

出國報告（出國類別：開會）

參加 2018 年美國實驗生物學年會
（EB 2018）報告

服務機關：台糖公司研究所

姓名職稱：李偉源 化學工程師

派赴國家：美國

出國期間：民國 107 年 4 月 20 日至 107 年 5 月 1 日

報告日期：民國 107 年 6 月 14 日

摘要

本次出差前往美國加州聖地牙哥參加 2018 年美國實驗生物學年會（Experimental Biology, EB 2018），舉辦地點為美國加州聖地牙哥會議中心（Convention Center），由 5 個美國學術研究協會主辦，舉辦期間為 107 年 4 月 21 日至 4 月 25 日。研討議題包括臨床醫學、分子生物學、營養學、解剖學、免疫學、神經生物學、代謝體學等領域。今年特別安排唐獎第二屆生技醫藥獎的得獎人張鋒（Feng Zhang）發表演說，場面盛大。

此行的目的主要為蒐集生物技術相關之最新議題發表，特別是 CRISPR/Cas 相關技術。這些資料將作為台糖公司未來推展農、畜、食品與生化工程等相關新技術研發規劃之參考。

目錄

壹、參加目的.....	4
貳、人員名單及行程摘要.....	5
參、會議內容摘錄.....	6
肆、心得與建議.....	27
附錄.....	30

壹、參加目的

為推廣「循環經濟」之理念，台糖公司已開發許多循環製程，增加再生商品的經濟規模，減少資源的投入與廢棄，達到環境保護的目的。探討台糖公司現行製程之副產品回收，可在不更改產品產出的前提下，實現循環經濟，例如全豬、全蔗、全蘭利用、工廠或畜殖場廢水處理，甚至平地造林樹種、農業廢棄物的利用等。微生物發酵工程具有控制容易、彈性高、原物料成本及能源耗費低、產品價值高、廢棄物易於處理的特性。循環製程可與微生物發酵工程結合，提高主要產品價值，例如生產菌種或酵素幫助廢棄物分解，或提高廢棄物處理效率之可行性，例如使用厭氧發酵處理工廠或畜殖場廢水。然而，微生物發酵研究最難掌握的變因是微生物的基因類型，即使在相同培養物質及生長環境下，不同基因類型仍會使代謝途徑的走向異常。若可開發新技術，減少菌種本身對發酵結果的不良影響，對發酵生產可能有些助益。

本次出席 2018 年實驗生物學年會，瞭解近期生物科學領域的重大研究成果，以及 CRISPR/Cas 技術的最新進展，作為研究開發新技術之基礎。CRISPR/Cas 技術的價值不僅只是改造生物體內之基因產生超級生物，還能使許多困難的生物科學實驗得以進行，對於生物科技的快速發展具有突破性的貢獻。藉由參加本次會議，蒐集相關生物學研究領域之最新發展趨勢與訊息，希望能對台糖公司在新產品與技術開發工作有所助益。

貳、人員名單及行程摘要

一、出國人員名單

服務機關	職稱	姓名
台糖公司研究所工程組	化學工程師	李偉源

二、出國行程摘要

日期	地點	工作內容
4月20日	臺南 - 桃園 - 舊金山 - 聖地牙哥	啟程、轉機
4月21日至 4月25日	聖地牙哥	報到並參加研討會
4月26日至 4月29日	聖地牙哥	私人行程
4月30日至 5月1日	聖地牙哥 - 舊金山 - 桃園 - 臺南	回程

參、會議內容摘錄

美國實驗生物學年會 (Experimental Biology, EB 2018) 為生物醫學領域之大型國際研討會，今年於美國加州聖地牙哥會議中心 Convention Center 舉行。該會議由 5 個美國學術研究協會主辦，50 個小型學會協辦，約有 14,000 位科學家參與。5 個主辦單位如下：美國解剖學會 (AAA)、美國生理學會 (APS)、美國藥理學與實驗治療學學會 (ASPET)、美國生物化學及分子生物學學會 (ASBMB)、以及美國調查病理學學會 (ASIP)。該會議以癌症生物學、炎症、免疫學、神經生物學、再生醫學 (幹細胞，組織再生)、生物材料、細胞傳輸 (通道與屏障)、代謝學以及代謝疾病探討等議題作為互相交流的主軸，發表的內容涵蓋多項領域。此外，今年也安排唐獎生技醫藥獎的得獎人張鋒介紹 CRISPR/Cas 系統以及重大成果，對科學界影響甚鉅。以下內容將介紹部份議題內容與實驗結論，以及將張鋒博士近年的研究成果特別提出介紹。

一、研討會部份議題內容簡介

阿拉巴馬州 Auburn 大學與巴西 Vila Velha 大學組成一個研究小組合作進行研究，利用大鼠進行餵食 Kefir 的實驗。Kefir 是一種歐洲地區的發酵牛奶飲品，可幫助維持消化系統中有益細菌的平衡。以往研究顯示，人體腸道菌相的失衡可能導致血壓升高，而補充有益腸道的益生菌製劑，具有降低血壓的作用，然而相關機制仍不清楚。他們發現補充 Kefir 九週後的大鼠的血壓較低、血中內毒素較低、以及較好的腸道功能性等。內毒素是一種與細胞破裂相關的毒性物質，而健康的腸道可以阻擋內毒素等潛在物質經由小腸絨毛細胞吸收，並允許一些物質通過。此外 Kefir 也能改善腸道中四種微生物的平衡狀態，並分泌酵素改善腦神經系統的功能，最後使血壓降低。

波多黎各大學的研究人員發表了一種利用奈米粒子，催化真菌 *Candida rugosa* 的 lipase 活性，在更低的成本下，將食用油和油脂廢物轉化為生質柴油的方法。除此之外，若在特定的溶劑中進行反應，可以使反應性進一步提高，例如使用 1,4 dioxane 作為溶劑，將會使利用氧化鐵作為載體的奈米顆粒酵素複合物的活性提高 54 倍，不過對工業製程而言，此酵素之效價仍然不足，不過對目前生質柴油製程開發領域而言，已算是不小的突破。

韓國梨花女子大學的研究團隊建立了一套使用 3D 列印的方式，透過微觀角度的列印方式，將碳水化合物和蛋白質堆疊成奈米級的結構，也使營養能更容易被身體所吸收，並能隨著個人對營養的特定需求調配。此外也有工業規模的 3D 列印食物的構想，利用大規模量產

特定配方的食品，減少生產與運輸的成本與廢棄物，不僅能滿足世界糧食需求，也能達到對環境友善的效果。

Michigan 大學的研究人員設計了一種新的化合物，使用小鼠進行動物試驗，證實可以提供緩解疼痛的效果，訊息傳遞路徑與嗎啡、鴉片等類似，然而此化合物較無成癮的風險。此實驗仍然在進行中，透過更多動物實驗佐證其結果，以充分了解此化合物對體內細胞組織的交互作用、生物的耐受性與依賴性等數據。相信未來對醫療領域有極大的幫助。

亞利桑那大學的實驗室使用大鼠進行研究，發現女性可能比男性更容易產生偏頭痛，原因可能是性別生理結構不同導致結果差異。然而，現行偏頭痛藥物的相關研究均以雄性動物模型為主，忽略性別對治療成效的影響。在美國，有超過三千八百萬的偏頭痛患者，其中至少 7 成為女性。有報告指出，女性常經歷更頻繁和嚴重的偏頭痛症狀，而且現行藥物治療方式對女性幾乎沒有反應。研究者對腦部細胞中的 NHE1 receptor，一種鈉離子/氫離子 exchanger 進行研究，發現雄性大鼠腦中的 NHE1 表現量比雌性大鼠高出 4 倍，並且雌激素濃度改變造成的波動會影響 NHE1 的表達量，使得雌性大鼠的 NHE1 含量不足導致其大腦容易有離子失調的現象，使疼痛訊號增強進而導致偏頭痛。未來他們將利用此研究平台進行新型療法的開發。除此之外，美國國立衛生研究院（NIH）更提出相關報告，強調性別差異導致不同的疾病作用途徑結果，應作為未來生科領域的重點研究方向之一。

肯塔基州 Sullivan 大學的研究人員發表了大麻萃取物對人體的生物交互作用，以及對卵巢癌的延緩作用。已知一種細胞因子介白素 IL-1 β 的產生可能會促進癌症的進程，此大麻萃取物可抑制介白素 IL-1 β 的分泌，表示其可能有一定的抗癌作用。目前卵巢癌的治療藥物 Cisplatin（順式-二氯二氨合鉑(II)）具有毒性，未來可望運用此萃取物輔助治療，降低 Cisplatin 的劑量。

紐約 Clarkson 大學的研究人員對老年人步態進行研究，他們發現步行的表現其實際上與身體疲勞無關，而是與「認知疲勞」有關。他們請一群平均年齡 75 歲的志願者們進行 6 分鐘的步行，記錄步行速度和步伐幅度作為身體狀態的參考數據，並在運動前後在一屏幕上進行特定的數字符號識別之活動，作為身體疲勞的參考數據，若是身體因運動失去精力，數字的識別成績應會隨之下降。統計分析後發現，步行測試 30 秒後，步行速度和步幅長度顯著降低，但卻與步行後數字的識別成績無關。實驗結果顯示，運動感到疲累可能僅是「感覺」疲累，未來將進一步探討相關問題。

二、CRISPR/Cas 系統近年重大成果介紹

張鋒 (Feng Zhang) 博士是唐獎第二屆生技醫藥獎的得獎人之一，在今年的實驗生物學年會上，他以「利用生物多樣性驅動基因編輯 (Harnessing Nature's Diversity For Gene Editing And Beyond)」為題發表演說，約有 6,000 多人出席，場面盛大；職有代表台糖公司出席此盛會，一睹大師風采而感到榮幸。許多人相信這是繼基因選殖技術 (cloning) 與聚合酶連鎖反應 (PCR) 技術問世以來，分子生物學史上最偉大的技術之一。由於此議題之重要性，以下內容將對張鋒博士發表的 CRISPR/Cas 系統研究工作及演講內容進行撰述。

張鋒博士是麻省理工學院腦與認知科學系與生物工程學系合聘終身教授、麥戈文腦科學研究所 (McGovern Institute) 研究員、以及布羅德生物醫學和基因組研究所 (Broad Institute) 的核心成員；1982 年出生於中國河北省石家莊市，11 歲隨家人移居美國；2004 年在哈佛大學取得化學及物理學士，5 年後在史丹福大學取得化學及生物工程博士。他在 2011 年進入麻省理工學院，以遺傳機制的角度深入探討神經科學與人類疾病，他的實驗室於 2013 年獨立發展出 CRISPR/Cas9 系統，並且利用此系統成功進行了人類及小鼠細胞的 DNA 修飾，首次證實 CRISPR/Cas9 技術可跨越物種間限制。此突破性發展使他獲得多種國際研究獎項，於 2017 年僅 35 歲就成為麻省理工學院史上最年輕的華裔終身教授，並躍升成為國際知名學者，甚至被預測是未來問鼎諾貝爾獎的人選之一。

CRISPR/Cas 系統是一套應用於編輯生命體基因組的技術，相較於舊有基因編輯方法例如鋅指 (Zinc finger, ZF) 蛋白或是轉錄激活劑樣效應物 (transcription activator-like effectors, TALE) 而言，具有靈敏、簡單、快速、高準確率等優點，已被廣泛應用於多種領域之研究，特別是醫學、新藥開發、以及基因治療 (gene therapy) 相關領域。基因治療的概念是利用這些基因編輯技術編輯重症病患體內基因達到治療效果，仍屬近年才產生的概念。目前雖尚未有核准上市的 CRISPR/Cas 基因療法，不過許多臨床試驗已在進行中。未來許多絕症或慢性病患者或許可藉助基因療法得以痊癒，例如 HIV (藉助 CCR5 基因突變)、阿茲海默症 (藉助 ApoE 基因突變)、糖尿病 (藉助 SLC30A8 基因突變)、杭丁頓氏舞蹈症、囊腫性纖維化症、鐮刀性紅血球貧血症、以及各種癌症等。除此之外，CRISPR/Cas 技術也被應用在農業、畜牧業、材料製造業、以及生質能源等行業之製程開發，具有潛在商業價值。

CRISPR 序列是一段 DNA 序列，早在 1987 年就由大阪大學的石野良純等人在大腸桿菌中發現，後來證實是細菌 (Bacteria) 及古細菌 (Archaea) 發展出的一套針對外來 DNA 入

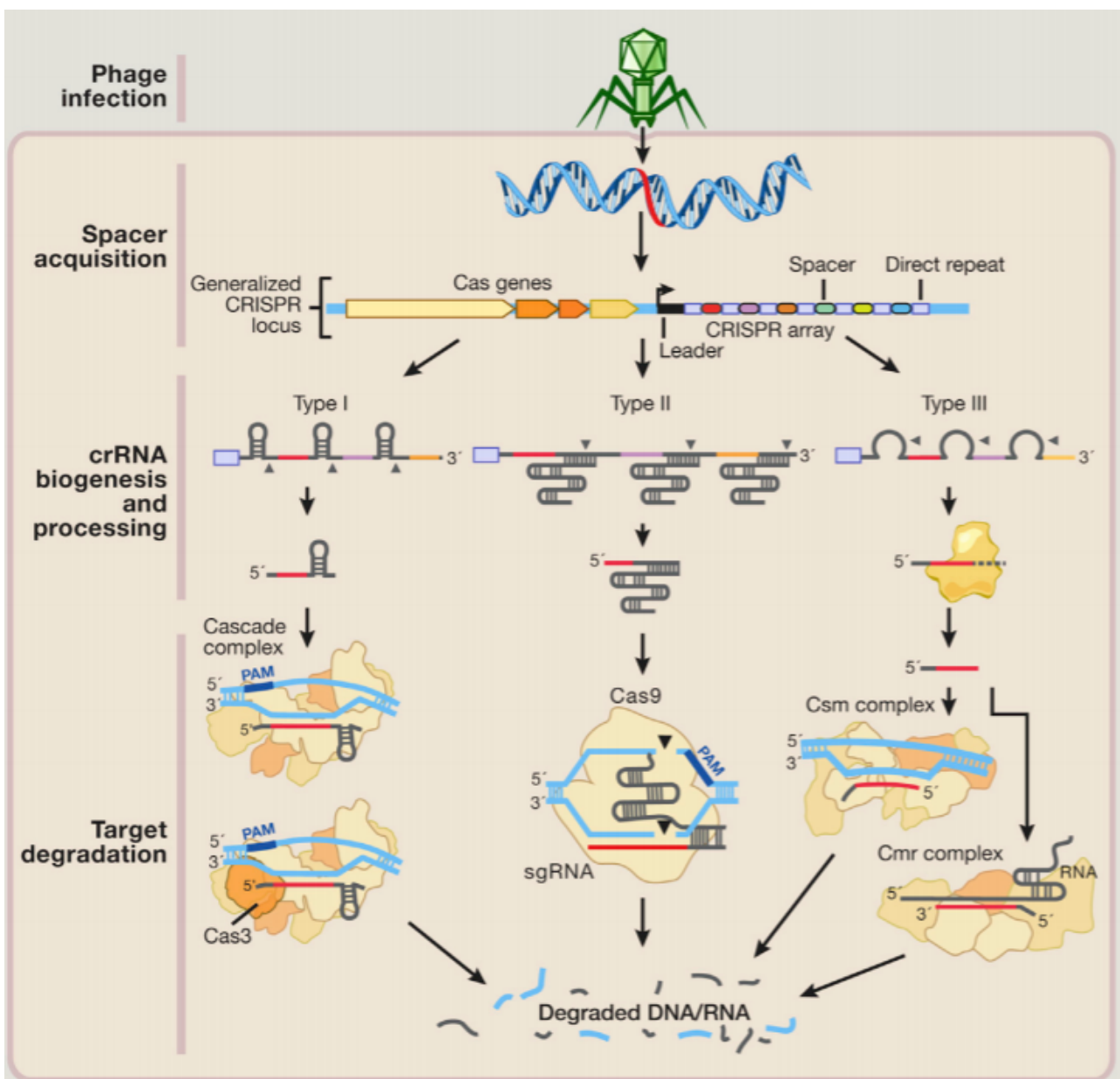
侵，例如噬菌體基因或質體的防禦策略。2002年科學家鑑定出數種CRISPR關聯蛋白（CRISPR associated proteins，簡稱Cas）之功能。後來又發現Cas第9號蛋白（簡稱Cas9蛋白，每種Cas蛋白依照發現順序以數字命名）的功能具有將DNA進行雙股斷裂（Double strand break，簡稱DSB），以及在*Streptococcus pyogenes*菌種中，CRISPR序列與Cas9蛋白之間具有關聯，此時才將這套系統命名為CRISPR/Cas系統，科學家們才瞭解此系統可能有用於基因編輯的潛力。2011年，Emmanuelle Charpentier博士發現CRISPR序列中轉錄出的兩種RNA（crRNA與tracrRNA）與Cas9蛋白進行基因編輯有關。Jennifer A. Doudna博士則發現這兩種RNA會嵌合在一起形成sgRNA，Cas9蛋白可能藉由此RNA去尋找目標基因。兩位科學家一齊合作，於2012年發表了一種基因編輯技術，可以在試管中自由剪輯*S. pyogenes*的基因。此技術可大幅減化實驗步驟，使基因體剪輯更有效率。在同一時間，張鋒博士的實驗室獨立設計CRISPR/Cas9系統的實驗方法，於2013年率先發表在人類及小鼠細胞成功進行單一及多重基因切除，以及基因的同源重組修復（homology-directed repair）的結果，使得運用CRISPR/Cas9系統一次修復多組基因的構想成為可能。2016年，三人因為基因修飾技術的重大突破，一齊獲得第二屆唐獎的生技醫藥獎。至今二方研究團隊仍然在歐美等國家競爭CRISPR/Cas9技術的專利權。儘管如此，科學研究者仍可受研究除外（research exemption）原則保障而有使用這些專利的權利，使得CRISPR/Cas9技術得以持續蓬勃發展，在眾多產學界科學家的投入下，也讓許多變化版的CRISPR/Cas系統的專利技術問世。

以下內容將開始進行CRISPR/Cas系統的介紹。CRISPR序列的全名是「常間回文重複序列叢集（Clustered regularly interspaced short palindromic repeats array）」，由多種不同功能性序列組成，由5'端至3'端分別是：（1）trans-activating crRNA（簡稱tracrRNA）的DNA序列、（2）Cas cassette序列、（3）leader序列、以及（4）characteristic array。目前已經發現數種類型的Cas基因，可以產生各種Cas蛋白，具有不同的作用。Cas基因與CRISPR序列共同演化，形成了在細菌中高度保守的CRISPR/CAS系統。leader序列具有作為啟動子（promoter）表現下游端序列的功能。characteristic array則是由眾多短而保守的direct repeat序列與spacer序列依序組成，direct repeat序列是相同的序列，spacer序列則是從不同外來的遺傳物質擷取下來的基因片段。

Streptococcus pyogenes SF370 type II CRISPR locus



基因編輯的概念，主要是讓生物體內之目標基因透過與核酸酶結合位（Nuclease domain）的交互作用進行 DNA 雙股斷裂，再透過細胞內部既有的內生性（endogenous）修復機制將基因序列修復。若要作用在特定的基因序列上，則必須仰賴 Nuclease domain 上的基因結合位，例如透過 DNA binding domain 辨認 DNA 序列。不同基因編輯機制擁有不同種類的 Nuclease domain，例如 ZF 的稱為 FokI，CRISPR/Cas 則有 RuvC、HNH、HEPN 等。



CRISPR/Cas 系統經過數年研究，目前已被歸類成 2 大類 (class) 共 6 種模式 (type)，為了更容易理解，首先介紹最早被發現的 3 種 CRISPR 系統的運作機制，均有三個階段：(1) 適應階段 (Adaptation stage)、(2) crRNA 成熟階段 (Maturation stage, crRNA 即 CRISPR RNA 的縮寫)、以及 (3) 干擾階段 (Interference stage)。

適應階段 (Adaptation stage) 過程如下：外來的遺傳物質例如噬菌體感染或是質體 DNA 進入宿主細菌後，Cas1 與 Cas2 蛋白便結合上去進行掃描並截取一段序列，整合到細菌基因組的 CRISPR 序列之中，這段序列稱為 protospacer，約 17~20 枚 nucleotide (簡稱 nt) 所組成。protospacer 兩端延伸出來的幾個 base pair (簡稱 bp) 稱為 protospacer adjacent motif (簡稱 PAM) 通常由 NGG 三個鹼基構成 (N 為任意鹼基)，Cas1/Cas2 蛋白識別出外來的遺傳物質上的 PAM 區域，然後將臨近 PAM 的 protospacer 截斷，並在其他蛋白酶的協助下，將擷取下來的 protospacer 插入臨近 CRISPR 序列中 leader 序列的下游，再插入一段 direct repeat 序列將這段新的 spacer 隔離。如此一來，一段新的 spacer 就被添加到了基因組的 CRISPR 序列之中。

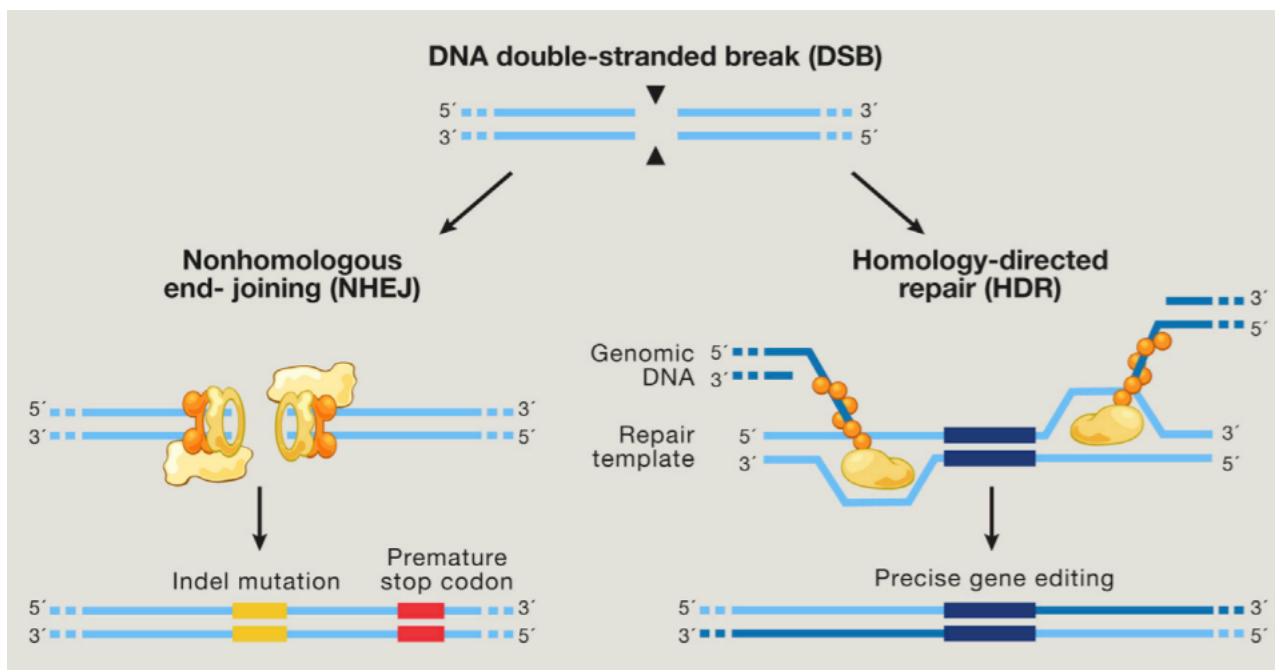
在 crRNA 成熟階段 (Maturation stage) 中，CRISPR 序列在 leader 序列的調控下，轉錄出 pre-crRNA (precursor CRISPR RNA)、tracrRNA (trans-activating crRNA) 兩段 noncoding RNA 以及 Cas 蛋白的 RNA，repeats 與 spacers 仍然彼此連接在 pre-crRNA 上。在 type I 與 type III 系統中，pre-crRNA 透過特定 Cas 蛋白剪成各種只含一段 spacer 的片段，再由某種 RNase 進一步修飾以產生成熟的 crRNA。

在 type I 系統中，crRNA 和由多種功能性蛋白組合而成的複合物結合形成 Cascade complex (CRISPR-associated complex for antiviral defense) 進行外源 DNA 識別。Cas3 蛋白與 Cascade complex 結合後才具有剪切外源 DNA 的能力。在 type III 系統中，同樣有 Cascade complex 結構，可以剪切雙股 DNA 與單股 RNA，不過與 type I 系統使用的 Cas 蛋白組合不同，用於剪切雙股 DNA 需要 Csm 蛋白家族配合，剪切單股 RNA 的蛋白則需要 Cmr 蛋白家族配合。type III 系統是初期研究發現唯一能進行 RNA 編輯的 CRISPR/Cas 系統，顯示此系統可能針對 RNA 病毒，或是僅將外來 DNA 轉錄出 RNA 時才進行干擾作用。

在 type II 系統中，tracrRNA 先與 pre-crRNA 上 direct repeat 雜交 (Hybridization) 形成 hybrids complex，再被 RNase III 以及其他核酸酶剪成同樣只含一段 spacer 的 RNA 及 tracrRNA 的連接片段，再進一步修飾形成 sgRNA (single guide RNA)。type II 系統的 effector protein 並非多種功能性蛋白的組合物，只需要一種 Cas9

蛋白就可以進行外源 DNA 剪切。值得一提的是，type I 與 type III 系統須結合許多擁有不完整功能的蛋白，形成複合物才能具有外源遺傳物質的干擾作用。type II 系統只需要 Cas9 一種核酸酶就可以達到所有功能，原因是 Cas9 蛋白序列上具有所有功能性蛋白序列。因此，科學家們便將 type I 與 type III 的機制歸類成 class 1，type II 機制歸類成 class 2。

當外來的遺傳物質例如噬菌體或是質體 DNA 再次入侵宿主細菌時，將進入干擾階段（Interference stage）。type I 與 type III 的 Cascade complex 或是 type II 的 sgRNA/Cas9 複合物會和外來的遺傳物質結合，掃描辨識外源遺傳序列的 PAM 區域、識別 crRNA 或 sgRNA 對外源遺傳序列中的互補序列、若有互補序列則進行雜交並使外源 DNA 雙股解開。在 type II 系統中，已知 sgRNA/Cas9 複合物和外源 DNA 結合時，造成蛋白質結構改變，形成一條通道以容納 RNA-DNA heteroduplex 結構（Jinek et al., 2014）。外源雙股 DNA 被解開，其中一股以 sgRNA 進行 α -helical recognition，而後 Cas9 蛋白上兩個 catalytic domain 會將雙股 DNA 進行 DSB（Jiang F et al., 2016）：HNH domain 切斷與互補之 DNA 結合之外源 DNA，RuvC domain 則切斷另一股未配對 DNA，使外來 DNA 無法在細菌內複製。



遺傳物質在經歷了 CRISPR/Cas 系統的剪切後會開始進行 DSB 的修復機制。菌體內具有不需要透過外來訊息傳遞路徑來啟動的二種內生性（endogenous）修復機制，分別為：同源性直接修復（homology-directed repair, HDR）與非同源性末端連接（nonhomologous end-joining, NHEJ）。HDR 的原理是利用 Rad51 蛋白與同源染色體上相對應的基因座比對，修復染色體上的 DSB，此修復方式較能將基因正確修復。NHEJ 不依賴同源染色體作為模板，

僅透過 Ku 蛋白（一種 heterodimers）與二斷裂點合併將其拉近並接合。然而，NHEJ 僅將斷裂的雙股 DNA 接合，並未進行鹼基配對錯誤或基因缺失之檢查，因此 DSB 過程中產生的 DNA 排列錯誤會被保留下來，此缺失突變將無法合成對應的蛋白，達到將特定基因 knock out 的目的。

Table 1 | Plasmid-interfering mutants obtained during plasmid stability assay.

PIM	Spacer acquired* (5' to 3')	PAM†	Gene‡	Position on pNT1	Strand	Transformation with pNT1§ (CFU per µg DNA)	Number of times isolated
DGCC7710 _{pNT1} ^{+S43}	GATCAAATAACTAATAAATACCCAGTACTT	<u>TGCAGAAG</u>	-	29	-	-	1
DGCC7710 _{pNT1} ^{+S44}	GACCCCTTTTAAGTGCCGAGTGCCAAAT	<u>TGAGAA</u>	<i>dso</i>	63	+	-	1
DGCC7710 _{pNT1} ^{+S45}	TATACTGGGTTAATTATACCGTATGGCAA	<u>AAGAAA</u>	-	436	+	4.4 ± 3.5	1
DGCC7710 _{pNT1} ^{+S46}	TTTCCAATCTTCTGGAATTGAATCGGGAT	<u>AGAGTAG</u>	<i>rep</i>	528	-	3.7 ± 2.6 × 10 ²	2
DGCC7710 _{pNT1} ^{+S47}	CATGATCTGCAATAATATTGCAGACCTCGT	<u>CTAGAA</u>	<i>rep</i>	917	-	-	1
DGCC7710 _{pNT1} ^{+S48}	GATGATCTGCAATAATATTGCAGACCTCGT	<u>CTAGAAT</u>	<i>rep</i>	918	-	-	2
DGCC7710 _{pNT1} ^{+S49}	CGATGATCTGCAATAATATTGCAGACCTCGT	<u>CTAGAAT</u>	<i>rep</i>	919	-	-	1
DGCC7710 _{pNT1} ^{+S50}	AATTTAGTTCCGTCAGTAGATTATGAACT	<u>GGAGAAG</u>	<i>rep</i>	1074	+	-	1
DGCC7710 _{pNT1} ^{+S51}	AAAAGCAATGAGTTACATGGTTGCAAGAAT	<u>GCAGAA</u>	<i>mob</i>	1488	+	-	4
DGCC7710 _{pNT1} ^{+S52}	GCCCCAGCTTACTATCAAGGAGCTTTCACG	<u>GCATAAA</u>	<i>sso</i>	1999	-	-	1
DGCC7710 _{pNT1} ^{+S53}	CGCCACAGTTACTTGCTGTCAAGGAGACC	<u>ATCGAAT</u>	-	2066	+	-	6
DGCC7710 _{pNT1} ^{+S54}	TCGTTTGTGAACTAATGGGTGCTTTAGTT	<u>GAAGAAT</u>	-	2246	-	-	4
DGCC7710 _{pNT1} ^{+S55}	AGAGTTTATGATTTATACCTTCTGATGT	<u>AGAGAAA</u>	<i>cat</i>	2717	+	-	3
DGCC7710 _{pNT1} ^{+S56}	TTCTTCAACTAACGGGCGAGTTAGTGACA	<u>TTAGAAA</u>	-	3114	-	-	2
DGCC7710	-	-	-	-	-	1.4 ± 0.6 × 10 ³	-

CFU, colony-forming units; PAM, proto-spacer adjacent motif; PIM, plasmid-interfering mutant.

* Nucleotide mismatch with pNT1 sequence is underlined.

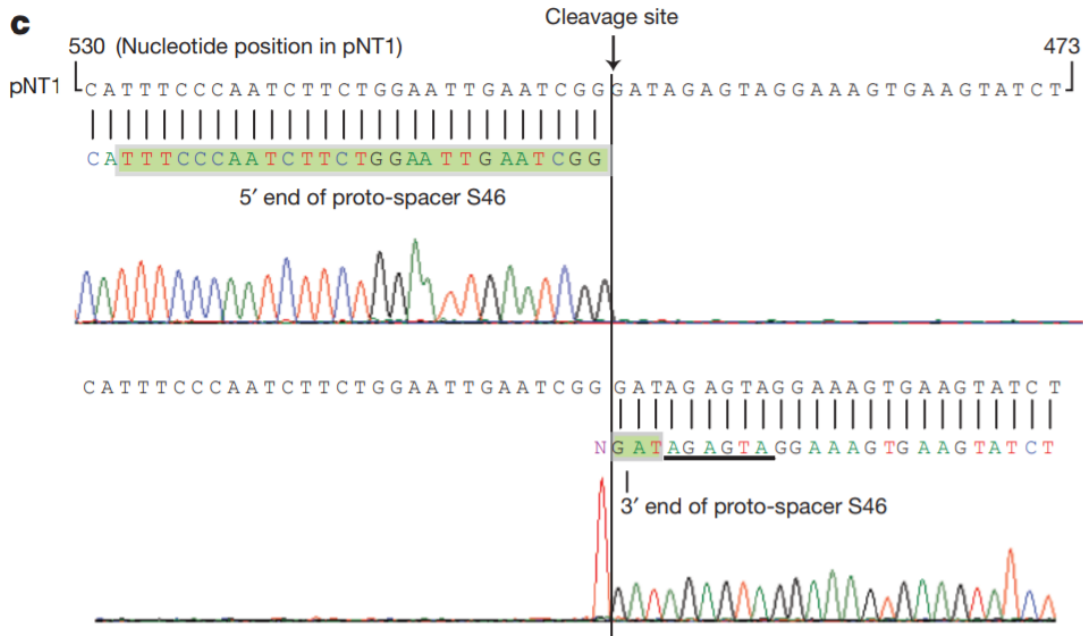
† Nucleotide mismatches with the CRISPR1 proto-spacer adjacent motif (NNAGAAG) are underlined.

‡ The '-' symbol indicates an intergenic region.

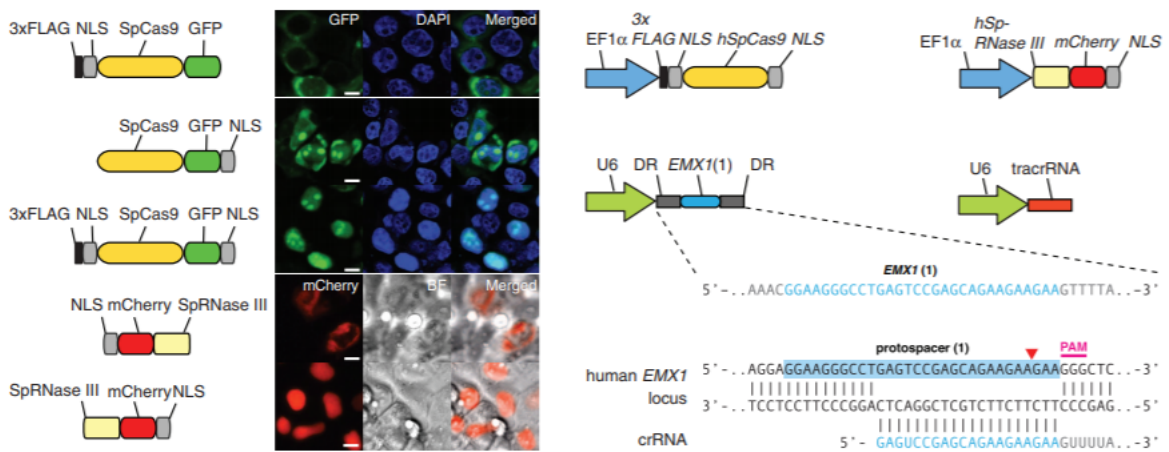
§ The '-' symbol indicates that pNT1 could not be electroporated into the plasmid-interfering mutants (<1 CFU per µg DNA), n ≥ 2.

|| The number of times that each plasmid-interfering mutant was isolated in the assay.

在早期的 CRISPR/Cas 相關研究中，法國科學家 Sylvain Moineau 的研究團隊的發現對後續的研究打下了基礎。2010 年，他們證實 CRISPR/Cas 系統不僅會剪切外來質體，也能將質體 DNA 進行精準的剪切。他們將嗜熱鏈球菌 *S. thermophilus* 的 pNT1 原生質體嵌入氯黴素抗性基因 *cat*，大量複製後以電穿孔模式引入菌體內進行液態培養 60 代後，培養成菌落並投入氯黴素進行篩選。在約 900 個菌落的篩選中發現有 54 個菌落無抗生素抵抗力，表示質體被丟失，分析這 54 個菌落的 CRISPR 序列發現某些 spacers 與 pNT1 質體同源，這些 spacers 經序列分析後鑑定了 14 種，顯示此菌種可以將質體切割獲得 spacers 並嵌入 CRISPR 序列。將這 14 個 spacers 與下游端 PAM 一齊分析，發現以四種簡併基因序列（degenerate motif）對照（NNAGAAG，NNATAAA，NNG GAAT 或 NNAGAAG）半數下游的 PAM 有一或兩個 Nucleotide 錯配現象，而 spacer 配對的選擇性相對較高。

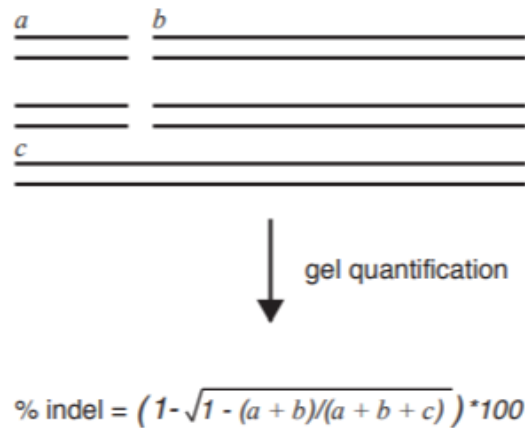


其中，將PIM S46 菌株 (plasmid-interfering mutants 質體被干擾後之相同菌株) transformation 後，仍帶有 pNT1 及氯黴素抗性。後來發現雖然此質體仍然存在 (分子量不變) 只是被切斷形成線性形式，但仍然具有氯黴素抗性。後來他們將其定序後發現，線性 pNT1 質體兩端與從 PIM S46 菌株發現的 spacer 完全吻合，顯示菌體透過 spacer 來標記質體上對應之 DNA 序列並將其切割。

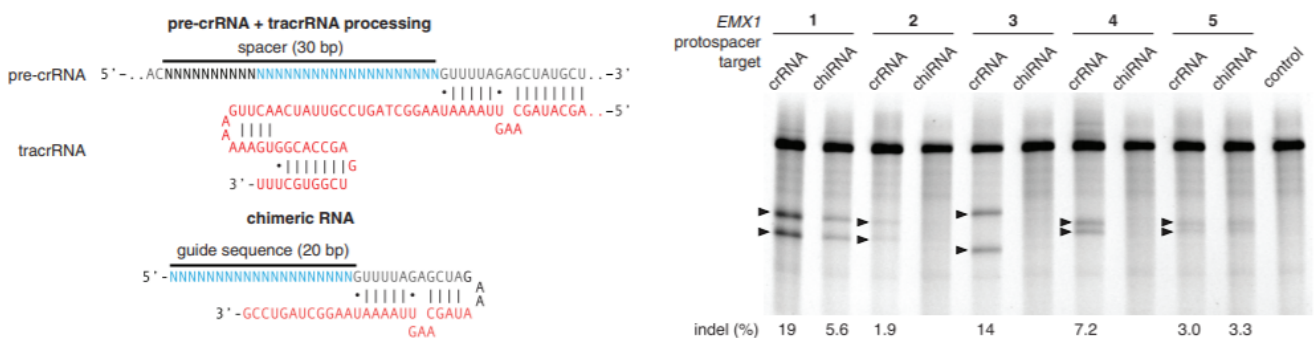


2013 年，張鋒博士研究團隊以 *S. pyogenes* SF370 的 CRISPR/Cas9 系統進行人類 EMX1、PVALB 以及小鼠 Th 基因座的 DSB 實驗。他們製作了 tracrRNA，pre-crRNA，RNase III 和 Cas9 這四類物質的表達載體，將 *S. pyogenes* 的 Cas9 和 RNase III 基因序列接上螢光信號蛋白 (發綠光的 GFP 或發桃紅光的 mCherry) 與兩段 nuclear localization signals 的基因序列，以 elongation factor 1 α (EF1 α) 啟動子表達，使蛋白順利進入細胞核內。pre-crRNA 部分，已知人類 EMX1 locus 有 5 段核苷酸序列符合 Cas9 配對所需的 NGG 核苷酸

序列作為 PAM，擷取其中一段 GGG 核苷酸序列的上游序列作為 protospacer，設計一段相同序列，前後接上重複序列 direct repeats，以 U6 啟動子表達。tracrRNA 則直接接上 U6 啟動子利用其表達。完成以上工作後，將這四種表達載體以不同排列組合進行哺乳動物細胞之 transfection，在完成 DSB 後，哺乳動物細胞會藉由 NHEJ 進行雙股 DNA 修復，藉由 DNA 連接酶直接將斷裂點接起來，所以使用 SURVEYOR 核酸酶分析法來檢測 SpCas9 是否有成功切割。

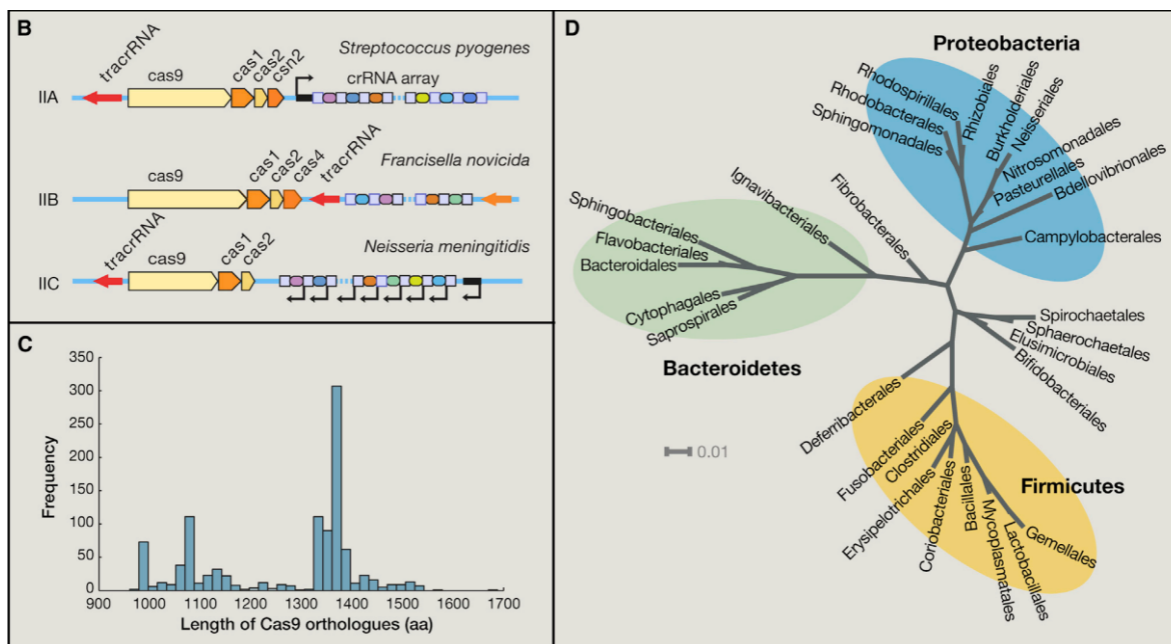


萃取 Cas9 修飾後 DNA 樣品及未修飾 DNA，純化後以其為模板進行 PCR，將二者混合加熱使其變性成為單股 DNA，再降溫使其重新配對黏合成單股，產生 heteroduplexes。以 Cas9 剪切 DNA 序列再進行 NHEJ 修復過程為一動態過程，期間容易在剪切位點上發生基因突變，surveyor 核酸酶會將錯配位置進行 DSB，使 DNA 序列變短。統計 DSB 後的短鍊 DNA，計算序列的插入與刪除 (insertion/deletion, Indels) 值，Indels 越高顯示 Cas9 順利剪切 DNA 序列。



此外也設計一套模擬 CRISPR 序列，分別表達 pre-crRNA 與 tracrRNA 的載體，以及另一套可同時表達 pre-crRNA 與部分 tracrRNA 序列並相互黏合形成 chimeric RNA 的載體，後者的 tracrRNA 序列僅保有與 crRNA 融合的部分。結果發現 pre-crRNA : tracrRNA 組切除的效率比 chimeric RNA 來的高，原因可能有 RNA 無法有效表達、RNA 干擾或 Cas9 蛋白結構變異

等。此外他們也成功編輯人類 PVALB 以及小鼠 Th 基因座，均得到類似結果，顯示 CRISPR / Cas 系統可廣泛適用在不同生物體。

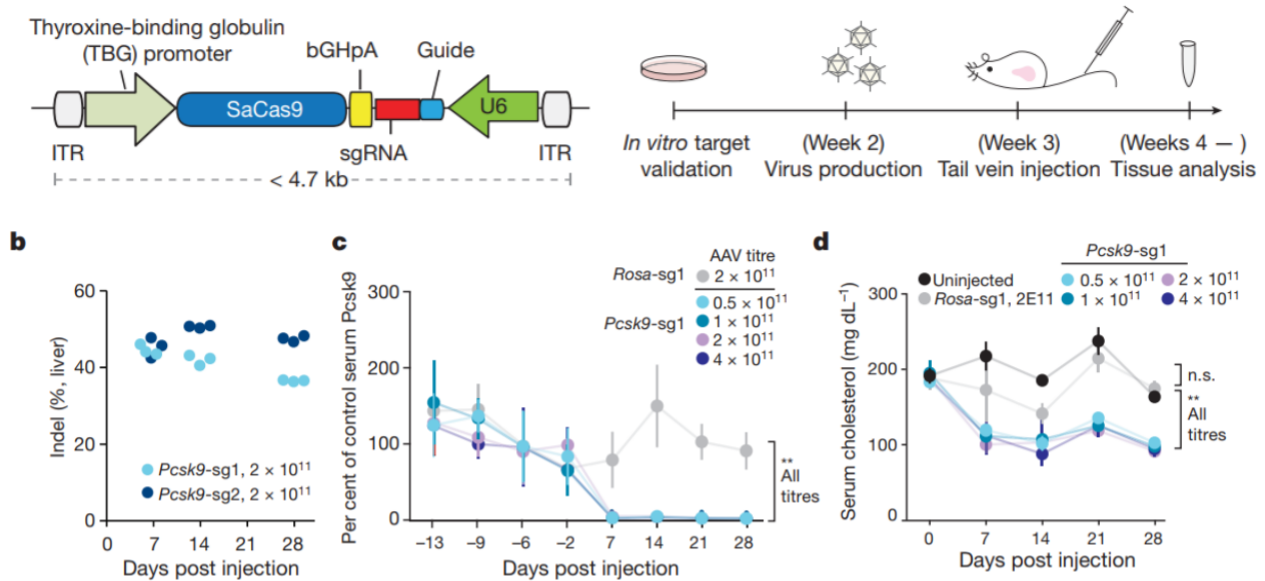


然而當時的 CRISPR / Cas 系統仍然有諸多缺點，為了找尋最佳的表達系統，他們分析了許多菌種的 CRISPR 基因，建立其親緣關係圖譜，也發現了許多 CRISPR / Cas9 亞型，大約分成三類：type II 主要由 Cas9，Cas1 和 Cas2 基因以及 CRISPR 序列和 *tracrRNA* 組成。type IIC 僅含有最小量的 Cas 基因，而 type IIA 和 type IIB 分別具有 *Csn2* 或 *Cas4* 基因。

他們也進行 CRISPR / Cas9 系統的優化。若要應用 CRISPR/Cas9 系統對動物細胞進行基因修飾，來自 *Streptococcus pyogenes* 的 SpCas9 蛋白基因太龐大，難以在組織內細胞間進行輸送。因此利用低免疫抗原性的腺伴隨病毒 adeno-associated virus (AAV) 作為載體進行 transfection，然而 AAV 可承載的序列空間為 1000 個鹼基左右，對 SpCas9 蛋白序列而言仍然太小，後來發現 *Staphylococcus aureus* 的 SaCas9 較小，較容易進行實驗。

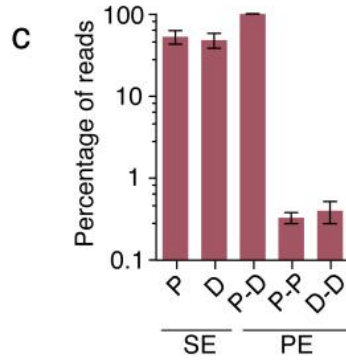
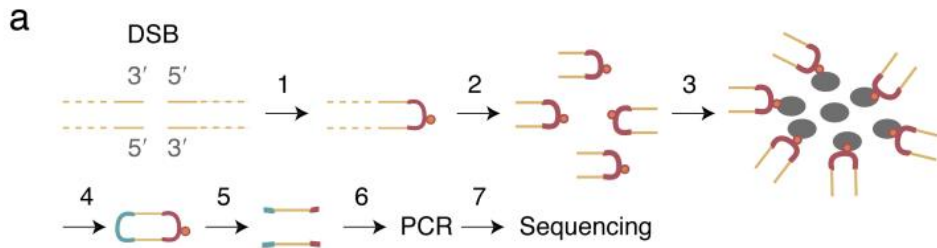
選擇的目標基因是 PCSK 蛋白基因，其與高血脂症的產生有關。高血脂症的產生來自血漿中脂蛋白的代謝異常，導致三酸甘油酯或膽固醇脂在血漿中的濃度異常升高。若攝取過量碳水化合物，促進肝臟釋放極低密度脂蛋白 (VLDL) 至血液循環中，細胞組織吸收三酸甘油酯，將 VLDL 轉變成低或高密度脂蛋白 (LDL 或 HDL) 回到肝臟代謝，其中 LDL 會被肝臟細胞膜上的 LDL receptor (LDLR) 辨識結合，將 LDL 帶進細胞內代謝，之後 LDLR 會回到肝臟細胞膜上繼續作用。然而 Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9 (PCSK9) 會先和 LDLR 結合，在捕捉到 LDL 形成複合物後進入肝細胞內被代謝，LDLR 在此路徑中將一併被代謝，無法重新回到細胞膜進行作用，使細胞膜上 LDLR 數量減少，LDL 逐漸累積在血液中而

產生高血脂症。研究顯示 PCSK9 蛋白丟失，與心血管疾病風險降低，以及血液中 LDL 濃度降低具有相關性。PCSK9 抑制劑也成為一類心血管疾病之相關藥物。

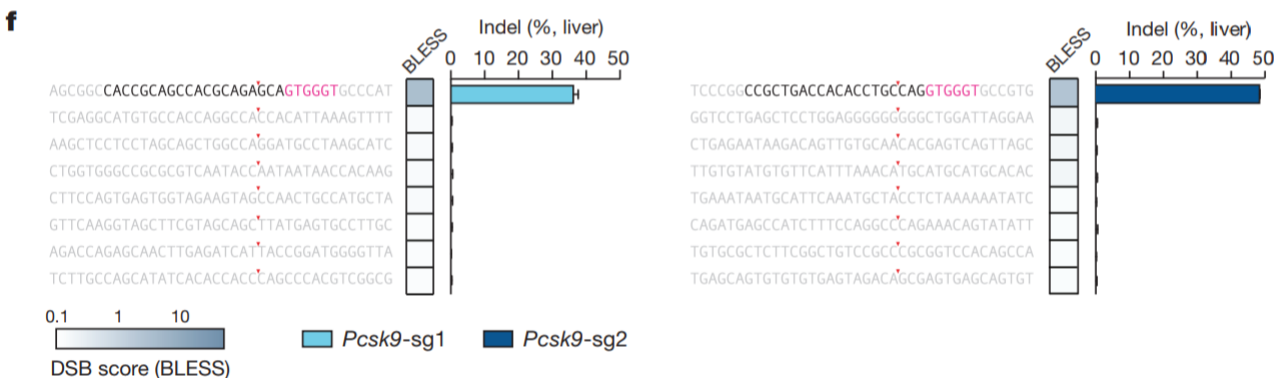
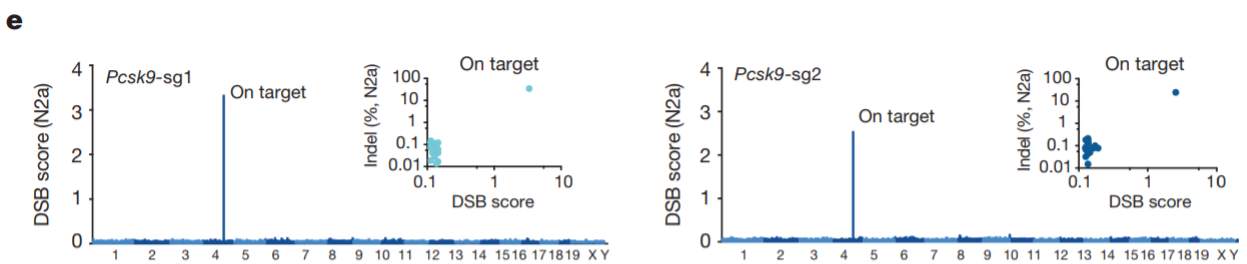


在此實驗中，設計了兩種 PCSK9 基因的 single guide RNA (sgRNAs) 序列，分別為 sg1 與 sg2，與 SaCas9 序列一齊放進 AAV 內（總量約 2×10^{11} 個）並注射到小鼠中。給藥數日後犧牲進行肝組織切片採樣，觀察到整個肝組織的任一位置之 indel 在給藥一週、二週、四周後均在 40% 左右，顯示確實進行基因編輯；此外，給藥一周後，血漿中 Pcsk9 蛋白降低 95%，總膽固醇降低 40%，此二現象均持續四周。

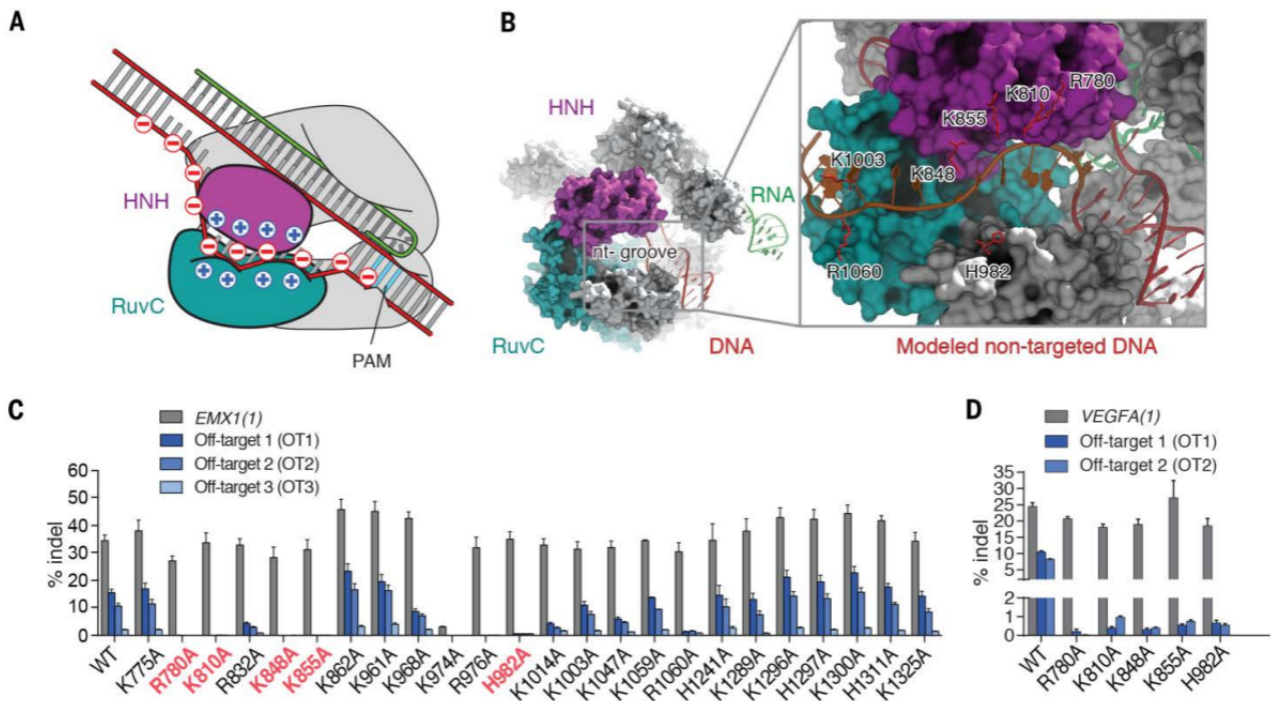
此外也應用 BLESS 方法進行基因修飾之脫靶檢測。部份經過編輯的 DNA 序列中，與 sgRNA 其實並沒有完全互補，而 Cas9 仍會在沒有完全互補的狀態下進行 DSB，這種現象稱為「脫靶」，此情形將可能對基因組編輯技術構成了一些風險。



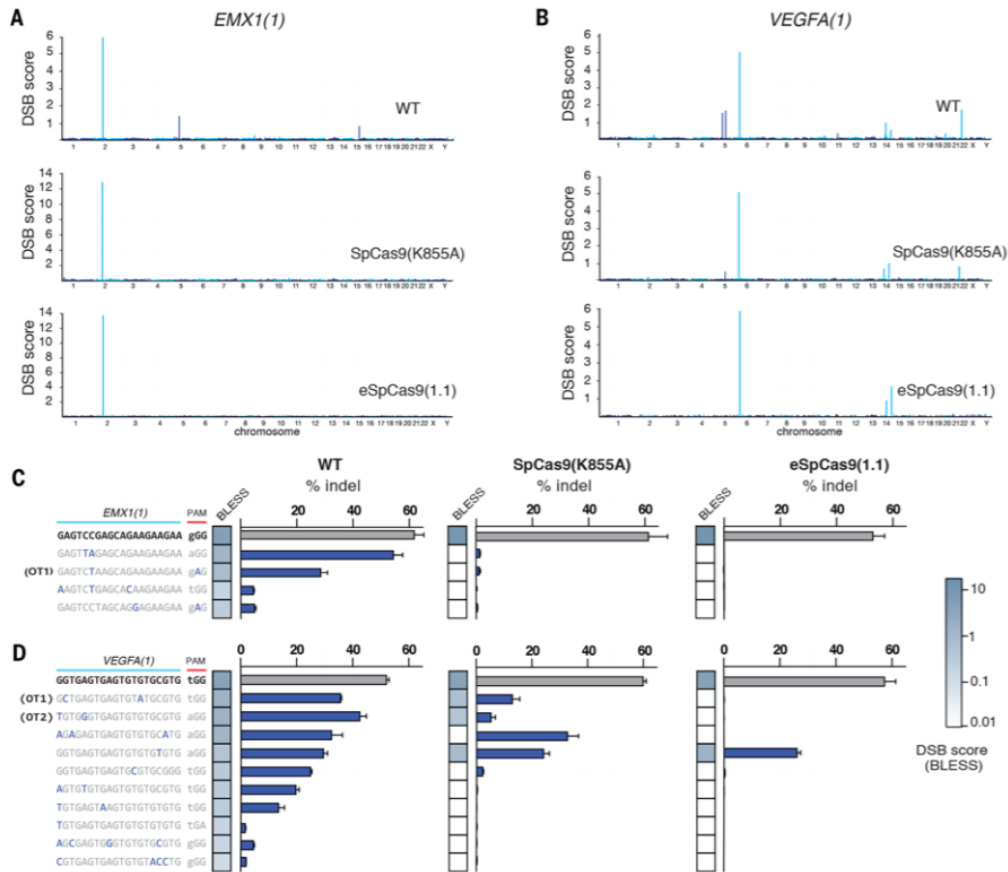
BLESS 方法 (direct in situ breaks labeling, enrichment on streptavidin and next-generation sequencing) 是一種可以擷取出哺乳動物細胞 DNA 序列中 DSB 位置之兩端序列進行基因定序的方法。方法為使用 T4 ligase 辨識 DSB 位置後，利用帶有 Biotin (維生素 B7) 的 linker 會與 DSB 兩端之 DNA 連接。使用 XhoI 限制酶辨識雙股 DNA 上特定序列 (CTCGAG, 稱為 XhoI site) 進行 DSB, 形成許多雙股 DNA 片段。加入 streptavidin 利用其與 Biotin 之高度親和力使這些雙股 DNA 片段聚集在 streptavidin 上，再加入第二種 ligase, 其可辨識 XhoI site 並將相同 linker 接上游離 DNA 片段的二端。將 linker 切斷即可獲得許多單股 DNA 片段，就可以進行 PCR 及全基因體定序。



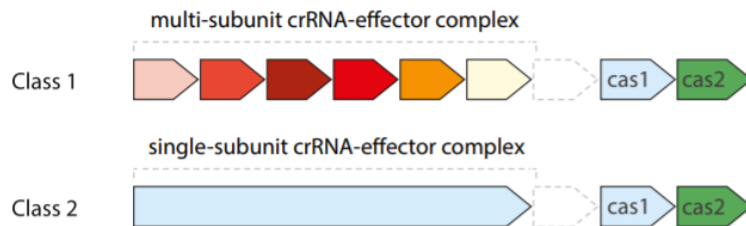
使用 BLESS 方法檢測動物細胞基因組中的 DSB 位置周圍的序列是否均來自基因修飾。將帶有 SaCas9 載體之 AAV 與 CMV（巨細胞病毒，cytomegalovirus）轉染到小鼠神經母細胞瘤-2a（Neuroblastoma-2a, N2a）細胞中，四周後應用 BLESS 檢測基因組中的 Cas9-誘導的 DSB。結果發現除了修飾位點以外，整個基因組的 DSB 數量非常低。因此證明藉由 SaCas9 調控的基因編輯系統具有高度專一性。



為了提高正確編輯的效果，使用 structure-guided protein engineering 方法進行探討，以提高 SpCas9 專一性。Cas9 蛋白上與外源 DNA 之 PAM 區域交互作用之溝槽（non-target strand groove 簡稱 nt-groove）主要由 HNH、RuvC 兩種 catalytic domain 突出部份所組成，均帶有正電荷，容易與帶負電之非互補 DNA 序列（not-complementary DNA 簡稱 ncDNA）結合並穩定 DNA 雙股解開之結構。將 Cas9 蛋白上 nt-groove 進行單一位點之氨基酸突變成丙胺酸，降低這些突變位點周圍之 subdomain 在一般環境下攜帶正電荷的量，理論上會減弱 nt-groove 與 ncDNA 之親和作用，使得 cDNA 更容易與 ncDNA 在雙股解開後重新進行雜交，理論上雖然 Cas9 蛋白活性會降低，但可提高基因配對的專一性。一共製作 32 種 subdomain 的突變，對人胚胎腎細胞 human embryonic kidney (HEK) cells 中的 EMX1 與 VEGFA 基因進行編輯，結果發現其中 5 種突變後的 SpCas9 的專一性顯著提高，這 5 種突變 subdomain 命名如圖中紅字所示。

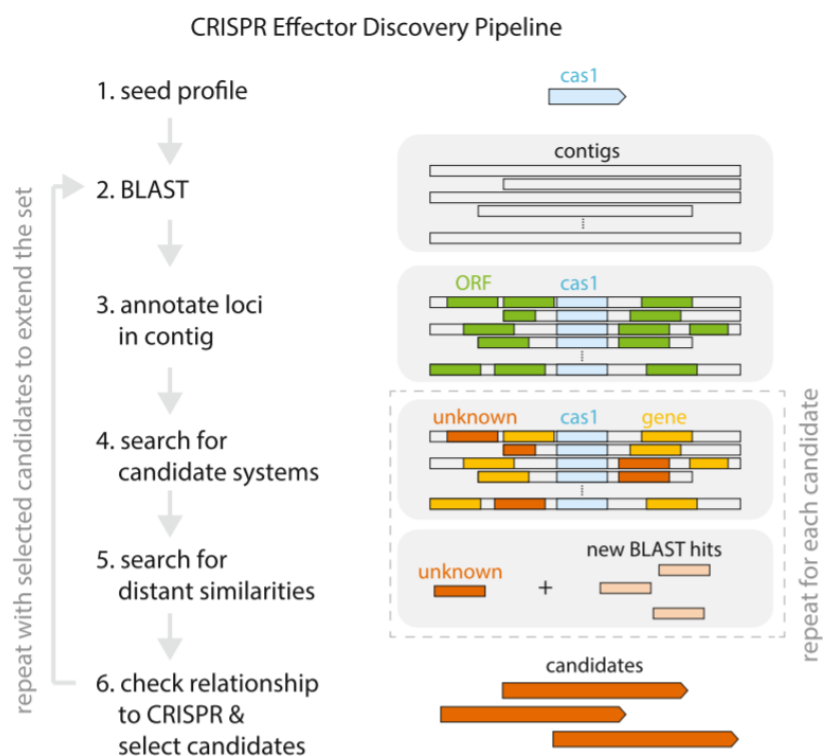


他們找出這 5 種 SpCas9 中的突變位點，排列組合進行突變，最後得到 1 種專一性最高之 SpCas9 (K848A / K1003A / R1060A)，將其命名為 eSpCas9 (1.1)，上圖為 SpCas9、SpCas9 (K855A) 以及 eSpCas9 (1.1) 對於 EMX1 與 VEGFA 基因切除之之 BLESS 試驗結果。其中 eSpCas9 (1.1) 相較其他兩者，雖然 indel 稍微降低至 60% 以下，但脫靶率卻大幅降低，甚至逼近 0%，顯示 Cas9 專一性提高是可以藉由編輯蛋白序列來達成的。



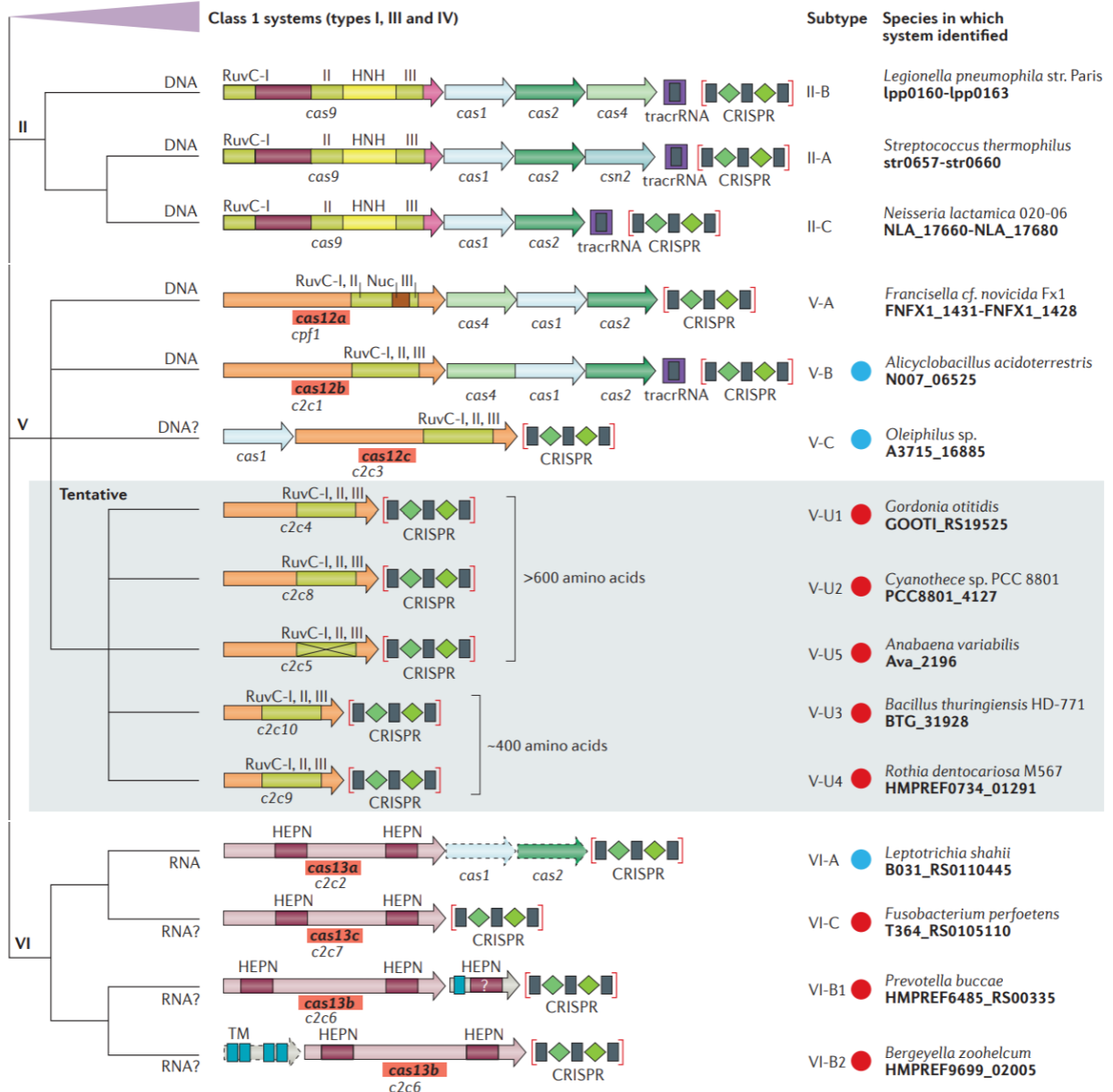
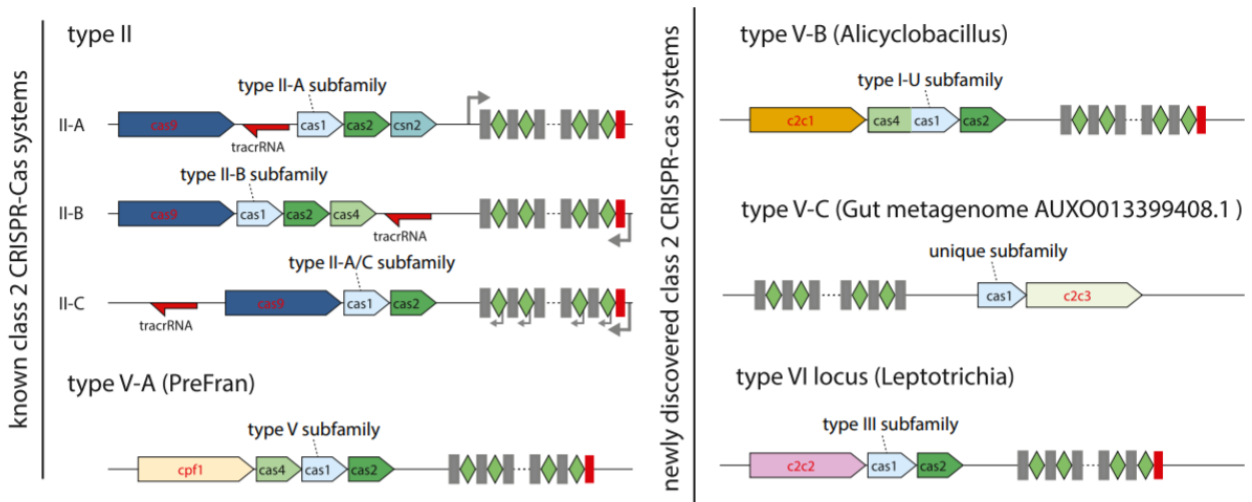
前面提到 CRISPR/Cas 系統經過數年研究，已經發現二大類 (class) 共六種模式 (type)。新型 CRISPR 分類有 Class 1 與 Class 2，主要以作用型 Cas 蛋白複合物的蛋白組成來區分。首先，大部分的 Cas 蛋白可依功能性分為兩種：適應型 (adaptation module) 以及作用型 (effector module)。適應型 Cas 蛋白將外源遺傳物質記錄至 CRISPR array 中；作用型的 Cas 蛋白則與這些遺傳物質紀錄製作出來的 crRNA 結合成複合物，利用 crRNA 作為導引，辨識並截斷相同的外源遺傳物質，因此作用型的 Cas 蛋白上必定由不同功能的 domain

或 subunit 所組成。在 CRISPR 的初始研究中，發現適應型 Cas 蛋白的組成極為保守，主要由兩種必需蛋白質 Cas1 和 Cas2 組成；而作用型的 Cas 蛋白的組成卻出現極大的差異，主要有兩種分類：Class 1 的作用型 Cas 蛋白複合物由許多不同功能的蛋白組成，例如 type I、III、IV；Class 2 的作用型 Cas 蛋白僅由一種蛋白所組成，具有許多不同功能性 domain，例如 type II 系統的 Cas9 蛋白，具有一組 RuvC-like (RNase H fold) domain 以及 HNH (McrAlike fold) domain。近年來又發現兩種新型的 CRISPR/Cas 系統：type V 的作用型 Cas 蛋白包含 Cpf1 (Cas12a)、C2c1 (Cas12b)、以及 C2c3 (Cas12c) 等蛋白僅包含 RuvC domain，不具有 HNH domain；以及 type VI 的 Cas 蛋白 C2c2 (在未確立其是否具 Cas 蛋白作用前，作者將候選蛋白命名為 Class 2 candidate 的簡稱) 不包含 RuvC domain 與 HNH domain 卻具有另一種不同功能的 HEPN domain，使得 type VI 系統的功能性與其他系統不同，其可以進行外源 RNA 的辨識與截斷。

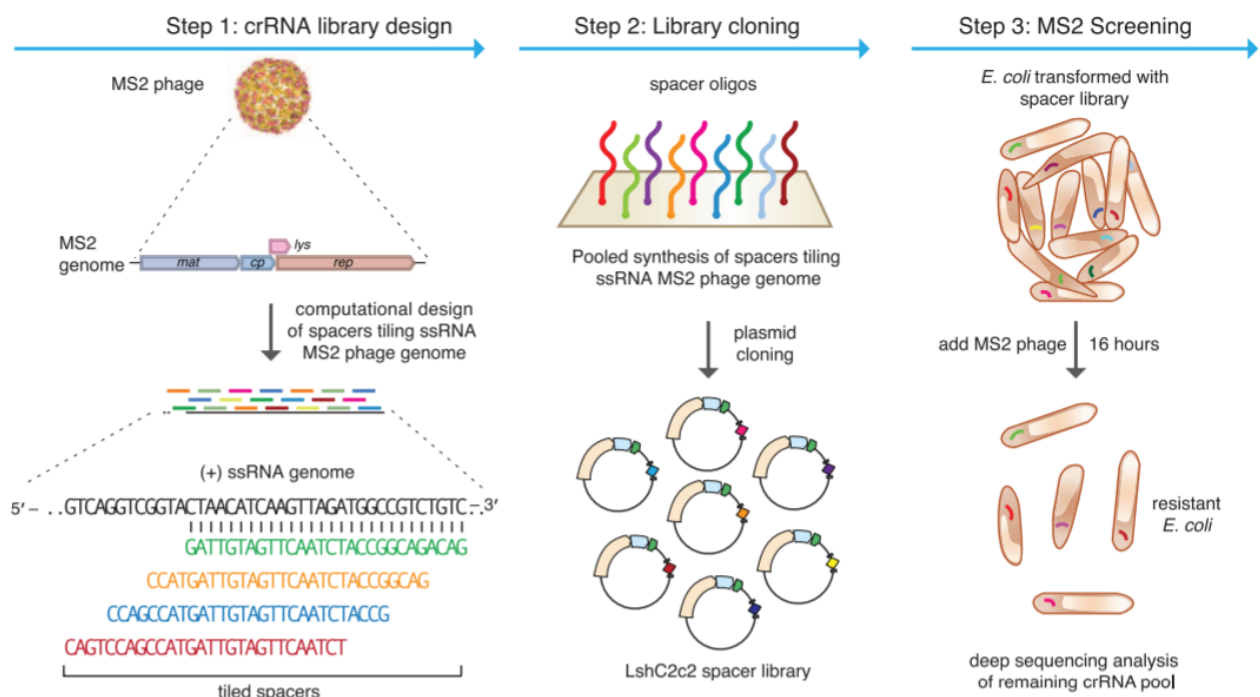


首先，大部分 CRISPR-Cas 序列中均包含 Cas1 序列，且 Cas1 序列具有高度的保守性，簡單來說，使用 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) 方法搜尋其他生物的基因序列是否有相似或相同的 Cas1 蛋白序列 contig 片段，找出這些序列之後，定位 Cas1 蛋白的基因座之後，將其他基因序列可轉譯出的大於 500 個氨基酸的蛋白質都鑑定出來並瞭解其功能。透過此方法辨識出部分蛋白屬於已知，部分蛋白則屬於未辨識出的蛋白，但可能具有

作用型 Cas 蛋白的活性，命名為候選蛋白 Class 2 candidate，一共 10 種。下圖為更新至 2017 年 Class 2 CRISPR-Cas 基因之所有可能亞形之序列。

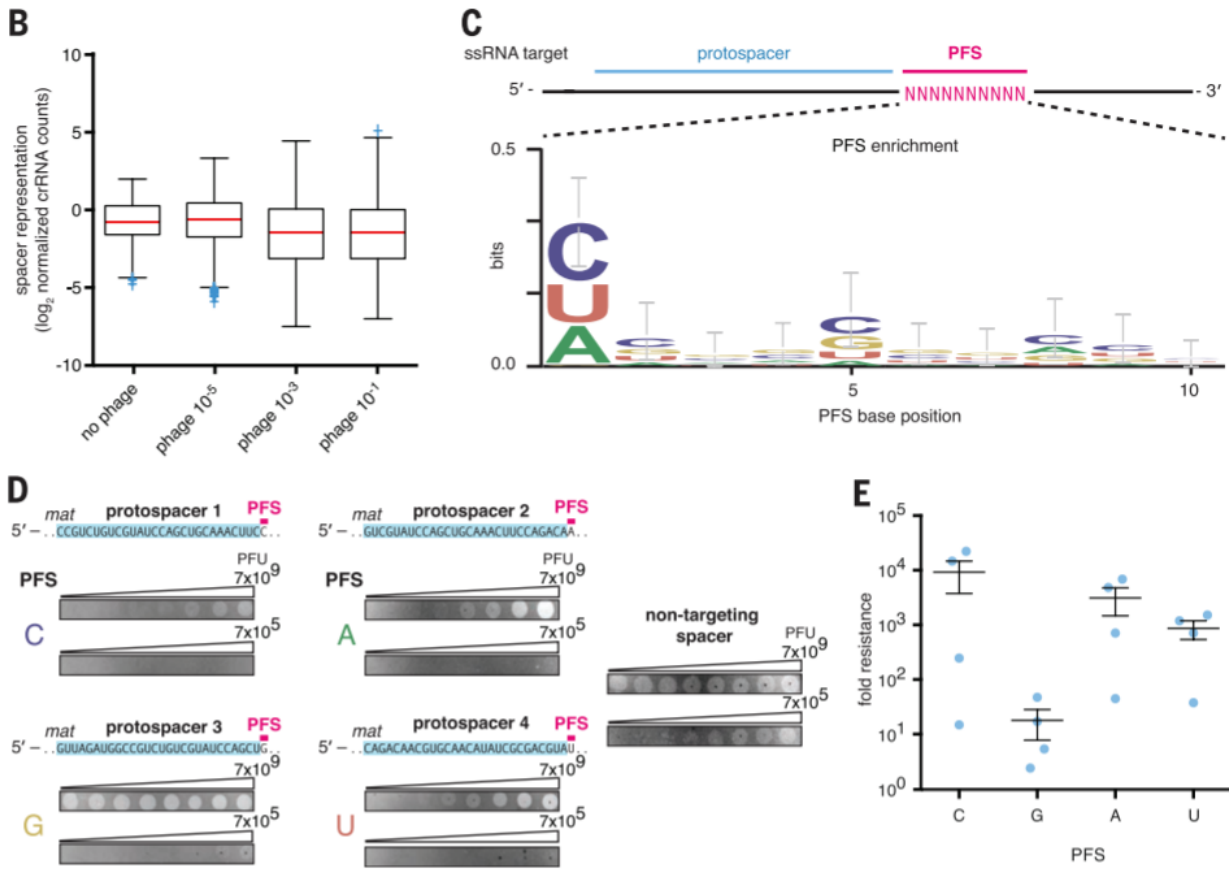


可針對外源 RNA 基因進行編輯的系統主要有兩種：Class 1 的 type III 系統，以及 Class 2 的 type IV 系統。Class 1 的作用型 Cas 蛋白複合物由許多不同功能的蛋白組成，而 type I 與 type III 的蛋白組成不同，type III 具有可剪切 RNA 的特殊蛋白使其具有 type I 缺乏的 RNA 剪切功能：type III-A/D 型由 Csm 蛋白組成，Type III-B/C 型則由 Cmr 蛋白組成。此外，HEPN domains (Higher Eukaryotes and Prokaryotes Nucleotide-binding domains) 是一種 RNases，於 type III-A 的 Csm6 蛋白以及 type III-B 的 Csx1 蛋白中也出現一次，使其二聚體具有切斷 RNA 序列的能力。Class 2 的 type IV 系統特徵在於作用型 Cas 蛋白僅由 C2c2 組成，同樣包含 2 段 HEPN domain 並缺乏 type II 或 type V 所包含的 RuvC domain 或 HNH domain，因此同樣可以切斷 RNA 序列，而沒有切斷 DNA 序列的能力。

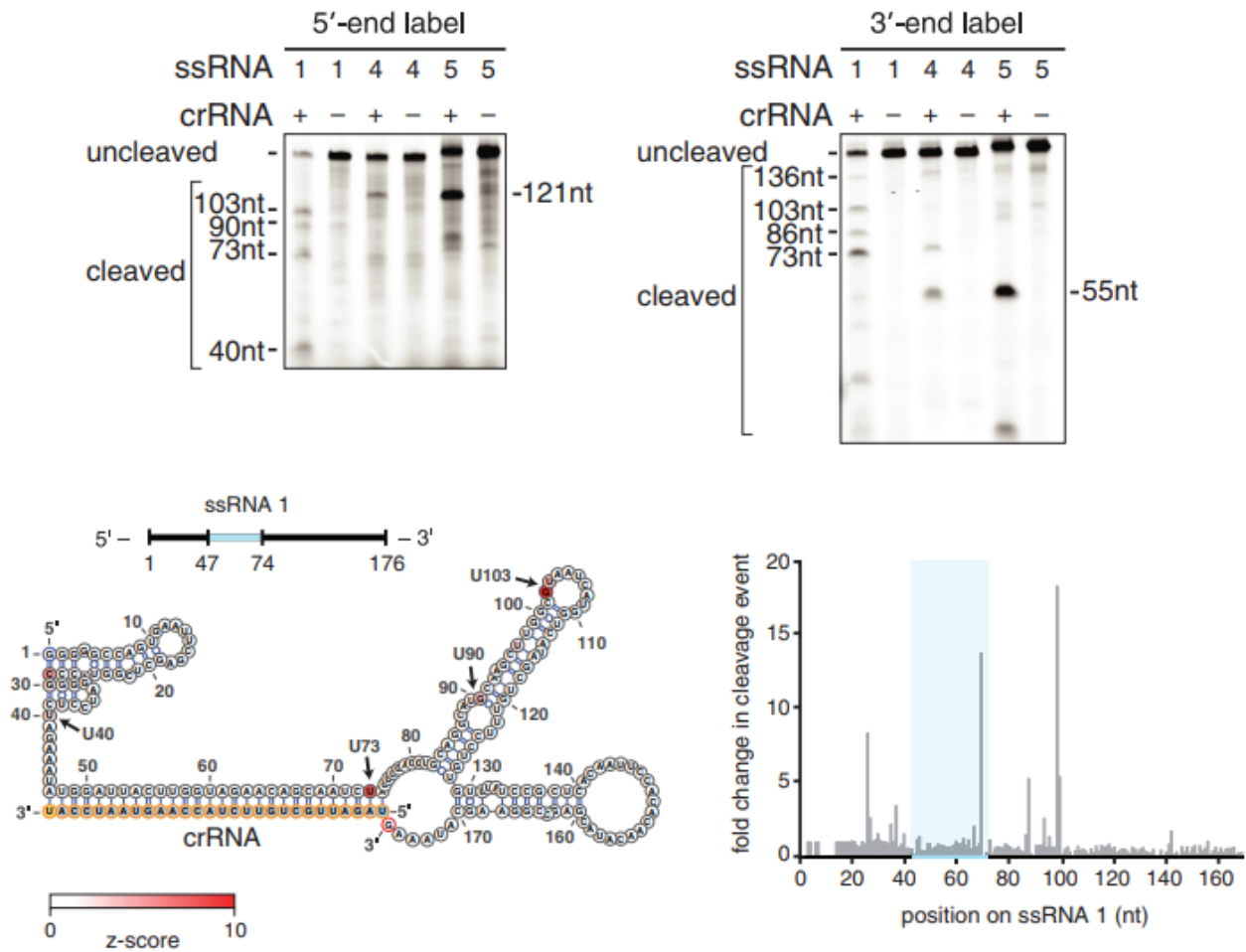


在發現 C2c2 時，為證明其具有 Cas 蛋白的功能而進行以下實驗。已知 *Leptotrichia shahii* 菌種的 CRISPR 序列上有 Cas1、Cas2、以及 C2c2 三種蛋白基因，嘗試使 *E. coli* 攜帶 C2c2 基因，利用 MS2 噬菌體進行感染，尋找干擾性高的 spacer 序列。MS2 噬菌體是一種裂解性噬菌體，只能表現 4 種蛋白：成熟蛋白 (maturation protein, mat)、裂解蛋白 (lysis protein, lys)、殼蛋白 (coat protein, cp)、以及複製酶 (replicase protein, rep)。MS2 的基因組為帶有 3,569 個核苷酸的單鏈 RNA (ssRNA)。首先 *L. shahii* 的 CRISPR/C2c2 系統中釋出的成熟 crRNA 最多可到 28 個核苷酸，因此從 MS2-ssRNA 序列盡可能選擇可以包含 28 個核苷酸的任何連續序列，最後得到 3473 種序列作為 spacer。將帶有 *L. shahii* 的 C2c2 基因 (以下簡稱 LshC2c2) 以及選擇其中一種 spacer 加進質體轉入 *E. coli*

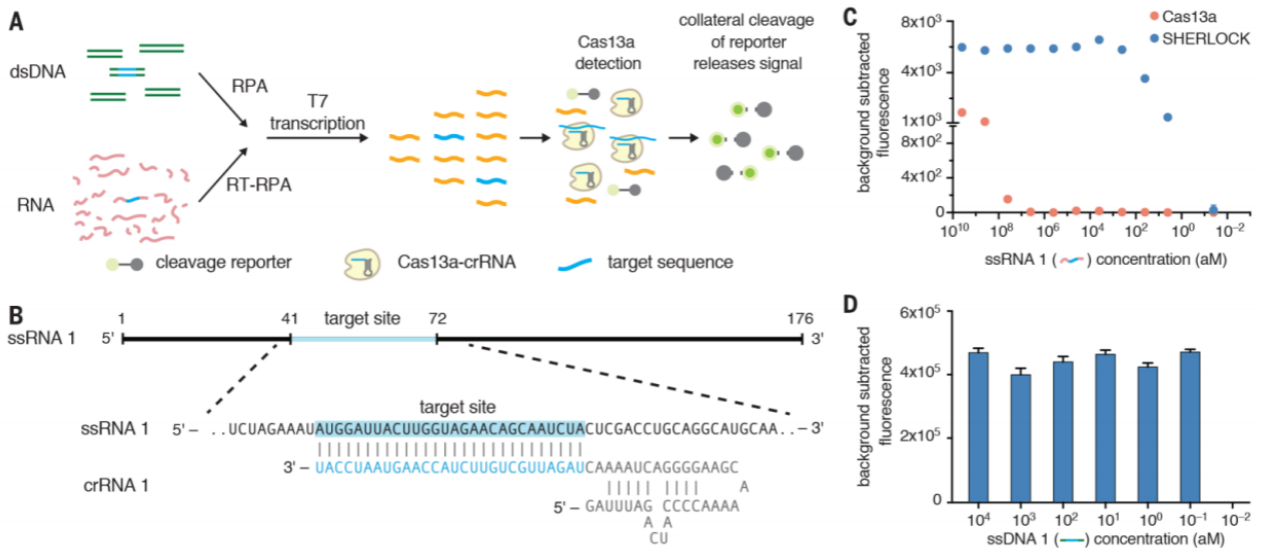
內，投入 3 種濃度（稀釋率與）的 MS2 進行感染，每組試驗 3 重複，16 小時之後分析感染後三重複均存活的 *E. coli* 是哪一種，其攜帶的 spacer 為何。理論上唯有干擾性強的 spacer 才可以讓 C2c2 快速反應，將 MS2 感染釋放出來的 ssRNA 在進行轉譯以前將其切斷。



結果顯示，稀釋率 10^{-1} 與 10^{-3} 組的 spacer 表現量均比稀釋率 10^{-5} 與控制組還高，分別有 152 和 144 組，顯示部分 *E. coli* 的 CRISPR/C2c2 系統確實對 MS2 作出反應。分析這些存活菌攜帶的 spacer 種類，對應上 MS2 基因的 protospacer，分析這些 protospacer 旁邊的 flanking regions（以下簡稱 PFS），發現 3' 端 PFS 上第一位鹼基（3' PFS-base1）的 Guanine (G) 的含量比 Adenine (A)、Cytosine (C)、Uracil (U) 三者少了許多，顯示 3' 端 PFS 有參與 C2c2 干擾作用。於是根據 MS2 的成熟蛋白基因，作出 3' PFS-base1 分別為 C、G、A、U 的 spacer，進行病毒斑試驗（Plaque assay）。先將帶有這些 spacer 的 *E. coli* 分別養在不同盤上，形成緻密的菌層，添加稀釋後 MS2 的溶液，讓 MS2 感染 *E. coli* 形成病毒斑，一段時間後觀察病毒斑的數量即可瞭解感染情形。結果發現 3' PFS-base1 為 C、A、U 的菌體對 MS2 的耐受濃度比 3' PFS-base1 為 G 與控制組還要好，在相對較高的濃度才會形成相同數量的病毒斑，其中耐受能力 $C > A > U$ 。



然而他們也發現，對於相同的 ssRNA 序列進行剪切，即便使用不同 crRNA 也會使 C2c2 在相同的剪接位點進行剪切，結果與以往 5 種 CRISPR/Cas 系統完全不同。不過對於不同 ssRNA 而言，仍會有不同的剪切結果，令人訝異。推測 C2c2 蛋白辨識剪切位點，與 ssRNA 序列無關，而是與 ssRNA 的二級結構有關，使用電腦軟體模擬第 14 號 ssRNA 的所有可能排列結構，並預測所有鹼基上的剪切可能性，結果發現所有剪切位點居然都在 ssRNA-crRNA duplex 序列以外的 Uracil 上，顯示 C2c2 會透過 crRNA 辨識外源 RNA，將 RNA 互補結合序列以外的特定位點進行剪切，剪切位點則取決於外源 RNA 的二級結構。此實驗結果證實 C2c2 蛋白搭配 ssRNA 具有將 RNA 序列進行特定位置剪切的能力，確立此系統同屬於 CRISPR/Cas 系統，將其命名為 Cas13a 蛋白。



張鋒博士的研究團隊持續利用自行開發的CRISPR/Cas系統，進行一連串的基因療法及感測診斷的技術研發。2017年，他與Jim Collins合作發表了一種檢測技術，改良CRISPR/Cas13a技術，檢測血液樣本中茲卡病毒（Zika virus）或登革熱（dengue）病毒的單分子RNA片段，並將其命名為SHERLOCK（Specific High Sensitivity Enzymatic Reporter Unlocking）並申請專利。SHERLOCK比單獨使用Cas13a更敏感，可檢測濃度低至 $2 \mu\text{M}$ 的ssRNA。順帶一提，Jennifer A. Doudna博士也在同時期發表了類似技術，利用CRISPR/Cas12a系統檢測人類乳突病毒（human papillomavirus，簡稱HPV），取名為DETECTR（DNA Endonuclease Targeted CRISPR Trans Reporter）。這些技術的重要性，在於單次檢測僅需要微量樣品，透過增加樣本中的RNA數量提高靈敏度，使檢測成本大幅降低，並可獲得準確性高的結果。對於資源貧乏、傳染病盛行的地區，對傳染病的快速篩檢具有相當大的幫助。CRISPR/Cas系統等科學技術的持續發展，使許多相關領域得以持續進步，最終使世人受惠。

肆、心得與建議

經由參加本次研討會，瞭解許多最新的生物學領域知識，其中可看出近年來強烈吸引各國學者興趣的幾個熱門研究方向，例如微生物學家對腸道微生物菌相的功能有興趣，與醫生與臨床學者合作研究，發現腸道菌相會影響腦部的運作，這項結果在十年前的科學界可能無法獲得認同。由於近年來科學持續發展，腦部、腸道等人體機制，以及基因技術的進步，綜合以上學門後發現腸道菌相領域有許多未知機制，才開創了這片新領域。這個例子突顯出跨領域合作在科學研究的重要性，同時人類的直覺雖然在部份情況下可能有用，但過於依賴直覺反而會限制思考。

一件技術的發明通常不是偶然，每一件專利、論文都是學者們花費數年光陰鑽研特定領域，對此領域的專業知識具有一定程度的瞭解。當機會來臨，無意間發現了一個意料之外的現象，一般人往往視而不見，然而這位專家卻找到了，並發展成一門技術。我相信前述報告所列的成果發表，可能是在實驗中偶然發現，不過在學者努力不懈的研究精神的鞭策下，這些成果的發現遲早會浮現，並非偶然，只要有人願意努力。每次想到這邊，腦中都會浮現稻盛和夫先生的一句話：「從拚命勞動中，可體會出人生的真義」。希望台糖公司未來能針對一兩種現有產業領域進行鑽研，例如探討酵素與豬隻腸道生理關聯性、益生菌與人類腸道功能關聯性等，讓每種領域都有專家甚至學者，經由與外界溝通或互相交流獲得最新資訊，如此將能讓台糖公司走得更遠。

職對 CRISPR/Cas 技術的初步瞭解來自研究所先期的學術會報，部份同仁對此技術寄予厚望，相信對於以農畜產品為主的台糖公司而言，將 CRISPR/Cas 技術導入研發工作將會具有重大意義。因此利用這次機會，深入探討 CRISPR/Cas 技術創始人張鋒博士的研究工作，分享讓長官及同仁瞭解。然而 CRISPR/Cas 技術屬於分子生物學領域，有一定的知識門檻，將此技術推廣周知將是一項挑戰。

CRISPR/Cas 系統是一套應用於編輯生命體基因組的技術，原是來自微生物體內針對外來遺傳物質入侵的抵抗機制。此技術的價值在於讓許多以往無法或難以進行的生物實驗得以進行，並有許多優點：可跨越物種限制、機制簡單、影響變因量少、基因編輯過程迅速、準確率高，更重要的是實驗成本低；然而也有一些缺點，例如系統建立不久，容易有脫靶的情況，可能會造成對生命體有害的突變，或是系統所選用的基因傳遞蛋白不穩定、具有毒性、或是特定蛋白成本較高等，需針對實驗中造成的影響進行風險評估，不過這些問題相信會隨著 CRISPR/Cas 技術逐漸成熟而得以解決。

數年前 CRISPR/Cas9 系統的發現，在分子生物學界掀起一股研究基因編輯相關技術的熱潮，至今仍未消退。隨著 CRISPR/Cas9 系統對基因編輯的方便性不斷被改良與驗證，也逐漸被國內外大部分的科學家所接受，大量的需求也帶動國內外相關生技產業的發展。臺灣許多研究院校對 CRISPR/Cas 系統的研究案數量逐年增多，需求量提高使得國內也出現以 CRISPR/Cas9 技術服務為基礎的生技公司，部分原有之生技公司也相繼轉型，因此 CRISPR/Cas 技術相關實驗之成本也逐年降低。可以進行 RNA 編輯的 CRISPR/Cas13 系統機制的報導也在近年發表，相信不久的未來會越來越普遍。

有數千種疾病已經被證實來自單一基因座突變，且大部分都屬於罕見疾病，遺傳造成的疾病通常伴隨嚴重症狀並難以透過一般療程進行醫治，治療費用極高。利用基因療法將特定基因利用載體導入病患體內，使特定基因在病患體內表現，經由分子生物學原理，例如基因修補、干擾、修飾等方法，達到治療的效果。目前科學家使用 CRISPR/Cas 技術探討治療方式的重大疾病有：癌症、遺傳疾病、愛滋病、阿茲海默症等，未來或許都可預見這些重症的治療方式。

依據 IPstudies 統計至 2018 年 1 月對 CRISPR 專利佈局分析結果顯示，CRISPR 技術之專利家族數量從 2017 年的 1,146，增長至 2018 年的 2,230，其中約 60% 為學界申請，30% 為業界申請，剩下約 10% 為共同申請或個人名義申請；來自美國之申請有 1,230 件，中國 697 件、英國 48 件、日本 43 件、韓國 40 件等。美國學術單位主要專利分佈方向為：基因編輯、基因療法與其診斷方法、人類細胞、哺乳動物細胞、真核細胞、系統改良以及載體改良。業界也有許多國際大型生技公司申請，專利數量前三大公司依序為：DuPont（1915 年成立）、Editas Medicine（2013 年成立）以及 Sangamo Therapeutics（1995 年成立），後兩間公司致力於推行體內基因組編輯的臨床試驗，杜邦公司主要專利分佈則為基因編輯方法、細胞改良、植物改良、植物細胞改良以及 guide RNA 序列方法等五項。此外，中國的學術單位亦有 CRISPR 相關專利，以中國科學院（CAS）及中國農業科學院（CAAS）為例，其專利佈局類別與杜邦公司幾乎相同，且兩公司在改良植物與改良微生物兩方面之相對數量均高於其他申請者。由 CRISPR 相關專利佈局結果來看，中國的學術研發方向與美國差異甚大，反而與杜邦公司相近，令人出乎意料。此外酵母菌、黴菌與藻類的專利數量前三名分別為美國哈佛大學、杜邦公司、以及美國加州大學，顯示學術界仍有興趣對微生物的基因修飾進行研究。

雖然臺灣目前仍未將 GMO 相關法令鬆綁，透過基因改造後的微生物須通過嚴格安全性測試才可能作為食品使用，基因改造後的農作物也遭遇同樣挑戰。CRISPR/Cas 技術可以讓研究者更快得知物種是否含有特定基因以利篩選，或是可更快取得基因編輯後的生物體，在

更短時間內取得大量數據，對於生物體接受外界的刺激或代謝機轉的釐清將變得更為容易。此外，CRISPR/Cas 技術可跨越物種限制，對於台糖各項產業都有潛在應用可能，例如結合次世代定序(next generation sequencing, NGS)等生物技術，將偵測到具有缺陷基因的品系篩除，進行甘蔗、豬隻、蘭花等農作物之優良品系的篩選與配種，對豬隻而言可促進健康，減少抗生素的使用，對蘭花而言則可強化其對病蟲害等外界刺激的抵抗；透過病毒基因的快速篩檢，在短時間內找出感染豬隻，防止傳染病的擴張；對於微生物的應用又更加廣泛了，透過基因快速偵測方法找出具有特定功能性基因的微生物加以培養，可應用在生產機能性食品、小分子或酵素生產、大量生產菌種用於廢水與廢棄物之處理等，例如乳酸菌在腸道微生物菌相中扮演不可或缺的角色，可透過新技術篩選出較能促進腸道功能的食品級菌種。若能將 CRISPR/Cas 技術應用加以研究，對於台糖公司各項產業的提昇或許是項契機。

附錄

附錄一：研討會行程

Apr 21, 2018

8:00 AM - 12:00 PM Refresher Course on GI Physiology: Not Just the Gut Anymore.
APS Education Committee

1:00 PM - 2:30 PM Sex and Age as Biological Variables in Physiology Research

3:00 PM - 4:30 PM The Mevalonate Pathway: A Fundamental Player in Human Disease

6:00 PM - 7:00 PM EB 2018 Tang Prize Award Lecture

Apr 22, 2018

8:30 AM - 9:15 AM John J. Abel Award in Pharmacology Lecture

10:00 AM - 12:00 PM Novel Enzymology

1:30 PM - 3:00 PM APS President's Symposium Series I. Exosomes: The New
Frontier. Cell Biology of Exosomes

3:00 PM - 4:45 PM Can We Target Aging?

4:00 PM - 5:15 PM Reading, Writing and Erasing Epigenetic Marks

Apr 23, 2018

8:30 AM - 10:00 AM Gut-Brain Interactions and Control of Feeding Behavior

9:30 AM - 12:00 PM G Proteins and G Protein Coupled Receptors in Cancer

1:30 PM - 3:00 PM APS President's Symposium Series II. Exosomes: The New
Frontier. Pathophysiology of Exosomes

3:30 PM - 5:00 PM Solomon Berson Distinguished Lectureship of the APS
Endocrinology and Metabolism Section

Apr 24, 2018

8:30 AM - 10:00 AM The Effects of Environmental Challenges on Performance and
Metabolism

10:00 AM - 12:00 PM Biochemistry of Autophagy and Organelle Trafficking

1:30 PM - 3:00 PM Molecular Transducers of the Physiological Adaptations to
Exercise and Aging

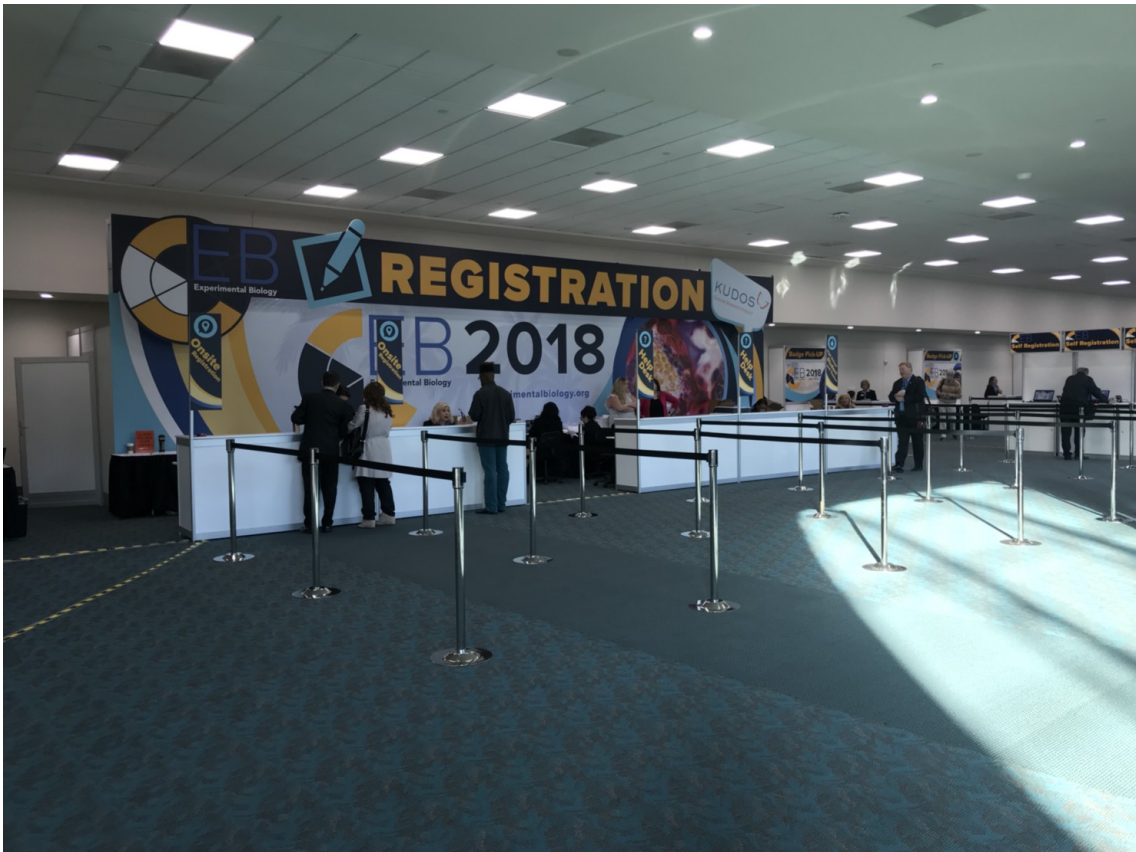
3:30 PM - 6:00 PM Computational Approaches to G Protein-Coupled Receptor
Structure and Function

Apr 25, 2018

8:30 AM - 11:00 AM The Organization of Signal Transduction and Its Impact on
Receptor Function

1:30 PM - 3:00 PM The Gut-Brain Axis

附錄二：與會照片



照片一、會場報到



照片二、會場佈置一景



照片三、唐獎演說會場入口處



照片四、張鋒博士接受大會表揚並發表演說



照片五、儀器展示區（左）與學術壁報論文展示區（右）



照片六、聖地牙哥會議中心二樓一景

附錄三：參考資料

1. 美國實驗生物學年會 (EB 2018) 官方介紹
<http://experimentalbiology.org/2018/About-EB/About-Experimental-Biology.aspx>
2. 美國實驗生物學年會 (EB 2018) 網站 <https://plan.core-apps.com/eb2018/customScreen/aboutShow>
3. 唐獎生技醫藥獎 http://www.tang-prize.org/owner_detail.php?cat=11&id=472
4. 張鋒實驗室網站 <http://zlab.mit.edu/>
5. IPStudies - 2018.01 CRISPR Patent Landscape SampleV2
https://www.ipstudies.ch/wordpress/wp-content/uploads/2018/06/2018.01-CRISPR-Patent-Landscape_SampleV2.pdf
6. Y Ishino, H Shinagawa, K Makino, M Amemura, A Nakata. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J Bacteriol.* 1987 Dec;169(12):5429-33.
7. Jansen R, Embden JD, Gaastra W, Schouls LM. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol. Microbiol. Mol. Microbiol.* 2002 Mar;43(6):1565-75.
8. Deltcheva EI, Chylinski K, Sharma CM, Gonzales K, Chao Y, Pirzada ZA, Eckert MR, Vogel J, Charpentier E. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature.* 2011 Mar 31;471(7340):602-7.
9. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science.* 2012 Aug 17;337(6096):816-21.
10. Garneau JE, Dupuis MÈ, Villion M, Romero DA, Barrangou R, Boyaval P, Fremaux C, Horvath P, Magadán AH, Moineau S. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature.* 2010 Nov 4;468(7320):67-71.
11. Hsu PD, Lander ES, Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell.* 2014 Jun 5;157(6):1262-78.
12. Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu X, Jiang W, Marraffini LA, Zhang F. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science.* 2013 Feb 15;339(6121):819-23.
13. Prashant Mali, Luhan Yang, Kevin M. Esvelt, John Aach, Marc Guell, James E. DiCarlo, Julie E. Norville, George M. Church. RNA-Guided Human Genome Engineering via Cas9. *Science.* 2013 Feb 15; 339(6121): 823 – 826.
14. Ran FA, Cong L, Yan WX, Scott DA, Gootenberg JS, Kriz AJ, Zetsche B, Shalem O, Wu X, Makarova KS, Koonin EV, Sharp PA, Zhang F. In vivo genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9. *Nature.* 2015 Apr 9;520(7546):186-91.

15. Slaymaker IM, Gao L, Zetsche B, Scott DA, Yan WX, Zhang F. Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity. *Science*. 2016 Jan 1;351(6268):84-8.
16. 高血症之藥物治療 <http://www.taiwan-pharma.org.tw/magazine/40/091-101.pdf>
17. Nicola Crosetto, Abhishek Mitra, Maria Joao Silva, Magda Bienko, Norbert Dojer, Qi Wang, Elif Karaca, Roberto Chiarle, Magdalena Skrzypczak, Krzysztof Ginalski, Philippe Pasero, Maga Rowicka, Ivan Dikic. Nucleotide-resolution DNA double-strand breaks mapping by next-generation sequencing. *Nat Methods*. 2013 Apr; 10(4): 361 – 365.
18. Makarova KS, Wolf YI, Alkhnbashi OS, Costa F, Shah SA, Saunders SJ, Barrangou R, Brouns SJ, Charpentier E, Haft DH, Horvath P, Moineau S, Mojica FJ, Terns RM, Terns MP, White MF, Yakunin AF, Garrett RA, van der Oost J, Backofen R, Koonin EV. An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol*. 2015 Nov;13(11):722-36.
19. Sternberg SH, Redding S, Jinek M, Greene EC, Doudna JA. DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. *Nature*. 2014 Mar 6;507(7490):62-7.
20. Shmakov S, Abudayyeh OO, Makarova KS, Wolf YI, Gootenberg JS, Semenova E, Minakhin L, Joung J, Konermann S, Severinov K, Zhang F, Koonin EV. Discovery and Functional Characterization of Diverse Class 2 CRISPR-Cas Systems. *Mol Cell*. 2015 Nov 5;60(3):385-97.
21. Shmakov S, Smargon A, Scott D, Cox D, Pyzocha N, Yan W, Abudayyeh OO, Gootenberg JS, Makarova KS, Wolf YI, Severinov K, Zhang F, Koonin EV. Diversity and evolution of class 2 CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol*. 2017 Mar;15(3):169-182.
22. Zetsche B, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Slaymaker IM, Makarova KS, Essletzbichler P, Volz SE, Joung J, van der Oost J, Regev A, Koonin EV, Zhang F. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. *Cell*. 2015 Oct 22;163(3):759-71.
23. Cox DBT, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Franklin B, Kellner MJ, Joung J, Zhang F. RNA editing with CRISPR-Cas13. *Science*. 2017 Nov 24;358(6366):1019-1027.
24. Abudayyeh OO, Gootenberg JS, Essletzbichler P, Han S, Joung J, Belanto JJ, Verdine V, Cox DBT, Kellner MJ, Regev A, Lander ES, Voytas DF, Ting AY, Zhang F. RNA targeting with CRISPR-Cas13. *Nature*. 2017 Oct 12;550(7675):280-284.
25. Abudayyeh OO, Gootenberg JS, Konermann S, Joung J, Slaymaker IM, Cox DB, Shmakov S, Makarova KS, Semenova E, Minakhin L, Severinov K, Regev A, Lander ES, Koonin EV, Zhang F. C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector. *Science*. 2016 Aug 5;353(6299):aaf5573.
26. Koonin EV, Zhang F. Coupling immunity and programmed cell suicide in prokaryotes: Life-or-death choices. *Bioessays*. 2017 Jan;39(1):1-9.

27. Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Lee JW, Essletzbichler P, Dy AJ, Joung J, Verdine V, Donghia N, Daringer NM, Freije CA, Myhrvold C, Bhattacharyya RP, Livny J, Regev A, Koonin EV, Hung DT, Sabeti PC, Collins JJ, Zhang F. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2. *Science*. 2017 Apr 28;356(6336):438-442.
28. CRISPR 最新應用：簡單、便宜又快速的醫療診斷系統
<https://technews.tw/2017/05/10/a-new-crispr-breakthrough-could-lead-to-simpler-cheaper-disease-diagnosis/>
29. Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Kellner MJ, Joung J, Collins JJ, Zhang F. Multiplexed and portable nucleic acid detection platform with Cas13, Cas12a, and Csm6. *Science*. 2018 Apr 27;360(6387):439-444.