The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

| | |
|---|---|
| Title | 質量分析イメージングによる植物種子中のグルタミン酸脱炭酸酵素活性の可視化 |
| Author(s) | 生田, 宗一郎 |
| Citation | 大阪大学, 2023, 博士論文 |
| Version Type | VoR |
| URL | https://doi.org/10.18910/91902 |
| rights | |
| Note | |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

博士学位論文

# 質量分析イメージングによる
# 植物種子中のグルタミン酸脱炭酸酵素活性
# の可視化

生田　宗一郎

2023 年 1 月

大阪大学大学院工学研究科
生物工学専攻

目次

略号.....6

第一章　諸論.....7

1.1 従来の酵素組織化学について.....7
1.2 MSI を用いた酵素組織化学.....10
1.3 グルタミン酸脱炭酸酵素.....11
1.4 本研究の目的と流れ.....13

第二章　マメ科植物種子におけるグルタミン酸脱炭酸酵素活性の可視化.....14

**2.1** 緒言.....14
**2.2** 実験材料及び実験方法.....16
**2.2.1** 試薬.....16
**2.2.2** 植物材料.....16
**2.2.3** 種子切片の作成.....17
**2.2.4** 組織内酵素反応.....18
**2.2.5** マトリックス供給.....18
**2.2.6 MALDI-MSI** 分析.....18
**2.2.7** 統計解析.....18
**2.2.8 LC/MS** 分析.....19
**2.3** 結果と考察.....20
**2.3.1** ダイズ切片上での **GAD** による酵素反応の確認.....20
**2.3.2 GAD** 酵素反応条件の検討.....22
**2.3.3** ダイズ未発芽種子と発芽種子における **GAD** 酵素活性可視化.....23
**2.3.4** 発芽種子の胚軸における **GAD** 酵素活性の可視化.....26
**2.3.5** アルファルファ種子における **GAD** 活性可視化.....29
**2.4** 小括.....31

第三章　塩分ストレスによるオオムギ種子中の GAD 酵素活性局在への影響の調査　32

**3.1** 諸論.....32
**3.2** 実験材料.....34
**3.2.1** 試薬.....34
**3.2.2** 植物材料.....34
**3.2.3 LC/MS** 分析.....35
**3.2.4** 種子切片作成.....36
**3.2.5** 組織上酵素反応.....36

**3.2.6 MALDI-MSI** 分析 ..... 37
**3.2.7** 統計解析 ..... 37
**3.3** 結果と考察 ..... 38
**3.3.1 LC/MS** 分析を用いた相対 **GAD** 活性の測定 ..... 38
**3.3.2** オオムギ種子における相対 **GAD** 活性局在の可視化手法の構築 ..... 39
**3.3.3** 塩分ストレス曝露時のオオムギ種子発芽過程における相対 **GAD** 活性の可視化 ..... 42
**3.3.4** オオムギ発芽種子の胚，種皮周辺部における相対 **GAD** 活性の可視化 ..... 44
**3.4** 小括 ..... 48
第四章　総括と展望 ..... 49
**4.1** 本研究の総括 ..... 49
**4.2** 本研究の展望 ..... 50
引用文献 ..... 52
発表論文 ..... 52
学会発表 ..... 58
謝辞 ..... 60
付録 ..... 61

## 略号

CaM: calmodulin, カルモジュリン

ChAT: choline acetyltransferase, コリンアセチルトランスフェラーゼ

CHCA: α-cyano-4-hydroxycinnamic acid, α-シアノ-4-ヒドロキシケイ皮酸

ChE: cholinesterase, コリンエステラーゼ

CMC: carboxymethyl cellulose, カルボキシメチルセルロース

EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid, エチレンジアミン四酢酸

DHB: 2,5-dihydroxybenzoic acid, 2,5-ジヒドロキシ安息香酸

GABA: γ-aminobutyric acid, γ-アミノ酪酸

GAD: glutamate decarboxylase, グルタミン酸脱炭素酵素

HPLC: high performance liquid chromatography, 高速液体クロマトグラフィー

ITO: indium tin oxide, 酸化インジウムスズ

LC/MS: liquid chromatography/mass spectrometry, 液体クロマトグラフィー質量分析

MALDI: matrix assisted laser desorption/ionization, マトリックス支援レーザー脱離イオン化法

MSI: mass spectrometry imaging, 質量分析イメージング

NADPH: nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸

OCT: optimal cutting temperature

PLP: pyridoxal 5'-phosphate, ピリドキサール 5-リン酸

POD: peroxidase, ペルオキシダーゼ

ROI: region of interest, 関心領域

# 第一章 諸論

## 1.1 従来の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．酵素分布の調査には免疫組織染色法[1]や *in situ* ハイブリダイゼーション法[2]が広く用いられている（図 1-1）．免疫組織染色法は標的酵素に特異的に結合する標識体がついた抗体を用いて標的酵素を可視化する技術であるが，タンパク質に特異的な抗体が必要であるという欠点がある．一方で，*in situ* ハイブリダイゼーション法は標的酵素をコードする mRNA 配列に相補的な配列を有する標識体を用いて，標的酵素の遺伝子発現位置を特定する技術である．この手法には，標的生物の遺伝子の塩基配列情報が必要であり，さらに標的配列のみを特異的に可視化できるプローブ設計も必要であるという欠点がある．さらにいずれの技術も，酵素の分布情報は得られるが，その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[3]．酵素活性は，様々な要因によって制御される．例えば，遺伝子から mRNA への転写調節や mRNA からタンパク質への翻訳調節によってタンパク質量が変動する．その後，グリコシル化，リン酸化，アセチル化などの翻訳後修飾によっても酵素活性が調節される．また生体内では，酵素を取り巻く環境によっても酵素活性が変化する．例えば，生体内の温度や pH によって活性は変化し，基質量も酵素反応に関係する[4]．そのため，酵素活性の局在の可視化することで，免疫組織染色法や *in situ* ハイブリダイゼーション法では得られない分布情報が得られる可能性がある．

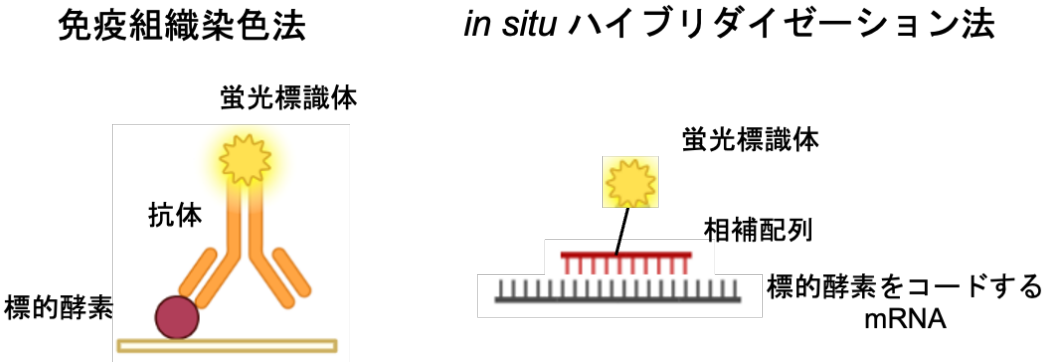


図 1-1. 免疫組織染色法と *in situ* ハイブリダイゼーション法の概略図

酵素組織化学の簡略化した手順を図 1-2 に示す. まず試料切片に標的酵素の基質を供給し, 適切な酵素反応条件で, 標的酵素による酵素反応を切片上でおこなう. さらにその生成物や副産物に特異的に反応する基質を加えて呈色反応をおこなうことで, 検出可視化できる状態となる. 最終的に顕微鏡観察によって酵素活性の局在を可視化することが可能となる.

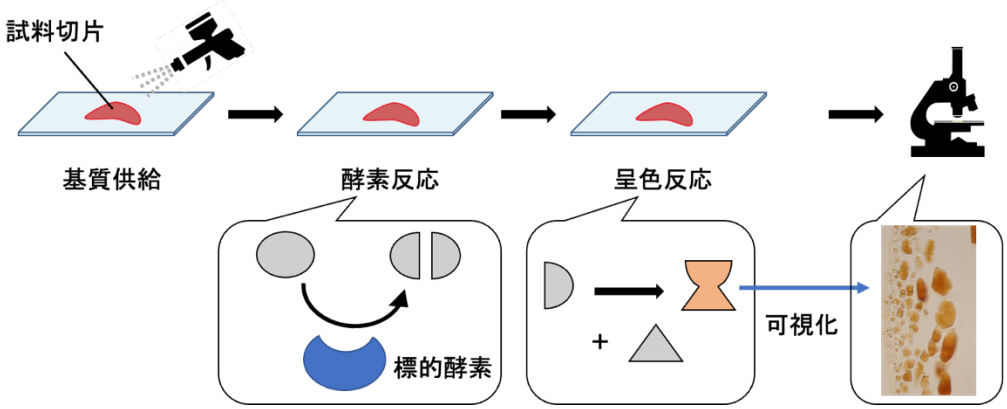


図 1-2. 酵素組織化学の手順

本手法は，試料切片を準備することができれば，幅広い生物に適用可能である．植物サンプルでは，酵素組織化学は 1960 年代より酵素活性の局在の調査にも用いられており[5]，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を用いた[6]. この報告では，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されている．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。しかしながら，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．

## 1.2 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[7]．この手法では組織上で化合物をイオン化することで，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（図 1-3）．

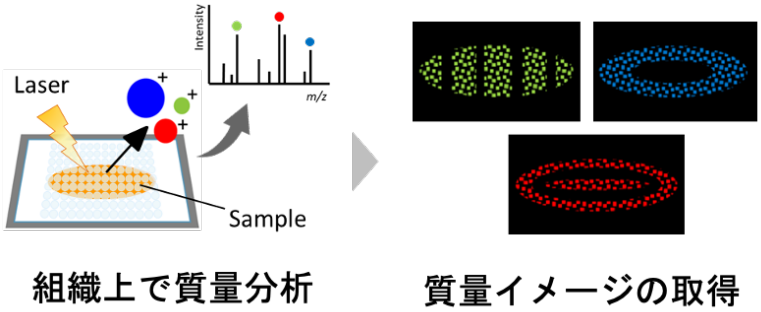


図 1-3 質量分析イメージングの原理

この 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・局在の可視化をおこなう．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[8]，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[9]．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）[10]やコリンアセチルトランスフェラーゼ（ChAT）[11] 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[12]．このように MSI を用いた酵素組織化学手法は複数報告されているが，動物や微生物サンプルにのみ適用されて

おり，本研究は植物サンプルに適用した初めての研究である．

## 1.3 グルタミン酸脱炭酸酵素

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．

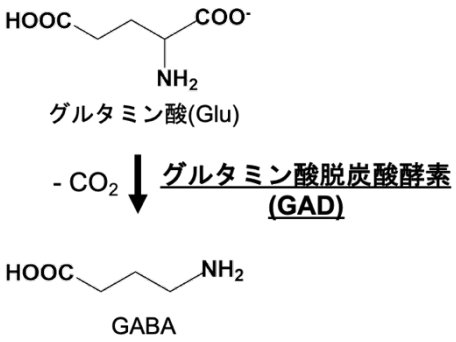


**図 1-4 グルタミン酸脱炭酸酵素が触媒する反応**

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，炭素-窒素比（C/N 比）の調整，生物的/非生物的なストレスへの応答などの役割を担っている[13]．またダイズ[14]，イネ[15]，オオムギ[16]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[13]．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ため[17]，多くの GABA 高含有食品が注目されており，ダイズなどのマメ科植物や玄米，オオムギなどのイネ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．以上から植

物発芽種子中で GABA 生合成に関わる GAD 酵素活性を調査することは重要である．

高等植物における GAD 活性に関する研究は，80 年以上前より行われている．奥貫は，ユリの花粉，キャベツ，ホウレンソウ，ニンジンなどの高等植物で GAD を精製した[18]．その際には， Warburg 圧力計を用いてサンプルから脱炭酸によって放出される二酸化炭素量を測定することにより，GAD 活性が測定された．その後同位体標識された基質を加えることで，発生した同位体標識された二酸化炭素の検出する手法が用いられた[20-23]．さらに，HPLC(高速液体クロマトグラフィー)カラムと組み合わせた紫外線検出器を用いることで，同位体標識された GABA を検出することで GAD 活性が測定された[24-26]. 以下に, 今まで GAD 活性の調査が行われた植物サンプルとその活性測定方法と，その報告例を表を示す．

表 1 植物サンプルに対する GAD 活性測定の報告例

| 酵素活性測定のための生成物 | 酵素活性測定方法 | 植物サンプル | 引用文献 |
|---|---|---|---|
| 二酸化炭素 | Warburg 圧力計を用いて捕集し測定 | ユリ花粉，キャベツ<br>ニンジン | 18 |
| | | フジマメ<br>(*Dolichos lablab*) | 19 |
| | $^{13}$C標識された放射性同位体を測定 | ジャガイモ | 20 |
| | $^{14}$C標識された放射性同位体を測定 | ダイズ | 21 |
| | | ペチュニア | 22 |
| | | タバコ | 23 |
| GABA | 化合物の紫外線吸収を利用した測定方法 | 米ぬか | 24 |
| | | ソラマメ | 25 |
| | | ササゲ | 26 |

Galleschi L.は，硬質コムギ（*Triticum durum*）の発芽初期の乾燥種子の全胚，胚軸，胚乳を組織分離することによって GAD 活性の局在の調査を試みた[27]．結果，胚軸での活性が最も高いことが明らかとなったが，組織の分離が困難な組織における酵素活性の局在の調査は行われておらず，組織の分離が必要な組織は酵素組織化学的な手法が必要である．しかし酵素反応によって生成した二酸化炭素や GABA を，その局在への影響なしに検出することができないため， GAD を対象とした酵素組織化学的な手法はこれまで報告されていない．

## 1.4 本研究の目的と流れ

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．

まず第二章では，代表的なマメ科植物であるダイズ種子（*Glycine max* L. ‘Fukuyutaka’）とアルファルファ種子（*Medicago sativa* ‘Makiwakaba’）の発芽種子を用いて，従来の酵素組織化学では報告のない GAD を対象とした MSI による酵素組織化学法の開発をおこなった．さらに，本手法が植物サンプルに対しても適用可能かどうかを検討した．続く第三章では，MSI を用いた GAD 酵素活性可視化の手法を拡張し，オオムギ種子（*Hordeum vulgare* ‘Shinjuboshi’）の発芽過程において塩分ストレスによる GAD 酵素活性への影響の調査に応用することを試みた．最後に，第四章では，第二章と第三章の結果を総括した上で，今後の展望について説明した．

# 第二章 マメ科植物種子におけるグルタミン酸脱炭酸酵素活性の可視化

## 2.1 緒言

第一章で述べたとおり，MSI を用いた酵素組織化学の手法は植物サンプルに対して適用された報告はない．そこで本章では植物種子内の発芽過程において重要な酵素であるグルタミン酸脱炭酸酵素（GAD）を対象とした MSI を用いた酵素組織化学手法の開発を目的とした．植物種子サンプルとして，モデル植物としても用いられ，発芽種子が食品としても消費されている，マメ科植物であるダイズ（*G. max*）とアルファルファ（*M. sativa*）の種子を用いた．

研究手法として，まず MSI を用いたダイズ発芽種子切片上に基質であるグルタミン酸をスプレーによって塗布し GAD によって酵素反応を確認した．ここで，内在性のグルタミン酸および GABA を酵素の局在への影響なしに組織切片上から除去することは困難であるため，それらの化合物と供給したグルタミン酸や酵素反応によって生成した GABA を区別できないことが問題となる．そこで本章では，グルタミン酸の重水素標識体である L-glutamic-2,4,4-d acid（Glu-d3）を基質として用いて，生成物の aminobutyric acid-2,2,4-d3（GABA-d3）を MSI 分析によって検出することにより，内在性のグルタミン酸と GABA を区別することとした（図 2-1）．

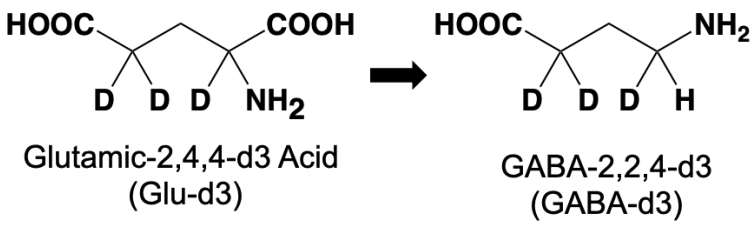


**図 2-1 基質 Glu-d3 および生成物 GABA-d3 の構造式**

次に相対 GAD 活性可視化のために, 基質溶液に用いるバッファーpH, 酵素反応温度, 酵素反応時間の検討をおこなった. その後, ダイズ発芽種子の根部と子葉部を分離し液体クロマトグラフィー質量分析法（LC/MS）を用いて相対 GAD 活性を測定し, MSI 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.

## 2.2 実験材料及び実験方法

### 2.2.1 試薬

L-glutamic acid-$^{15}$N は Sigma-Aldrich（ミズーリ，アメリカ）より，L-glutamic-2,4,4-d3 acid（Glu-d3）は CDN isotope（ポイントクレア，カナダ）より，aminobutyric acid-$^{15}$N（GABA-$^{15}$N） L-glutamic acid-$^{15}$N（Glu-$^{15}$N）は Santa Cruz Biotechnology 社（テキサス，アメリカ）より購入した．マトリックス支援レーザー脱離イオン化法（MALDI）で用いたマトリックスである α-cyano-4-hydroxycinnamic acid（CHCA）と 2,5-dihydroxybenzoic acid（DHB）はメルク（ダルムシュタット，ドイツ）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 社，マサチューセッツ，アメリカ）より得た．

### 2.2.2 植物材料

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，種子が隠れる程度に薄くバーミキュライトを被せて 25℃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）上に薄葉紙（PROWIPE，大王製紙株式会社，東京，日本）を敷き，24 時間後に発芽種子を回収した．回収した発芽種子は分析まで−80℃で凍結保存した．

発芽種子サンプルは，子葉，胚軸を同時に分析するために，切片作成時にこれらの組織が二次元的に平面になる必要がある．胚軸は重力と同じ向きに伸長するため，ダイズ種子を播種する際には胚軸が子葉と並行に伸長するように胚軸部分が下側となるようにした．アルファルファ種子に関しては，発芽した種子において子葉胚軸部分を同時に分析するために，胚軸が子葉と並行に伸長している種子を選択した．

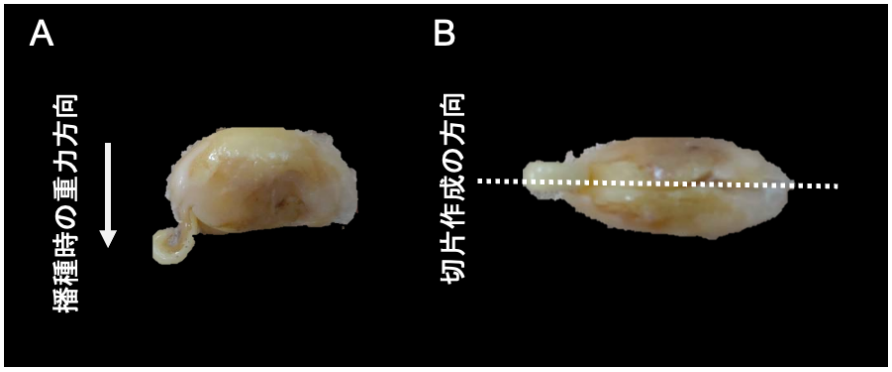


図 2-2 ダイズ発芽種子の播種方法と切片作成の方向
(A)ダイズ発芽時に根の胚軸の伸長が重力方向下向きになるように播種した
(B)(A)のような方法で播種した結果，子葉と胚軸を同時に含むような切片を作成することができる

### 2.2.3 種子切片の作成

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ディスポーザブルの包埋皿であるモールド（Base mold A，株式会社ファルマ，東京，日本）に入れて 4% Carboxymethyl cellulose 溶液（CMC）で包埋し，−80℃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，クライオミクロトーム（CM1950，ライカバイオシステムズ，ヴェツラー，ドイツ）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，ミネソタ，アメリカ）を用いて酸化インジウムスズ（ITO）グラススライド（松浪硝子工業，大阪，日本）上に固定した．

### 2.2.4 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 および 8.0）, 2mM 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℃で加温した加湿チャンバー内で 0-30 分反応させた.

### 2.2.5 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℃, 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.

### 2.2.6 MALDI-MSI 分析

MALDI-MSI 分析は iMScope QT（島津製作所, 京都, 日本）を用いておこなった. 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検出モードにて *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.

### 2.2.7 統計解析

相対 GAD 活性の可視化のため, 全分析点中で GABA d3 強度が最大時の強度を 100 %とし, 切片内の全分析点における GABA-d3 強度値の割合を相対 GAD 活性として MS イメージ図を作成した. さらに GAD 酵素活性イメージを IMAGEREVEAL MS を用いて ROI（region of interest）解析をおこなった. 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 を行った後，事後検定として Bonferoni 法を用いた．

### 2.2.8 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[28]．ダイズ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℃，30 分間酵素反応をおこなった．酵素反応を停止させるために，90℃，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，クロロホルム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に 100 μL 分注し，分析をおこなった．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[29]． GABA-$^{15}$N の面積値を測定するために，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[19]． LC/MS 分析は Nexera HPLC System（島津製作所）を LCMS-8060（島津製作所）に接続した装置を用いておこなった． クロマトグラフィーによる分離のために CROWNPAK CR-I（+）（3.0 mm i.d. 150 mm，5 mm; 株式会社ダイセル，大阪，日本）を分析用カラムとして用いた．GABA-$^{15}$N の面積値を相対 GAD 活性値として用いた．

## 2.3 結果と考察

### 2.3.1 ダイズ切片上での GAD による酵素反応の確認

初めに，ダイズ種子切片上で基質から生成物への GAD による酵素反応を確認した．まずダイズ発芽種子切片を準備し，さらに酵素反応が切片上のダイズ GAD によって起きたことを確認するために，ネガティブコントロールとして，オートクレーブ処理によって酵素を不活化したダイズ種子切片を準備した。基質 Glu-d3 をエアブラシによって供給後 40℃，15 分間インキュベーションし，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 の検出を試みた．その結果，オートクレーブ非処理のダイズ種子切片上では 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．一方でオートクレーブ処理によって酵素を不活化した切片では基質 *m/z* 151.08 は検出されたが，GABA-d3 のピークはオートクレーブ非処理の種子切片に比べて，わずかしか検出されなかった（図 2-3 A）．さらに得られたイメージング結果において，オートクレーブ未処理の種子切片上では GABA-d3 は検出されたが，オートクレーブ処理後の種子切片上では検出されなかった（図 2-3 B）．以上の結果より，ダイズ種子切片上の Glu-d3 から GABA-d3 への GAD による酵素反応をダイズ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の比較実験をおこなった．内在性 GABA の検出には CHCA と DHB の使用例がそれぞれ報告されているため[30, 31]，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有意に高く検出された（図 S1）．したがって以降の実験では CHCA をマトリックスとして用いた．

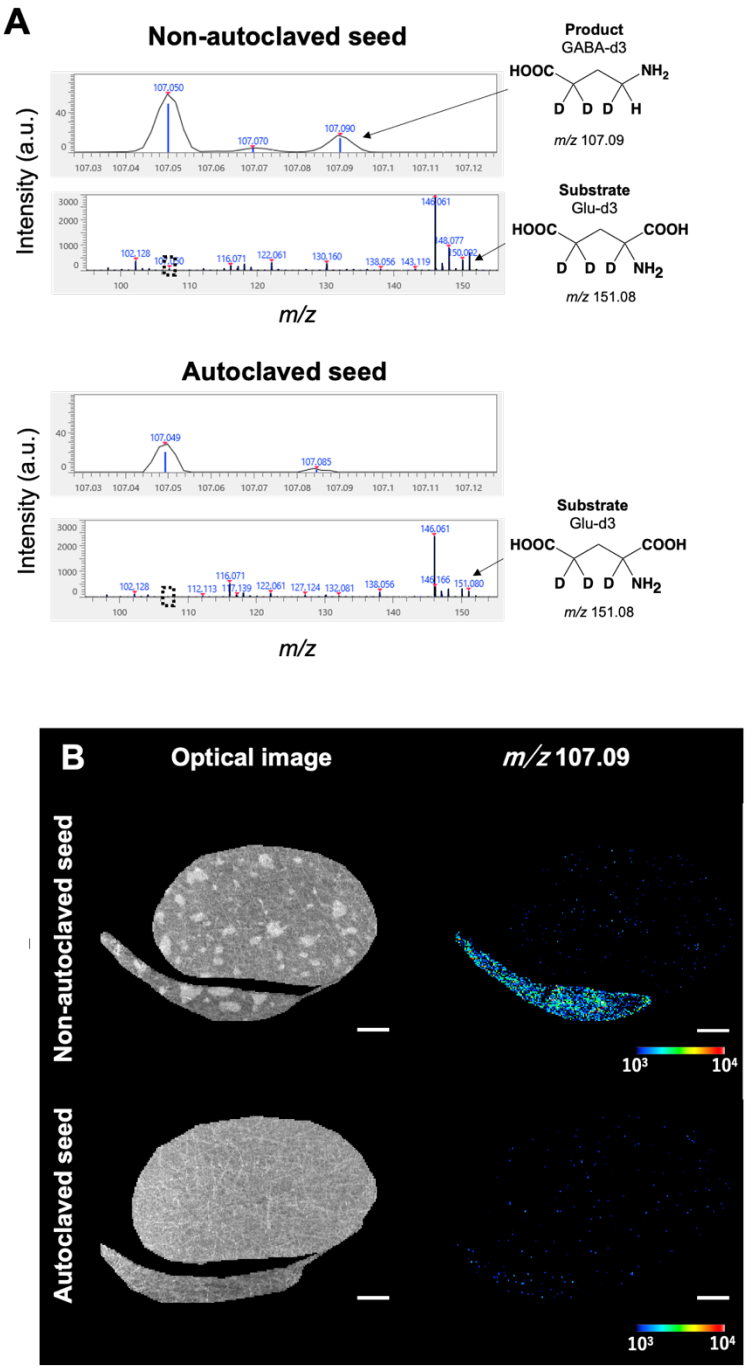


図 2-3 ダイズ発芽種子における GAD による酵素反応の確認

（A） オートクレーブ処理後，非処理のダイズ切片に基質として Glu-d3 溶液を噴霧し，40 ℃で 15 分間インキュベートした時のマススペクトル （B） オートクレーブ処理後，非処理の種子切片の光学顕微鏡画像と GABA-d3 分布 （*m/z* 107.09）．スケールバー：2 mm.

### 2.3.2 GAD 酵素反応条件の検討

本研究では GAD 活性可視化のための酵素反応条件の検討のために，基質溶媒の pH，酵素反応温度，酵素反応時間を検討した．

溶媒の pH 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（図 2-4 A）．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．ダイズの 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[32]．したがって本研究においても基質溶媒の pH には 5.8 を選択した．

酵素反応温度に関しては，GAD の最適温度が 40℃，50℃，60℃の条件で比較した．結果 60℃のとき最も活性が強く検出された（図 2-4 B）．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．植物の GAD の最適温度に関しては，ササゲ[26]やジャガイモ[20]では 40℃であったと報告されている一方で，発芽イネ種子[33]，ソラマメ[25]，セイヨウカボチャ[34]では 60℃であったと報告されている．本実験結果より，ダイズ発芽種子では 60℃で最も GAD 活性が高かったため，本研究では 60℃を選択した．ダイズの GAD 活性の最適温度は 40℃ではなく 60℃である考えられる．

最後に酵素反応時間の検討をおこなうために，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図 2-4 C に示した．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 酵素活性の相対な活性値分布とみなした．

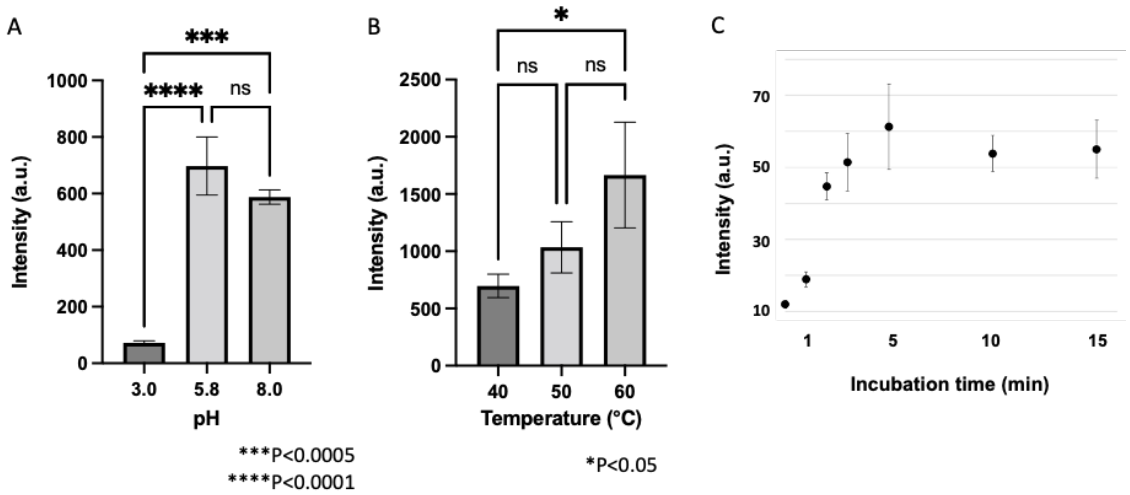


図 2-4 GABA-d3 強度の比較.
（A） 異なるバッファー pH 条件下.（B） 異なる酵素反応温度条件下.
（C） 異なる酵素反応時間条件下. n = 3.

### 2.3.3 ダイズ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相対 GAD 活性の MSI 結果を図 2-5（B）に示した. ダイズ切片 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（図 S2）. 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 分析をおこなった結果を図 2-5（A）に示した. さらにこの結果の再現性を確認した（図 S3）. 続いて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（図 S4）.

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. 40 時間発芽処理をおこなったダイズ種子における GAD 活性は未発芽種子に比べて 2.81 倍に増加することが報告されており[35], 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[36], 本実験の結果でも 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[32]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.

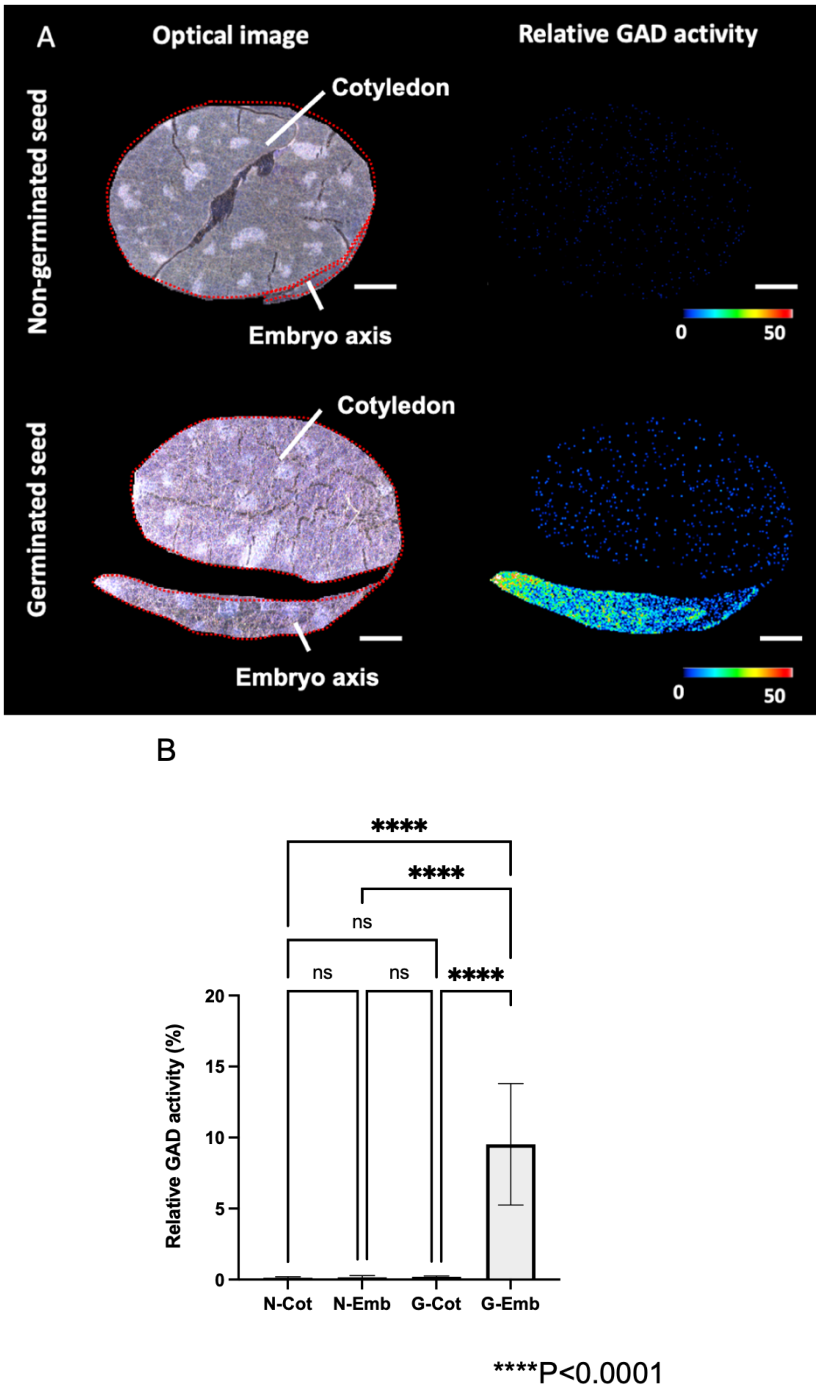


図 2-5 （A）ダイズの発芽種子と未発芽種子における顕微鏡画像と相対 GAD 活性の分布．スケールバー：3 mm.

（B） 未発芽種子の子葉 （N-Cot），未発芽種子の胚軸 （N-Emb），発芽種子の子葉（G-Cot），発芽種子の胚軸 （G-Emb） 間の GAD 活性の比較．n=8

### 2.3.4 発芽種子の胚軸における GAD 酵素活性の可視化

さらに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：10 μm）で分析した．伸長したダイズから分離した胚軸のみを 4%CMC を用いてサンプルとして用いた．さらに，切片構造を維持するために用いるクライオフィルムや導電性テープは検出強度を下げる可能性があるため，それらの材料を使用せずに直接スライドグラスに切片を貼り付け，分析をおこなった．その際に，レーザー強度は 70 に設定した．結果を図 2-6 に示した．

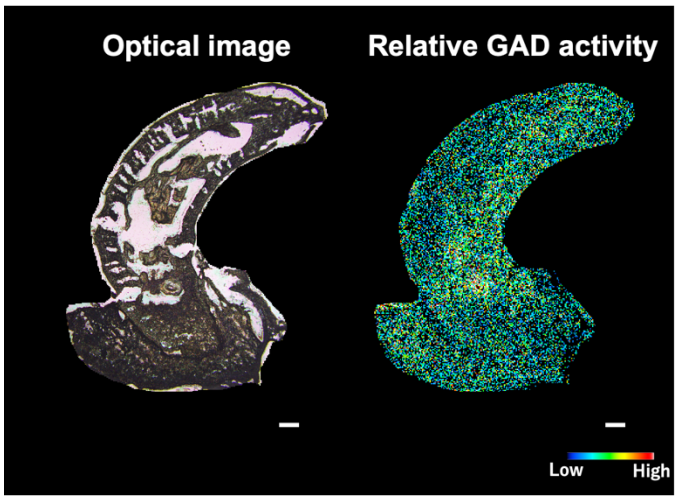


図 2-6. 高解像度分析に施与した発芽ダイズ種子胚軸の光学顕微鏡写真と相対 GAD 活性分布．スケールバー：200 μm.

結果より，組織の構造を観察することはできなかった．そこで胚軸分析のための切片作成法と分析パラメータの再検討をおこなった．切片作成法に関しては，2.3.1 から 2.3.3 の実験方法と同様に子葉から分離せず種子全体を包埋し，クライオフィルムと導電性テープを用いて切片作成をおこない，胚軸部分においてのみ分析をおこなった．さらにクライオフィルムや導電性テープによる検出強度の低下を防ぐために，レーザー強度は装置の最大強度である 77.6 に設定した．結果を図 2-7A に示した．顕微鏡写真の結果より，胚軸内の維管束系（Vascular

system)，根端分裂組織（Root meristem），根柔組織（Root parenchyma）を観察することができた．さらに ROI 分析の結果，胚軸内の維管束系や根端分裂組織における相対 GAD 活性値が根柔組織における相対 GAD 活性値に比べて有意に高かった（図 2-7 B）．さらにこの結果の再現性を確認し，胚軸内の組織を再現良く胚軸内の組織が観察・分析できることを示した．（図 S5）．これらの結果より，維管束系は光合成産物などの小分子化合物だけでなく，mRNA やタンパク質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[37]，GAD タンパク質が多く存在し，根柔組織よりも GAD 活性が高かった可能性がある．さらに先行研究[38]では，発芽ダイズの根を 1 cm 毎に切断した部位と子葉において GAD 活性，カルシウム($Ca^{2+}$)レベル，カルモジュリン(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 $Ca^{2+}$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 はカルシウム/カルモジュリン（$Ca^{2+}$/CaM）依存性の酵素あるため[21]，根端分裂組織でより活性が高くなったと考えられる．

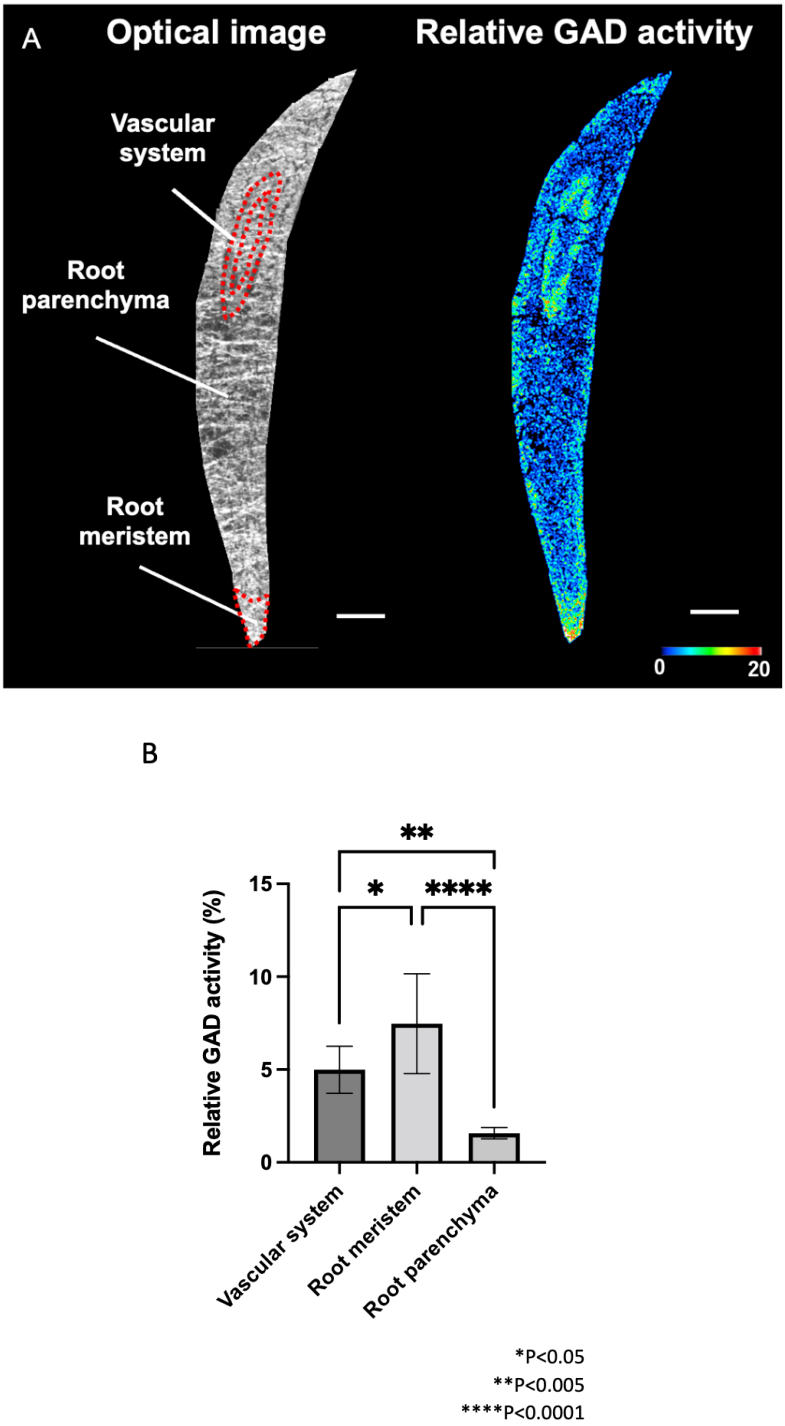


図 2-7. （A） 高解像度分析に施与した発芽ダイズ種子における胚軸の光学顕微鏡写真と相対 GAD 活性分布（B） 胚軸内の組織である vascular system，root meristem，root parenchyma における相対 GAD 活性の比較．スケールバー：1 mm. n = 8.

### 2.3.5 アルファルファ種子における GAD 活性可視化

アルファルファ種子はダイズ種子と異なり，乾燥時に直径 1-2 mm 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．そこで組織を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（図 2-7 A）．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（図 2-7 B）．さらにこの結果の再現性を確認した（図 S6）．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では根端において GAD 活性が高かった．これは発芽ダイズと同様に根端において Ca レベルや CaM 量が他の組織に比べて増加しており，その結果，より GAD 活性が高くなった可能性がある．さらに，ダイズ発芽種子の子葉とは異なり，アルファルファの子葉では活性が検出された．これはダイズ種子とは異なり，GAD 発現量や GAD タンパク量などに違いがあった可能性がある．これらの仮説を検証するためには GAD 発現量，GAD タンパク量，Ca 量や CaM 量の調査など，他の手法を用いる必要がある．

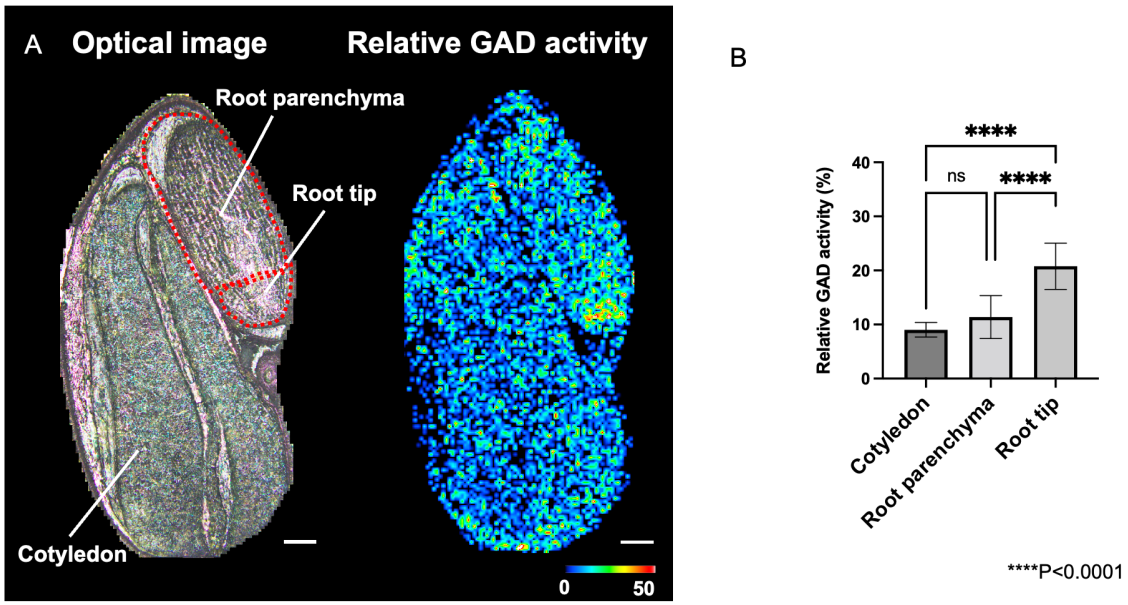


図 2-8. （A） 発芽アルファルファ種子の光学顕微鏡画像と相対 GAD 活性分布

（B） 子葉(cotyledon)，根柔組織(root parenchyma)，根端(root tip)における相対 GAD 活性の比較.

スケールバー：200 μm. n = 8.

## 2.4 小括

本研究により，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ダイズの組織内での 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，ダイズ種子やアルファルファ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，例えばソラマメ種子[39, 40]，インゲンマメ種子[41]，オオムギ種子[16]で，塩分ストレスや浸透圧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．そこで第三章では，第二章で MSI を用いた植物発芽種子中の GAD 活性の可視化手法をオオムギ種子にも拡張し，塩分ストレスによる GAD 活性への影響の調査に応用可能かを検討した．

# 第三章 塩分ストレスによるオオムギ種子中の GAD 酵素活性局在への影響の調査

## 3.1 諸論

種子の発芽過程は植物の成長発達において重要な段階である．さらに作物の収量や品質に影響を与えるため，農業にとっても重要な側面を持つ[42]．土壌中に含まれる塩分は浸透圧ストレスやイオン毒性によって植物の発芽に影響を与え，世界中の様々な作物の収量に大きな影響を与える[43]．そのため植物種子がどのように塩分ストレスに対して応答し，乗り越えて発芽に至るかを理解することは極めて重要である．

植物において GABA は，寒冷，高温，乾燥，低酸素，機械的傷害など様々な環境刺激に応答して，植物に蓄積する適応代謝物として作用する[44]．一方で，GABA そのものだけでなくストレス応答やそのシグナル伝達において GABA 代謝経路が役割を有する可能性が指摘されている[45]．中でも，GABA の生合成に関わる酵素として GAD もストレス応答に大きく関わっており，塩分ストレスや浸透圧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[16, 39-41]．しかし，塩分ストレスへの応答として発芽種子中のどの組織で GAD 活性が影響するのかは明らかにされていない．

オオムギ種子は種子発芽の研究に広く用いられるモデル植物の一種である．オオムギは世界で四番目に生産され[46]，重要な穀物の一種でもあり，その発芽種子は未発芽種子に比べて GABA を多く含有することから[47]，GABA 高含有食品としても利用されている．またオオムギは 150 mM から 500 mM までの NaCl ストレス下でも生育できるため，塩分ストレスに対して比較的耐性のあることが報告されている[48]．そのため塩分ストレス応答研究にも広く用いられて

いる[16，46-49]．しかし塩分ストレスが GAD 酵素活性やその局在に対してどのように影響するか調査されていない．そこで本研究では MSI を用いた酵素組織化学手法が，オオムギ発芽種子の部位特異的な GAD 活性局在に対する塩分ストレスの影響の調査にも適用可能かを調査することを目的とした．研究手法として，まずオオムギ種子の異なる発芽段階で塩分ストレスの GAD 活性に対する影響を LC/MS 分析を用いて調査した. 次に MSI 分析によるオオムギ発芽種子中の GAD 局在可視化のために，酵素反応条件の検討をおこなった．続いてその検討後の条件を用いて，複数の発芽段階において塩分ストレス種子の GAD 活性局在とコントロール種子における GAD 活性局在を比較した．さらに高解像度分析によって種子の胚，糊粉層における GAD 活性局在への塩分ストレスの影響を調査した．

## 3.2 実験材料

### 3.2.1 試薬

酵素反応の基質である L-glutamic -2,4,4-d3 acid（Glu-d3）は CDN isotope（ポイントクレア，カナダ）より購入した．酵素反応の基質である L-glutamic acid-$^{15}$N より，内部標準物質である $d_4$-DL-alanine は Santa Cruz Biotechnology（テキサス，アメリカ）より購入した．マトリックスである α-cyano-4-hydroxycinnamic acid（CHCA）はメルク（ダルムシュタット，ドイツ）より購入した．酵素反応のための基質バッファーに加える 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，マサチューセッツ，アメリカ）より得た．

### 3.2.2 植物材料

オオムギの種子はカネコ種苗株式会社（群馬，日本）より購入した．種子発芽のために，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）上に paper tissue（PROWIPE，大王製紙株式会社，東京，日本）を敷き，10mL の超純水あるいは塩分ストレス曝露のための 100 mM NaCl 水溶液で湿らせた．オオムギ種子はその上に播種し暗所に静置することで発芽させた．播種後，12 時間，24 時間，36 時間，48 時間後に種子を回収し，分

析まで−80 度で凍結保存した.

発芽種子サンプルは，胚乳，胚を同時に分析するために，切片作成時にこれらの組織が二次元的に平面になることが求められる．そこで発芽した種子をサンプリングする際には，胚が胚乳と並行に肥大伸長している種子を選択した.

### 3.2.3 LC/MS 分析

各発芽段階における塩分ストレスの有無でオオムギ発芽種子 5 粒ずつを 50 mL の凍結粉砕用チューブ （安井器械，大阪，日本） に入れた．チューブごと液体窒素で凍結し，チューブに粉砕用メタル（安井器械, 大阪, 日本）を入れ，液体窒素を用いて十分に冷却したあと，マルチビーズショッカー （安井器械，大阪，日本） を用いて粉砕し （2000 rpm，5s)，パウダー状にした．その後溶解を防ぐために液体窒素で凍結させながら，30 mg ずつ秤量したチューブを準備した（n=3)．その後，各サンプルに 500 μL の Buffer（70 mM pH5.8 リン酸バッファー，2mM EDTA，0.2 mM PLP）を加え，振とう型インキュベーター（25℃，30 min 1200 rpm）を用いて粗酵素液を作製した. その後, 遠心分離（4℃, 10000 rpm, 10 min）によって上清を回収した．回収した上清 80 μL に 50 mM Glu-$^{15}$N 溶液 40 μL を混合し，40 ℃，30 分間インキュベートすることで酵素反応をおこなった．酵素反応を停止させるために, 90 ℃, 10 分間インキュベートした. 遠心分離（4 ℃, 10000 rpm，10 min）後，上清を 100 μL 回収し，メタノール 300 μL，内部標準物質として $d_4$-DL-Alanine 溶液（20 μmol/ml in 50% MeOHaq） 20 μL を加えて脂質成分を分離した. その後, 超純水, クロロホルム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 分注し分析をおこなった． GABA-$^{15}$N 強度を測定するために，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[19]．LC/MS 分析は Nexera HPLC System（島津製作所）を接続した LCMS-8060 （島津製作所）を用いておこなった． クロマトグラフィーによる分離のために CROWNPAK CR-I （+） （3.0 mm i.d. 150 mm，5 mm; 株式会社ダイセル, 大阪, 日本）を分析用カラムとして用いた. GABA-$^{15}$N の面積値を $d_4$-DL-Alanine の面積値で割った値を相対 GAD 活性値として用いた.

### 3.2.4 種子切片作成

凍結切片作成のためにオオムギ発芽種子をモールド（Base mold A，株式会社ファルマ, 東京, 日本）に入れて 4% Carboxymethyl cellulose 溶液（CMC）で包埋し, −80℃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，ライカバイオシステムズ, ヴェツラー, ドイツ）を用いて−20℃の条件下で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, ミネソタ, アメリカ） を用いて Indium Tin Oxide （ITO）グラススライド（Matsunami，大阪，日本）上に固定した.

### 3.2.5 組織上酵素反応

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 ℃で加温した加湿チャンバー内で 0-30 分反応させた.

### 3.2.6 MALDI-MSI 分析

イオン化を補助するためにマトリックスである CHCA を，真空蒸着装置（iMLayer；島津製作所）を用いて，組織切片を載せた ITO ガラスに蒸着した（250 ℃，3 min）．MALDI-MSI 分析は iMScope QT（島津製作所）を用いておこなった．MSI 分析において照射レーザー間を 30 μm および 15 μm に設定し，マススペクトルは全てポジティブイオン検出モードにて *m/z* 95-155 の範囲で取得した．MS イメージ取得のために解析ソフトウェアの IMAGEREVEAL MS（島津製作所）を用いた．

### 3.2.7 統計解析

相対 GAD 活性の可視化のため，GABA-d3 強度の最大値を 100 %とし，切片内の全解析点における GABA-d3 値の割合を相対 GAD 活性として表示した．相対 GAD 酵素活性画像より IMAGEREVEAL MS を用いて Region of interest（ROI）解析をおこなった．棒グラフは，8 つの ROI から得られた相対 GAD 活性の平均値に基づいて作成した．対応のない 2 群の平均値間の有意差を調べるには Student の t-test を用いた. 3 群以上の平均値間の有意差を調べるには ANOVA を使用し，事後検定として Bonferoni 法を用いた.

## 3.3 結果と考察

### 3.3.1 LC/MS 分析を用いた相対 GAD 活性の測定

塩分ストレスによるオオムギ発芽種子中の GAD 活性への影響を調査するために，吸水処理後 12 時間，24 時間，36 時間，48 時間のオオムギ発芽種子における相対 GAD 活性を LC/MS 分析を用いて測定し，結果を図 3-1 に示した．その結果，コントロール種子では，ほぼ横ばいだったのに対し，塩分ストレスに曝露された種子では増加傾向にあった．さらに各発芽段階で相対 GAD 活性値を比較すると，12 時間，36 時間，48 時間の時に，コントロール種子に比べて塩分ストレスを与えた発芽種子で有意に相対 GAD 活性が高くなった（図 S7）．以前の研究では，オオムギ種子 3 品種（Athrouh，Acsad175，Rum）の塩分ストレスに対する GAD 発現遺伝子への応答が調査され，結果塩分ストレスによって GAD タンパク質をコードする mRNA 量の増加が確認された[16]．本研究においても GAD 発現量が増加した結果 GAD 活性が高くなった可能性がある．一方で，GAD はカルモジュリン（CaM）依存性の酵素で，細胞質で Glu から GABA を合成した後，ミトコンドリアへ輸送される[50]．植物では，カルシウムイオン濃度の上昇によって，GAD が活性化することによって GABA 濃度の上昇を引き起こすことが報告されている[51]．そのため，塩分ストレスがオオムギ発芽種子中の GAD タンパク質における翻訳後の調整にも影響している可能性が示唆された．

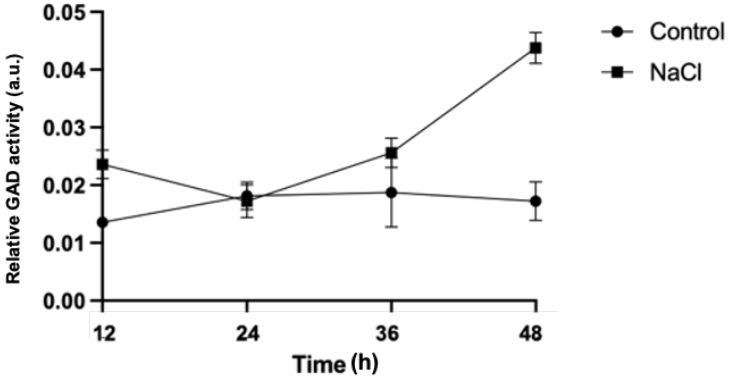


図 3-1 塩分ストレスの有無によるオオムギ種子発芽過程における相対 GAD 活性変動

### 3.3.2 オオムギ種子における相対 GAD 活性局在の可視化手法の構築

3.3.1 で塩分ストレスによってオオムギ発芽種子の GAD 活性が増加する傾向があることが示された．そのため，MSI を用いた酵素組織化学の手法によって塩分ストレスに曝露されたオオムギ発芽種子における GAD 活性局在の調査し，GAD 増加の原因となる組織の特定を試みた．

オオムギ発芽種子における GAD 活性局在の可視化手法を構築するために，オオムギ発芽種子切片上で GAD による Glu-d3 から GABA-d3 への酵素反応を確認した．基質 Glu-d3 をエアブラシによって供給後 40℃，15 分間インキュベーションした．その後，第二章のマトリックスの比較検討結果に従い (図-S1)，マトリックスには CHCA を選択し，iMlayer を用いて蒸着し，MSI 分析によってオオムギ発芽種子凍結切片上で生成物 GABA-d3 の検出を確認した．第二章の結果と同様に（図 2-3 A），本研究でも，*m/z* 107.09 を GABA-d3 由来のピークとして選択した．さらにこの GABA-d3 がオオムギ種子切片上の GAD によって生成されたことを確認するために，オートクレーブによって酵素を不活化した切片上で同様の実験をおこなった．その結果，オートクレーブ未処理の種子切片上では GABA-d3 は検出されたが，オートクレーブ処理後の切片上では GABA-d3 は検

出されなかった（図 3-2）．以上の結果より，オオムギ発芽種子切片上で GAD による Glu-d3 から GABA-d3 への酵素反応をオオムギ発芽種子切片上で確認することができた．

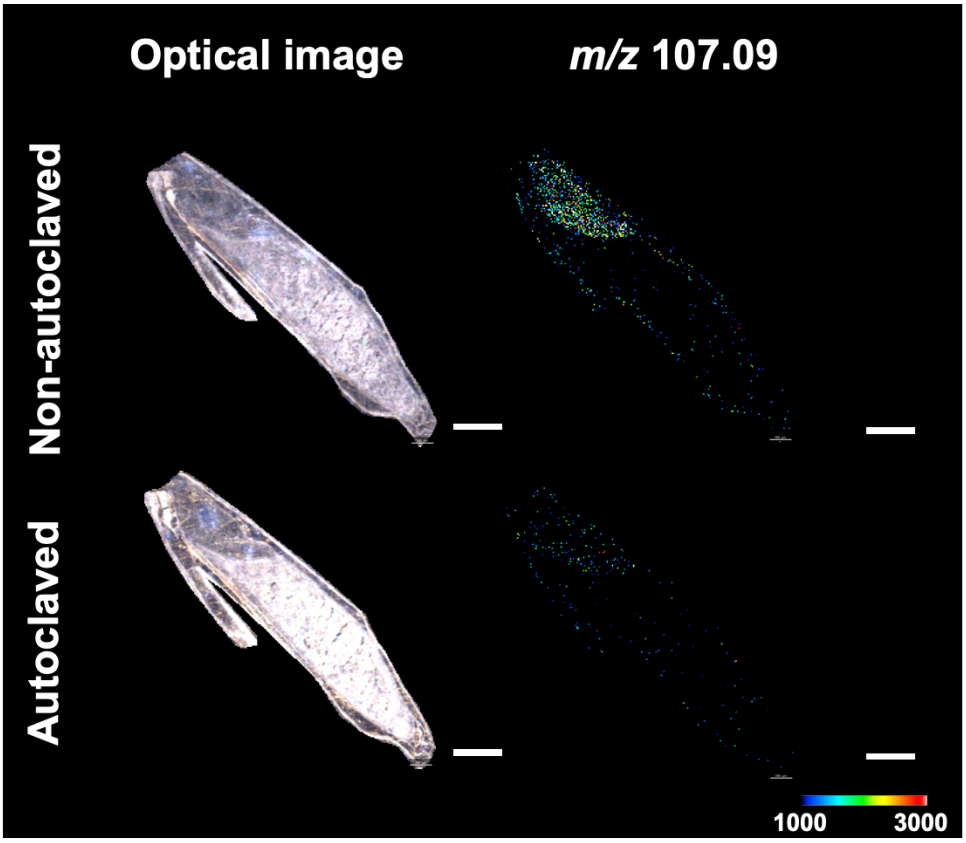


図 3-2 オオムギ発芽種子における GAD による酵素反応の確認
オートクレーブ処理/未処理の種子切片の光学顕微鏡画像と GABA-d3 分布 （*m/z* 107.09）．スケールバー：1 mm.

次に，GAD 活性局在可視化のために，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 の条件下では pH 3.0，pH 8.0 条件に比べて有意に活性が強く検出された（図 3-3 A）．以前の研究では，オオムギ種子の GAD の最適 pH は 5.0-6.0 付近に存在しており，今回の結果と一致していた[46]．したがって本研究における基質溶媒の pH には 5.8 を選択した．

酵素反応温度に関して，40℃，50℃，60℃の条件で比較した．その結果 60℃のときに，活性が有意に最も強く検出された（図 3-3 B）．したがって本研究における酵素反応温度には 60℃を選択した．以前イネの発芽種子の最適温度を調査した実験でも 60℃であったため[33]，イネ科植物の GAD の最適 pH，最適温度はこの付近であることが示唆された．

さらに，基質供給後の酵素反応のため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図 3-3 C に示した．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 分における GABA-d3 の検出強度を GAD 酵素活性の相対的な GAD の活性値分布とみなした．

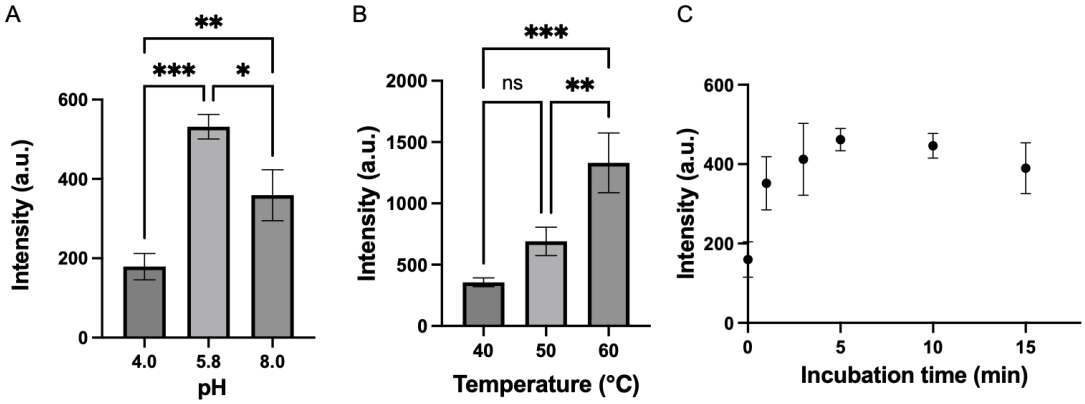


図 3-3 GABA-d3 強度の比較．

（A） 異なるバッファー pH 条件下．（B） 異なる酵素反応温度条件下．
（C） 異なる酵素反応時間条件下．n = 3．

### 3.3.3 塩分ストレス曝露時のオオムギ種子発芽過程における相対 GAD 活性の可視化

3.3.2 で決定した酵素反応条件を用いて，異なる発芽段階におけるオオムギ種子を塩分ストレスに曝露し，相対 GAD 活性の可視化を試みた．結果を図 3-4 に示した．

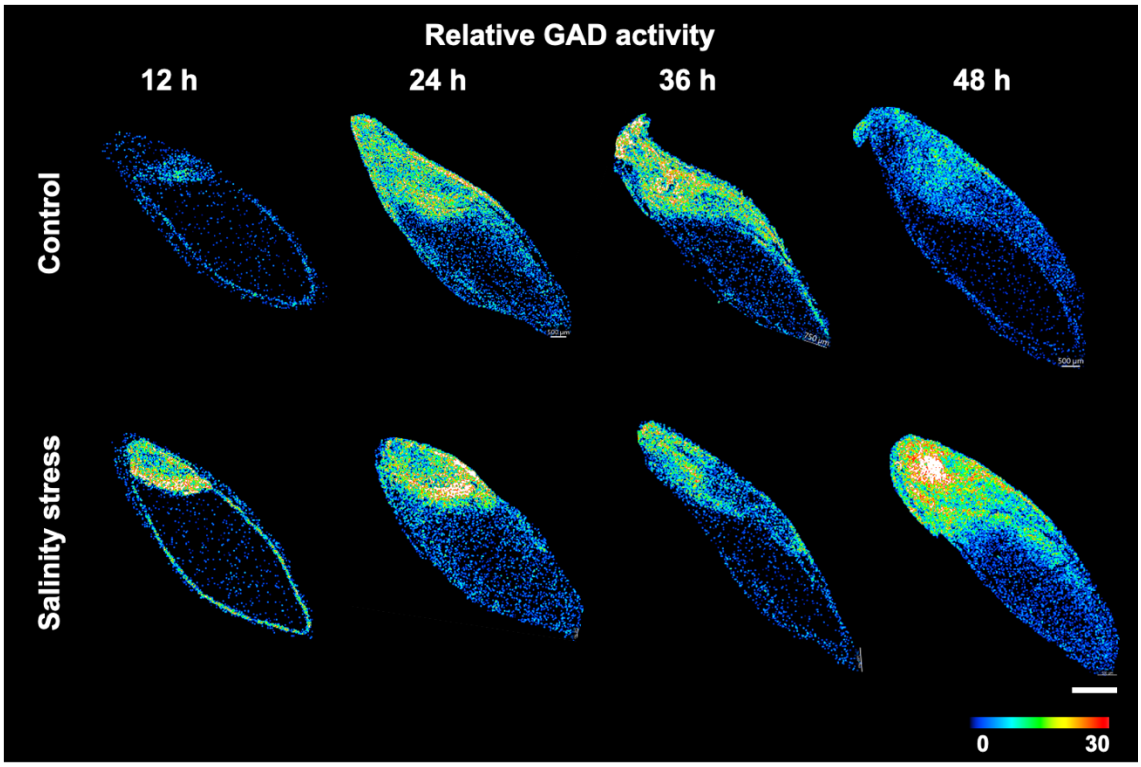


図 3-4 塩分ストレスに曝露したオオムギ種子と，曝露していない種子における異なる発芽段階(発芽処理後 12，24，36，48 時間後)の相対 GAD 活性の分布．

スケールバー：1 mm

さらに ROI 分析を用いて胚および胚乳の相対 GAD 活性の比較をおこなった．塩分ストレスに曝露されたオオムギ種子のいずれの発芽段階において，胚乳よりも胚において相対 GAD 活性が高くなった（図 S8）．近年の研究では，TCA サイクルのバイパス経路である GABA シャント経路が寒冷，高温，乾燥，などの

多くの環境ストレスに応答し活性化されることが報告されている[39]. GABA シャント経路では，グルタミン酸デヒドロゲナーゼによってアンモニアが 2-オキソグルタル酸に同化され, グルタミン酸が生成され, 続いてGADによってGABA と $CO_2$ を生成される．その後 GABA から GABA-T によってコハク酸セミアルデヒド（SSA）を経てコハク酸へと変化し TCA サイクルに合流する．環境ストレスのうち塩分ストレスによっても GABA シャント経路が亢進されることが知られており[45]，塩分ストレスに曝露されたダイズ種子において，GAD および GABA シャントの活性の増加が報告された[54]. また, GABA シャントの活性は, pH とカルシウムイオン量に依存する GAD 活性に影響されることが報告されている[55]．さらに植物組織では，塩分ストレスを含む環境ストレス条件下で活性酸素の蓄積が促進されることが知られているが，GABA シャント経路の亢進によって，活性酸素の発生を効果的に抑制することが知られている[13]．そのため抗酸化物質が, 発芽する胚を保護し, 発芽を成功させるために重要な役割を果たすと考えられる．発芽オオムギ種子中の胚において塩分ストレスによって抗酸化物質であるフラボノイドが増加することが示されており[56]，胚における GAD 活性が増加し GABA シャントが亢進することで, 抗酸化物質を介在した塩分ストレス応答に関与している可能性が示唆された．したがってオオムギの発芽種子胚中の GAD 活性が増加したことで，GABA シャント経路が亢進され，抗酸化物質を介在した塩分ストレスに応答した可能性がある．この事実をさらに検証にするためには GABA シャント経路に関わる代謝物や酵素，抗酸化物質を調査する必要がある．

加えて本結果では, 胚乳においても GAD 活性が検出された(図 3-4). 胚乳は発芽種子の大部分を占め，発芽段階において成長する胚に栄養を供給するための栄養貯蔵器官である．この部位を構成する成熟した細胞には, 貯蔵タンパク質や

デンプン粒が詰まっているが，生細胞ではない[52]．そのため胚乳においてもGAD 活性が観察されたのは，二つの可能性がある．一つは胚乳に保存されていた GAD タンパク質が活性化された可能性がある．もう一つは，GAD 種子の胎盤や糊粉層から GAD 酵素が供給された可能性が考えられる．例えばデンプン分解酵素であるアミラーゼは糊粉層から胚乳に供給されることが知られている[53]．本研究の結果は，これらの他の組織から胚乳に GAD タンパク質が供給された可能性を示唆した初めての研究である．しかし，この事実を検証にするためには発現タンパク質そのものを追跡する他の技術を組み合わせた更なる研究が必要である．

本実験では，吸水処理後の時間ごとに塩分ストレスの有無で比較すると平均活性に違いが見られた（図 S7）．しかし 24 時間，36 時間，48 時間の胚の大きさを比べると（図 3-4），違いが見られた．これは塩分ストレスによって吸水スピードや成長スピードが異なったためだと考えられる[48, 49]．一方で発芽処理 12 時間後の胚では大きさに違いは特に観察されなかったが，胚や種皮周辺の相対 GAD 活性分布の結果に明らかに違いが見られた（図 3-4）．そこで吸水処理 12 時間後のオオムギ発芽種子の胚と種皮周辺部における GAD 活性の詳細な調査をおこなった．

### 3.3.4 オオムギ発芽種子の胚，種皮周辺部における相対 GAD 活性の可視化

発芽処理 12 時間後の発芽種子の胚における GAD 活性の分布を詳細に調査するために，オオムギ発芽種子の胚のみを高解像度（レーザー照射間隔：15 μm）で分析し，結果を図 3-5A に示した．ROI 分析によって塩分ストレスに曝露され

た種子胚とコントロール種子胚における相対 GAD 活性を比較した結果，塩分ストレスに曝露された種子の胚で有意に活性が高かった（図 3-5 B）．さらにこの結果の再現性を確認した（図 S9 B）．胚内部の構造に注目すると，塩分ストレスに曝露された種子の胚盤（Scutellum）において相対 GAD 活性が高かった（図 3-5 C）．さらにこの結果の再現性を確認した（図 S9 C）．

植物種子の胚盤は，植物胚と胚乳の界面に位置し，デンプン分解酵素の分泌や分解産物の吸収の両方に関わる重要な構成要素である[53]．アブシシン酸アナログを人工的に処理されたイネ発芽種子において，胚盤組織の拡大促進と，組織内における多糖代謝酵素やタンパク質を発現することが示された[57]．アブシシン酸は植物の様々なストレス応答に重要な役割を持つ植物ホルモンであるため，この結果より種子胚盤において GAD 活性の増加にともなう塩分ストレス応答に関わる重要な組織である可能性が示された．

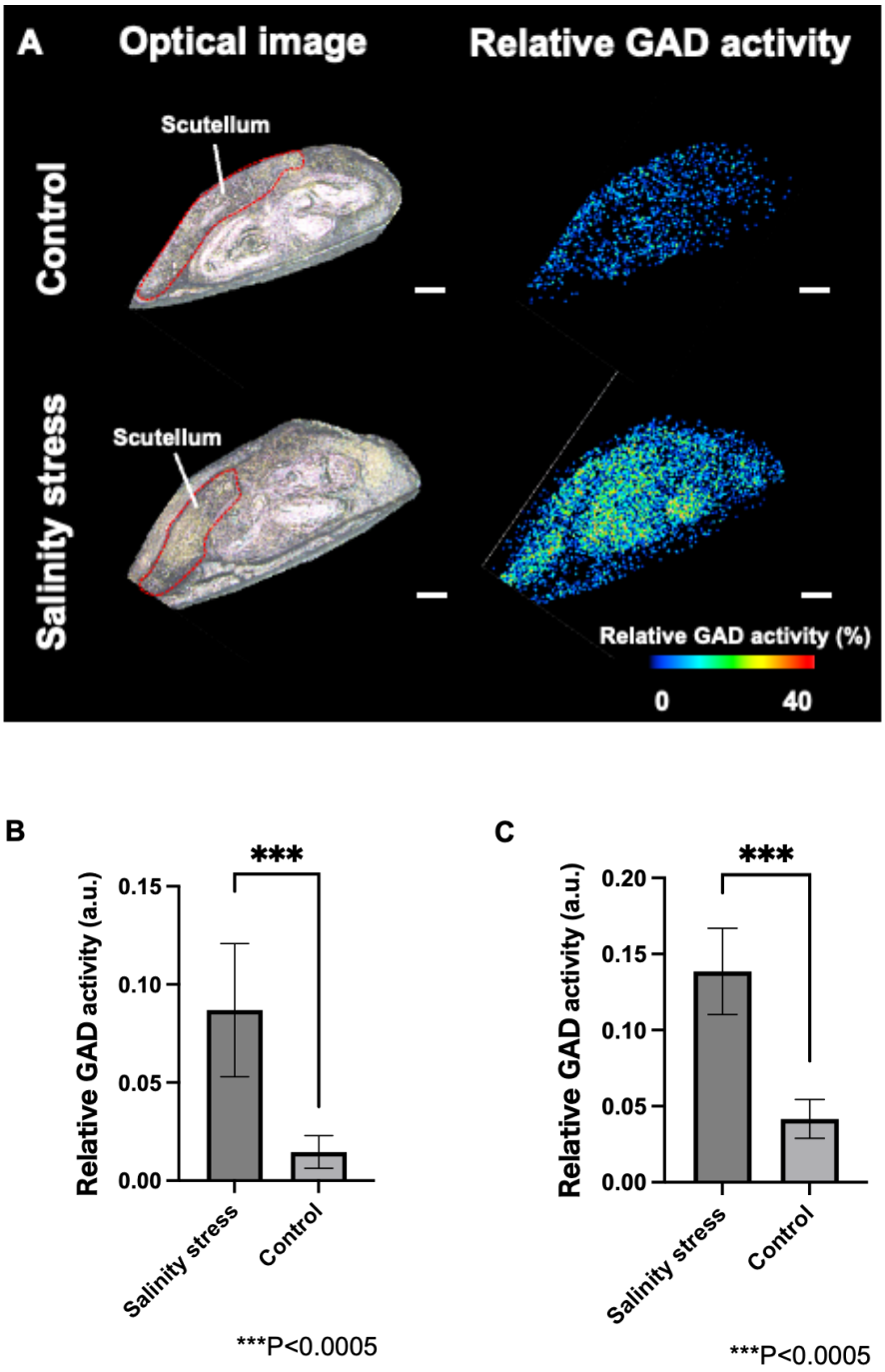


図 3-5 （A）発芽処理後 12 時間，塩分ストレスに曝露したオオムギ種子胚と，曝露していない種子胚における相対 GAD 活性の分布と（B）比較．（C）胚盤における相対 GAD 活性の比較．スケールバー：200 μm.

さらに塩分ストレスに曝露されたオオムギ発芽種子とコントロール種子における種皮周辺部の相対 GAD 活性を比較した．光学顕微鏡画像より塩分ストレスによって糊粉層（Aleurone layer）の構造的な違いは見られなかったが，糊粉層において相対 GAD 活性が強く検出された（図 3-6）．さらに本現象の再現性も確認できた（図 S10）．糊粉層は，種皮と胚乳の間の細胞層で，発芽に関与する多くのタンパク質を含む重要な層である[53]．発芽時の吸水により糊粉層において活性酸素種を生成する酵素である NADPH oxidase の遺伝子発現が増加することが免疫組織染色法によって示されており[58]，糊粉層が，GAD が活性酸素の生成に関わる塩分ストレス応答に関わる重要な組織であることが示唆された．

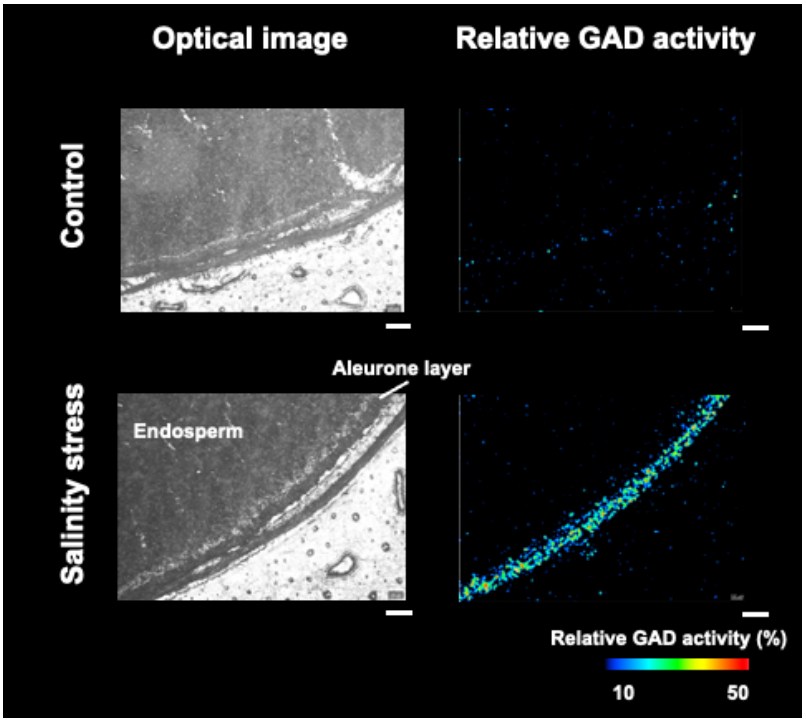


図 3-6．発芽処理後 12 時間，塩分ストレスに曝露したオオムギ種子表層と，曝露していない種子表層における相対 GAD 活性の分布．スケールバー：200 μm.

## 3.4 小括

本研究の結果より, MSI を酵素組織化学に応用することで, オオムギ発芽種子を用いて発芽時の 相対 GAD 活性を可視化することに成功した．さらにこの手法を塩分ストレスに曝露されたオオムギの発芽種子における GAD 活性の可視化に適用した．LC/MS 分析によって塩分ストレスによってオオムギ発芽種子中で GAD 活性が増加することが明らかとなった．そこで MSI による酵素活性の局在を可視化することで GAD 活性増加の原因が, 主に種子胚における相対 GAD 活性が増加したことによることが明らかとなった．さらに抽出分析では分離が難しく，活性の測定が比較的困難な種子表層の組織である糊粉層においてより高い GAD 活性が検出することに成功した．本手法は，免疫組織染色や *in situ* ハイブリダイゼーションなどの他のイメージング技術と組み合わせることによってオオムギ種子のストレス耐性に関わる GAD 酵素反応を含む GABA シャントの役割を明らかにできる可能性がある．

# 第四章 総括と展望

## 4.1 本研究の総括

本博士研究では，質量分析イメージング法による酵素組織化学手法を応用し，植物発芽種子において GAD 活性の局在を可視化する手法を確立することに成功した.

第二章では，重水素標識された Glu-d3 を基質として使用し，双子葉植物であるマメ科植物のダイズ発芽種子とアルファルファ発芽種子において GAD 酵素組織化学手法を構築した. 本手法によって，従来の方法では不明であったダイズの組織内での 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種子内の組織間の GAD 活性の局在の違いも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.

第三章では，第二章で構築した手法を応用し，単子葉植物であるオオムギ発芽種子の GAD を対象とした酵素組織化学手法を開発した. さらにこの手法を塩分ストレスに曝露されたオオムギの発芽種子における GAD 活性の可視化に適用し，従来の酵素活性測定法では抽出が比較的困難である，種子表層の組織や胚中の組織において，塩分ストレスによる GAD 活性への影響を明らかにした.

本博士論文は，従来の酵素組織化学手法では活性を可視化することができない GAD 活性の局在を可視化した最初の報告である. 加えて，植物サンプルを用いた MSI による酵素組織化学に応用した最初の例であり，MSI による酵素組織化学の更なる発展可能性を示した.

## 4.2 本研究の展望

本研究によって，MSI を用いた植物発芽種子における GAD 活性の可視化手法を確立し，本手法が塩分ストレスに対する植物の組織特異的な応答の調査にも応用できることを示した．

本手法を応用することで，GAD が植物の発芽過程や塩分ストレスに対してどのように寄与しているかを解明し，植物による耐塩分ストレスのためのメカニズムの一端を解明できることが期待される．最終的には，GABA 高生産品種や塩分ストレスに対して高塩分ストレス耐性品種の作出につながるであろう．

さらに，発芽時の植物種子中のストレスに対する GAD 活性の制御は GABA 生合成量にも影響すると考えられる．MSI は内在性代謝物を可視化できる強力なツールでもあるため，種子の発芽段階における内在性 GABA 分布と GAD 酵素活性の局在を同時に可視化し，イメージング結果を比較することで，GABA と GAD 酵素活性の因果関係を明らかにすることができると予想される．これらの結果により，GABA 高生産に関わる組織特異的な知見を獲得することができれば，GABA 高含有品種の作出などに貢献できる可能性がある．

また MSI は農薬や植物調整剤などの外因性の化合物の可視化も可能である．そこで植物調整剤の分布と酵素活性の局在を比較することで，植物調整剤による植物体内の酵素活性への影響を間接的に明らかにできる可能性がある．これにより，既存の植物調整剤の作用メカニズムを明らかにすることや新規の調整剤の開発に役立てられる．

最後に，本手法は，植物組織だけでなく動物の神経組織における GAD 活性の局在可視化にも応用できると考えられる．GAD は動物において神経伝達に関わる重要な酵素であり，本可視化手法は動物組織の神経・精神疾患の研究に応用できる可能性があるため，今まで明らかにされなかった疾患に関する知見を得る

ことができれば，医療分野にも大きな貢献を果たすことができる.

## 引用文献

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, **27**, 153-165 (2019).

3. **Van Noorden, C. J.:** Imaging enzymes at work: metabolic mapping by enzyme histochemistry, J Histochem Cytochem, **58**, 481-497 (2010).

4. **Heal, W. P., Dang, T. H., and Tate, E. W.:** Activity-based probes: discovering new biology and new drug targets, Chem Soc Rev, **40**, 246-257 (2011).

5. **Lauchli, A.:** Cryostat technique for fresh plant tissues and its application in enzyme histochemistry, Planta, **70**, 13-25 (1966).

6. **Molero de Avila, M. E., Alarcon, 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).

7. **Caprioli, R. M.:** Imaging mass spectrometry: A perspective, J Biomol Tech, **30**, 7-11 (2019).

8. **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**, E1016-1024 (2012).

9. **Erich, K., Reinle, K., Muller, 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).

10. **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).

11. **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).

12. **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, **134**, 133-137 (2022).
13. **Li, L., Dou, N., Zhang, H., and Wu, C.:** The versatile GABA in plants, Plant Signal Behav, **16**, 1862565 (2021).
14. **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).
15. **Zhao, G. C., Xie, M. X., Wang, Y. C., and Li, J. Y.:** Molecular mechanisms underlying gamma-aminobutyric acid (GABA) accumulation in giant embryo rice seeds, J Agric Food Chem, **65**, 4883-4889 (2017).
16. **Al-Quraan, N. A., Al-Ajlouni, Z. I., and Obedat, D. I.:** The GABA shunt pathway in germinating seeds of wheat (*Triticum aestivum L.*) and barley (*Hordeum vulgare L.*) under salt stress, Seed Science Research, **29**, 250-260 (2019).
17. **Hepsomali, P., Groeger, J. A., Nishihira, J., and Scholey, A.:** Effects of oral gamma-aminobutyric acid (GABA) administration on stress and sleep in humans: A systematic Rreview, Front Neurosci, **14**, 923 (2020).
18. **Okunuki, K.:** Ueber ein neues enzym glutaminocarboxylase, Bot. Mag. (Tokyo), **51**, 270 (1937).
19. **Ambe L., and Sohonie K**.: Purification and properties of glutamate, Enzymologia, **26**, 98-107 (1963).
20. **Satyanarayan, V. and Nair, P. M.:** Purification and characterization of glutamate decarboxylase from Solanum tuberosum, Eur J Biochem, **150**, 53-60 (1985).
21. **Snedden, W. A., Arazi, T., Fromm, H., and Shelp, B. J.:** Calcium/calmodulin activation of soybean glutamate decarboxylase, Plant Physiol, **108**, 543-549 (1995).
22. **Snedden W. A., Koutsia N., Baum G., and Fromm H.**: Activation of a recombinant petunia glutamate decarboxylase by calcium/calmodulin or by a monoclonal antibody which recognizes the calmodulin binding domain, J Biol Chem, **271**, 4148-53 (1996).
23. **Dmytro P., Yevtushenko, Michael D. McLean, Sriyani Peiris, Owen R. Van Cauwenberghe, and Barry J. Shelp**: Calcium/calmodulin activation of two divergent glutamate decarboxylases from tobacco, J Exp Bot, 54, 2001-03 (2003).
24. **Wang L, Liu M,Lv YG, and Zhang H.**: Purification of calmodulin from rice bran and activation of glutamate decarboxylase by $Ca^{2+}$/calmodulin, J Sci Food Agric, **90**, 669-75 (2010).
25. **Yang, R., Yin, Y., Guo, Q., and Gu, Z.:** Purification, properties and cDNA cloning of glutamate decarboxylase in germinated faba bean (*Vicia faba L.*), Food Chem, **138**,

1945-1951 (2013).
26. **Brandon S. Johnson, Narendra K. Singh, Joe H. Cherry, Robert D. Locy, :** Purification and characterization of glutamate decarboxylase from cowpea, Phytochemistry, **46**, 39-44 (1997).
27. **Inatomi K, and Slaughter J. C.**: Glutamate decarboxylase from barley embryos and roots. General properties and the occurrence of three enzymic forms. Biochem J., **147**, 479-84 (1975).
28. **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).
29. **Nakano, Y., Taniguchi, M., and Fukusaki, E.:** High-sensitive liquid chromatography-tandem mass spectrometry-based chiral metabolic profiling focusing on amino acids and related metabolites, J Biosci Bioeng, **127**, 520-527 (2019).
30. **Shariatgorji, M., Nilsson, A., Goodwin, R. J., Kallback, 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).
31. **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).
32. **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).
33. **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**, S166-S170 (2019).
34. **Matsumoto, T., Yamaura, I., and Funatsu, M.:** Improved Purification and Spectroscopic Properties of Squash Glutamate Decarboxylase, Biosci Biotechnol Biochem, **60**, 889-890 (1996).
35. **Yang, R., Feng, L., Wang, S., Yu, N., and Gu, Z.:** Accumulation of gamma-aminobutyric acid in soybean by hypoxia germination and freeze-thawing incubation, J Sci Food Agric, **96**, 2090-2096 (2016).
36. **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 (2017).
37. **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 XXX authors:** The plant vascular system: evolution, development and functions, J Integr Plant Biol, **55**, 294-388 (2013).
38. **Oh, Suk-Heung and Won-Gyu Choi.**: Changes in the levels of γ-aminobutyric acid and glutamate decarboxylase in developing soybean seedlings, J Plant Res, **114**, 309-313 (2001).
39. **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 Adv, **8**, 20456-20461 (2018).
40. **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).
41. **Dash, M., Panda, S.:** Salt Stress Induced Changes in Growth and Enzyme Activities in Germinating *Phaseolus Mungo* Seeds, Biol Plant, **44**, 587–589 (2001).
42. **Tuan, P.A. Sun, M., Nguyen, T.-N., Park, S., Ayele, B.T.:** Molecular mechanisms of seed germination. in sprouted grains, Feng, H., Nemzer, B., DeVries, J.W., Eds.; AACC International Press: Washington DC, USA, 1–24（2019）.
43. **Tester, M. and Davenport, R.:** $Na^+$ tolerance and $Na^+$ transport in higher plants, Ann Bot, **91**, 503-527 (2003).
44. **Shelp, B. J., Aghdam, M. S., and Flaherty, E. J.:** gamma-Aminobutyrate (GABA) regulated plant defense: mechanisms and opportunities, Plants (Basel), **10** (2021).
45. **Fait, A., Fromm, H., Walter, D., Galili, G., and Fernie, A. R.:** Highway or byway: the metabolic role of the GABA shunt in plants, Trends Plant Sci, **13**, 14-19 (2008).
46. **Dermendjiev, G., Schnurer, M., Weiszmann, J., Wilfinger, S., Ott, E., Gebert, C., Weckwerth, W., and Ibl, V.:** Tissue-specific proteome and subcellular microscopic analyses reveal the effect of high salt concentration on actin cytoskeleton and vacuolization in aleurone cells during early germination of barley, Int J Mol Sci, **22** (2021).
47. **Kihara, M., Okada, Y. Iimure, T. Ito, K.:** Accumulation and degradation of two functional constituents, GABA and beta-glucan, and their varietal differences in germinated barley *Hordeum vulgare* grains, Breed Sci, **57**, 85-89（2007）
48. **Zhang, H., Irving, L. J., McGill, C., Matthew, C., Zhou, D., and Kemp, P.:** The effects of salinity and osmotic stress on barley germination rate: sodium as an osmotic regulator, Ann Bot, **106**, 1027-1035 (2010).
49. **Isayenkov, S. V.:** Genetic sources for the development of salt tolerance in crops, Plant

Growth Regul, **89**, 1-17 (2019).
50. **Krasensky, J. and Jonak, C.:** Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks, J Exp Bot, **63**, 1593-1608 (2012).
51. **Baum, G., Lev-Yadun, S., Fridmann, Y., Arazi, T., Katsnelson, H., Zik, M., and Fromm, H.:** Calmodulin binding to glutamate decarboxylase is required for regulation of glutamate and GABA metabolism and normal development in plants, EMBO J, **15**, 2988-2996 (1996).
52. **W. M. Lamkin, S. W. Nelson, B. S. Miller, and Y. Pomeranz.:** Glutamic acid decarboxylase activity as a measure of percent germination for barley, Cereal Chem, **60**, 166-171 (1983).
53. **G, B, Fincher,:** Molecular and Cellular Biology Associated with Endosperm Mobilization in Germinating Cereal Grains, Annu Rev Plant Physiol, **40**, 305-346 (1989)
54. **Yin, Y., Yang, R., Han, Y., and Gu, Z.:** Comparative proteomic and physiological analyses reveal the protective effect of exogenous calcium on the germinating soybean response to salt stress, J Proteomics, **113**, 110-126 (2015).
55. **Che-Othman, M. H., Millar, A. H., and Taylor, N. L.:** Connecting salt stress signalling pathways with salinity-induced changes in mitochondrial metabolic processes in C3 plants, Plant Cell Environ, **40**, 2875-2905 (2017).
56. **Gupta, S., Rupasinghe, T., Callahan, D. L., Natera, S. H. A., Smith, P. M. C., Hill, C. B., Roessner, U., and Boughton, B. A.:** Spatio-temporal metabolite and elemental profiling of salt stressed barley seeds during initial stages of germination by MALDI-MSI and micro-XRF spectrometry, Front Plant Sci, **10**, 1139 (2019).
57. **Asakura, T., Hirose, S., Asatsuma, S., Nanjo, Y., Nakaizumi, T., Itoh, K., Hori, H., Komatsu, S., and Mitsui, T.:** Proteomic characterization of tissue expansion of rice scutellum stimulated by abscisic acid, Biosci Biotechnol Biochem, **71**, 1260-1268 (2007).
58. **Ishibashi, Y., Kasa, S., Sakamoto, M., Aoki, N., Kai, K., Yuasa, T., Hanada, A., Yamaguchi, S., and Iwaya-Inoue, M.:** A role for reactive oxygen species produced by NADPH oxidases in the embryo and aleurone cells in barley seed germination, PLoS One, **10**, e0143173 (2015).

## 発表論文

三好航平，生田宗一郎，福崎英一郎，新間秀一

「質量イメージングの展開」『バイオイノベーションに向けて～バイオテクノロジーの新技術からの新しい視点～』pp59-67　（2019）

**Ikuta, S., Shinohara, N., Fukusaki, E., and Shimma, S.:** Mass spectrometry imaging enables visualization of the localization of glutamate decarboxylase activity in germinating legume seeds, J Biosci Bioeng, **134**, 356-361 (2022).

※本学位論文に関与する論文

**Ikuta, S., Fukusaki, E., and Shimma, S.:** Visualization of glutamate decarboxylase activity in barley seeds under salinity stress using mass microscope, Metabolites, **12**, 1262 (2022).

※本学位論文に関与する論文

## 学会発表

国際学会およびシンポジウムにおける発表

Soichiro Ikuta, Eiichiro Fukusaki, Shuichi Shimma

"*In situ* visualization of glutamate decarboxylase activity in germinating plant seed using mass microscope"

The 23rd Academic Exchange Seminar Between Shanghai Jiao Tong University And Osaka University，Online，December 2022

Soichiro Ikuta, Eiichiro Fukusaki, Shuichi Shimma

"Visualization of glutamate decarboxylase activity in barley seeds under salinity stress using mass microscope"

6th International symposium of the KBMSS International mass spectrometry imaging Symposium, Kyoto, January 2023

国内学会およびシンポジウムにおける発表

生田宗一郎，岡澤敦司，西脇寿，福崎英一郎，新間 秀一「質量顕微鏡による *Solanum lycopersicum* におけるネオニコチノイド系農薬の移行の解析」，日本農芸化学会，東京，2019 年 3 月

生田宗一郎，岡澤敦司，西脇寿，福崎英一郎，新間 秀一 "Visualization of neonicotinoids in *Solanum lycopersicum* using Mass Microscope"，知の共創プログラム公開シンポジウム，大阪，2019 年 3 月

生田宗一郎，福崎英一郎，新間 秀一「質量顕微鏡を用いたコムギ葉 （*Triticum aestivum*） 断面におけるアゾキシストロビンの経時的分布可視化法の開発」，日本生物工学会，岡山，2019 年 9 月

○生田 宗一郎，福崎 英一郎，新間 秀一，「質量顕微鏡を用いたイネ科植物の発芽種子におけるグルタミン酸脱炭酸酵素活性の可視化」，日本生物工学会，オンライン，2021 年 10 月

○生田 宗一郎，福崎 英一郎，新間 秀一，「質量顕微鏡を用いたオオムギ発芽種子におけるグルタミン酸脱炭酸酵素活性の可視化」，日本生物工学会，オンライン，2022 年 10 月

## 謝辞

本博士論文は，著者が大阪大学工学研究科生物工学専攻博士後期課程在籍中に行った研究成果をまとめたものです．

本研究を進めるにあたり，終始ご指導ご鞭撻を賜りました大阪大学工学研究科生物工学専攻 福崎英一郎教授に謹んで感謝の意を表します．また，日頃より懇切丁寧なご指導を賜りました大阪大学工学研究科生物工学専攻 新間秀一准教授に厚く御礼申し上げます．また，本論文を精読してくださり数多なるご助言を賜りました大阪大学工学研究科生物工学専攻 村中俊哉教授ならびに大阪大学生物工学国際交流センター 藤山和仁教授に厚く感謝申し上げます．さらに，日頃より研究室生活全般にわたり暖かいご援助を賜りました大阪大学工学研究科生物工学専攻 Sastia Prama Putri 准教授に心より感謝申し上げます．学部生時代より研究活動のご指導を賜り，現在まで数々のご相談に乗っていただいた大阪公立大学農学研究科 岡澤敦司准教授に深く御礼申し上げます。

加えて，本研究で使用した質量分析イメージング装置ならびに前処理装置を提供していただきました大阪大学・島津分析イノベーション協働研究所 飯田順子所長に厚く御礼申し上げます．

そして，研究活動のみならず研究室生活において大変お世話になりました大阪大学工学研究科生物工学専攻生物資源工学領域のイメージングチームの Rattanaburi Pitchapa 修士，林大暉学士，篠原菜穂学士，Eliza Farestiani 学士，石本梓穂氏，林優希氏，研究室配属時からの研究室同期，諸先輩方，学生諸氏，研究員，事務補佐の方々に心より感謝の意を表します．本当にありがとうございました．

最後に，博士後期課程へ進学する機会を与えいつも側で支えてくれた家族，そして応援し続けてくれた多くの友人に深い感謝の意を表して謝辞と致します．

# 付録

## 第二章に関わる付録（掲載順）

表 S1．MSI 分析における iMScope QT の分析パラメーター

表 S2．LC/MS 分析における内部標準物質の MRM トランジションとパラメーター

図 S1．2 種類のマトリックス（CHCA と DHB）使用時の GABA-d3 強度の比較

図 S2．ダイズ未発芽種子とダイズ発芽種子切片上で GAD 酵素反応によって生成した GABA-d3 平均強度の比較

図 S3．図 2-5 の再現実験結果

図 S4. LC/MS 分析によるダイズ種子の子葉部，胚軸部における GAD 酵素反応による GABA-$^{15}$N 面積値の比較

図 S5．図 2-6 の再現実験結果

図 S6．図 2-7 の再現実験結果

## 第三章に関わる付録（掲載順）

表 S3．MSI 分析における iMScope QT の分析パラメーター

表 S4 LC/MS 分析における内部標準物質の MRM トランジションとパラメータ

図 S7．LC/MS 分析による発芽処理 12 時間，24 時間，36 時間，48 時間後におけるオオムギ発芽種子中の相対 GAD 活性値

図 S8．ROI 分析による発芽処理 12 時間，24 時間，36 時間，48 時間後のオオムギ発芽種子胚および胚乳における相対 GAD 活性値の比較

図 S9．図 3-5 の再現実験結果

図 S10．図 3-6 の再現実験結果

表 S1 MSI 分析における iMScope QT の分析パラメーター

| レーザー照射条件 | | |
|---|---|---|
| 照射回数 | 50 回 | |
| 繰り返し周波数 | 1000 Hz | |
| 照射径 | 1（約 10 μm） | 2（約 25 μm） |
| レーザー強度 | 77.6 | 77.6 |
| **MS 分析条件** | | |
| イオン種 | ポジティブイオン（プロトン付加体） | |
| *m/z* 測定範囲 | 95-155 | |
| 積算回数 | 1 回 | |
| サンプルプレート電圧 | 3.50 kV | |
| 検出器電圧 | 2.30 kV | |
| MS 段数 | 1 | |

表 S2 LC/MS 分析における LC-MS 8060 の分析パラメーター

| | プリカーサー<br>イオン<br>（*m/z*） | プロダクト<br>イオン<br>（*m/z*） | Q1 Pre Bias<br>（V） | CE<br>（eV） | Q3 Pre Bias<br>（V） |
|---|---|---|---|---|---|
| Glu-$^{15}$N | 149.10 | 85.10 | −10 | −17 | −18 |
| GABA-$^{15}$N | 105.05 | 87.10 | −29 | −11 | −16 |
| Ala-$d_4$<br>（IS） | 94.15 | 48.20 | −13 | −19 | −15 |

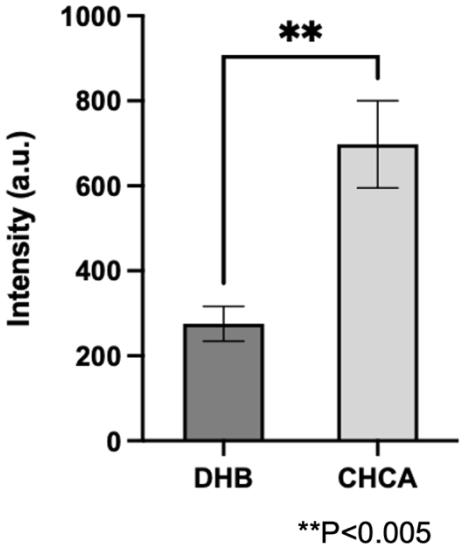


図 S1. 2 種類のマトリックス（CHCA と DHB）使用時の GABA-d3 強度の比較．n = 3.

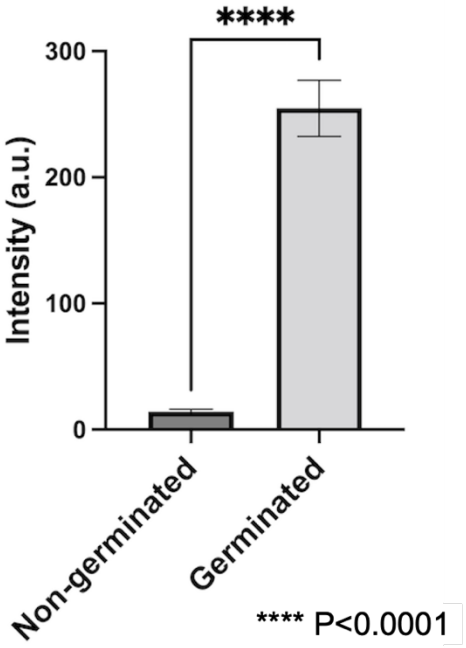


図 S2 ダイズ未発芽種子とダイズ発芽種子切片上で GAD 酵素反応によって生成した GABA-d3 平均強度の比較. n = 3.

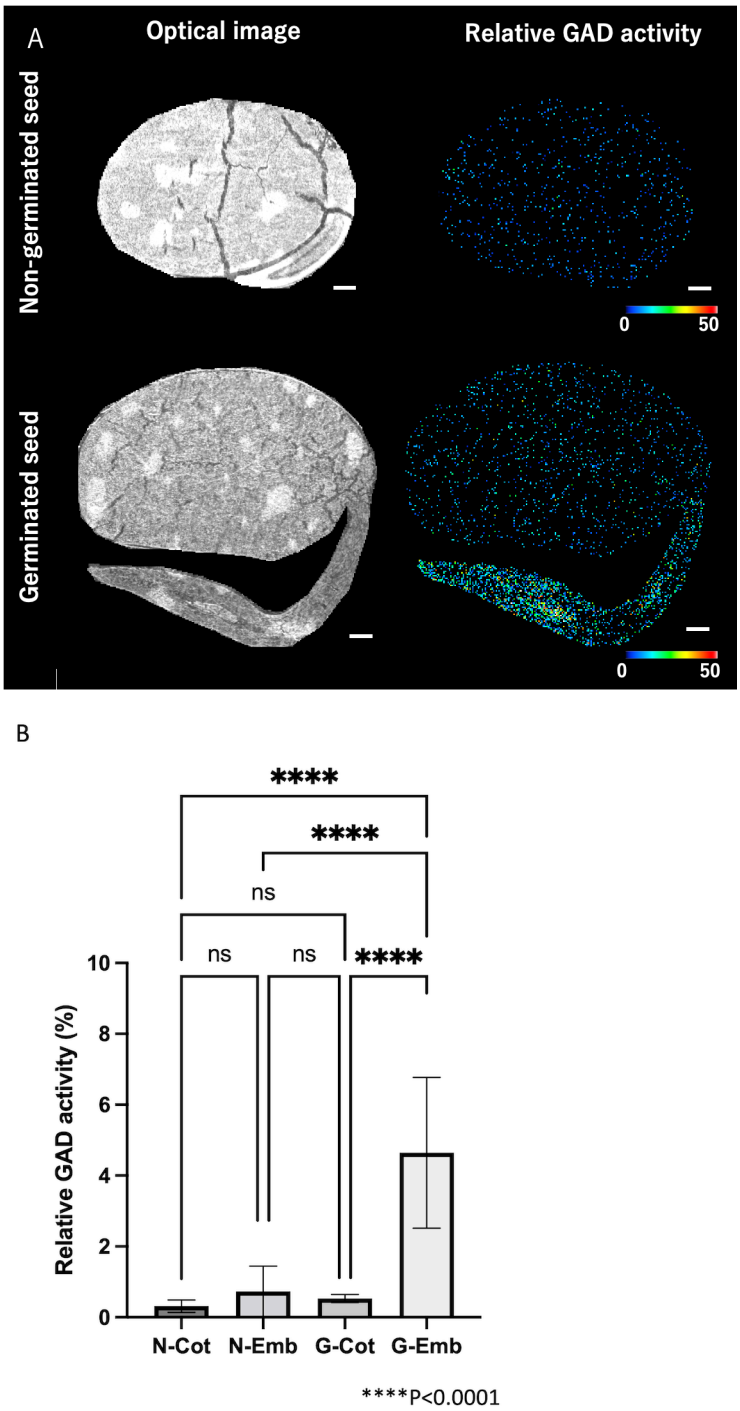


図 S3. 図 2-5 の再現実験結果．スケールバー：500 μm .

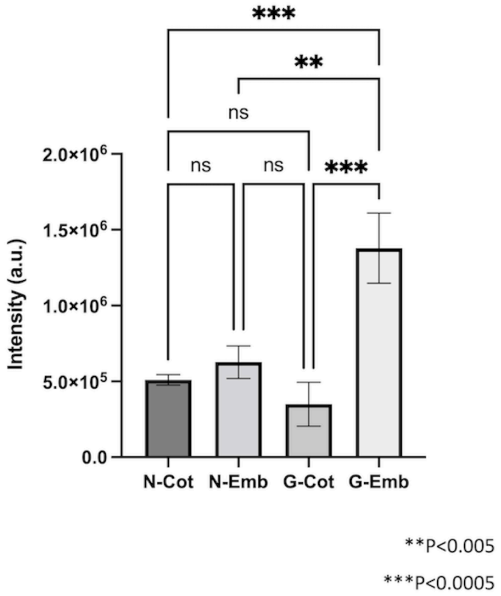


図. S4. LC/MS 分析によるダイズ種子の子葉部，胚軸部における GAD 酵素反応による GABA-$^{15}$N 面積値の比較; 未発芽種子子葉 （N-Cot），未発芽種子胚軸 （N-Emb），発芽種子子葉 （G-Cot），発芽種子胚軸 （G-Emb）

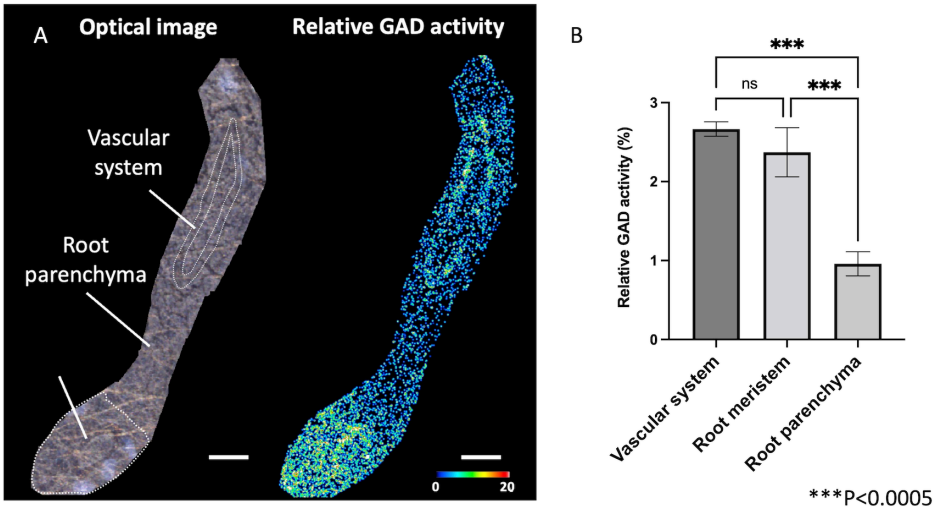


図 S5. 図 2-6 の再現実験結果．スケールバー：1 mm .

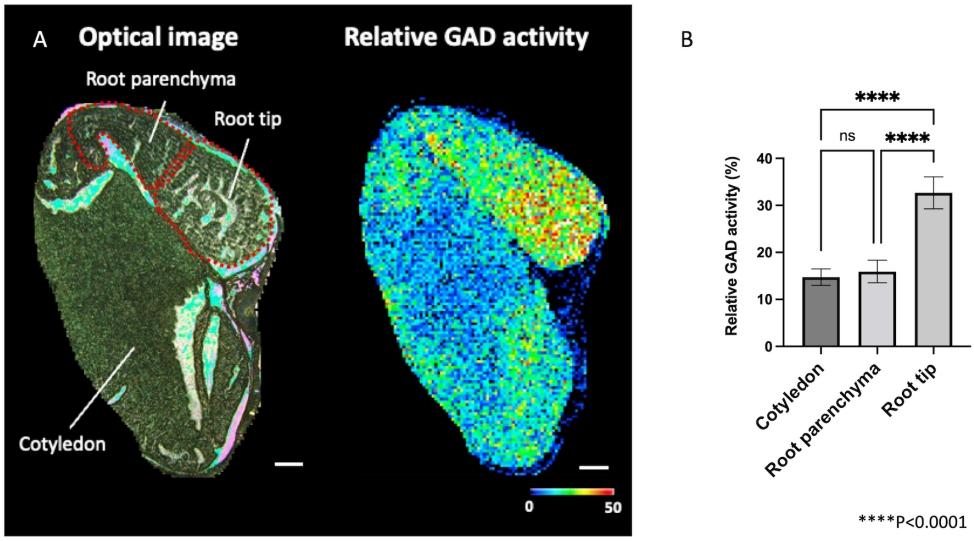


図 S6. 図 2-7 の再現実験結果．スケールバー：250 μm .

表 S3 MSI 分析における iMScope QT の分析パラメーター

| レーザー照射条件 | | |
|---|---|---|
| 照射回数 | 50 回 | |
| 繰り返し周波数 | 1000 Hz | |
| 照射径 | 1（約 10 μm） | 2（約 25 μm） |
| レーザー強度 | 77.6 | 77.6 |
| **MS 分析条件** | | |
| イオン種 | ポジティブイオン（プロトン付加体） | |
| *m/z* 測定範囲 | 95-155 | |
| 積算回数 | 1 回 | |
| サンプルプレート電圧 | 3.50 kV | |
| 検出器電圧 | 2.30 kV | |
| MS 段数 | 1 | |

表 S4 LC/MS 分析における LC-MS 8060 の分析パラメーター

| | プリカーサー イオン (*m/z*) | プロダクト イオン (*m/z*) | Q1 Pre Bias (V) | CE (eV) | Q3 Pre Bias (V) |
|---|---|---|---|---|---|
| Glu-$^{15}$N | 149.10 | 85.10 | −10 | −17 | −18 |
| GABA-$^{15}$N | 105.05 | 87.10 | −29 | −1 | −16 |
| Ala-$d_4$ (IS) | 94.15 | 48.20 | −13 | −19 | −15 |

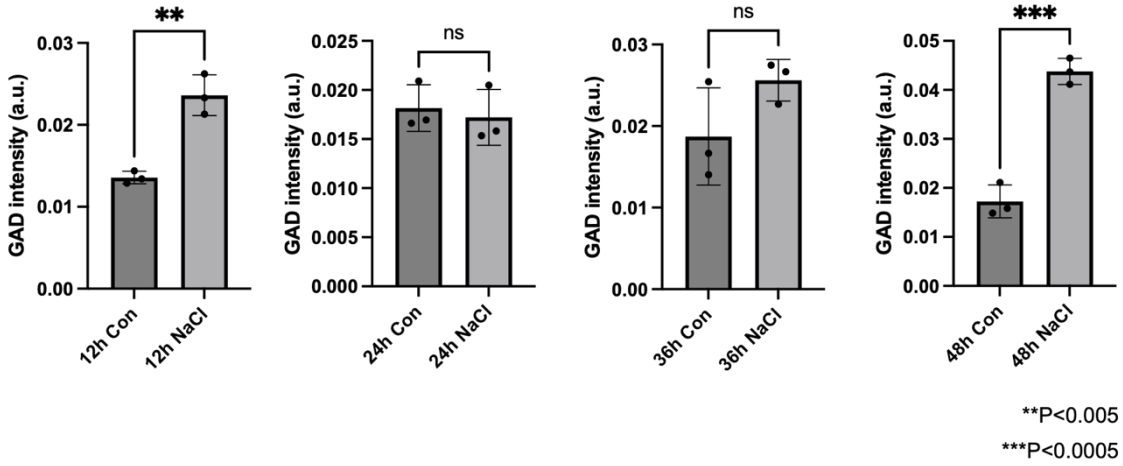


図 S7 LC/MS 分析による発芽処理 12 時間，24 時間，36 時間，48 時間後における
オオムギ発芽種子中の相対 GAD 活性値の塩分ストレス曝露の有無での比較

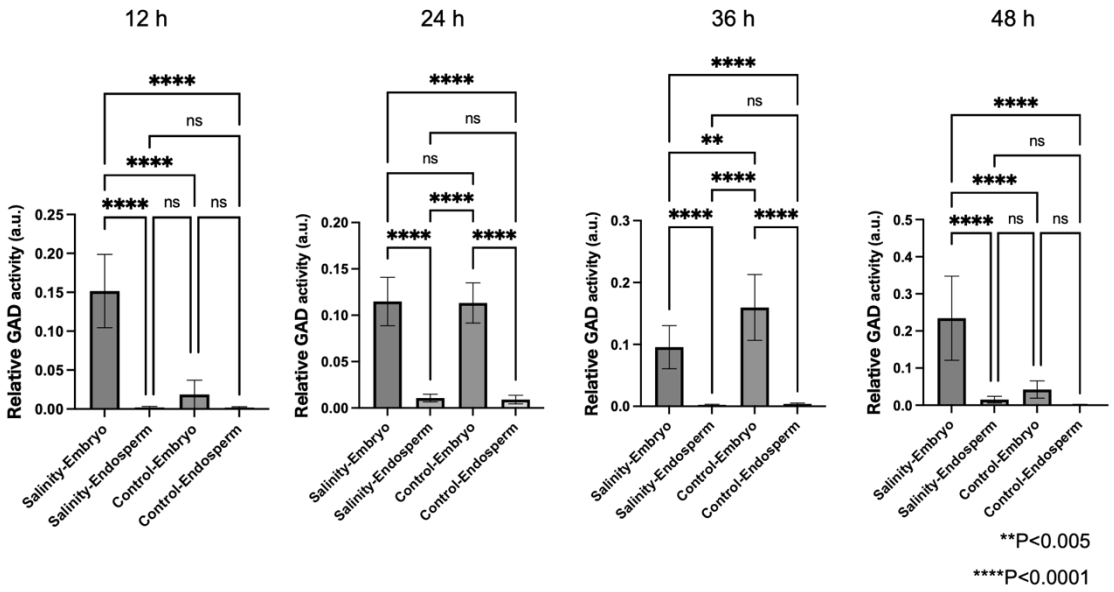


図 S8．ROI 分析による発芽処理 12 時間，24 時間，36 時間，48 時間後のオオムギ発芽種子胚および胚乳における相対 GAD 活性値の比較

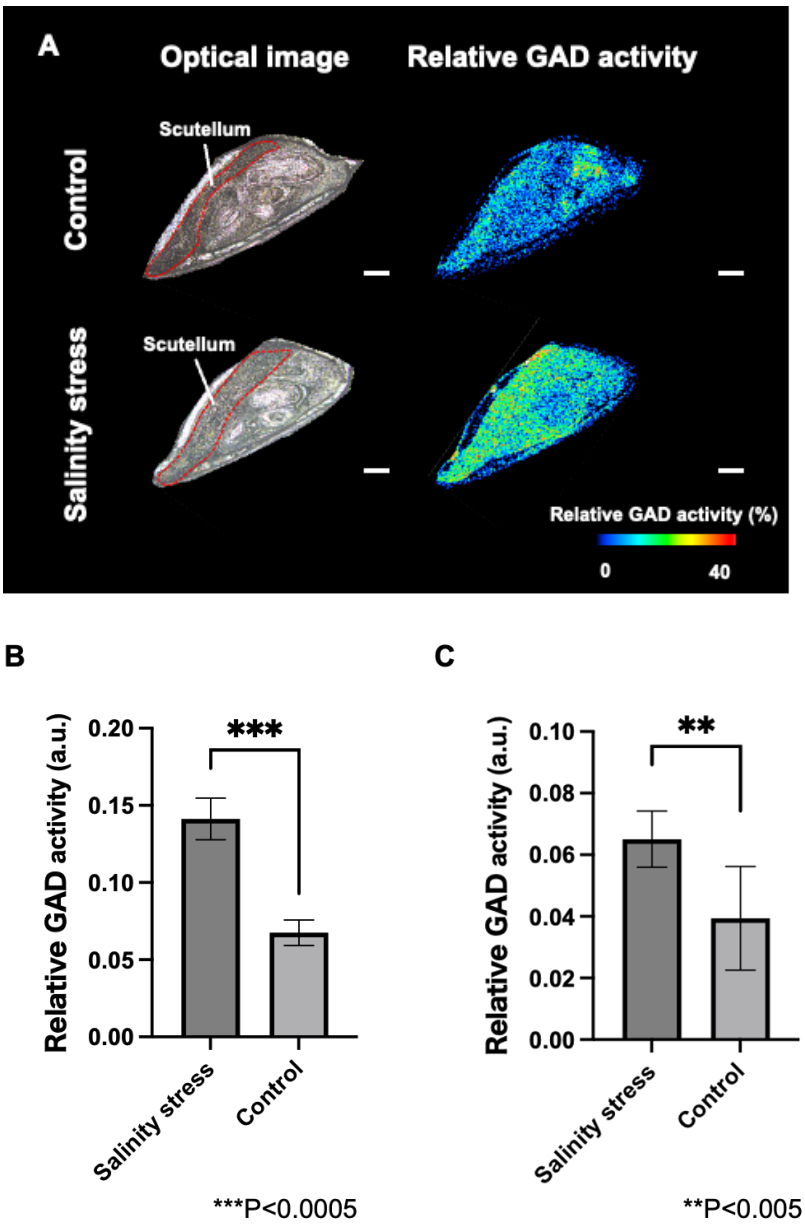


図 S9. 図 3-5 の再現実験結果. スケールバー : 200 μm .

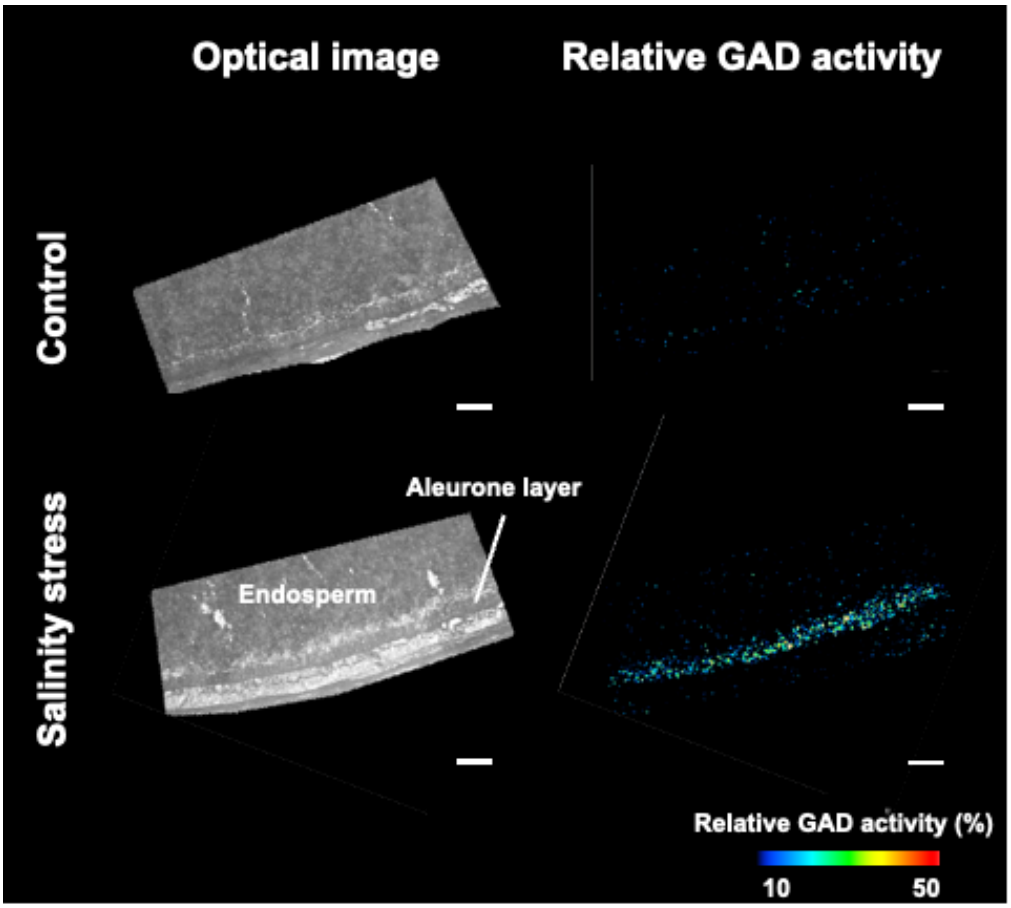


図 S10. 図 3-6 の再現実験結果. スケールバー：200 μm .