

CRISPR/Cas9 基因編輯技術平台之發展及作物育種的應用

游舜期¹ 王怡雯¹ 林思妤¹ 王昭月¹ 林大鈞^{2,*}

摘要

游舜期、王怡雯、林思妤、王昭月、林大鈞。2019。CRISPR/Cas9 基因編輯技術平台之發展及作物育種的應用。台灣農業研究 68(4):274–292。

全球暖化導致極端氣候，造成全球性作物減產及糧食危機，因應氣候變遷之逆境抗性品種的快速選育來確保糧食安全，已是刻不容緩的研究議題。現今作物品種改良，是藉由回交或雜交將帶有逆境抗性基因導入現行優良品種，但因遠緣雜交育種之障礙及種原遺傳多樣性的喪失，而限制育種的廣度及進程。cluster regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein 9 (CRISPR/Cas9) 基因編輯技術系統自確立可應用在真核生物以來，受到學術界、研發單位、產業界與政府相關單位的重視。此技術相較於之前的基因編輯方法，不僅操作簡化且所需經費亦相對便宜，更重要的是能精準且有效編輯目標基因，使其不論在動物、植物或者人類疾病治療等皆有廣泛性的應用。在植物育種方面，由於 CRISPR/Cas9 系統能準確編輯目標基因，對於植物性狀變異的掌控或者功能性基因的探索上，無疑可跳脫現有技術限制，而成為新興的育種工具。爰此，本篇主要在回顧整理基因編輯技術歷程、CRISPR/Cas9 系統的原理發展與應用，冀以提供國內學者或分子育種專家參考。

關鍵詞：基因編輯、CRISPR/Cas9、嚮導 RNA、作物育種。

前言

對育種家而言，具有廣泛歧異度之植物種原，於作物育種改良是極為重要。不同植物性狀及遺傳變異可增加育種廣度與研究深度，而在自然界中，自然突變即是增加植物遺傳變的方式之一，也因此創造出多元的植物樣態。在人為創造種原變異上，主要透過兩種方法，一為利用物理或化學法，即利用 X 射線、 γ 射線、誘變劑 [如 ethyl methanesulfonate (EMS)、 NaN_3 、5-bromouracil (5-BU) 等] 等產生染色體變異，另一則利用轉殖 T-DNA 嵌入植物 DNA，造成基因之干擾性突變 (disruption mutation) 或基因重組。然而，無論自然突變或人為誘變，產生的基因變異皆是隨機產生，無法精準針對目標基因。因此在基因的探索、驗證及應用上，無法有效分析基因功

能。為能精準對單點或多點位置進行核苷酸改造，基因編輯工具因應而生。在 cluster regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein 9 (CRISPR/Cas9) 技術發展之前，主要以 zinc-finger nuclease (ZFN) 及 transcription activator-like effector nuclease (TALEN) 作為基因編輯工具，但因 CRISPR/Cas9 技術在應用上，具有價格便宜、操作簡便及精準等優勢，使 CRISPR/Cas9 系統成為目前基因編輯的主流，後續也引發學術及產業競相投入此技術的改良及應用。未來無論是在功能性基因的探討、新特徵變異的產生，甚至育種改良，該技術將是不可或缺的新型核心工具之一。本文將介紹各基因編輯技術的發展歷程，並比較各技術的優劣，再切入 CRISPR/Cas9 技術的發展歷程，探討 CRISPR/Cas9 系統如何從原核生物系統

投稿日期：2018 年 10 月 31 日；接受日期：2019 年 5 月 19 日。

* 通訊作者：dagin@tari.gov.tw

¹ 農委會農業試驗所生物技術組助理研究員。台灣 台中市。

² 農委會農業試驗所生物技術組聘用副研究員。台灣 台中市。

被發現，到最後實際在作物育種上的應用與發展。

基因編輯工具現況與優劣

基因編輯工具目前可概略區分為三大類，分別為 ZFN、TALEN 及 CRISPR/Cas 系統 (表 1)。ZFN 屬於一種人造融合蛋白質 (fusing protein)，主要由兩個蛋白質結構域 (domain) 所組成，一為鋅指 (zinc finger; ZF) 重覆結構域，與目標 DNA 的結合與辨識有關；另一為裁切核苷酸之核酸酶 (nuclease) 結構域。鋅指重覆結構域最早於 1985 年爪蟾卵母細胞之轉錄因子 IIIA (transcription factor IIIA) 中被發現 (Miller *et al.* 1985)，其模組 (motif) 約由 30 個胺基酸所組成，具有兩對 Cys₂His₂ 結合鋅原子形成 $\beta\beta\alpha$ 結構，每個模組可辨識約 3–4 bp DNA 序列。一般而言，ZFN 蛋白質約由 3–6 個鋅指所組成，可辨識 9–18 bp 的目標 DNA。ZFN 與目標序列結合後，需要依靠核酸酶裁剪切核苷酸。此步驟主要由 *FokI* 內限制酶結構域來執行。*FokI* 內限制酶屬第 IIS 型限制酶，其蛋白質 C 端具有切割 DNA 之功能，

當與目標序列結合後，會活化切割結構域，進行 DNA 裁切。利用基因工程技術融合鋅指結構域與 *FokI* 結構域形成之 ZFN 融合蛋白質，不同組合之鋅指會專一性地辨識特定 DNA 序列，與 DNA 結合後，活化態的二聚體 ZFN 即可進行雙股 DNA 切割作用。

TALEN 與 ZFN 在結構上類似，皆由兩個結構域所組成，分別為與 DNA 結合的 TAL 效應蛋白質 (TALE) 及裁切 DNA 的核酸酶結構域。TAL 效應蛋白質屬於一種轉錄因子蛋白質，最早發現於黃單胞桿菌屬 (*Xanthomonas*)，其可透過第三型分泌系統 (type III secretion pathway) 進入植物細胞，可作為毒力因子 (virulence factor) 來影響宿主感病基因，造成病害現象；或可作為非毒力因子 (avirulence factor)，活化宿主的抗病基因 (Boch & Bonas 2010; Bogdanove *et al.* 2010)。TAL 效應蛋白質 N 端與第三型分泌系統有關，C 端則是細胞核定位信號 (nuclear localization signal; NLS) 及酸性激活域 (acidic activation domain; AAD)。而目標 DNA 辨識區則為中心蛋白質結構域，由 33–34 個胺基酸可變數目縱排重複序列 (variable number of tandem repeat; VNTR) 所組

表 1. 基因編輯技術之比較。

Table 1. Comparison of three genome editing technologies².

Property	ZFN	TALEN	CRISPR/Cas9
Domain	ZF domain + nuclease domain (MW:~ 45 kDa × 2)	TALE domain + <i>FokI</i> nuclease domain	gRNA + Cas9 protein (MW:~ 160 kDa)
Binding domain	ZF	TALE	gRNA
Target	DNA	DNA	DNA/RNA
Multiple editing	Difficult	Difficult	Easy
Time of first application in genetic engineering	1996	2008	2011
Discovered from	<i>Xenopus oocyte</i>	<i>Xanthomonas bacteria</i>	<i>Streptococcus thermophiles</i>
PAM	-	-	+
Design feasibility	Difficult	Difficult	Easy
Specificity	Low	High	High
Frequency of off-target	High	Low	Low
Efficiency	Variable	Moderate	High
Cost	High	High	Low

² ZFN: zinc-finger nuclease; TALEN: transcription activator-like effector nuclease; CRISPR/Cas9: cluster regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein 9; ZF: zinc finger; MW: molecular weight; TALE: transcription activator-like effector; PAM: protospacer adjacent motif.

成，多數 TAL 重複序列單元幾乎完全相同，結構上形成兩個螺旋束 (helix)。其間的連結環 (loop) 中，位於第 12 及 13 個胺基酸殘基，具有高度變異性，而這兩個位置被稱為重複可變雙殘基 (repeat variable diresidue; RVD)，亦是與 DNA 鹼基發生交互作用的位置。目前約有 20 多種 RVDs 組合被發現，而 HD、NG、NN 及 NI [分別辨識 DNA 鹼基 C、T、G (或 A) 及 A] 四種雙胺基酸為最常見組合，另有較為寬鬆專一性的 NS 及 N* 與較為嚴格專一性的 NH 及 NK (兩者皆辨識鹼基 G) (Doyle *et al.* 2013)。TAL 效應蛋白質目前已有各種客製化模式，可有效針對目標基因序列進行重組表現，進而形成目標基因表現的活化或者抑制 (Mahfouz *et al.* 2012)。TAL 效應蛋白在基因編輯應用上，是藉由重組其與核酸酶形成 TALEN 蛋白質，由 TALE 結構域負責辨認目標 DNA 序列，核酸酶催化區 (例如 *FokI*) 則進行 DNA 斷裂。過程與 ZFN 類似，*FokI* 核酸酶在 TALEN 同樣需要形成二聚體，方能在目標 DNA 作用，故需要在 DNA 間隔約 15–20 bp 且相反方向各設計一個 TALEN，才能造成 DNA 雙股斷裂 (Christian *et al.* 2010; Voytas & Gao 2014)。

CRISPR/Cas 系統概略可歸類成 6 個類型。不同類型的編輯目標可為 DNA 或 RNA (Mohanraju *et al.* 2016; Koonin *et al.* 2017)。相較於 ZFN 和 TALEN 僅能編輯 DNA 而言，此系統較有應用彈性。CRISPR/Cas9 是屬於其中第 II 類型的系統，也是目前應用最廣的類型。其主要由嚮導 RNA (guide RNA; gRNA) 與 Cas9 蛋白質形成複合體，並藉由 gRNA 辨識目標序列後，再由 Cas9 的核酸酶斷裂目標雙股 DNA。與 ZFN 和 TALEN 最大不同之處，CRISPR/Cas9 系統並非以蛋白質結構域作為辨別目標序列的工具。因蛋白質結構域辨識目標序列需考慮立體結構與核苷酸間的親和力，在設計及應用較為複雜。同時 ZFN 和 TALEN 系統要形成雙股 DNA 斷裂，需要設計可辨識目標序列的正股與反股兩個結構域，相較 CRISPR/Cas9 的 gRNA 僅需設計 20 個核苷酸，前二者之構築表現載體所需費用則較為昂貴 (表 1)。

CRISPR/Cas 系統起源於原核生物後天性免疫系統

CRISPR/Cas 系統中文全名為常間回文重複序列叢集/Cas 蛋白質系統，其系統包括兩個部分：CRISPR 及 Cas 蛋白質。日本科學家 Ishino *et al.* (1987) 在大腸桿菌 (*Escherichia coli*) 之 *iap* (isozyme conversion of alkaline phosphatase) 基因研究中發現，其基因終止密碼子尾端，有 5 個特定的重複序列，與 repetitive extragenic palindromic (REP) 序列具有高度保留性，而重複序列間由變異性較大的 32 個核苷酸所區隔。後人的研究及回溯，才逐漸確立 *iap* 基因尾端特定的重複序列之功能性，並將之命名為 CRISPR 序列 (Jansen *et al.* 2002; Ishino *et al.* 2018)。在細菌基因組裡 CRISPR 序列由 21–40 bp 之重複序列以及 25–40 bp 變異序列 (variable sequence，或稱區隔序列，spacer) 區隔所組成 (Jansen *et al.* 2002; Tang *et al.* 2002)。之後的研究發現，約 50% 細菌及 87% 古生菌皆含有類似重複序列。在 2005 年，三個研究團隊同時獨自提出，CRISPR 可能是細菌對抗嗜菌體之重要序列，主要原因是 CRISPR 之變異序列片段經過序列分析後，發現與外源嗜菌體的編碼 (coding) 和非編碼 (non-coding) DNA 序列相似。顯示這些變異序列極有可能是細菌受到入侵者感染後，將外源 DNA 片段嵌入至宿主中，從而演變成記憶性免疫系統 (Bolotin *et al.* 2005; Mojica *et al.* 2005; Pourcel *et al.* 2005)。

目前已知真正能確立 CRISPR/Cas 在細菌之免疫系統角色，是由 Barrangou *et al.* (2007) 在嗜熱鏈球菌 (*Streptococcus thermophiles*) 所證實。Barrangou 發現乳製品生產商常用來發酵的嗜熱鏈球菌具有 CRISPR 序列，且能抵抗病毒侵襲，進而能穩定生產發酵的乳製品 (Barrangou & Horvath 2012; Barrangou *et al.* 2013)。而嗜熱鏈球菌屬第 II 類型 CRISPR/Cas 系統中的 CRISPR 基因座由 Cas 蛋白質基因及 CRISPR 序列所組成，分別轉譯 Cas 蛋白質及轉錄 crRNA 前驅物 (pre-CRISPR RNA) 與 trans-activating crRNA (tracrRNA)。Cas 蛋白質先與 tracrRNA 結合後，活化 Cas 蛋白質

核酸酶活性，並將 crRNA 前驅物適當裁剪為成熟的 crRNA，接著與 tracrRNA 及 Cas 蛋白質形成具有功能的 crRNA-tracrRNA-Cas 複合體。當嗜菌體侵入後，不同 crRNA 會辨識特定種類嗜菌體，之後活化 Cas 蛋白質本身核酸酶並造成嗜菌體雙股 DNA 斷裂 (圖 1)，斷裂的 DNA 會呈現不穩定狀態而裂解，而達到防禦嗜菌體侵入效果 (Brouns *et al.* 2008; Garneau *et al.* 2010; Gasiunas *et al.* 2012; Jinek *et al.* 2012)。

CRISPR/Cas 系統分類

CRISPR/Cas 系統為存於多數細菌和古生菌中之後天免疫系統，功能為抵抗外來的嗜菌

體侵擾。為了因應多變的入侵者系統，細菌之 CRISPR/Cas 系統針對嗜菌體感染相關之可動遺傳因子 (mobile genetic elements; MGE)，演化出多元且不同功能的樣態，以抵禦侵入 (Koonin & Makarova 2017)。依據功能、基因座組成及序列相似度，概略可歸類為 2 個類別 (class)，再細分為 6 個類型 (type) 及數個次類型 (subtype) (表 2)。2 個類別是以單一或多個效應蛋白質模組 (effector) 完成 CRISPR/Cas 功能來進行區分 (Makarova *et al.* 2015; Mohanraju *et al.* 2016; Koonin *et al.* 2017)。在第 1 類中，需要不同及多種效應蛋白質才能完成 CRISPR/Cas 功能，例如在 pre-crRNA 處理過程，區隔序列載入及目標序列裁切之各個

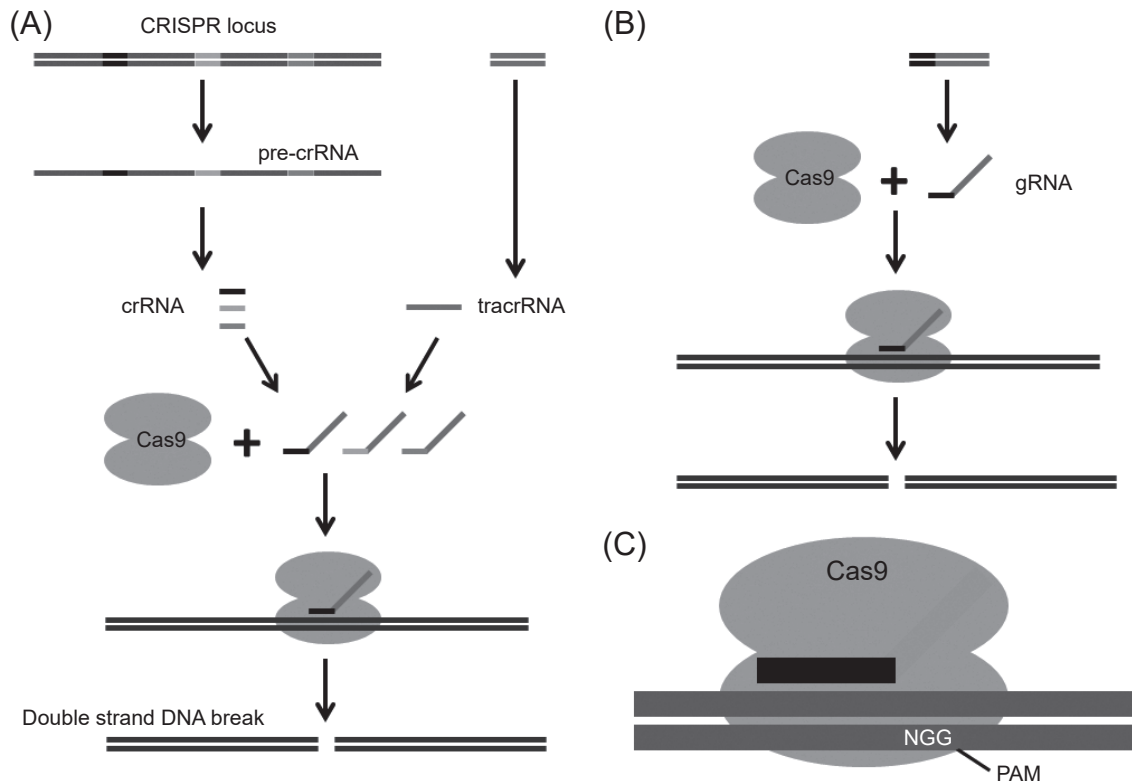


圖 1. CRISPR/Cas9 系統作用機制。(A) 細菌利用 crRNA、tracrRNA 與 Cas9 造成目標 DNA 雙股斷裂；(B) 簡化 tracrRNA 和 crRNA 結構後形成 gRNA，形成現行 CRISPR/Cas9 系統作用機制；(C) PAM 序列與 Cas9-gRNA-DNA 複合體之示意圖。

Fig. 1. Overview of the cluster regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein 9 (CRISPR/Cas9) mechanism. (A) Cleavage mechanism of target DNA by crRNA-tracrRNA-Cas9; (B) cleavage mechanism of target DNA by engineered CRISPR/Cas9 system; and (C) schematic representation of PAM and Cas9-gRNA-DNA ternary complex.

表 2. CRISPR/Cas 系統之分類。

Table 2. Functional classification of the cluster regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein 9 (CRISPR/Cas9) systems.

Class	Type	Pre-crRNA processing	Effector	Spacer insertion	Target
1	I	Cas6	Cas7 Cas5 large subunit, small subunit	Cas1 and Cas2	
	III	Cas6	Cas7 Cas5 large subunit, small subunit	Cas1 and Cas2	DNA/RNA
	IV	unknown	Cas7 Cas5 large subunit, small subunit	Cas1 and Cas2	
2	II	RNase III	Cas9	Cas1 and Cas2	DNA
	V	Cpf1	Cpf1	Cas1 and Cas2	DNA
	VI	C2c2 (Cas13a)	C2c2 (Cas13a)	Cas1 and Cas2	RNA

階段過程，需要由各個核酸酶進行處理。在第 2 類中，則由同一個蛋白質即可完成所有工作 (Koonin *et al.* 2017)。第 1 類包含第 I、III 及 IV 型，常見於古生菌，但少見於細菌系統，其 CRISPR/Cas 呈現相似的重複序列相關未知蛋白質 (repeat-associated mysterious proteins; RAMP) 骨架，主要由 Cas7、Cas5、大和小次單元 (subunit) 及 crRNA 所組成之效應蛋白質複合體 (Makarova *et al.* 2013; Makarova *et al.* 2015)。Cas5 用來結合 5' 端 crRNA 與大次單元 (第 I 型大次單元為 Cas8，第 III 型則為 Cas10)，小次單元則用來連結 Cas7 及 crRNA 骨幹 (Koonin *et al.* 2017)。第 I 型最大特徵為 Cas3 蛋白質，其在 N 端具有磷酸水解酶 (phosphohydrolase) 及核酸酶 (nuclease) 結構域，C 端則是具有螺旋酶 (helicase) 結構域。研究結果發現，其功能為協助運送 Cascade-crRNA 複合體 (CRISPR-associated complex for antiviral defence-crRNA) 至目標外源 DNA，進行水解防禦作用 (Sinkunas *et al.* 2011; Plagens *et al.* 2014)。第 III 型特徵為重複序列相關未知蛋白質骨架的大次單元為 Cas10，並再依利用 Csm 或 Cmr 蛋白質進行 crRNA 前驅物的加工，將第 III 型分別區分為第 III-A 和 III-B 次類型 (Osawa *et al.* 2015)。第 IV 型目前研究較少，已知其具有尚未鑑定的 *csf1* 基因，可轉錄出重複序列相關未知蛋白質骨架的大次單元

Cas8 蛋白質 (Makarova *et al.* 2015)。RAMP 骨架中，效應蛋白質複合體負責連結 crRNA 和目標 DNA，並進行標的物之裁剪。另一核心蛋白質 (core protein) 為 Cas6，其具有核糖核酸內切酶 (endoribonuclease) 功能，可加工 crRNA 前趨物為成熟的 crRNA，進而使效應蛋白質複合體能進行後續目標 DNA 之辨識和裁剪 (Brouns *et al.* 2008; Carte *et al.* 2008)。

相較於第 1 類，第 2 類的效應蛋白質模組較為簡單且一致，由一個具有多個結構域的蛋白質組成，分為第 II、V 及 VI 型。第 II 型的效應蛋白質為 Cas9，是目前所有類型中最為廣泛應用的核酸酶，屬 RNA 依賴型核酸內切酶，具有 HNH 和 RuvC-like 兩個核酸酶結構域 (Mali *et al.* 2013a; Shmakov *et al.* 2017)。第 V 類型的效應蛋白質是與 Cas9 功能相似的 Cpf1，只具一個 RuvC-like 核酸酶結構域 (Makarova & Koonin 2015; Zetsche *et al.* 2015)，裁切 DNA 後形成 4 個核苷酸外伸 (overhang) 的黏性末端 (sticky end)，而不像 Cas9 會造成 DNA 雙股斷裂形成平滑末端 (blunt end)，且其 protospacer adjacent motif (PAM) 序列為 5'-TTTN-3' (Zetsche *et al.* 2015)，也不需要依靠 tracrRNA 即可與目標序列結合。第 VI 型的效應蛋白質為 C2c2 (class2; candidate 2) 或稱 Cas13a。C2c2 具有兩個高度保留性的核苷酸結合結構域，稱為 higher eukaryotes and pro-

karyotes nucleotide-binding (HEPN) 結構域，其主要功能為核糖核酸酶 (RNase)，使 C2c2 可裁切目標單股 RNA (Abudayyeh *et al.* 2016; Aman *et al.* 2018)。此外，第 1 類的第 III 型亦有此相同結構域，可以提供另一種新型工具應用於目前 RNA 調控的基因編輯。除了上述 Cas 蛋白質分類外，另外值得一提的為 Cas1 和 Cas2 核心蛋白質，幾乎所有 CRISPR/Cas 系統中皆包括這兩個蛋白質。外源 DNA 片段序列之所以能嵌入宿主 DNA，形成區隔序列，主要就是倚靠 Cas1 及 Cas2 蛋白質 (Nuñez *et al.* 2014)。前述 CRISPR 序列由重複序列及區隔序列組成，而區隔序列來自於入侵者的外源 DNA 片段，可轉錄為 crRNA，再由 Cas 蛋白質 (第 1 類為 Cas6，第 2 類如表 2) 加工為成熟 crRNA，進而形成記憶性免疫系統 (Carte *et al.* 2008; Bondy-Denomy *et al.* 2013)。

PAM 序列與 Cas9 蛋白質

PAM 序列的發現，使 CRISPR/Cas 系統之作用機制更加明確。Deveau *et al.* (2008) 發現嗜菌體基因組 PAM 序列突變後，可繞過 CRISPR/Cas 免疫系統的干擾，進而感染細菌。目前已知 CRISPR/Cas 系統需要與目標 DNA 互補的 crRNA 及目標 DNA 附近出現特定 PAM 序列，才能讓 CRISPR/Cas 系統正確尋找到標的物。目前在基因編輯技術使用最廣泛的 PAM 序列，是針對化膿性鏈球菌 Cas9 蛋白質 (*Streptococcus pyogenes* Cas9; SpCas9) 的 5'-NGG-3' 序列，N 是指任一 DNA 核苷酸種類，G 則是鳥嘌呤 (圖 1)。在自然狀態下，直系同源 (orthologues) Cas9 蛋白質可辨識多樣態的 PAM 序列，經由基因工程改造 Cas9 蛋白質殘基 (residue)，結果證實可改變 Cas9 對 PAM 的專一性 (Kleinstiver *et al.* 2015; Hirano *et al.* 2016; Hu *et al.* 2018; Nishimasu *et al.* 2018)。此外，在分子層面研究報告指出，Cas9-crRNA 複合體會先與目標 DNA 的 PAM 序列結合，遇到不正確 PAM 序列會快速地與 DNA 分離。當有正確的 PAM 序列被辨識到，且鄰近的目標 DNA 序列與 crRNA 呈現互補狀況時，Cas9 會開始從 PAM 位置造成 DNA

鹼基對在結構上不穩定，使 crRNA 更容易與目標 DNA 結合形成 RNA-DNA 雜合狀態，最後驅動雙股 DNA 進行解旋 (unwind) 至目標位置末端 (Sternberg *et al.* 2014)。解旋後的 DNA，則由 Cas9 核酸酶開始進行雙股 DNA 斷裂過程。

Cas9 蛋白質在結構上可區分為 6 個結構域，分別為 REC I、REC II、Bridge Helix、PAM Interacting、HNH 和 RuvC 結構域 (圖 2) (Jinek *et al.* 2014; Nishimasu *et al.* 2014)。REC I 在 Cas9 蛋白質中是最大的結構域，負責與 crRNA 或 gRNA 結合，造成蛋白質結構改變，進而活化 Cas9 活性。REC II 結構域功能目前仍不明確。Bridge Helix 結構域負責與目標 DNA 進行連接。PAM Interacting 結構域用來辨識 PAM 區域及目標 DNA 的結合，而核酸酶活性則由 Cas9 的 HNH 和 RuvC 結構域所負責。位於 Cas9 蛋白質 N 端 HNH 結構域的最大特徵，為具有一個保守的 $\beta\beta\alpha$ 摺疊結構及 3 個殘基 (在 SpCas9 為 Asp839、His840 和 Asn863) 組成的催化區。而 RuvC 結構域則位於 Cas9 蛋白質中間區域，具有類似 RNase H 的摺疊結構，並包括 4 個殘基 (在 SpCas9 為 Asp10、Glu762、His983 和 Asp986) 組成的活化區 (Jinek *et al.* 2014; Nishimasu *et al.* 2014; Chen & Doudna 2017)。當 Cas9-crRNA 複合體活化後，如前述，會先確認目標 DNA 的 PAM 序列是否正確，當目標 DNA 與 crRNA 呈現正確互補後，進而解旋雙股 DNA，之後 HNH 和 RuvC 核酸酶結構域則會開始在 PAM 序列上游第 3 到第 4 個核苷酸間進行斷裂作用 (Gasiunas *et al.* 2012; Jinek *et al.* 2012; Nishimasu *et al.* 2014)。

DNA 雙股斷裂及細胞修補機制

自然狀態下，細胞因環境變異形成基因組 DNA 斷裂或損傷時，為延續本身的生存，會自動進行修補機制，以免造成有害突變甚至死亡。所以 DNA 的檢查及修復，在細胞內需經常運作，並快速更正錯誤的 DNA 序列與結構。在原核生物及真核生物中，DNA 雙股斷裂可藉由兩種修補方式進行修補，即同源性重

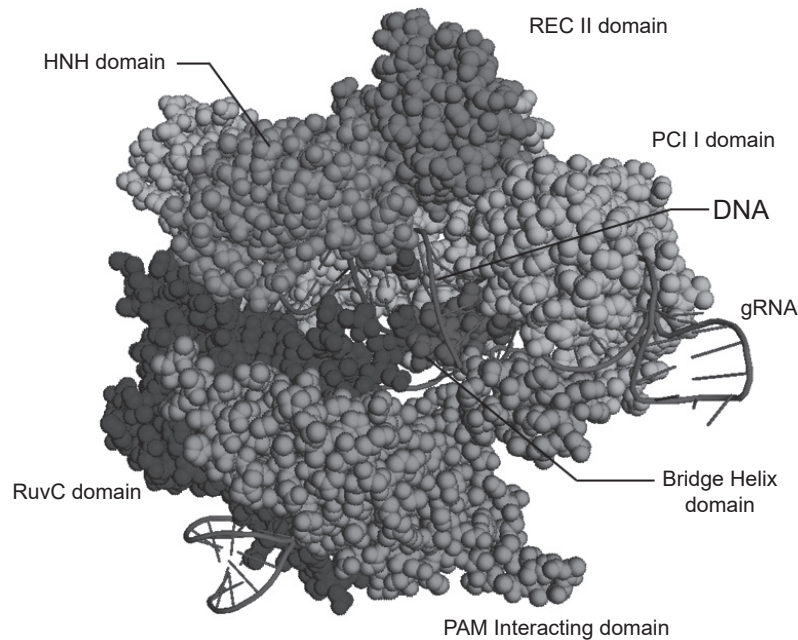


圖 2. Cas9-gRNA-DNA 三元複合體之結構 (蛋白質結構繪製來源於 PDB ID 4oo8)。

Fig. 2. Structure of Cas9-gRNA-DNA ternary complex (Source: PDB ID 4oo8).

組 (homologous recombination; HR 或 homology-directed repair; HDR) 及非同源性末端接合 (non-homologous end joining; NHEJ) 修補機制。兩者最大差別，在於修補時是否需要同源 DNA 當作模板及修復的準確性 (Puchta 2005)。同源性重組修補於雙股 DNA 斷裂修補機制中是扮演次要角色，主要發生在植物細胞週期 (cell cycle) 的 S 及 G₂ 期 (Puchta 2005; Schmidt *et al.* 2019)。依據不同的同源性重組修補路徑，可再區分為單股貼合 (single-strand annealing; SSA)、合成依賴股貼合 (synthesis-dependent strand annealing; SDSA)、雙股斷裂修補 (double-strand break repair; DSBR) 與溶解 (dissolution) 之修補反應。在同源性重組修補機制中，多數情況下是以單股貼合和合成依賴股貼合之修補方式進行，次之為於減數分裂時期進行之雙股斷裂修補和溶解修補 (Osman *et al.* 2011; Spampinato 2017; Schmidt *et al.* 2019)。

而在植物體細胞中，最主要使用之 DNA 雙股斷裂修補機制是非同源性末端接合路徑，

其與同源性重組修補機制不同處在於可確保在無同源 DNA 序列配合下，即可快速進行修補以避免嚴重的 DNA 損傷，造成計畫性細胞死亡 (programmed cell death) (Roy 2014)。非同源性末端接合修補機制，依修補路徑可再區分為典型非同源性末端接合 (canonical/classical-NHEJ; c-NHEJ) 與替代型非同源性末端接合 (alternative-NHEJ; a-NHEJ) (Decottignies 2013; Waters *et al.* 2014; Sfeir & Symington 2015)。典型非同源性末端接合之 DNA 修補機制，主要出現在 G₁ 和 G₂ 之細胞時期，當出現雙股 DNA 斷裂時會藉由以下路徑進行修補，首先由 KU70/KU80 異二聚體蛋白質辨識及結合雙股 DNA 斷裂處，形成 Ku-DNA 複合體，以避免更嚴重的核苷酸損失 (Mimitou & Symington 2010; Karanam *et al.* 2012)。之後，經過一連串之蛋白質激活、磷酸化及 DNA 結構上改變，最終藉由 DNA 連接作用 (ligation) 將斷裂之雙股 DNA 進行黏合 (Manova & Gruszka 2015; Spampinato 2017)。此修補機制可能會產生插入或缺失等突變，而最佳狀況是無錯

誤的修補結果。替代型非同源性末端接合又可稱為備用非同源性末端接合 (backup-NHEJ; b-NHEJ) 或微同源介導的末端接合 (microhomology-mediated end joining; MMEJ)，無需依賴 KU70/KU80 異二聚體蛋白質即可進行修補機制，常發生於細胞週期之 S 期 (Truong *et al.* 2013)。替代型非同源性末端接合是近年來才發現的修補機制，出現雙股 DNA 斷裂時，由 poly ADP-ribose polymerase (PARP) 蛋白質取代 Ku 蛋白質的功能與斷裂 DNA 結合，並觸發 MRE11-RAD50-NBS1 (MRN) 複合體進行 DNA 末端切除，之後進行微同源區域貼合 (annealing of a microhomology region)、異源區段移除、填充合成及 DNA 連接作用。由於微同源介導的末端接合修補會將異源區段移除後，再進行 DNA 填充合成與連接，常造成序列缺失之錯誤 (Manova & Gruszka 2015; Spampinato 2017; Schmidt *et al.* 2019)。

CRISPR/Cas9 在真核生物應用之奠立

在化膿性鏈球菌抵禦系統中，需轉錄及轉譯出 tracrRNA、crRNA 和 Cas9 蛋白質形成 CRISPR/Cas9 複合體，造成外源 DNA 斷裂來達到防禦效果。相關的研究被美國 Jennifer Doudna 和瑞典 Emmanuelle Charpentier 兩個團隊共同在 2012 年發表，並指出 tracrRNA 和

crRNA 可藉由連結環 (linker loop) 被連結在一起成為 sgRNA (全名為 single guide RNA，單一嚮導 RNA，或稱 gRNA)，且仍具有 tracrRNA 和 crRNA 兩者的功能。這個發現簡化 CRISPR/Cas9 基因編輯工具，並更容易使用 (Jinek *et al.* 2012)。真正能確立 CRISPR/Cas9 編輯系統可應用在真核生物，則是由美國 3 個團隊分別在 2013 年，同時發表可應用在人類細胞實驗 (Cong *et al.* 2013; Jinek *et al.* 2013; Mali *et al.* 2013b)，並開創新一代基因編輯的應用與發展。

CRISPR/Cas9 之 gRNA 目標序列及表現載體

gRNA 總長度約 98 個核苷酸所組成 (圖 3)，其中 20 個核苷酸為與目標 DNA 互補的嚮導區域 (guide region)，或者在原核系統中被稱為區隔序列。另有 12 個核苷酸組成重複區段 (repeat region)，14 個核苷酸的抗重複 (anti-repeat) 區段和三個莖環 (stem loop) 共同組成的 tracrRNA (Nishimasu *et al.* 2014; Liang *et al.* 2016)。重複區段及抗重複區段於原核生物體中，是驅使 RNase III 加工 crRNA 前驅物為成熟態，進而活化 crRNA-Cas9 切割目標 DNA 的重要區段 (Deltcheva *et al.* 2011; Liang *et al.* 2016)。第一個莖環用來幫助 Cas9-gRNA- 目標 DNA 複合體的形成，第二

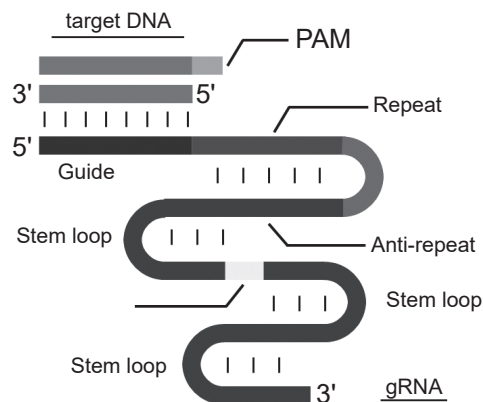


圖 3. gRNA 及目標 DNA 複合體 (參考 Nishimasu *et al.* 2014)。

Fig. 3. Schematic representation of the gRNA and target DNA complex (Nishimasu *et al.* 2014).

和第三個莖環則是穩定此複合體並活化 Cas9 活性 (Nishimasu *et al.* 2014)。

CRISPR/Cas9 基因編輯工具在設計與使用上，相較於 ZFN 與 TALEN 來得容易且成更低。因此一般實驗室幾乎可依照指示及操作，即可進行一系列研究項目。但目前遭遇最大問題點在於脫靶 (off-target) 效應，是指設計不良的 CRISPR/Cas9 系統會誤認目標區域，造成非目標 DNA 被編輯，而 gRNA 的選擇與設計，即是影響脫靶效應的主因。目前已有多个協助設計的網站 [例如：CRISPRdirect (Naito *et al.* 2015)、E-CRISP (Heigwer *et al.* 2014)、CHOPCHOP (Montague *et al.* 2014; Labun *et al.* 2016)]，可依據以下條件，進行 gRNA 及目標序列評估與設計：

- (1) PAM 序列：前述已知 PAM 是影響 Cas 蛋白質是否能有效辨識目標 DNA 的重要因子，而不同的 Cas 蛋白質系統對應不同 PAM 序列編碼。在應用最廣泛的 Cas9 系統中，其 PAM 序列為 5'-NGG-3'，而上游 20 個核苷酸即為目標序列。
- (2) 目標序列：目標序列設計在基因前端的外顯子 (exon) 影響基因功能大於後端外顯子 (intron)。此外，目標 DNA 設計在轉錄股 (transcribed strand，或稱反義股 anti-sense)，影響基因功能較非轉錄股較差 (Wang *et al.* 2014)。所以 gRNA 在目標序列的設計，建議優先選擇非轉錄股且位於上游或接近 5' 端的外顯子。
- (3) 目標序列 G/C 含量：目前認為 gRNA 與目標 DNA 結合的 20 個核苷酸，其 G/C 含量介於 40–60% 為最佳狀態。過高或過低的 GC 含量都會影響 gRNA 的有效性 (Wang *et al.* 2014a; Liu *et al.* 2016)。
- (4) gRNA 辨識目標 DNA 的序列：目標 DNA 序列辨識的 gRNA 多設計為 20 個核苷酸，而位於 PAM 上游 8–12 個核苷酸的 gRNA 區段是影響專一性的主因 (亦有研究指出是位於 4–7 的位置) (Hsu *et al.* 2013; Zheng *et al.* 2017)。此外，gRNA 與目標序列互補長度方面減少到 15 個核苷酸，可減少脫靶效應 5,000× 以上，進而提高專一性，但

過高的專一性會降低基因編輯頻度，使編輯效率變差 (Pattanayak *et al.* 2013; Fu *et al.* 2014)。

- (5) 二級結構：如同前述 gRNA 莖環能穩定並活化 Cas9 複合體形成，缺少此二級結構會影響 Cas9-gRNA 複合體與目標 DNA 的鹼基配對。此外，亦有研究指出 gRNA 序列結構之些許變更可影響基因編輯效率 (Liang *et al.* 2016; Xu *et al.* 2017)。
- (6) 基因組序列：由於大多農園藝作物為非模式植物，基因體序列資料庫完整度相對於人類或水稻來得薄弱，甚至無全基因組序列可供參考，對於脫靶效應預測與目標序列選擇之精準度將受到極大影響。再者，即使有全基因組序列，遺傳變異 (genetic variation)、單核苷酸多型性 (single nucleotide polymorphism; SNP) 及高度相似的序列等皆可能提高脫靶效應之風險 (Luo *et al.* 2015; Lessard *et al.* 2017; Balabaskaran-Nina & Desai 2018)。

gRNA 的表現需要有適當啟動子，目前植物 CRISPR/Cas9 系統主要選擇 U3 或 U6 啟動子來驅使 gRNA 表現，主因是 U3 或 U6 啟動子在轉錄過程，並不是由 RNA 聚合酶 II 進行作用，而是由 RNA 聚合酶 III。這差別在於 RNA 聚合酶 III 適合製作 shRNA、tRNA 及 rRNA 5S 等較小片段的 RNA，且產物不會像製作大片段 mRNA 的 RNA 聚合酶 II 會在末端形成多聚腺苷酸尾 (poly-A tail)。在短片段 RNA 生產上，U3 或 U6 搭配 RNA 聚合酶 III 也比較有效率 (Paule & White 2000; Mäkinen *et al.* 2006)。U3 或 U6 啟動子之後為轉錄起始位置，兩者偏好不同核苷酸作為轉錄起始位，U3 偏好以腺嘌呤 (A)，在目標序列上宜選用 5'-A-N₍₁₉₎-NGG-3' 組合，U6 則偏好鳥嘌呤 (G)，在目標序列上宜選用 5'-G-N₍₁₉₎-NGG-3' 組合，若無相對應的起始核苷酸，則會造成 gRNA 表現量變差，在編輯效率亦會受到影響。除了 U3 和 U6 啟動子外，Ranganathan *et al.* (2014) 發現 H1 啟動子可提供另外的選擇，在目標序列選用 5'-A-N₍₁₉₎-NGG-3' 或 5'-G-N₍₁₉₎-NGG-3'，皆可穩定表現 gRNA。由

於啟動子轉錄起始有偏好的特定核苷酸限制，在目標序列上選擇易受到限制，而 Sander & Joung (2014) 提出可在 gRNA 前多設計一個啟動子轉錄起始偏好的特定核苷酸，即可獲得解決，雖然多出的核苷酸無法與目標序列配對，但 Cas9 可正常辨識目標序列並編輯。

通常一個載體包含一個 gRNA 的表現序列，因此在單一細胞轉形 (transformation) 後，僅能編輯單一位點。為了能單次轉形且可編輯多個位點的基因座，可利用以下方式達成目的：

- (1) 共轉染 (co-transfection)：在 CRISPR/Cas9 發展初期，gRNA 表現與 Cas9 蛋白質表現為兩個不同載體，因此要同時表現 gRNA 與 Cas9 蛋白質則需要以一定載體數量比率同時送入細胞內，此現象稱為共轉染，因此編輯多個 gRNA 則需要混和多種 gRNA 載體 (Li *et al.* 2013; Zhang *et al.* 2015)。然而，此方式最大的缺陷是多個載體不一定會同時轉染 (transfection) 到同一個細胞，且細胞對載體乘載量有一定數量限制。因此，在多基因編輯操作技術較複雜和困難，且獲得期望多基因編輯效果較低，故目前較少以此方法進行。
- (2) Golden-gated cloning：此技術可單次且無縫方式將多個 DNA 片斷黏合 (Xing *et al.* 2014)，因此多個啟動子與不同 gRNA 組合片斷可藉由 Golden-gated cloning 方法進行黏合，每一個 gRNA 為利用各自的啟動子表現。
- (3) Polycistron：指多個基因由一個啟動子轉錄或轉譯出多個產物，此現象較常發生在基因組較小的原核生物上，例如原核生物的 polycistronic 訊息 RNA 可一次轉譯出多個蛋白質。真核生物單個訊息 RNA 多僅能轉錄出單個蛋白質，僅在少部分狀況真核生物方能發生 Polycistron 現象 (Nakajima *et al.* 1981; Kruska *et al.* 2003)。Xie *et al.* (2015) 利用此現象來進行多個 gRNA 的表現，而不同 gRNA 之間，則以 tRNA 進行接合。當 tRNA-gRNA polycistron 轉錄成 RNA 後，細胞內生性 tRNA 處理機制

的 RNase P 和 RNase Z，會將 tRNA-gRNA polycistron RNA 裁剪成 gRNA 與 tRNA。此策略相較於傳統的 gRNA 載體可提高 3–30× 的 gRNA 表現量，並有較高的編輯效率 (Xie *et al.* 2015)。

CRISPR/Cas9 基因編輯系統主要以 Cas9 蛋白質進行 DNA 裁切，因此是否有正確地轉錄出 Cas9 蛋白質，將影響基因編輯的效率與正確性。在不同生物間存在些許遺傳密碼的差異及密碼子偏愛性，若以相同遺傳密碼應用在不同物種，會影響蛋白質的表現。而 Cas9 蛋白質最初在化膿性鏈球菌中被發現，亦是目前 CRISPR/Cas9 編輯技術中應用最廣泛的 Cas9 蛋白質序列編碼。但利用原核 Cas9 蛋白質編碼於真核生物中表現，例如人類、植物等，可能會影響基因編輯效果。因此，在遺傳密碼轉換上則需要有適當的調整，例如在水稻研究報告中發現，Cas9 基因密碼子利用率調整為適合水稻模式下表現，相對於用人類或衣藻屬的遺傳密碼具有較高的效率 (Xu *et al.* 2014; Zhou *et al.* 2014)。在遺傳密碼正確下，搭配 Cas9 蛋白質的啟動子選擇也是相當重要，研究報告指出具有較高活性的啟動子調控下，基因編輯效率較佳，但值得注意的是 Cas9 蛋白質與 gRNA 過度表現，極有可能導致脫靶效應機率變高 (Mikami *et al.* 2015)。所以 Cas9 表現量的過與不及，對於基因編輯都有不良的影響 (Schaeffer & Nakata 2015)。

CRISPR/Cas9 系統的暫時及穩定表現

CRISPR/Cas9 表現載體構築完成後，則需送至植物細胞進行功能性驗證。目前基因轉殖較常見技術有 (1) 電穿孔法 (electroporation)：是利用瞬間高壓脈衝下造成細胞膜短暫出現開放小孔，進而導入外源 DNA 分子 (Kim *et al.* 2014; Liang *et al.* 2015)；(2) polyethylene glycol (PEG) 化學法：PEG 在二價陽離子 (Mg^{2+} 與 Ca^{2+}) 存在下，會與 DNA 形成共沉澱，且加上 PEG 造成細胞膜的短暫孔洞效果，進而使植物原生質體吸收外源 DNA (Malnoy *et al.* 2016; Lin *et al.* 2018)；(3) 基因槍 (gene gun) 法：

又稱粒子槍導入 (particle bombardment)，主要利用外來 DNA 附著在鎢 (tungsten) 或金之金屬微粒上，再藉由高壓氣體作為驅動力，加速附有 DNA 的金屬微粒，使其進入植物細胞 (Svitashev *et al.* 2016; Hamada *et al.* 2018)；(4) 農桿菌轉殖法 (*Agrobacterium*-mediated transformation)：自然界中之農桿菌在感染植物後，即會利用本身 Ti 質體 (tumor inducing plasmid) 將自己特定區域 DNA 嵌入宿主 (植物) 的染色體。農桿菌轉殖方式則利用此特性，將外源 DNA 轉移到植物基因組內 (Sardesai & Subramanyam 2018; Zhang *et al.* 2018)。

電穿孔與 PEG 化學法需要依靠植物原生質體作為受體 (receptor)，原生質體培養及再生條件相當嚴苛。因此在 CRISPR/Cas9 功能驗證系統中，適合用來作為暫時表現系統，而基因槍與農桿菌轉殖法之受體則為植物組織的培植體，在植物系統應用上，可穩定表現外源基因。以上所述 CRISPR/Cas9 基因編輯系統，都是以送入外源 DNA 進入植物細胞內後，讓植物產生 gRNA 和 Cas9 蛋白質來進行基因編輯，而農桿菌轉殖法則會使外源 DNA 嵌入植物基因組，可能會造成植物原本基因功能喪失或變異 (Kanchiswamy 2016; Svitashev *et al.* 2016)。再者，導入外源 DNA 之轉基因作物，被視為基因改造作物 (Genetically Modified Organism; GMO)，對於產業應用仍有一定疑慮。為了避免外源 DNA 的嵌入而干擾植物外表型探討，以及避免基因改造作物議題，目前有兩種方法可達到基因編輯後的植株無外源 DNA：

(1) Cas9 核糖核蛋白質 (ribonucleoprotein; RNPs)：

CRISPR/Cas9 基因編輯的作用機制，是依靠 Cas9 與 gRNA 結合後，辨識目標 DNA 後造成 DNA 雙股斷裂而達到編輯效果，因此只要送入 Cas9 蛋白質及 gRNA 即可進行基因編輯。在動物細胞中，由於沒有細胞壁緣故，可藉由微脂粒 (liposome) 包覆 Cas9 核糖核蛋白質後，即可與細胞膜融合進行轉染。植物因為有細胞壁緣故，必須先分離出原生植體型態，才能進行轉染。Cas9 核糖核蛋白質的製作，分為兩部分：Cas9 蛋白質部分可藉由大腸桿菌大量

表現後進行純化；gRNA 則可在試管中 (*in vitro*) 藉由 T7 RNA 聚合酶來合成。混和 Cas9 蛋白質與 gRNA 形成 Cas9 核糖核蛋白質複合體，即可轉染至原生質體。此方法完全無需將外源 DNA 送至植物細胞，可達到在沒有外源 DNA 下，即可進行基因編輯 (DNA-free genome editing)。目前已知有阿拉伯芥 (*Arabidopsis*)、菸草、萵苣、水稻等植物，都已證實可利用 Cas9 核糖核蛋白質進行基因編輯 (Woo *et al.* 2015; Svitashev *et al.* 2016; Murovec *et al.* 2018)。

(2) 自交或回交：農桿菌轉殖植株在多次自交狀態下，藉由植物本身即會發生的染色體互換，配合檢測基因編輯後的目標基因與外源 DNA，進行外源 DNA 剔除且保留編輯之目標基因，可獲得無外源基因干擾的植株。但基因編輯有可能會發生脫靶效應，造成非期望基因被編輯，在此狀況之下，現況僅能利用全基因組定序才能檢測與追蹤，然而利用全基因組定序進行多世代檢測脫靶效應，依目前技術所耗費資源仍屬昂貴。因此，利用野生型 (wild type) 親本與轉殖株進行回交，不僅可保留目標基因，亦可剔除外源 DNA 與脫靶效應干擾 (Schaeffer & Nakata 2015; Borrelli *et al.* 2018; Jaganathan *et al.* 2018; Metje-Sprink *et al.* 2018)。

基因編輯於植物學的應用

CRISPR/Cas 系統在植物學應用上，依其功能性概略可區分為兩種：「功能性基因驗證」及「剔除或弱化特定基因進行重要性狀改良」。在功能性基因驗證，概略可分為「失去功能性」(loss-of-function)及「獲得功能性」(gain-of-function)兩種變異方法 (Travella *et al.* 2006; Kuromori *et al.* 2009)。在過去幾十年間，失去功能性分析主要是用 RNA 干擾 (RNA interference; RNAi) 技術來抑制目標基因。由於 RNA 干擾技術是藉由雙股 RNA 被裁切成活化態的小片段干擾 RNA (small interfering RNA; siRNA)，並與數個蛋白質組成核糖核蛋白質，稱為 RNA 誘導沉默複合物 (RNA-in-

duced silencing complex; RISC)。而 RNA 誘導沉默複合物會藉其小片段反股 RNA 與目標 mRNA 結合後，進一步降解目標 mRNA，導致後續無法進行轉譯特定蛋白質，而達到基因靜默現象 (gene silencing) (Eamens *et al.* 2008; Guo *et al.* 2016)。然而，RNA 干擾技術因無法完全降解所有的目標 mRNA，經常可發現仍有目標蛋白質被轉譯出來。因此 RNA 干擾技術在基因調控結果，通常被稱為基因減弱 (knock down)，而非基因剔除 (Mocellin & Provenzano 2004; Kamthan *et al.* 2015; Fang & Qi 2016)。此外，RNA 干擾技術會受到小片段反股 RNA 序列的專一程度，進而影響到目標 RNA 的脫靶率。CRISPR/Cas9 系統在基因調控上，是直接作用在 DNA 層次造成鹼基插入與缺失的移碼突變，導致特定基因失去功能性，來達到真正的基因剔除效果。因此在脫靶率上，CRISPR/Cas9 系統優於 RNA 干擾技術 (Smith *et al.* 2017)，所以在近代的功能性基因驗證上，基因編輯被認為是非常有效且強大的工具。除了基因失去功能性的應用方面外，CRISPR/Cas9 的基因編輯技術亦被證實可應用在獲得功能性基因，主要是依靠 CRISPR/Cas9 產生的雙股 DNA 斷裂會誘發細胞本身的同源性重組及非同源性末端接合修補機制，此時加入改造後的外源 DNA 當作模板，即可插入外源 DNA，使宿主獲得新的功能性基因 (Li *et al.* 2013)。

作物育種的應用

植物在生長過程中，會遭受生物性及非生物性的環境逆境，前者包含真菌、細菌及病毒等微生物或昆蟲的侵擾，後者如澇災、乾旱、鹽害及寒害等。作物在生物逆境下會影響其生長勢，嚴重情況甚至造成作物死亡，進而影響產量。植物在對抗生物性逆境過程中，由於微生物生長週期短、演化快速，病菌突變成新型致病原常常造成大面積且無預警的嚴重性病害，例如在 1998 年烏干達的小麥爆發一種真菌性病害，為 *Puccinia graminis* 真菌突變小種「Ug99」引起的稈銹病。Ug99 對小麥田的破壞性極大，當時造成烏干達約 90% 小麥產

量損失 (Pretorius *et al.* 2000)，並在亞洲、非洲地區開始蔓延，甚至傳播到中東地區，造成嚴重的飢荒及內亂。而對抗生物逆境的性狀，多數由複雜的數量性狀基因座所調控。因此，在作物育種上，要有效掌控多基因遺傳的數量性狀 (例如：產量、抗病育種、逆境耐受性等) 是相當困難且需花費長時間的研究。由於 CRISPR/Cas9 可載入單一或多個不同的 gRNA 序列，以達到單一或多個基因的編輯效果，也因此被運用於多種作物改良上，藉此以加速作物育種進程。以下，將概略性介紹如何利用 CRISPR/Cas9 基因編輯技術，來進行作物育種改良。

作物產量之增加

離層素 (abscisic acid; ABA) 對植物的生長及抗逆境反應扮演相當重要的關鍵因子，而植物會對離層素產生反應主要是透過與受體結合後產生訊息傳遞造成的整體結果。目前已知離層素的受體為 pyrabactin resistance/pyrabactin-like/regulatory components of ABA receptor (PYR/PYL/RCAR) 蛋白質家族所組成，游離態的離層素與 PYR/PYL/RCAR 受體結合後會產生結構上的改變，進而與 protein phosphatase 2C (PP2C) 蛋白質結合，並進一步影響特定蛋白質之活性化，最終影響下游的訊息傳導路徑，例如：離子通道傳輸、基因表現與生理代謝路徑等。在阿拉伯芥植物的研究中發現，PYL 家族總共由 14 個基因所調控，不同 PYL 基因控制不同生理反應。以往，能在同一株植物進行多個目標基因編輯，需要耗費長久時間與金錢才能獲得相對的基因驗證結論，而 CRISPR/Cas9 技術的發展，可藉由載入單一或多個不同的 gRNA 序列，達到單一或多個基因的編輯效果。在 Miao *et al.* (2018) 研究中即是利用 CRISPR/Cas9 多基因編輯技術來探討不同 PYL 家族組合如何影響水稻的生長，其研究結果發現同時編輯 *PYL1/4/6* 三個基因，可促進水稻生長及增加稻穀生產力。除了水稻外，多種作物已發表可藉由編輯特定基因來達到影響產量效果，例如：玉米的 *GRAIN WEIGHT 2 (GW2)*、*VRS1-LIKE HOMEBOX PROTEIN (VLHP)* 基因，小麥的

GW2、*GASR7*、*DENSE AND ERECT PANICLE 1 (DEP1)*，番茄的 *CLAVATA-WUSCHEL (CLV-WUS)* 基因等 (Rodriguez-Leal *et al.* 2017; Borisjuk *et al.* 2019; Kelliher *et al.* 2019)。

提升作物之抗病性

在環境不良情況下，作物產量及品質之維持將受到極大壓迫，特別在現今全球溫室效應下，導致之氣候異常，生物性及非生物性的逆境耐性議題更顯得特別重要。小麥是世界最主要的糧食作物之一，而白粉病是全球小麥的主要病害之一，會嚴重影響小麥的產量和品質，甚至可能因產量的減少引發糧食危機，也因此培育具有抗病品種一直是育種上的重要挑戰項目。小麥的 *MILDEW RESISTANCE LOCUS O (MLO)* 基因是第一個成功應用 CRISPR/Cas9 技術來達到具有抗白粉病效果實驗 (Shan *et al.* 2013)，之後陸續發現 *TaMLO-A1*、*TaEDR1 (ENHANCED DISEASE RESISTANCE 1)* 等不同的基因編輯也可以達到類似抗真菌性病害的效果 (Wang *et al.* 2014b; Zhang *et al.* 2017)。

植物病毒侵入宿主植物後，會造成系統性的感染，進而引起作物不正常生長。一旦感染病毒之作物，現況無法以藥劑施用來獲得防治，僅能藉由田間管理、清除病株、病蟲害媒介或人為之機械傳播進行綜合性防治，所以最根本的解決方法是能獲得抗病毒品種。病毒藉由病蟲媒介侵入到植物宿主後，會利用宿主本身特定因子來進行複製與感染。自然界中，宿主特定因子發生突變，病毒則無法輕易地利用宿主資源來擴散，即能達到可遺傳的抗病特性 (Nicaise 2014)。encoding translation initiation factor 4E (eIF4E) 蛋白質是真核生物中，開始進行蛋白質轉譯的重要因子之一，也是 *Potyviridae* 病毒侵入宿主所需的特定因子。所以，藉由 CRISPR/Cas9 剔除 *eIF4E* 基因功能，即可達到抗病毒之策略，並在不同作物中獲得證實，例如：黃瓜、樹薯等 (Chandrasekaran *et al.* 2016; Gomez *et al.* 2019)。

討論

基因編輯技術自 2013 年確立可應用在真

核生物以來，不到 5 年期間，即受到當今學術界、研發單位、產業界與政府相關單位高度注目，並爭相投入相關的技術開發與專利布局。本技術不僅於基礎研究探討、基因功能驗證，甚至創造新種原或疾病治療等各方面，皆有廣泛之研究及不斷推陳出新的應用。目前基因編輯技術主要以 CRISPR/Cas9 系統發展最完善且在各種物種上得到驗證，而能如此快速拓展基因編輯技術的主要原因，在於實驗操作層面被認為是日前基因編輯技術中最容易取得、方便操作且應用工具最完善的技術，投入所需的資金亦相對較少。不過，也因為投入龐大資金與人力在 CRISPR/Cas9 的研究，CRISPR/Cas9 本身的缺陷與限制也逐漸被攤在陽光底下，亦是引來不少爭議與質疑，例如：脫靶效應、基因編輯是否受到 GMO 法律規範、基因治療產生的後續倫理爭議等。惟相對地因應而生的檢測方法與改良技術也不斷的被開發出來，姑且不論 CRISPR/Cas 系統的爭議性議題，CRISPR/Cas 系統在基因探索驗證及相關育種上，無疑是現今生物技術及改良育種上最具有發展性及功能強大的技術。

引用文獻

- Abudayyeh, O. O., J. S. Gootenberg, S. Konermann, J. Joung, I. M. Slaymaker, D. B. Cox, S. Shmakov, K. S. Makarova, E. Semenova, L. Minakhin, K. Severinov, A. Regev, E. S. Lander, E. V. Koonin, and F. Zhang. 2016. C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector. *Science* 353:aaf5573.
- Aman, R., Z. Ali, H. Butt, A. Mahas, F. Aljedaani, M. Z. Khan, S. Ding, and M. Mahfouz. 2018. RNA virus interference via CRISPR/Cas13a system in plants. *Genome Biol.* 19:1.
- Balabaskaran-Nina, P. and S. A. Desai. 2018. Diverse target gene modifications in *Plasmodium falciparum* using Bxb1 integrase and an intronic attB. *Parasit Vectors* 11:548.
- Barrangou, R., C. Fremaux, H. Deveau, M. Richards, P. Boyaval, S. Moineau, D. A. Romero, and P. Horvath. 2007. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* 315:1709–1712.
- Barrangou, R. and P. Horvath. 2012. CRISPR: New horizons in phage resistance and strain identification.

- Annu. Rev. Food Sci. Technol. 3:143–162.
- Barrangou, R., A. C. Couïté-Monvoisin, B. Stahl, I. Chavichvily, F. Damange, D. A. Romero, P. Boyaval, C. Fremaux, and P. Horvath. 2013. Genomic impact of CRISPR immunization against bacteriophages. *Biochem. Soc. Trans.* 41:1383–1391.
- Boch, J. and U. Bonas. 2010. Xanthomonas AvrBs3 family-type III effectors: Discovery and function. *Annu. Rev. Phytopathol.* 48:419–436.
- Bogdanove, A. J., S. Schornack, and T. Lahaye. 2010. TAL effectors: Finding plant genes for disease and defense. *Curr. Opin. Plant Biol.* 13:394–401.
- Bolotin, A., B. Quinquis, A. Sorokin, and S. D. Ehrlich. 2005. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology* 151:2551–2561.
- Bondy-Denomy, J., A. Pawluk, K. L. Maxwell, and A. R. Davidson. 2013. Bacteriophage genes that inactivate the CRISPR/Cas bacterial immune system. *Nature* 493:429–432.
- Borisjuk, N., O. Kishchenko, S. Eliby, C. Schramm, P. Anderson, S. Jatayev, A. Kurishbayev, and Y. Shavrukov. 2019. Genetic modification for wheat improvement: From transgenesis to genome editing. *Biomed Res. Intl.* 2019:6216304.
- Borrelli, V. M. G., V. Brambilla, P. Rogowsky, A. Marocco, and A. Lanubile. 2018. The enhancement of plant disease resistance using CRISPR/Cas9 technology. *Front. Plant Sci.* 9:1245.
- Brouns, S. J. J., M. M. Jore, M. Lundgren, E. R. Westra, R. J. H. Slijkhuis, A. P. L. Snijders, M. J. Dickman, K. S. Makarova, E. V. Koonin, and J. van der Oost. 2008. Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science* 321:960–964.
- Carte, J., R. Wang, H. Li, R. M. Terns, and M. P. Terns. 2008. Cas6 is an endoribonuclease that generates guide RNAs for invader defense in prokaryotes. *Genes Dev.* 22:3489–3496.
- Chandrasekaran, J., M. Brumin, D. Wolf, D. Leibman, C. Klap, M. Pearlsman, A. Sherman, T. Arazi, and A. Gal-On. 2016. Development of broad virus resistance in non-transgenic cucumber using CRISPR/Cas9 technology. *Mol. Plant Pathol.* 17:1140–1153.
- Chen, J. S. and J. A. Doudna. 2017. The chemistry of Cas9 and its CRISPR colleagues. *Nat. Rev. Chem.* 1:0078.
- Christian, M., T. Cermak, E. L. Doyle, C. Schmidt, F. Zhang, A. Hummel, A. J. Bogdanove, and D. F. Voytas. 2010. Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics* 186:757–761.
- Cong, L., F. A. Ran, D. Cox, S. Lin, R. Barretto, N. Habib, P. D. Hsu, X. Wu, W. Jiang, L. A. Marraffini, and F. Zhang. 2013. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* 339:819–823.
- Decottignies, A. 2013. Alternative end-joining mechanisms: A historical perspective. *Front. Genet* 4:48.
- Deltcheva, E., K. Chylinski, C. M. Sharma, K. Gonzales, Y. Chao, Z. A. Pizada, M. R. Eckert, J. Vogel, and E. Charpentier. 2011. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature* 471:602–607.
- Deveau, H., R. Barrangou, J. E. Garneau, J. Labonté, C. Fremaux, P. Boyaval, D. A. Romero, P. Horvath, and S. Moineau. 2008. Phage response to CRISPR-encoded resistance in *Streptococcus thermophilus*. *J. Bacteriol.* 190:1390–1400.
- Doyle, E. L., B. L. Stoddard, D. F. Voytas, and A. J. Bogdanove. 2013. TAL effectors: Highly adaptable phytobacterial virulence factors and readily engineered DNA-targeting proteins. *Trends Cell Biol.* 23:390–398.
- Eamens, A., M. B. Wang, N. A. Smith, and P. M. Waterhouse. 2008. RNA silencing in plants: Yesterday, today, and tomorrow. *Plant Physiol.* 147:456–468.
- Fang, X. and Y. Qi. 2016. RNAi in plants: An argonauta-centered view. *Plant Cell* 28:272–285.
- Fu, Y., J. D. Sander, D. Reyon, V. M. Cascio, and J. K. Joung. 2014. Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. *Nat. Biotechnol.* 32:279–284.
- Garneau, J. E., M. E. Dupuis, M. Villion, D. A. Romero, R. Barrangou, P. Boyaval, C. Fremaux, P. Horvath, A. H. Magadán, and S. Moineau. 2010. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature* 468:67–71.
- Gasiunas, G., R. Barrangou, P. Horvath, and V. Siksnys. 2012. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109:E2579–E2586.
- Gomez, M. A., Z. D. Lin, T. Moll, R. D. Chauhan, L. Hayden, K. Renninger, G. Beyene, N. J. Taylor, J. C. Carrington, B. J. Staskawicz, and R. S. Bart. 2019. Simultaneous CRISPR/Cas9-mediated editing of cassava *eIF4E* isoforms nCBP-1 and nCBP-2 reduces cassava brown streak disease symptom severity and incidence. *Plant Biotechnol. J.* 17:421–434.
- Guo, Q., Q. Liu, N. A. Smith, G. Liang, and M. B. Wang. 2016. RNA silencing in plants: Mechanisms, technologies and applications in horticultural crops. *Curr. Genomics* 17:476–489.
- Hamada, H., Y. Liu, Y. Nagira, R. Miki, N. Taoka, and R. Imai. 2018. Biolistic-delivery-based transient

- CRISPR/Cas9 expression enables in planta genome editing in wheat. *Sci. Rep.* 8:14422.
- Heigwer, F., G. Kerr, and M. Boutros. 2014. E-CRISP: Fast CRISPR target site identification. *Nat. Methods* 11:122–123.
- Hirano, S., H. Nishimasu, R. Ishitani, and O. Nureki. 2016. Structural basis for the altered PAM specificities of engineered CRISPR-Cas9. *Mol. Cell* 61:886–894.
- Hsu, P. D., D. A. Scott, J. A. Weinstein, F. A. Ran, S. Konermann, V. Agarwala, Y. Li, E. J. Fine, X. Wu, O. Shalem, T. J. Cradick, L. A. Marraffini, G. Bao, and F. Zhang. 2013. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat. Biotechnol.* 31:827–832.
- Hu, J. H., S. M. Miller, M. H. Geurts, W. Tang, L. Chen, N. Sun, C. M. Zeina, X. Gao, H. A. Rees, Z. Lin, and D. R. Liu. 2018. Evolved Cas9 variants with broad PAM compatibility and high DNA specificity. *Nature* 556:57–63.
- Ishino, Y., H. Shinagawa, K. Makino, M. Amemura, and A. Nakata. 1987. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J. Bacteriol.* 169:5429–5433.
- Ishino, Y., M. Krupovic, and P. Forterre. 2018. History of CRISPR-Cas from encounter with a mysterious repeated sequence to genome editing technology. *J. Bacteriol.* 200:e00580-17.
- Jaganathan, D., K. Ramasamy, G. Sellamuthu, S. Jayabalan, and G. Venkataraman. 2018. CRISPR for crop improvement: An update review. *Front. Plant Sci.* 9:985.
- Jansen, R., J. D. A. van Embden, W. Gastra, and L. M. Schouls. 2002. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol. Microbiol.* 43:1565–1575.
- Jinek, M., K. Chylinski, I. Fonfara, M. Hauer, J. A. Doudna, and E. Charpentier. 2012. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337:816–821.
- Jinek, M., A. East, A. Cheng, S. Lin, E. Ma, and J. Doudna. 2013. RNA-programmed genome editing in human cells. *Elife* 2:e00471.
- Jinek, M., F. Jiang, D. W. Taylor, S. H. Sternberg, E. Kaya, E. Ma, C. Anders, M. Hauer, K. Zhou, S. Lin, M. Kaplan, A. T. Iavarone, E. Charpentier, E. Nogales, and J. A. Doudna. 2014. Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation. *Science* 343:1247997.
- Kamthan, A., A. Chaudhuri, M. Kamthan, and A. Datta. 2015. Small RNAs in plants: Recent development and application for crop improvement. *Front. Plant Sci.* 6:208.
- Kanchiswamy, C. N. 2016. DNA-free genome editing methods for targeted crop improvement. *Plant Cell Rep.* 35:1469–1474.
- Karanam, K., R. Kafri, A. Loewer, and G. Lahav. 2012. Quantitative live cell imaging reveals a gradual shift between DNA repair mechanisms and a maximal use of HR in mid S phase. *Mol. Cell* 47:320–329.
- Kelliher, T., D. Starr, X. Su, G. Tang, Z. Chen, J. Carter, P. E. Wittich, S. Dong, J. Green, E. Burch, J. McCuiston, W. Gu, Y. Sun, T. Strebe, J. Roberts, N. J. Bate, and Q. Que. 2019. One-step genome editing of elite crop germplasm during haploid induction. *Nat. Biotechnol.* 37:287–292.
- Kim, S., D. Kim, S. W. Cho, J. Kim, and J. S. Kim. 2014. Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins. *Genome Res.* 24:1012–1019.
- Kleinstiver, B. P., M. S. Prew, S. Q. Tsai, V. V. Topkar, N. T. Nguyen, Z. Zheng, A. P. W. Gonzales, Z. Li, R. T. Peterson, J. R. J. Yeh, M. J. Aryee, and J. K. Joung. 2015. Engineered CRISPR-Cas9 nucleases with altered PAM specificities. *Nature* 523:481–485.
- Koonin, E. V. and K. S. Makarova. 2017. Mobile genetic elements and evolution of CRISPR-Cas systems: All the way there and back. *Genome Biol. Evol.* 9:2812–2825.
- Koonin, E. V., K. S. Makarova, and F. Zhang. 2017. Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems. *Curr. Opin. Microbiol.* 37:67–78.
- Kruszka, K., F. Barneche, R. Guyot, J. Ailhas, I. Meneau, S. Schiffer, A. Marchfelder, and M. Echeverria. 2003. Plant dicistronic tRNA-snoRNA genes: A new mode of expression of the small nucleolar RNAs processed by RNase Z. *EMBO J.* 22:621–632.
- Kuromori, T., S. Takahashi, Y. Kondou, K. Shinozaki, and M. Matsui. 2009. Phenome analysis in plant species using loss-of-function and gain-of-function mutants. *Plant Cell Physiol.* 50:1215–1231.
- Labun, K., T. G. Montague, J. A. Gagnon, S. B. Thyme, and E. Valen. 2016. CHOPCHOP v2: A web tool for the next generation of CRISPR genome engineering. *Nucleic Acids Res.* 44:W272–W276.
- Lessard, S., L. Francioli, J. Alfoldi, J. C. Tardif, P. T. Ellinor, D. G. MacArthur, G. Lettre, S. H. Orkin, and M. C. Canver. 2017. Human genetic variation alters CRISPR-Cas9 on- and off-targeting specificity at therapeutically implicated loci. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 114:E11257–E11266.
- Li, J. F., J. E. Norville, J. Aach, M. McCormack, D. Zhang, J. Bush, G. M. Church, and J. Sheen. 2013.

- Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana* using guide RNA and Cas9. *Nat. Biotechnol.* 31:688–691.
- Liang, X., J. Potter, S. Kumar, Y. Zou, R. Quintanilla, M. Sridharan, J. Carte, W. Chen, N. Roark, S. Ranganathan, N. Ravinder, and J. D. Chesnut. 2015. Rapid and highly efficient mammalian cell engineering via Cas9 protein transfection. *J. Biotechnol.* 208:44–53.
- Liang, G., H. Zhang, D. Lou, and D. Yu. 2016. Selection of highly efficient sgRNAs for CRISPR/Cas9-based plant genome editing. *Sci. Rep.* 6:21451.
- Lin, C. S., C. T. Hsu, L. H. Yang, L. Y. Lee, J. Y. Fu, Q. W. Cheng, F. H. Wu, H. C. Hsiao, Y. Zhang, R. Zhang, W. J. Chang, C. T. Yu, W. Wang, L. J. Liao, S. B. Gelvin, and M. C. Shih. 2018. Application of protoplast technology to CRISPR/Cas9 mutagenesis: From single-cell mutation detection to mutant plant regeneration. *Plant Biotechnol. J.* 16:1295–1310.
- Liu, X., A. Homma, J. Sayadi, S. Yang, J. Ohashi, and T. Takumi. 2016. Sequence features associated with the cleavage efficiency of CRISPR/Cas9 system. *Sci. Rep.* 6:19675.
- Luo, Y., D. Zhu, Z. Zhang, Y. Chen, and X. Sun. 2015. Integrative analysis of CRISPR/Cas9 target sites in the human HBB gene. *Biomed Res. Intl.* 2015:514709.
- Mäkinen, P. I., J. K. Koponen, A. M. Kärkkäinen, T. M. Malm, K. H. Pulkkinen, J. Koistinaho, M. P. Turunen, and S. Ylä-Herttua. 2006. Stable RNA interference: Comparison of U6 and H1 promoters in endothelial cells and in mouse brain. *J. Gene Med.* 8:433–441.
- Mahfouz, M. M., L. Li, M. Piatek, X. Fang, H. Mansour, D. K. Bangarusamy, and J. K. Zhu. 2012. Targeted transcriptional repression using a chimeric TALE-SRDX repressor protein. *Plant Mol. Biol.* 78:311–321.
- Makarova, K. S. and E. V. Koonin. 2015. Annotation and classification of CRISPR-Cas systems. *Methods Mol. Biol.* 1311:47–75.
- Makarova, K. S., Y. I. Wolf, and E. V. Koonin. 2013. The basic building blocks and evolution of CRISPR-CAS systems. *Biochem. Soc. Trans.* 41:1392–1400.
- Makarova, K. S., Y. I. Wolf, O. S. Alkhnbashi, F. Costa, S. A. Shah, S. J. Saunders, R. Barrangou, S. J. Brouns, E. Charpentier, D. H. Haft, P. Horvath, S. Moineau, F. J. Mojica, R. M. Terns, M. P. Terns, M. F. White, A. F. Yakunin, R. A. Garrett, J. van der Oost, R. Backofen, and E. V. Koonin. 2015. An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. *Nat. Rev. Microbiol.* 13:722–736.
- Mali, P., K. M. Esvelt, and G. M. Church. 2013a. Cas9 as a versatile tool for engineering biology. *Nat. Methods* 10:957–963.
- Mali, P., L. Yang, K. M. Esvelt, J. Aach, M. Guell, J. E. DiCarlo, J. E. Norville, and G. M. Church. 2013b. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science* 339:823–826.
- Malnoy, M., R. Viola, M. H. Jung, O. J. Koo, S. Kim, J. S. Kim, R. Velasco, and C. Nagamangala Kan-chiswamy. 2016. DNA-Free genetically edited grapevine and apple protoplast using CRISPR/Cas9 ribonucleoproteins. *Front. Plant Sci.* 7:1904.
- Manova, V. and D. Gruszka. 2015. DNA damage and repair in plants- from models to crops. *Front. Plant Sci.* 6:885.
- Metje-Sprink, J., J. Menz, D. Modrzejewski, and T. Sprink. 2018. DNA-Free genome editing: Past, present and future. *Front. Plant Sci.* 9:1957.
- Miao, C., L. Xiao, K. Hua, C. Zou, Y. Zhao, R. A. Bresnan, and J. K. Zhu. 2018. Mutations in a subfamily of abscisic acid receptor genes promote rice growth and productivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 115:6058–6063.
- Mikami, M., S. Toki, and M. Endo. 2015. Parameters affecting frequency of CRISPR/Cas9 mediated targeted mutagenesis in rice. *Plant Cell Rep.* 34:1807–1815.
- Miller, J., A. D. McLachlan, and A. Klug. 1985. Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus* oocytes. *EMBO J.* 4:1609–1614.
- Mimitou, E. P. and L. S. Symington. 2010. Ku prevents Exo1 and Sgs1-dependent resection of DNA ends in the absence of a functional MRX complex or Sae2. *EMBO J.* 29:3358–3369.
- Mocellin, S. and M. Provenzano. 2004. RNA interference: Learning gene knock-down from cell physiology. *J. Transl. Med.* 2:39.
- Mohanraju, P., K. S. Makarova, B. Zetsche, F. Zhang, E. V. Koonin, and J. van der Oost. 2016. Diverse evolutionary roots and mechanistic variations of the CRISPR-Cas systems. *Science* 353:aad5147.
- Mojica, F. J. M., C. Díez-Villaseñor, J. García-Martínez, and E. Soria. 2005. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J. Mol. Evol.* 60:174–182.
- Montague, T. G., J. M. Cruz, J. A. Gagnon, G. M. Church, and E. Valen. 2014. CHOPCHOP: A CRISPR/Cas9 and TALEN web tool for genome editing. *Nucleic Acids Res.* 42:W401–W407.
- Murovec, J., K. Guček, B. Bohanec, M. Avbelj, and R. Jerala. 2018. DNA-free genome editing of *Brassica*

- ca oleracea* and *B. rapa* protoplasts using CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein complexes. *Front. Plant Sci.* 9:1594.
- Naito, Y., K. Hino, H. Bono, and K. Ui-Tei. 2015. CRISPRdirect: Software for designing CRISPR/Cas guide RNA with reduced off-target sites. *Bioinformatics* 31:1120–1123.
- Nakajima, N., H. Ozeki, and Y. Shimura. 1981. Organization and structure of an *E. coli* tRNA operon containing seven tRNA genes. *Cell* 23:239–249.
- Nicaise, V. 2014. Crop immunity against viruses: Outcomes and future challenges. *Front. Plant Sci.* 5:660.
- Nishimasu, H., F. A. Ran, P. D. Hsu, S. Konermann, S. I. Shehata, N. Dohmae, R. Ishitani, F. Zhang, and O. Nureki. 2014. Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell* 156:935–949.
- Nishimasu, H., X. Shi, S. Ishiguro, L. Gao, S. Hirano, S. Okazaki, T. Noda, O. O. Abudayyeh, J. S. Gootenberg, H. Mori, S. Oura, B. Holmes, M. Tanaka, M. Seki, H. Hirano, H. Aburatani, R. Ishitani, M. Ikawa, N. Yachie, F. Zhang, and O. Nureki. 2018. Engineered CRISPR-Cas9 nuclease with expanded targeting space. *Science* 361:1259–1262.
- Núñez, J. K., P. J. Kranzusch, J. Noeske, A. V. Wright, C. W. Davies, and J. A. Doudna. 2014. Cas1-Cas2 complex formation mediates spacer acquisition during CRISPR-Cas adaptive immunity. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 21:528–534.
- Osawa, T., H. Inanaga, C. Sato, and T. Numata. 2015. Crystal structure of the CRISPR-Cas RNA silencing Cmr complex bound to a target analog. *Mol. Cell* 58:418–430.
- Osman, K., J. D. Higgins, E. Sanchez-Moran, S. J. Armstrong, and F. C. Franklin. 2011. Pathways to meiotic recombination in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol.* 190:523–544.
- Pattanayak, V., S. Lin, J. P. Guilinger, E. Ma, J. A. Doudna, and D. R. Liu. 2013. High-throughput profiling of off-target DNA cleavage reveals RNA-programmed Cas9 nuclease specificity. *Nat. Biotechnol.* 31:839–843.
- Paule, M. R. and R. J. White. 2000. Survey and summary: Transcription by RNA polymerases I and III. *Nucleic Acids Res.* 28:1283–1298.
- Plagens, A., V. Tripp, M. Daume, K. Sharma, A. Klingl, A. Hrle, E. Conti, H. Urlaub, and L. Randau. 2014. *In vitro* assembly and activity of an archaeal CRISPR-Cas type I-A Cascade interference complex. *Nucleic Acids Res.* 42:5125–5138.
- Pourcel, C., G. Salvignol, and G. Vergnaud. 2005. CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. *Microbiology* 151:653–663.
- Pretorius, Z. A., R. P. Singh, W. W. Wagoire, and T. S. Payne. 2000. Detection of virulence to wheat stem rust resistance gene Sr31 in *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* in Uganda. *Plant Dis.* 84:203.
- Puchta, H. 2005. The repair of double-strand breaks in plants: Mechanisms and consequences for genome evolution. *J. Exp. Bot.* 56:1–14.
- Ranganathan, V., K. Wahlin, J. Maruotti, and D. J. Zack. 2014. Expansion of the CRISPR-Cas9 genome targeting space through the use of H1 promoter-expressed guide RNAs. *Nat. Commun.* 5:4516.
- Rodriguez-Leal, D., Z. H. Lemmon, J. Man, M. E. Bartlett, and Z. B. Lippman. 2017. Engineering quantitative trait variation for crop improvement by genome editing. *Cell* 171:470–480.
- Roy, S. 2014. Maintenance of genome stability in plants: Repairing DNA double strand breaks and chromatin structure stability. *Front Plant Sci.* 5:487.
- Sander, J. D. and J. K. Joung. 2014. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nat. Biotechnol.* 32:347–355.
- Sardesai, N. and S. Subramanyam. 2018. Agrobacterium: A genome-editing tool-delivery system. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 418:463–488.
- Schaeffer, S. M. and P. A. Nakata. 2015. CRISPR/Cas9-mediated genome editing and gene replacement in plants: Transitioning from lab to field. *Plant Sci.* 240:130–142.
- Schmidt, C., M. Pacher, and H. Puchta. 2019. DNA break repair in plants and its application for genome engineering. *Methods Mol. Biol.* 1864:237–266.
- Sfeir, A. and L. S. Symington. 2015. Microhomology-mediated end joining: A Back-up survival mechanism or dedicated pathway? *Trends Biochem. Sci.* 40:701–714.
- Shan, Q., Y. Wang, J. Li, Y. Zhang, K. Chen, Z. Liang, K. Zhang, J. Liu, J. J. Xi, J. L. Qiu, and C. Gao. 2013. Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. *Nat. Biotechnol.* 31:686–688.
- Shmakov, S., A. Smargon, D. Scott, D. Cox, N. Pyzocha, W. Yan, O. O. Abudayyeh, J. S. Gootenberg, K. S. Makarova, Y. I. Wolf, K. Severinov, F. Zhang, and E. V. Koonin. 2017. Diversity and evolution of class 2 CRISPR-Cas systems. *Nat. Rev. Microbiol.* 15:169–182.
- Sinkunas, T., G. Gasiunas, C. Fremaux, R. Barrangou, P. Horvath, and V. Siksnys. 2011. Cas3 is a single-stranded DNA nuclease and ATP-dependent helicase in the CRISPR/Cas immune system. *EMBO J.*

- 30:1335–1342.
- Smith, I., P. G. Greenside, T. Natoli, D. L. Lahr, D. Wadden, I. Tirosh, R. Narayan, D. E. Root, T. R. Golub, A. Subramanian, and J. G. Doench. 2017. Evaluation of RNAi and CRISPR technologies by large-scale gene expression profiling in the Connectivity Map. *PLoS Biol.* 15:e2003213.
- Spampinato, C. P. 2017. Protecting DNA from errors and damage: An overview of DNA repair mechanisms in plants compared to mammals. *Cell Mol. Life Sci.* 74:1693–1709.
- Sternberg, S. H., S. Redding, M. Jinek, E. C. Greene, and J. A. Doudna. 2014. DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. *Nature* 507:62–67.
- Svitashev, S., C. Schwartz, B. Lenderts, J. K. Young, and A. Mark Cigan. 2016. Genome editing in maize directed by CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein complexes. *Nat. Commun* 7:13274.
- Tang, T. H., J. P. Bachelier, T. Rozhdestvensky, M. L. Bortolin, H. Huber, M. Drungowski, T. Elge, J. Brosius, and A. Hüttenhofer. 2002. Identification of 86 candidates for small non-messenger RNAs from the archaeon *Archaeoglobus fulgidus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99:7536–7541.
- Travella, S., T. E. Klimm, and B. Keller. 2006. RNA interference-based gene silencing as an efficient tool for functional genomics in hexaploid bread wheat. *Plant Physiol.* 142:6–20.
- Truong, L. N., Y. Li, L. Z. Shi, P. Y. Hwang, J. He, H. Wang, N. Razavian, M. W. Berns, and X. Wu. 2013. Microhomology-mediated End joining and Homologous Recombination share the initial end resection step to repair DNA double-strand breaks in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110:7720–7725.
- Voytas, D. F. and C. Gao. 2014. Precision genome engineering and agriculture: Opportunities and regulatory challenges. *PLoS Biol.* 12:e1001877.
- Wang, T., J. J. Wei, D. M. Sabatini, and E. S. Lander. 2014a. Genetic screens in human cells using the CRISPR-Cas9 system. *Science* 343:80–84.
- Wang, Y., X. Cheng, Q. Shan, Y. Zhang, J. Liu, C. Gao, and J. L. Qiu. 2014b. Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. *Nat. Biotechnol.* 32:947–951.
- Waters, C. A., N. T. Strande, D. W. Wyatt, J. M. Pryor, and D. A. Ramsden. 2014. Nonhomologous end joining: A good solution for bad ends. *DNA Repair (Amst)* 17:39–51.
- Woo, J. W., J. Kim, S. I. Kwon, C. Corvalán, S. W. Cho, H. Kim, S. G. Kim, S. T. Kim, S. Choe, and J. S. Kim. 2015. DNA-free genome editing in plants with pre-assembled CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins. *Nat. Biotechnol.* 33:1162–1164.
- Xie, K., B. Minkenberg, and Y. Yang. 2015. Boosting CRISPR/Cas9 multiplex editing capability with the endogenous tRNA-processing system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112:3570–3575.
- Xing, H. L., L. Dong, Z. P. Wang, H. Y. Zhang, C. Y. Han, B. Liu, X. C. Wang, and Q. J. Chen. 2014. A CRISPR/Cas9 toolkit for multiplex genome editing in plants. *BMC Plant Biol.* 14:327.
- Xu, J., W. Lian, Y. Jia, L. Li, and Z. Huang. 2017. Optimized guide RNA structure for genome editing via Cas9. *Oncotarget* 8:94166–94171.
- Xu, R., H. Li, R. Qin, L. Wang, L. Li, P. Wei, and J. Yang. 2014. Gene targeting using the *Agrobacterium tumefaciens*-mediated CRISPR-Cas system in rice. *Rice* 7:5.
- Zetsche, B., J. S. Gootenberg, O. O. Abudayyeh, I. M. Slaymaker, K. S. Makarova, P. Essletzbichler, S. E. Volz, J. Joung, J. van der Oost, A. Regev, E. V. Koonin, and F. Zhang. 2015. Cpf1 is a Single RNA-Guided endonuclease of a Class 2 CRISPR-Cas system. *Cell* 163:759–771.
- Zhang, L., R. Jia, N. J. Palange, A. C. Satheka, J. Togo, Y. An, M. Humphrey, L. Ban, Y. Ji, H. Jin, X. Feng, and Y. Zheng. 2015. Large genomic fragment deletions and insertions in mouse using CRISPR/Cas9. *PLoS One* 10:e0120396.
- Zhang, S., R. Zhang, G. Song, J. Gao, W. Li, X. Han, M. Chen, Y. Li, and G. Li. 2018. Targeted mutagenesis using the *Agrobacterium tumefaciens*-mediated CRISPR-Cas9 system in common wheat. *BMC Plant Biol.* 18:302.
- Zhang, Y., Y. Bai, G. Wu, S. Zou, Y. Chen, C. Gao, and D. Tang. 2017. Simultaneous modification of three homoeologs of TaEDR1 by genome editing enhances powdery mildew resistance in wheat. *Plant J.* 91:714–724.
- Zheng, T., Y. Hou, P. Zhang, Z. Zhang, Y. Xu, L. Zhang, L. Niu, Y. Yang, D. Liang, F. Yi, W. Peng, W. Feng, Y. Yang, J. Chen, Y. Y. Zhu, L. H. Zhang, and Q. Du. 2017. Profiling single-guide RNA specificity reveals a mismatch sensitive core sequence. *Sci. Rep.* 7:40638.
- Zhou, H., B. Liu, D. P. Weeks, M. H. Spalding, and B. Yang. 2014. Large chromosomal deletions and heritable small genetic changes induced by CRISPR/Cas9 in rice. *Nucleic Acids Res.* 42:10903–10914.

The Development and Application of CRISPR/Cas9 Genome Editing Platform

Shuen-Chi You¹, Yi-Wen Wang¹, Su-Yu Lin¹, Jau-Yueh Wang¹, and Da-Gin Lin^{2*}

Abstract

You, S. C., Y. W. Wang, S. Y. Lin, J. Y. Wang, and D. G. Lin. 2019. The development and application of CRISPR/Cas9 genome editing platform. *J. Taiwan Agric. Res.* 68(4):274–292.

Extreme weather caused by global warming could lead to increase of crop diseases, reduction of crop yield and food crisis. It is a top research priority to improve plant stress tolerance for the adaptation of weather extremes and food security. Plant breeding has been devised for improving crop varieties by backcross or hybridization. However, the limitation of distant hybridization and loss of genetic diversity make the breeding program difficult, and the selection of crop improvement through conventional plant breeding is inefficient and unpredictable. Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein 9 (CRISPR/Cas9) as a powerful gene editing tool has received a great degree of attention since its establishment on eukaryote. Compared with the previous gene editing technology, the CRISPR-Cas9 system is an easy to use and low-cost requirement tool. More importantly, the efficiency and accuracy of CRISPR/Cas9 system on target gene editing makes it as a widely used tool in animal, plant and human. CRISPR/Cas9 as a revolutionary plant breeding tool can facilitate precision crop improvement by controlling the gene function accurately. To provide a concept for follow-up researcher or breeding experts, we review the history of CRISPR/Cas9 system and its genome-editing mechanism. We also describe the current progress and the potential application for crop improvement.

Key words: Genome editing, CRISPR/Cas9, gRNA, Crop breeding.

Received: October 31, 2018; Accepted: May 19, 2019.

* Corresponding author, e-mail: dagin@tari.gov.tw

¹ Assistant Research Fellows, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

² Contract Associate Research Fellow, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.