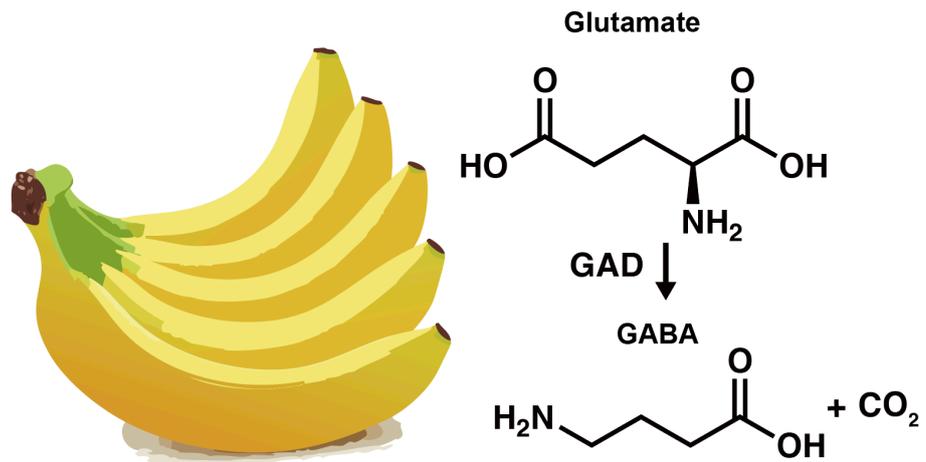


## MSIを用いたバナナの成熟段階のGABAとグルタミン酸脱炭酸酵素反応の可視化

新聞 秀一<sup>1,2,3</sup>、石本梓穂<sup>1</sup>、山本 卓志<sup>4</sup>、福崎英一郎<sup>1,2,3</sup>



本イメージの一部はAdobe illustratorの生成AI機能を用いて作成しました。

### ■ 要旨

バナナは日本において直近20年でもっともよく食べられている果実として知られています。バナナは、植物ホルモンの一つであるエチレンの作用により収穫後も熟成を続けるクリマクテリック型フルーツとしても知られています。本研究では、バナナの成熟過程におけるγ-アミノ酪酸（GABA）とその合成酵素であるグルタミン酸脱炭酸酵素（GAD）の活性変化に着目しました。本研究の目的は、エチレン処理バナナの成熟期におけるGABAとGAD反応の関係を解明することです。この目的を達成するために、未熟状態から経時的に採取したバナナに対して質量分析イメージング（mass spectrometry imaging：MSI）を用いてGABAとGAD反応の局在を可視化しました<sup>1)</sup>。

### 1. はじめに

バナナは青果の中で最も多く取引されており、2022年における全世界の生産量は1350万トンにも及びます（<https://oregoncherry.jp/statistics-banana.html>）。また、バナナは典型的なクリマクテリック型フルーツであり、収穫後の熟成プロセスを経て、内在性物質の組成が大きく変化することが報告されています<sup>2)</sup>。

クリマクテリック型フルーツでは多くの場合、外因性のエチレンの助けを借りて収穫後に熟成することが可能です。この熟成は、果実の色、食感、風味、および香りの変化に影響を与え、果物の品質を向上させます<sup>3,4)</sup>。さらに、貯蔵寿命<sup>5)</sup>や冷害に対する感受性<sup>6)</sup>など様々な要因に影響を及ぼします。そのため、バナナの熟成を正確に理解することは非常に重要であると考えられます。

グルタミン酸脱炭酸酵素GAD（EC 4.1.1.15）は、補因子であるピリドキサル5'-リン酸の存在下でL-グルタミン酸をγ-アミノ酪酸（GABA）に変換する役割を担っています。植物におけるGADの遺伝子発現または活性の変化や外因性GABAの投与は、様々な環境刺激（コールドショック<sup>7)</sup>、干ばつストレス<sup>8)</sup>、酸性ストレス<sup>9)</sup>、低酸素状態<sup>10)</sup>、植物ホルモン<sup>11)</sup>）に関連したストレス応答に関与しています<sup>12)</sup>。活性化されたGADは、窒素貯蔵<sup>13)</sup>、植物の発育<sup>14)</sup>、植物の防御<sup>7)</sup>、および果実の熟成の調節に重要なGABAの蓄積をもたらします。

さらにGABAは動物体内においては神経伝達物質として働き、血圧降下作用や精神安定作用などの多くの生理作用が報告されています<sup>15)</sup>。高GABA含有の食品は健康機能食品としても近年人気であり<sup>16)</sup>、実際にGABA高含有のバナナや白米で、高めの血圧を下げる効果があると報告されています<sup>17)</sup>。

1 大阪大学大学院工学研究科生物工学専攻  
2 大阪大学・島津分析イノベーション協働研究所  
3 大阪大学先導的学際研究機構  
4 島津製作所 分析計測事業部 Solutions COE

果実の熟成におけるGADの役割を調査した以前の研究では、トマト<sup>18, 19)</sup>や柑橘類<sup>20)</sup>を含むいくつかの種の果実でGAD遺伝子が単離されました。これらの研究により、GAD遺伝子の発現は成熟段階によって変化することが示されています。バナナについても同様に、GAD遺伝子が収穫後のバナナ果実の成熟過程に関与していることが示された研究もあります<sup>21)</sup>。また、GABAの量は、トマト<sup>18)</sup>、リンゴ<sup>22)</sup>、ザクロ<sup>23)</sup>などのさまざまな果物の成熟段階で増加し、果実の熟成に重要な役割を果たしていると考えられます。このようにクリマテリック型フルーツにおけるGAD活性とGABAを調べることは重要であると考えられますが、GAD活性とGABAの組織特異的な局在を調べた研究は未だ報告がありません。成熟過程におけるバナナのGABA生合成に関するGAD活性の分布を理解することは、GADがクリマテリック型フルーツの成熟過程にどのように寄与しているかを解明することになります。さらに、GABAを多く含む食品の開発にも有益である可能性があると考えられます。

代謝物の局在を可視化する方法としてMSIが近年注目を集めています。MSIは薄く切った試料表面を二次元平面上で直接質量分析することにより得られたマススペクトルの情報から、標的物質の局在を可視化する手法です。MSIは果実サンプルにも応用されており、MSIによってイチゴの異なる成熟におけるクエン酸や天然糖、アントシアニンの局在の可視化に成功したことが報告されています<sup>24)</sup>。

さらに、MSIを用いた酵素組織化学法は酵素活性の局在を可視化する手法として近年注目されています。この技術はこれまで、コリンエステラーゼ<sup>25)</sup>やコリンアセチルトランスフェラーゼ<sup>26)</sup>、ジペプチルペプチダーゼ<sup>27)</sup>の活性の局在可視化に用いられました。過去の筆者らの研究では、発芽期のマメ科植物種子におけるGADの相対活性をMSIを用いて可視化することに成功しています<sup>28)</sup>。そこで今回は、この方法をクリマテリック型フルーツにおけるGAD活性の局在に対する熟成の影響を調べるために応用しました。

本研究の目的は、バナナの成熟段階におけるGABAとGAD活性の局在の関係を明らかにすることです。目的を達成するために、各成熟段階におけるバナナのGABA含有量とGAD活性の定量をLC-MSを用いて、局在の可視化はiMScope™ QTを用いて行いました。MSIを用いた酵素組織化学によってGAD活性を可視化するために、GAD酵素による変換を確認し、温度、溶媒pH、インキュベーション時間などの酵素反応パラメータを最適化しました。

## 2. 実験

### 2-1 【試薬調製】

LC-MS分析に用いたアセトニトリルは関東化学（東京、日本）、メタノール、クロロホルムはキシダ化学（大阪、日本）、エタノール、トリフルオロ酢酸（Trifluoroacetic acid : TFA）は富士フィルム和光純薬（大阪、日本）より購入しました。MSIのGAD基質溶液に用いたL-glutamic acid-d3 (Glu-d3) はCDN ISOTOPE (モントリオール、カナダ)、LC-MSで用いた基質であるL-glutamic acid-<sup>15</sup>N (Glu-<sup>15</sup>N) はSigma-Aldrich (ミズーリ、アメリカ)、酢酸ナトリウム三水和物はナカライテスク (京都、日本)、酢酸は富士フィルム和光純薬より購入しました。マトリックス支援レーザー脱離イオン化法のマトリックスとして用いた $\alpha$ -シアノ-4-ヒドロキシケイ皮酸 ( $\alpha$ -CHCA) はメルク (ダルムシュタット、ドイツ) より購入しました。超純水は超純水製造装置 (Genpure UV-TOC xCAD PLUS ; Thermo Fisher Scientific社、マサチューセッツ、アメリカ) より適宜採水しました。

バナナ試料は高地栽培バナナとして知られているエクアドル産のキャベンディッシュ (*Musa acuminata cv. Cavendish*) の一種であるUuru bananaを用いました。

### 2-2 【LC-MSのサンプル前処理】

-80℃で保存していたバナナをマルチビーズショッカー (MB1050 ; 安井機械、大阪、日本) を用いて2500 rpmで5秒間粉碎することを2回繰り返しました。その際、液体窒素にサンプルを浸すことでバナナが液状になることを防ぎました。その後、粉碎したサンプルを凍結乾燥機 (VD-800R ; タイテック、東京、日本) を用いて24時間凍結乾燥しました。GABAの定量では、各乾燥バナナサンプルを10 mgずつ1.5 mLチューブに測り取り、メタノールを700  $\mu$ L、超純水を100  $\mu$ L、内部標準物質としてd4-DL-Alanineを20  $\mu$ L加えて10秒間ボルテックスミキサーで攪拌し、9400 $\times$ g、4℃で10分間遠心分離しました。新しいチューブに超純水180  $\mu$ L、上清360  $\mu$ L、クロロホルム360  $\mu$ Lを順に加えました。10秒間ボルテックスミキサーで攪拌した後、9400 $\times$ g、4℃で10分間遠心分離し、上清を50  $\mu$ L回収して200  $\mu$ Lの混合溶液 (アセトニトリル : エタノール : 超純水 = 80 : 15 : 5) で5倍希釈しました。10秒間ボルテックスミキサーで攪拌した後、9400 $\times$ g、4℃で10分間遠心分離し、上清100  $\mu$ Lをバイアルに移しました。

GADの酵素反応の評価を行うために、粗酵素溶液を調製しました。30 mgの乾燥バナナ粉末にpH=5.5の酢酸ナトリウムバッファー1 mLを加え乳鉢ですりつぶしました。その後、9400 $\times$ g、4℃で10分間遠心分離し、上清を粗酵素溶液としました。粗酵素溶液80  $\mu$ Lに50 mMのGlu-<sup>15</sup>Nを40  $\mu$ L加え、37℃で12分間保温することで酵素反応を行いました。その後、90℃で10分保温し反応を止めました。10秒間ボルテックスミキサーで攪拌した後、9400 $\times$ g、4℃で10分間遠心分離しました。その後、生成した同位体標識GABA (GABA-<sup>15</sup>N) を含むサンプルを抽出しました。

### 2-3 【LC-MS分析】

Nexera™ HPLCシステムとLCMS™-8060 (島津製作所、京都、日本) を用いてピーク面積値からGABAの生成量を測定しました。イオン化はエレクトロスプレーイオン化法で行いました。イオン源はポジティブモードに設定し、インターフェースパラメータは表1のように設定しました。

分離は分析カラムにCROWNPAK CR-I (+) (3.0 mm i.d.  $\times$  150 mm, 5  $\mu$ m, ダイセル、東京、日本) を用いました。インジェクション量は1  $\mu$ L、オープン温度は30℃に保ちました。移動相はアセトニトリル、エタノール、水、トリフルオロ酢酸 (80/15/5/0.5, v/v/v/v) を用いました。流速は0.4 mL/minでアイソクラティック条件に設定しました。データの取得と処理はLabSolutions™ (島津製作所、京都、日本) を用いて行いました。

表1 LC-MS分析におけるインターフェースパラメータ

項目	設定値
ネブライズガス流量	3 L/min
ヒーティングガス流量	15 L/min
ドライイングガス流量	5 L/min
インターフェース温度	200℃
DL温度	250℃
ヒートブロック温度	300℃
インターフェース電圧	4.0 kV

### 2-4 【組織切片試料の作成】

凍結させた試料からクライオマイクローム（CM1950；ライカバイオシステムズ、ヌスロッホ、ドイツ）を使用して、-30℃の温度下で厚さ30 μmの凍結切片を作製しました。

作製した凍結切片は、クライオフィルム（SECTION-LAB、横浜、日本）を用いて回収し、常温に取り出した後、導電性不織布両面テープ（3M、セントポール、アメリカ）を貼り付けた酸化インジウムスズ（Indium-thin-oxide:ITO）コートガラス（松浪ガラス、大阪、日本）に貼り付けました。これをシリカゲル入りの50 mL遠心管内で10分かけて乾燥させ、サンプルとしました。

### 2-5 【切片上での酵素反応】

基質溶液作製のため、酢酸と酢酸ナトリウムを用いてpH=3.0および5.5の酢酸ナトリウム緩衝液を調製しました。pH=8.0の緩衝液については、リン酸緩衝液を使用しました。それぞれのpH緩衝液を用いて10 mMグルタミン酸重水素体溶液を作製し、基質溶液として用いました。バナナ切片1枚につき50 μLの基質溶液をエアブラシ（プロコンBOY SQ:SIクレオス、東京、日本）を用いて、凍結切片上に均一にスプレーしました。先行研究を基に、37、50、60℃に加熱したチャンバー内で蒸気を当てながら0-30分酵素反応を行いました<sup>29</sup>。

### 2-6 【マトリックス供給】

凍結切片上に基質を供給後、マトリックスとしてα-CHCAを、図1のマトリックス蒸着装置（iMLayer™；島津製作所、京都、日本）を用いて0.7 μmの厚さになるように蒸着しました。蒸着温度は250℃に設定しました。



図1 マトリックス蒸着装置iMLayer™



図2 イメージング質量顕微鏡 iMScope™ QT

表2 iMScope™ QTの分析パラメータ

MS分析条件	
イオン種	正イオンモード
<i>m/z</i> 測定範囲	95 - 155
積算回数	1回
サンプル電圧	4.50 kV
検出器電圧	2.20 kV <sup>*1</sup>
DL温度	250℃
ヒートブロック温度	450℃
CIDガス圧	150 kPa
MS段数	1
レーザー照射条件	
照射回数	80回
繰り返し周波数	1000 Hz
照射径設定値	2 (直径約25 μm)
レーザー強度	62

\*1：参考値

（最適な検出器電圧は、検出器の劣化具合とサンプルのイオン化のしやすさにより異なります。検出器電圧の設定によっては検出器の劣化を早める可能性があります。詳しくは取扱説明書をご参照ください。）

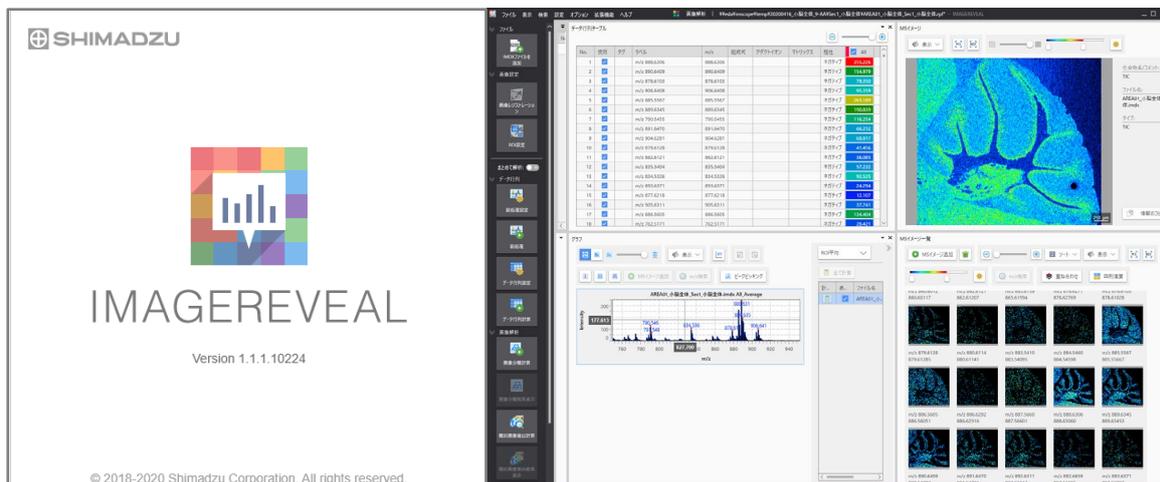


図3 MSイメージングデータ解析ソフトウェアIMAGEREVEAL™ MS

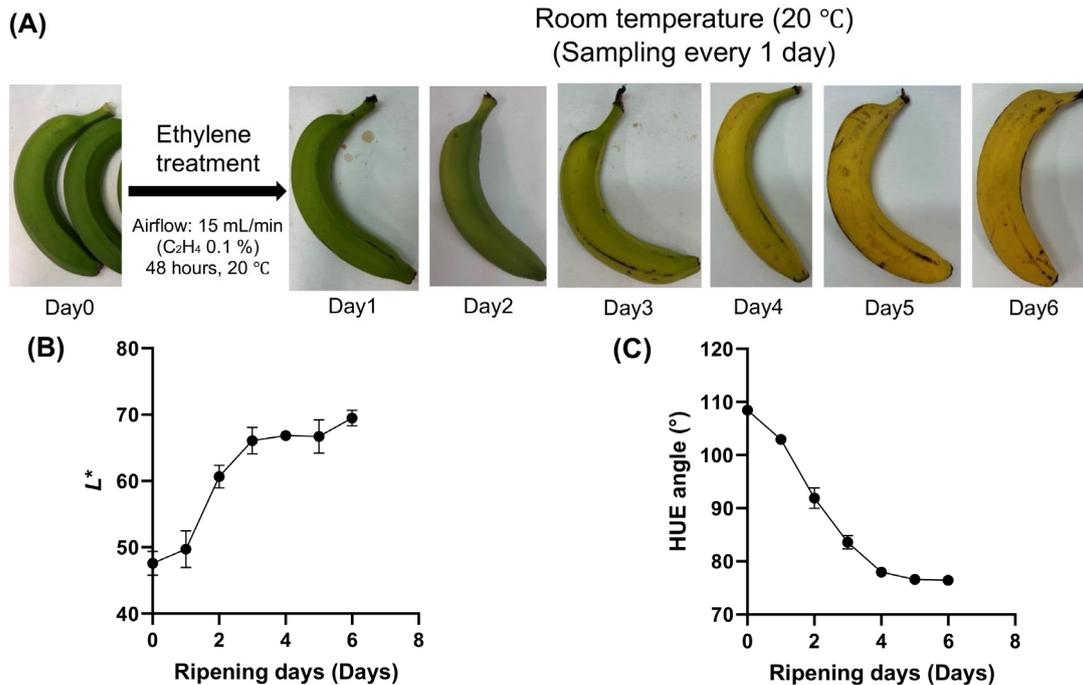


図4 バナナサンプルの熟成段階による違い  
(A) 異なる熟成日のバナナサンプルの外観 (B) 明度 (L\*) の変化 (C) HUE角度の変化  
反復回数はn = 4としました。

### 2-7 【MSI測定】

イメージング質量顕微鏡iMScope QT (図2) を用いて空間分解能60 μmのMSIを行いました。なお、iMScope QTでのデータ取得の際には、表2の分析パラメータを設定しました。

データ解析にはMSイメージングデータ解析ソフトウェアのIMAGEREVEAL™ MS (図3) を用いました。m/z 104.07のピークからGABAを、m/z 107.08のピークからGABA-d3のイメージング画像を作成しました。GAD反応の局在可視化は、GAD反応の生成物であるGABA-d3の局在を得ることで達成しました<sup>27)</sup>。

## 3. 結果・考察

### 3-1 【バナナの成熟段階と色彩の測定】

実験の項目で述べた追熟方法で熟成させたバナナを、分光測色計 (CM-2600d; コニカミノルタ、東京、日本) を用いてL\*a\*b\*色空間に基づいて測定した結果を図4に示しました。L\*a\*b\*色空間は、人間の色知覚の全領域をマッピングしており、L\*値は明るさを表し0から100までの範囲で数値が大きい程明るいことを意味しています。色度はa\*b\*を組み合わせて表され、a\*b\*ともに0の場合には無彩色となります。a\*が正の方向になるほど赤みが強くなり、負の方向になるほど緑みが強くなります。また、b\*が正の方向になるほど黄色みが強くなり、負の方向になるほど青みが強いことを意味します。今回は、90° に近づくほど黄色を示すHUE角度を用いて色彩の評価を行いました<sup>30)</sup>。

Day0から追熟が進むに伴い、HUE角度は小さくなり、定性的にバナナの色が緑色から黄色に変化したことが確認されました。特に、エチレン処理後2日後から4日後にかけての色の変化が顕著に見られたことから、この熟成期間において代謝物が大きく変化することが予想されます。

### 3-2 【LC-MSを用いた内在性GABAとグルタミン酸の測定】

各熟成段階のバナナの果肉と果皮を分離し、それぞれのGABAとグルタミン酸の含有量を測定し、その結果を図5に

示しました。その結果、果肉ではエチレン処理を行った後にGABA含有が一時的に減少し、エチレン処理後は成熟が進むに伴いGABA含有が増え、6日目には約40 mg/100 gに至ることがわかりました (図5A)。一方で、果皮ではバナナの成熟段階とGABA含有の変化には相関がみられず、10 mgから20 mg/100 g程度の含有量でした (図5B)。この結果から、GABAはバナナ果肉に主に蓄積されると考えられます。MALDI-MSIを用いて、内在性GABAの局在を確認することによりこの仮説を検証することにしました。また、グルタミン酸の含有量については果肉においても果皮においても成熟段階との相関は見られませんでした (図5C、5D)。GABAの基質であるグルタミン酸量はGABA生成には相関がないと考えられ、その代わりに成熟段階における酵素活性の変化が関与すると考えられました。

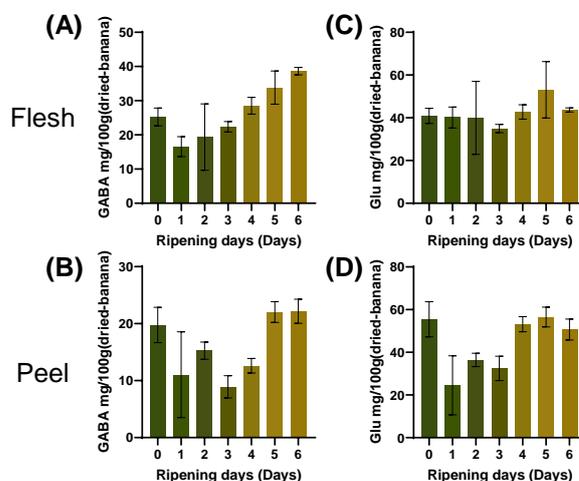


図5 LC-MSを用いた内在性GABAおよびグルタミン酸の定量  
(A) 果肉中のGABA含有量  
(B) 果皮中のGABA含有量  
(C) 果肉中のグルタミン酸含有量  
(D) 果皮中のグルタミン酸含有量  
再現性確認のためにサンプル数はn = 3としました。

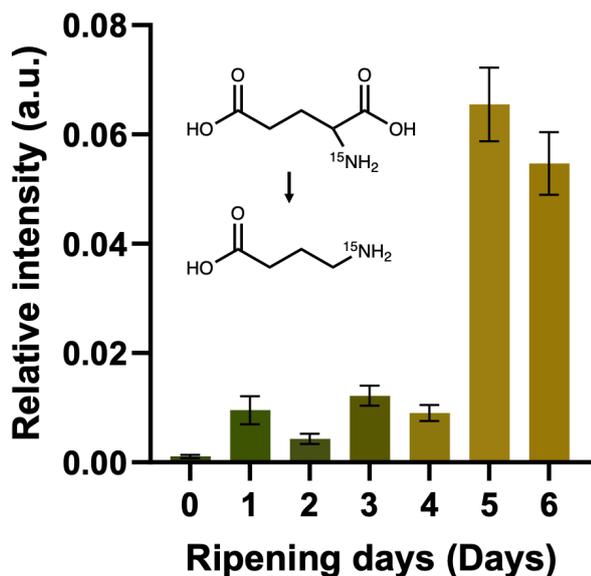


図6 LC-MSによるGAD反応の確認

LC-MSでの酵素反応では（挿入図）、L-glutamic acid-<sup>15</sup>Nを用いました。グラフの縦軸は相対強度を内部標準物質であるd4-DL-アラニンで割った値を表示しました。再現性確認のためにサンプル数はn=3としました。

### 3-3 【LC-MSを用いたGAD活性の測定】

各成熟段階のバナナの果肉のみを分離し、それぞれのGAD反応の強度を測定した結果を図6に示しました。その結果、成熟段階が0日目から4日目までほとんど活性が無いことがわかりました。その一方で5日目と6日目はGAD活性の強度が強く検出されました。この原因として、熟成初期のバナナではGADが十分に抽出できていなかったことも一つの原因として考えられます。バナナは成熟が進むにつれて細胞壁の主成分であるペクチンが分解し、糖が生成されます<sup>31)</sup>。つまり、分解していない細胞壁で酵素が強固に保護されてしまい、その酵素が十分に抽出されなかった可能性が考えられます。LC-MSでの測定ではこのような前処理の欠点が考えられますが、次に紹介するMALDI-MSIIによる手法では、酵素抽出を必要とせず直接試料表面で分析を行うため、この問題を解決するにあたり有効であると考えられます。

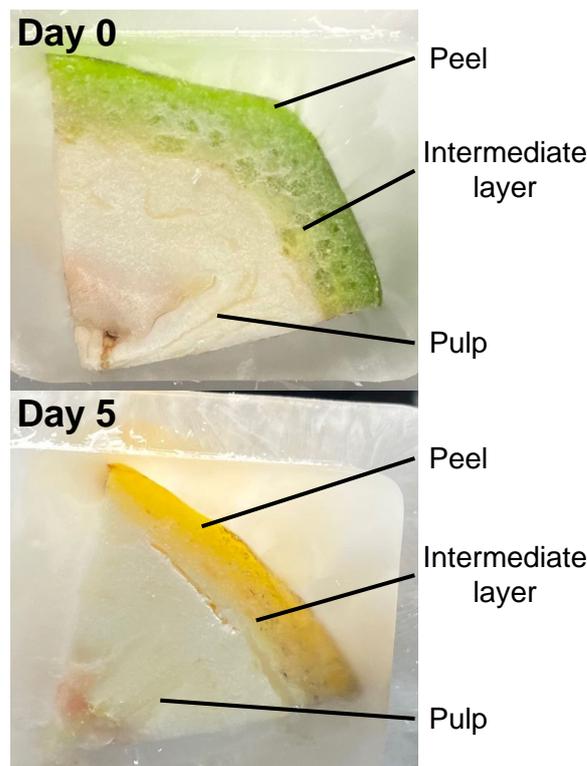


図7 0日目と5日目のバナナサンプルの断面図  
成熟するにつれて中間層(Intermediate layer)が薄くなる。

### 3-4 【MSIを用いたGAD酵素反応可視化法の確立】

まず、バナナ切片上で基質として供給したGlu-d3がGABA-d3となる反応がバナナ内のGADによる反応であるか確認しました。この確認を行うために、オートクレーブ処理をすることにより生体内の酵素を不活性化させた切片と、オートクレーブ未処理の切片上でそれぞれGABA-d3を検出する実験を行いました。なお、以下の説明で用いるバナナの部位は図7に示しました。その結果、オートクレーブ未処理の切片上ではGABA-d3が検出されましたが、酵素を不活性化させた切片上では明らかにピーク強度が減少しました（図8A）。

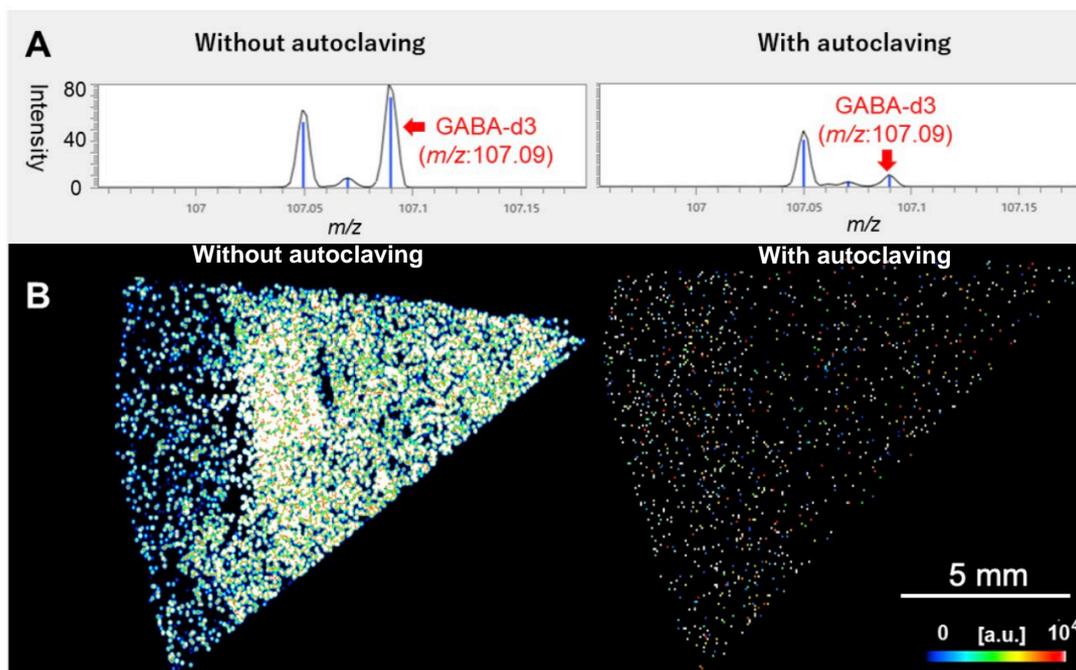


図8 オートクレーブ前後によるGABA-d3の検出  
(A) GABA-d3のマスペクトルおよび (B) 得られたMSI結果

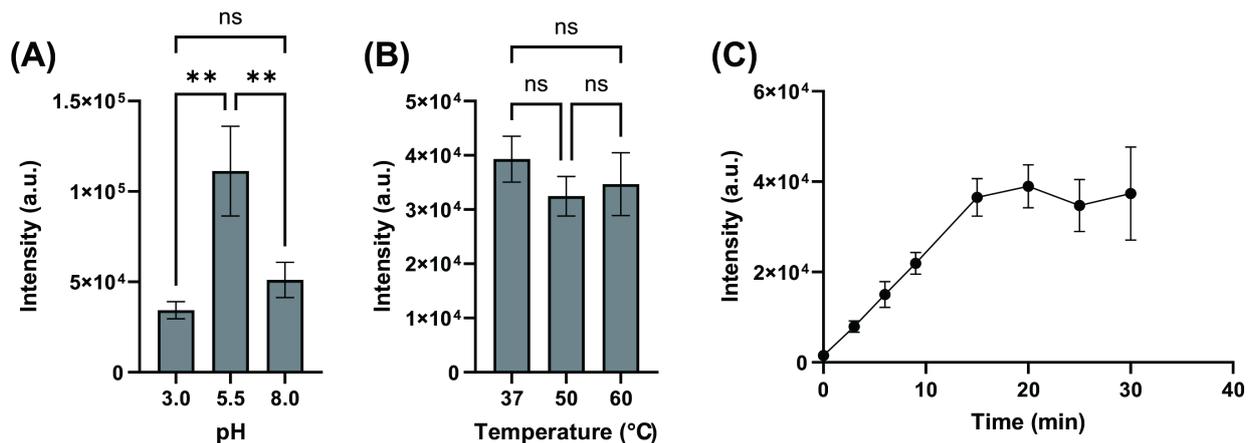


図9 MALDI-MSIを用いてGAD反応を可視化するための最適条件の検討  
(A) 溶媒pH (B) 反応温度 (C) 反応時間  
グラフの縦軸はGABA-d3ピークの高さから求めた強度を表しています。  
反復回数はn=3であり、アスタリスクはp<0.01を示しています。

つづいて、MSIにおいてGAD反応を可視化するために、基質溶媒のpH、酵素反応温度、酵素反応時間を検討しました。先行研究において、既存の分光光度計を用いてGAD反応を測定するための最適条件は、pH=5.5、反応温度37°Cと報告されていました<sup>29)</sup>。MSIによりGAD反応の測定を行うため、本実験においても、上記の最適条件を基にMSIに適した酵素反応条件検討を行いました。

初めに、基質溶液のpHを検討しました。pH=3.0、pH=5.5、pH=8.0の条件下で酵素反応させ、GABA-d3の強度を比較すると、pH=5.5におけるピークが優位に高く検出されました(図9A)。以上の結果から、本研究においてもpH=5.5が最適pHであると示されたため、このpH=5.5を選択しました。

酵素反応温度について37°C、50°C、60°Cで検討したところ、各温度で有意な差はありませんでしたが37°Cで最も高い強度のピークが得られました(図9B)。先行研究においても反応時間は37°Cと設定されており、妥当である考えられます<sup>29)</sup>。以上の結果から、本研究においても反応温度は37°Cを選択しました。

最後に酵素反応時間について、0、3、6、9、15、20、25、30分と酵素反応時間を変化させて実験を行いました。0-15分の間は直線的( $R^2=0.9995$ )にGABA-d3の生成は増加しました(図9C)。その後、20分を過ぎるとグラフは平坦となりました。十分な基質量があるとき、酵素反応は0次反応で進み、生成物は反応時間とともに直線的に増加することが知られています。また、0次反応条件下において、生成物の強度は酵素が基質を生成物へと変換させる力と比例すると考えることができます。以上の結果から、酵素反応の最適時間はグラフの直線上かつ十分に酵素反応が進んだと考えられる10分と決定しました。

### 3-5 【MSIを用いた各成熟段階におけるバナナの内在性GABAとGAD反応の分布の可視化】

ここでは、基質溶液を噴霧していないバナナ切片をMSIすることによって、 $m/z$  104.07であるGABAを検出し、バナナ切片上で内在性GABAの局在の可視化を行いました。エチレン処理後、3日目以降からGABAの蓄積が果肉の内側 (Inner pulp) から始まるのがわかります(図10A)。特に果皮 (Peel) に近い果肉の外側 (Outer pulp) にGABAの蓄積は増加することがわかります。また、果皮と果肉では明らかな蓄積の差がみられました。すなわち、果皮ではGABAの蓄積がみられず、果肉についてはエチレン処理後に成熟に伴

ってGABA含有が増加することが確認できました。色彩測定で述べた通り、エチレン処理後3日目にGABA蓄積の開始と果皮の色味の緑色から黄色への変化が始まりました。

得られたGABA分布の経時変化の結果から、内在性物質の変化はエチレン処理後3日後から顕著に表れることが示されました。これは色彩測定で得られた結果と一致しています。

前項で決定した最適条件下で、MSIを用いて各成熟段階のバナナのGAD反応の局在の可視化を行いました。MSIの結果より、エチレン処理後1日目からGAD反応が増加していることが確認されました(図10B)。その後、エチレン処理後4日目にかけて果肉上部から果肉中心部にかけてGAD反応は広がっていくことがわかりました。エチレン処理後5、6日目においてGAD反応はより強く活性化していました。先行研究では、最終的にGAD1の遺伝子発現が停止することが報告されていました<sup>7)</sup>。しかし、本研究ではGADの活性は依然として高いままでした。また、果皮と果肉の間の部分 (Intermediate layer) でのGAD反応が高いという先行研究による報告と一致することがわかりました<sup>28)</sup>。先行研究では果肉でのGAD反応の測定は行われていませんでしたが、本研究結果において、初めて果皮と果肉の間の部分よりも果肉ではさらにGAD反応が高いということが判明しました。

GAD反応とGABAの蓄積を比較したところ、GAD反応が始まってから2日遅れてGABAの蓄積が始まるのがわかりました。さらに、GAD反応とGABAの蓄積の分布の広がりほどどちらも果肉上部から果肉中心に広がっていたため、GAD反応が高い部分でGABAが生成されていると考えられます。この結果は、バナナのGABA生合成にはGADが主反応として関わっていることを直接的に示しています。

## 5. まとめ

本研究において、はじめて各成熟段階におけるバナナの内在性GABAとGAD反応の局在を可視化することに成功しました。MALDI-MSIを用いて各成熟段階におけるバナナの内在性GABAの局在の可視化を行いました。その結果、果皮にはGABAが蓄積されず、果肉で成熟に伴ってGABAが蓄積されることが判明しました。次に、MALDI-MSIを用いた酵素組織化学法によってバナナ切片上でGADによる酵素反応を可視化した例がないため、バナナ切片上でGAD反応の確認と最適条件の検討を行いました。最適化した条件下で各成熟段階におけるバナナのGAD反応を可視化したところ、エ

チレン処理後に果肉上部からGAD反応は始まり、エチレン処理4日後まで果肉全体に広がり、その後もGAD反応は依然として活性化することが判明しました。

本研究では、MALDI-MSIという一つの技術を用いて、エチレン処理後の成熟過程において内在性GABAとGAD反応の局在の変化を解明し、それらの結果を比較することができました。得られた結果より、成熟過程におけるGABAの増加の直接的な原因がGAD反応によることが示されました。さらに、GAD反応が活性化した後に遅れてGABAが生成されることが判明しました。このことから、バナナがGABAを高生産するためにはGAD反応に注目することが重要であると提案できます。

GABAはコハク酸セミアルデヒドに代謝され、コハク酸となり、TCAサイクルに入り代謝されます。この経路は「GABAシャント」と呼ばれています。今後、追熟過程のバナナのGABAシャントに関わる代謝産物の局在を網羅的に解析することができれば、バナナの内在性GABAがいつどの部位で代謝されるのか解明できるかもしれません。特に、今回得られた結果である「GAD反応が高まった後に遅れてGABA生合成が始まった」原因が明らかになると期待されます。また、様々な食用植物に応用することで、近年GABAが機能性食品として人気が高まっている背景から、GABA高含有品種の開発にともなう食品産業のさらなる発展に貢献するものと思われます。

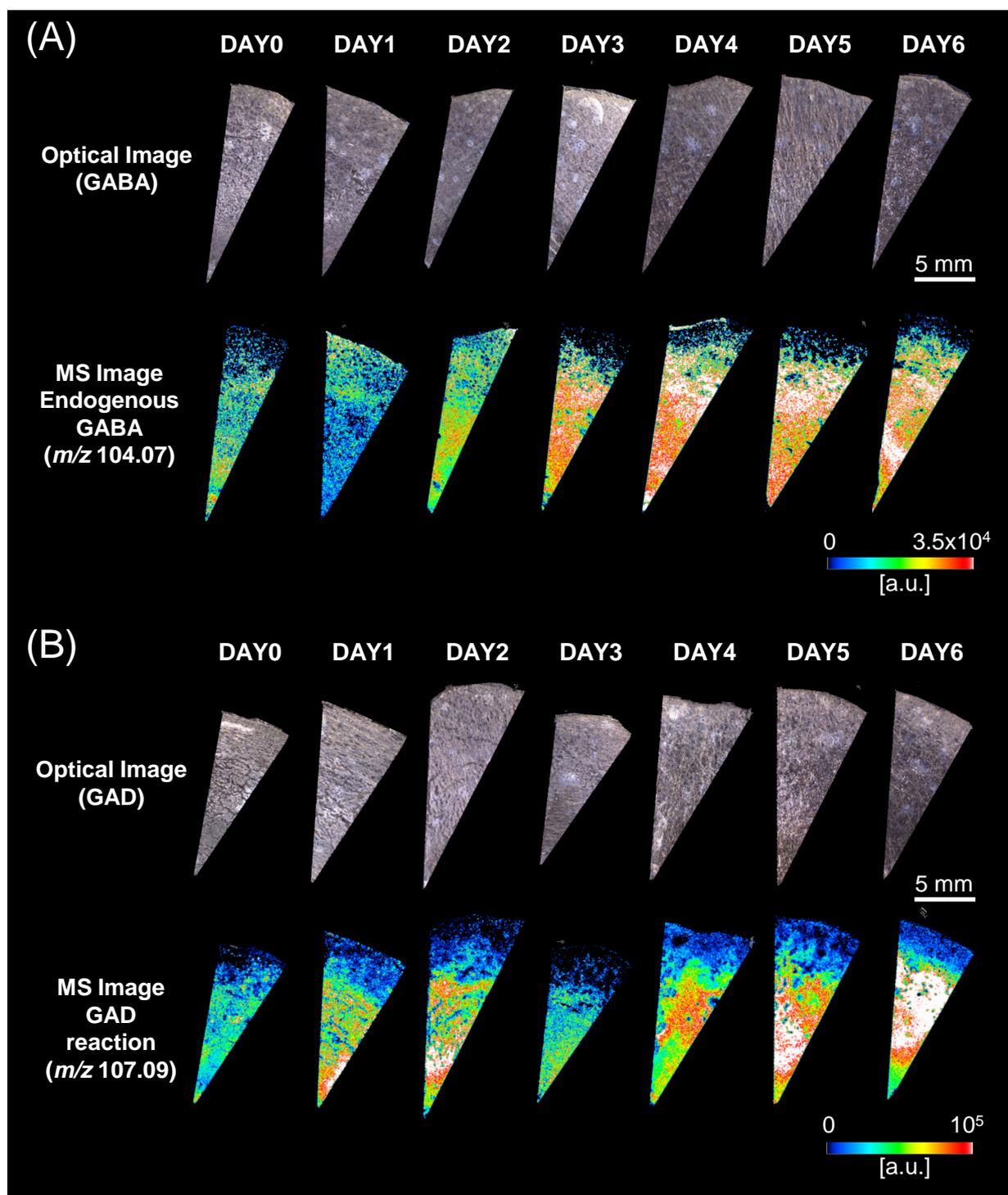


図 10 異なる成熟段階におけるGABAとGAD反応の分布  
(A) 内因性GABA (B) GAD反応

## &lt;参考文献&gt;

- 1) Ishimoto S, Fukusaki E, Shimma S. Mass spectrometry imaging of gamma-aminobutyric acid and glutamic acid decarboxylase reactions at various stages of banana ripening, *Journal of Bioscience and Bioengineering* (in press)
- 2) Parijadi AAR, Yamamoto K, Ikram MMM, et al. Metabolome Analysis of Banana (*Musa acuminata*) Treated With Chitosan Coating and Low Temperature Reveals Different Mechanisms Modulating Delayed Ripening, *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 6 (2022).
- 3) Marriott J and Palmer JK. BANANAS - PHYSIOLOGY AND BIOCHEMISTRY OF STORAGE AND RIPENING FOR OPTIMUM QUALITY, *Crc Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 13, 41-88 (1980)
- 4) Maduwanthi SDT and Marapana R. Induced Ripening Agents and Their Effect on Fruit Quality of Banana, *International Journal of Food Science*, 2019 (2019)
- 5) Li W, Shao YZ, Chen WX, et al. The Effects of Harvest Maturity on Storage Quality and Sucrose-Metabolizing Enzymes During Banana Ripening, *Food and Bioprocess Technology*, 4, 1273-1280 (2011)
- 6) Wang HB, Zhang ZQ, Xu LY, et al. The effect of delay between heat treatment and cold storage on alleviation of chilling injury in banana fruit, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92, 2624-2629 (2012)
- 7) Wang YS, Luo ZS, Huang XD, et al. Effect of exogenous  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) treatment on chilling injury and antioxidant capacity in banana peel, *Scientia Horticulturae*, 168, 132-137 (2014)
- 8) Li Z, Peng Y, and Huang BR. Alteration of Transcripts of Stress-Protective Genes and Transcriptional Factors by  $\gamma$ -Aminobutyric Acid (GABA) Associated with Improved Heat and Drought Tolerance in Creeping Bentgrass (*Agrostis stolonifera*), *International Journal of Molecular Sciences*, 19 (2018)
- 9) Ma Z, Richard H, Tucker DL, Conway T, et al. Collaborative regulation of *Escherichia coli* glutamate-dependent acid resistance by two AraC-like regulators, GadX and GadW (YhiW), *Journal of Bacteriology*, 184, 7001-7012 (2002)
- 10) Salvatierra A, Pimentel P, Almada R, et al. Exogenous GABA application transiently improves the tolerance to root hypoxia on a sensitive genotype of *Prunus* rootstock, *Environmental and Experimental Botany*, 125, 52-66 (2016)
- 11) Xu B, Sai N, and Gilliam M. The emerging role of GABA as a transport regulator and physiological signal, *Plant Physiology*, 187, 2005-2016 (2021)
- 12) Podlesáková K, Ugena L, Spíchal L, et al. Phytohormones and polyamines regulate plant stress responses by altering GABA pathway, *New Biotechnology*, 48, 53-65 (2019)
- 13) Fait A, Nesi AN, Angelovici R, et al. Targeted Enhancement of Glutamate-to- $\gamma$ -Aminobutyrate Conversion in Arabidopsis Seeds Affects Carbon-Nitrogen Balance and Storage Reserves in a Development-Dependent Manner, *Plant Physiology*, 157, 1026-1042 (2011)
- 14) Jin J, Hua L, Zhu ZF, et al. *GAD1* Encodes a Secreted Peptide That Regulates Grain Number, Grain Length, and Awn Development in Rice Domestication, *Plant Cell*, 28, 2453-2463 (2016)
- 15) Inoue K, Shirai T, Ochiai H, et al. Blood-pressure-lowering effect of a novel fermented milk containing gamma-aminobutyric acid (GABA) in mild hypertensives, *European Journal of Clinical Nutrition*, 57, 490-495 (2003)
- 16) Gramazio P, Takayama M, and Ezura H. Challenges and Prospects of New Plant Breeding Techniques for GABA Improvement in Crops: Tomato as an Example, *Frontiers in Plant Science*, 11 (2020)
- 17) Nishimura M, Yoshida S-I, Haramoto M, et al. Effects of white rice containing enriched gamma-aminobutyric acid on blood pressure, *Journal of traditional and complementary medicine*, 6, 66-71 (2016). (in Japanese)
- 18) Akihiro T, Koike S, Tani R, et al. Biochemical mechanism on GABA accumulation during fruit development in tomato, *Plant and Cell Physiology*, 49, 1378-1389 (2008)
- 19) Gallego PP, Whotton L, Picton S, et al. A ROLE FOR GLUTAMATE-DECARBOXYLASE DURING TOMATO RIPENING - THE CHARACTERIZATION OF A CDNA-ENCODING A PUTATIVE GLUTAMATE-DECARBOXYLASE WITH A CALMODULIN-BINDING SITE, *Plant Molecular Biology*, 27, 1143-1151 (1995).
- 20) Liu X, Hu XM, Jin LF, et al. Identification and transcript analysis of two glutamate decarboxylase genes, *CsGAD1* and *CsGAD2*, reveal the strong relationship between *CsGAD1* and citrate utilization in citrus fruit, *Molecular Biology Reports*, 41, 6253-6262 (2014)
- 21) Hu W, Liu JH, Yang XY, et al. Identification of a Gene Encoding Glutamate Decarboxylase Involved in the Postharvest Fruit Ripening Process in Banana, *Hortscience*, 49, 1056-1060 (2014)
- 22) Shelp BJ, Bozzo GG, Trobacher CP, et al. Hypothesis/review: Contribution of putrescine to 4-aminobutyrate (GABA) production in response to abiotic stress, *Plant Science*, 193, 130-135 (2012)
- 23) Lorente-Mento JM, Valero D, Martínez-Romero D, et al. Preharvest Multiple Applications of GABA Improve Quality Traits and Antioxidant Compounds of Pomegranate Fruit during Storage, *Horticulturae*, 9 (2023)
- 24) Enomoto H. Unique distribution of ellagitannins in ripe strawberry fruit revealed by mass spectrometry imaging, *Current Research in Food Science*, 4, 821-828 (2021)
- 25) 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*, *Analytical Chemistry*, 92, 12379-12386 (2020)
- 26) Takeo E, Sugiura Y, Ohnishi Y, et al. Mass Spectrometric Enzyme Histochemistry for Choline Acetyltransferase Reveals De Novo Acetylcholine Synthesis in Rodent Brain and Spinal Cord, *ACS Chemical Neuroscience*, 12, 2079-2087 (2021)
- 27) Wisman AP, Minami M, Tamada Y, et al. Visualization of dipeptidyl peptidase B enzymatic reaction in *rice koji* using mass spectrometry imaging, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 134, 133-137 (2022)
- 28) Ikuta S, Shinohara N, Fukusaki E, et al. Mass spectrometry imaging enables visualization of the localization of glutamate decarboxylase activity in germinating legume seeds, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 134, 356-361 (2022)
- 29) Wang B, Miao Y, Chen J, et al. Activity and distribution of glutamate decarboxylase in banana peel, *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 14, 211-217 (2014) (in Chinese)
- 30) McLellan MR, Lind LR, and Kime RW. HUE ANGLE DETERMINATIONS AND STATISTICAL ANALYSIS FOR MULTIQUADRANT HUNTER L,a,b DATA, *Journal of Food Quality*, 18, 235- 240 (1995)
- 31) Cordenunsi-Lysenko BR, Nascimento JRO, Castro-Alves VC, et al. The Starch Is (Not) Just Another Brick in the Wall: The Primary Metabolism of Sugars During Banana Ripening, *Front Plant Sci*, 10, 391 (2019).

iMScope, iMLayer, Nexera, LCMS, LabSolutions、およびiMAGEREVEALは、株式会社 島津製作所またはその関係会社の日本およびその他の国における商標です。

**株式会社 島津製作所** 分析計測事業部  
<https://www.an.shimadzu.co.jp/>

初版発行：2024年12月

本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。本文中に記載されている会社名、製品名、サービスマークおよびロゴは、各社の商標および登録商標です。本文中では「TM」、「®」を明記していない場合があります。

本資料の掲載情報に関する著作権は当社または原著者に帰属しており、権利者の事前の書面による許可なく、本資料を複製、転用、改ざん、販売等することはできません。掲載情報については十分検討を行っていますが、当社はその正確性や完全性を保証するものではありません。また、本資料の使用により生じたいかなる損害に対しても当社は一切責任を負いません。

▶ アンケート

**関連製品** 一部の製品は新しいモデルにアップデートされている場合があります。



▶ iMScope™ QT



▶ iMLayer

マトリックス蒸着装置



▶ IMAGEREVEAL™ MS

MSイメージングデータ解析ソフトウェア

## 関連分野

▶ ライフサイエンス

▶ in vitro イメージング（組織などの標本）

▶ 食品・飲料

▶ 栄養・機能性成分

▶ 価格お問い合わせ

▶ 製品お問い合わせ

▶ 技術お問い合わせ

▶ その他お問い合わせ