. n = 8.

考察

本研究では GAD 活性の酵素反応条件の比較のために基質溶媒の pH, 酵素反応温度, 酵素反応時間を検討した。Cowpea[20], potato [21], germinated rice[22]などのいくつかの植物種の GAD は先行研究において, 最適 pH が 5.8-6.0 と報告されている。また Soybean の GAD 活性を測定した先行研究においても pH 5.8 が用いられている[23]。本研究においても pH 5.8 の時に最適 pH であることが示されたため, その pH を選択した。

植物の GAD の最適温度に関しては, Faba bean[24]や potato[21]では 40°Cだと報告されている一方で, germinated rice[22]や squarsh[25]では 60 °Cだと報告されている。結果より, ダイズ発芽種子では 60°Cで最も GAD 活性が高かったため, 本研究では 60 °Cを選択した。ダイズの GAD 活性の最適温度は 40 °Cではなく 60 °Cだと考えられる。さらに, 基質が十分に残存する状況下では酵素による反応は反応速度一定であり, この条件下では, 生成物量は反応時間の経過とともに直線的に増加する。そこで, 本研究では, 反応が直線的に進む条件として, インキュベーション時間 3 分の時の GABA-d3 の検出強度を GAD 酵素活性の相対的な活性値分布とみなした。

40 時間発芽処理を行ったダイズ種子における GAD 活性は未発芽種子に比べて 2.8 倍に増加することが報告されており[26], ダイズ種子の GAD 活性は発芽初期に活性化されることが知られている。その結果は今回の実験結果と一致している。ダイズ種子では, 発芽処理 5 日後までに GAD 遺伝子発現量が増加することが報告されており[27], 今回の結果でも GAD 遺

伝子発現量が増加した結果、酵素活性が増加した可能性がある。

さらに ROI 分析結果より、発芽過程において GAD 活性が増加したのは、胚軸部での GAD 活性が増加したためだと示された。ダイズ種子の子葉では主に栄養の貯蓄や供給が行われており、発芽初期では GABA の生合成は活発でなかったと考えられる。子葉部と胚軸部を分離した先行研究[23]では、胚軸部における GAD 活性が子葉部における GAD 活性よりも活性が高いことが示されており、今回の結果とも一致している。この結果と LC/MS による検証実験により、MSI を用いたダイズ種子における GAD 活性の局在を可視化する手法を確立したことが示された。

次に高解像度分析の結果、維管束系は光合成産物などの Small molecule だけでなく、mRNA や proteins などの分子量の大きい物質も輸送に用いられることから[28]、GAD タンパク質が多く存在し、GAD 活性が強い可能性がある。さらに先行研究[29]では、発芽ダイズの根を 1cm 毎に切断した部位と子葉において GAD 活性、Ca レベル、CaM 量が調査された。結果、子葉などの成熟した組織に比べて、発芽ダイズの根の先端 1 cm において GAD 活性と Ca レベルが増加していた。さらに、他の根の部位に比べて、根の先端 1 cm において CaM 量が多く検出された。これらの結果を考慮すると、ダイズ GAD は calcium/calmodulin ($\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$)依存性の酵素であるため[30]、根端分裂組織でより活性が高くなったと考えられる。

さらに、本研究では MSI を用いてアルファルファ発芽種子における GAD 活性の局在の可視化に初めて成功した。アルファルファ種子においてもダイズ種子と同様、根端で GAD 活性が高まったのは細胞分裂が活発であるためだと考えられる。

結語

本研究によって、MSI を応用した酵素組織化学法によってダイズ種子における GAD 活性の局在を可視化することに初めて成功した。GAD 活性の局在を可視化することによって、従来の方法では不明であった大豆の組織内での GAD 活性の分布が明らかになった。さらに組織の分離が困難であるアルファルファ内の組織間の GAD 活性の局在を可視化することに成功し、本手法の拡張性を示すことができた。本手法は、マメ科種子だけでなく他の植物種子の GAD 調査にも適用できる可能性がある。特に非生物学ストレスの応答として GABA の代謝として GAD は大きく関わっており、例えばダイズ種子[16,26]、ソラマメ種子[31,32]、インゲンマメ種子[33]で、塩分ストレスや hypoxia ストレスによって発芽過程で GAD 活性値や GAD 発現遺伝子発現量が増加することが報告されている。このことから GAD が発芽過程においてストレス応答に重要な代謝反応と考えられる。そこで本手法を様々な植物に応用することで発芽種子における GAD の組織学的な役割を明らかにできる可能性がある。最終的に発芽時の植物種子中のストレスに対する制御は農業生産において重要であるため、その分野への応用も期待できる。

文献

1. Walker, R. P., Chen, Z. H., Johnson, K. E., Famiani, F., Tecsi, L., and Leegood, R. C.: Using immunohistochemistry to study plant metabolism: The examples of its use in the localization of amino acids in plant tissues, and of phosphoenolpyruvate carboxykinase and its possible role in pH regulation, *J. Exp. Bot.*, 52, 565–576 (2001).
2. Jiang, J.: Fluorescence in situ hybridization in plants: Recent developments and future applications, *Chromosome Res.*, 3, 153–165 (2019).
3. Cornelis, J.F. and Van, Noorden, C. J.: Imaging enzymes at work: Metabolic mapping by enzyme histochemistry, *J. Histochem. Cytochem.*, 58, 481–497 (2010).
4. Läubli, A.: Cryostat technique for fresh plant tissues and its application in enzyme histochemistry, *Planta*, 70, 13–25 (1966).
5. Molero, M. E., Alarcón, M. V., Uriarte, D., Mancha, L. A., Moreno, D., and Francisco-Morcillo, J.: Histochemical and immunohistochemical analysis of enzymes involved in phenolic metabolism during berry development in *Vitis vinifera* L., *Protoplasma*, 256, 25–38 (2019).
6. Caprioli, R. M.: Imaging mass spectrometry: A perspective, *J. Biomol. Tech.*, 30, 7–11 (2019).
7. Grobe, N., Elased, K. M., Cool, D. R., and Morris, M.: Mass spectrometry for the molecular imaging of angiotensin metabolism in kidney, *Am J Physiol Endocrinol Metab.*, 302, 1016–1024, (2012).
8. Erich, K., Reinle, K., Müller, T., Munteanu, B., Sammour, D. A., Hinsenkamp, I., Gutting, T., Burgermeister, E., Findeisen, P., Ebert, M. P., Krijgsveld, J., and Hopf, C.: Spatial distribution of endogenous tissue protease activity in gastric carcinoma mapped by MALDI mass spectrometry imaging, *Mol. Cell. Proteomics*, 18, 151–161. (2019).
9. Takeo, E., Fukusaki, E., and Shimma, S.: Mass spectrometric enzyme histochemistry method developed for visualizing in situ cholinesterase activity in *Mus musculus* and *Drosophila melanogaster*, *Anal. Chem.*, 92, 12379–12386 (2020).
10. Takeo, E., Sugiura, Y., Ohnishi, Y., Kishima, H., Fukusaki, E., and Shimma, S.: Mass Spectrometric enzyme histochemistry for choline acetyltransferase reveals de novo acetylcholine synthesis in rodent brain and spinal cord, *ACS Chem. Neurosci.*, 12, 2079–2087 (2021).
11. Wisman, A. P., Minami, M., Tamada, Y., Hirohata, S., Gomi, K., Fukusaki, E., and Shimma, S.: Visualization of dipeptidyl peptidase B enzymatic reaction in rice koji using mass spectrometry imaging. *J. Biosci. Bioeng.*, <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2022.05.002> (available online 25 may 2022).
12. Li, L., Dou, N., Zhang, H., and Wu, C.: The versatile GABA in plants, *Plant Signal Behav.*, 16, e1862565 (2021).

13. Matsuyama, A., Yoshimura, K., Shimizu, C., Murano, Y., Takeuchi, H., and Ishimoto, M.: Characterization of glutamate decarboxylase mediating gamma-amino butyric acid increase in the early germination stage of soybean (*Glycine max* [L.] Merr), *J. Biosci. Bioeng.*, 107, 538–543 (2009).
14. Zhao, G., Xie, M., Wang, Y., and Li J.: Molecular mechanisms underlying γ -aminobutyric acid (GABA) accumulation in giant embryo rice seeds, *J. Agric. Food Chem.*, 65 4883–4889 (2017).
15. AL-Quraan N., AL-Ajlouni Z., and Obedat D.: The GABA shunt pathway in germinating seeds of wheat (*Triticum aestivum* L.) and barley (*Hordeum vulgare* L.) under salt stress, *Seed Sci Res.*, 29, 250–260 (2019).
16. Yin, Y., Yang, R., Guo, Q., and Gu, Z.: NaCl stress and supplemental CaCl₂ regulating GABA metabolism pathways in germinating soybean, *Eur. Food Res. Technol.*, 238, 781–788 (2014).
17. Shariatgorji, M., Nilsson, A., Goodwin, R. J., Källback, P., Schintu, N., Zhang, X., Crossman, A. R., Bezard, E., Svenningsson, P., and Andren, P. E.: Direct targeted quantitative molecular imaging of neurotransmitters in brain tissue sections. *Neuron*, 84 697–707 (2014).
18. Goto-Inoue, N., Setou, M., and Zaima, N.: Visualization of spatial distribution of gamma-aminobutyric acid in eggplant (*Solanum melongena*) by matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry, *Anal. Sci.*, 26, 821–825 (2010).
19. Guo, Y., Yang, R., Chen, H., Song, Y., and Gu, Z.: Accumulation of γ -aminobutyric acid in germinated soybean (*Glycine max* L.) in relation to glutamate decarboxylase and diamine oxidase activity induced by additives under hypoxia, *Eur. Food Res. Technol.*, 234, 679–687 (2012).
20. Brandon, S. Johnson, Narendra, K. Singh, Joe, H. Cherry, and Robert, D. Locy.: Purification and characterization of glutamate decarboxylase from cowpea, *Phytochemistry*, 46, 39–44 (1997).
21. Sstyanarayan, V. and Nair, P. M.: Purification and characterization of glutamate decarboxylase from *Solanum tuberosum*, *Eur. J. Biochem.*, 150, 53–60 (1985).
22. Pramai, P., Thanasukarn, P., Thongsook, T., Jannoey, P., Chen, F., and Jiamyangyuen, S.: Glutamate decarboxylase (GAD) extracted from germinated rice: Enzymatic properties and its application in Soymilk, *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 65 166–170 (2019).
23. Runqiang, Y., Yongqi, Y., Qianghui G., and Zhenxin G.: Purification, properties and cDNA cloning of glutamate decarboxylase in germinated faba bean (*Vicia faba* L.), *Food Chem.*, 138, 1945–1951 (2013).
24. Matsumoto, T., Yamaura I., and Funatsu M.: Improved purification and spectroscopic properties of squash glutamate decarboxylase, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 60, 889–890 (1996).

25. Yang, R., Feng, L., Wang, S., Yu, N., and Gu, Z.: Accumulation of γ -aminobutyric acid in soybean by hypoxia germination and freeze-thawing incubation, *J. Sci. Food Agric.*, 96, 2090–2096 (2016).
26. Luo, X., Wang, Y., Li, Q., Wang, D., Xing, C., Zhang, L., Xu, T., Fang, F., and Wang, F.: Accumulating mechanism of γ -aminobutyric acid in soybean (*Glycine max* L.) during germination, *Int. J. Food Sci.*, 53, 106–111 (2018).
27. Lucas, W.J., Groover, A., Lichtenberger, R., Furuta, K., Yadav, S.R., Helariutta, Y., He, X. Q., Fukuda, H., Kang, J., Brady, S. M., and other 6 authors: The plant vascular system: Evolution, development and functions, *J. Integr. Plant Biol.*, 55, 294–388 (2013).
28. Oh, S., and Choi, W.: Changes in the levels of γ -aminobutyric acid and glutamate decarboxylase in developing soybean seedlings, *J. Plant Res.*, 114, 309–313 (2001).
29. Snedden, W. A., Arazi, T., Fromm, H., and Shelp, B. J.: Calcium/calmodulin activation of soybean glutamate decarboxylase. *Plant Physiol.*, 108, 543–549 (1995).
30. Yin, Y., Cheng, C., and Fang, W.: Effects of the inhibitor of glutamate decarboxylase on the development and GABA accumulation in germinating fava beans under hypoxia-NaCl stress. *RSC Advances*, 8, 20456–20461 (2018).
31. Yang, R., Wang, S., Yin, Y., and Gu, Z.: Hypoxia treatment on germinating faba bean (*Vicia faba* L.) seeds enhances GABA-related protection against salt stress. *Chil. J. Agric. Res.*, 75, 184–191 (2015).
32. Dash, M., and Panda, S.: Salt stress induced changes in growth and enzyme activities in germinating *Phaseolus mungo* seeds. *Biol. Plant.*, 44, 587–589 (2001).