

애기장대 cDNA library로부터 Glutamate Decarboxylase 유전자의 부분 클로닝 및 서열분석

†오 석 흥 · ¹최 원 규 · 최 동 성
우석대학교 생명공학부, ¹대학원 생명공학과
(접수 : 2000. 11. 27., 게재승인 : 2000. 1. 31.)

Cloning and Nucleotide Sequencing of a Partial Glutamate Decarboxylase Gene from *Arabidopsis thaliana* cDNA Library

Suk-Heung Oh[†], Won-Gyu Choi¹, and Dong-Seong Choi
Division of Bioscience and Biotechnology and ¹Department of Life Science and Technology, Graduate School, Woosuk University, Chonju 565-701, Korea
(Received : 2000. 11. 27., Accepted : 2001. 1. 31.)

In order to study the molecular mechanism of γ -aminobutyric acid (GABA) production in plants, we cloned and sequenced a partial glutamate decarboxylase (GAD) cDNA from the *Arabidopsis thaliana* cDNA library, using primers targeted at highly conserved sequences of the petunia GAD gene. The cDNA fragment was inserted into TA cloning vector with T7 promoter and the recombinant plasmid obtained was used to transform *E. coli*. The plasmid DNA purified from the transformed *E. coli* was digested with *EcoRI* and the presence of the insert was confirmed. Nucleotide sequence analysis showed that the fragment is a partial *Arabidopsis thaliana* GAD gene and that the sequence showed 98% and 78% identity to the region of the putative *Arabidopsis thaliana* GAD sequences deposited in GenBank, Accession nos: U46665 and U10034, respectively. The amino acid sequence deduced from the partial *Arabidopsis thaliana* GAD gene showed 99% and 91% identities to the GAD sequences deduced from the genes of the U46665 and U10034, respectively. The partial cDNA sequence determined may facilitate the study of the molecular mechanism of GABA metabolism in plants.

Key Words : γ -aminobutyric acid, glutamate decarboxylase, cDNA, cloning

서 론

식물의 경우 γ -aminobutyric acid (GABA)의 존재가 이미 오래전에 확인된 바 있고(1), 외부 환경적 요인들(산소부족, 저온 및 고온, 어둠, 기계적 자극 등)에 의해 식물체내 GABA의 생성이 증진되는 것으로 보고되고 있다(2,3). 동물이나 미생물에서의 GABA 생성 기작과는 달리 식물에서는 Ca^{2+} 과 결합한 calmodulin (CaM) 단백질이 glutamate decarboxylase (GAD)를 활성화 시켜 GABA 생성을 증진시키는 것으로 *in vitro* 실험을 통해 조사된 바 있다(4,5). 지금까지 제안된 식물세포내 GABA의 역할에 대해서는 pH조절을 위한 대사기구의 한 부분, glutamate에서 succinate에 이르는 GABA-shunt

를 통해 TCA 회로에서 산화를 위한 탄소골격의 제공, 질소 저장 화합물 및 아미노산 대사산물, 식물이 해충의 공격 중에 있을 때 내충성 기능 등의 여러 가지가 있다(2,3,6). 그러나 이들 중 어느 것이 더 확실한 GABA의 식물세포내 기능인지에 대해서는 판단하기 매우 어렵고 식물이 환경적 요인들에 적응하기 위해 필요에 따라 GABA를 합성하고 사용하리라고 보는 것이 타당할 것이다.

식물에서 GAD는 세포질 효소로 알려져 있으며, GAD의 활성화에 영향을 주는 중요한 인자로는 pH, Ca^{2+} , CaM 등이 보고되고 있다(2,3,6). 즉, 여러 환경적 요인에 의해 세포내 칼슘농도의 증가, 수소이온 농도의 증가가 관찰된 바 있으며(7,8), 칼슘과 결합한 CaM이 GAD를 활성화 시켜 세포내 GABA 농도를 증가시킨다는 것이다(5,9). 지금까지 정제된 여러 식물 GAD는 칼슘과 CaM이 없어도 어느 정도의 기본 활성을 보이고 있는데(9,10), 이는 식물 본래의 CaM이 정제 과정 중에 완전히 제거되지 않았기 때문으로 판단된다(9,11). 이렇듯 CaM과 GAD가 칼슘신호 없이도 서로 강력하게 결합

†Corresponding Author : Department of Biotechnology, Woosuk University, Chonju 565-701, Korea
Tel : +82-63-290-1433, Fax : +82-63-291-9312
E-mail : shoh@core.woosuk.ac.kr

되어 있다면 각종 환경적 스트레스에 의해 칼슘신호와 수소는 농도의 변화가 야기될 경우 훨씬 민감하게 이들 스트레스에 대항하기 위하여 GABA를 생성할 수 있을 것으로 판단되어 작용기작에 대한 연구도 활발하게 진행되고 있다(4,5,11). 또한 식물의 여러 조직으로부터 정제된 GAD들의 경우도 효소의 특이적 활성이 매우 달라 각각 다른 형태의 GAD가 조직별로 분포되어 있을 가능성이 시사된 바 있고(9), 그 실체가 확인되고 있다(6,12). 그리고 한 식물체 안에 여러 형태의 CaM isoforms이 발견되고 있는 점(13,14)을 감안한다면, 이들 CaM이 GAD의 활성에 다르게 영향을 줄 수 있을 것으로도 예상된다. 이미 보고된 pH, Ca²⁺, CaM 외에 GAD의 활성에 영향을 주는 어떤 중요한 요소가 있는가에 대한 연구와 더불어 GAD와 이들 인자들과의 작용 기작에 대한 구체적인 연구가 시도될 것으로 예상된다. 또한 GAD 단백질의 인산화 및 각종 CaM isoforms에 의한 활성화 정도 차이, GAD isoforms을 찾으려는 연구도 진행될 것이다.

동물에 있어 GABA는 뇌의 혈류를 활발하게 하고 산소 공급량을 증가시키며 뇌세포의 대사 기능을 향진 시키는 것으로 알려져 있으며, 임상에서는 뇌졸중 후유증 및 뇌 동맥경화증 등의 개선 약으로 사용되고 있다(15). 뇌중 GABA 및 GAD의 농도 저하는 간질병, 파킨슨씨병, 정신분열증 등의 질병과 매우 밀접한 관계가 있는 것으로 알려져 있고(15,16), 알콜중독자들의 혈중 GABA 농도는 정상인과 비교시 유의적으로 낮은 값을 보이고 있는 것으로 보고 된 바 있다(15,17). 이와같이 GABA가 중요한 역할을 하는 것으로 잘 알려지면서 의약품으로서의 GABA 뿐 아니라 최근에는 기능성 식품소재로서의 GABA에 대한 관심이 고조되고 있다. 따라서 앞으로는 식물세포내 GABA 생성체계에 대한 변화를 유전공학적인 방법을 통하여 인위적으로 조절하여 각종 환경적 스트레스나 침입자의 공격에 내성이 있는 식물체 및 GABA 고함유 기능성 식품재료를 개발하는 등 유용한 식물체를 생산해 내기 위한 연구가 계속되리라 본다.

최근 본 연구진은 현미의 발아와 키토산 처리에 따른 GAD 활성변화 및 GABA 생성에 대한 논문에서 식물체내 GABA 생성을 극대화할 수 있는 모델을 제시한 바 있다(18). 식물체내 GABA 생성을 극대화 할 수 있는 방안 중 앞으로 중요시될 부분이 GAD 유전자의 도입과 환경적인 스트레스를 적절히 처리하는 전략이기 때문에 GAD 유전자의 확보는 매우 중요한 과제이다. 따라서 본 연구에서는 식물 GABA 생성조절 메커니즘에 대한 기초 연구와 GABA 고함유 식물체 생산을 위한 토대를 마련하기 위한 시도의 일환으로 애기장대 cDNA library로부터 GAD 유전자를 부분 클로닝하여 그 서열을 분석하였다.

재료 및 방법

재 료

본 실험에 사용한 PCR 기기는 Biometra제 (Tampa, Florida, USA)를 사용하였고, TA cloning kit와 F' one shot™ kit는 Invitrogen제 (Carlsbad, California, USA)를 사용하였다. 애기장대 cDNA가 cloned된 pFL61 플라스미드는 Dr. Gary Stacey (University of Tennessee, Knoxville, USA)로부터 제공받아 사

Table 1. Primers used in the PCR amplification of glutamate decarboxylase gene from cDNA library of *Arabidopsis thaliana*

Primers ¹⁾	Sequences	%GC
Forward (18-mer)	GGATGGAACACAGAGTGTG	55
Reverse(24-mer)	CTCCATCACATTCTTGTAAACCTC	46

¹⁾The sequences of 18-mer and 24-mer primers were identical to the sense (from bp number 271 to 288) and the antisense (from bp number 1083 to 1106) sequences of the conserved regions in petunia glutamate decarboxylase cDNA (GenBank Accession No. L16797).

용하였다. *Taq* DNA polymerase는 Promega (Madison, Wisconsin, USA)제를 사용하였고, 기타 시약은 특급의 제품을 구매하여 사용하였다.

PCR screening of cDNA library

애기장대 cDNA library로부터 GAD 유전자를 증폭시키기 위하여 Table 1에서와 같이 primers를 합성하였다. Primers는 petunia GAD 유전자의 271-288 bp와 1083-1106 bp 부위를 각각 sense와 antisense 방향으로 합성하였다. PCR 반응은 pFL61 template DNA 100 ng, primers 각 200 ng, dNTPs 각 0.2 mM, MgCl₂ 2.0 mM, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100를 포함하는 10 mM Tris-HCl (pH 9.0)반응액을 94℃에서 5분간 반응시킨 후 2.5 μl의 *Taq* DNA polymerase (0.5 unit/μl)를 가하고 94℃에서 1분, 45℃에서 2분, 72℃에서 3분간 반응시키는 denaturation, annealing, extension 사이클을 30회 실시하였다. PCR products 생성은 1% agarose gel 전기영동을 실시하여 확인하였고, 증폭된 DNA 단편을 TA cloning vector인 pCR™2.1 vector (Invitrogen, Carlsbad, California, USA)에 T4 ligase로 ligation하였다.

제조합 DNA에 의한 대장균 형질전환 및 확인

제조합 TA vector에 의한 *E. coli* 형질전환에 필요한 시약, competent cells 등은 F' one shot™ kit (Invitrogen, Carlsbad, California, USA)의 것을 사용하였다. 50 μg/ml kanamycin과 25 μl의 X-Gal (10 mg/ml stock in dimethylformamide)이 함유된 LB배지에서 제조합 DNA에 의해 형질전환된 백색의 대장균 콜로니를 선발하였고, 50 μg/ml kanamycin이 함유된 LB배지에서 액체배양하였다. 액체배양된 대장균 세포로부터의 plasmid DNA 정제는 Promega제(Madison, Wisconsin, USA)의 Wizard DNA 정제 키트를 사용하였고, 기타 구체적인 대장균 형질전환 절차와 plasmid DNA 정제 절차는 제조사의 매뉴얼에 따랐다. 정제된 plasmid DNA는 *EcoRI* 제한효소로 37℃에서 2시간 반응시킨 후 1% agarose 전기영동을 실시하여 PCR product의 존재를 확인하였다.

DNA sequencing

DNA 염기서열 분석은 합성 oligonucleotide primers와 dsDNA Cycle Sequencing System (Perkin Elmer, USA)을 이용한 dideoxynucleotide termination procedure(19)에 의하여 실시하였다. 염기서열에 따른 아미노산 서열은 DNASIS program (Hitachi Software Engineering Co., USA)을 이용하여 분석하였다.

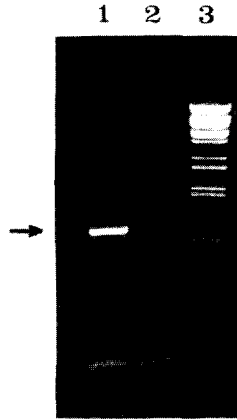


Figure 1. PCR product of glutamate decarboxylase gene from cDNA library of *Arabidopsis thaliana*. PCR product was analyzed by 1% agarose gel electrophoresis and the gel was stained with ethidium bromide. Lane 1, DNA fragment amplified from template DNA with the primers; lane 2, control reaction conducted with no added template DNA; lane 3, λ /BstEII DNA molecular weight marker. The arrow indicates the position of the PCR product.

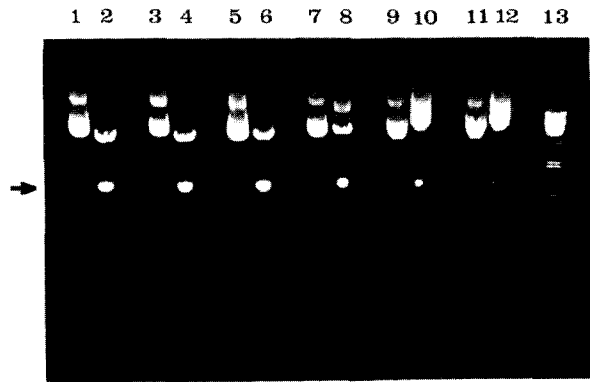


Figure 2. Restriction digestion of the inserted *Arabidopsis thaliana* PCR product into vector. The PCR product was ligated into the pCRTM2.1 vector (Invitrogen, Carlsbad, California) and the recombinant pCRTM vector was used to transform competent *E. coli* cells. Lane 1, 3, 5, 7, 9, 11 undigested plasmids from selected colonies; lane 2, 4, 6, 8, 10, 12 plasmids from the selected colonies digested with *EcoRI*; lane 13, λ /BstEII DNA molecular weight marker. The arrow indicates the position of the insert.

결과 및 고찰

본 연구는 식물 GAD 유전자를 확보하여 GABA 생성조절 메카니즘에 대한 연구와 GABA 고함유 식물체 생산을 위한 전략의 토대를 마련하기 위하여 수행되었다. 이를 위해 애기장대 cDNA library로부터 GAD 유전자를 부분 클로닝하여 그 서열을 분석하였다. 애기장대 cDNA library로부터 GAD 유전자를 증폭시키기 위하여 사용한 primer DNA는 petunia GAD 유전자의 271-288 bp와 1083-1106 bp 부위를 각각 sense와 antisense 방향으로 합성한 것이었다(Table 1). PCR로 증폭된 애기장대 DNA의 단편(Figure 1)을 pCRTM2.1 vector (Invitrogen, California, USA)에 삽입하여 재조합 DNA를 만들었다. 이 재조합 DNA로 형질전환된 대장균으로부터 얻은

```

10      20      30      40      50      60
5' TGGATGAAC CAGAGTGTGACAAACTCATCGACTCTATCAACAAGAACTACGTTGAT
  W M E P E C D K L I M D S I N K N Y V D

70      80      90      100     110     120
ATGGATGAGTACCCCTGTGCAACTGAGCTCCAGAACCGATGTGTAACATTATAGTCGA
  M D E Y P V T T E L Q N R C V N I I A R

130     140     150     160     170     180
CTGTTCAATGCCCACTCGAGGAATCTGAGACGGCGGTGGGAGTAGGGACAGTTGGTTCT
  L F N A P L E E S E T A V G V G T V G S

190     200     210     220     230     240
TCAGAAGCCATCATGTTAGCCGGATTGGCCTCAAAGAAAATGGCAGAACAACGCAAG
  S E A I M L A G L A F K R K W Q N K R K

250     260     270     280     290     300
GCTGAGGGTAAACCCATGACAAACCAACATTGTCACCGGAGCCAATGTTCAAGTTTGC
  A E G K P Y D K P N I V T G A N V Q V C

310     320     330     340     350     360
TGGGAGAAATTCGCTCGGTACTTCGAGGTGGAGCTAAAGGAAGTAAACCTAAGTGAAGGT
  W E K F A R Y F E V E L K E V N L S E G

370     380     390     400     410     420
TACTACGTGATGGATCCAGACAAGCAGCAGAAAATGGTAGCAGAGAACACAAATCTGTGTC
  Y Y V M D P D K A A E M V D E N T I C V

430     440     450     460     470     480
GCAGCCATATTAGGATCCACACTCAACGGTGGAGTTCGAAGACGTGAAGCGTCTCAATGAC
  A A I L G S T L N G E F E D V K R L N D

490     500     510     520
TTGCTAGTCAAGAAAACAGGAGACTGGTTGGAACACACCCATCCCAC 3'
  L L V K K N Q E T G W N T P I P
    
```

Figure 3. Nucleotide and deduced amino acid sequences of the cloned *Arabidopsis thaliana* GAD gene. The predicted amino acids sequence (single-letter abbreviation) is shown below the nucleotide sequence.

plasmid DNA를 *EcoRI* 제한효소로 절단하여 PCR DNA 단편이 존재함을 확인하였다(Figure 2). 정제된 plasmid DNA로부터 PCR DNA 단편의 염기서열을 합성 oligonucleotide primers와 dsDNA Cycle Sequencing System (Perkin Elmer, USA)을 이용한 dideoxynucleotide termination sequencing procedure(19)로 분석하였다. 분석결과 클로닝된 애기장대 DNA는 sense 방향의 primer로부터 클로닝된 것으로 총 길이가 529bp의 것이었으며(Figure 3), 이는 full-length GAD open reading frame 약 1500bp (GenBank Accession nos: U46665, U10034)의 약 1/3의 크기였다. 부분 클로닝된 애기장대 DNA의 염기서열과 deduced 아미노산 서열은 putative 애기장대 GAD (AraGAD2) 서열(GenBank Accession no. U46665)의 동일 서열부위와 비교하면 염기서열 98%와 아미노산서열 99%의 동질성이 확인되었다(Figure 3, 4). 또한 AraGAD3 (GenBank Accession no. U10034)의 염기서열 및 아미노산 서열과는 각각 78%와 91%의 동질성이 확인되었다(Figure 3, 4). 이와같은 결과는 애기장대가 여러 형태의 동질 GAD효소를 가지고 있음을 나타내 주는 결과이며, 향후 full-length GAD의 확보 및 활성연구를 통해 동질효소들 간의 특성차이에 대한 조사가 이루어질 것으로 사료된다.

동물에 있어 GABA는 중추신경계의 주된 억제성 신경전달 물질로서 잘 알려져 있다. GABA는 많은 생리적인 메카니즘의 조절에 관여하여 동물의 경우 뇌의 혈류를 활발하게 하고 산소공급량을 증가시켜 뇌세포의 대사 기능을 향진시키는 것으로 알려져 있다(15,16). 또한 GABA는 혈압강하 및 통증완

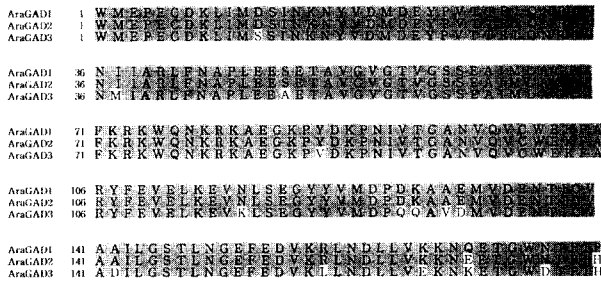


Figure 4. Comparison of the partial amino acid sequence of *Arabidopsis thaliana* GAD isoforms. AraGAD1 is the cloned GAD (this study), and AraGAD2 and AraGAD3 correspond to GenBank Accession nos: U46665 and U10034, respectively. The grey boxes represent identity.

화 등에도 효과가 있는 것으로 알려져 있어 약리적으로 매우 관심이 높은 물질이다(15). 이와같은 관심은 GABA 고함유 식품 및 식물 탐색이라는 동기를 부여하였고, 이에 대한 연구가 활발히 시도 되고 있다. 예를 들면, Chang 등(20)은 제주도 다원에서 생산된 녹차 생엽을 적체 시기별로 혐기적으로 처리하여 GABA 및 기타 주요성분의 함량변화를 측정하고 결과 GABA의 함량이 증진되는 것을 확인하였다. Yun 등(21)도 보리 맥아제조시 발아된 보리에 혐기적인 처리를 가하므로써 맥아 중의 GABA 함량을 약 2배 증진시킬 수 있다고 보고하였다. 본 연구진도 현미 발아시 키토산을 처리하면 GAD의 활성화에 의하여 발아현미 중의 GABA의 함량이 급격하게 증가하는 것을 발견하였다(18). 또한 GABA가 다량 함유된 배추뿌리 첨가 diet는 쥐의 혈중 및 간장 중의 총지질 및 중성지방의 양을 유의적으로 낮추는 것으로 조사된 바 있다 (22).

앞으로 GABA 고함유 기능성 식물식품들의 생산이 시도될 전망이다. 이 경우 GAD 유전자의 확보가 필수적이라 여겨지며 확보된 유전자는 곧 귀중한 자원이 될 것이다. 또한 식물체내 GAD에 대한 연구에 있어 GAD isoforms을 찾으려는 시도 등이 진행될 것이다. 본 연구를 통해 확보된 애기장대 GAD 단편은 식물체내 full-length GADs 확보를 위해 필수적인 probe DNA로 사용될 수 있어 여러 종류의 식물 cDNA로부터 GAD 유전자 클로닝에 활용될 전망이다. 이와같은 일련의 클로닝 작업을 통해 궁극적으로 식물세포내 GABA 생성 체계에 대한 변화를 유전공학적인 방법을 통하여 인위적으로 조절할 수 있게 될 것이다. 이는 각종 환경적 스트레스나 침입자의 공격에 내성이 있는 식물체 및 GABA 고함유 기능성 식품재료를 개발하는 등 유용한 식물체를 생산해내기 위한 전략에 응용될 것이다.

요 약

식물 GAD 유전자를 확보하기 위한 시도의 일환으로 애기장대 cDNA library로부터 GAD 유전자를 부분 클로닝하여 그 서열을 분석하였다. PCR로 증폭된 애기장대 cDNA 단편을 TA cloning vector에 삽입하여 재조합 DNA를 만들었다. 이 재조합 DNA로 형질전환된 대장균으로부터 얻은 plasmid DNA를 EcoRI 제한효소로 절단하여 cDNA 단편이 존재함을

확인하였다. 염기서열이 분석된 애기장대 GAD DNA는 sense 방향의 primer로부터 클로닝된 것으로 총 길이가 529 bp의 것이었으며, 이는 full-length GAD 염기서열의 약 1/3 정도의 크기였다. 부분 클로닝된 애기장대 DNA의 염기서열은 putative 애기장대 GAD sequences (GenBank Accession nos: U46665 and U10034)의 동일서열 부위와 비교하여 각각 98%와 78%의 동질성을 보였다. Deduced 아미노산 서열은 동일서열부위와 비교하면 각각 99%와 91%의 동질성이 보였다. 이들 결과는 앞으로 식물체내 GAD 조절 및 GABA 대사 연구를 위해 필수적인 유전자 재료 및 정보를 제공해 주는 것이다.

감 사

본 연구는 2000년도 우석대학교 학술연구비 지원으로 수행되었으며 연구비 지원에 감사드립니다. 또한 DNA 염기서열 분석에 도움을 준 채건상 교수님께도 감사드립니다.

REFERENCES

1. Satyanarayan, V. and P. M. Nair (1990), Metabolism enzymology and possible roles of 4-aminobutyrate in higher plants, *Phytochem.* **29**, 367-375.
2. Bown, A. W. and B. J. Shelp (1997), The metabolism and functions of γ -aminobutyric acid, *Plant Physiol.* **115**, 1-5.
3. Snedden, W. A. and H. Fromm (1998), Calmodulin, calmodulin-related proteins and plant responses to the environment, *Trends in Plant Sci.* **3**, 299-304.
4. Arazi, T., G. Baum, W. A. Snedden, B. J. Shelp, and H. Fromm (1995), Molecular and biochemical analysis of calmodulin : Interactions with the calmodulin-binding domain of plant glutamate decarboxylase, *Plant Physiol.* **108**, 551-561.
5. Baum, G., S. Lev-Yadun, Y. Fridmann, T. Arazi, H. Katsnelson, M. Zik, and H. Fromm (1996), Calmodulin binding to glutamate decarboxylase is required for regulation of glutamate and GABA metabolism and normal development in plants, *EMBO J.* **15**, 2988-2996.
6. Shelp, B. J., A. W. Bown, and M. D. McLean (1999), Metabolism and functions of gamma-aminobutyric acid, *Trends in Plant Sci.* **4**, 446-452.
7. Knight, M. R., S. M. Smith, and A. J. Trewavas (1992), Wind-induced plant motion immediately increases cytosolic calcium, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 4967-4971.
8. Katsuhara, M., K. Kuchitsu, K. Takeshige, and M. Tazawa (1989), Salt stress-induced cytoplasmic acidification and vacuolar alkalization in *Nitellopsis obtusa* cells, *Plant Physiol.* **90**, 1102-1107.
9. Snedden, W. A., T. Arazi, H. Fromm, and B. J. Shelp (1995), Calcium/calmodulin activation of soybean glutamate decarboxylase, *Plant Physiol.* **108**, 543-549.
10. Ling, V., W. A. Snedden, B. J. Shelp, and S. M. Assmann (1994), Analysis of a soluble calmodulin binding protein from fava bean roots: Identification of glutamate decarboxylase as a calmodulin-activated enzyme, *Plant Cell* **6**, 1135-1143.
11. Snedden, W. A., N. Koutsia, G. Baum, and H. Fromm (1996), 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**, 4148-4153.
12. Zik, M., T. Arazi, W. A. Snedden, and H. Fromm (1998), Two isoforms of glutamate decarboxylase in *Arabidopsis* are regulated by calcium/calmodulin and differ in organ distribution, *Plant Mol. Biol.* **37**, 967-975.
 13. Braam, J. and R. W. Davis (1990), Rain-, wind-, and touch-induced expression of calmodulin and calmodulin-related genes in *Arabidopsis*, *Cell* **60**, 357-364.
 14. Lee, S. H., J. C. Kim, M. S. Lee, W. D. Heo, H. Y. Seo, H. W. Yoon, J. C. Hong, S. Y. Lee, J. D. Bahk, I. Hwang, and M. J. Cho (1995), Identification of a novel divergent calmodulin isoform from soybean which has differential ability to activate calmodulin-dependent enzymes, *J. Biol. Chem.* **270**, 21806-21812.
 15. Krogsgaard-Larsen, P. (1989), GABA receptors, In *Receptor Pharmacology and Function*, M. Williams, R. A. Glennon and P.M.W.M. Timmermans Eds., p349-383, Marcel Dekker, Inc., New York.
 16. Bao, J., W. Y. Cheung, and J. Y. Wu (1995), Brain L-glutamate decarboxylase, *J. Biol. Chem.* **270**, 6464-6467.
 17. Tsai, G. E., P. Ragan, R. Chang, S. Chen, V. H. Linnoila, and J. T. Coyle (1998), Increased glutamatergic neurotransmission and oxidative stress after alcohol withdrawal, *Am. J. Psychiatry* **155**, 726-732.
 18. Oh, S.-H. and W.-G. Choi (2000), Production of the quality germinated brown rices containing high γ -aminobutyric acid by chitosan application, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **15**, 615-620.
 19. Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson (1977), DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.
 20. Chang, J. S., B. S. Lee, and Y. G. Kim (1992), Changes in γ -aminobutyric acid(GABA) and the main constituents by treatment conditions and of anaerobically treated green tea leaves, *Korean J. Food. Sci. Technol.* **24**, 315-319.
 21. Yun, S. J., K. G. Choi, and J. K. Kim (1998), Effect of anaerobic treatment on carbohydrate-hydrolytic enzyme activities and free amino acid contents in barley malt, *Korean Soci. Crop Sci.* **43**, 19-22.
 22. Cha, Y.-S. and S.-H. Oh (2000), Investigation of γ -aminobutyric acid in Chinese cabbages and effects of the cabbage diets on lipid metabolism and liver function of rats administered with ethanol, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **29**, 500-505.