

平成18年8月4日

新潟地方裁判所高田支部 御中

隔離圃場栽培実験に用いた組換えイネ5系統7種のディフェンシン生成の確認

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構

中央農業総合研究センター

研究管理監 田中宥司



本実験は、既提出の黒田実験（乙第 25 号証）に用いた系統AD77がカラシナ・ディフェンシンを生成していることを確認したものである。なお、他の4系統6種についてもカラシナ・ディフェンシンを生成していることを確認した。

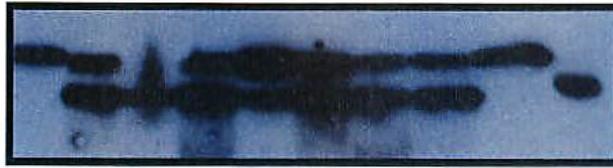
## 〔方法〕

実験に供試したAD77を含む5系統7種の組換えイネは、隔離温室で育成したもので、既提出の黒田実験（乙第 25 号証）に供試したものと同一のものである。各試料である組換えイネあるいは陰性コントロールの「どんとこい」の葉身 0.5 g を秤量し、鉢に入れ、液体窒素で凍結し粉碎した。乳鉢に溶解バッファー（0.1 M Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 7.5）1 ml を加え、よく磨りつぶした。ペースト状になったところで、1.5 ml の遠心チューブに全量回収し、15,000 rpm で 1 時間遠心分離する。上清（注 1）を回収し、分析の支障となる高分子成分を還元させるため、マイクロコン YM-30（日本ミリポア；分画分子量 30,000）を通過させた。得られた通過画分はさらにマイクロコン YM-3（日本ミリポア；分画分子量 3,000）で 175  $\mu$ l まで濃縮した。濃縮サンプルの 20  $\mu$ l をそれぞれ SDS-ポリアクリルゲル電気泳動にかけ、ディフェンシンの有無を確認した。

（注 1） 得られた可溶性タンパク質の容量はいずれも 約 700  $\mu$ l であった。

## 〔結果と考察〕

結果は、図 1 に示すとおり、黒田実験に用いた系統AD77を含め実験対象としたすべての系統において、カラシナ・ディフェンシンの生成を確認した。なお、ディフェンシンとその上のバンド（分子量約 1 万）が認められるが、このバンドはネガティブコントロールにも認められるので、本来、元品種に抗体と反応する蛋白質が存在するものであると考えられ、このデータの評価には支障がないものである。



上段：どんとこいが本来的に  
有しているタンパク質  
下段：ディフェンシン

レーン： 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

図1. カラシナ・ディフェンシンの生成

レーン1：どんとこい（非組換え体）	レーン2：AD4131
レーン3：AD4142	レーン4：AD4811
レーン5：AD5141	レーン6：AD7763
レーン7：AD9721	レーン8：AD9742
レーン9：どんとこい（非組換え体）	レーン10:ディフェンシン 50ng