



財團法人
食品工業發展研究所
Food Industry Research and Development Institute

生物資源保存及研究簡訊

中華民國 111 年 9 月發行

補助單位：經濟部技術處 / 執行單位：財團法人食品工業發展研究所

本期內容

研發成果

1

- ◎ 酵母菌基因編輯技術在產業應用之發展概況
- ◎ 棒狀桿菌基因編輯
- ◎ 益生大腸桿菌基因編輯技術的應用
- ◎ 基因編輯相關法規介紹

酵母菌基因編輯技術

在產業應用之發展概況

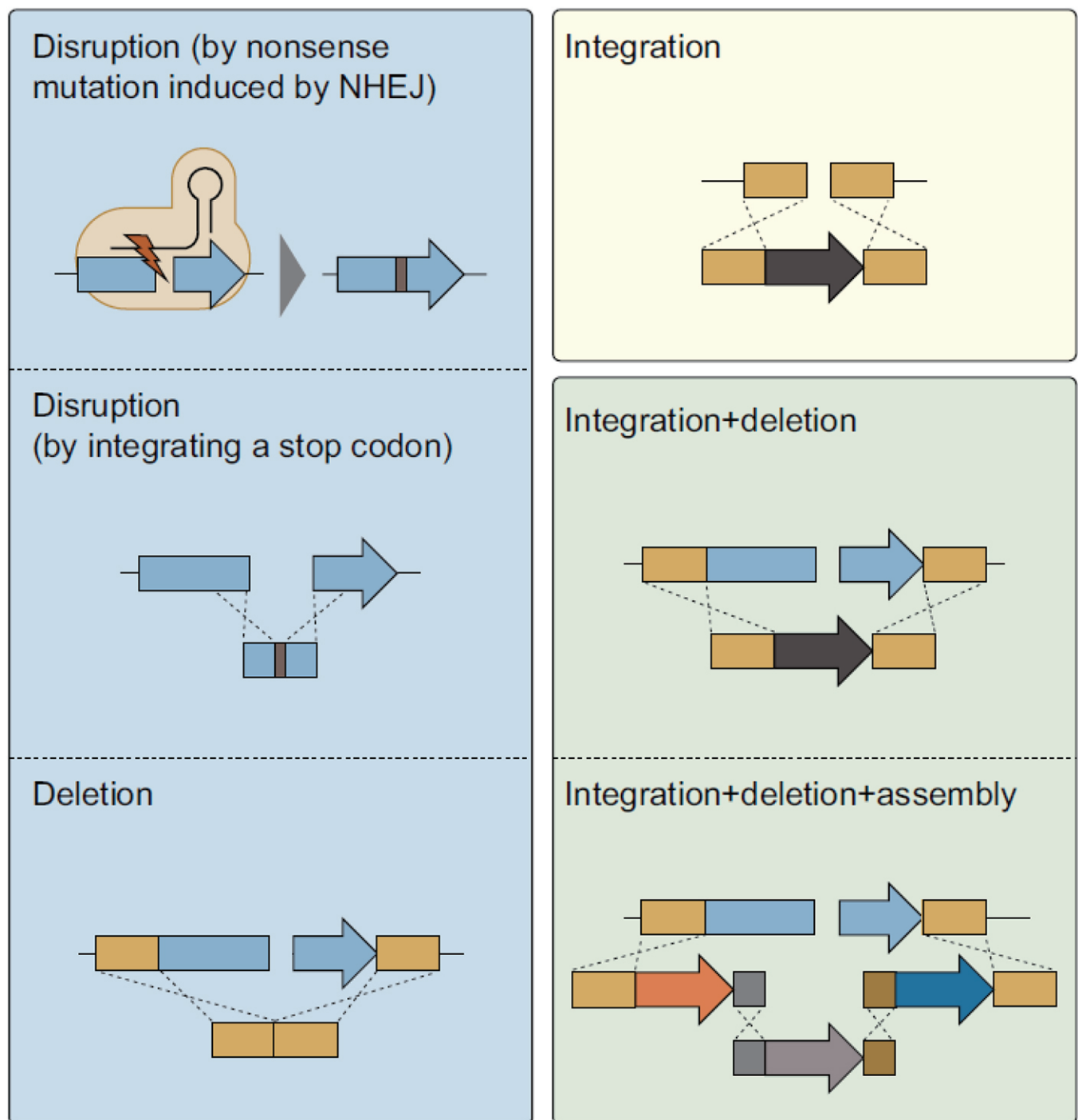
生物資源保存及研究中心 / 副研究員
陳柏洲

一、前言

酵母菌被人類取作進行釀酒及烘焙已經有幾千年的悠長歷史，長久以來，人們使用傳統育種的方式改良酵母菌，以獲得具有目標特色的菌株，然而近幾十年來，酵母菌的生化特性及基因序列逐漸被研究透徹，於是科學家開始嘗試以分子工程技術進行酵母菌基因改造，將重組基因送入宿主細胞產生新的酵母菌品系。酵母菌並非病原菌，加上具有長久的安全使用歷史及分子操作上的便利性，讓許多科學家紛紛投入相關技術的研發，包括利用 PCR 技術在特定序列造成基因修飾及利用 DNA 雙股切割修復系統等，而在 CRISPR-Cas 系統被發現後，更是大大打開了基因編輯技術的大門。本文將簡單介紹基因編輯技術內容、基因編輯酵母菌在釀酒及烘焙產業上之應用潛力及本所自行研發成果。

二、CRISPR-Cas 基因編輯技術之簡介

CRISPR I-Cas 基因編輯技術為透過標靶特定序列並以內切核酸酶截切造成 DNA 斷裂，藉細胞內修復機制造成宿主特定序列改變之技術。其作用機制分為三個步驟，首先與 DNA 結合，進行目標序列 DNA 切割，最後藉著細胞修復機制進行 DNA 修復。CRISPR I-Cas 系統可辨認目標序列附近的 PAM (protospacer adjacent motif) 位置，由約 20 bp 的 guide RNA (gRNA) 序列帶著 DNA 內切酶 Cas 與緊鄰的目標序列結合，gRNA 的設計將會決定基因編輯的效率及專一性，與目標序列結合後，Cas 便會被加以活化進而切割 DNA，接著宿主細胞偵測到 DNA 斷裂後，便會啟動修復機制，細胞內有兩種主動修復 DNA 機制，分別為非同源末端接合 (non-homologous end-joining, NHEJ) 及同



圖一、CRISPR-Cas 技術之不同應用

(Mitsui *et al.*, 2019)

源重組 (homologous recombination, HR)，非同源末端接合不需要作為模板的 DNA 序列，而同源重組的進行則需要 DNA 序列作為模板。

三、CRISPR-Cas 基因編輯技術於酵母菌之應用概況

由於釀酒酵母菌偏好採取同源重組的方式進行 DNA 修復，藉此特性將能夠高效率地實現在目標位置嵌入或剔除特定基因（圖一），相反地也因釀酒酵母菌不偏好以非同源末端接合方式修復 DNA，因此在釀酒酵母菌基因

體中操作基因編輯技術，可大大降低因非同源末端接合方式所引起的脫靶效應。利用 CRISPR-Cas 基因編輯技術除了可以剔除單一基因外，目前的研究使用能夠表現多組 gRNA 的單一質體在雙倍體的酵母菌基因體中，可同時剔

除不同位置的不同特定基因。此技術也可以在基因體中嵌入多個異源基因，有研究團隊嘗試將五個與類胡蘿蔔素合成相關的基因序列同時嵌入至三個特定位置，進而提高 31% 的類胡蘿蔔素產量；有不同的研究團隊將 18 個 24 kb 長度及 40 個 3.5kb 長度的 DNA 序列透過 CRISPR-Cas 技術同時嵌入酵母菌基因體中。

四、CRISPR-Cas 酵母菌基因編輯技術之產業應用概況

1. 利用酵母菌大量表現特定蛋白質

從 1980 年代開始，重組蛋白質開始應用於食品、化學及製藥產業，到了 2020 年，重組蛋白質的市場價值已有 28.5 億美元。目前生產重組蛋白質還是以大腸桿菌為主，但因為酵母菌具有轉譯後修飾作用的特性，所以已被視為未來用以表現重組蛋白質的重要宿主微生物。已有文獻指出使用 CRISPR-Cas 技術將目標序列 DNA 剪切後，再以同源重組方式嵌入欲表現蛋白質之基因組，可大幅提高基因編輯成功效率，利用此系統將 40 個 3.5 kb 大小的相同基因片段嵌入酵母菌 δ 序列中，取培養基進行分析，發現所表現的蛋白質活性較傳統使用的分子工程所得菌株高了 17.3 倍。CRISPR-Cas 技術結合於 δ 序列嵌入目標基因，能夠被應用於各種重組蛋白質包括藥物蛋白質的大量表現，將來對於不同產業的應用潛力甚為巨大。

2. 應用於編輯酵母菌代謝途徑

CRISPR-Cas 技術已被廣泛應用在酵母菌的代謝工程，包括表現或抑制數個與代謝途徑相關的基因，以達到增加目標物質濃度或減少代謝副產物的目的。有研究團隊將一段 24 kb 大小的 DNA 片段，包含了與木糖分解及 (R,R)-2,3- 丁二醇合成有關的基因，18 個相同的片段透過 CRISPR-Cas 技術嵌入酵母菌基因體的 δ 序列中，經過編輯的菌株可以成功將木糖代謝並生產 (R,R)-2,3- 丁二醇。

除了嵌入特定基因，CRISPR 干擾技術也同時在發展中，利用經突變失去核酸酶活性的 Cas (dCas) 與 gRNA 達到專一性地與 RNA 聚合酶或轉錄因子結合，進而抑制轉錄反應的進行。研究團隊在酵母菌中表現 dCas 與一組合 7 個針對不同目標基因的 gRNA，抑制這些基因約 75% 的轉錄表現，成功大幅提升目標產物 β -amyrin 的濃度。除了 CRISPR 干擾技術，藉著 dCas 增加目標基因轉錄作用的 CRISPR 活化技術也被大量研究。與傳統基因工程技術相比，使用 CRISPR-Cas 技術進行酵母菌代謝工程具有更多的優勢，未來趨勢將會朝向嵌入代謝途徑所需基因及同時調控更多基因表現而發展。

3. 酵母菌之環境耐受性工程

酵母菌對於環境壓力耐受性是許多不同基因相互協同調控所表現出的一種複雜機制，而

CRISPR-Cas 技術也已被應用於壓力耐受性菌株的篩選，其中有一組研究團隊以 CRISPR-Cas 系統在酵母菌基因體特定位置產生斷裂而以非同源末端接合修復機制達到隨機突變目的，此機制類似於傳統的菌株突變方法，如放射線照射及化學藥劑處理，將突變菌株在固定環境壓力下進行培養，能成功生長的菌株即表示已具有環境壓力耐受性，文獻指出使用此突變技術，可獲得具耐高溫特性菌株，且同時可耐受高濃度酒精及酸性環境壓力。透過不同類型和強度的環境壓力，利用 CRISPR-Cas 突變技術將可篩選出各種環境耐受性酵母菌株，對於產業界建構工業級酵母及學術界研究酵母菌的環境耐受機制都是相當便利的工具技術。

4. 釀酒產業之應用

近年在高度競爭的葡萄酒釀造市場上，對於酒類品質及安全性的日趨要求，因此開發新的釀酒酵母菌株越發重要，一株好的釀酒酵母菌株應能耐受極端的發酵環境壓力，代謝產物達到氣味的平衡而不產生酸敗的異味，更重要的是釀酒終產物不應含有對人類健康會產生危害的物質。科學家嘗試在實驗室使用分子工程構築酵母菌，期待獲得發酵能力更好並提高酒品感官品質的菌株。CRISPR-Cas 技術已大量應用於釀酒酵母菌株的構築，例如尿素是致癌物氨基甲酸乙酯的前驅物，利用 CRISPR-Cas 技術降低尿素的生成，進而減少酒類產品中甲酸

乙酯的濃度，經過發酵之後，分析產物中尿素的含量，發現尿素濃度會比使用母株酵母菌所得發酵產物減少 92.0% 之多，而甲酸乙酯的濃度也會減少 16.8%。酵母菌的 *ATF1* 基因產物乙醇乙醯轉移酶 I 能代謝生成乙醯乙酯，乙酸乙酯是決定酒類獨特風味的重要風味物質，可呈現果膠香味、水果香味或花香味，藉著 CRISPR-Cas 技術在酵母菌基因體中嵌入 *ATF1* 基因及 *GPD1* 基因 (表現甘油-3-磷酸脫氫酶)，分析其發酵產物，甘油及乙酸乙酯濃度皆有提昇，甘油可維持酒品在口中的天鵝絨口感及醇厚感，此基因編輯菌株同時可減少醋酸的生成，避免酒品產生酸敗的異味。

五、本所研發成果

本所生資中心研發團隊建構酵母菌 CRISPR-Cpf1 基因編輯平台，利用菌株視覺化辨識系統，建立最佳化之高效率基因編輯系統。為了提高酵母菌應用於冷凍麵團之抗凍能力，剔除酵母菌之海藻糖分解酶基因及或熱休克蛋白基因以降低酵母菌因凍融之傷害。透過分析結果發現，基因編輯菌株可使海藻糖大量累積於細胞中，而海藻糖為酵母菌能夠避免冷凍傷害的重要物質；基因編輯菌株冷凍回溫後的存活率皆遠高於原始菌株；此外，將酵母菌與麵團混合後冷凍，模擬麵團冷凍保存後之發酵情形，結果顯示原始酵母菌無法提供冷凍麵團任何膨發能力，而含有基因編輯菌株的冷凍麵團在解凍後仍能正常膨發，顯示基因編輯菌株具

有較高的抗凍能力，有利於應用於冷凍麵團製作。本所研究團隊利用最佳化的基因編輯平台，精準編輯酵母菌特定基因，提升酵母菌之抗凍能力。基因編輯平台可應用在菌株特性改良上，將可大幅提升酵母菌於食品工業之應用發展。

六、參考文獻

1. Malc1, K., Walls, L.E., Rios-Solis, L. 2020. Multiplex genome engineering methods for yeast cell factory development. *Front Bioeng Biotechnol.* 8, 589468.
2. Mitsui, R., Yamada1, R., Ogino,

H. 2019. CRISPR system in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and its application in the bioproduction of useful chemicals. *World J Microbiol Biotechnol.* 35(7), 111.

3. Vilela, A. 2021. An overview of CRISPR-based technologies in wine yeasts to improve wine flavor and safety. *Ferment.* 7(1), 5.
4. Chen, B.C and Lin, H.Y. 2022. Deletion of NTH1 and HSP12 increases the freeze-thaw resistance of baker's yeast in bread dough. *Microb Cell Fact.* 21, 149.

棒狀桿菌基因編輯

生物資源保存及研究中心 / 副研究員
廖雪君

一、前言

“基因編輯”是近年來在生物學界新起的一個名詞，從字面上解析“基因”是指能夠遺傳且具功能性的一段 DNA 或 RNA 序列，而“編輯”則通常指各種媒體在出版前進行的後期製作，包含內容取捨、剪接、排版、校對及審核等過程，因此“基因編輯”顧名思義就是取捨、剪接及置換生物之基因序列。目前已開發出多種基因編輯技術如鋅指核酸酶 (zinc-finger nucleases, ZFNs)、類轉錄激活效應因子核酸酶 (transcription activator-like effector nucleases, TALENs) 及

常間群聚短迴文重複序列核酸酶 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats-CRISPR associated proteins, CRISPR-Cas) 等等，其中又以常間群聚短迴文重複序列核酸酶為目前基因編輯技術之主流。為何要費盡心想盡辦法的去編輯生物的基因呢？許多案例顯示，透過基因編輯技術可以提升番茄的 GABA 含量，可以增進鯛魚的肌肉比率，可以促進微生物之代謝產物的生產，甚至可以治療遺傳性疾病，這些案例證實基因編輯技術廣泛的用途和明確的效果，且基因編輯技術可以達到最終產物不含外來基因序列之境界，可比擬為基因發生

自然變異之生物，較傳統基因改造產物少了一層安全上的疑慮，因此吸引許多學者投注心力於其中，而作為工業上重要生物工廠“麩胺酸棒狀桿菌”亦為主要研究題材之一，期望能藉由基因編輯技術提升其生產效率，達到降低生產成本及創造利潤之目的，至今已有許多相關研究被發表。

二、麩胺酸棒狀桿菌之價值

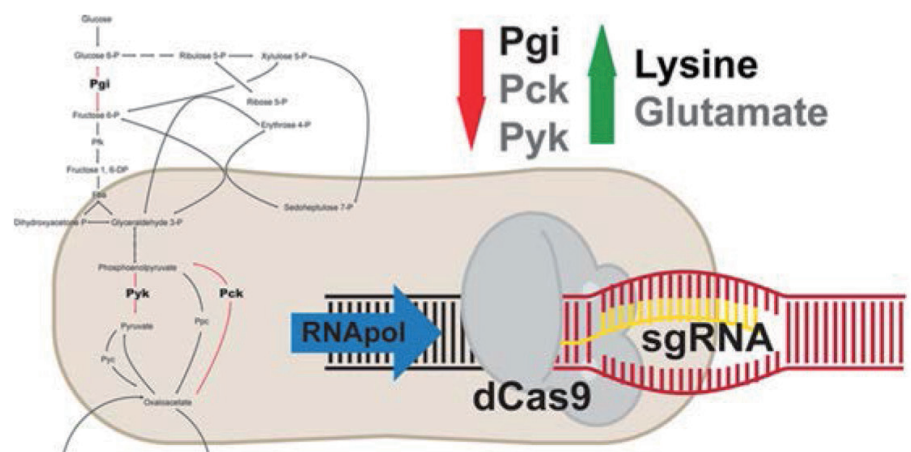
麩胺酸棒狀桿菌 (*Corynebacterium glutamicum*) 是一種革蘭氏陽性菌，廣泛分布於土壤中，且因麩胺酸棒狀桿菌為公認安全的 GRAS(generally recognized as safe) 菌株，故於一般工業生產之外，亦可應用於食品製造產業上，由於生長快速和具食品安全性，為一理想的微生物工廠及工業用生產菌株。在過去的幾十年裡，麩胺酸棒狀桿菌主要被使用於生產麩胺酸和離胺酸 (Lysine)，其產量可達每年約 600 萬噸。明顯可見之商業價值，吸引業者投入資金進行更進一步的研發，至今以麩胺酸棒狀桿菌為生物工廠生產製造的天然或非天然化合物已有 70 多種，如主要用作豬和家禽飼料添加劑的離胺酸及甲硫胺酸 (Methionine)；作為輸液和特殊飲食主要補充劑的異白胺酸 (Isoleucine)；穩定血壓、促進睡眠、緩和情緒刺激造成的不安及緊張感之保健食品 γ -氨基丁酸；合成生物基聚醯胺材料尼龍 5(Nylon 5) 和尼龍 5,6(Nylon 5,6) 的單體及參與許多化學合成路徑的氨基戊酸 (5-aminovalerate, 5AVA)；可用

作免疫抑製劑或肽類抗生素的前體之非蛋白胺基酸 2-吡啶甲酸 (pipecolic acid, L-PA)；美白、抗氧化、保濕、防曬等功能，具備全方位化妝品應用開發潛力的天然的細胞保護劑四氫嘧啶 (ectoine)；具有作為聚合物結構單體潛在功能的離胺酸降解過程中之中間體二氨基戊烷 (1,5-diaminopentane, DAP)；可作為生物基聚醯胺和聚酯基礎材料的戊二酸 (glutarate)；用於化纖、樹脂、橡膠、塗料、造紙、醫藥、農藥、食品、絲綢等市場應用領域的伊康酸 (itaconic acid) 及其他諸如醇類，維生素和具有抗病毒和抗癌活性的紫羅蘭素 (violacein) 等等，這些研發成果皆說明麩胺酸棒狀桿菌之商業價值及其對生物經濟發展之重大貢獻 (Becker *et. al.*, 2018)。

三、麩胺酸棒狀桿菌基因編輯系統

檢閱並整理已發表之文獻，發現目前用於麩胺酸棒狀桿菌之基因編輯系統主要為 CRISPR-Cas9 和 CRISPR-Cpf1 兩大系統，

其中 Cas9 屬於第 2 類的 CRISPR 系統，且為第一個被廣泛應用的 CRISPR 核酸酶，而 Cpf1 則為第 5 類的 CRISPR 系統。雖然 CRISPR-Cas9 和 CRISPR-Cpf1 系統編輯生物基因之主要步驟均為辨認目標 DNA 序列，接著使辨認 DNA 序列位置產生斷裂，最後再修復 DNA 序列，但兩者細部之間則有些許關鍵差異點，包括：1. DNA 斷裂方式不同：Cpf1 導致雙鏈 DNA「交錯」或「黏性 (sticky end)」切割，而 Cas9 則主要造成平整的「鈍的 (blunt end)」末端。2. 辨認的原間隔序列鄰近的區域 (protospacer adjacent motif, PAM) 不同：Cpf1 辨認「富含 T 鹼基」的 PAM，而 Cas9 所辨認之 PAM 序列則為 NGG。3. Cpf1 僅需要 CRISPR RNA (crRNA) 用於成功標定目標序列，但 Cas9 則除了 crRNA 之外，還需要一個反向活化 crRNA (tracrRNA) 的協助，才可成功標定目標序列，因此在進行基因編輯實驗時，不同的系統須考量的條件亦不相同。此外 CRISPR-



圖一、CRISPRi 反應流程圖

(Cleto, *et. al.*, 2016)

Cas9 系統在抑制基因表現上，發展出類似 RNAi 概念的 CRISPRi (CRISPR interference) 模式，此模式為將喪失基因序列斷裂功能之突變 Cas9 與目標基因結合，造成目標基因無法正常進行轉錄作用，進而達到抑制基因活性之效果 (Safari, *et. al.*, 2019)。

四、麩胺酸棒狀桿菌基因編輯案例

2016 年 Cleto 等人將 Cas9 之第 10 和第 840 個胺基酸突變成 alanine，獲得沒有核酸水解酶活性的突變蛋白 dCas9 (D10A 和 H840A)，將 dCas9 分別和 *pgi*、*pck* 及 *pyk* 基因之 sgRNA 匹配，並以電轉方式送入麩胺酸棒狀桿菌中，以期干擾麩胺酸棒狀桿菌之 *pgi*、*pck* 及 *pyk* 基因之轉錄，實驗結果顯示成功降低這 3 個基因的 mRNA 合成，且 *pgi* 基因的轉錄活性降低導致磷酸戊糖途徑 (pentose phosphate pathway) 過量生產 NADPH，進而增加離胺酸的合成，而 *pck* 及 *pyk* 基因之轉錄活性降低則影響三羧酸循環 (tricarboxylic acid cycle)，則促進麩胺酸之生產 (圖一) (Cleto, *et. al.*, 2016)。2021 年 Yao 等人以 CRISPR-Cas9 系統編輯麩胺酸棒狀桿菌 (ATCC13032)，成功刪除 10 多個 ATCC13032 基因，並以較強之啟動子 PtacM 及人工合成之核糖體結合位點置換 *gdhA* 基因之天然啟動子，檢測基因編輯株發酵液中麩胺酸及麩醯胺酸 (L-glutamine) 之含量，發現 *glnA1* 基因編輯菌株發酵液中之麩胺酸

含量較 ATCC13032 低，且發酵液中無法檢測出麩醯胺酸，而 *glnA2* 基因編輯菌株發酵液中之麩胺酸含量同樣較 ATCC13032 低，但麩醯胺酸含量卻是 ATCC13032 的 2.99 倍，證實 *glnA1* 及 *glnA2* 為合成麩胺酸和麩醯胺酸之重要基因 (Yao, *et. al.*, 2021)。2017 年 Jiang 等人開發了 *Francisella novicida* 來源之 CRISPR-Cpf1 基因編輯系統，以 CRISPR-Cpf1 搭配單股 DNA (ssDNA) 的方式，以高達 86~100% 之效率，精確的變更麩胺酸棒狀桿菌之 *proB* 基因之數個鹼基，達到定點突變的效果，並發現當 ProB 之第 149 個胺基酸由 G 變成 K 時，麩胺酸棒狀桿菌可合成較多的脯胺酸 (L-proline)。除此之外，其亦將 CRISPR-Cpf1 與目標基因之 crRNA 及模板組合在一質體上，成功刪除 705 bp 之 *crtYf* 基因片段 (Jiang, *et. al.*, 2017)。

五、本所研發成果

本所生資中心研發團隊選定 *Francisella novicida* 來源之核酸水解酶 -Cpf1，建立麩胺酸棒狀桿菌之基因編輯系統，目前已成功刪除麩胺酸棒狀桿菌與麩胺酸合成相關基因之片段，並順利去除送入菌體中之質體，取得無外源基因之基因編輯株，除了單一基因之編輯外，亦成功獲得雙基因編輯株。搖瓶實驗檢測結果顯示基因缺損之基因編輯株，其麩胺酸生成量較野生株高。因麩胺酸棒狀桿菌可生合成多種有產業價值之物質，將陸續以此系統研究麩胺酸棒狀桿菌之其他

代謝合成相關基因，以獲得高產量之基因編輯株，並期待能開創商業之價值。

六、參考文獻

1. Becker, J., Rohles, C. M., Wittmann, R. C. 2018. Metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum* for bio-based production of chemicals, fuels, materials, and healthcare products. *Metab. Eng.* 50, 122-141.
2. Cleto, S., Jensen, J. V., Wendisch, V. F., Lu, T. K. 2016. *Corynebacterium glutamicum* Metabolic Engineering with CRISPR Interference (CRISPRi). *ACS Synth. Biol.* 20;5(5):375-85.
3. Jiang, Y., Qian, F., Yang, J., Liu, Y., Dong, F., Xu, C., Sun, B., Chen, B., Xu, X., Li, Y., Wang, R. and Yang, S. 2017. CRISPR-Cpf1 assisted genome editing of *Corynebacterium glutamicum*. *Nat Commun.* 15179 . <https://doi.org/10.1038/ncomms15179>.
4. Safari, F., Zare, K., Negahdaripour, M., Barekati-Mowahed, M. and Ghasemi, Y. 2019. CRISPR Cpf1 proteins: structure, function and implications for genome editing. *Cell Biosci.*, 9:36. <https://doi.org/10.1186/s13578-019-0298-7>.
5. Yao, C., Hu, X. and Wang, X. 2021. Construction and application of a CRISPR/Cas9-assisted genomic editing system for *Corynebacterium glutamicum*. *AMB. Expr.* 11, 70. <https://doi.org/10.1186/s13568-021-01231-7>.

益生大腸桿菌基因編輯技術的應用

生物資源保存及研究中心 / 研究員
梁克明

一、前言

大腸桿菌是廣為人們熟知的微生物，因此類微生物能廣泛利用多種不同類別碳、氮源作為生長營養源，且能在有氧或無氧環境中快速生長，加上菌體基因資訊完整，以及菌株相關分子生物技術開發完善，容易對菌體進行改質以生產人類所需的產物。然而，常作為生產用途的大腸桿菌株雖為對人無危害，但也非列於食品原料整合使用查詢平臺之可食菌株名單，加上利用基因工程表現異源基因所生產原料，將歸類於基因改造食品 (Genetically modified food)，使得人們在使用或食用上有著安全議題的顧慮，即使近年政府陸續核准以 GMO (Genetically Modified Organisms) 大腸桿菌生產 2'-岩藻糖基乳糖 (2'-fucosyllactose) 用於嬰兒配方食品、嬰兒配方輔助食品、兒童乳粉添加使用，或是利用基改大腸桿菌產生蝦紅素 (Astaxanthin) 做為食品原料，這些基改菌生產的原料用在加工製造產品後，會要求最終成品不含基改微生物與其轉殖基因片段。然而消費者在心理層面上還是會有所顧慮。如今科學家朝向使用更安全的菌株 - 益生大腸桿菌 (*E. coli* Nissle 1917，簡稱

EcN)，及興新技術 - CRISPR 基因編輯技術 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats, CRISPR) 的結合使用，對 EcN 菌株進行基因序列編輯以生產食品原料以提高產物的使用安全性，或許另一方式可以減低消費者對 GMO 食品安全性的擔憂。

二、益生大腸桿菌 (*E. coli* Nissle 1917, EcN) 之介紹

1917 年德國學者 Alfred Nissle 在處理德國士兵糞便檢體時，將檢體樣品塗抹在含有沙門氏菌 (*Salmonella*) 的平板中進行共培養，一般情況下，沙門氏菌會呈優勢菌種而大量生長，然而卻發現有少數平板內的沙門氏菌生長不良，甚至沒有生長，因此推測糞便檢體微生物菌叢中，可能存有能抑制沙門氏菌之菌株。當時正處第一次世界大戰，在戰場環境惡劣，常有因受沙門氏菌污染導致士兵們發生腹瀉或是其他腸道疾病的發生，在這樣環境中，藉由健康士兵者之糞便檢體所分離的大腸桿菌，經進一步測試，結果顯示確實對腸道病原菌具有拮抗能力 (antagonistic activity)。因此，發現此大腸桿菌為一種益生大腸桿菌 (*E. coli*

Nissle 1917, EcN)。經由分子生物分析結果，EcN 菌株不同於具致病性的大腸桿菌，EcN 不帶有任何對人或動物致病性的基因。與一般腸道大腸桿菌比較，EcN 菌株還額外存有可能由其他腸道菌水平轉移所得的基因組島 (Genomic island)，這基因組島能很穩定存在於 EcN 基因組中 (genome)，並能產生拮抗性的物質如微黴素 (microcins) 抑制其他病原菌的生長。後續實驗也證實 EcN 能維持人體腸道菌相平衡以穩定所處腸道環境 (Schlee *et al.*, 2007)，接著科學家對此菌株進行全基因解碼以增加日後菌株的應用性，由基因解碼結果顯示，EcN 含有 190 個獨特的重要基因，同時含有兩個無性狀質體 (cryptic plasmid)。目前 EcN 益生菌主要用來治療腹瀉，緩解腸胃道疾病，治療孔羅氏病 (Crohn's disease)，現在更是研究開發做為藥物載體的應用。

三、益生大腸桿菌之基因編輯技術應用

基因編輯技術是近年相當熱門的生物技術，不同以往的分子技術，此技術能精準、正確的對生物體的目標基因序列進行修改編輯，此特性大大縮短育種所需時程，因此開始廣泛應用於農作物的基因改良，陸續培育出較不易累積丙烯醯胺的馬鈴薯品系，能夠減少馬鈴薯在高溫的食品加工製程產生有毒物丙烯醯胺，及穩定血壓與緩和緊張的高 γ -胺基丁酸 (γ -Aminobutyric acid,

GABA) 含量的番茄產品，或是提高作物對於不良環境的耐受度 (耐旱、耐寒、耐鹽) 及抗蟲害，以維持一定水準的高產量。同樣的，應用於大腸桿菌的編輯技術也是蓬勃發展，利用此技術對大腸桿菌的基因序列進行剔除 (deletion)、插入 (insertion)、取代 (replacement)，以及調控 (regulation) 等手段，改變菌體的代謝途徑，使大腸桿菌生產目標產物，或是提高產量。如表一所示，

表一、大腸桿菌基因編輯技術之應用

目標產物	工具	菌株	產量
β- 胡蘿蔔素 (β-Carotene)	CRISPR–Cas9	E. coli MG1655	2.0 g/L
異丙醇 (Isopropanol)	CRISPR–Cas9	E. coli BW25113	7.1 g/L
正丁醇, n-Butanol	CRISPR–Cas9	E. coli MG1655	0.82 g/L
5- 氨基乙酰丙酸, (5-Amino-levulinic acid)	CRISPR–Cas9	E. coli BL21(DE3)	2.81 g/L
脂肪酸 (Fatty acids)	CRISPR–Cas9	E. coli MG1655	增加 5.3%
酪胺酸 (L-tyrosine)	CRISPR–Cas9	E. coli W3110	3.74 g/L
順, 順 - 己二烯二酸 (Cis, cis-muconic acid)	CRISPR–Cas9	E. coli K12 (ATCC31,882)	4.09 g/L
白藜蘆醇 (Resveratrol)	CRISPRi	E. coli BL21(DE3)	0.3 g/L
柚皮素 (Naringenin)	CRISPRi	E. coli BL21(DE3)	0.42 g/L
茄紅素 (lycopene)	CRISPRi	E. coli BL21(DE3)	5.2 mg/L
甲羥戊酸 (Mevalonate)	CRISPRi	E. coli MG1655	增加 41%
1,4 丁二醇 (1,4-butanediol)	CRISPRi	E. coli W (ATCC 9637)	1.8 g/L
赤松素 (Pinosylvin)	CRISPRi	E. coli BL21(DE3)	0.28 g/L
芍藥素葡萄糖苷氯化物 (Peonidin 3-O-glucoside)	CRISPRi	E. coli BL21(DE3)	51 mg/L
泛酸 (D-pantothenic acid)	CRISPRi	E. coli W3110	28.45 g/L

(Hashemi, 2020)

目前以大腸桿菌為宿主，利用基因編輯技術所生產各種目標產物。

利用基因編輯技術的產物類別主要有燃料、特用化學品及食品原料，但以無危害之大腸桿菌做為食品原料生產菌株，消費者還是會擔心產品會殘留微生物及其代謝物的可能性，而有食用安全的疑慮，因此科學家開始使用更安全的菌株，益生大腸桿菌 EcN 進行基因編輯技術的應用。2021 年 Lan 等人 (Lan *et al.*, 2021) 以 EcN 菌株生產 γ -胺基丁酸 (γ -Aminobutyric acid, GABA)，GABA 一種存在於人體內能夠抑制神經傳導的物質，具有降血壓、改善睡眠、舒緩身心不適症狀等功效。作者利用基因編輯技術成功剔除原本存在於 EcN 菌體內的兩個無性狀質體 (cryptic plasmids)，在大量表現特定蛋白時，能減低菌株生產其它非生長所需蛋白，分散體內營養源而造成菌株生長的負擔。接著製備另一新質體，而質體的特性是在不使用抗生素情況下，能夠在菌株分裂複製 8 個世代後，依然穩定的存在於菌株體內，並於質體內額外表現 *gadB* 基因，以調控 EcN 菌株代謝途徑，最終能有 17.9 g/L γ -胺基丁酸產量。

此外，益生大腸桿菌不只是做為生產菌株，同時也被應用於做為醫療用途菌株，2021 年 Kan 等人 (Kan *et al.*, 2021) 為了能讓 EcN 菌株更能適合藥物傳遞菌株，因此進行 EcN 菌株的

改質，作者先將原生於 EcN 菌株的質體基因序列進行修改，包括有 (1) 改變後質體能夠在不使抗生素的條件下，可穩定存在於菌體中，以利菌株在醫療使用時，避免使用外加抗生素而干擾腸道原有菌相；(2) 導入由溫度變化可調控基因表現的系統，即是菌株在 30℃ 培養生長時 (低於 36℃)，質體的目標蛋白不會表現，可減低菌株生長負擔，之後應用於人體恆溫 37℃ 環境時 (大於 36℃)，菌株即可表現目標蛋白，無須添加額外誘導物；(3) 結合 EcN 之 Curli 蛋白分泌系統，能將菌株生產的目標蛋白分泌至胞外，屆時能讓菌株所處腸道環境直接受分泌的目標蛋白影響而達到治療效果。在將原質體改造生成新質體後，作者利用 CRISPR 基因編輯技術，將 EcN 體內二個原生質體剔除，產生無質體的 EcN 菌株，再將製備好的新質體送入菌株體內，獲得能夠分泌目標蛋白之全新 EcN 菌株。最後再將此菌株進行活體 (in vivo) 小鼠腸道試驗，將小鼠餵食培養內含新質體之 EcN 突變菌株，並能小鼠腸道測得由 EcN 突變菌株所分泌的 Curli 蛋白，以確立這新 EcN 菌株藥物輸送系統建立成功，將來可應用這套 EcN 菌株分泌蛋白系統進行相關腸道疾病的治療。

四、本所研發成果

本所團隊針對大腸桿菌株 *E. coli* MG1655，成功建立 CRISPR 基因編輯技術，可進行基因剔

除以調控菌株代謝途徑，應用於生產目標產物及提高產量。

五、參考文獻

1. Hashemi, A. 2020. CRISPR–Cas9/CRISPRi tools for cell factory construction in *E. coli*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 36(7), 96.
2. Kan, A., Gelfat, I., Emami, S., Praveschotinunt, P., Joshi, N.S. 2021. Plasmid Vectors for in Vivo Selection-Free Use with the Probiotic *E. coli* Nissle 1917. *ACS Synthetic Biology*, 10(1), 94-106.
3. Lan, Y.-J., Tan, S.-I., Cheng, S.-Y., Ting, W.-W., Xue, C., Lin, T.-H., Cai, M.-Z., Chen, P.-T., Ng, I.S. 2021. Development of *Escherichia coli* Nissle 1917 derivative by CRISPR/Cas9 and application for gamma-aminobutyric acid (GABA) production in antibiotic-free system. *Biochemical Engineering Journal*, 168, 107952.
4. Schlee, M., Wehkamp, J., Altenhoefer, A., Oelschlaeger, T.A., Stange, E.F., Fellermann, K. 2007. Induction of Human β -Defensin 2 by the Probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 Is Mediated through Flagellin. *Infection and Immunity*, 75(5), 2399-2407.

基因編輯相關法規介紹

生物資源保存及研究中心 / 研究員
林奐妤

一、前言

在食品與農業息息相關的 21 世紀，我們的主食多是以農作物為主，然而我們將面臨氣候變遷、可耕地有限、農民數量減少等諸多挑戰，人們總是要找到各種方法來提高農業生產力，而生物技術的使用就有助於現代農業創新的一部分。與任何新技術一樣，使用生物技術改良的產品都必須經過評估及管理相關之風險。早期的作物雜交育種、誘變選育出的新品種，都以其用途作為食品、飼料和環境保護等，評估其安全風險，而以基因改造技術產生的新生物，更有特定的風險評估規則及風險管理策略。過去 25 年中，基因改造作物產量增加了 100 倍以上，全球耕種面積約有 1.9 億公頃，主要的四種基因改造作物為大豆 (~50%)、玉米 (~30%)、棉花 (~13%) 及油菜 (~5%)，其中大豆主要用於榨油，棉花主要作為天然纖維來源，玉米除了作為飼料，也作為生產酒精之原料，全球玉米總產量中約有 12% 作為糧食。近年來，基因編輯技術發展迅速，以基因編輯技術發展出的作物不僅可精確地修改生物之基因序列，更可篩選出終產品不含任何外源基因的作物，許多國家也針對基因編輯作

物之管理建立規範或調整立法，根據其用途在食品、飼料及環境等三個面向上之管理。

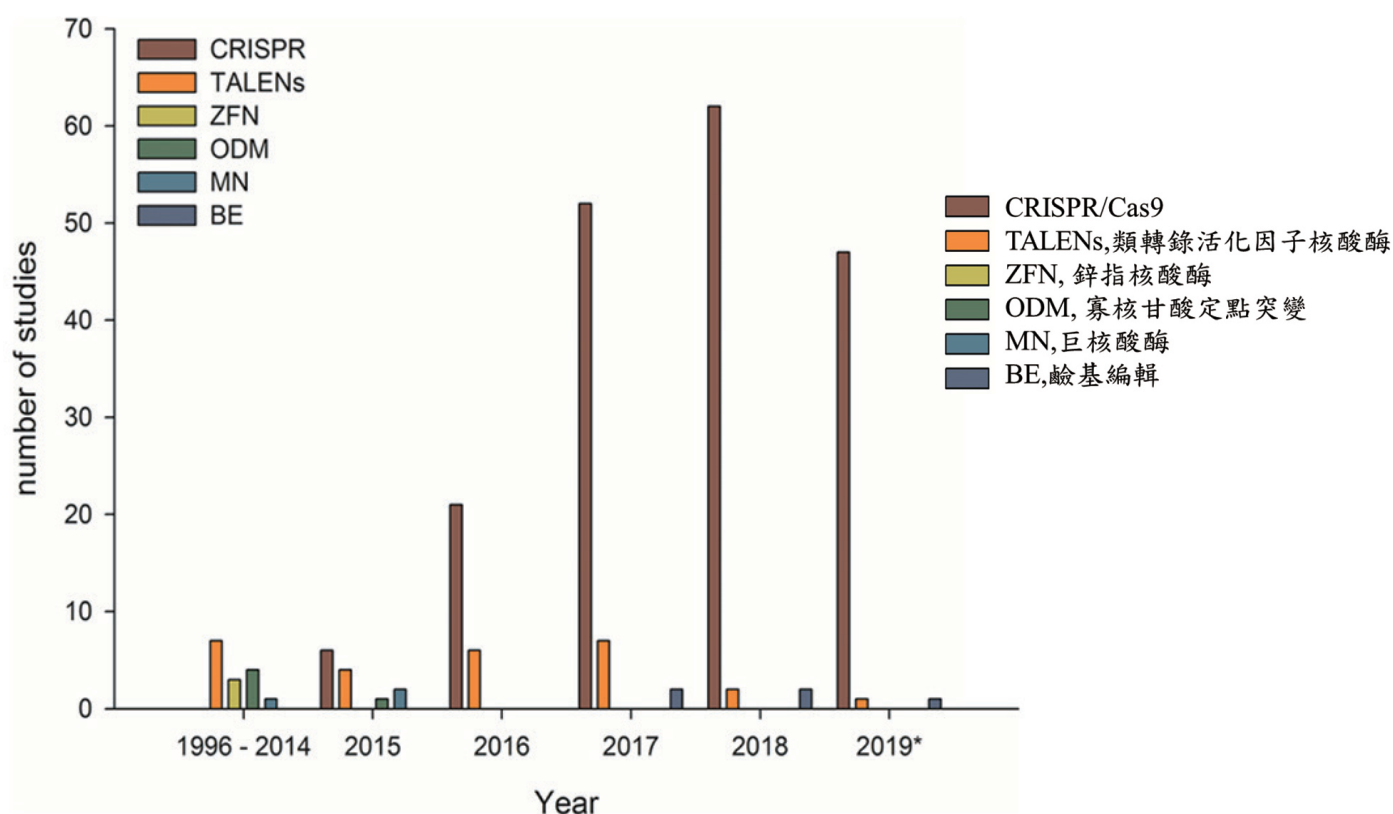
二、基因編輯技術在既有法律上之不確定性

目前大多數的國家都尚未明確地訂定基因編輯產品的法律規範，而相對基因改造產品的法律規範是非常明確的，且各國基因改造的定義與生物多樣性公約卡塔赫納生物安全議定書中的定義是一致的或相似的，可確保基因改造生物的安全、運輸及使用。許多國家也針對卡塔赫納定義的基因改造技術立法，以確保基因改造產品的生物安全。現行有關進口、種植及使用基因改造食品及飼料的安全規範，是為了滿足人們對於基因改造可能對人類和動物健康及環境產生不可預見的風險而制定的，近 30 年來的研究及評估結果，基因改造技術本身是否引起風險尚未得到證實。然而用於種植或進口作為食品或飼料的基因改造生物，開發商需要提供大量的安全評估數據，才可通過大多數國家的嚴格安全評估，獲得許可。在歐盟，批准一件基因改造作物的成本約為 1100~1700 萬歐元，相當於 3.3~5.1 億元新台幣，平均約需要 6 年的時間。自 2011 年以來，種

子開發公司及研究機構，陸續向國家主管機關徵求詢問商業用基因編輯植物是否受到管理及如何管理，是否與其他基因改造生物一樣的管理規定。Cibus 公司以寡核苷酸定點突變技術開發耐除草劑油菜，在許多國家引起了法律爭議，並對於基因編輯產品之管理引發爭議性討論，尤其是在歐盟，2018 年 7 月歐盟法院對於定向誘變作出裁決，認為基因編輯技術沒有安全使用歷史，因此與傳統隨機誘變技術不同，所衍生出的生物無法豁免審查。雖然歐盟法院提出明確的管理制度，但也為研發基因編輯之育種公司及科學家們帶來意想不到的結果。然而與歐盟相比，加拿大對於寡核苷酸定點突變技術之耐除草劑油菜的管理，與其他作物相同，沒有因為所使用的技術而有特殊的管理，僅考慮其性狀的新穎性。近年來，已有許多基因編輯產品產出，而未來這類型的產品也將越來越多（圖一），若基因編輯產品在生產國或是進口國的管理機制不同，在商品貿易上將受到極大的挑戰，各國如何管理基因編輯產品將更引起關注。

三、全球立法概況

在管理基因改造作物時，對於種植、進出口或作為消費性的食品和飼料是有區別的，通常都由多個官方機構共同參與管理，例如在美國就有農業部 USDA、環境保護署 EPA 及食品藥物管理局 FDA 分別管理種植、環境及食品飼料等。政府立法在於制訂保



圖一、1996 年至 2019 年 7 月基因編輯農作物應用之研究數量

(Menz *et al.*, 2020)

護其公民、社會及環境的法規，但不同國家或地區，實現的方式就有所不同，從基因改造相關法規來看，就可分為以過程為導向或以產品為導向的管理模式。與傳統方法相比，以過程為導向的管理模式將基因改造技術視為一種新的技術，而以產品為導向的管理模式則強調產品與傳統育種產品之新穎性，例如加拿大管理基因改造產品，就是以產品之新穎性為主，以產品為導向的管理模式。

(一) 美國

美國的管理框架並沒有因為基因編輯產品的出現而改變，而是把基因編輯納入更新的生物技術管理。2019 年美國白宮發布

了農業生物技術產品管理框架現代化的行政命令，要求改革現有制度朝向促進農業創新及簡化現有生物技術與新興技術的管理制度。因此農業部於 2021 年實施新安全規則 SECURE，對於基因編輯技術產品，若為刪除、單個鹼基對的取代、僅引入植物序列或編輯已知的植物基因序列，皆可免除管理。

(二) 加拿大

加拿大的管理系統也未因基因編輯產品的出現而改變，所有產品都是根據性狀的新穎性進行管理，無論是傳統育種、誘變育種、基因改造或基因編輯技術，只要具有新穎性狀之產品皆須受到相同的管理。對於新穎的定義，

根據經驗，與對照組差異大於 20% 就視為新穎。

(三) 澳洲

2019 年 4 月澳洲政府發布基因技術計畫更新修正案，提出對於未使用核酸模板的基因編輯技術免除管理，這意味著只要過程中有使用核酸模板就視為基因改造生物。

(四) 歐盟

2018 年 7 月歐盟法院裁定對於定向誘變所衍生出的生物無法豁免審查，基因編輯技術產品皆視為基因改造產品。

(五) 中國

近年來，中國大力投入基因

編輯研究中，農業農村部於 2022 年 1 月提出試行版農業用基因編輯植物安全評價指南，針對沒有引入外源基因的基因編輯植物須提出申報，繳交資料較為簡化。對於引入外源基因的基因編輯植物需視為基因改造植物管理。

(六) 日本

日本對於基因編輯生物之管理主要依據卡塔赫納生物安全議定書之管理原則。2019 年厚生勞動省發布食品及飼料產品之管理程序，產品來自基因編輯或其雜交後代，生產商在上市前需要向厚生勞動省諮詢產品的監管狀態，確認是否需要進行特定安全評估。上市前須通知產品基因編輯技術、修飾目標基因、上市時間及相關訊息。對於產品含有一個或多個鹼基插入或缺失之產品與傳統產品相似，僅需要進行通知，而產品含有外源基因則需要進行安全評估。

四、國際組織認為精準育種具發展潛力且管理制度應有共識

經濟合作暨發展組織 OECD 認為基因編輯之新興育種技術對

全球經濟的影響越來越大，2018 年 6 月匯集 35 個國家的科學家、公司及利益相關者召開基因編輯育種會議，應確定基因編輯管理方法，並與所有利益相關者之間有更好溝通，同時須考慮預防及創新。雖然各國管理體系及政策不同，也須達成共識。

2018 年 11 月，澳洲、阿根廷、巴西、加拿大、多明尼加、瓜地馬拉、宏都拉斯、巴拉圭、美國、烏拉圭代表團在世界貿易組織 WTO 之衛生與健康委員會簽署了精準生物技術農業應用國際聲明，提及基因編輯產品應基於科學的監管框架下提供發展機會，並避免貿易障礙，基因編輯品種與傳統品種具高度相似性，應以類似的制度管理。在較寬鬆的管制下，可提供中小企業及國家研究機構更多的機會。在國家及國際層面協調一致下，更可充分發揮基因編輯的潛力。

五、結論

不同國家對於育種技術的管理存在很大的差異，目前已有許多國家認定基因編輯產品的管理應與基因改造產品的管理不同，也有國家使用目前的管理制度使

基因編輯產品與基因改造的管理制度一致，有些國家則訂定或修改現有的法規以個案評估或分層管理，有些國家更只需在上市前提供必要資訊。一般來說，逐案審查結果仍難以預測，但隨著越來越多的產品進入市場，可預測新的基因編輯產品是否有機會不須以嚴格的基因改造審查而許可上市。根據目前趨勢基因編輯法規無法全球統一，未來挑戰將會是基因編輯產品檢測鑑定及自由貿易等問題。

六、參考文獻

1. Menz, J., Modrzejewski, D., Hartung, F., Wilhelm, R., Sprink, T. 2020. Genome edited crops touch the market: A view on the global development and regulatory environment. *Front. Plant Sci.* 11:586027. doi: 10.3389/fpls.2020.586027.
2. Turnbull, C., Lillemo, M., Hvoslef-Eide, T.A.K. 2021. Global Regulation of Genetically Modified Crops Amid the Gene Edited Crop Boom – A review. *Front. Plant Sci.* 12:630396. doi: 10.3389/fpls.2021.630396.

生物資源保存及研究簡訊 第131期

發行者：財團法人 食品工業發展研究所

發行人：廖啓成所長

主編：陳倩琪

編輯：王俐婷、許璿文、黃學聰、梁克明

本著作權依補助契約歸屬財團法人 食品工業發展研究所

地址：新竹市食品路 331 號

電話：(03)5223191-6

傳真：(03)5224171-2

承印：國大打字行

電話：(03)5264220

ISSN：1021-7932

GPN：2009001214

中華郵政新竹誌字第0030號

交寄登記證登記為雜誌交寄

