

氏 名	KULSUM UMMEY
学位の種類	博士（理学）
学位記番号	自博甲第14号
学位授与年月日	令和7年9月19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852号
専攻名	創成理工学専攻
学位論文題目	Comprehensive studies on the genome-edited hybrid rice line with dual truncations in the calmodulin-binding domains of OsGAD1 and OsGAD3 (OsGAD1 と OsGAD3 のカルモジュリン結合ドメインの欠損を二重に持つゲノム編集ハイブリッドイネ系統に関する総合的研究)
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.), as a primary food source for over half the world's population, plays an essential role in global food security. However, rice cultivation is increasingly threatened by a wide range of abiotic stresses, including drought, salinity, cold, and flooding factors exacerbated by climate change's ongoing impacts. These environmental constraints can significantly impair plant growth, disrupt physiological functions, and reduce grain yield and quality. Therefore, enhancing the resilience of rice to such stresses has become a central focus in modern plant breeding and biotechnology. Among the numerous biochemical responses that plants activate under stress, the accumulation of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA), a non-protein amino acid, has emerged as an important component of the stress response. In plants, GABA is synthesized through the decarboxylation of L-glutamate, a reaction catalyzed by the enzyme glutamate decarboxylase (GAD). A unique feature of plant GADs is the presence of a calmodulin-binding domain (CaMBD) at the C-terminal region. This domain acts as an autoinhibitory module, limiting GAD activity under normal physiological conditions. Upon stress-induced increases in cytosolic calcium levels, the binding of calmodulin to the CaMBD activates the enzyme, leading to enhanced GABA synthesis. Recent studies have demonstrated that truncation of the CaMBD can relieve this inhibition and promote constitutive GAD activity, resulting in elevated GABA levels even under non-stress conditions. Building on this concept, the present study employed CRISPR/Cas9 genome editing to truncate the CaMBD of

OsGAD1, generating a novel edited line (OsGAD1 $\Delta$ C #5). This was then crossed with OsGAD3 $\Delta$ C #8, a previously developed *OsGAD3* genome-edited line, to produce a hybrid line, designated as Hybrid #78, which carried both truncated alleles. This combinatorial approach was designed to integrate the complementary expression patterns of *OsGAD1* and *OsGAD3* to achieve broad-spectrum enhancement of GABA metabolism across developmental stages. Phenotypic evaluations revealed that Hybrid #78 exhibited significantly improved tolerance to multiple abiotic stresses compared to both the wildtype Nipponbare and the single-edited parent lines. Under cold stress, Hybrid #78 displayed a survival rate of 25%, while under salt stress it achieved 33%, and under flooding and drought conditions it reached 83%. In contrast, the survival rates of wild-type plants ranged from 0% to 33%, and the parent lines showed intermediate tolerance, with survival rates from 0% to 66%. These results indicate a synergistic effect of the dual truncation in enhancing stress resilience. Biochemical assays further demonstrated that Hybrid #78 accumulated the highest GABA content among all genotypes, particularly under stress conditions. Relative to wild-type plants, GABA levels in the hybrid increased by approximately 3.5-fold under cold stress, 3.9-fold under salinity, and up to 5-fold during both flooding and drought. Moreover, GABA content in Hybrid #78 was up to two times higher than that of the genome-edited parent lines, confirming the additive benefit of the dual gene modification. In addition, histochemical analysis using 3,3'-diaminobenzidine (DAB) staining revealed that Hybrid #78 accumulated significantly lower levels of hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) under stress, indicating reduced oxidative damage and more efficient ROS detoxification. To uncover the molecular basis of these improvements, RNA sequencing was conducted on shoot tissues of Hybrid #78 and wild-type Nipponbare under non-stress conditions. A total of 975 differentially expressed genes (DEGs) were identified between the two genotypes, of which 450 genes were uniquely expressed in Hybrid #78. Functional enrichment analysis using the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) database revealed significant upregulation in pathways associated with nitrogen metabolism. Since glutamate is a precursor for GABA biosynthesis, enhanced nitrogen assimilation may contribute to the elevated GABA levels observed in the hybrid. Additionally, broader transcriptional variation was observed in the hybrid line, indicating greater regulatory plasticity. Several key stress-responsive genes, including *OsDREB*, *OsHSP70*, and *OsNAC3*, were also found to be upregulated in Hybrid #78. These genes are well-documented for their roles in improving abiotic stress tolerance through transcriptional regulation and hormonal crosstalk. Their increased expression suggests that the hybrid line may possess a primed or pre-activated stress response system, potentially contributing to its superior stress resilience. In conclusion, this study demonstrates the effectiveness of CaMBD truncation in enhancing the functional activity of GAD enzymes and boosting GABA production in rice. The generation of a genome-edited hybrid line combining modifications in both *OsGAD1* and *OsGAD3* represents a novel and promising strategy for developing rice cultivars with improved abiotic stress tolerance. These findings contribute to our understanding of GABA metabolism in plant stress adaptation and highlight the utility of precise genome editing for trait improvement in crop breeding programs.

# 論文審査結果の要旨

本論文はイネ (*Oryza sativa* L.)を材料とし、GABA 代謝系で主要な役割を担うグルタミン酸脱炭酸酵素 (GAD) をコードする GAD1 遺伝子と GAD3 遺伝子をゲノム編集技術によってそれぞれを改変したイネ系統 (GAD1#5 と GAD3#8) とそのハイブリッド系統 (#78)を用いて、 $\gamma$ -アミノ酪酸 (GABA) の植物での新規な生理機能を生理学的・分子生物学的・生化学的手法を用いて解明した結果をまとめたものであり、5つの章から構成されています。

第1章序論では、実験材料であるイネの重要性、植物における GABA 経路の特性とストレスによる GABA の蓄積機構、CRISPR/Cas9 による遺伝子改変の原理、本課題の GAD1 遺伝子と GAD3 遺伝子改変の根拠、及び研究目的について記されています。

第2章材料と方法では申請者が研究の対象とした CRISPR/Cas9 による GAD 遺伝子の変異系統とその交雑系統の作出方法、生体分子 (DNA、RNA、遊離アミノ酸など)の分析方法について、野生型イネとゲノム編集イネを用いた環境ストレス試験の方法や RNA 解析 (RNA-seq) について説明されています。また、ストレス応答に関わる遺伝子群に絞った RT-qPCR や活性酸素種 (ROS) の検出方法を説明しています。

第3章結果では、4つのイネ系統 (野生型日本晴 Ni、単一の遺伝子を改変したゲノム編集イネ GAD1#5 と GAD3#8、これらの交雑系統#78) を用いて様々な観点からの解析結果を説明しています：まず、これら系統のイネ苗を様々な環境ストレス (低温・高塩・冠水・乾燥) で処理し、土に移植後に2週間生育させると、Niは殆どが枯死したのに対して、ゲノム編集したイネの生存率は、#78 > #8 > #5 の順番でした。アミノ酸分析の結果、GABA 含量は#78 が最も高い傾向が見られました。また、GAD1 と GAD3 の発現レベルも#78 が高塩と乾燥ストレスで有意に高まっていました。これらのストレスにより、プロリンなどストレス緩衝能を持つアミノ酸の蓄積が見られ、特に#78 で有意に高まっていました。過酸化水素含量を DAB 染色で調べた結果、Ni が最も高く、#78 が最も低い値を示しました。非ストレス下での RNA-seq 解析から#78 に特徴的な遺伝子発現様式が観察され、DREB、HSP70、NAC3 などストレス応答で鍵になる遺伝子群が有意に発現上昇していることが分かりました。

第4章考察と第5章結論では、ハイブリッド系統#78 の優れた環境ストレス耐性能について論じています。すなわち、ハイブリッドイネではストレスに応答して相加的に GABA 蓄積が高まること、これが GAD1 と GAD3 のストレスに応答した発現誘導に寄与すること、高 GABA が介在した ROS 消去、遊離アミノ酸の蓄積、抗ストレス遺伝子群の誘導を引き起こすことなどが環境ストレス耐性の付与に関わるものと考えられました。

以上のように本論文は、ハイブリッドイネを用いた、植物における GABA に関する極めて新規性の高い研究成果を含んでおり、その学術的インパクトは高い水準にあると判断できます。得られた成果の一部は、申請者を筆頭著者とする関連論文として査読付き英語学術誌で発表されており、公聴会における発表と質疑応答でもその内容の新規性とインパクトが認められました。以上から判断して、申請者の論文は博士の学位授与に値するものと審査委員が全員一致し判定しました。