

淺談植物專一 基因編輯技術

撰文/郭瑋君

植物專一基因編輯的重要性

隨著世界人口上升，預計 2050 年人口將高達 91.5 億，對糧食穩定供給近年來獲得全球高度的重視。然而近年來由於氣候變遷、旱災及水患肆虐主要的農業地區，已造成產量大幅下降，再加上顯著比例的作物如玉米等，轉用於生產生質能源，更惡化作物生產的高需求，學者推測全球可能正邁向另一次糧食危機。因此，透過全基因體研究解碼作物中代謝產物的路徑及抗逆境的調控機轉，利用分子育種以提升重要作物的生產力已是全球植物研究的緊急任務。

幾百年的演化過程中，人類主要利用表面性狀來選取目前大多栽培作物的品種。在大約 30 年前，研究學者利用人為基因轉殖 (genetic transformation) 技術建立了第一棵具有新特質的植物，例如具有抗蟲及殺草劑的能力，開啟了利用基因編輯技術進行作物品種改良的新頁，使分子育種向前邁了一大步。然而，早期的轉殖技術主要依賴農桿菌媒介之 T-DNA 插入，其會隨機將人為重組的外源基因導入植物基因體內，有時會導致非預期表觀遺傳性狀 (epigenetic effect)，如部分非目標之植物 DNA 序列重組、質體序列插入其它重要基因等，即所謂的位置效應 (position effect)，也可能使目標基因無法正常表達。除此之外，分子育種的先決條件為目標基因的功能解碼，但仍有一大部分的基因功能研究並無法透過隨機 T-DNA 突變的途徑來達成，也阻礙高

通量的植物基因體功能研究。因此，在高等植物中進行有效率且專一性的基因編輯技術，不僅可顯著加快分子育種，以提高作物產量，同時也可助益植物基因功能的研究，若此技術發展成熟，對植物生物技術的應用將無可限量。我們將能直接插入基因於準確的位置以建立需要的性狀，或者移除特定基因及控制基因的表達量以增加植物的生存能力，甚至可以人為設計全新的植物品種，例如 C4 稻米計畫及固氮氣穀類作物計畫等。

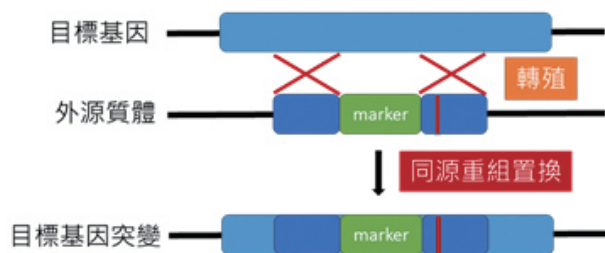
於 1980 年代末期，由瑞士科學家 Paszkowski 開創首例利用同源重組的方法專一修復菸草原生質體 (protoplast) 中失去功能的抗藥基因，而開啟植物專一性基因編輯技術的研發熱潮，尤其於 2000 年初期發展出的 nucleases 之 DNA 編輯技術更突破低基因編輯效率的瓶頸，增加高通量應用的可能性。近 5 年來利用 CRISPR/Cas9 之 nuclease 基因編輯更有突破性的發展，顯著降低此技術應用門檻及提高編輯專一性，大幅增加高通量植物基因功能研究及基因工程應用的可能性 (Baltes, 2015; Cardi, 2016)。以下針對這些技術的原理及在植物的應用進行介紹：

同源性重組 (homologous recombination, HR)

所謂同源性重組 (HR)，即當 DNA 序列具有高度的相似性 (不一定為同源染色體)，DNA 片段會配對重組，在減數分裂 (meiosis) 的過程中尤為

常見。其功能為在體細胞 (somatic cells) DNA 發生雙股斷裂 (double-strand break, DSB) 時，同源重組提供精確的 DNA 修復，也可重組成新的等位基因 (allele)，改變遺傳性狀。在自然情況下，相較於其它生物，植物鮮少利用 HR 機制進行細胞核中 DNA 的修復，然而，當人為置入相似性的 DNA 片段時，即可誘導 HR 發生，進行基因專一序列之突變 (圖一)。在應用時，可人工將欲突變之內源基因序列插入標記基因，如抗藥基因，來篩選已進行 HR 的植物或細胞。當目標基因完成置換後，可造成基因功能剔除 (knock-out)。目前已於菸草、阿拉伯芥及稻米中建立 HR 的穩定突變株。

即使如此，在應用上，在轉殖植物重組的效率仍非常低，只能到達 10^{-3} - 10^{-6} ，需要精細的篩選策略提供協助。主要原因為真核細胞的 DNA 發生 DSBs 時，除利用 HR 機制修復外，也會利用非同源性末端接合 (non-homologous end joining, NHEJ) 來修復，且其機率與同源重組相當，因此當進行人為 DNA 片段轉殖時，也會誘導 NHEJ 的發生，大量提升 DNA 片段隨機插入 (random integration) 基因體的機率，一方面降低重組的機率，同時造成其它基因的突變，這也是 HR 在植物專一基因突變應用的一大瓶頸。雖然已發現可透過表現影響同源性重組及染色體結構的蛋白質，如酵母菌的 RAD54 基因，來增加阿拉伯芥植物的重組機率，但目前仍無應用於其它植物的例子。



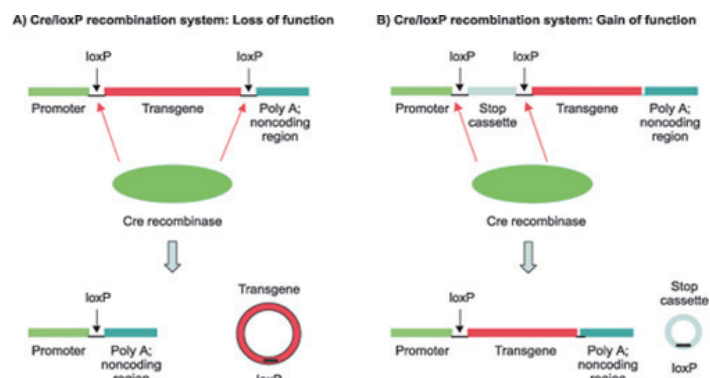
圖一 同源性基因重組編輯原理

重組酶(recombinase)基因置入

重組酶主要源自於原核生物及一些低等的真核生物，以進行 DNA 序列的置入。舉例來說，當噬菌體 (phage) 的基因嵌入細菌的基因體時，其重組酶會辨識細菌基因上的特定序列進行專一性的 DNA 序列重組。大約在 30 年前，先驅基因工程使噬菌體 1 的 Cre 重組酶可於高等真核生物作用，開啟 Cre-lox 重組酶系統於植物基因編輯應用的大門，也是目前為止在植物中應用最多的重組酶。其作用原理如圖二所示，Cre 重組酶會辨識 loxP 的序列進行 DNA 序列重組。若在建構轉殖植物時，事先在轉殖基因 (transgene) 或調控序列 (如圖二的 stop cassette) 前後插入 loxP 序列，即可利用基因轉殖方法導入 Cre 重組酶，進而啟動專一性 DNA 序列重組，去除標記基因或改變轉殖基因的表達。此技術已應用於菸草、稻米及大豆等，但因其突變株的建立需要兩次的基因轉殖步驟，所以目前較少應用於高通量植物功能的研究。

寡核苷酸(oligonucleotide)標靶突變

在植物及動物細胞中，可利用寡核苷酸達到特定基因的突變，寡核苷酸可分為以下三種：單股 RNA/ DNA 融合寡核苷酸 (single stranded RNA/ DNA hybrids)、單股 DNA 寡核苷酸 (single stranded



資料來源：http://www.dianliwenmi.com/postimg_4137814.html。

圖二 Cre-lox重組酶系統於植物的應用

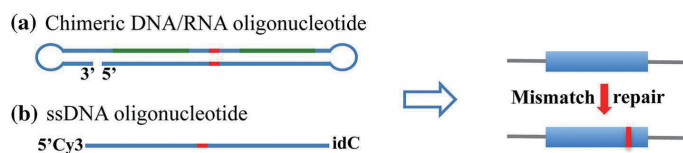
DNA oligonucleotide) 及三股寡核苷酸 (triplex-forming oligonucleotide, TFO)。單股 RNA/ DNA 融合寡核苷酸含有一段與標靶基因相同的序列 (圖三 a 藍色區段), 除欲進行突變的地方 (圖三 a 紅色區段) 外其他與互補的 RNA 序列片段相接 (圖三 a 綠色區段), 並在頭尾建置髮夾 (hair pin) 結構以穩定分子結構, 以避免被降解。當此分子存在於細胞中時, 會與相同 DNA 區域形成互補穩定 D-loop 結構, 此時, 轉入的 DNA 突變片段成為鹼基錯誤配對 (mismatch) 修復的模版 (template), 造成專一性單一鹼基的改變 (圖三 a)。單股 DNA 寡核苷酸亦是利用相同的原理, 只有序列頭尾結構稍有不同。本技術優點為用於多基因家族相同鹼基的突變, 雖然在菸草、玉米、稻米中藉由基因槍轉殖証實此方法可造成外源篩選基因如 GFP 或抗殺草劑基因的突變, 然而, 突變機率非常低, 為 10^{-4} 左右。在動物研究更發現在長期生長中 (於一年間), 突變被修正機率高達 40%, 因此其在植物的應用仍有限。

TFO 作用方式則略為不同, 若含有 10 mM $MgCl_2$ 其可與目標基因與雙股 DNA 形成穩定的三股結構 (triplex formation), 抑制 RNA polymerase 的轉錄作用, 進而抑制該基因的表現。近年來結合 TFO 及奈米科技, 開發出人造標靶光激發之奈米剪刀 (artificial targeted light-activated nanoscissor, ATLAN), 其將 TFO 前端附著在金奈米粒子以做為進入細胞的載體 (圖四 a), 並在 TFO 尾端接上可被光激發的 DNA 切割試劑 - hydrazone (圖四

a-c), 當此巨分子進入細胞, 會與特定 DNA 序列結合, 在受到特定波長的光激發 (圖四 d) 後產生自由基進行 DNA 雙股斷裂 (圖四 e), 藉此誘發專一基因突變。此技術最大的優點為不具破壞性且不須轉殖即可達到 DNA 專一序列的突變。目前已可應用在動物細胞中, 未來希望可進一步應用於植物細胞。

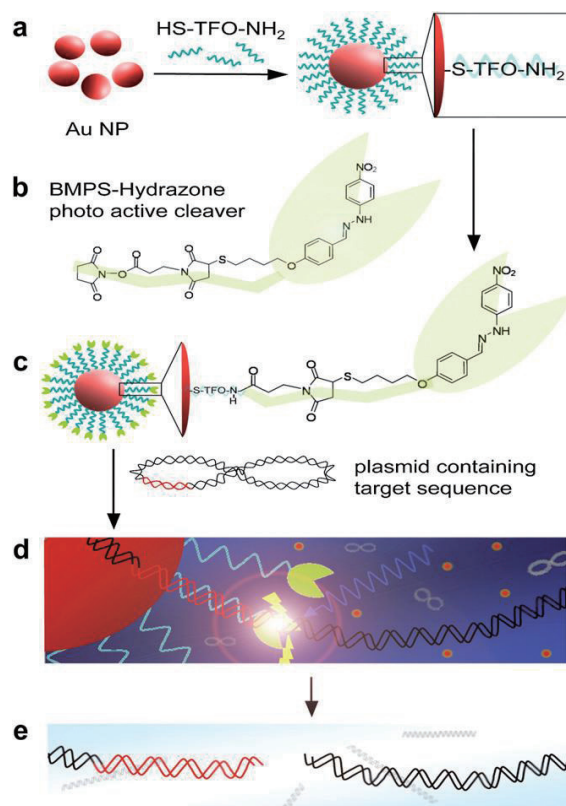
核酸酶(nuclease)標靶突變

相較上述所提的基因編輯技術, 利用核酸酶 (nuclease) 標靶突變為目前遺傳修飾應用最廣且效率最高的方法, 其基本的原理為利用約 18-40 鹼基對結合序列, 使核酸酶作用於特定的基因序列上, 造



資料來源: Cardi, 2016。

圖三 寡核苷酸標靶突變



(a) 特定TFOs分子聚集在金奈米粒子。
 (b) BMPS-hydrazone 結合上TFO。
 (c) TFOs分子識別目標DNA質體且形成穩定的鍵結。
 (d) 當暴露在紫外線光, hydrazone造成DNA雙鏈斷裂。
 資料來源: Tsai, 2010。

圖四 ATLANs 的設計

成雙股 DNA 斷裂，活化植物細胞內 DNA 修復機制如同同源序列重組或 NHEJ，再藉由修飾過的外來模板進行 DNA 修復，即可造成特定位置基因突變。研究指出雙股 DNA 斷裂為植物專一性基因突變的主要限制因子，所以利用核酸酶增加雙股 DNA 斷裂的機率，較同源序列重組的突變率高，在阿拉伯芥中可達 29% 的突變率。因此，近 10 年來，核酸酶基因工程蓬勃發展，以下針對 4 種主要核酸酶系統進行說明：

(一) 巨核酸酶(meganucleases)

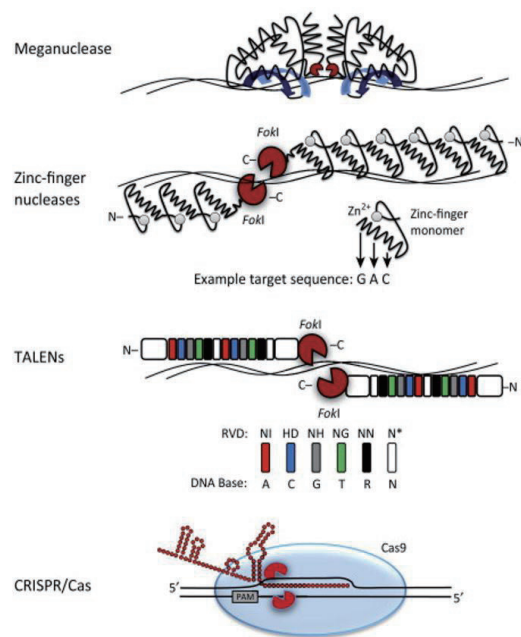
為微生物一種內源核酸內切酶 (homing endonuclease) 及第一種應用於植物的核酸酶，相較於其它的核酸酶，其最大的優勢在於分子小，只須約 165 個胺基酸即可專一地辨識長達 14-40 鹼基對的序列 (圖五)，因此可廣泛使正不同植物轉殖的方法如植物 RNA 病毒轉殖。然而其缺點在於其所辨識之序列有限，無法廣泛用於多種基因，主要原因在於此蛋白酵素結合序列與調控活性之序列重疊，因此如何透過蛋白結構重組工程增加專一性辨識序列的多樣性又可同時保有活性成為此技術的瓶頸，目前只能利用自然存在的巨核酸酶如 I-SceI、I-CreI 等。此項技術已應用於玉米及棉花，在玉米的基因改造上，約可有 3% 突變率。

(二) 鋅指核酸酶(zinc-finger nucleases, ZFN)

鋅指蛋白 (zinc finger protein, ZFP) 是真核生物中最大轉錄因子 (transcription factor) 族群之一，在所有生物的生長與發育中扮演重要的調控角色。其特色在於 DNA 進行轉錄時，ZFP 的結合區 (DNA-binding domain) 可以辨識特定的啟動子 (promoter) 序列，一個 ZFP 能夠辨識三個鹼基，進而抑制或增加基因的表達。因此，利用 ZFP 與 DNA 之間的結合專一性，人為構築含有特定 ZFP 的複合體，每一個複合體包含 3-4 組 ZFPs (圖五)，表現於植物細胞時，可專一性辨識定 9-12 鹼基對，並於 C 端結合 FokI 內切酶 (endonuclease) (圖五中紅色圖示) 此複

合體稱為鋅指核酸酶 (zinc-finger nucleases, ZFN)。當表現於生物體時，ZFPs 結合特定 DNA 序列，FokI 形成雙體 (dimer) 活化其內切酶的活性，進而造成特定位置 DNA 雙股斷裂，誘發細胞自體修復產生突變。目前已建立公開序列資源 "OPEN" 以供 ZFN 的設計，已約有 2000 種 ZFN 應用於阿拉伯芥及菸草中，並進行基因功能的研究。

然而，即使 ZFNs 已具有專一性，但仍有報告指出 ZFNs 也會造成其他相似序列的斷裂，造成非標靶基因不正常表現，導致細胞死亡。也因其為轉錄因子，當過度表達時，仍會影響部分植物基因的表現情形。另外，一個基因的突變需要 6 或 8 組 ZFPs，而同時進行二個基因以上的突變則至少需要 12 或 16 組以上的 ZFPs，在質體的設計上其複雜性將會是很大的障礙，雖然目前已研發出只需 2 組 ZFPs 及可作用之 ZFN，但廣大的應用仍須觀察。



資料來源：Baltes, 2015。

圖五 核酸酶突變的機制

(三) Transcription activator-like effector nucleases(TALENs)

TALENs 為近幾年開始研發的定點核酸酶 (site-specific nuclease)。TALE 蛋白來自植物致病菌—*Xanthomonas*，當其感染植物時，會分泌 TALE 蛋白結合在植物基因的啟動子序列以活化協助其感染的基因。TALE 蛋白的結合區主要由 33-35 個胺基酸所組成的重複片段，而每一個重複片段含有兩個高度可變的胺基酸，稱為可變雙胺基酸 (repeat-variable di-residues, RVD)，可專一性辨識一個 DNA 鹼基 (圖五)。利用此專一性，人為合成具有不同 RVD 的 TALE 蛋白片段，即可辨識大片段特定 DNA 序列，並於 C 端結合 FokI 內切酶，使其可造成特定序列的 DNA 雙股斷裂。其最大的優點在於結合區的設計彈性高，只要一組 RVD，即可辨識一個鹼基，相較於 ZFN，可大幅簡化質體的設計及應用且專一性顯著提升。一般而言，TALEN 具有 15-20 個 RVDs，可辨識 30 個以上的 DNA 序列，因此，相較於其它核酸酶，其專一性最高。而唯一缺點是 TALE 蛋白質體序列較長且片段重複性高，約含有 950-1,900 鹼基，使植物轉殖效率低。目前已應用於建立抗病稻米、小麥、大豆、玉米及馬鈴薯等作物的改良。

(四) CRISPR/Cas(Clustered regularly-interspaced short palindromic repeats/CRISPR associated protein)系統

於 2013 年所研發的 CRISPR/Cas 系統再為植物基因體編輯技術 (genome editing) 開創新的契機，被認為是至今最佳的核酸酶系統。Cas 為細菌內特殊核酸內切酶，當受到病毒感染時，研究發現 Cas9 會與其導引 RNA(guiding RNA, gRNA) 結合，辨識

目標序列，並切割目標 DNA。研究發現 gRNA 藉由約 20 個核苷酸決定 Cas9 切割的專一性 (圖五)，因此，在應用上相較於 ZFN 及 TALEN 須經繁複基因工程以合成辨認目標序列的蛋白結合區，CRISPR/Cas9 系統只須合成 20 個辨認特定序列的 gRNA (與目標 DNA 互補)，即可改變 Cas9 的專一性，辨識不同序列的 DNA，實行上更為成熟且有效率。在 2013 年底，CRISPR 線上資料庫的建立更增加此技術的使用性及普及性。然而其缺點是脫靶 (off-target) 切割效應，在只有 20 個核苷酸辨識序列中，gRNA 可容許少數的錯誤配對 (miss-match)，尤其在 5' 端更為明顯。目前已有研究進一步開發 CRISPR/Cas9-FokI 系統，以改善專一性的問題。另一個缺點則是 Cas9 含約 1,400 個胺基酸，為目前最大定點核酸酶，阻礙植物基因轉殖的效率。未來應可先建構持續性表現 (constitutively expression) Cas9 的轉殖植物，再轉入不同的 gRNA 進行後續基因編輯來改善問題。目前，此項技術已應用於多種作物的品種改良，如水稻、菸草、小麥、大豆、玉米及甜橙等，甚至可造成高達 46% 的突變率，未來在植物基因體編輯的應用將無可限量。

結語

隨著定序技術的突飛猛進，在後基因體時代 (post-genome era)，基因解碼後，如何更進一步了解植物整體性的生理調控，進而進行更高階的分子育種及精進作物的環境適應力，為目前植物科學重要課題。新興的專一基因編輯技術，尤其是序列專一的核酸酶系統將會是非常有力的技術工具，勢必對植物品種的開發造成革命性的影響。

AgBIO

郭瑋君 國立成功大學 生物科學與科技學院
熱帶植物科學研究所 助理教授

參考文獻

- Baltes, N. J. and Voytas, D. F. (2015) *Enabling plant synthetic biology through genome engineering*. Trends in Biotechnology. 33(2):120-131
- Cardi, T. and Neal Stewart, C. Jr. (2016) *Progress of targeted genome modification approaches in higher plants*. Plant Cell Report 29. [Epub: DOI 10.1007/s00299-016-1975-1]
- Tsai, T. L., Shieh, D. B., Yeh, C. S., Tzeng, Y., Htet, K., Chuang, K. S., Hwu, J. R., Su, W. C. (2010) *The down regulation of target genes by photo activated DNA nanoscissors*. Biomaterials. 31(25):6545-54.