

部位特異的ヌクレアーゼタイプ1とタイプ2及びオリゴヌクレオチド特異的突然変異を用いて開発された植物の安全性評価のための部位特異的ヌクレアーゼタイプ3に関する
EFSA の見解の妥当性

要約

欧州委員会は、遺伝子組換え生物 (Genetically Modified Organism=GMO) に関する EFSA のパネルに対して、EFSA の「ジンクフィンガー・ヌクレアーゼタイプ3技術 (ZFN-3) 及び類似の機能を持った他の部位特異的ヌクレアーゼ (site-directed nuclease=SDN) を用いて開発した植物のリスク評価に関する科学的見解」のセクション4 (危険の特定) と結論が、SDN-1、SDN-2 及びオリゴヌクレオチド特異的突然変異生成 (oligonucleotide-directed mutagenesis=ODM) によって開発された植物の場合、有効であるか否かを評価するよう要請した。この見解を提出するに際して、GMO パネルは SDN-1、SDN-2 及び ODM によって作られた植物に関連する危険を SDN-3 と従来の繁殖の双方によって得られた植物に関連するものと比較した。SDN-3 方法とは違って、SDN-1、SDN-2 及び ODM アプローチの適用は、いかなるトランスジーン、イントラジーン又はシスジーンをも含まない植物をもたらすような方法でゲノム配列を変更することを狙っている。結果として、GMO パネルは、セクション4 及び SDN-3 に関する見解の結論に含まれるトランスジーン、イントラジーン又はシスジーンが存在性に特に関連するそれらの検討事項は、この見解で定義されている SDN-1、SDN-2 又は ODM によって得られた植物には関係が無い、と結論付けた。全体として GMO パネルは、SDN-3 と従来繁殖と比較して SDN-1、SDN-2 又は ODM によって行われた遺伝子組換えに特に結び付けられる新しい危険は確認しなかった。更に GMO パネルは、既存の「遺伝子組換え植物に由来する食品と飼料のリスク評価のための指針」及び「遺伝子組換え植物の環境的リスク評価に関する指針」は十分であるが、SDN-1、SDN-2 又は ODM によって作られた植物には部分的にのみ適用出来る、と考えている。事実、それらの指針文書の外因性 DNA の存在に結び付けられる要件は、最終製品のゲノムが外因性 DNA を含んでいなければ、SDN-1、SDN-2 又は ODM アプローチによって開発された植物のリスク評価には重要ではない。

©2020 年欧州食品安全機関。欧州食品安全機関を代表して John Wiley and Sons Ltd. によって出版された EFSA ジャーナル。

キーワード：部位特異的ヌクレアーゼ、SDN-1、SDN-2、SDN-3、オリゴヌクレオチド特異的突然変異生成、トランスジェネシス、オフターゲット、遺伝子組換え植物、リスク評価、EFSA 指針。

要求者：欧州委員会

質問番号：EFSA-Q-2019-00297

連絡先：GMO_secretariat_applications@efsa.europa.eu

パネルメンバー：（省略）

感謝の言葉：（省略）

推奨する引用文：（省略）

ISSN: 1831-4732

©2020 年欧州食品安全機関。欧州食品安全機関を代表して John Wiley and Sons Ltd. によって出版された EFSA ジャーナル。

この文書は「クリエイティブ・コモンズ帰属 - 派生物無しライセンス」の条件の下での自由アクセスの記事であり、あらゆるメディアでの使用と分配が許されている。但し、原文が適切に引用され、変更や改作が加えられていないこと。

目次

要約	1
1. 序文	4
1.1 欧州委員会による背景	4
1.2 EFSA による背景	4
1.3 付託条項	5
2. データと方法論	5
2.1 SDN-3 に関する EFSA 見解	5
2.1.1 背景情報	6
2.1.2 SDN-3 に関する EFSA 見解セクション 4	6
2.1.3 SDN-3 に関する EFSA 見解の結論	7
2.2 協議	7
3. 評価	8
3.1 序文	8
3.1.1 SDN-1、SDN-2 及び ODM 対 SDN-3 の比較	8
3.1.2 SDN-1、SDN-2 及び ODM 適用に使われる技術	9
3.1.3 植物に SDN をもたらす又は発現させる方法	10
3.2 命令の ToR1: SDN-3 に関する EFSA 見解のセクション 4 の SDN-1、SDN-2 及び ODM アプローチを用いて取得した植物 への適用可能性	10
3.2.1 序文	11
3.2.2 SDN-3 に関する EFSA 見解のセクション 4 の評価	11
3.2.2.1 セクション 4.1 の評価：遺伝子ソースと遺伝子製品の安全性	11
3.2.2.2 セクション 4.2 の評価：ゲノムへの変更	12
3.2.2.2.1 挿入部位での変更（セクション 4.2.1）	12
3.2.2.2.2 ゲノムの他の場所での変更（セクション 4.2.2）	12
3.3 命令の ToR2: SDN-3 に関する EFSA 見解の結論の SDN-1、SDN-2 及び ODM アプローチを用いて得た植物 への適用可能性	14
4. 結論	15
参考文献	16
略語	18
用語集	19

1. 序文

1.1 欧州委員会による背景¹

突然変異生成についての訴訟 C-528/16 に関する EU の裁判所の判決は、指令 2001/18/EC²がその採用以来出現した突然変異生成技術によって得られた遺伝子組換え生物 (GMO) に適用可能であることを明確にした (「新しい突然変異生成技術」)。

指令 2001/18/EC は GMO の環境への計画的放出を規制している。2010 年に、GMO に関する EFSA パネルは「遺伝子組換え (GM) 植物の環境リスク評価に関する指針 (EFSA GMO パネル、2011 年)」を発行し、2011 年に「GM 植物由来の食品と飼料のリスク評価に関する指針 (EFSA GMO パネル、2012 年)」を発行した。欧州委員会の要求に従い、2012 年に EFSA は「ジnkフィンガー・ヌクレアーゼ 3 及び類似の機能を有するその他の部位特異的ヌクレアーゼ (SDN-3) を用いて開発された植物の安全性評価に関する科学的見解」を発表した (EFSA GMO パネル (2012 年 a)、以下「SDN-3 に関する EFSA の科学的見解」と言う)。この科学的見解で、EFSA GMO パネルによって適用された評価方法は、SDN-3 技術で作られた植物に関連する危険を、従来の植物繁殖技術で得られたもの及び現在使われている形質転換によるものと比較することであった。従来の植物繁殖技術の中で、EFSA GMO パネルは指令 2001/18/EC の採用前に出現して遺伝的変異を創るためのツールとして使われている特定の突然変異繁殖技術を検討した。

その科学的見解は、「SDN-3 技術は受領側ゲノムの中の遺伝子及び・又は調節要素の崩壊に関連する危険を最小限にすることが出来る。SDN-3 技術は受領側植物のゲノムのオフターゲット変化を誘導することが出来るが、それらの変化は殆どの突然変異生成技術で生じるものよりも少ない。更に、そのような変化が生じる場合、それらは従来の繁殖技術によって作られるものと同じ種類である。」と結論付けた。

EFSA GMO パネルはまた、その 2010 年と 2011 年の指針文書は「SDN-3 技術を用いて開発された植物由来の食品と飼料の評価、及び環境リスクの評価の実施、に適用可能である。しかしながら、SDN-3 技術を使って開発された植物のリスク評価のためには、ケースバイケースで、より少ない事象特異的データが必要であろう。」と結論付けた。

1.2 EFSA による背景

欧州委員会の要求の後 (Aress(2019)2488590-09/04/2019 を参照)、2019 年 4 月に EFSA は命令 (mandate) を GMO パネルの分子特性化作業グループに割り当てた

¹ このセクションのテキストは命令による文書の一部として欧州委員会によって提供された。「書簡の付属書 (ToR)」は <http://register.of.questions.efsa.europa.eu/rpqFrontend/questionsListLoader?mandate=M-2019-0095> にある EFSA の質問一覧にある。

² 欧州議会及び欧州理事会の遺伝子組換え生物の環境への計画的放出に関する 2001 年 3 月 12 日の指令 2001/18/EC 及び無効にする理事会指令 90/220/EEC-委員会宣言。OJ L 06, 17.4.2001, p. 1-39。

(BU/GdS/KL/FA/cz_OC-2019-21268932 を参照)。公の協議を可能にするため、EFSA は欧州委員会にその時に 2020 年 4 月 30 日から 2020 年 10 月 30 日に延期されていた科学的見解の期日 (BU/GdS/EW(2019)OC-2019-22763474) を変更するように要求した (Ares(2020)250930-15/01/2020 を参照)。

1.3 付託条項¹

この背景に対して、欧州委員会は規則(EC)No 178/2002³の第 29 条に従って、EFSA に対して以下の 2 つの付託条項 (Terms of Reference=ToR) に対応するように要求した。

- 1) ジンクフィンガー・ヌクレアーゼ 3 及びその他の類似の機能を持った部位特異的ヌクレアーゼを用いて開発された植物の安全性評価に関する EFSA の科学的見解のセクション 4 に説明されている評価方法の、全部又は 1 部がタイプ 1 とタイプ 2 の部位特異的ヌクレアーゼによって、及びオリゴヌクレオチド特異的突然変異生成によって、開発された植物に適用出来るか否か、を助言すること。

ToR1 に対する助言が肯定的であれば、委員会は規則(EC)No 178/2002 の第 29 条に従って EFSA に対して以下を要求することになる。

- 2) 2012 年のジンクフィンガー・ヌクレアーゼ 3 及びその他の類似の機能を持った部位特異的ヌクレアーゼを用いて開発された植物の安全性評価に関する EFSA の科学的見解の結論が、全部又は 1 部がタイプ 1 とタイプ 2 の部位特異的ヌクレアーゼによって、及びオリゴヌクレオチド特異的突然変異生成によって、開発された植物に有効であるか否か、を助言すること。

2. データと方法論

2 つの付託条項に対応するため、分子特性化作業グループ (MC WG) は、SDN-3 に関する EFSA 見解のセクション 4 と全体の結論及び科学的文献に載った関連情報を考慮した。背景に関する情報、セクション 4 の内容、及び全体としての SDN-3 に関する EFSA 見解の結論は以下のセクション 2.1 に紹介してある。

2.1 SDN-3 に関する EFSA 見解

2.1.1 背景情報

³ 欧州食品安全機関を設立して食品の安全性に関する手順を定める一般原則と食料法の要件を定める、欧州議会及び欧州理事会の 2002 年 1 月 28 日付規則(EC)No 178/2002。OJ L 31, 1.2.2002, p.1-24。

2012年に、EFSAは新しい植物繁殖技術についての2つの見解を発行した。1つ目はシスジェネシスとイントラジェネシスに関するもの（EFSA GMO パネル、2012年b）で、2つ目はSDN-3に関するものである（EFSA GMO パネル、2012年a）。SDN-3に関する見解をまとめるため、GMO パネルは以下を問われた：1）ZFN-3技術で開発された植物を、従来の植物繁殖技術によって得られた植物と、現在使われている遺伝子組換え技術で得られた植物と比較して、ヒト、動物及び環境に対する影響の意味でリスクを決定すること。そして2）ZFN-3技術で作られた植物のリスク評価について新しい指針が必要であるか、又は食品と飼料のリスク評価に関する既存の指針、及びGM植物の環境リスクの評価に関する既存の指針（EFSA GMO パネル、2010年）が更新されるべきか、又は更に詳述されるべきか、を決定すること。食品と飼料のリスク評価に関する指針（EFSA GMO パネル、2011年）は、実施規則(EU)No 503/2013⁴によって置き換えられたことを指摘しておく。

SDN-3に関する科学的見解をまとめるため、GMO パネルはSDN-3方法で開発された植物を、自然に発生するものと誘発された突然変異の両方を含め、従来の繁殖によって得られた植物と比較した（EFSA GMO パネル、2012年a）。

2.1.2 SDN-3に関するEFSA見解のセクション4

SDN-3に関するEFSA見解のセクション4は、トランスジーン、イントラジーン又はシスジーンを特定の植物ゲノムの遺伝子座への挿入を標的とするために使用されるSDN-3方法を使って作られた植物に関連する危険に焦点を当てている。GMO パネルは以下のように結論付けた：

- ・各種の植物繁殖技術に由来する危険は、使われた遺伝子の源、展開した遺伝子と形質と構造への変化、受領するゲノムの組織と配列に関連する。主要な牽引者は、他の生じる全ての変化はこれらの変化の直接又は間接の結果であるため、各種の繁殖プロセスが植物に導入する遺伝子変化である。これらの変化に関する障害は、従来の繁殖及び形質転換の両方に生じるかもしれない。

- ・ZFN-3技術とSDN-3は一般的に、DNAの標的を絞った挿入のために使用される。導入された遺伝子に関して、SDN-3技術は現在使われている他の遺伝子組換え技術と異なることは無く、トランスジーン、イントラジーン、又はシスジーンの導入するために使用することが出来る。遺伝子の源に関係する危険は、EFSAによって説明されている（EFSA GMO パネル、2012年b）。

⁴ 欧州議会と理事会の規則(EC)No 1829/2003に従った遺伝子組換え食品と飼料の承認申請に関する2013年4月3日の委員会実施規則(EU)No 503/2013及び改定委員会規則(EC) No 641/2004及び(EC)No 1981/2006。OJ L 157, 8.6.2013, p.1-48。

・SDN-3 技術はトランスジェネシスと同じ形質転換技術を利用する。但し、SDN の一時的発現と安定発現の両方とも、部位特異的な DSB（二重鎖切断）を導入するのに使用することが出来る。SDN 遺伝子の安定的統合の場合、統合された遺伝子のみを含む植物を得るために、分離によってそれらをその後取り除くことが出来る（EFSA GMO パネル、2012 年 a）。

2.1.3 SDN-3 に関する EFSA 見解の結論

SDN-3 に関する EFSA 見解の全体結論で、GMO パネルは以下のように述べた：

・EFSA GMO パネルは、SDN-3 技術によって作られた植物に関連する危険を、従来の繁殖技術によって得られた植物及び現在使われている形質転換によって得られた植物に関連する危険と比較した。

・SDN-3 技術と形質転換との主要な違いは、DNA の挿入がゲノムの予め決定された区域を標的にするという点だ。従って、SDN-3 技術は遺伝子発現のためのゲノム環境を最適化して、受領側ゲノムの遺伝子及び・又は調節要素の崩壊に関連する危険を最小にすることが出来る。

・SDN-3 技術はオフターゲットの変化を誘導することが出来るが、これら変化は殆どの突然変異生成技術で生じるものよりも数が少ない。変化が起きる場合、その変化は従来の繁殖技術によって作られるものと同じ種類である。

・導入された遺伝子に関しては、SDN-3 技術は現在使われている他の遺伝子組換え技術と異なることは無く、トランスジーン、イントラジーン又はシスジーンを導入するのに使うことが出来る。

・EFSA GMO パネルは、遺伝子組換え植物由来の食品と飼料のリスク評価のための指針（EFSA GMO パネル、2011 年）と、遺伝子組換え植物の環境リスク評価に関する指針（EFSA GMO パネル、2010 年）は、SDN-3 技術を使って開発された植物由来の食品と飼料の評価、及び環境リスク評価の実施、に適用可能である。しかしながら、ケースバイケースで、SDN-3 技術を使って開発された植物のリスク評価のために必要な事象特異的データの量は減ると思われる。従って、リスク評価のためのデータ要件は柔軟性が必要である（EFSA GMO パネル、2012 年 a）。

2.2 協議

その開放性と透明性に関する方針に沿って、EFSA はオンラインの公の協議を通じて EU 加盟国とその利害関係者と協議した。2020 年の 4 月から 5 月にかけて、関心のある人

達は、GMO パネルの科学的見解案について意見を求められた。⁵ この協議プロセスに続いて、その文書は GMO パネルと MC WG の専門家達によって改定された。

オンラインの公の協議の結果は、EFSA のウェブサイト到最后的な科学的見解と共に公表される EFSA の技術的報告書で報告される。

3. 評価

3.1 序文

3.1.1 SDN-1、SDN-2 及び ODM 対 SDN-3 の比較

部位特異的ヌクレアーゼ (site-directed nuclease=SDN) の運用上の定義は、首席科学的アドバイザーのグループ、欧州委員会の科学的助言機構 (scientific advice mechanism= SAM) からの農業バイオテクノロジーでの新しい技術に関する説明文書で、定義された配列で部位特異的な二重鎖切断 (DSBs) を創る酵素 (エンドヌクレアーゼ) とされている。SDN は通常特定の DNA 配列を認識して、そのような配列内又はその近くで DNA を開裂する。DNA 標的の認識は、タンパク質分子自身 (タンパク質特異的 SDNs) 又は関係するガイド RNA 分子によって介在される (欧州委員会、2017 年)。

SDN を使用する時に選択したアプローチによって、異なる結果があり得る。SDN-1 の適用において、植物の非同源末端結合 (non-homologous end-joining=NHEJ) 修理経路は標的 DSB 部位でのランダムな突然変異 (代替、挿入及び削除) を導入するために利用される。反対に、SDN-2 アプローチは、植物の相同性指示修理 (homology directed repair =HDR) 経路を利用して標的 DSB で予測した変更 (即ち、意図した配列変更) を起こすためにテンプレート DNA を利用する。最後に、SDN-3 アプローチは、大きく伸びた DNA を標的であるゲノムの位置に挿入するのに、NHEJ と HDR の双方を利用することが出来る (EFSA GMO パネル、2012 年 a、Podevin 他、2013 年)。

ODM は、外因性ヌクレアーゼに依存しないため、SDN ベースの技術とは区別されている。農業バイオテクノロジーにおける新しい技術に関する注記は、ODM を、「ゲノムの中の標的を絞った突然変異の導入のためにオリゴヌクレオチドの使用、通常 1 つ又は僅かな近隣のヌクレオチドであるが、に基づいたアプローチと定義している。ODM を使用して得られる遺伝子変化には代替、挿入又は削除が含まれる。」 (欧州委員会、2017 年)

全体として、SDN-1、SDN-2 及び ODM 方法の適用は、標的となった遺伝子座での外来性 DNA の挿入無しに、標的となったゲノム遺伝子座のランダム (SDN-1) 又は予測された (SDN-2 及び ODM) 突然変異のいずれかをもたらす。SDN-3 方法の狙いは、各種の長さの外来性 DNA を挿入して標的の遺伝子座を変更することである。

⁵ <http://www.efsa.europa.eu/en/calls/consultations> で公表。

3.1.2 SDN-1、SDN-2 及び ODM の適用に使われる技術

SDN-3 に関する EFSA 見解は、2012 年までの植物ゲノム編集の分野における技術の開発と適用を扱った。この点で、ジンクフィンガー・ヌクレアーゼ (ZFNs)、転写活性化因子似のエフェクター・ヌクレアーゼ (TALENs) 及びメガヌクレアーゼに関する文献批評が含まれていた (EFSA GMO パネルのセクション 2.1 (2012 年 a))。この SDN-1、SDN-2 及び ODM に関する科学的見解の中で、GMO パネルは、これら 3 つのアプローチで展開された技術に関する詳細な文献批評を行うことは求められなかった。しかしながら、この数年で実現しているゲノム編集の進歩を考えると、GMO パネルは、それらに関するある程度の情報を含めることが適切である、と考え、それを以下に示す。

2012 年以来、CRISPR/Cas (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated nuclease) システムとして知られている新しい RNA 特異的 SDN タイプの技術が出現した (Jinek 他、2012 年)。植物遺伝子を編集する上で ZFNs と TALENs の利用を説明している報告書が未だに存在し、これらの技術は合衆国で既に市場に出回っている製品を取得するのに使われているが (例えば、TALENs アプローチを利用したゲノム編集大豆に由来する Calyno 高オレイン酸大豆油と粉末⁶)、CRISPR/Cas システムはゲノム編集のための事実上の望ましい技術になった (Chen 他、2019 年)。CRISPR/Cas システムは、モデル植物 (例えば、Jiang 他 (2013 年)、Li 他 (2013 年)、Nekrasov 他 (2013 年) を参照)、及びトウモロコシ、ソルガム、オオムギ、ジャガイモ、コメ及びコムギ (例えば、Upadhyay 他 (2013 年)、Liang 他 (2014 年)、Modrzejewski 他 (2019 年)、Afzal 他 (2020 年)) を含め、複数の植物種のゲノム編集に適用されてきた。今までのところ、ODM 技術は比較的単純で容易に選択可能な形質を持った GM 植物の生成にのみ使用されてきた；例えば、除草剤抵抗性 (Sauer 他、2016 年)、及び分子メカニズム、技術的側面、システムの応用と固有の制約 (即ち、異なる植物種の中の効率と特異性) の点で文献から入手可能な情報量は、CRISPR/Cas システムなど SDN ベースの技術に比べて限られている、と考えられている (Modrzejewski 他、2019 年)。

ZFNs、TALENs、メガヌクレアーゼ及び CRISPR/Cas システムは全て標的としたゲノム遺伝子座のランダムな (SDN-1)、そして予測される (SDN-2) 突然変異及び DNA 配列の正確な挿入を達成するために利用出来るが、ODM は実際には SDN-2 タイプのものに類似する標的とする遺伝子変更を生成するためにだけ適用される。塩基編集とプライム (prime) 編集など、最近出現した他の技術 (Komor 他、2016 年; Anzalone 他、2019 年; Lin 他、2020 年) は、いかなるテンプレート DNA も展開せずに、標的遺伝子座の中に DSB を誘導せずに、標的とする配列の中で特定のヌクレオチド変異を生成するために使用

⁶ <https://calyxt.com/first-commercial-sale-of-calyxt-high-oleic-soybean-oil-on-the-u-s-market/>

することが出来る。この科学的見解の中で、塩基編集とプライム編集を用いて取得した遺伝子組換えは、SDN-2 技術で創ったものと同様である、と GMO パネルは考えている（セクション 3.1.1 を参照）。

ゲノム編集された植物を生成するために適用した技術のより詳細な検討のために、GMO パネルは読者に EU 科学的助言メカニズム（欧州委員会、2017 年）の注釈といくつかの包括的な最近の批評を紹介する（Doudna と Charpentier、2014 年; Komor 他、2017 年; Chen 他、2019 年; Hua 他、2019 年; Zhang、2020 年）。

3.1.3 植物に SDN をもたらす又は発現させる方法

植物では、部位特異的突然変異は、遺伝子変異を達成するために必要な安定した統合、一時的発現、又は「DNA が関わらない」分子成分の受け渡しによって達成することが出来る（以下、SDN モジュールと言う）。安定した統合の場合で、性的に繁殖する作物の場合、SDN モジュールは分離によって除外出来る。このステップは多分一般的に無性的に（無性生殖）繁殖する作物では実施されないだろう。一般的に、最終製品に SDN 遺伝子カセットの存在が望ましくない全ての場合に、一時的発現は SDN モジュールを発現するための有効な代替方法であるかもしれない（Ma 他、2017 年）。「DNA が関わらない」受け渡しにとって、ヌクレアーゼを発現するメッセンジャー-RNA、タンパク質自身（TALENs については、ZFNs とメガヌクレアーゼ）又はリボ核タンパク質複合体（CRISPR/Cas システムにとって）は、DNA の中間配列の使用無しに、植物細胞に直接受け渡される（Matje-Sprink 他、2019 年）。純化された配列特異的ヌクレアーゼを植物細胞に受け渡す可能性は、メガヌクレアーゼと TALENs を用いてタバコで最初に説明された（Luo 他、2015 年）。それ以来、DNA の関わらない受け渡し方法は、コメ（Woo 他、2015 年）、コムギ（Zang 他、2016 年; Billchak 他、2019 年）、トウモロコシ（Svitashev 他、2016 年）及び大豆（Kim 他、2017 年）などの重要な作物を含む幾つかの植物に応用されてきた。ODM の場合、科学的に合成されたオリゴヌクレオチドは、安定的又は一時的発現システムを必要としないで、植物細胞に直接受け渡される。ODM はトウモロコシ（Zhu 他、2000 年）、コメ（Okuzaki と Toriyama、2004 年）、及び菜種（Gocal 他、2015 年）などいくつかの作物に成功裡に応用されてきた。SDN 成分の複数の受け渡しシステムは、PEG 融合、電気穿孔及び遺伝子銃を含み、異なる植物組織で試験されてきた（CRISPR/Cas9 成分受け渡し方法の批評については（Sandhya 他、2020 年）を参照のこと）。

3.2 命令の ToR1（付託条項 1）：SDN-3 に関する EFSA 見解のセクション 4 の SDN-

1、SDN-2 及び ODM アプローチを用いて取得した植物への適用可能性

3.2.1 序文

命令の ToR1 への対応として、GMO パネルは、SDN-3 アプローチを用いて開発した植物に関連する危険を遺伝子組換え及び従来繁殖の植物のものとを比較する⁷SDN-3 に関する EFSA 見解のセクション 4 を評価し、SDN-1、SDN-2 及び ODM を用いて開発された植物への適用可能性を評価した。GMO パネルは、2つのシナリオを想定している。最初のシナリオでは、完全な SDN モジュール、その一部及びゲノム編集プロセスで意図的に展開された全ての核酸配列は、植物ゲノムの中で全部又は一部が存在する（セクション 3.1.3 を参照）。この場合、製品のリスク評価は、ゲノムに統合された外来性 DNA に関して遺伝子組換え植物として、及び SDN-1、SDN-2 及び ODM アプローチで変更された標的配列に関して遺伝子が編集された植物として、行われる。第二のシナリオでは、SDN モジュールとゲノム編集プロセス中に意図的に展開された全ての核酸配列は、編集された植物のゲノムの中に存在しない（セクション 3.1.3 を参照）。この場合、評価は SDN の活動による変更のみ焦点を当てることになる。SDN-3 に関する EFSA 見解のセクション 4 の評価は、以下のセクション 3.2.2 に説明している。

3.2.2 SDN-3 に関する EFSA 見解のセクション 4 の評価

3.2.2.1 セクション 4 の評価：遺伝子の源と遺伝子製品の安全性

SDN-1、SDN-2 及び ODM アプローチは、いかなる DNA 配列をも挿入することを目指しておらず、既に存在している内因性配列を変更することを目指している、と言う点で SDN-3 と形質転換と異なっている（セクション 3.1.1 を参照）。変更された遺伝子・遺伝子座の性格、及びアレルの源と最終製品に関連する形質によって、リスク評価プロセスは必然的に安全使用の歴史を考慮することになる。例えば、新たにもたらされる機能に関する知識の点で全く異なる 2つのシナリオが予想される。一方では、ゲノム編集で得られた新しいアレル及び最終製品を特性化する関連形質は、同じ種の消費された及び・又は栽培された種の中に既に存在している。この場合、リスク評価はその種に関する知識（安全使用の歴史）に焦点を当てるかもしれない、編集された遺伝子とその製品に関する具体的なデータは必要ではないかもしれない。他方、変更されたアレルと最終製品に存在する関連形質は、これまでには説明されたことがない。この場合、新しいアレルと関連形質に関するデータは、リスク評価のために必要になるだろう。GMO パネルは、これら 2つの可能性の間には多くの異なるシナリオが想定され、結果として、ある範囲のデータ要件は具体的なケースに適用されるかもしれない、と考えている。評価対象の製品によっては、ある場

⁷ SDN-3 に関する EFSA 見解から：従来の繁殖方法には幅広い技術が含まれる（van der Wiel 他、2010 年）。EFSA GMO パネルは、以下の技術が SDN-3 技術で開発された植物との比較で重要であると考えた：性的交配、ブリッジ交配、胚救出、体細胞交雑、転座繁殖及び突然変異育種。

合には SDN-3 に必要なデータのサブセットのみが必要になる。

上記全ての点からして、SDN-3 に関する EFSA 見解のセクション 4.1（遺伝子の源と遺伝子製品の安全性）は、SDN-1、SDN-2 又は ODM アプローチによって開発された植物に部分的にのみ適用出来る、と GMO パネルは結論付けている。

3.2.2.2 セクション 4.2 の評価：ゲノムへの変更

3.2.2.2.1 挿入部位の変更（セクション 4.2.1）

SDN-1 と SDN-2 アプローチは、DSBs を誘導するために SDN-3 と同じ分子メカニズムを使用する。SDN-1 と SDN-2 アプローチとは違い、ODM アプローチは DSBs を誘導するには設計されておらず、この点、SDN-3 とは異なる。更に、ゲノム編集分野（即ち、プライムと塩基編集、セクション 3.1.2 を参照）での最近の技術開発の適用は、プロセスの全ての段階で植物ゲノムに DSB を誘導しない；それよりも、一般的にそれらは標的部位で 1 本鎖切断を誘導する。使用されたアプローチに関係なく、SDN-1、SDN-2 又は ODM をうまく適用すると、外因性 DNA が挿入されない具体的な予め定められたゲノム遺伝子座を標的とする配列変更がもたらされる。これらの理由のため、i)SDN-3 によって介在されたトランスジーン、イントラジーン又はシスジーンの標的を絞った統合；ii)自然の遺伝子座で特定の遺伝子を加え又は交換する可能性；そして iii)植物 DNA と挿入された DNA との間に新しく創られた接点の最適化、について言及する SDN-3 に関する EFSA 見解のセクション 4.2.1 で説明されている検討事項は、全て SDN-1、SDN-2 又は ODM アプローチを用いて得られた植物には重要ではない。

上記全ての点から、SDN-3 に関する EFSA 見解のセクション 4.2.1（挿入部位での変更）は SDN-1、SDN-2 又は ODM アプローチを用いて開発された植物には適用出来ない、と GMO パネルは結論付ける。

3.2.2.2.2 ゲノムの別の場所での変更（セクション 4.2.2）

SDN-1、SDN-2 又は ODM アプローチの適用は、予め決められた植物のゲノム配列を変更することを目指している。しかしながら、それらの適用に関連するオフターゲット活動とそれらのプロセスのために、それはゲノムの別の場所に変化を導入することも出来る（Hahn と Nekrasov、2019 年）。オフターゲット活動は、使用される技術の特異性のみ依存しているのではなく、元の標的遺伝子座とあるレベルの配列の類似性を共有する配列の存在と利用可能性にも依存している。加えて、ある塩基編集システムは、塩基エディター活動自身に繋がる Cas9 とは独立したオフターゲット効果を提示することが示された（Jin 他、2019 年；Zuo 他、2019 年）。これらの理由のため、SDN-1、SDN-2 又は塩基

編集オフターゲット活動は、予測可能（SDN-1 と SDN-2 について）又は可能でない（ある塩基編集システムについて）元の標的配列の外での意図しない突然変異をもたらすかもしれない（Jin 他、2019 年; Naeem 他、2020 年）。近年、SDN ベースの技術、特に CRISPR/Cas システムについて、効率と特異性の改善に大きな努力が払われている（塩基編集を含む；Doman 他（2020 年）；Deng 他（2020 年）；Anzalone 他（2020 年）を参照。）。例えば、短い gRNAs の設計又はそれらの改善設計（Young 他、2019 年）、Cas-gRNA 複合体の細胞内濃度の低減（Hoffman 他、2019 年）、特定の反 CRISPR タンパク質の発現（Hoffman 他、2019 年）、又は RNP 受け渡し（Svitashev 他、2016 年）は一般的にオフターゲット効果を削減するようだ。更に、他の CRISPR 関連のヌクレアーゼの開発（及び・又は確認）は、効率と特異性を改善してオフターゲット効果を削減する助けとなった（Veillet 他、2020 年）。

SDN-3 に関する EFSA 見解の中で、SDN-3 アプローチの適用により誘導されたオフターゲット突然変異は、以前から使われていて安全使用の長い歴史を持っている従来の突然変異生成技術を適用したときに起きるものよりも少ない、と GMO パネルは結論付けた。加えて、意図的に変更された遺伝子座に遺伝的に繋がっているものを除き、最終製品からこれらの潜在的なオフターゲット突然変異を除くために、形質転換プロセスに続いての戻し交配が使用出来る（EFSA GMO パネル、2012 年 a）。SDN-3 に関する見解の発表の後、SDN ベースの方法の適用によって生じたオフターゲット突然変異の種類と数を記載した実験の証拠が公表された（Tang 他、2018 年; Lee 他、2019 年; Li 他、2019 年）。これらの出版物によって、SDNs によって潜在的に誘導されたオフターゲット突然変異は、自然発生の突然変異と物理的及び化学的突然変異生成を含み、従来の繁殖で使用されている突然変異と同じ種類であることが確認された。更に、これらの出版物で、SDN ベースの方法によって生成されたオフターゲット突然変異の数は、従来の繁殖に見られる自然発生または誘導された突然変異による突然変異の数よりも少ないことも確認された（Tang 他、2018 年; Lee 他、2019 年; Li 他、2019 年）。従って、潜在的オフターゲットの解析は、リスク評価にとっての価値は限られたものである、と GMO パネルは考えている。加えて、潜在的なオフターゲット突然変異を特定するためにいくつかの生化学的及び生物情報学的ツールが利用可能であるが（Bae 他、2014 年; Tsai 他、2015 年; Cameron 他、2017 年; Akcakaya 他、2018 年; Peng 他、2018 年; Naeem 他、2020 年）、植物ゲノム配列の限られた利用可能性及び・又は完全さ及びその種内と変種内のばらつきは、潜在的なオフターゲット突然変異の信頼性のある予測を必ずしも可能にしない（Tang 他、2018 年; Lee 他、2019 年）。増加しつつある多くの出版物が SDN ベースの技術の場合のオフターゲット効果を調査しているが、ODM の場合のオフターゲットメカニズムと頻度に関する情報は極めて限られていることを、GMO パネルは気づいた（Modrzejewski 他、2019 年）。最後に、SDN-3 に関する EFSA 見解は、形質転換プロセスに続く戻し交配ステップは最終製品のゲノムからオフターゲット突然変異を除外する可能性が高い、と述べた（上記を

参照)。SDN-1、SDN-2 又は ODM アプローチによって生成された植物にはこの側面が依然として適用可能である、と GMO パネルは考えている。

SDN モジュールを導入するのに植物の形質転換が使用される場合、植物ゲノムに意図しないプラスミド DNA 又は他の外因性 DNA が意図せずに挿入されることがあり得る。更に、SDN-1 と SDN-2 変更を達成するための何らかの方法（例えば、一時的発現と DNA が関わらない方法）の適用は、その配列が先験的に知られているかもしれない外因性 DNA の意図的統合をもたらすことがある（外因性 DNA の意図しないオンターゲット挿入の例は、Clasen 他（2016 年）、Andersson 他（2018 年）、Norris 他（2020 年）、Solomon（2020 年）で見つけることが出来る）。もし最終製品がいかなる外因性 DNA をも保持することを意図されていない場合、申請者は SDN 変更を生成するために使った方法に由来する DNA 配列の潜在的な存在を評価すべきである（例えば、プラスミド又はベクター。セクション 3.1.3 を参照。）。外因性 DNA の意図しない統合は、EU 規制の下、既に GM 植物のリスク評価の中で分子特性化の一部であることを指摘しておきたい。従って、これはゲノム編集された植物のリスク評価にとって新しい要件と考えられてはいない。

上記の全ての点から、SDN-3 に関する EFSA 見解のセクション 4.2.2（ゲノムの他の場所での変更）は SDN-1、SDN-2 又は ODM アプローチによって開発された植物に適用出来る、と GMO パネルは結論付けた。

3.3 命令の ToR2（付託条項 2）：SDN-1、SDN-2 又は ODM アプローチを用いて取得した植物への SDN-3 に関する EFSA 見解の結論の適用可能性

EFSA GMO パネル（2012 年 a）は、SDN-3 アプローチの適用で取得した植物を従来の繁殖技術で作られたもの、及び現在使われている遺伝子組換えによるものと比較した。以下のセクションで、GMO パネルは SDN-1、SDN-2 又は ODM アプローチで作った植物に関連する危険を、SDN-3 アプローチで取得した植物に関連するものと比較した。命令の ToR2 への対応として、GMO パネルはセクション 3.2 で報告したその評価を検討して、SDN-3 に関する EFSA 見解の結論を評価した（EFSA GMO パネル、2012 年 a）。以下の検討事項が挙げられた。

- 1) SDN-3 植物へのトランスジーン、シスジーン又はイントラジーン挿入のゲノム的意味合いの最適化に言及する結論は、SDN-1、SDN-2 又は ODM アプローチを用いて取得した植物には適用可能ではない。何故ならこれらの方法はいかなるトランスジーン、イントラジーン又はシスジーンの挿入も無しに内因性 DNA 配列を変更することを目指しているからである。
- 2) SDN-3 に関する EFSA 見解は、SDN-3 の適用はオフターゲットの突然変異を誘発出

来るが、これらは殆どの突然変異生成技術で生じるものよりも少ない、と結論付けた。それが生じる場合、それらの変化は従来の繁殖技術に由来するものと同じ種類のものである（EFSA GMO パネル、2012 年 a）。SDN-1 と SDN-2 技術は DSB を生成するために SDN-3 と同じ分子メカニズムを使用するため、SDN-3 に関する結論は SDN-1 と SDN-2 にも適用出来る。ODM の場合、オフターゲット効果のメカニズムと頻度に関する情報は文献では僅かしか入手できないが、この技術は SDN ベースの方法と同じように配列特異的な部位認識に基づいているため、同じ結論も適用すると想定することは合理的である。

- 3) 第 1 点で概説した理由から、導入されたトランスジーン、イントラジーン又はシスジーンのリスク評価を扱った結論は適用できない。しかしながら、場合によっては、SDN モジュールはその植物ゲノムの中で導入遺伝子として安定的に導入できるかもしれない、と GMO パネルは考える。これらの場合、取得された植物は遺伝子導入植物と見做されなければならない、導入遺伝子の存在は GMO に関する EU 規則で定められた全ての規定に従ってリスク評価されることになる。
- 4) SDN-3 に関する EFSA 見解の中で、GM 植物由来の食品と飼料のリスク評価の指針（EFSA GMO パネル、2011 年）及び GM 植物の環境リスク評価に関する指針（EFSA GMO パネル、2010 年）は、SDN-3 方法を用いて取得された植物のリスク評価に適用出来る、と GMO パネルは結論付けた。2つの指針文書は十分であるが、SDN-1、SDN-2 又は ODM 方法の適用によって生成された植物のリスク評価には部分的にのみ適用出来る、と GMO パネルは考えている。事実、トランスジーン、イントラジーン又はシスジーンが存在するそれらの要件は、第 1 点で概説した理由により、関係が無い。SDN-3 に関する EFSA 見解の中で、「個々の事例により、リスク評価に必要な事象特異的データは減っている」、とも GMO パネルは結論付けている（EFSA GMO パネル、2012 年 a）。GMO パネルは、この結論は SDN-1、SDN-2 又は ODM アプローチによって生成された植物にも適用される、と考えている。事実、トランスジーン、イントラジーン又はシスジーンが存在しない場合、リスク評価のために必要な実験的データの量は、主として導入された変更された形質に依存し、SDN-1、SDN-2 又は ODM によって作られた植物のために必要な実験的データは、SDN-3 によって生成された植物に比べても少ないだろう。

4. 結論

ToR1 に関連して、GMO パネルは、SDN-3 に関する EFSA 見解のセクション 4 に提示されている評価方法は SDN-1、SDN-2 及び ODM には部分的に適用可能であると結論付けた。これらのアプローチは標的を絞った方法で内因性 DNA 配列を変更することを目指しているので、最終的な製品がトランスジーン、イントラジーン又はシスジーンを全く

含んでいなければ、これらの植物は SDN-3 アプローチを用いて取得された植物に見られる挿入されたトランスジーン、イントラジーン又はシスジーンに潜在的に関係する危険は提示しないであろう。更に、GMO パネルは、SDN-3 と従来の突然変異生成を含む従来の繁殖技術の双方と比較して、SDN-1、SDN-2 及び ODM アプローチの使用に関連した追加の危険は確認しなかった。SDN-1 と SDN-2 アプローチはオフターゲット変化を誘発出来るが、SDN-3 の場合のように、これらの変化は伝統的な突然変異生成技術で生じるものよりも少なく、遺伝子の変更又は中断のリスクは減少する。

ToR2 に関連して、食品と飼料に関する既存の指針 (EFSA GMO パネル、2011 年) 及び環境リスク評価 (EFSA GMO パネル、2010 年) は十分であるが、SDN-1、SDN-2 又は ODM アプローチによって生成された植物のリスク評価のためには部分的にのみ適用可能である。事実、SDN-1、SDN-2 及び ODM は外因性 DNA を統合せずに内因性 DNA 配列を変更することを目指しているため、導入遺伝子の存在に結びついた既存の指針の中の多くの要件は、SDN-1、SDN-2 又は ODM 植物の評価には関係が無い。リスク評価のために必要な実験的データの量は、主として導入された変更された形質に依存するので、リスク評価へのケースバイケース原則のアプローチが特に SDN-1、SDN-2 及び ODM 植物にとって重要である、と GMO パネルは考えている。

参考文献

- Afzal S, Sirohi P and Singh NK, 2020. A review of CRISPR associated genome engineering: application, advances and future prospects of genome targeting tool for crop improvement. *Biotechnology Letters*, 42, 1611–1632.
- Akcakaya P, Bobbin ML, Guo JA, Malagon-Lopez J, Clement K, Garcia SP, Fellows MD, Porritt MJ, Firth MA, Carreras A, Baccega T, Seeliger F, Bjursell M, Tsai SQ, Nguyen NT, Nitsch R, Mayr LM, Pinello L, Bohlooly YM, Aryee MJ, Maresca M and Joung JK, 2018. *In vivo* CRISPR editing with no detectable genome-wide off-target mutations. *Nature*, 561, 416–419.
- Andersson M, Turesson H, Olsson N, Falt AS, Ohlsson P, Gonzalez MN, Samuelsson M and Hofvander P, 2018. Genome editing in potato via CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein delivery. *Physiologia Plantarum*, 164, 378–384.
- Anzalone AV, Randolph PB, Davis JR, Sousa AA, Koblan LW, Levy JM, Chen PJ, Wilson C, Newby GA, Raguram A and Liu DR, 2019. Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. *Nature*, 576, 149–157.
- Anzalone AV, Koblan LW and Liu DR, 2020. Genome editing with CRISPR-Cas nucleases, base editors, transposases and prime editors. *Nature Biotechnology*, 38, 824–844.
- Bae S, Park J and Kim JS, 2014. Cas-OFFinder: a fast and versatile algorithm that searches for potential off-target sites of Cas9 RNA-guided endonucleases. *Bioinformatics*, 30, 1473–1475.
- Bilichak A, Sastry-Dent L, Sriram S, Simpson M, Samuel P, Webb S, Jiang FY and Eudes F, 2019. Genome editing in wheat microspores and haploid embryos mediated by delivery of ZFN proteins and cell-penetrating peptide complexes. *Plant Biotechnology Journal*, 18, 1307–1316.
- Cameron P, Fuller CK, Donohue PD, Jones BN, Thompson MS, Carter MM, Gradia S, Vidal B, Garner E, Slorach EM, Lau E, Banh LM, Lied AM, Edwards LS, Settle AH, Capurso D, Llaca V, Deschamps S, Cigan M, Young JK and May AP, 2017. Mapping the genomic landscape of CRISPR-Cas9 cleavage. *Nature Methods*, 14, 600–606.
- Chen KL, Wang YP, Zhang R, Zhang HW and Gao CX, 2019. CRISPR/Cas genome editing and precision plant breeding in agriculture. *Annual Review of Plant Biology*, 70, 667–697.
- Clasen BM, Stoddard TJ, Luo S, Demorest ZL, Li J, Cedrone F, Tibebe R, Davison S, Ray EE, Daulhac A, Coffman A, Yabandith A, Retterath A, Haun W, Baltes NJ, Mathis L, Voytas DF and Zhang F, 2016. Improving cold storage and processing traits in potato through targeted gene knockout. *Plant Biotechnology Journal*, 14, 169–176.

- Deng C, Lv X, Li J, Liu Y, Du G and Liu L, 2020. Development of a DNA double-strand break-free base editing tool in *Corynebacterium glutamicum* for genome editing and metabolic engineering. *Metab Eng Commun*, 11, e00135.
- Doman JL, Raguram A, Newby GA and Liu DR, 2020. Evaluation and minimization of Cas9-independent off-target DNA editing by cytosine base editors. *Nature Biotechnology*, 38, 620–628.
- Doudna JA and Charpentier E, 2014. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 346, 1077–+.
- EFSA GMO Panel (EFSA Panel on Genetically Modified Organisms), 2010. Guidance on the environmental risk assessment of genetically modified plants. *EFSA Journal* 2010;8(11):1879. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2010.1879>
- EFSA GMO Panel (EFSA Panel on Genetically Modified Organisms), 2011. Guidance for risk assessment of food and feed from genetically modified plants EFSA Panel on Genetically Modified Organisms (GMO). *EFSA Journal* 2011;9(6):2193. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2011.2193>
- EFSA GMO Panel (EFSA Panel on Genetically Modified Organisms), 2012a. Scientific opinion addressing the safety assessment of plants developed using Zinc Finger Nuclease 3 and other Site-Directed Nucleases with similar function. *EFSA Journal* 2012;10(10):2943. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2012.2943>
- EFSA GMO Panel (EFSA Panel on Genetically Modified Organisms), 2012b. Scientific opinion addressing the safety assessment of plants developed through cisgenesis and intragenesis. *EFSA Journal* 2012;10(2):2561.
- European Commission, 2017. New techniques in agricultural biotechnology. CEU. SAM_ADV, Directorate-General for Research and Innovation, 28 April 2017.
- Gocal GFW, Schöpke C and Beetham PR, 2015. Oligo-Mediated Targeted Gene Editing. In: Zhang F, Puchta H and Thomson JG, eds. *Advances in New Technology for Targeted Modification of Plant Genomes*. Springer, New York, New York, NY.
- Hahn F and Nekrasov V, 2019. CRISPR/Cas precision: do we need to worry about off-targeting in plants? *Plant Cell Reports*, 38, 437–441.
- Hoffmann MD, Aschenbrenner S, Grosse S, Rapti K, Domenger C, Fakhiri J, Mastel M, Borner K, Eils R, Grimm D and Niopek D, 2019. Cell-specific CRISPR-Cas9 activation by microRNA-dependent expression of anti-CRISPR proteins. *Nucleic Acids Research*, 47.
- Hua K, Zhang JS, Botella JR, Ma CL, Kong FJ, Liu BH and Zhu JK, 2019. Perspectives on the application of genome-editing technologies in crop breeding. *Molecular Plant*, 12, 1047–1059.
- Jiang WZ, Zhou HB, Bi HH, Fromm M, Yang B and Weeks DP, 2013. Demonstration of CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated targeted gene modification in Arabidopsis, tobacco, sorghum and rice. *Nucleic Acids Research*, 41.
- Jin S, Zong Y, Gao Q, Zhu ZX, Wang YP, Qin P, Liang CZ, Wang DW, Qiu JL, Zhang F and Gao CX, 2019. Cytosine, but not adenine, base editors induce genome-wide off-target mutations in rice. *Science*, 364, 292–+.
- Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA and Charpentier E, 2012. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 337, 816–821.
- Kim H, Kim ST, Ryu J, Kang BC, Kim JS and Kim SG, 2017. CRISPR/Cpf1-mediated DNA-free plant genome editing. *Nature. Communications*, 8.
- Komor AC, Kim YB, Packer MS, Zuris JA and Liu DR, 2016. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature*, 533, 420–+.
- Komor AC, Badran AH and Liu DR, 2017. CRISPR-based technologies for the manipulation of eukaryotic genomes. *Cell*, 168, 20–36.
- Lee K, Zhang Y, Kleinstiver BP, Guo JA, Aryee MJ, Miller J, Malzahn A, Zarecor S, Lawrence-Dill CJ, Joung JK, Qi Y and Wang K, 2019. Activities and specificities of CRISPR/Cas9 and Cas12a nucleases for targeted mutagenesis in maize. *Plant Biotechnology Journal*, 17, 362–372.
- Li JF, Norville JE, Aach J, McCormack M, Zhang DD, Bush J, Church GM and Sheen J, 2013. Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in Arabidopsis and Nicotiana benthamiana using guide RNA and Cas9. *Nature Biotechnology*, 31, 688–691.
- Li J, Manghwar H, Sun L, Wang P, Wang G, Sheng H, Zhang J, Liu H, Qin L, Rui H, Li B, Lindsey K, Daniell H, Jin S and Zhang X, 2019. Whole genome sequencing reveals rare off-target mutations and considerable inherent genetic or/and somaclonal variations in CRISPR/Cas9-edited cotton plants. *Plant Biotechnology Journal*, 17, 858–868.
- Liang Z, Zhang K, Chen KL and Gao CX, 2014. Targeted mutagenesis in *Zea mays* using TALENs and the CRISPR/Cas system. *Journal of Genetics and Genomics*, 41, 63–68.
- Lin Q, Zong Y, Xue C, Wang S, Jin S, Zhu Z, Wang Y, Anzalone AV, Raguram A, Doman JL, Liu DR and Gao C, 2020. Prime genome editing in rice and wheat. *Nature Biotechnology*, 38, 582–585.
- Luo S, Li J, Stoddard TJ, Baltes NJ, Demorest ZL, Clasen BM, Coffman A, Retterath A, Mathis L, Voytas DF and Zhang F, 2015. Non-transgenic plant genome editing using purified sequence-specific nucleases. *Molecular Plant*, 8, 1425–1427.
- Ma J, Xiang H, Donnelly DJ, Meng FR, Xu HM, Durnford D and Li XQ, 2017. Genome editing in potato plants by agrobacterium-mediated transient expression of transcription activator-like effector nucleases. *Plant Biotechnology Reports*, 11, 249–258.

- Metje-Sprink J, Menz J, Modrzejewski D and Sprink T, 2019. DNA-free genome editing: past, present and future. *Frontiers. Plant Science*, 9.
- Modrzejewski D, Hartung F, Sprink T, Krause D, Kohl C and Wilhelm R, 2019. What is the available evidence for the range of applications of genome-editing as a new tool for plant trait modification and the potential occurrence of associated off-target effects: a systematic map. *Environmental Evidence*, 8.
- Naeem M, Majeed S, Hoque MZ and Ahmad I, 2020. Latest developed strategies to minimize the off-target effects in CRISPR-Cas-mediated genome editing. *Cells*, 9.
- Nekrasov V, Staskawicz B, Weigel D, Jones JDG and Kamoun S, 2013. Targeted mutagenesis in the model plant *Nicotiana benthamiana* using Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nature Biotechnology*, 31, 691–693.
- Norris AL, Lee SS, Greenlees KJ, Tadesse DA, Miller MF and Lombardi HA, 2020. Template plasmid integration in germline genome-edited cattle. *Nature Biotechnology*, 38, 163–164.
- Okuzaki A and Toriyama K, 2004. Chimeric RNA/DNA oligonucleotide-directed gene targeting in rice. *Plant Cell Reports*, 22, 509–512.
- Pattanayak V, Lin S, Gullinger JP, Ma EB, Doudna JA and Liu DR, 2013. High-throughput profiling of off-target DNA cleavage reveals RNA-programmed Cas9 nuclease specificity. *Nature Biotechnology*, 31, 839–+.
- Peng H, Zheng Y, Zhao Z, Liu T and Li J, 2018. Recognition of CRISPR/Cas9 off-target sites through ensemble learning of uneven mismatch distributions. *Bioinformatics*, 34, i757–i765.
- Podevin N, Davies HV, Hartung F, Nogue F and Casacuberta JM, 2013. Site-directed nucleases: a paradigm shift in predictable, knowledge-based plant breeding. *Trends in Biotechnology*, 31, 375–383.
- Sandhya D, Jogam P, Allini VR, Abbagani S and Alok A, 2020. The present and potential future methods for delivering CRISPR/Cas9 components in plants. *J Genet Eng Biotechnol*, 18, 25.
- Sauer NJ, Mozoruk J, Miller RB, Warburg ZJ, Walker KA, Beetham PR, Schopke CR and Gocal GFW, 2016. Oligonucleotide-directed mutagenesis for precision gene editing. *Plant Biotechnology Journal*, 14, 496–502.
- Solomon SM, 2020. Genome editing in animals: why FDA regulation matters. *Nature Biotechnology*, 38, 142–143.
- Svitashev S, Schwartz C, Lenderts B, Young JK and Cigan AM, 2016. Genome editing in maize directed by CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein complexes. *Nature. Communications*, 7.
- Tang X, Liu G, Zhou J, Ren Q, You Q, Tian L, Xin X, Zhong Z, Liu B, Zheng X, Zhang D, Malzahn A, Gong Z, Qi Y, Zhang T and Zhang Y, 2018. A large-scale whole-genome sequencing analysis reveals highly specific genome editing by both Cas9 and Cpf1 (Cas12a) nucleases in rice. *Genome Biology*, 19, 84.
- Tsai SQ, Zheng Z, Nguyen NT, Liebers M, Topkar VV, Thapar V, Wyvekens N, Khayter C, Iafate AJ, Le LP, Aryee MJ and Joung JK, 2015. GUIDE-seq enables genome-wide profiling of off-target cleavage by CRISPR-Cas nucleases. *Nature Biotechnology*, 33, 187–197.
- Upadhyay SK, Kumar J, Alok A and Tuli R, 2013. RNA-guided genome editing for target gene mutations in wheat. *G3-Genes Genomes. Genetics*, 3, 2233–2238.
- Van der Wiel C, Schaart J, Niks R and Visser R, 2010. Traditional plant breeding methods. Report 338, Available from <http://edepot.wur.nl/141713>
- Veillet F, Kermarrec MP, Chauvin L, Chauvin JE and Nogue F, 2020. CRISPR-induced indels and base editing using the *Staphylococcus aureus* Cas9 in potato. *PLoS ONE*, 15, e0235942.
- Woo JW, Kim J, Il Kwon S, Corvalan C, Cho SW, Kim H, Kim SG, Kim ST, Choe S and Kim JS, 2015. DNA-free genome editing in plants with preassembled CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins. *Nature Biotechnology*, 33, 1162–U156.
- Young J, Zastrow-Hayes G, Deschamps S, Svitashev S, Zaremba M, Acharya A, Paulraj S, Peterson-Burch B, Schwartz C, Djukanovic V, Lenderts B, Feigenbutz L, Wang L, Alarcon C, Siksnys V, May G, Chilcoat ND and Kumar S, 2019. CRISPR-Cas9 editing in maize: systematic evaluation of off-target activity and its relevance in crop improvement. *Scientific Reports*, 9, 6729.
- Zhang B, 2020. CRISPR/Cas9: a robust genome-editing tool with versatile functions and endless application. *International Journal of Molecular Sciences*, 21.
- Zhang Y, Liang Z, Zong Y, Wang YP, Liu JX, Chen KL, Qiu JL and Gao CX, 2016. Efficient and transgene-free genome editing in wheat through transient expression of CRISPR/Cas9 DNA or RNA. *Nature. Communications*, 7.
- Zhu T, Mettenburg K, Peterson DJ, Tagliani L and Baszczyński CL, 2000. Engineering herbicide-resistant maize using chimeric RNA/DNA oligonucleotides. *Nature Biotechnology*, 18, 555–558.
- Zuo EW, Sun YD, Wei W, Yuan TL, Ying WQ, Sun H, Yuan LY, Steinmetz LM, Li YX and Yang H, 2019. Cytosine base editor generates substantial off-target single-nucleotide variants in mouse embryos. *Science*, 364, 289–+.

略語

- DSBs double-strand breaks (二重鎖切断)
- GMO Genetically Modified Organisms (遺伝子組換え生物)

HDR	homology-directed repair (相同性特異的修理)
MC WG	molecular characterization working group (分子特性化作業グループ)
NHEJ	non-homologous end-joining (非相同末端結合)
ODM	oligonucleotide-directed mutagenesis (オリゴヌクレオチド特異的突然変異生成)
SAM	Scientific Advice Mechanism (科学的助言機構)
SDN	site-directed nuclease (部位特異的ヌクレアーゼ)
TALENs	transcription activator-like effector nuclease (転写活性化因子似のエフェクター・ヌクレアーゼ)
ToR	terms of reference (付託条項)
ZFNs	zinc finger nuclease (ジンクフィンガー・ヌクレアーゼ)

用語集

戻し交配	親の1方との、又は親の1方と同じ遺伝特性を持った生物との交配 (ハイブリッド)。
シスジェネシス	交配可能な (性的に適合性のある) 生物からの遺伝子を持ったレシピエント生物の遺伝子組換え
CRISPR	(クラスター化され、規則的に間隔が空いている短い回文の反復) ウイルスに対して認識して保護するために使用する細菌性免疫の成分。一般的に CRISPR/Cas9 システムの短縮形として使われる。
DSB (二重鎖切断)	DNA の両鎖の機械的、化学的又は酵素による開裂。
外因性 DNA	植物の外で生じた DNA で、自然に又は技術的介入により導入可能であるように変更されたもの。
遺伝的に関係がある	性的に繁殖する生物の中で、極めて近い場所にあるゲノム遺伝子座で減数分裂中に一緒に遺伝を受ける。
ゲノム	その維持のために全ての遺伝的情報を持っている所与の生物の染色体の単数のセット。
ゲノムの突然変異	所与の生物のゲノムの中のヌクレオチド配列の恒久的変化。
相同性特異的修理	HDR と略される、テンプレートとして相同性配列を用いて DNA の二重鎖切断の修理を可能にする分子メカニズム。
イントラジェネシス	レシピエントとして同じ又は性的に適合する種のドナー生物からの異なる遺伝子断片の組合せに繋がる、レシピエント生物の遺伝子組換え (EFSA GM パネル、2012 年 b)。
非相同末端結合	NHEJ と略される、DNA の相同配列が利用できない場合

	に、DNA 二重鎖切断の修理を可能にする分子メカニズム。場合によっては、NHEJ はゲノム突然変異、通常は DNA の断片の挿入又は削除をもたらす。
オフターゲット突然変異	遺伝子操作技術の適用の結果としての意図したもの以外の、ゲノム遺伝子座に起きるゲノム突然変異。
オリゴヌクレオチド	比較的少数のヌクレオチドからなる核酸のストレッチ。
リボヌクレオタンパク質	タンパク質と RNA ポリマーからなる巨大分子複合体。
配列	通常 DNA と RNA 又はタンパク質の中のアミノ酸の中のヌクレオチドの線形序列のことである。
部位特異的突然変異生成	この見解では、ゲノム遺伝子座に特定の意図的变化（挿入、削除及び代替）を起こさせるために使われる分子生物学の方法である。
部位特異的ヌクレアーゼ	SDN と略される、特定の配列を認識して DNA を開裂して、通常二重鎖切断を生じさせる酵素。
SDN モジュール	この見解では、遺伝的突然変異を達成するのに必要な分子成分。
形質転換	この見解では、原核性又は真核性細胞が外因性 DNA を吸収するプロセス。
遺伝子組換え	異なる性的に不適合な種からの遺伝子を所与の細胞のゲノムに導入するプロセス及びその後のそのような遺伝子の繁殖。