

基因編輯技術簡介及農業應用 Genome editing technology and application

陳哲仁¹、林如玲²、龔美玲²、張惠如³

一、前言

隨著生物技術進展，現今對於作物基因體也逐漸累積更多更清晰的瞭解，並且可以實際應用於育種改良工作，以滿足人口增長及可耕地面積減少帶來的糧食需求壓力，此外，對於農產品食用及加工品質之提升，也是生產上持續追求目標。往昔基因改造（簡稱基改）作物，已成功利用基因轉殖技術，使得作物獲得新穎性抗蟲及（或）抗殺草劑兩項重要栽培管理特性，並且從基改作物商業生產 20 餘年的紀錄顯示栽培面積及產量持續增加，但是有鑑於傳統基因轉殖技術具有不確定性，為了維護消費者食用及環境生態安全，因此，各國制定有相關管理辦法進行基改作物審查與市場抽檢。近期新一代的基因編輯技術，可以達成精準地定點變動基因體序列以獲得或廢除特定基因功能，是現今基因體功能分析的重要技術，也具有龐大的產業應用潛力可以加速新品種開發，由於在基因編輯作物在使用技術方面與傳統基改作物有明顯區別，本文就現行主要基因編輯技術及作物開發管理現況進行簡要的說明（圖 1）。

二、基因編輯技術

傳統利用基因轉殖方式導入功能性基因片段達成性狀改良目標定義為上一世代基因改造生物，而歐盟委員會(European Commission)於2007年針對不屬於傳統基改作物範疇的新育種技術(New plant breeding techniques, NPBT)開啓討論，包括寡核苷酸定點突變(Oligonucleotide-directed mutagenesis, ODM)、核酸酶定點突變(Nuclease-mediated site-directed mutagenesis)、RNA導引DNA甲基化(RNA-directed DNA methylation; RdDM)、基改砧木嫁接(Grafting on GM Rootstock)、反向育種(Reverse breeding)、農桿菌滲入(Agroinfiltration)以及其他技術等，其中ODM及核酸酶定點突變技術是一般通稱的基因編輯技術(gene editing or genome editing)，是目前使用最多、最廣泛的DNA重組技術，也是產業應用進展最前者。基因編輯技術也是目前重要的品種改良技術之一，此技術主要仰賴特定的核酸酶可以在DNA或RNA引導下，與具有互補性序列結合位置發生雙股DNA斷裂(double strand breakdowns, DSBs)，使得細胞遵循自我修

¹ 種苗改良繁殖場農場 副研究員兼主任

² 種苗改良繁殖場生物技術課 助理研究員

³ 種苗改良繁殖場生物技術課 副研究員兼課長

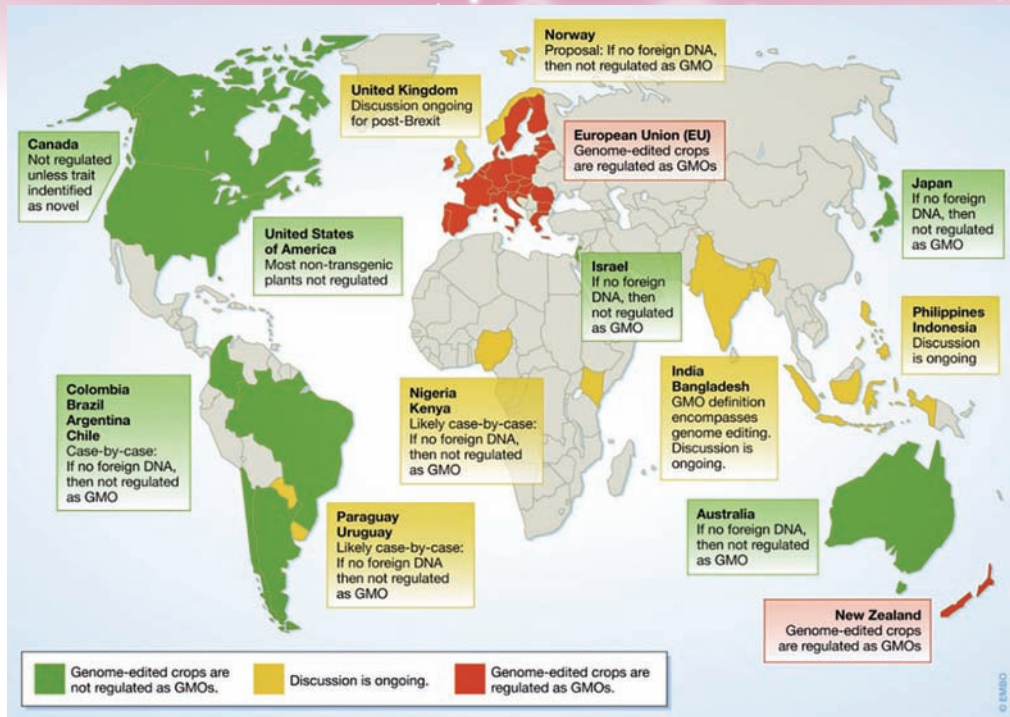


圖 1. 目前全球對於基因編輯作物管理之立法情形。(資料來源：Schmidt et al. 2020)

復機制進行同源序列置換(homology direct repair, HDR)或非同源性末端結合(Non-homologous end joining, NHEJ)，最終結果會導致目標位置基因發生序列改變。以下就三項主要技術進行說明：

1. 鋅指核酸酶 (zinc finger nucleases, ZFNs)

ZFNs是最早利用的基因編輯核酸酶，具有由30個胺基酸構成的Cys2-His2 zinc finger domain特徵，可與3個DNA鹼基結合，透過組合3-4個C2H2 zinc finger domain達成專一性序列辨識，並且在C端FokI限制酵素作用下截切雙股DNA，但是由於篩選功能性ZFNs組成耗時且缺乏效率，甚至具有細胞毒性，因此缺少實際育種應用案例。

2. 類轉錄激活因子效應物核酸酶 (transcription activator-like effector nucleases, TALENs)

TALE 蛋白 (Transcription Activator-Like Effector) 是由植物致病細菌 *Xanthomonas* 所產生具有調節基因轉錄表現的功能性蛋白，可以與特定基因啟動子序列發生專一性結合，並活化下游基因表現。而 TALENs 類似於 ZFNs 設計，是在 TALE 蛋白 C 端接上 FokI 限制酵素發揮截切雙股 DNA 效果，TALE 蛋白由 34 個胺基酸組成，其第 12 及 13 位置胺基酸決定 TALE 蛋白與 DNA 結合的專一性，故可透過修改 TALE 蛋白胺基酸序列來改變 DNA 序列結合的專一性，但是 TALE 蛋白設計需要特殊專業才能達到預期效果，因此僅有少數團隊採用。

3. CRISPR/Cas 系統 (clustered regularly-interspaced short palindromic repeats/CRISPR associated sequence)

文獻報告

最近新開發的 CRISPR/Cas 基因編輯技術最為廣泛運用，CRISPR 首先在 1987 年大腸桿菌中發現有一連續性 29 個鹼基長度的重複性序列，中間由 32 鹼基間隔，直到 2005 年才證實這 32 鹼基間隔序列部分與病毒及質體的序列一致，後續實驗顯示這是一種源自於細菌及古細菌 (archaea) 的核酸層級免疫防禦系統，透過類似於 RNA 干擾 (RNA interference) 機制，經 RNA 引導下將具有互補性序列由 CRISPR-associated protein(Cas) 蛋白作用進行雙股 DNA 截切。並由 short CRISPR RNA(crRNA) 負責引導 CRISPR/Cas 系統與專一性序列結合；transactivating crRNA(tracrRNA) 雖然與序

列專一性無關，但是負責關鍵的核糖核蛋白 (ribonucleoprotein) 與 Cas 蛋白體複合體結合 (圖 2)。現在實用上已經將 crRNA 及 tracrRNA 合併為單一構築，稱為 single guide RNA (sgRNA)，此外，作用序列上相鄰辨識位置還需有 protospacer adjacent motif(PAM) 存在才能有效發揮截切效果。由於 CRISPR/Cas 系統僅需使用基本的 DNA 重組技術，相較 ZFN 及 TALEN 技術具有使用簡單、有效、低成本且可同時進行多基因編輯的優勢，並且適用於動、植物物種，栽培作物方面已有包括水稻、小麥、玉米、大麥等 16 項作物的性狀改良應用。

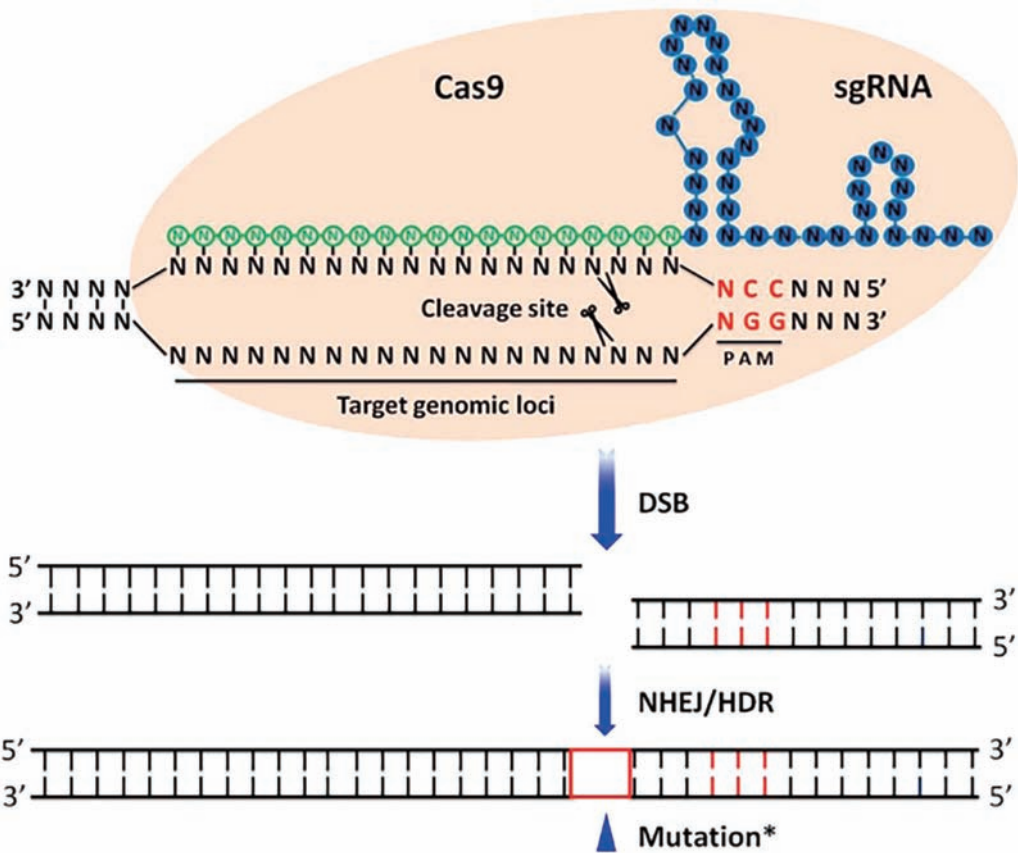


圖 2. CRISPR/Cas9 系統結構及基因修飾示意圖。(資料來源：Xiong et al. 2015)

三、基因編輯技術之農業應用

自 2013 年同一時期首度發表利用 CRISPR/Cas9 系統進行動物及植物基因功能研究以來，由於此項技術操作簡便、有效且低成本，對於控制作物重要農藝性狀基因的功能鑑定及育種改良應用具有極大的應用潛力，相關研究成果迅速累積，在 2017 年 2 月至 2018 年 8 月的 1 年半期間為例，即有 377 篇關於 CRISPR/Cas9 於作物研究的報告被發表。目前本項技術已在 24 種作物中被應用，包括水稻、小麥、玉米、大麥、甘藍，胡蘿蔔、木薯、胡瓜、馬鈴薯、油菜、番茄、西瓜、蘋果、香蕉、葡萄、葡萄柚、柳橙、苜蓿、大豆、棉花、亞麻和咖啡等，且以在水稻性狀的改良上被應用最為廣泛。

目前已知的基因編輯作物產製品共有三項，分別是 2018 年 Cibus 公司推出 Falco™ 抗殺草劑油菜，根據公司官網資料指出，此產品有較佳的產量及品質表現，宣稱有較高的預期收益，而品種改良採用該公司自行開發的 Rapid trait development system, RTDSTM 基因編輯技術，雖然沒有完整的公開資料，但據信屬於 ODM 一種，其次，美國 Calyxt 公司則在 2019 年 2 月已經正式開始銷售由基因編輯大豆所壓製零反式脂肪且高油酸的油品，並且有更佳的儲架壽命及油炸穩定性作為產品訴求，由於該先驅商品直接對終端市場銷售，因此未來市場接受度將會影響後續的基因編輯作物及食品在美國的推出，最後，日本筑波大學新創 Sanatech Seed 公司利用 CRISPR/Cas 技術開發的高 GABA 含量番

茄，品種名稱爲”シシリアンルーージュハイギャバ(Sicilian Rogue High GABA)” (圖 3)，具有抑制血壓上升效果，已分別取得食品及農業使用許可，也在今 (2021) 年 3 月間宣布上市，預估在今夏開始進行種子販售，先期並免費提供 5,000 株種苗供一般民衆試種，也隨即被預約索取完畢。根據這樣的現象可以預期一旦農民及消費者願意接受此類基因編輯農產品，未來將會有更多的基因編輯作物進入市場。

四、結語

根據聯合國報告指出到 2050 年，全球人口將達到 90 億人，將對現行的糧食生產供應體系產生莫大的壓力以避免飢荒，此外，可耕地減少、水資源匱乏以及極端氣候事件影響，更是永續農業生產的重大阻礙，過往認為基改作物是解決人類糧食危機的選擇之一，基因編輯作物除了可以改良品質，也可用於增進作物對生物及非生物性逆境的耐受性以穩定生產，故仍建議應積極投入開發，並且在符合科學證據安全無虞的前提下，作為品種改良方法的選擇方式。



圖 3. 高 GABA 含量基因編輯小果番茄” Sicilian Rogue High GABA”
(資料來源：Sanatech Seed, <https://sanatech-seed.com/ja/210427/>)