

基因編輯技術及 魚類研究應用實例

撰文/王涵青·葉盈君·前川峻·青木宙

前言

2015 年底，Science 雜誌將基因編輯 (gene editing) 工具中的 CRISPR-Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats-Cas9) 列為當年度的重大科學突破；2016 年初，英國批准科學家以 CRISPR-Cas9 在僅供短期實驗觀測的人類胚胎進行基因編輯；2016 年 3 月，Nature 特刊封面故事又是以 CRISPR-Cas9 為主題，討論此撼動全球的生物技術是將如何改變世界。CRISPR-Cas9 從默默無名、毫不起眼的細菌類適應性免疫機制，自 2012 年精進成基因編輯技術，旋風式的成為生命科學界超級巨星，登上各式重要期刊封面，為人類社會許下更美好的願景外，隨之而來的隱憂也陸續浮出。本文將對於基因編輯技術及其在魚類研究進行概述介紹外，也分享本研究團隊以此技術應用於青鱗魚之研究進展。

基因編輯關鍵技術

正處於後基因體時代 (post genomic era) 的今日，伴隨著次世代定序 (next generation sequencing, NGS) 技術演進，基因體及轉錄體探索過程中所獲得的基因序列可說是以爆炸性模式不斷累積，科學家的研究策略也從過往以表型 (phenotype) 找基因的正向遺傳學 (forward genetics)，轉向以從特定基因看表型的反向遺傳學 (reverse genetics)。在反向遺傳學的主流技術中，從早期的基因剔除技術 (gene

knockout)，進入了核糖核酸干擾 (RNA interference, RNAi) 時代，又再次邁入了基因編輯新紀元。因為有這些技術，讓科學家可針對特定基因進行基因移除或沉默 (gene silencing)，觀測所造成的表型得以回推該基因可能功能性。

RNAi 是建立在宿主抗病毒免疫作用模式，所建立之轉錄後基因沉默化 (post-transcriptional gene silencing, PTGS)，可讓目標基因所表現出的 mRNA 降解或抑制其轉譯，進而達到減少目標蛋白質表現，影響其正常運作機制。相較於基因剔除技術的高技術門檻與相對長的實驗周期，簡單方便的 RNAi 一推出就廣泛使用在植物、線蟲、昆蟲類、魚類及哺乳類動物，後續也研發出數種不同技術平台。然而 RNAi 畢竟主要作用在 mRNA 層級，間接性的影響蛋白質表現量，並不是每個基因的 mRNA 都可成功被沉默化外，mRNA 減少也不代表其蛋白質產物表現量也一定會減少；此外，多數 RNAi 技術平台僅可暫時性的減少目標基因表現，無法長久存於生物體而達到永久抑制效果。

相較於上述 RNAi 的間接手法，直接針對基因體位置上動手腳，即可直接從源頭限制此基因表現。如前所述，傳統藉由同源染色體互換 (homologous recombination) 為作用原理或是以 Cre-loxP 系統進行條件式基因剔除的技術平台，不但操作複雜、困難且成功機率低，平均會耗費 2-3 年來產出一種基因剔除鼠。同樣是瞄準目標基因的基因體位置進行

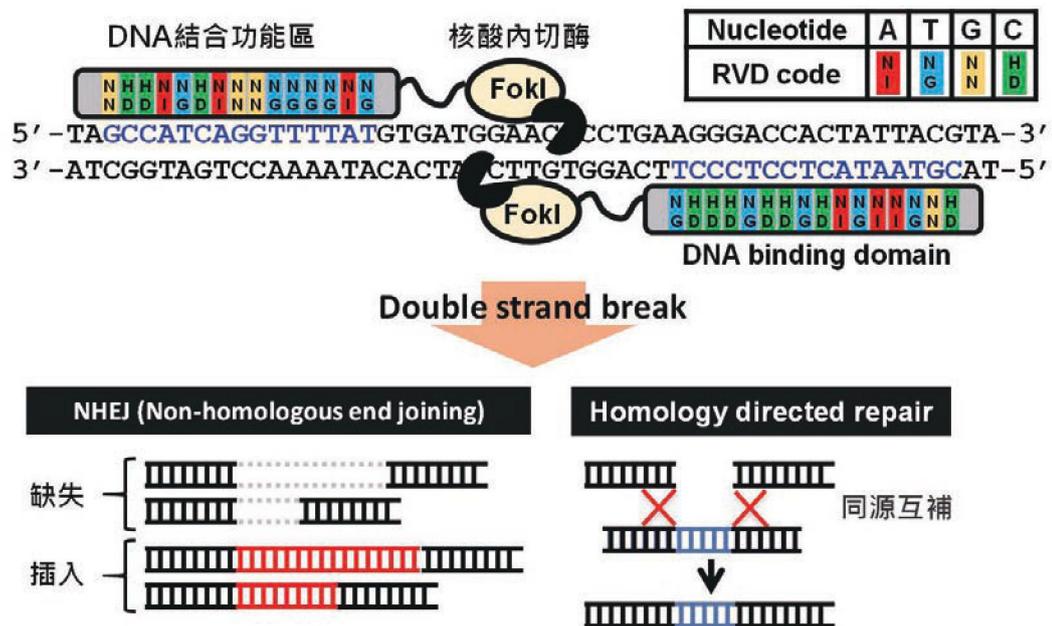
改造，人工內切核酸酶基因編輯 (genome editing with engineered nucleases, GEEN) 就是一個相對較快、簡單、便宜且成功率高的方法，目前廣為使用的技術平台為 TALENs (transcription activator-like effector nucleases) 以及 CRISPR-Cas9。此兩項技術的主要原理，就是透過蛋白質或是 RNA 與目標基因的基因體 DNA 序列進行專一性結合後，其所搭配的核酸酶即可進行定點式基因切割。當基因體 DNA 受到切割後，會啟動非同源末端接合 (non-homologous end joining, NHEJ) 的 DNA 修補機制，此修補機制常會造成修補區有部分序列隨機缺失或插入的現象，進而導致此基因的基因體序列後續編碼位移而產生移碼突變 (frameshift mutation)，若發生移碼突變的區域是位於此基因重要功能區的上游或其他適當位置，此特定基因即會失去功能。由於此兩種基因編輯技術並非具有高技術門檻，很容易自行於研究室中完成外，可專一性定點性編輯目標基因體、相對實驗花費不高、篩選快速方便及高成

功率等特質，讓 TALENs 及 CRISPR-Cas9 如同當年的 RNAi 一般，快速擴展並應用到各生命科學領域中。

TALENs 基因編輯技術及應用於魚類研究概況

(一) TALENs 基因編輯技術原理

TALENs 基因編輯技術約於 2010 年建立，主要是利用左臂 TALEN (left arm TALEN) 與右臂 TALEN (right arm TALEN) 分別各與目標序列的 15-18 個特定序列結合後，再利用所帶有的核酸內切酶將序列進行剪切，隨後有可能引起錯誤的 DNA 修補過程，而讓基因功能喪失。左右兩臂 TALEN 組成相似，都帶有具切割功能的 Fok I 核酸酶 (nuclease) 和 Xanthomonas 屬的植物病原細菌所表現出之 transcription activator-like (TAL) effector 之 DNA 結合功能區 (DNA binding domain) (圖一)。TALENs 對於目標基因體序列進行專一性結合是由



註：非同源末端接合DNA修復機制可能造成的序列缺失或插入，進而導致此基因的基因體序列後續編碼位移。本TALENs標靶位點設計實例是以青鱗魚MSTN基因為標的。

圖一 TALENs 基因編輯技術的作用原理概圖及非同源末端接合DNA修復機制

其 DNA 結合功能區所主導，此 DNA 結合功能區是由 15-18 個稱為重複可變雙胺基酸 (repeat variable di-residues, RVDs) 的串聯序列所決定。目前已知 RVD 的雙胺基酸組成為 HD 的話，可與核苷酸的胞嘧啶 (cytosine, C) 結合；NN 識別鳥糞嘌呤 (guanine, G)；NG 識別胸腺嘧啶 (thymine, T)；而 NI 則可識別腺嘌呤 (adenine, A)，藉由不同 RVD 的排列組合而成的 DNA 結合功能區，即可識別目標 DNA 序列。由於左右兩臂 TALEN 需分別辨識到對應目標基因正、反股序列，因此雙臂 TALEN 的 DNA 結合功能區序列會有所不同。當左右雙臂 TALEN 結合到適當位置後，其上各自所帶的 Fok I 才會形成二聚體以活化內切酶活性，進行雙股 DNA 剪切。

TALENs 基因編輯操作方法簡述如下：若已有目標基因的基因體序列，可利用 TALE-NT 2.0 (TAL effector nucleotide targeter 2.0) 程式，獲得以下資訊：1. TALENs 的標靶位點。2. 左右臂 TALEN 個別的 DNA 結合功能區之 DNA 結合位核苷酸序列。3. 編輯對應 DNA 結合位核苷酸序列的 DNA 結合功能區 RVD 組合順序。待上述資料完整後，左右臂 TALEN 則可利用 TAL 作用元件模組逐步選殖至分別對應左右臂 TALEN 的質體中，總計約 4-7 天即可完成 TALENs 最終載體的建構。確認 TALENs 質體序列的正確度後，將此表現載體利用限制酶剪切成線性，隨後進行體外 mRNA 合成及純化，將兩臂 TALEN mRNA 混合後以顯微注射方式送入單細胞時期的受精卵即可。

突變篩選法則是可經由異質雙股泳動性分析 (heteroduplex mobility assay) 進行初篩後，再以定序方式確認其基因突變型。由於 TALENs 需要識別較多的目標基因序列，因此專一性高、極少有脫靶 (off-target) 現象，目前已應用在果蠅、蛔蟲、斑馬魚、青鱗魚、青蛙、大鼠及豬的諸多研究中，也從基因剔除的主功能外，延伸應用至基因敲入 (gene knockin)。

(二) TALENs 基因編輯技術應用於魚類研究概況

首先開啟 TALENs 在魚類系統應用的可能性是在 2011 年時，Sander 與其團隊選用斑馬魚進行 TALENs 基因編輯運作評估，針對了 *gria3a* 及 *hey2* 兩種基因進行 TALENs 設計並送入單細胞階段的受精卵，研究結果顯示的確可利用 TALENs 基因編輯平台造成 *gria3a* 及 *hey2* 的基因體序列發生隨機缺失或插入。Sander 等人還進一步計算發生突變的樣本數占總樣本數的 11%-33%，暗示著同基因但不同標靶位點所造成的突變率會有不同，推測其後可影響此兩基因的正常功能性。同年，Huang 等人針對斑馬魚基因 *tnikb* 和 *dip2a* 設計 TALENs 後，將 TALENs 注射入受精卵並持續飼養成為親代 (F0 founder)，他們發現親代的突變基因型可以遺傳到第一子代 (F1)，因此提供了第一個在脊椎動物由 TALENs 造成之變異具可遺傳性的證據。當開啟 TALENs 可應用在斑馬魚研究時，科學家也於 2013 年成功將 TALENs 應用在青鱗魚中，其以參與抗氧化壓力基因 *DJ-1* 為標的，利用 TALENs 基因編輯方式造成其基因體序列發生移碼突變，同樣也證明此種序列變異可遺傳至 F1，而 F1 是無法表現出具功能性 *DJ-1* 蛋白質。

目前臺灣也開始投入利用 TALENs 於魚類基因編輯的研究，其中之一為筆者的研究團隊，我們利用 TALENs 破壞青鱗魚肌肉生長抑制因子 (*myostatin, MSTN*) 基因體序列，並觀測到第二子代 (F2) 及第三子代 (F3) 所呈現的表型，相關內容將會在後文敘述。截至今日，多數利用 TALENs 於魚類基因研究仍以斑馬魚及青鱗魚作為模式生物，現已進入了突變個體表型分析，如激素受體突變所造成的影響及發育因子缺失對個體發育的觀測；除此之外，陸續已有其他魚種也開始使用此技術進行基因編輯，如鯰魚 (*tachysurus fulvidraco*, yellow catfish)、墨西哥麗脂鯉 (*astyanax mexicanus*, mexican cavefish) 等。

CRISPR-Cas9基因編輯技術及應用於魚類研究概況

(一) CRISPR-Cas9基因編輯技術原理

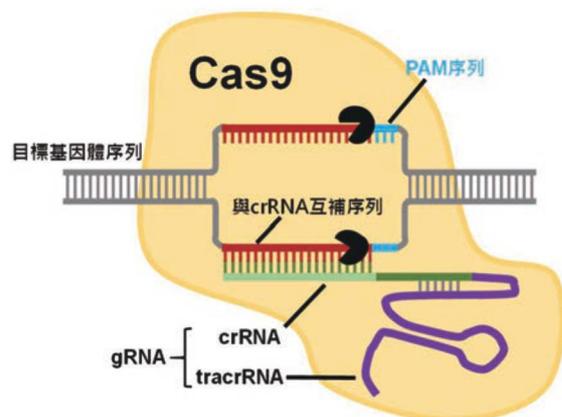
CRISPR-Cas9 基因編輯技術中，主要兩個作用因子分別為 guide RNA (gRNA) 與 Cas9 蛋白質，其中 gRNA 為 crRNA (clustered, regularly interspaced, short palindromic repeats RNA) 及 tracrRNA (transactivating crRNA) 的複合體 RNA，主要用以識別與結合目標基因體序列，而 Cas9 蛋白質則是扮演剪切目標基因體之核酸酶。那這個系統為何要被稱為成簇有規律間隔排列的短重複序列 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats; CRISPR) 這個完整名稱長到很難被記住的名字呢？原因是有關於這個基因編輯技術的起源，在 1987 年時，在細菌中發現了一段由重複序列片段 (repeat) 與間隔序列片段 (spacer) 不斷相隔排列而成的特殊 DNA 序列，後來科學家將此序列命名為 CRISPR，研究過程中又發現此序列常與某些特定序列同時存在，因此將這些與 CRISPR 共同存在、且可表現出核酸酶活性蛋白質的基因序列稱為 Cas (CRISPR-associated sequence, cas)。

這些發現陸續累積了將近 30 餘年，科學家終於完整建立此系統，其後將 Type II CRISPR-Cas 系統應用於基因編輯技術上。簡而言之，CRISPR 中的每段間隔序列片段皆源自於外來病毒部分的序列，當相同病毒再次感染此細菌時，CRISPR 可轉錄出用來識別病毒序列的 crRNA 以及可與 crRNA 部分互補並協助 crRNA 尋找病毒 DNA 的 tracrRNA，當 crRNA-tracrRNA 形成複合體並找到目標序列後，僅需 Type II CRISPR-Cas 系統中 Cas9 的活化即可進行剪切病毒 DNA 基因體 (Type I 及 Type III CRISPR-Cas 系統是相對複雜的系統，需要多種 Cas 才可達到 DNA 剪切作用)。2012 到 2013 年可說是這個劃時代生物技術平台建立的關鍵點，科學家看準了這個細菌抵抗病毒的免疫系統可使用於基因編

輯上，因此將 crRNA 與 tracrRNA 結合在一起，就形成上述 CRISPR-Cas9 基因編輯技術主要作用分子之一的 gRNA，此 gRNA 就兼具識別特定序列及活化整個系統；當 gRNA 與目標序列結合後，Cas9 即可進行 DNA 剪切以啟動非同源末端接合 DNA 修補機制 (圖二)。

CRISPR-Cas9 基因編輯技術操作概要如下：若已有目標基因的基因體序列，可利用 CRISPR DESIGN 程式尋找 CRISPR 的標靶位點 (在外顯子 (exon) 中約 20 個核苷酸組成的序列)，將此序列送入含有 gRNA 架構的質體，其後可利用試管內核糖核酸合成試劑組製備出 gRNA。Cas9 也已有商品化 Cas9 質體，同樣以試管方式進行 Cas9 mRNA 的合成，Cas9 mRNA 與 gRNA 混合後，即可利用顯微注射送入單細胞時期的受精卵，之後再利用異質雙股泳動性分析進行初篩、定序以確認其基因突變型。

相較於 TALENs 需要以模組逐步組合識別目標序列的左右兩臂 TALEN，CRISPR-Cas9 系統就簡單了許多，只需一次帶有標靶位點的 gRNA 載體選殖即可；再者，儘管這個系統是在細菌中被鑑定出來，竟出乎意料的可運用在廣泛生物中，從酵母菌、植物、無脊椎動物的線蟲與果蠅到脊椎動物的青蛙、兔子、齧齒類及其他哺乳動物。在這些優點之



註：crRNA淺綠色的部分即是利用程式搜尋後，所獲之最適與目標基因結合的標靶序列片段。

圖二 CRISPR-Cas9基因編輯技術的作用原理概圖

下，即使 CRISPR-Cas9 系統比 TALENs 晚 2-3 年推出，且因辨識位較短而有可能產生脫靶現象，但在推出後仍立即受到廣大研究者愛戴與使用。

(二) CRISPR-Cas9 基因編輯技術應用於魚類研究概況

在 CRISPR-Cas9 系統推出的 2013 年，斑馬魚立即被印證可利用此系統進行基因體序列移碼突變外，也發現可在 DNA 修補過程送入外源基因至目標序列中，這些新型斑馬魚研究策略重要性與發展進度因此一躍而升。除了針對單一基因外，科學家已可在斑馬魚中，以 CRISPR-Cas9 系統進行多個基因的編輯：Jao 等人在 2013 年將對應四個斑馬魚基因 (tyrosinase(tyr)、golden(gol)、mitfa 和 ddx19) 的 gRNA 混合後，與 Cas9 mRNA 同時送入受精卵中，成功同時造成這四個基因的基因體序列發生移碼突變；Ota 等人也在 2014 年時進行類似實驗，他們成功的同時造成 tyr、gol、slpr2 及 spns2 的基因體序列移碼突變，也確實觀察到成功突變的斑馬魚產生皮膚與視網膜色素沉澱變少及形成兩顆心臟的表型。

除了斑馬魚，CRISPR-Cas9 系統也成功的應用在另一種魚類模式動物青鱗魚中，亦可造成目標基因體移碼突變，其中本研究團隊也成功利用此系統產生 MSTN 缺失的青鱗魚，目前進展將於後文分享。過往許多水產養殖重要經濟魚種由於性成熟時間長而不利於育種與遺傳研究，現在也陸續的加入 CRISPR-Cas9 研究行列。Zhong 等人利用 TALENs 和 CRISPR-Cas9 系統，可在四倍基因體的鯉魚中，目標性的分別造成與骨骼形成相關基因 (sp7a、sp7b、runx2、bmp2a、spp1) 及其肌肉抑制因子基因 (mstnba) 等的基因體移碼突變，其後更成功的利用 CRISPR-Cas9 系統同時造成 sp7a 及 mstnba 的突變。在表型分析中，當骨骼形成相關基因突變的魚體會呈現嚴重的骨骼缺損表型，而將 mstnba 突變的鯉魚會有肌肉細胞顯著增加的現象。

在鮭魚研究中，為了避免養殖鮭魚從養殖場流出後，與野生型鮭魚交配擾亂野生鮭魚族群的遺傳

完整性，Wargelius 等人同時將針對鮭魚生殖細胞存活所需的重要基因 dnd 及作為篩選標記之色素形成相關基因 alb 的兩種 gRNA 連同 Cas9 mRNA 送入受精卵中，孵化後的鮭魚幼魚可先從體色變化進行初篩，可提高突變魚隻的篩選效率，隨後分析在篩選後魚隻中的 dnd 是否有成功突變，希望可藉由阻止生殖細胞正常發育而達到不孕效果。

結果顯示此種處理雖然不會影響鮭魚性別的分化，但在雄魚和雌魚兩者的生殖細胞似乎皆失去正常表型，推測將會影響其生殖能力。上述所舉之例在在都顯示 CRISPR-Cas9 系統是對基因體進行編輯的高效能工具，可同時大幅推進那些生活史長、性成熟慢之魚種的遺傳與育種研究步伐。

以青鱗魚為基因編輯模式動物之研究實例

由於上述低技術門檻的基因編輯技術可以在不嵌入任何外來基因至目標動物基因體下，利用其自然的 DNA 修補現象導致目標基因序列的隨機移碼突變，讓目標蛋白失去原本功能後，觀測對應表型。這種反向遺傳學研究策略，可以探索許多新穎基因的未知功能外，也可深入已知基因的功能性及未來產業應用性。本研究團隊多年投入經濟水產養殖物種的研究，從中也了解糧食危機及資源枯竭對於全球的威脅，如果可提高動物體生長速率，減少養殖過程的資源使用，或可藉由水產養殖滿足當前糧食需求之外，亦可同時兼顧天然資源保持與延續，不損害後代子孫生存權利，維持地球的永續發展 (sustainable development)。

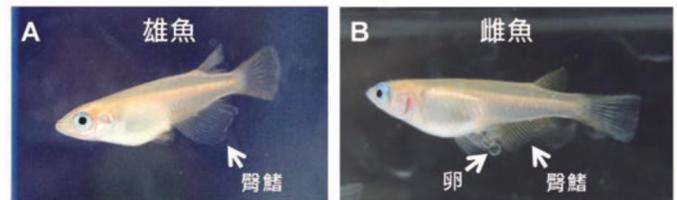
在哺乳類肌肉生長抑制因子 (MSTN) 研究中，此基因的抑制或缺失可獲得肌肉異常發達表型，這似乎符合上述養殖產業所追求的「快速生長養殖品系」；但在 MSTN 缺失的硬骨魚中，其表型卻不一致，如在斑馬魚中使用 RNAi 抑制 MSTN 或過度表現不活化態的 MSTN，有些個體可增加 1.4 倍體重，但有些研究僅有些微上升；而利用突變劑 ENU(N-ethyl-N-nitrosourea) 處理以篩選出 MSTN 失活的青鱗魚，則表現出高成長表型，如體重 / 體長增加、

肌肉纖維大小增加等。不同於哺乳動物與青鱗魚，由於多數魚種 MSTN 皆具有基因重複現象 (gene duplication; 即有兩個以上與 MSTN 具有同源性基因座存在)，如斑馬魚、鮭魚、鱒魚等，因此先前魚類 MSTN 剔除或抑制研究皆無法排除其他 MSTN 基因座可表現出具有功能性的 MSTN 所造成的影響。再者，在 MSTN 缺失的動物體中，除了肌肉倍增現象外，可能附帶其他的生理副作用 (side effect)，如降低免疫力或生殖力，因此在投入大量資源於 MSTN 抑制策略以增進經濟水產魚種養殖效益之前，先行使用適當魚種和簡便方法來徹底探討魚體 MSTN 功能性與副作用是必行研究。

(一) 使用青鱗魚作為MSTN基因編輯實驗動物的原因

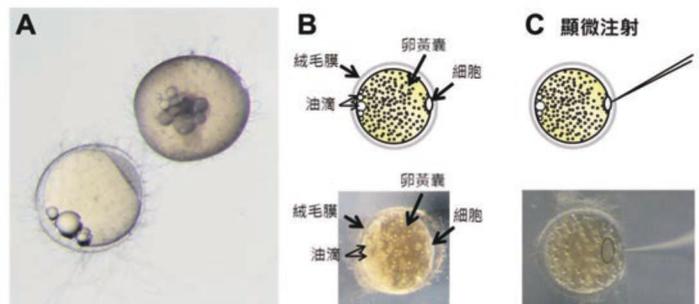
我們選用青鱗魚 (*Oryzias latipes*, medaka, 又稱稻田魚) 作為本研究的實驗動物 (圖三)，其主因在於青鱗魚已被長時間作為探討基因功能的低等硬骨魚實驗動物，其全基因體已完成定序並公布於公開網路空間 (http://www.ensembl.org/Oryzias_latipes/Info/Index)，其體型小(成魚約 3-4 公分)、易養殖、性成熟快(約 8-12 週即可進行交配)、卵量足夠(每日可產 10-20 左右不等)、顯微注射技術已純熟(圖四)等等特質，因此非常適合用來進行遺傳表徵、環境毒理學等研究主題。本研究團隊因此決定先行以青鱗魚為實驗動物，所獲之重要資訊可於未來轉譯至經濟魚種。

利用上述公開的青鱗魚基因體資料庫，已證實此魚種僅具有一個與哺乳動物 MSTN 為同源基因的 OIMSTN，不像其他魚類有發生 MSTN gene duplication 的現象，顯示出青鱗魚非常適合及容易進行 MSTN 基因編輯，並可專一性觀測 MSTN 缺失所造成的影響。與哺乳動物和其他硬骨魚一樣，青鱗魚的 MSTN 基因座由三個外顯子和兩個內含子所組織而成 (Ensembl gene no. ENSORLG00000015057)，此基因可轉譯具有 377 個胺基酸的多肽，並包含了三個保守性功能區域：



註：(A) 雄性青鱗魚體型瘦長，臀鰭較大且長、顏色透明。
(B) 雌性青鱗魚腹部豐滿，臀鰭較短小整齊、顏色淡黃；本圖中的雌魚腹部帶有數個卵。

圖三 雄性與雌性青鱗魚



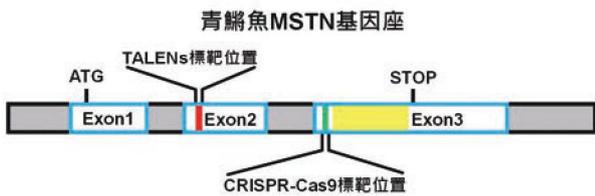
註：(A) 受精與未受精卵。左下為交配後約四小時的受精卵，受精卵呈現透明圓球狀；右上為未受精成功的胚胎，對光線的通透性差。
(B) 為受精後15分鐘左右的單細胞時期受精卵及卡通示意圖。
(C) 利用毛細管針進行顯微注射，將TALENs或是gRNA-Cas9 mRNA注射在單一細胞時期的受精卵中。

圖四 青鱗魚卵及顯微注射技術

Exon 1 的訊號序列 (signal peptide)、Exon 2 中的 N 端前勝肽 (N-terminal propeptide) 和 Exon 3 的 C 端活化功能區 (C-terminal active domain) (圖五)。

(二) 青鱗魚作為MSTN基因編輯標靶位點的選擇

標靶位點的設計策略主要與目標蛋白質主要功能區結構有關。以 MSTN 為例，在 MSTN 活化過程中，會先將 N 端訊號序列切除後分泌到細胞外，MSTN 的 N 端前勝肽會再次進行切除與降解，剩餘的 C 端活化功能區會與另一個 MSTN C 端活化功能區形成 MSTN C 端活化功能區同型二聚體 (C-terminal homodimer)，隨後即可結合在細胞膜受器上，並進一步活化 Smad2/3，Smad3 的活化會抑

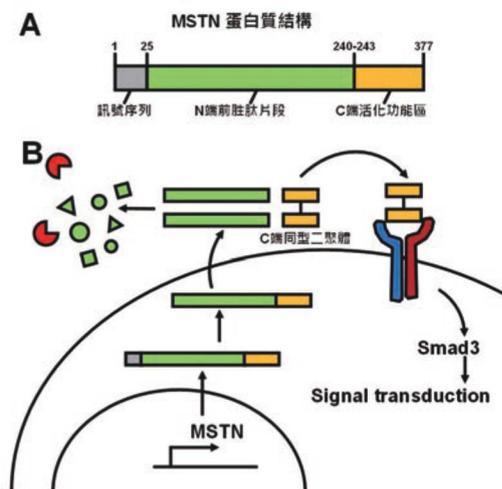


註：藍框區域：外顯子(Exon)；灰色區域：內含子(intron)；黃色區域：MSTN C端活化功能區。

圖五 TALENs與CRISPR-Cas9在青鱒魚MSTN基因體序列上的標靶位置

制下游與肌肉生長相關的基因表現(圖六)。從上述資料中可知，決定MSTN活性的區域是位於C端的活化功能區，因此標靶位點需設計在可轉譯出此C端活化功能區的序列上游，這樣當DNA修補所造成的序列移碼突變時，才可導致下游C端活化功能區的基因體序列編碼位移，讓MSTN完全失去功能。

在此策略下，TALENs的標靶位點則設計在外顯子2，CRISPR-Cas9的標靶位點則設計在外顯子3可轉譯出C端活化功能區序列的上游處(圖五)。利用此兩個基因編輯技術分別進行MSTN基因編輯，



註：(A) MSTN蛋白質結構示意圖。
(B) MSTN作用機制，MSTN的C端活化功能區同型二聚體會活化Smad3，進而抑制下游與肌肉生長相關基因的表現。

圖六 MSTN的蛋白質結構與其作用機制

皆成功產生C端活化功能區序列移碼突變的F0親代，繼續進行交配所產生的F1、F2乃至F3，皆可帶有同樣移碼突變之基因型(圖七)。

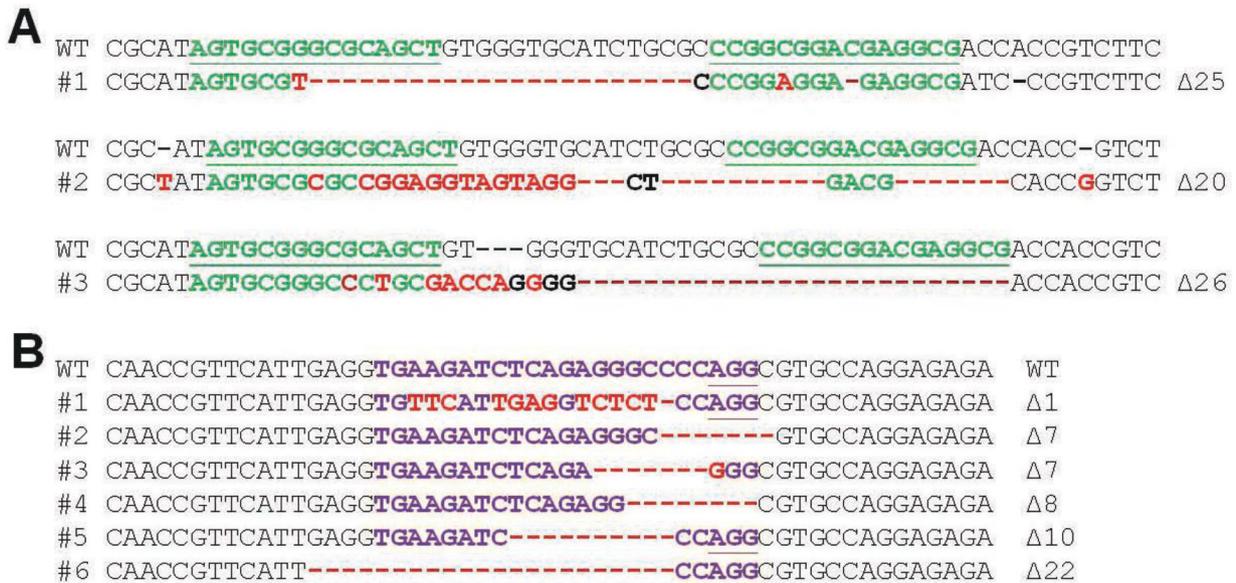
(三) 由基因編輯技術所獲之MSTN缺失青鱒魚的生長表型分析

由TALENs所產生的MSTN缺失(TALENs-mediated MSTN^{-/-} medaka, T-MSTN^{-/-})青鱒魚的第二子代(F2)，針對其幼魚期至成體的體長和體重進行持續追蹤，發現T-MSTN^{-/-}青鱒魚在這兩個指標上皆大於同期的野生型(wild type medaka, WT)青鱒魚；而在最後的觀察時間點(孵化八週後)，體長和體重則分別增加了13.4%及24.5%。MSTN下游所抑制與肌肉生長相關之肌肉轉錄调控因子(myogenic regulatory factor, MRF)，如MyoD、Myf5與Myogenin等，皆在孵化四週後的T-MSTN^{-/-}青鱒魚中有明顯上升趨勢。就魚的形態而言，第二子代T-MSTN^{-/-}青鱒魚除了體長和體重增加以外，並沒有觀察到其他明顯缺陷或畸形。這些結果指出T-MSTN^{-/-}青鱒魚具有肌肉快速生長、體型較大的表型。

由CRISPR-Cas9所產生的MSTN缺失(CRISPR-mediated MSTN^{-/-} medaka, C-MSTN^{-/-})青鱒魚的第三子代，如同T-MSTN^{-/-}青鱒魚所呈現的表型，C-MSTN^{-/-}青鱒魚體長與體重皆大於同期的野生型青鱒魚(圖八)，目前也未觀察到其他明顯外在缺陷或畸形。在利用兩種普遍使用並具高效率及目標特異性的基因組編輯工具(TALENs及CRISPR-Cas9)，青鱒魚MSTN基因體序列成功產生移碼突變，而這些基因型皆可繼續遺傳至子代，藉由這些MSTN突變青鱒魚的表型可知，青鱒魚的MSTN如同哺乳動物的MSTN具有抑制肌肉生長特性。

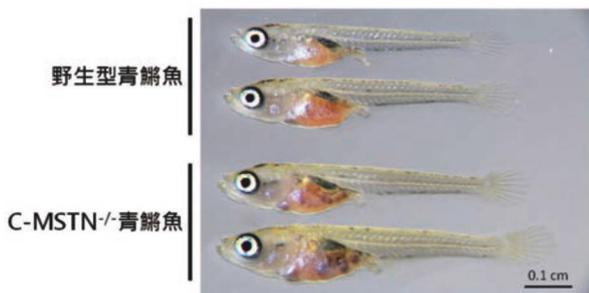
(四) 由基因編輯技術所獲之MSTN缺失青鱒魚的後續研究議題

經由基因編輯技術所產生的MSTN缺失青鱒魚已被證實具有高成長率的表型，看似將經濟魚類進



註：綠色標記區域：TALENs標靶位置；紫色標記區域：CRISPR-Cas9標靶位置；紅色標記核苷酸：插入序列；紅色標記短線：被刪除的序列。(本圖並未包含本團隊篩選到的所有基因型，僅以數例作為代表)

圖七 (A)TALENs及(B)CRISPR-Cas9基因編輯技術所產生之青鱗魚MSTN基因移碼突變之基因型例子



圖八 孵化後三周的野生型與C-MSTN^{-/-}青鱗魚苗

行 MSTN 基因剔除應有利於水產養殖永續發展的目標。先不就基因編輯生物是否屬於基因改造生物 (genetically modified organisms, GMO) 此複雜議題進行討論，但出乎意料的是 T-MSTN^{-/-} 青鱗魚似乎有著免疫能力低落的伴隨表型 (C-MSTN^{-/-} 青鱗魚尚未進行免疫能力評估)。

在畜禽類及水產養殖動物，例如牛、豬、禽類及鱒魚等，MSTN 功能缺失所造成的高生長現象，一直被視為對產業發展及地球資源利用有正面影

響力，目前並沒有任何證據顯示阻斷 MSTN 運作 (myostatin blockade) 會在正常情況下對動物生存造成負面影響。然而，從動物能量代謝及使用角度而言，快速生長及保持足夠免疫能力都是相當消耗能量的生理行為，因此在這些耗能但有助於動物存活的表型 (fitness-enhancing traits) 之下，會顯示出表型取捨現象 (trade-off)。

在足夠的環境資源之下，生物為了生存，對所有主要的適應性性狀 (fitness trait)，如成長率、免疫力、繁殖力、繁殖成功率、抗壓及老化等等，可在最理想狀況下，將能量經由分配後，使每個存活特性達到最佳的中間值，此為生物體的「資源配置理論」 (resource allocation theory)。此理論對於生物演化過程中，在存活、行為、性狀及生理的選擇策略上極為重要。然而在現實面上，生物會因為面對有限的生存資源，而不得不面臨性狀選擇，能量將會轉而被配置到主要性狀，而其他次要性狀即會因能量不足而導致功能低落，這就是取捨現象。舉例而言，以生長快速表型所篩選出的家禽類，對於免疫刺激

後所表現出的免疫能力有低落現象；Foote 等人的研究亦指出，就算是經由高營養食品餵食以促使小牛快速成長，同樣造成其免疫細胞發育能力降低。

相較於 MSTN 對於肌肉生長抑制作用的功能性，評估 MSTN 在免疫調控能力評估的研究可說是極為少數，因此對於下述問題「由基因編輯技術或其他方式所獲得的 MSTN 缺失動物，是否確實普遍具有免疫能力低落的情形呢？」，尚未有明確的答案，而 T-MSTN^{-/-} 青鱗魚及 C-MSTN^{-/-} 青鱗魚即可被應用在此複雜、但具產業重要性的議題進行深入探討。但若此現象未來被證實為真，MSTN 缺失動物應用於動物養殖業時，就需要被謹慎評估；取而代之的方案或許是在特定時期且片段式的 MSTN 抑制技術，僅在靠近上市前的養殖階段進行 MSTN 抑制以增加成長率。

結語

簡單、方便、快速而且幾乎人人用得起的基因編輯技術，可藉由生物本身的 DNA 修補機制，讓科學家有效率且精準的在各式生物中進行目標基因 DNA 序列的編輯，而這些技術仍不斷的精進及增加其基因編輯的多元性，勢必對於不遠的未來具有巨大影響力。由於斑馬魚及青鱗魚的基因體皆已被解序且相對生活周期短，可快速的藉由此技術探索脊椎動物基因功能與相對應表型。當然不僅只為模式

動物魚種，基因編輯研究亦可加速水產養殖魚種乃至於觀賞魚種的改良與優化，此為極具產業發展潛力的研究方向。在這些研究過程中，科學家也可同時思考如何將這些研究成果連結至他種生物中，將科學發現轉移至疾病控制、抗病能力、特質優化、產業改良、醫療應用、減少遺傳疾病發生乃至於物種維持等有利於人類社會永續發展的面相。

從基因編輯技術使用的廣泛性，可預見藉由這些技術所產生的基因修改動植物的數量也會不斷快速增加，當然也帶來在法律、道德及環境影響的隱憂。雖然上述最基本的基因編輯技術並未帶入外來基因至目標動物基因體中，所造成的序列改變也是由生物自然修補機制所造成，已有別於過去轉基因生物的產生方式，但對於「是否經基因編輯將產出的生物不歸類於 GMO」這個議題仍無法在短時間內獲得定論，是否可將此類生物應用於產業也有很長的一段路要走。即使自去年開始，已有數個國家開始認定部分基因編輯技術所產生的作物，並不歸類在法律對 GMO 管轄範圍內，但仍未有一致共識、清楚界線及完全自由的應用性。不論如何，基因編輯技術讓科學家及世界看到了新的希望及挑戰，驥望可在合乎科學倫理及法規之下，藉由應用這些技術，讓世界更加的美好與進步。

AgBio

王涵青	國立成功大學	生物科技與產業科學系	副教授
葉盈君	國立成功大學	生物科技與產業科學系	博士後研究員
前川峻	國立成功大學	生物科技與產業科學系	博士後研究員
青木宙	國立成功大學	生物科技與產業科學系	客座教授

參考文獻

1. Ansai, S., Sakuma, T., Yamamoto, T., Ariga, H., Uemura, N., Takahashi, R. and Kinoshita, M. (2013) *Efficient targeted mutagenesis in medaka using custom-designed transcription activator-like effector nucleases*. *Genetics* 193:739-749.
2. Bedell, V.M., Wang, Y., Campbell, J.M., Poshusta, T.L., Starker, C.G., Krug, R.G. 2nd., Tan, W., Penheiter, S.G., Ma, A.C., Leung, A.Y., Fahrenkrug, S.C., Carlson, D.F., Voytas, D.F., Clark, K.J., Essner, J.J. and Ekker, S.C. (2012) *In vivo genome editing using a high-efficiency TALEN system*. *Nature* 491:114-118.
3. Beilharz, R.G., Luxford, B.G. and Wilkinson, J.L. (1993) *Quantitative genetics and evolution: Is our understanding of genetics sufficient to explain evolution?* *J Anim Breed Genet* 110:161-170.
4. Boettcher, M. and McManus, M.T. (2015) *Choosing the Right Tool for the Job: RNAi, TALEN, or CRISPR*. *Mol Cell* 58:575-585.
5. Chiang, Y.A., Kinoshita, M., Maekawa, S., Kulkarni, A., Lo, C.F., Yoshiura, Y., Wang, H.C. and Aoki, T. (2016) *TALENs-mediated gene disruption of myostatin produces a larger phenotype of medaka with an apparently compromised immune system*. *Fish Shellfish Immunol* 48:212-220.

參考文獻

6. Chisada, S.I., Okamoto, H., Taniguchi, Y., Kimori, Y., Toyoda, A., Sakaki, Y., Takeda, S. and Yoshiura, Y. (2011) *Myostatin-deficient medaka exhibit a double-muscling phenotype with hyperplasia and hypertrophy, which occur sequentially during post-hatch development*. Dev Biol 359:82-94.
7. Christian, M., Cermak, T., Doyle, E.L., Schmidt, C., Zhang, F., Hummel, A., Bogdanove, A.J. and Voytas, D.F. *Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases*. Genetics 186:757-761.
8. Dong, Z., Ge, J., Xu, Z., Dong, X., Cao, S., Pan, J. and Zhao, Q. (2014) *Generation of myostatin B knockout yellow catfish (Tachysurus fulvidraco) using transcription activator-like effector nucleases*. Zebrafish 11:265-274.
9. Foote, M.R., Nonnecke, B.J., Beitz, D.C. and Waters, W.R. (2007) *High growth rate fails to enhance adaptive immune responses of neonatal calves and is associated with reduced lymphocyte viability*. J Dairy Sci 90:404-417.
10. Guernec, A., Berri, C., Chevalier, B., Wacrenier-Cere, N., Le Bihan-Duval, E. and Duclos, M.J. (2003) *Muscle development, insulin-like growth factor-I and myostatin mRNA levels in chickens selected for increased breast muscle yield*. Growth Horm IGF Res 13:8-18.
11. Huang, P., Xiao, A., Zhou, M., Zhu, Z., Lin, S. and Zhang, B. (2011) *Heritable gene targeting in zebrafish using customized TALENs*. Nat Biotechnol 29:699-700.
12. Ma, L., Jeffery, W.R., Essner, J.J. and Kowalko, J.E. (2015) *Genome editing using TALENs in blind Mexican Cavefish, Astyanax mexicanus*. PLoS One 10:e0119370.
13. Jao, L.E., Wente, S.R. and Chen, W. (2013) *Efficient multiplex biallelic zebrafish genome editing using a CRISPR nuclease system*. Proc Natl Acad Sci U S A 110:13904-13909.
14. Ledford, H. (2016) CRISPR: *gene editing is just the beginning*. Nature 531:156-159.
15. Lee, C.Y., Hu, S.Y., Gong, H.Y., Chen, M.H., Lu, J.K. and Wu, J.L. (2009) *Suppression of myostatin with vector-based RNA interference causes a double-muscle effect in transgenic zebrafish*. Biochem Biophys Res Commun 387:766-771.
16. McPherron, A.C. and Lee, S.J. (1997) *Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene*. Proc Natl Acad Sci U S A 94:12457-12461.
17. Medeiros, E.F., Phelps, M.P., Fuentes, F.D. and Bradley, T.M. (2009) *Overexpression of follistatin in trout stimulates increased muscling*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 297:R235-242.
18. Ota, S., Hisano, Y., Ikawa, Y. and Kawahara, A. (2014) *Multiple genome modifications by the CRISPR/Cas9 system in zebrafish*. Genes Cells 19:555-564.
19. Reardon, S. (2016) *Welcome to the CRISPR zoo*. Nature 531:160-163.
20. Sander, J.D., Cade, L., Khayter, C., Reyon, D., Peterson, R.T., Joung, J.K. and Yeh, J.R. (2011) *Targeted gene disruption in somatic zebrafish cells using engineered TALENs*. Nat Biotechnol 29:697-698.
21. Sander, J.D. and Joung, J.K. (2014) *CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes*. Nat Biotechnol 32:347-355.
22. Travis, J. (2015) *Making the cut*. Science 350:1456-1457.
23. van der Most, P.J., de Jong, B., Parmentier, H.K. and Verhulst, S. (2011) *Trade-off between growth and immune function: a meta-analysis of selection experiments*. Functional Ecology 25:74-80.
24. Wargelius, A., Leininger, S., Skaftnesmo, K.O., Kleppe, L., Andersson, E., Taranger, G.L., Schulz, R.W. and Edvardsen, R.B. (2016) *Dnd knockout ablates germ cells and demonstrates germ cell independent sex differentiation in Atlantic salmon*. Sci Rep. 6:21284.
25. Xu, C., Wu, G., Zohar, Y. and Du, S.J. (2003) *Analysis of myostatin gene structure, expression and function in zebrafish*. J Exp Biol 206:4067-4079.
26. Zhong, Z., Niu, P., Wang, M., Huang, G., Xu, S., Sun, Y., Xu, X., Hou, Y., Sun, X., Yan, Y. and Wang, H. (2016) *Targeted disruption of sp7 and myostatin with CRISPR-Cas9 results in severe bone defects and more muscular cells in common carp*. Sci Rep 6:22953.