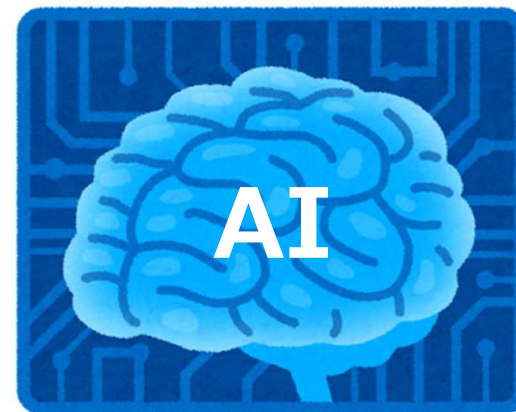


バイオリソースに関する安全保障輸出管理

～今、遺伝子実験に関して知っておきたいこと～

知らないと怖いこと



理化学研究所
バイオリソース研究センター
遺伝子材料開発室

三輪 佳宏

2024.5.10

バイオイメーjing研究



近赤外イメーjing



パルスオキシメーター



炎症

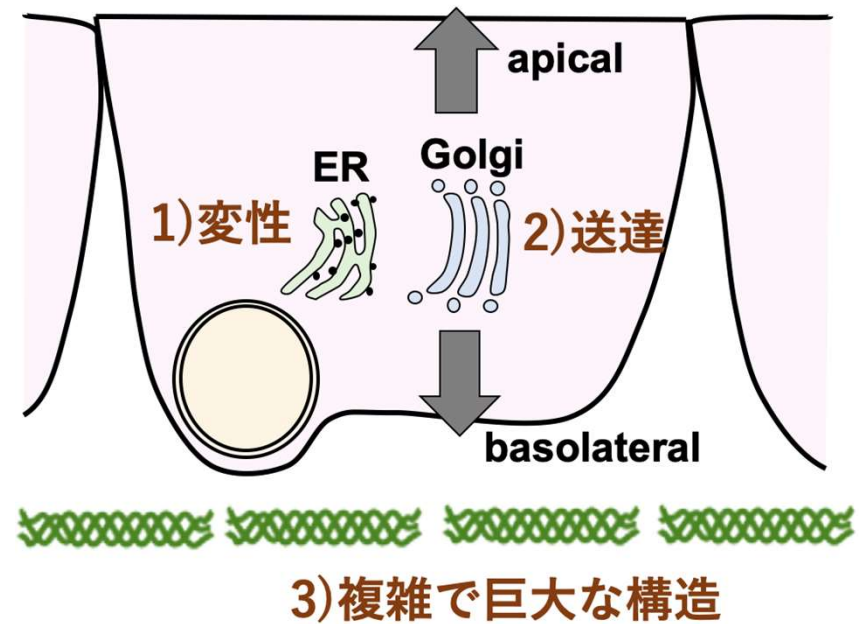
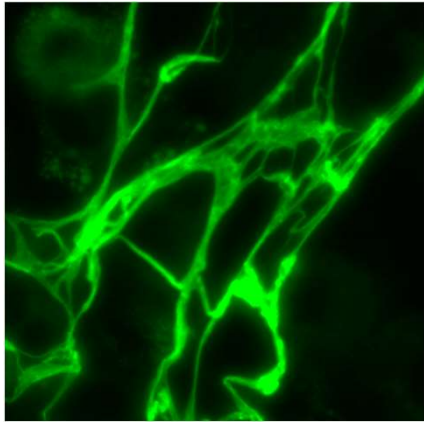
動脈硬化

線維症

細胞外イメージング技術



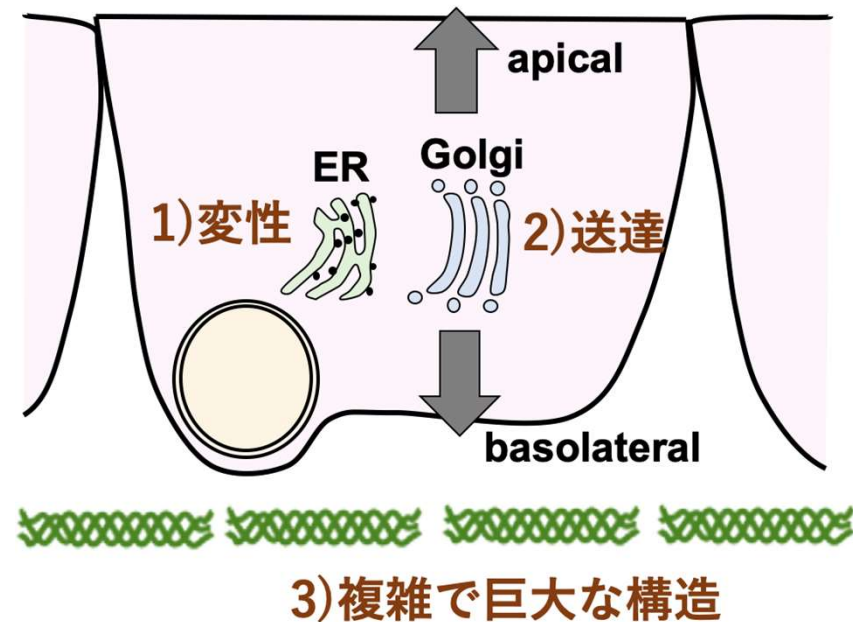
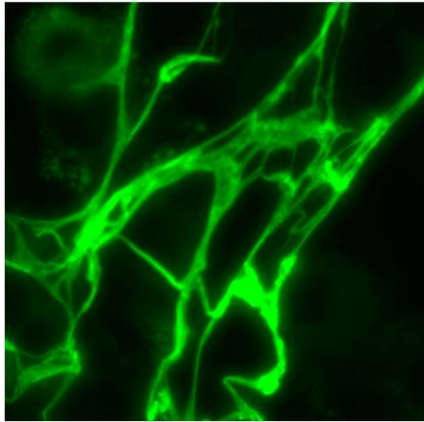
細胞外イメージング コラーゲンイメージング



細胞外イメージング技術



細胞外イメージング コラーゲンイメージング



学術変革領域研究A
「細胞外情報を統御する
マルチモーダルECM」

2023年～2028年
領域内限定サービス

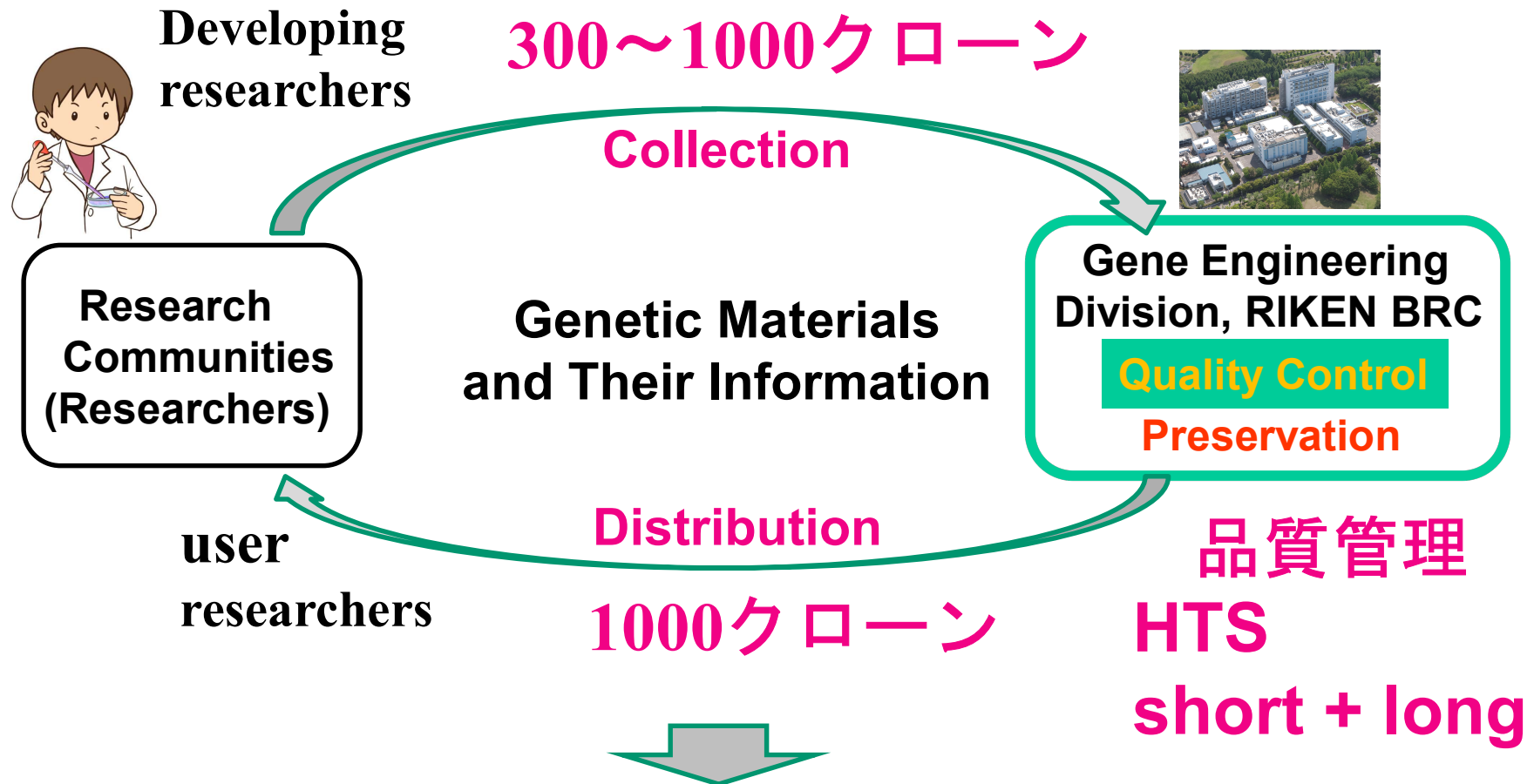


MULTIMODAL
ECM

理研バイオリソース研究センター遺伝子バンク

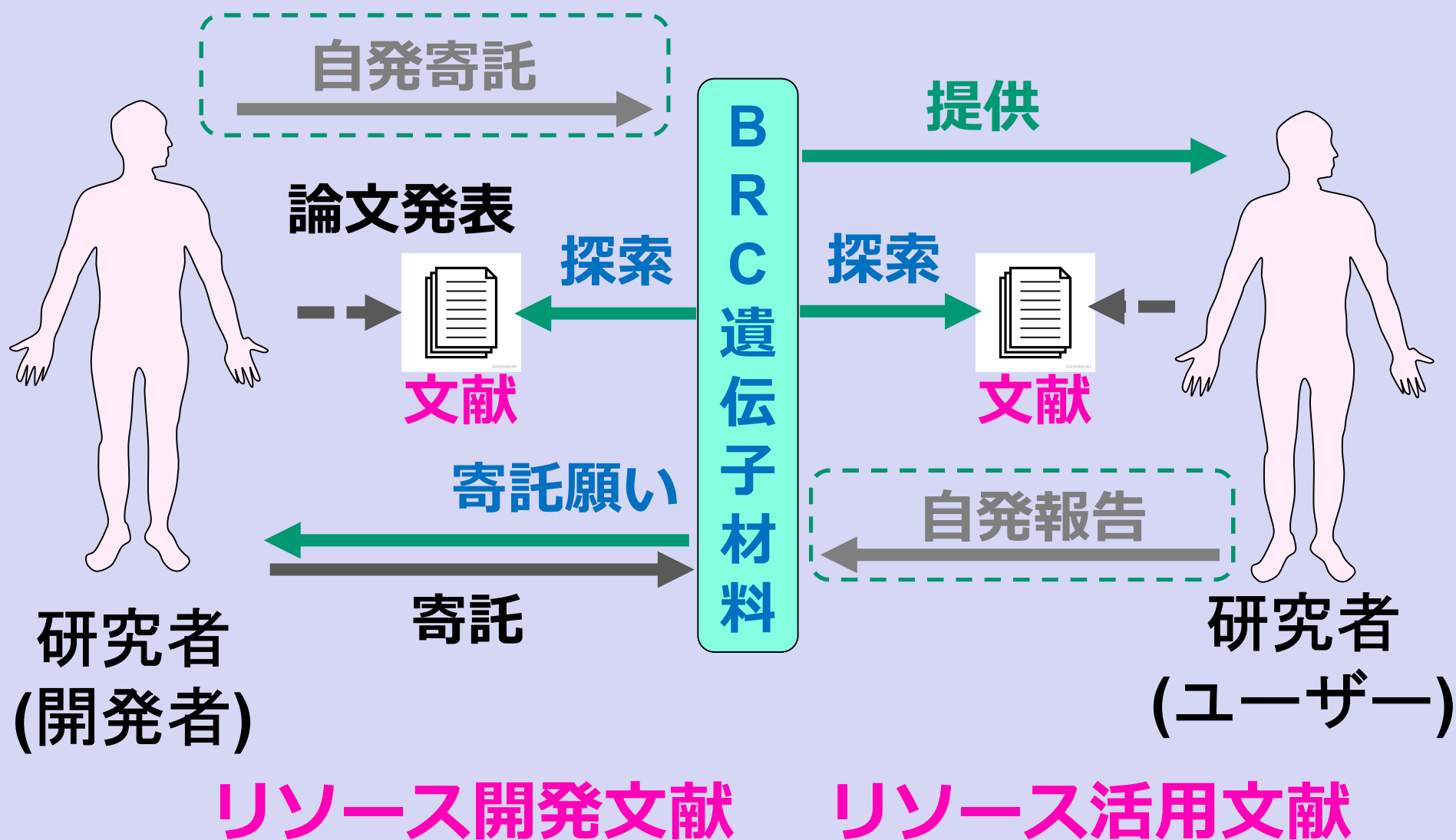


2020年～



イメージングツール・ゲノム編集・解析ツール
定年退職される先生の一括寄託

リソース業務において探索を要する2つの文献



機械学習によるAI開発



遺伝子材料を収集せよ



The First Take 冒頭50秒の研究室紹介

収集・保存・検査・提供をトータルに実行



遺伝子リソースにまつわる実験上の注意



輸出規制遺伝子とは？
安全保障貿易管理
事前に経産省の許可

The Australia Group

<https://www.dfat.gov.au/publications/minisite/thewallgroupnet/site/en/index.html>

Fighting the spread of chemical and
biological weapons
Strengthening global security

<https://www.mofa.go.jp/mofaj/gaiko/bwc/ag/gaiyo.html>

外務省 解説サイト

令和5年9月20日

核軍縮・不拡散

オーストラリア・グループ (AG : Australia Group) の概要

The Australia Group

Australia Group Participants

Argentina (1993)	Lithuania (2004)
Australia (1985)	Luxembourg (1985)
Austria (1989)	Malta (2004)
Belgium (1985)	Mexico (2013)
Bulgaria (2001)	Netherlands (1985)
Canada (1985)	New Zealand (1985)
Croatia (2007)	Norway (1986)
Czech Republic (1994)	Poland (1994)
Denmark (1985)	Portugal (1985)
Estonia (2004)	Republic of Cyprus (2000)
European Union (1985)	Republic of Korea (1996)
Finland (1991)	Republic of Turkey (2000)
France (1985)	Romania (1995)
Germany (1985)	Slovak Republic (1994)
Greece (1985)	Slovenia (2004)
Hungary (1993)	Spain (1985)
Iceland (1993)	Sweden (1991)
India (2018)	Switzerland (1987)
Ireland (1985)	Ukraine (2005)
Italy (1985)	United Kingdom (1985)
Japan (1985)	United States (1985)
Latvia (2004)	

Country	Date	Country	Date
 Argentina	1993	 Lithuania	2004
 Australia	1985	 Luxembourg	1985
			2004
			2013
			1985
			1985
			1986
			1994
			1985
			2000
			1996
			2000
			1995
			1994
			2004
			1985
			1991
			1987
			2005
			1985
			1985

42+EU

Fight
of ch
biolo
Strengt

化学兵
と闘う

グロー

1985

The Australia Group

Viruses

1. African horse sickness virus
2. African swine fever virus
3. Andes virus
4. Avian influenza virus^[2]
5. Bluetongue virus
6. Chapare virus
7. Chikungunya virus
8. Choclo virus
9. Classical swine fever virus (Hog cholera virus)
10. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus
11. Dobrava-Belgrade virus
12. Eastern equine encephalitis virus
13. Ebolavirus: all members of the Ebolavirus genus
14. Foot-and-mouth disease virus
15. Goatpox virus
16. Guanarito virus



経済産業省

安全保障貿易管理

Export Control

貨物等省令第2条の2	
項番	項目
貨物等省令第2条の2第1項	輸出令別表第1の3の2の項(1)の経済産業省令で定めるものは、次のいずれかに該当するものとする。
貨物等省令第2条の2第1項第一号	ウイルス(ワクチンを除く。)であって、 アフリカ馬疫ウイルス、 アフリカ豚熱ウイルス、 アンデアン・ポテト・ラテント・ウイルス、 アンデスウイルス、 エボラウイルス属の全てのウイルス、 黄熱ウイルス、 オムスク出血熱ウイルス、 オロポーチウイルス、 ガナリトウイルス、 キャサヌール森林病ウイルス、 牛疫ウイルス、 クリミア・コンゴ出血熱ウイルス、 口蹄疫ウイルス、 高病原性鳥インフルエンザウイルス(H5又はH7のH抗原を有するものに限る。)、 SARSコロナウイルス、 再構成1918年インフルエンザウイルス、 サビアウイルス、 サル痘ウイルス、 小反芻獣疫ウイルス、 シンノンブレウイルス、 水疱性口内炎ウイルス、 西部ウマ脳炎ウイルス、 セントルイス脳炎ウイルス、 ソウルウイルス

2019

Genetic Elements and Genetically-modified Organisms ^[1]:

Any genetically-modified organism which contains, or genetic element that codes for:

1. any gene or genes specific to any listed virus; or
2. any gene or genes specific to any listed bacterium ^[3] or fungus, and which
 - a. in itself or through its transcribed or translated products represents a significant hazard to human, animal or plant health, or
 - b. could endow or enhance pathogenicity^[4]; or
3. any listed toxins or their sub-units.

貨物等省令
第2条の2
1項
第六号

遺伝子を改変した生物(意図的な分子操作によって核酸の塩基配列を生成し、又は改変されたものを含む。)であって次のいずれかを有するもの又は遺伝要素(染色体、ゲノム、プラスミド、トランスポゾン、ベクター及び復元可能な核酸断片を有するもの)であって次のいずれかの塩基配列を有するもの

イ 第一号に該当する遺伝子

ロ 第二号又は前号に該当する遺伝子

健康に重大な危害を与えるもの(健康に重大な危害を与えるものを含む。)又は病原性を付与若しくは増強することができ

**2019年1月～2021年1月
VSV-G遺伝子 7カ国**

**2019年以前
「核酸の塩基配列のうち
病原性を発現させるもの」**

ー、〇ー
清型をもつ
の遺伝要素

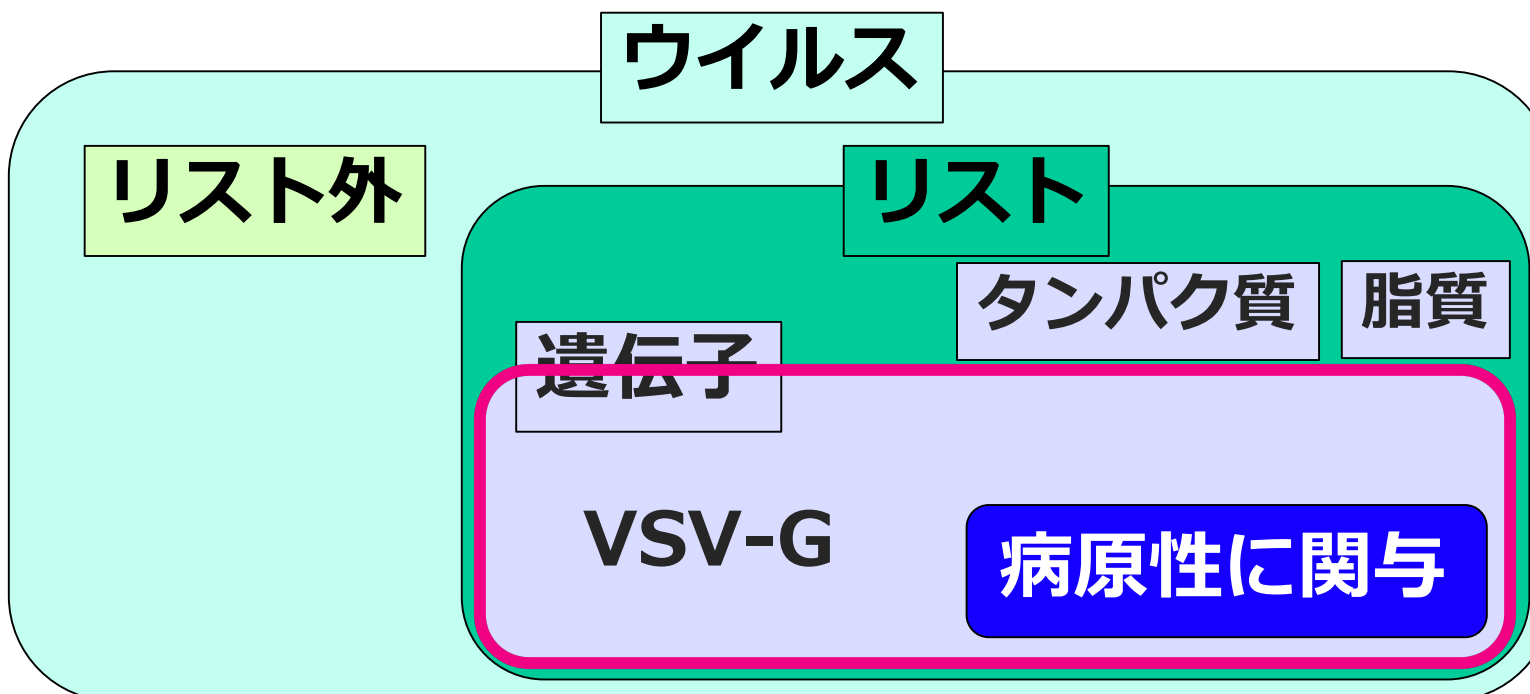
を持つものに限る。)を有するもの以外のものを除く。)

2019

Genetic Elements and Genetically-modified Organisms ^[1]:

Any genetically-modified organism which contains, or genetic element that codes for:

1. any gene or genes specific to any listed virus; or
2. any gene or genes specific to any listed bacterium ^[3] or fungus, and which
イ 第一号に該当する遺伝子 products represents a significant
 b. could endow or enhance pathogenicity^[4]; or
3. any listed toxins or their sub-units.

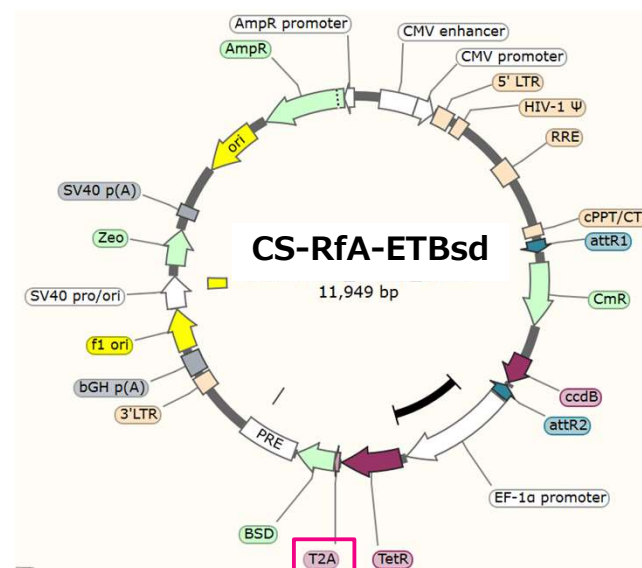
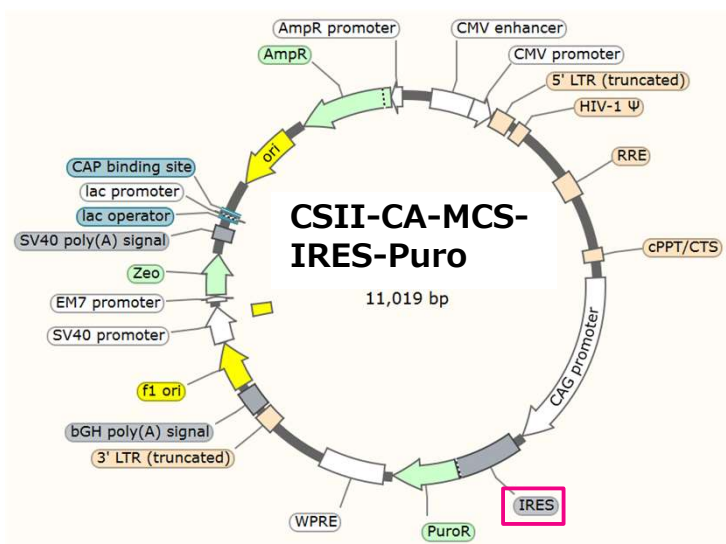


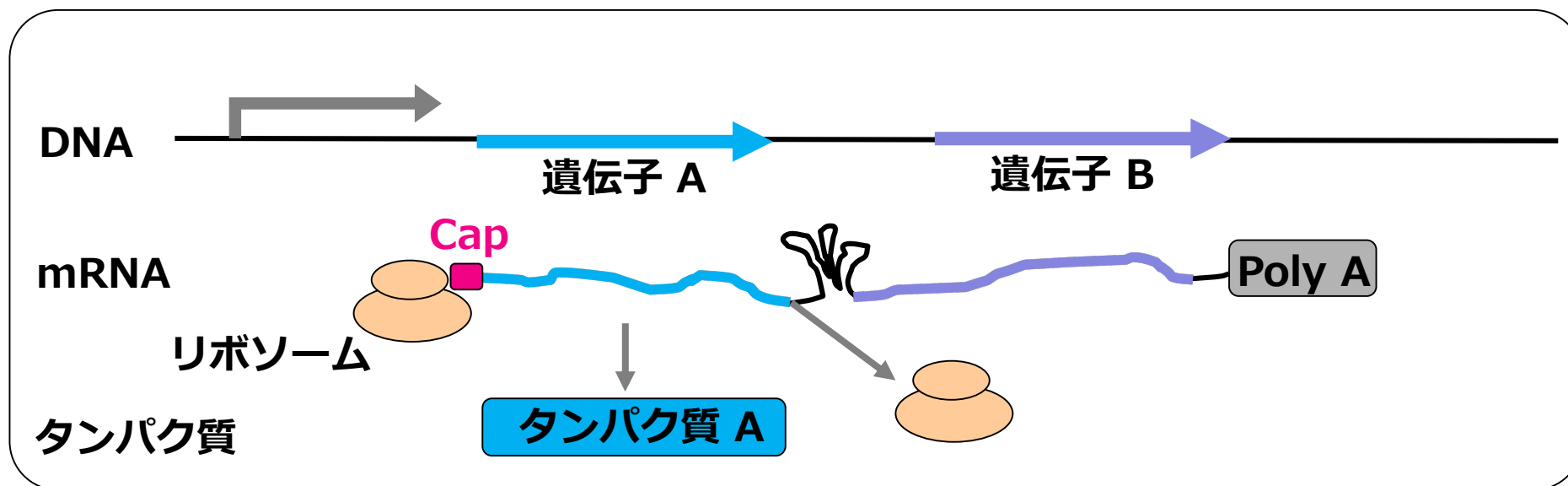
貨物等省令
第2条の2
1項
第六号

遺伝子を改変した生物(意図的な分子操作によって核酸の塩基配列を生成し、又は改変されたものを含む。)であって次のいずれかを有するもの又は遺伝要素(染色体、ゲノム、プラスミド、トランスポゾン、ベクター及び復元可能な核酸断片を含む不活性化された組織体を含む。)であって次のいずれかの塩基配列を有するもの

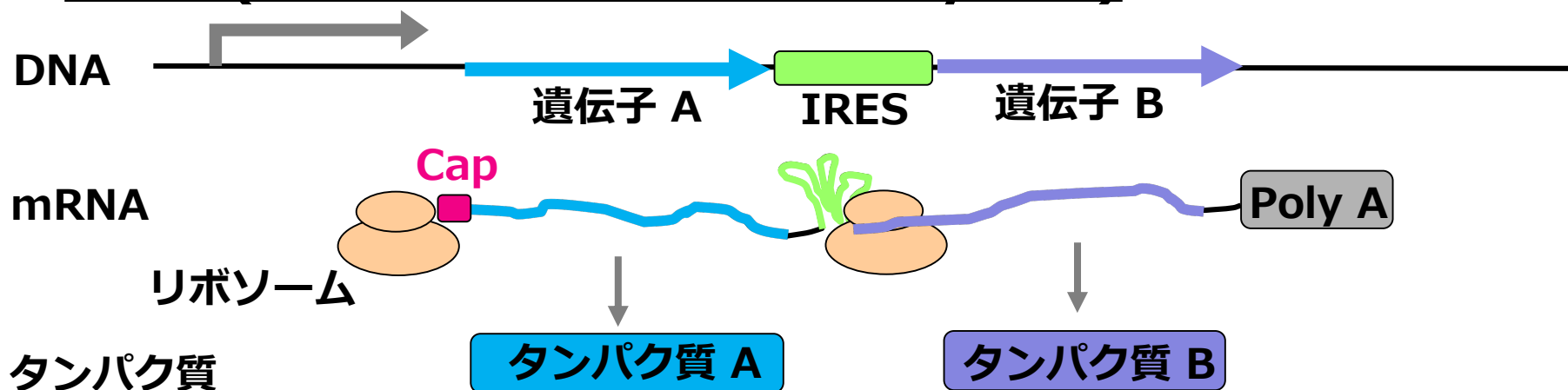
イ 第一号に該当する遺伝子

プラスミドの構成因子であるIRESと2Aは遺伝子？

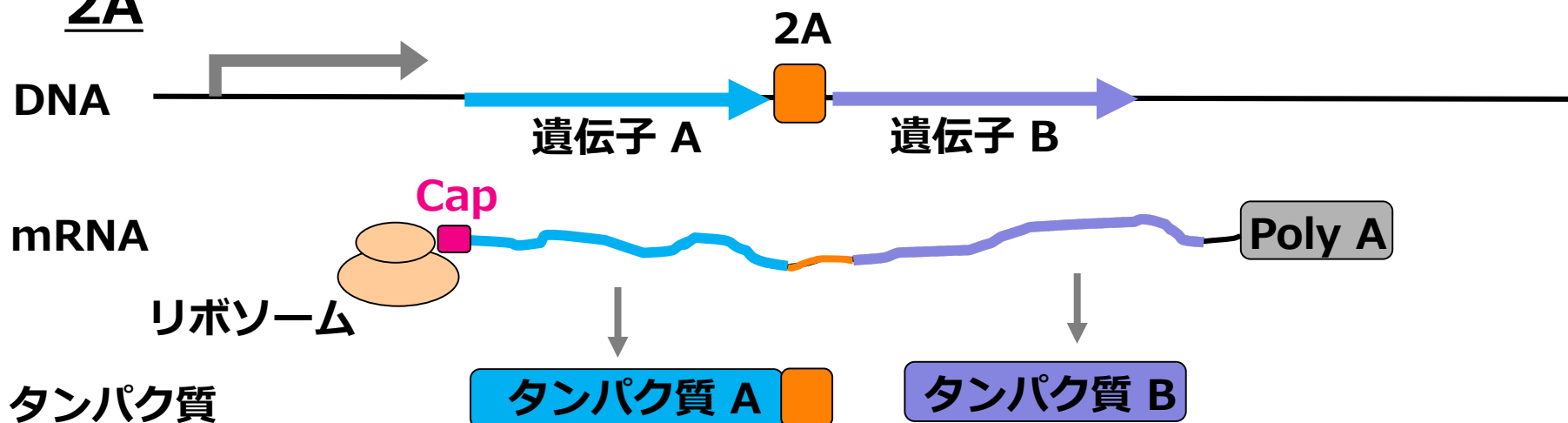




IRES (internal ribosomal entry site)



2A



貨物等省令
第2条の2
1項
第六号

遺伝子を改変した生物（意図的な分子操作によって核酸の塩基配列を生成し、又は改変されたものを含む。）であって次のいずれかを有するもの又は遺伝要素（染色体、ゲノム、プラスミド、トランスポゾン、ベクター及び復元可能な核酸断片を含む不活性化された組織体を含む。）であって次のいずれかの塩基配列を有するもの

イ 第一号に該当する遺伝子

IRESと2Aは遺伝子ではない

By 経済産業省

I2A	(GSG)	EGRGSLL TCGDVEENPGP
P2A	(GSG)	ATNFSLLKQAGDVEENPGP
E2A	(GSG)	QCTNYALLKLAGDVESNP GP
F2A	(GSG)	VKQTLNFDLLKLAGDVESNP GP

Inosea asigna

ブタデシオ

ウマ鼻炎A

口蹄疫

遺伝子リソースにまつわる実験上の注意



This item is currently unavailable outside the US without additional regulatory approval.

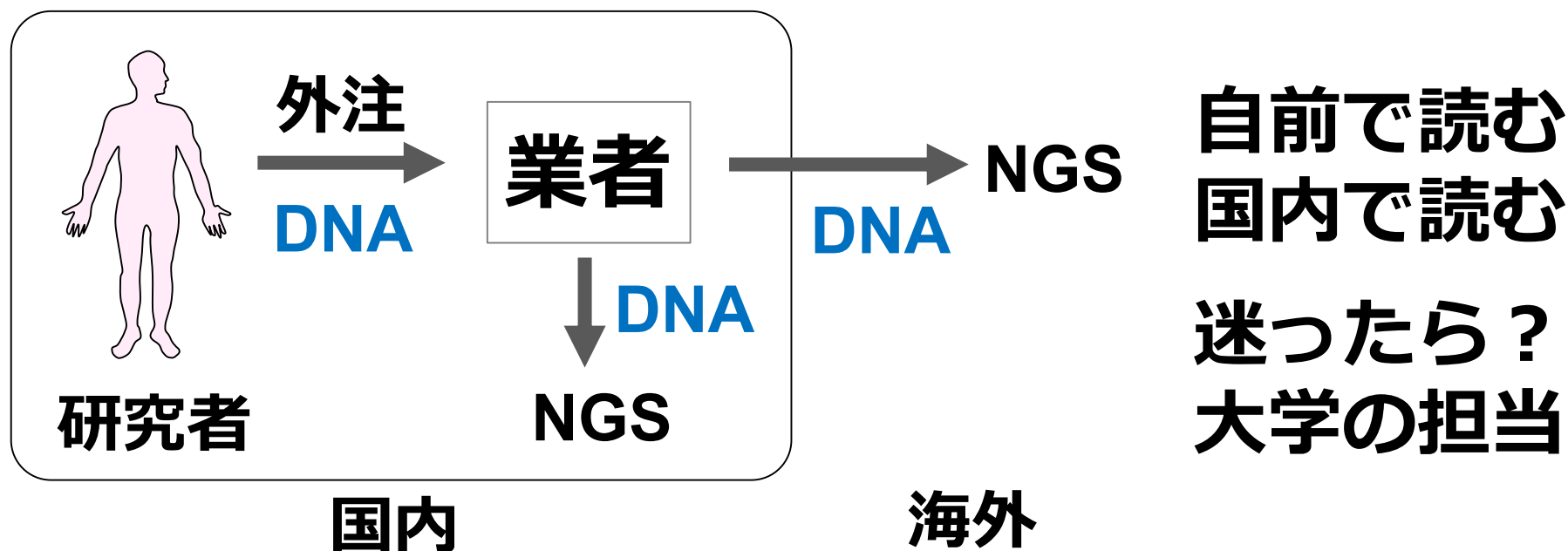
Addgene's export license service is currently in its early stages. At this time, only **VSV-G** and a subset of **SARS-CoV-1** plasmids are available outside of the U.S. under this service. As an international customer, you will be able to add these items to your cart and

47. Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus ?

遺伝子リソースにまつわる**実験上の注意**

次世代シーケンサー 外注
高い（国内） ↔ 安い（海外拠点）

研究者：**輸出規制？ 海外？**



全合成？

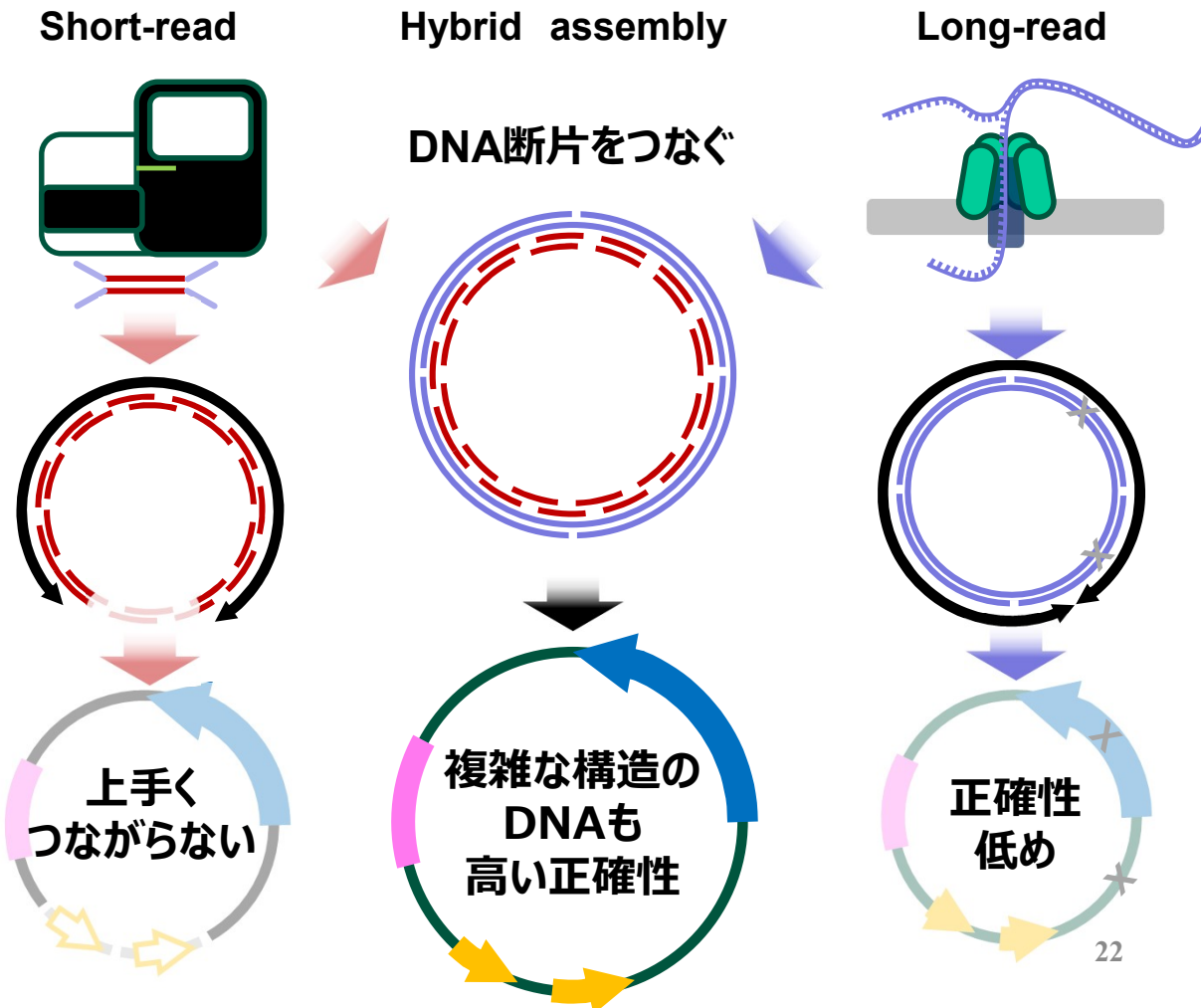
AGTCTGAGCCCTGGGGGTACCT
TTATATATAGGGGATCGCGCGAAT
GGAATCGCTCGATCGATCGAAAA
TTCCCGATCGATCGCGCGCATA
TATAGCGCATATCGTATCGCTAGC
TAGGCTTTTAGCTAGCTACCGGC
GGTGGAGGGCTCTGGGCTGGTAAG
CTATAGCTAGCTAGGGCTAGCTAG
CTGGGGGATGGCCCTAGGGGGGGC
GCGCGCGCCGCGAATAGCTATTA
TTTTTTTCGATCGATCAAAAAC
TCGATAGATAGACTAGATCC
ATAGGATAGGGCGCGCT

NCBI database

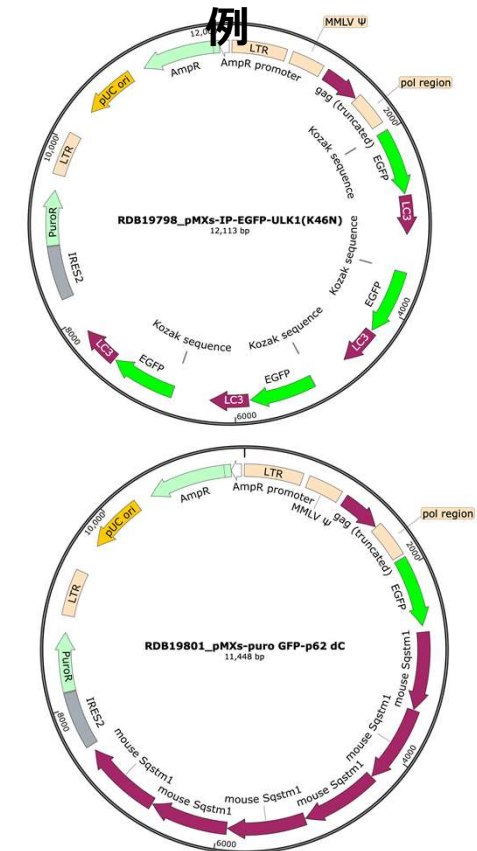
配列検査体制の強化



HTS（組合せ）を用いたDNA配列検査



Long readと組合せることで
繰り返し構造が解析できる



* short readのみの
addgeneでは正しく解析できて
22 いない

Gene expression vector : drug resistant genes

Drug	inhibition	activity
Neomycin	translation	kinase
Hygromycin	translation	kinase
Blastcidin S	translation	deaminase
Puromycin	translation	acetylation
Zeocin	DNA damage	binding

Puromycin-resistant gene(s?)



- 1 V E C P K D R A T W C M T R K P G A *
 ..TGCGAG tgcccgaaggaccgcgcg ACCTGGTGCATGACCCGCAAGCCCGGTGCCTGA
- 2 ..TGCGAG gtgcccgaaggaccgcgc ACCTGGTGCATGACCCGCAAGCCCGGTGCCTGA
 V E V P E G P R T W C M T R K P G A *

品質管理検査 2の配列しか出てこない

Puromycin-resistant gene(s?)

LOCUS	STMPAC	906 bp	DNA	linear	BCT 02-DEC-2016
REFERENCE	1 (bases 1 to 906)				
AUTHORS	Lacalle,R.A., Pulido,D., Vara,J., Zalacain,M. and Jimenez,A.				
TITLE	Molecular analysis of the pac gene encoding a puromycin N-acetyl transferase from Streptomyces alboniger				
	Gene 79 (2), 375-380 (1989)				
	2676728				
REFERENCE	2 (bases 1 to 906)				
AUTHORS	Jimenez,A.				
TITLE	Direct Submission				
JOURNAL	Submitted (17-MAR-1989) Antonio Jimenez, Centro de Biologia Molecular Severo Ochoa (CSIC/UAM), Universidad Autonoma de Madrid, Madrid, 28049, Spain				
COMMENT	GenBank staff is unable to verify source organism and sequence and/or annotation provided by the submitter.				
	On Apr 11, 1995 this sequence version replaced gi: 153397 .				

登録

修正

コピー

**2022年に
古い配列での
新規登録**



**間違いコピー
増殖中**

0. 誰かが間違えた
1. 自分で調べない
2. 無自覚なコピー

gtcgacatcg cggccgaacc ggctgtgagc ccctgggaca tcgccgccct ccagatcctc
cgggacg
cgccccc
tcacaag
acgacgt
gccacac
tcacgcg
cggtctg
gcatggc
cgccgca
accaggg
ccggggt
tcggctt
cccgcaa
cacgacc

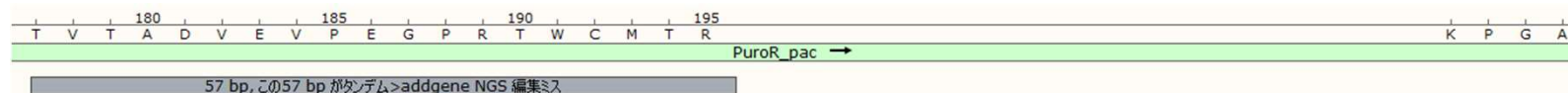
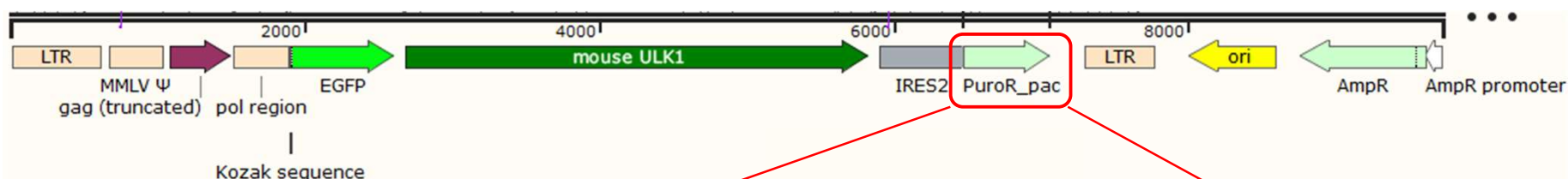
収集・検査・保存・提供を行う遺伝子バンク



Puromycin-resistant gene(s?)

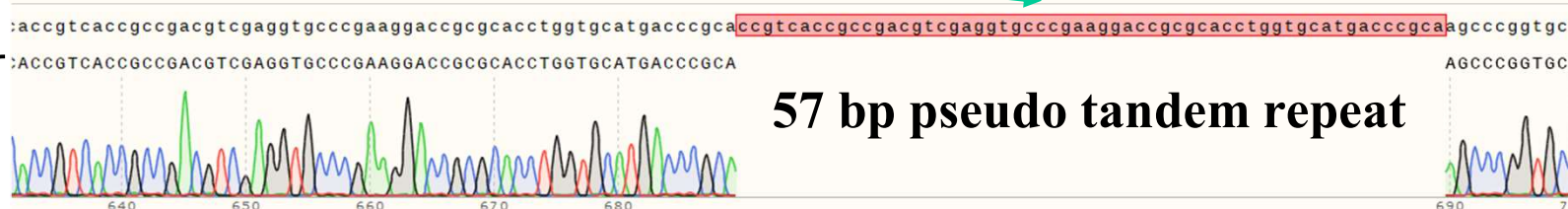
↻ addgene

NGS解析



addgene

取得配列



57 bp pseudo tandem repeat

Molecular Microbiology (1992) 6(22), 3385–3393

pUC oriがHigh copyになる原理(1992)

High copy number of the pUC plasmid results from a Rom/Rop-suppressible point mutation in RNA II

Sue Lin-Chao,^{1*} Wen-Tsuan Chen¹ and Ten-Tsao Wong^{1,2}

¹Institute of Molecular Biology, Academia Sinica, Nankang, Taipei, Taiwan 11529, Republic of China.

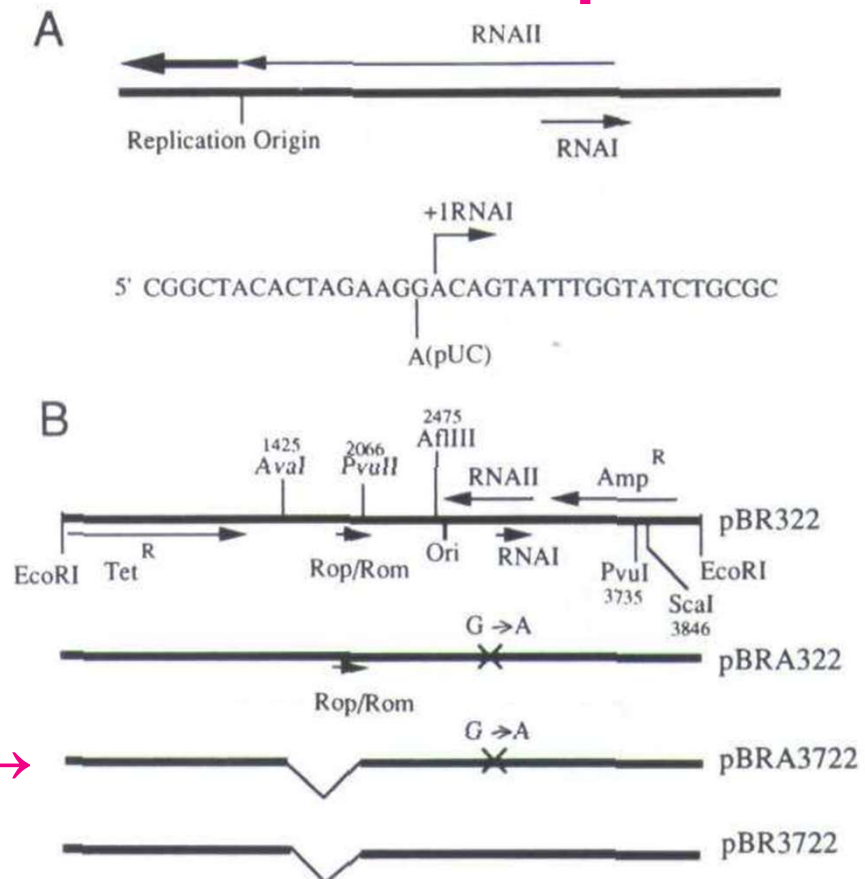
²Institute of Biochemistry, National Yang-Ming Medical College, Taipei, Taiwan 11221, Republic of China.

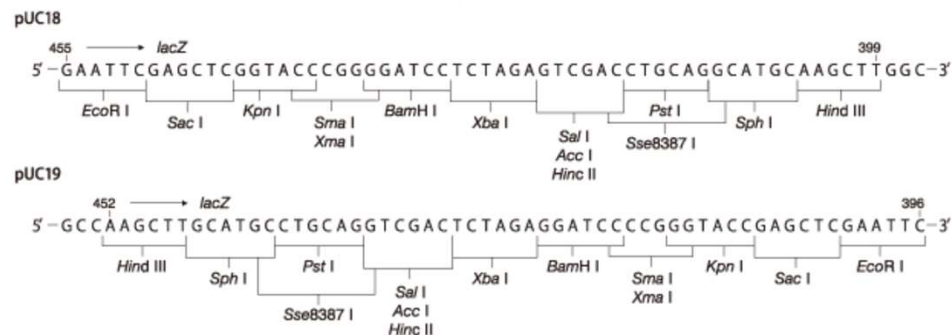
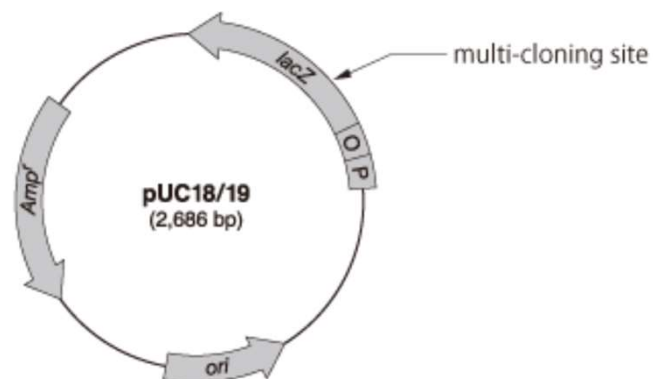
Recently it was reported that pUC plasmids contain a point mutation (Minton *et al.*, 1988) not found in the originally published pUC sequence (Yanisch-Perron *et al.*,

pUC ori内に点変異があることが報告(1988年)

pUC ori →

pBR ori

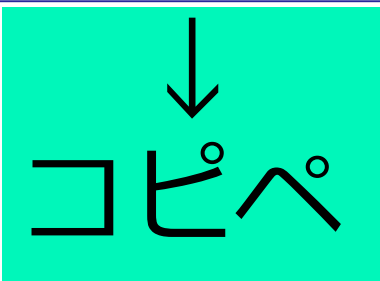




pUC18

Go to: ☒

LOCUS SYNPU18V 2686 bp DNA circular SYN 27-APR-1993
 DEFINITION pUC18 cloning vector.
 ACCESSION L08752
 VERSION L08752.1
 KEYWORDS .
 SOURCE synthetic construct
 ORGANISM [synthetic construct](#)
 other sequences; artificial sequences.
 REFERENCE 1 (sites)
 AUTHORS Norrander,J., Kempe,T. and Messing,J.
 TITLE Construction of improved M13 vectors using
 oligodeoxynucleotide-directed mutagenesis
 JOURNAL Gene 26 (1), 101-106 (1983)
 PUBMED [6323249](#)
 REFERENCE 2 (bases 1 to 2686)
 AUTHORS Gilbert,W.
 TITLE Obtained from VecBase 3.0
 JOURNAL Unpublished



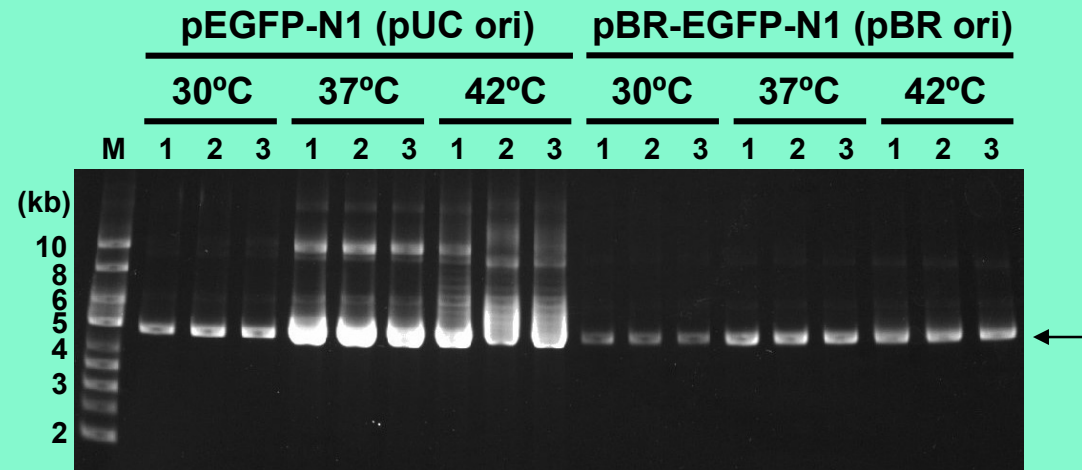
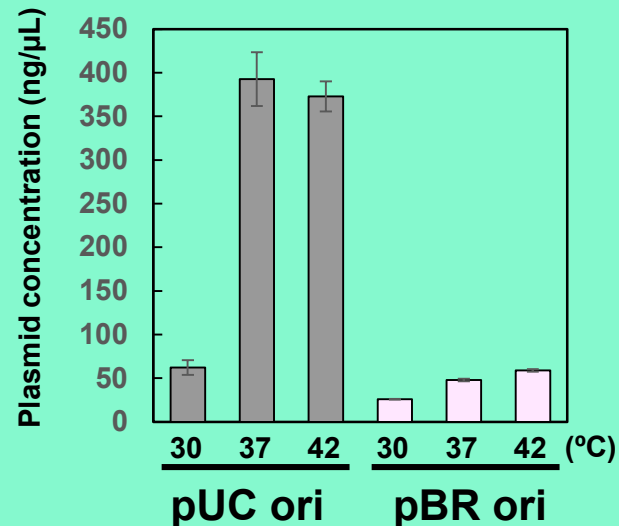
pUC19

Go to: ☒

LOCUS SYNPU19V 2686 bp DNA circular SYN 07-AUG-2008
 DEFINITION Cloning vector pUC19, complete sequence.
 ACCESSION M77789 M11662
 VERSION M77789.2
 KEYWORDS .
 SOURCE Cloning vector pUC19
 ORGANISM [Cloning vector pUC19](#)
 other sequences; artificial sequences; vectors.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 2686)
 AUTHORS Norrander,J., Kempe,T. and Messing,J.
 TITLE Construction of improved M13 vectors using
 oligodeoxynucleotide-directed mutagenesis
 JOURNAL Gene 26 (1), 101-106 (1983)
 PUBMED [6323249](#)
 REFERENCE 2 (bases 1 to 2686)
 AUTHORS Yanisch-Perron,C., Vieira,J. and Messing,J.
 TITLE Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide
 sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors
 JOURNAL Gene 33 (1), 103-119 (1985)
 PUBMED [2985470](#)
 REMARK Erratum: [Gene. 1992 May 1;114(1):81-3. PMID: 1375182]
 REFERENCE 3 (bases 1 to 2686)
 AUTHORS Messing,J.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (27-SEP-1991) Waksman Institute, Rutgers State Univ., 190
 Frelinghuysen Road, Piscataway, NJ 08854, USA
 REFERENCE 4 (bases 1 to 2686)
 AUTHORS Messing,J.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (12-JAN-2000) Waksman Institute, Rutgers State Univ., 190
 Frelinghuysen Road, Piscataway, NJ 08854, USA
 REMARK Sequence update by submitter
 COMMENT On Jan 12, 2000 this sequence version replaced [M77789.1](#).

わずか1塩基の違いで本当にコピー数が違うのか？

pUC ベクターに変異を導入しpBR ベクターに



pUC ori プラスミドの収量は、pBRと比較して
30°Cで2倍、37°Cで8倍、42°Cで6倍 であつた。

Gene expression vector

5 promoters

sv40 < CMV < SR α < EF1 α = CAG

EF1 α : human Elongation factor 1 α promoter

Dr. Shigekazu Nagata : pEF-BOS

CAG: CMV enhancer + chicken β -actin promoter

Dr. Niwa & Miyazaki : pCAGGS

EF1 α · CAG : ubiquitous, strong, Tg animals

CMV : strong shortly after transient transfection

EF1 α : human Elongation factor 1 α promoter

Dr. Shigekazu Nagata : pEF-BOS



13 bp

29 bp

• 4types of EF-1 alpha promoter

genome : [NC_000006.12](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_000006.12)

Type 1. genomic sequence

RDB18336 : pAY5 (mAID-EGFP-NLS piggyBac)

clones

1

Type 2. Dr. Nagata JBC paper

RDB18973 : pEF321-Flag-EX

11

Type 3. Dr. Nagata pEF-BOS plasmid

RDB07939 : pEF-BOS, pEF-BOS-EX

158

Type 4. lenti virus modified?

RDB17867 : CSII-EF-IRES2-Bsd

34

Gene expression vector

5 Drug resistant Genes

Neo, Hygro, Puro, Bsd (Zeo)

5 promoters

Sv40, CMV, EF1 α , CAG (SR α)

標準化できているものは一つもない

全合成？



NCBI database = 地雷原？

配列探偵

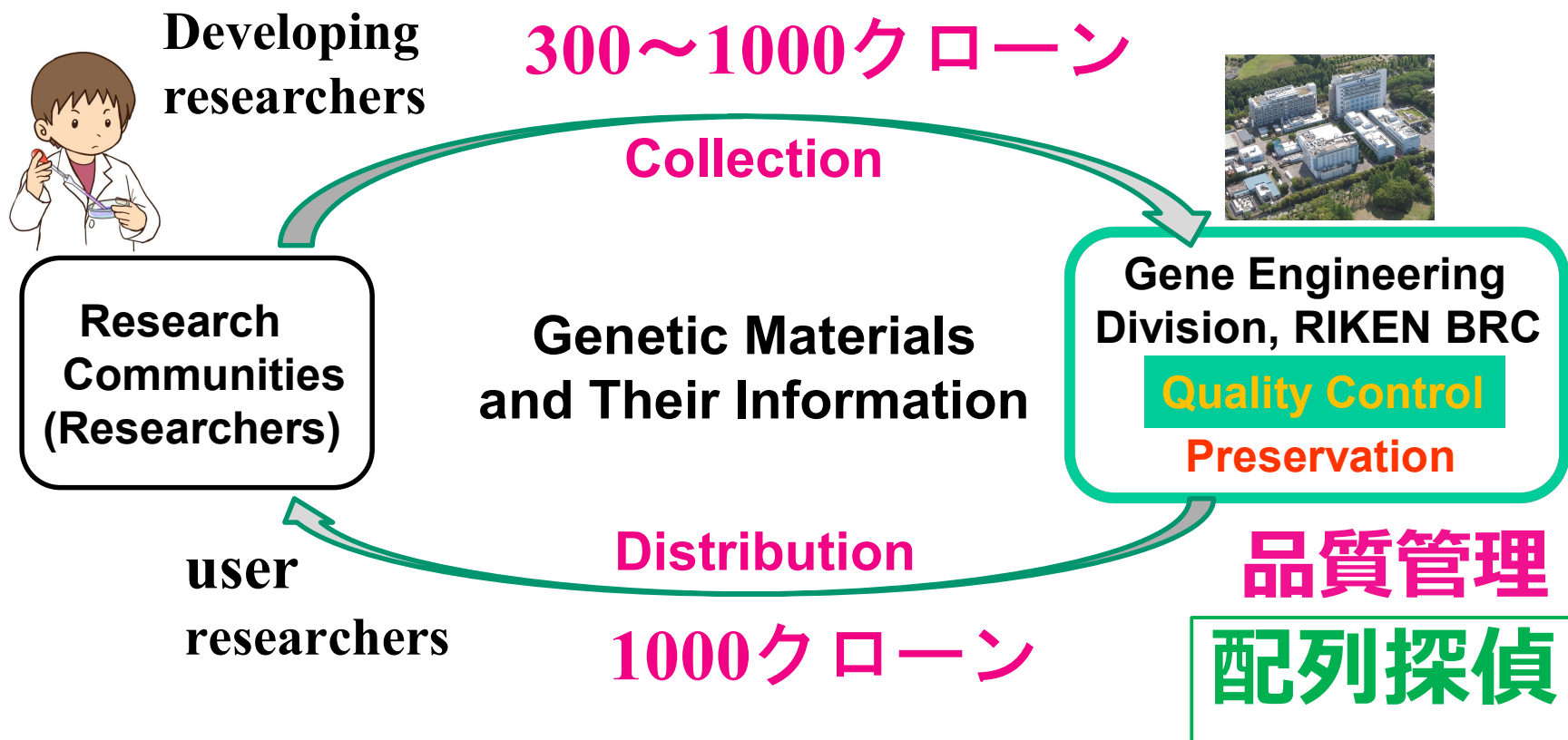


WEB・データ：リアル
事実に基づいたフィクション

理研バイオリソース研究センター遺伝子バンク



2020年～



データベースのエラー発見 ぜひご一報を！

実名・(仮名)可 ストーリー：応相談

他に注意すべき国際ルール



輸出規制遺伝子とは？

- ・ 安全保障貿易管理
- ・ ワシントン条約(希少生物)
- ・ EAR(再輸出 EAR99 変化)

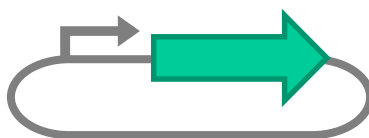
他に注意すべき国際ルール

ワシントン条約 (CITES) 25条



個体・標本: 個体の部分・派生物
 マーモセット
 アフリカミドリザル
 (Vero細胞)

合成DNA



輸出: ○ ? × ?

安全保障貿易管理

輸出: ×

他に注意すべき国際ルール



輸出規制遺伝子とは？

- ・ 安全保障貿易管理
- ・ ワシントン条約(希少生物)
- ・ EAR(再輸出 EAR99 変化)

Acknowledgements



遺伝子材料開発室

RIKEN BRC Gene Engineering Division

Acknowledgements



リアル配列探偵たち

RIKEN NEWS Spring2024

https://www.riken.jp/pr/closeup/2024/20240202_1/index.html



機械学習の進め方



教師データ作成

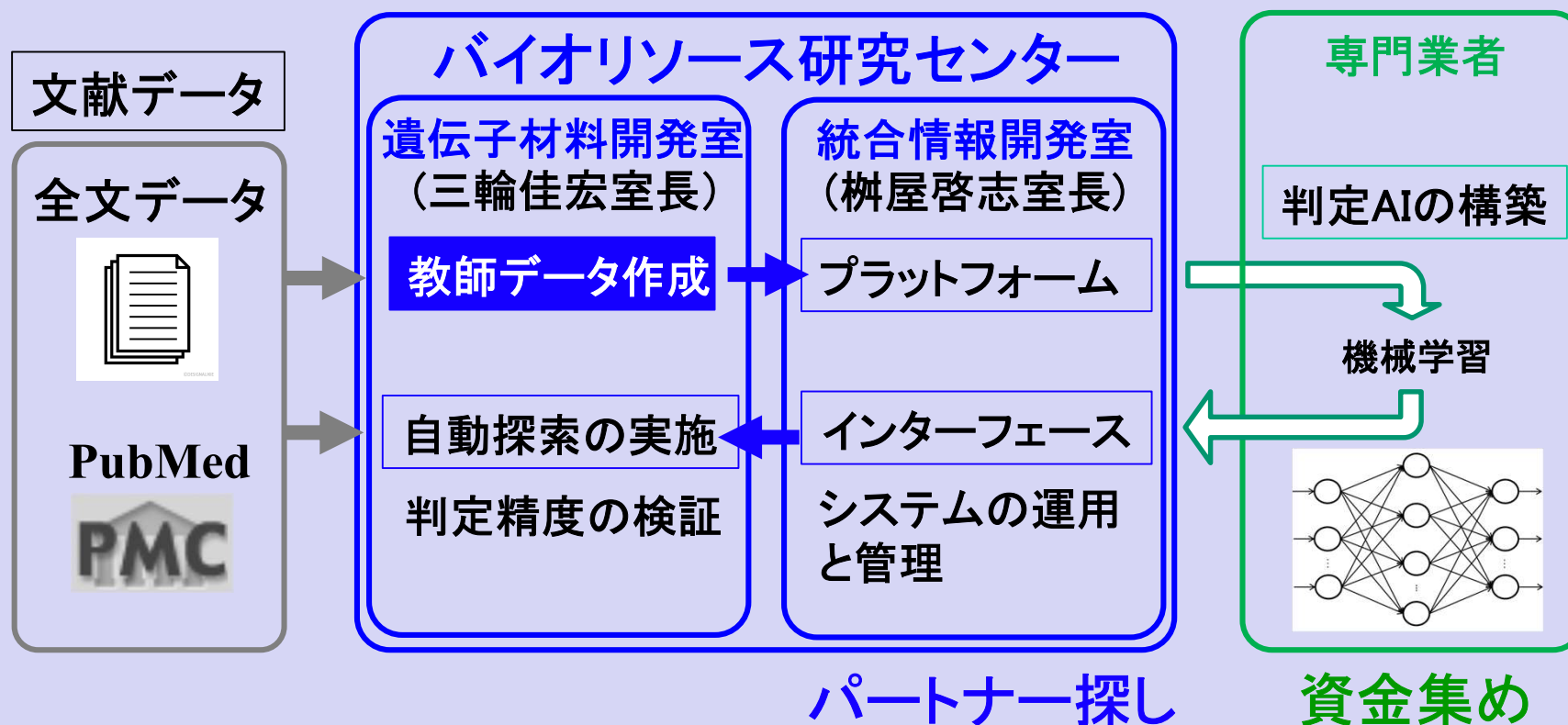
機械学習

モデル評価

実装

先行開発: リソース開発文献を自動抽出するシステムを構築

サイクルを回しながら開発を進める



経済産業省への問い合わせ とは？

調査・資料作成

オープンクエスチョン

～はどうですか？

～の定義はなんですか？

～についてどう判断しますか？

回答者

クローズドクエスチョン

質問者

Yesですか？ Noですか？（基本形）

遺伝子とみなさない、と判断してOK？

根拠は？ 前例は？ 説明は？

わかりやすく明快なあらゆる資料 提出

質問状 丁寧にわかりやすく矛盾なく回答

NHK クローズアップ現代 2022年11月16日(水) 無実の逮捕なぜ～狙われた中小企業 300日の記録～



噴霧乾燥機

生物兵器作成に
転用可能と判断

[原文\(英語\)を見る](#)

2. Fermenters

designed to be sterilized or disinfected in situ
滅菌 殺菌(薬液)