# 運用 CRISPR/Cas 13 技術調控真核細胞的 RNA 世界

## The application of CRISPR/Cas 13 as a regulatory tool in the RNA world of eukaryotes

邱燕欣[1]、蘇士閔[2]、鍾文全[3]、林詩舜[4]

### 一、CRISPR/Cas 技術介紹與分類

CRISPR 唸作“crisper”，為英文字串取單字首字 Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat 之簡稱，CRISPR 中文翻譯為『叢集有規律間隔的短迴文重複序列』，而 Cas 則為 CRISPR 相關蛋白 (CRISPR-associated protein, Cas) 的縮寫。雖然中文唸起來極為拗口，但在生物技術領域中，CRISPR 儼然變為家喻戶曉的基因編輯利器，從近 5 年 PubMed 的發表文章數呈現指數性成長可見端倪（圖 1），光是 2018 年，就超過五千多篇在摘要或題目包含 CRISPR 或 Cas 9 的科學文章，預計 CRISPR 炙手可熱的現況，仍會持續發熱好幾年。

CRISPR 的作用機制起源於細菌或古菌對抗外來噬菌體（phage）核酸干擾（去氧核醣核酸 DNA 或核糖核酸 RNA），作為防禦機制（innate defense mechanisms）發展的後天性免疫系統（adaptive immunity）。當外來核酸侵入細菌細胞後，外來核酸的部分序列（spacer）會被保留並嵌入細菌基因體的 CRISPR 基因座（CRISPR locus）內，被高保留的重複性迴文序列（repeat）所間隔（圖 2），CRISPR 基因座啟動轉譯（transcription）作用後，成為串在一起的外來核酸部分序列與高保留的重複性迴文序列，組成 CRISPR RNA 前驅物（pre-crRNA），pre-crRNA 經由切割後，生合成成熟的 crRNA (repeat 加一個 spacer) 的 mature crRNA，且 repeat 具備迴文序列的特性，會摺疊成雙股構型，並且與 Cas 形

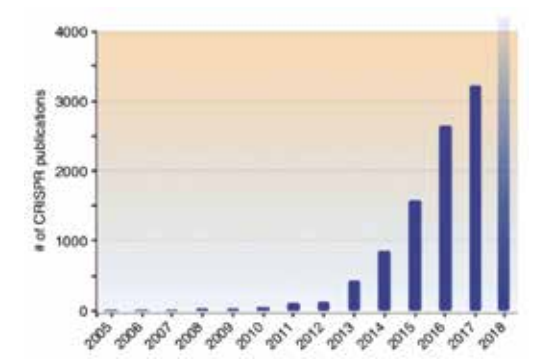


圖 1. 有關 CRISPR 或 Cas 9 的科學文章近年來的發表數量（Mazhar, A., 2018）

[1] 種苗改良繁殖場繁殖技術課 助理研究員
[2] 種苗改良繁殖場種苗經營課 助理研究員
[3] 種苗改良繁殖場 研究員兼副場長
[4] 國立臺灣大學生物科技所教授

成複合物（CRISPR/ Cas complex），後天性免疫系統藉由 spacer 對於外來核酸的相似度，引導 CRISPR/ Cas complex 鎖定下一波入侵的外來核酸，達成免疫保護的機制 ( 圖 2)。

而根據 2018 年 Mitchell R. O'Connell 的發表，以四大特性包括 (1) CRISPR/ Cas 的個體類型和亞型的特徵；(2) Cas 蛋白之間的序列相似性；(3) 系統發育 Cas 1（最高度保守的 Cas 蛋白）；(4) CRISPR/ Cas 基因座中的基因序列差別，將 CRISPR/ Cas 系統劃分為兩大不同的類別（圖 3）。而本篇要討論的 CRISPR/Cas 13a ( 原命名為 C2c2) 則屬於第二分類群中的第六型（class II type VI）。這與 CRISPR/Cas 9 的最大差異度為裂解標的物的不同，CRISPR/ Cas 9 的標的物為雙股 DNA，而 CRISPR/ Cas 13 的標的物則為 RNA，在基因體結構上具備 2 個可切割真核生物及原核生物核酸的核酸鍵結區 (higher eukaryotes and prokaryotes nucleotide binding domain, HEPN)，自 2016 年 6 月由美國麻省理工學院 Broad 實驗室的張峰（Feng Zhang）在 Science 發表 CRISPR/ Cas 13a 能 切割 菌 胞中特定的 RNA 序列，進而調節細胞內基因的表現，又掀起了一股熱潮，再為 CRISPR/ Cas 的應用版圖開拓新的疆土。

## 二、運用 CRISPR/Cas 13a 對抗植物 RNA 病毒

2018 年沙烏地阿拉伯的 Rashid Aman 團隊發表在 Genome Biology（IF: 13.214），運用 CRISPR/Cas 13a 策略，干擾蕪菁嵌紋病毒 (*Turnip mosaic virus*, TuMV) 致病病程，首先以農桿菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 轉殖系統，利用花椰菜嵌紋病毒之 35S 啟動子（*Cauliflower mosaic virus*, CaMV 35S promoter）載體，持續驅動 Cas13a 表現 (pCas13a)，並以菸草脆裂病毒 (*Tobacco rattle virus*, TRV) 系統於植物細胞轉錄 crRNA，4 個 crRNA 標的分別鎖定 *HC-Pro*、*CP*、*GFP1* 及 *GFP2* 等區間。利用帶有綠色螢光蛋白 (Green fluorescent

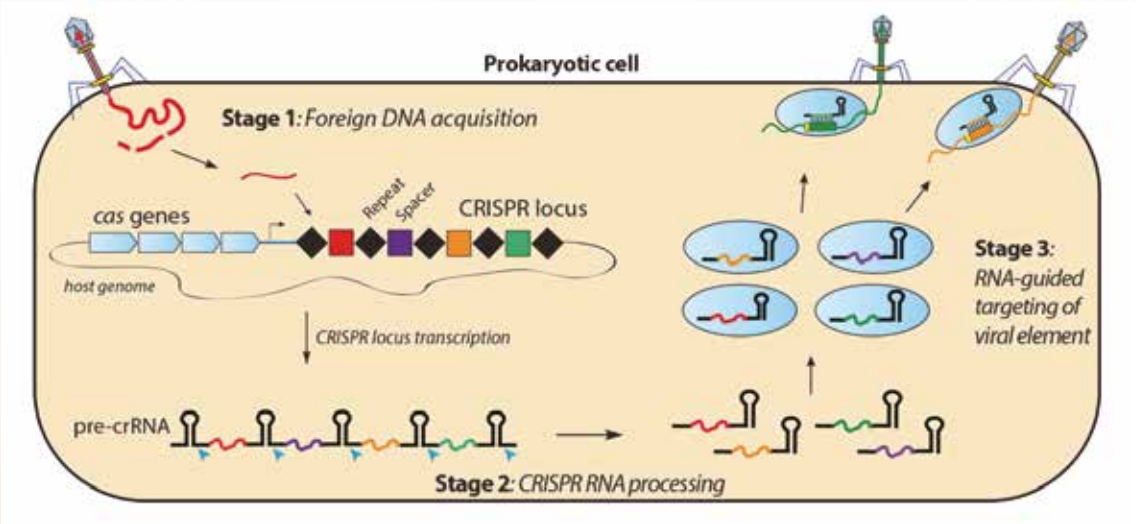


圖 2. 原核生物 CRISPR-Cas 的作用路徑示意圖
（圖片引用於加州大學柏克萊分校的珍妮佛 · 杜德納（Jennifer Anne Doudna）網頁 http://doudnalab.org/research_areas/crispr-systems/）

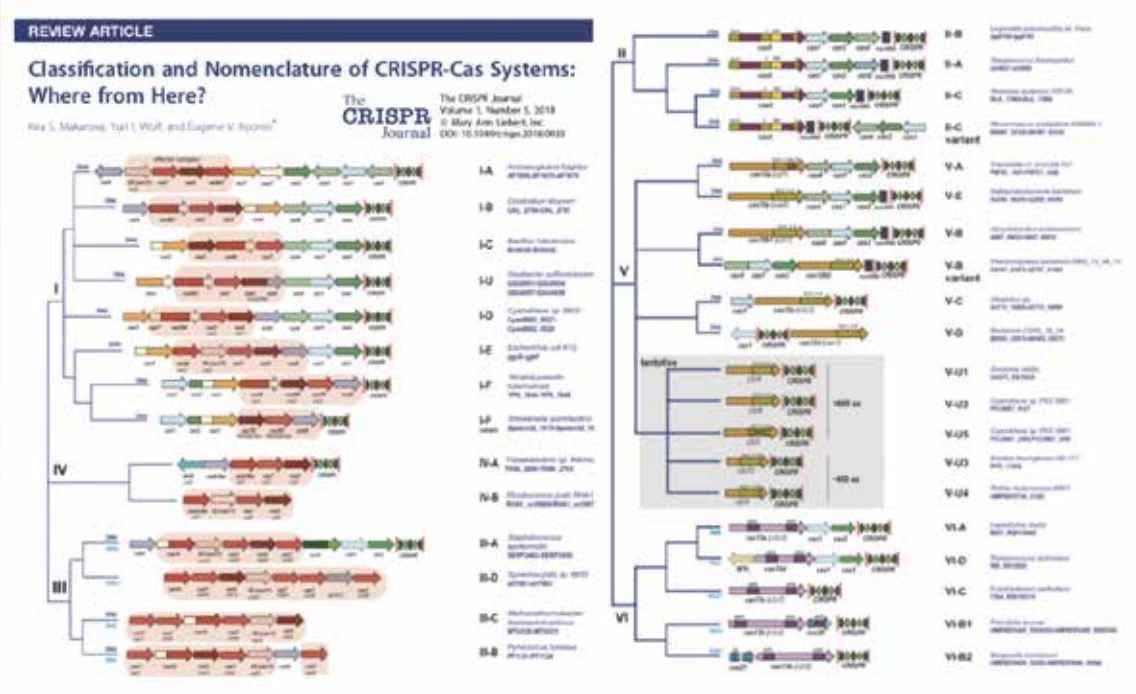


圖 3. CRISPR/ Cas 系統分類（Mitchell R. O'Connell, 2018）

protein, GFP) 的 TuMV 感染性選殖株（TuMV-GFP infectious clone）感染後，觀察 GFP 表現量與分佈，試驗結果顯示不同的 cr RNA 標的序列影響 GFP 的表現，其中 cr RNA 以 *HC-Pro* 與 *GFP2* 作為標的 GFP 表現量減少 50% 以上，顯示 CRISPR/ Cas 13a 的確影響 TuMV-GFP 的存在。接下來他們模擬自然界串連多個 crRNA 的方式，將 3 個 crRNAs 設計串聯在 CRISPR arrays 內，轉譯為長鍊的 crRNA 前驅物（pre-crRNA），試驗結果顯示，北方轉漬法證實在植物體內 pCas13a 可以將長片段 pre-crRNA 切割成為短片段成熟的 crRNA，以 GFP 表現評估導入 poly-crRNA 可以有效減少 GFP 表現量 50%，並且影響 TuMV-GFP 於植株的分佈。

2019 年中國的 Xiaohui Zhan 團隊則在 Plant Biotechnology Journal（IF: 6.305）發表以 CRISPR/Cas 13a 策略產生抗馬鈴薯 Y 病毒（*Potato Virus Y*, PVY）的馬鈴薯，該團隊僅構築單一質體表現 Cas 13a 蛋白及 sgRNA (small guide RNA)。載體構築策略為使用 *UBQ10* (Arabidopsis ubiquitin-10) 啟動子持續表現 Cas 13a，由 *AtU6* 啟動子啟動轉譯 sgRNA，並在 sgRNA 序列的 3' 端加掛複腺苷酸尾部（poly A tail），使得此段 non-coding RNA 可自細胞核內送到細胞質，順利與 Cas 13a 形成複合物，達到干擾 PVY 抗病毒的目的。由於 PVY 的田間病毒株基因組變異性及重組性高，因此該團隊分析 $PVY^{O}$、$PVY^{N}$ 以及複合型的 $PVY^{N:O}$ 病毒株的基因體，找到 14 區具高度保留的區間，並從中選出 4 個分別在 PVY 基因組的

*P3*、*CI*、*NIb* 及 *CP* 區間設計 sgRNA，轉殖後的植株以 $PVY^0$ 進行接種並觀察病徵表現，以 ELISA 及 qRT-PCR 檢視病毒表現的差異量。試驗結果顯示轉殖的馬鈴薯在接種 25 天後無病徵顯現， 且病毒表現量大幅下降與對照組呈現顯著差異。而且此轉殖馬鈴薯抗性為高度 PVY 專一性，而對馬鈴薯其他的不同類群的病毒如馬鈴薯 A 病毒（potato virus A, PVA）與馬鈴薯 S 病毒（potato virus S, PVS）無抗病性。

## 三、結論

CRISPR/Cas 13 的彈性在於編輯對象為 RNA，在不影響核心 DNA 的層次上，進行轉錄機制下的基因表現調控，運用於 RNA 病毒檢定、以 RNA 作為遺傳物質的病毒與類病毒 (viroid) 基因編輯、調節選擇性剪接 (alternative splicing, AS) 、利用 Cas 13 具備特定鑲嵌特定 RNA 序列特性，追蹤特定 RNA 在活細胞的移動、或利用 Cas 13 蛋白質體外結合試驗（Pull-down assay），找到與 Cas 13 結合核心序列的特性，以及作為 RNA 檢定的材料。

CRISPR/Cas 被認定為基因編譯的革命性發現，功能就如同人類對於歷史的記載，將過去的事件做有系統的紀錄及分類，人類的歷史可提供今人理解過去，作為未來行事的參考依據，而 CRISPR/Cas 則提供細菌自三十多億年來面對其他物種威脅，在存亡之秋的保命秘笈。因為 CRISPR/Cas 的操作性佳、大幅縮短標的基因的操作，加速了生物基因編輯的效率，甚至運用於動植物基因疾病 (genetic disease) 上的基因治療 (gene therapy)，而美國時代雜誌更在 2019 年 4 月 17 日公布 2019 年全球百大最具影響力人物榜中，入圍的中國科學家賀建奎就是在 2018 在自傳媒體宣布成功創造全球首例基因編輯嬰兒，引發倫理議題之輿論大浪，相較於動物及人體醫學試驗上，運用 CRISPR/Cas 在植物基因編輯的敏感性相較較低，但礙於國內相關政策亦仍在擬定中或法規仍尚未完全，試驗多為開發期程前中段的基礎研究，在合理的試驗倫理管控下，好好師法這存活三十多億的微生物面對地球的環境轉變與氣候變遷，在國際植物生物科技研發持續保有臺灣植物生技的舞台。