

氏名	AKTER NADIA		
学位の種類	博士（理学）		
学位記番号	自博甲第7号		
学位授与年月日	令和6年9月20日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項		
文部科学省報告番号	甲第819号		
専攻名	創成理工学専攻		
学位論文題目	Comprehensive studies on functional expression of OsGAD4 gene in rice plants and physiological analysis of its genome-edited mutants under abiotic stress conditions (イネにおける OsGAD4 遺伝子の機能発現と非生物的ストレス下でのそのゲノム編集変異体の生理学的解析に関する総合研究)		
論文審査委員	主査	島根大学教授	中川 強
		島根大学教授	赤間 一仁
		島根大学教授	丸田 隆典
		島根大学准教授	西村 浩二

## 論文内容の要旨

Rice (*Oryza sativa* L.) is the ubiquitous staple food for a lion's share of the world population. Though rice is offering energy and basic vital nutrients, its productivity is facing challenges due to abiotic stresses resulting from climate change. GABA (Gamma-aminobutyric acid) is a non-protein amino acid widely known as major inhibitory neurotransmitter in the central nervous system of mammals. In plants, GABA acts as a signaling molecule and key regulator of growth and development. It is synthesized from glutamate via the enzyme glutamate decarboxylase (GAD). GAD is ubiquitous in all organisms, but only plant GAD has the ability to bind Ca<sup>2+</sup>/calmodulin (CaM). This kind of binding suppresses the auto-inhibition of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin binding domain (CaMBD) when the active site of GAD is unfolded resulting in stimulated GAD activity. OsGAD4 is one of the five GAD genes in rice genome. It was confirmed that OsGAD4 can bind to Ca<sup>2+</sup>/CaM. Moreover, it exhibits the strongest expression against several stress conditions among the five OsGAD genes. In this study, CRISPR/Cas9-mediated genome editing was performed to trim the coding region of CaMBD from the OsGAD4 gene, to remove its autoinhibitory function. DNA sequence analysis of the genome-edited rice plants revealed the truncation of CaMBD (216 bp). The truncated version of OsGAD4 mutant showed significant increment in GAD enzymatic activity in contrast to the wild type. Genome edited line (#14-1) produced 11.26 mg GABA/100g grain, which is almost 9-fold in comparison to the wild type. Short deletion in the coding region for CaMBD yielded in mutant (#14-6) with lower GABA content than wild-type counterpart. Abiotic stresses like salinity, flooding and drought significantly enhanced GABA accumulation in #14-1 at various time points compared to wild-type and #14-6 under the

same stress conditions. Moreover, upregulated mRNA expression in vegetative tissues seems correlated with the stress-responsiveness of OsGAD4 when exposed to the above-mentioned stresses. Stress tolerance of OsGAD4 genome-edited lines was evidenced by the higher survival rate, reduction of biomass loss in terms of fresh weight and dry weight indicating the gene may induce resilience against abiotic stresses in rice. GABA-enriched mutants were found to have significantly higher antioxidant enzyme such as Catalase (CAT), Peroxidase (POD) and Ascorbate peroxidase (APX) activity suggesting their ability to detoxify the production of reactive oxygen species (ROS) and thus alleviate the oxidative damage at the cellular level. It can be assumed that GABA has a strongly positive role to regulate ROS scavenging process to protect the plant cell from stress. Moreover, RNA-seq analysis reveals a higher number of uniquely expressed genes in the #14-1 line compared to the wild-type which might have a major role in drought stress tolerance. Gene ontology implies cellular components have influential role in gene expression process thus speculating the fact that they were majorly associated in stress response pathways. Additionally, several key genes and gene families associated with drought stress or stress-related conditions were found differentially expressed, including drought tolerance genes, transcription factors, and signaling protein kinases. Such findings indicate that a high concentration of GABA possibly boosted abiotic stress resilience via modulating gene expression and interconnecting stress signaling and defense mechanisms. To our best knowledge, this is the first report on abiotic stress tolerance in rice plants modulated by endogenous GABA, opening up new avenues for future research in this field.

## 論文審査結果の要旨

本論文は、イネ (*Oryza sativa* L.)を材料として、その $\gamma$ -アミノ酪酸 (GABA) 代謝系で中心的な役割を担うグルタミン酸脱炭酸酵素 GAD4 をコードする GAD4 遺伝子をゲノム編集技術により改変したイネを確立し、その生理機能を解析した結果をまとめたものであり、4つの章から構成されている。

第1章は序論であり、実験材料であるイネの重要性、研究課題である GABA の性質、植物における GABA 経路の特性、ストレスによる GABA の蓄積、CRISPR/Cas9 による遺伝子改変の原理、GAD4 遺伝子改変の根拠、及び研究目的について記されている。

第2章は、氏が研究の対象としたイネ GAD4 遺伝子がコードするカルモジュリン結合ドメイン (CaMBD) の生化学的な特性、CRISPR/Cas9 によるゲノム編集イネの作出とその分子レベルでの確認、GABA を含めた遊離アミノ酸含量や生育特性の調査の結果についてまとめられている。作出したゲノム編集イネは GAD4 遺伝子の CaMBD をコードする領域約 200 bp の欠失が確認され、胚芽抽出液を用いた GAD 酵素活性は約 2 倍上昇しており、種子中の GABA 含量は親株 (日本晴) と比べて、8.8 倍上昇したことが示されている。

第3章では、ゲノム編集イネの環境ストレス試験 (高塩・乾燥・冠水) について報告している。ゲノム編集イネ#14-1 はこれらのストレスにさらされることで、改変された GAD4 遺伝子の発現が上昇し、GABA 含量が急激に増加することが示されている。環境ストレス後、イネを土に移植し、17日間成長させると、いずれのストレスでも野生型イネがほとんど枯死したのに対して、ゲノム編集イネは高い割合で生存していた。対照となるイネとバイオマスの低下の割合を比較すると、野生型が 30%前後の低下であったのに対し、ゲノム編集イネは約 10%の低下であった。ゲノム編集を用いて植物の内生遺伝子を改変することで、複合的なストレスに対し植物を強靱化させた例は極めて珍しい。また、GABA やその異性体を植物に直接添加することで、植物に耐性を付

与した報告はあるが、遺伝子改変により内生の GABA を増強させることで、植物がストレス耐性を獲得した報告はこれが初めてと言える。植物体内で増加した GABA がどのようにして環境ストレス耐性を誘導するのか、氏は活性酸素種 (ROS) に注目して調べている。DAB 染色や ROS を除去する酵素の解析から、ゲノム編集イネ#14-1 では ROS の発生が有意に抑制されていることが示唆された。また、網羅的な発現解析 (RNA-seq) から、乾燥ストレス耐性に関わる遺伝子群を同定し、それらの特徴を解析している。

第4章は本研究成果をまとめている (GAD4 改変イネは種子中に高濃度の GABA を含み、環境ストレス耐性であり、RNA-seq 解析で乾燥ストレスに関わる遺伝子群を同定した)。

以上より氏の論文は、生命科学の最先端のゲノム編集技術を用い、植物における GABA 機能の一端を明らかにしただけでなく、新規性のある研究成果が数多く認められ、その学術的な貢献度は極めて高いと評価できる。研究成果は氏を筆頭著者とする関連論文として査読付き国際学術誌に発表され、2024年8月20日開催の公聴会では、氏の研究発表と審査委員との質疑応答を通して、研究成果の独自性と学術的及び社会的インパクトの大きさが確認された。以上より、審査委員会は本論文が博士の学位授与に十分に値すると判断した。