

生命科学に関するデュアルユースに関する分析

研究分担者 木賀 大介 早稲田大学 理工学術院 教授

研究要旨：

合成生物学を学ぶ学生に、彼らが内容を理解している原著論文の技術を転用した際のデュアルユースのシナリオの検討を依頼し、この内容を分析した。また、タンパク質について、配列からの立体構造予測を行う新規ツールについて分析した。このツールについては、配列情報の公開および遺伝子合成の受託合成のスクリーニングについての議論と組み合わせ、分析を引き続き行っていく必要がある。

A. 研究目的

本研究課題の主題である生命科学に関するデュアルユース問題について、「先進生命科学技術のデュアルユース問題とバイオセキュリティ」の観点に立ち、この領域で学ぶ学生から観た論文情報のデュアルユースに対する着眼点、および、タンパク質のアミノ酸配列からその立体構造を人工知能によって予測することにより生命科学に革新をもたらすと期待される新手法について調査し、今後に向けてのべきガバナンスの展望を考察する。

B. 研究方法

学生から観た論文情報のデュアルユースに関する検討

合成生物学に関する国際学生コンテストに参加するチームの学生、および、合成生物学の研究室に所属する学部または修士学生について、彼らがチームや研究室内で文献紹介した原著論文について、デュアルユースがあるとしたらどのようなケースが考えられるか、の記載を依頼した。依頼時に、自由意志での参加不参加の判断が可能であること、および、成果報告での各記載と各参加者の対応付けを行わないことを告知した。

タンパク質の電子情報からの機能推定を行う人工知能に関する調査

原著論文の解析と共に、各種生物系学会での論文およびこの構造予測手法に関するセッションに参加し、受容の様子を調査した。

C. 研究結果

学生から観た論文情報のデュアルユースに関する検討

各論文について、一文概要と想定されるデュアルユース短文は、学生による記載を木賀が要約したものとなっている。

論文1

A broad-host-range event detector: expanding and quantifying performance between *Escherichia coli* and *Pseudomonas* species
<https://academic.oup.com/synbio/article/5/1/ysaa002/5753964>

(一文概要)

同一の遺伝子回路が、生物が異なった時に、どの程度作用が異なるか

(想定されるデュアルユース短文)

ヒトのゲノムDNAに遺伝子操作を行い、ヒト由来の物質を本来必要な量よりも大量にヒトの体内で作成して収穫するという非倫理的な行為

(論文概要)

現在の微生物のバイオデザインは特徴のある遺伝子部品を再利用して、異なる機能のために再構成する原理のもとで行われている。しかし、これらは一般的な実験室で用いられる大腸菌など限られた宿主でしか成功していない。複雑な環境での化学センシングや動作記録などの新しい応用が新しい筐体の恩恵を受けるのはあきらかである。この研究では同じ化学的動作記録（センサーとメモリー）が4つの菌株と3つの異なる微生物種でどのように動作するのかを定量的に比較する。2つはシュドモナス、残り2つは種類の異なる大腸菌を使用した。結果、センサーとメモリーの性能は宿主ごとに明確に変化したことが観察・定量化された。よって、シュドモナスは多くの点で一般的な大腸菌DH5 α を凌駕する筐体であることが証明された。この研究は幅広い宿主域のデバイスを構築し、異なる種がプログラム可能な遺伝子操作を実行できる背景を理解することで合成生物学をさらに前進させるものである。

(想定されるデュアルユース)

本論文では異なる種類の微生物種（シュドモナ

スと大腸菌)を用いて筐体ごとに性能が変化することを示していた。この技術が発展し、合成生物学への理解が深まることで筐体ごとの物質の合成量がわかるようになる。

そして、菌だけでなくヒトやマウスなどの哺乳類ごとの筐体性能も研究が進むことでより具体的に明らかになっていく。このことにより、ヒトのDNAに遺伝子操作でパーツを導入し、ヒト由来の物質を大量にヒトの体内で作成して収穫するという非倫理的な行為につながる。

論文 2

Synthesizing a Genetic Sensor Based on CRISPR-Cas9 for Specifically Killing p53-Deficient Cancer Cells

<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acssynbio.8b00202>

(一文概要)

p53の機能欠損時にプログラム細胞死を起こすことのできるシステム、および、生体内の主要な遺伝子の特異的な破壊

(想定されるデュアルユース短文)

他者に対する遺伝子操作。ヒトのみならず、どのような生物種に対しても想定することが出来るため、畜産や水処理施設等のインフラストラクチャー等にも影響を与える

(論文概要)

本論文では、ガン細胞のみを特異的にアポトーシスさせる遺伝子回路の合成について紹介されている。設計された遺伝子回路の対象となる細胞は、p53遺伝子に異常のあるガン細胞である。p53は細胞内のDNA傷害を検知し、細胞周期の停止や細胞死(アポトーシス)を引き起こすガン抑制遺伝子として働いている。設計においてはヒト細胞でジフテリア毒素を発現するもの、CAS9タンパク質とgRNAを転写翻訳する2つの遺伝子回路が用いられる。毒素を発現させる遺伝子回路(DT plasmid)では、hER1 α プロモーター下流にジフテリア毒素遺伝子が存在する。ヒト細胞中に導入された場合には恒常的にジフテリア毒素を生産する。CAS9タンパク質、gRNAを転写する遺伝子ではp53結合配列(BER)とSV40プロモーターの下流にCAS9タンパク質遺伝子、gRNA配列が存在する。ヒト細胞中に導入された場合には、p53依存的にCAS9タンパク質、gRNAを転写、翻訳する。

予想される遺伝子回路の挙動として、正常細胞ではCAS9タンパク質、gRNAの発現によりジフテリア毒素遺伝子が分解され翻訳は起こらない。しかしp53の欠損、変異が起こったガン細胞ではジフテリア毒素のmRNAがCAS9タンパク質に分解されることなくそのまま発現し、アポトーシスを引き起こす。実際にp53異常を持つ細胞に導入した場合には、p53異常のない細胞の10%がアポトーシスしたことに対し、異常(変異、欠損)のある細胞では40%アポトーシスを起こした。

(想定されるデュアルユース)

紹介された遺伝子回路は、細胞に導入した時点ではガン細胞、正常ともにアポトーシスを引き起こす毒素が常に発現しうる状態である。論文ではp53の遺伝子異常によって毒素の発現が起こるように想定されていたが、実際にはp53分解を促進するMDM2の過剰発現やSVプロモーターの阻害を引き起こすことで人為的に毒素発現が起こりうる状況を作り出すことができると考えられる。そのため、この遺伝子回路は任意に毒素発現を起こすことのできるシステムとして悪意ある人間に使用される可能性がある。このような想定において各遺伝子回路単体は本来毒性を示さないことから、事前に対策を取ることが困難であることが懸念される。

また、CRISPER-CAS9システムによるDNAの分解はジフテリア毒素遺伝子分解のみならず、普遍的な2本鎖DNAに対して応用可能である。今回はgRNAの対象としてジフテリア毒素遺伝子を選択したが、このgRNAを変更することによって生体内の主要な遺伝子の特異的に分解することも可能である。そのため、遺伝子回路の導入を受けた人間に対して健康被害を及ぼしうる。

この活用に対してはどのような生物種に対しても想定することが出来るため、畜産や水処理施設等のインフラ等にも影響を与えることが出来ると考えられる。

ただし、同意せずに遺伝子を改変する対象がヒトである場合には、遺伝子導入手法に工夫が必要となる。これらの遺伝子回路の導入において最も確実な方法は皮下投与、筋肉内投与、静脈内投与のような注射製剤への混入であるが、先に上げた製剤の管理を考えると混入させる手段は現実的に難しい。次点に上げられるのは、人ではヘルペスウイルス、大腸菌であればファージ等のDNAウイルスに遺伝子回路を載せ対象に感染させる手法である。ウイルスの感染であれば侵襲的な手法を取らずとも、対象との接触や飛沫等の接点があれば遺伝子回路の導入が可能である。そのためウイルスによる遺伝子回路の導入は、侵襲的な注射製剤等の手法に比べ検挙しにくく、より多くの対象へ広げることに適している。またウイルスによる導入で懸念されるべき点として、ウイルスの残留やDNAへの溶原化によって遺伝子回路が一定期間残留する可能性があることが挙げられる。遺伝子回路の残留は、悪意ある人間に毒素発現の有無に加えてそのタイミングまで掌握されることとなり、事前予測や対応をさらに困難にすると考えられる。

論文 3

Genetically Programmable Microbial Assembly

<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acssynbio.0c00616>

(一文概要)

外殻となる菌および内部で物質生産を行う菌の2種類の細菌からなるコンソーシアムを形成

(想定されるデュアルユース短文)

抗生物質や殺菌剤耐性の外殻と毒素を出すコアとする。別の方法として、2種類の菌で毒物の合成を分担させ、安全な貯蔵や隠蔽性を担保する

(論文概要)

可逆性と非可逆性な膜タンパク質相互作用を利用して、自発的に構築される微生物コンソーシアムのサイズや構造を、遺伝的にプログラム可能な方法で制御できるようになった。構造形成と解離の動作は各菌体が発現する膜タンパクによって決まり、集合体サイズは膜タンパクの発現レベルによって制御される。本論文では2種類の細胞で構成されるコアシェル構造を安定に形成させることが出来なかったが、表面被覆率 $66\pm 3\%$ という結果を出し、遺伝的にプログラム可能な微生物コンソーシアムを作製するのにいい選択を提供した。

また、コンソーシアムの形成によって、細胞間の物質交流はバルク溶液相に希釈されることなく集合体で蓄積されるため、通常ではクォーラムセンシングをサポートしない細胞密度でもクォーラムセンシング回路を機能できることを実証できた。それによって、クォーラムセンシング回路を持つ細胞の挙動をコンソーシアムの形成に依存させることができた。

(想定されるデュアルユース)

微生物コンソーシアムの本質は多種類の菌体の共生なので、論文で例に挙げられたように、シェルによって水銀から守られたコアがペンタクロロフェノールを浄化することができれば、当然抗生物質や殺菌剤耐性のシェルと毒素を出すコアも作れる。また、コンソーシアムでは細胞間の物質交流はバルク溶液相に希釈されにくいいため、代謝ステップ間のチャネリングができ、集合体で代謝ステップ分担して集団全体による生体触媒製造や互いへの物質供給が可能となる。

よって、シェルの設計によって、コアにある菌が活動できる環境を拡張できれば、より複雑な多段階合成も可能となる。より浄化されにくい、より高度と自由度の高い汚染除去（バイオレメディエーションなど）が可能となる。

本実験で提示した微生物コンソーシアムの形成方法は、通常ではエクストレーションや3DプリントなどによるTop-downプロセスや、生化学刺激や光遺伝学刺激によって形成される微生物コンソーシアムを、各微生物に事前にプログラムされた遺伝情報を導入することで自発的に形成できるという特徴がある。菌体さえ用意できれば、コンソーシアムを働かせたい時現場で混ぜるだけなので、現場での作業が簡単で迅速という利点があり、菌体の増殖によって微生物コンソーシアムも自発的に増加するので、継続かつ高度な働きができる。

おまけに、細胞の挙動をコンソーシアムの形成に依存させることで、多種類の細胞を利用して多段階合成反応を行う場合、混合しない限り合成反応は最終産物を産出しないため、混合して揮発性の毒物を

生産する場合はより安全に貯蔵できるし、毒物検査の対象となる物質は混合するまで製造されないため、隠蔽性が良いと思う。単純に1種類のコアなる細胞を使う場合でも、混合前の貯蔵中段階ではシェルの細胞に守れることはないため、抗生物質や成長抑制剤などによって成長や合成反応を制御できるので、同じく安全性と隠蔽性の良さを持つと考える。

論文 4

A multiplexed, electrochemical interface for gene-circuit-based sensors.

<https://www.nature.com/articles/s41557-019-0366-y>

(一文概要)

任意に設定した核酸を簡便に検出する電気化学センサー

(想定されるデュアルユース短文)

複数の細菌をキメラ化したものを検出。別の用途として、ある物質の存在により活性化し大量の毒素を放出する

(論文概要)

この論文では、プログラム可能な遺伝子回路を設計し、それを電気化学的な出力に繋げることで、核酸の複数同時検出に成功した。電気化学検出法は、蛍光や発色を利用した従来の検出法に比べ、感度が高く、複数のシグナルを独立に検出できるという点で優れている。著者たちはまず、制限酵素をスクリーニングし、DNA切断能力の高い制限酵素を特定した。次に、トーホールドスイッチを設計し、検出対象のRNAが存在すると特定の制限酵素が合成されるようにした。無細胞タンパク質合成系と呼ばれるin vitroの反応溶液中には、二重鎖のレポーターDNAが複数種類入れてあり、それらの一方の鎖の末端はメチレンブルーで標識されている。生産された制限酵素は、溶液中の特定のレポーターDNAを認識し切断する。その結果一本鎖となったレポーターDNAが、微小電極に取り付けてあるキャプチャーDNAにハイブリダイゼーションすることで、電極とメチレンブルーとの間で酸化還元反応が起こり、電流シグナルが生じる。本論文では、コンピュータ上で遺伝子回路をデザインした4種類の抗生物質耐性遺伝子について、それらを電気化学的に同時検出できることが実際に確かめられた。

(想定されるデュアルユース)

この論文の技術は非常に汎用性が高く、目的の核酸に応じたトーホールドスイッチを設計するだけで、実質的にあらゆる核酸の検出に応用することができる。つまり、天然には存在しない人工の核酸配列に対しても、容易に遺伝子回路をプログラムし、高感度な電気化学検出に繋げることが可能である。

したがって、生物兵器の研究開発の場面で用いられる恐れがある。たとえば、いくつかの病原体のゲノムを組み合わせて、より強い毒素を持つ新しい病原体を作ろうと試みる過程で、様々な種類の核酸を一度に手軽に検出するのに利用されるかもしれない。

さらに踏み込むと、検出技術自体の悪用にとどまらず、その前段階で用いられている遺伝子回路の設計技術の悪用も懸念される。すなわち、トールドスイッチの下流の遺伝子回路を自由にプログラムすることで、ある物質がくると活性化し大量の毒素をばらまく機能を持つ生物兵器を作ることができる。

論文5

Bioluminescence burst caused by a process in carbohydrate metabolism in a luciferase reporter strain of Escherichia coli

<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.08.016>

(一文概要)

細胞内状態のモニタリングで、状態の動的変化のメカニズムを理解する

(想定されるデュアルユース短文)

細胞状態変化メカニズムの理解は、細胞の制御に繋がる。自社が権利を持つ開発済みの治療薬のある病態を、制御をデザインした常在細菌改変体によって発症させ、治療薬の購入を強制する

(論文概要)

ホタルルシフェラーゼ遺伝子 (*luc+*) を導入した大腸菌は定常期初期に急激に生物発光のレベルが上昇するという生物発光バーストという現象が観測される。この生物発光バーストはプロモーターによらず同じタイミングで観測されることや、制御因子の*lacI*や*crp*が欠損した株においても観測されたことから翻訳後のプロセスが原因と推測されている。本研究では生物発光バーストのメカニズムを調べるために、各種遺伝子欠損株を用いて生物発光バーストに関与する遺伝子の探索が行われた。結果として、解糖系の2番目の反応を触媒する酵素Phosphoglucose isomerase (PGI) をコードする*pgi*欠損株では生物発光バーストが観測されなかった。また、PGIの反応を省略できる炭素源であるアラビノースやキシロースを用いた野生型の培養でも生物発光バーストが観測されなかった。以上の結果から生物発光バーストには糖質代謝が関与することが示唆された。原因代謝物が特定されることで生物発光バーストは代謝の動的変化をモニターする有用なマーカーになりうる。このマーカーは定常期における飢餓やストレスに対応するための細胞内状態の調整についての理解に役立つ。

(想定されるデュアルユース)

生物発光バーストにより代謝の動的変化のモニターが可能になり、定常期における飢餓やストレスに対応するための細胞内状態の調整についての理解が進むことで、大腸菌など細菌の制御が容易になると考えられる。

細菌制御の悪用で考えられることとして、ヒトに直接の影響がない物質などで常在細菌などを制御し異所性感染を意図的に引き起こすことが可能となれば、自然に感染症が発症したかの判断が難しく低リスクで他者に損害を与えることができる。また、制御したうえで発症させるため治療薬の開発も容易く、

搾取構造を構築できる。

論文6

Cell-Free Mixing of Escherichia coli Crude Extracts to Prototype and Rationally Engineer High-Titer Mevalonate Synthesis

<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acssynbio.6b00154>

(一文概要)

無細胞代謝工学では、酵素混合比率の最適化が容易(想定されるデュアルユース短文)

毒性物質生産系を簡便に最適化

(論文概要)

本研究では目的酵素を個別に過剰発現させたソース株のライセートを混合して代謝経路を再構築する手法「lysate-based CFME」により、メバロン酸合成を行った。lysate-based CFMEは、無細胞系(CFME)であることから中間体の細胞毒性の影響が無いことや、従来の無細胞系である精製酵素を利用した合成系と異なり内因性酵素によるエネルギー、補酵素のリサイクルが可能であるという利点がある。また、目的酵素を個別に過剰発現させたソース株のライセートを利用することから、生合成経路の最適化が細胞の再設計ではなく、ライセートの混合比を変えることにより可能という簡便さがある。本研究で生合成を行ったメバロン酸は有用物質であるイソプレノイド合成の中間体であり、解糖系・TCA回路で得られるアセチル-CoA からメバロン酸経路で合成可能である。この合成経路に関する3種類の酵素についてのスクリーニングとライセートの混合比の検討から最適化を行った結果、119 mM という高収量を達成しlysate-based CFMEの有用性が示された。

(想定されるデュアルユース)

本研究で有用性が示されたlysate-based CFMEにより、有用物質の生合成による開発が容易になると考えられる。このことは裏を返せば有機合成の難しい生物由来の毒物などの開発も容易になるということである。本研究で合成されたメバロン酸から有用物質であるイソプレノイドの合成が可能であるが、イソプレノイドにはヒトに毒性を示す物質もある。例を挙げると、植物毒として有名なトリカブト由来のアコニチンはイソプレノイドの一種である。構造が複雑なアコニチンは有機合成に多工程が必要であり全合成は困難である。一方で生合成経路は知られていることから、メバロン酸からアコニチンを合成する経路に関連する各酵素を個別に過剰発現させたソース株のライセートを、本研究でのメバロン酸合成系に混合するという簡便な拡張だけで合成できる可能性がある。

タンパク質の電子情報からの機能推定を行う人工知能に関する調査

2021年、タンパク質の配列から立体構造を予測するツールとして、Alpha fold2が公表された。

Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A. *et al.* Highly accurate

protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* **596**, 583–589 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>

この論文のインパクトは本邦でも大きく、生物系の多くの学会で、このツールの紹介がなされた。クラウドの計算機資源を使った構造予測も可能であるだけでなく、ローカル環境でも、50万円程度のゲーミングPCで動作検証がなされ、おそらくは10万円未満のGPU搭載PCでも可能になる、とも述べられている。

D. 考察

学生から観た論文情報のデュアルユースに関する検討

学生が想定したデュアルユースは、当初こちらが予想していた毒物の生産や、望まない遺伝子操作を施す、ということだけでなく、経済的な搾取にも及んだ。市民向け合成生物学講演(2021年、ゲノム問題討論会、講演内容を研究協力者四ノ宮の共同編集書籍の一章として、2022年5月出版予定)でも、搾取構造に対する質問があった。社会構造の不安定化も社会に対するリスクととらえるならば、生物多様性条約の交渉でも見られるような経済的な側面もデュアルユースの対象として検討されることが、社会から望まれるかもしれない。

今回の学生の参加率は、報酬があったにも関わらず、該当者の2割程度と、高いものではなかった。本研究グループが構成する講演会での演者であった、齊藤智也博士によると、以前木賀が招いた東工大の講演でも、学生たちが積極的にデュアルユースを考えた、ということは無かったとのことである。本研究について、報酬が魅力的でなかった可能性もあるが、通常教育を受けているのみでは、デュアルユースを想定したことが無かったために参加のハードルが高かった、または、自らが学ぶ技術の悪用に対して目を背けたい、という意識があったのかもしれない。

タンパク質の電子情報からの機能推定を行う人工知能に関する調査

配列がわかっているものの機能が未知なタンパク質について、その機能を推定するためには、立体構造情報が極めて重要となる。立体構造解析手段の進展を活かしてこの情報を手にすることもできるが、構造生物学者の介在が必要となる。この度の立体構造

予測ツールは、生物学者一般に、確度の高い予測立体構造情報の入手を可能にした点で、大きな意義がある。

この新規な予測ツールと、デュアルユースの既存の議論対象が組み合わせることで、どちらの方向の使用にも、大きな進展が予期される。すなわち、環境微生物を含めたゲノム情報の公開と入手、および、必要とされる塩基配列について、電子情報から遺伝子の合成を外注して物質としてのDNAを入手することである。この意味で、遺伝子合成に対する適切な監視を、より確実に行う必要がある。また、ゲノム情報の公開が科学と技術の進展に有益であることは間違いない一方、誰がどのように情報にアクセスしたか、という履歴を残すことが必要かもしれない。この点に、機能獲得(ゲイン オブ ファンクション) 研究に関するデュアルユースの既存の議論との相似性がある。

E. 結論

合成生物学を学ぶ学生にとって、積極的にデュアルユースを検討する機会は稀であるが、ひとたび検討するならば、いくつものシナリオを想定する能力があることが分かった。タンパク質について、配列からの立体構造予測技術の進展は著しく、デュアルユースの観点から、この技術と、配列情報の公開および遺伝子合成の受託合成のスクリーニングについての議論を引き続き行っていく必要がある。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表
 - ・「合成生物学とバイオセキュリティ」木賀大介. バイオエコノミーの現状 セミナー(シリーズ) 応用編 2022年2月21日
 - ・「合成生物学に期待される役割」木賀大介. 生命倫理学会 2021年11月28日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし