

# 陳述書 (3)

生井 兵治

私は、本 GM イネの野外実験について、これまで、陳述書 (甲 15 号証) 陳述書(2) (甲 33 号証) を作成した者です。

今回、被告の北陸研究センターは、準備書面(2)で、ディフェンシンは細胞壁と電氣的に強く結合する等を理由として、そもそもディフェンシンがイネの外部に出る可能性は一切存在しないと主張され、その論拠として、乙 18 号証の黒田秧氏の意見書を引用しておりますが (10 頁) しかし、その見解には様々な問題がありますので、以下に、科学的な見地からそれを明らかにしたいと思います。

## 目 次

- 1、電氣的結合に関する被告の主張
- 2、反論 1 実証例
- 3、反論 2 生物における一般的な結合と解離のあり方
- 4、反論 3 イオン交換の原理
- 5、反論 4 被告主張の矛盾 (背理法)
- 6、結合しないディフェンシンまたは解離したディフェンシンの外部流出について
- 7、被告が実施した検証実験に関する乙 18 号証 (黒田意見書) に対する論評

### 1、電氣的結合に関する被告の主張

ディフェンシンと細胞壁とが電氣的に結合するかどうかに関する被告の主張は、次のように要約できます。

「ディフェンシンは細胞壁を通過して、ほかに移動することはない。なぜなら、プラスの電気を帯びたディフェンシンは、細胞膜を通過後、直ちにマイナスの電気を帯びた細胞壁とイオンの強に強く結合したまま細胞壁から解離しないからである」(被告準備書面(2)挿入別紙 2 1 ~ 3 行目。乙 18 号証の黒田意見書 1 頁下から 10 行目以下参照)。

或る物同士が結合してもそのあと再び解離する現象のことを可逆的結合といますが、それによれば、上記被告主張の骨子は、次のように言い換えることができます。

「ディフェンシンと細胞壁とのイオン結合は不可逆的である」  
では、果して、このようなことが成立するのでしょうか。

## 2、反論 1 実証例

まず第 1 に、これは明らかに事実に反します。なぜなら、プラスに荷電している（カラシナ・ディフェンシンと同じアブラナ科の）ダイコンのディフェンシンについて、既に、これが植物体外に出たことを実証した報告があるからです（その抜粋が別紙 1）。これは、「植物ディフェンシン」(plant defensin) という用語を最初に提案した重要な論文であり、これが今日の植物ディフェンシンの原点となっているばかりでなく、被告の本 GM イネの研究者たち自身も彼らの論文中にこの論文を引用しているものです（甲 3 号証 234 頁の文献 4）。

以下が、この論文の骨子（裁判に関係する部分だけですが）です。

掲載雑誌：The Plant Cell. 7: 573-588 (1995).

論文課題：Small cysteine-rich antifungal proteins from radish: their role in host defense. (ダイコンから得られたシステインを多く含み抗菌性を有する小タンパク質：宿主の防御におけるそれらの役割)

著者：Terras FR, Eggermont K, Kovaleva V, Raikhel NV, Osborn RW, Kester A, Rees SB, Torrekens S, Van Leuven F, Vanderleyden J, Cammue, BPA; and Broekaert, WF

所属：F.A. Janssens Laboratory of Genetics, Katholieke Universiteit Leuven, Heverlee, Belgium.

重要な骨子：ダイコン抗菌タンパク質（Rs-AFPs）は種子内の種々の組織の細胞壁に存在し、とくに子葉の表皮組織の細胞壁の外側の表層に多くみられます。そして、発芽の過程で種皮が破けてはずれると、Rs-AFPs は優先的に滲み出します。このことは、人工的に種皮を破いた種子を 1 粒ずつ水に浸け、この浸漬液に含まれるタンパク質については、浸漬液を SDS ポリアクリルゲル電気泳動に 30 分間かけてから、抗体を用いた微量タンパク質検出法（イムノプロット法）によって検出すると、抗菌タンパク質が明瞭に検出できたことによって証明されたのです。そして、滲み出した相当量の Rs-AFPs は、発芽種子の周囲における菌類の増殖を抑制することが実証されました。また、これらの Rs-AFPs は、菌類が最初に付着した部位で産生される細胞外種子タンパク質であり、菌類の付着部位は種子のさまざまな器官の外側表面または細胞間隙の表面です。なお、抗菌タンパク質は、

健全な本葉でも少しは産生されていますが、菌類が接種された本葉では計画的に大量に産生されることも実証されており、この本葉の抗菌タンパク質も抗菌種子タンパク質と同じ Rs-AFPs であることが分かっています。そこで、著者らは、これら Rs-AFPs のような植物における抗菌タンパク質を、plant defensin(s) (植物ディフェンシン) と呼ぶことを提案しました。

つまり、ダイコンのディフェンシンはダイコンの発芽種子の外に滲み出し、種子の周囲における菌類の増殖を抑制することが実証されたのです。この実験により、「プラスに荷電しているディフェンシンが細胞壁と電気的に結合したまま、解離することはない」という被告の主張が成立しないことが明らかです。

### 3、反論2 生物における一般的な結合と解離のあり方

(1)、また、被告の主張は、生物における一般的な結合と解離のあり方からしても明らかにおかしいのです。なぜなら、生物における一般的な結合のタイプとして、

- ・ 共有的結合<sup>1</sup>
- ・ 非共有的結合

という2つのタイプがあり、後者はさらに、

- (a)、イオン結合<sup>2</sup>
- (b)、水素結合<sup>3</sup>
- (c)、ファン・デル・ワールス引力<sup>4</sup>

などがありますが、別紙参考文献1<sup>5</sup>の57頁表2-2にある通り、水溶液中では、共有結合がイオン結合などの非共有結合に比べ、30~900倍も強いのです。すなわち、

《非共有結合的な相互作用は、通常、静電的なものであり、強力な共有結合とは異なり、個々の非共有結合的相互作用は相対的に弱いので容易に切断される》

---

<sup>1</sup> 水〔H<sub>2</sub>O〕のように原子同士が電子を共有しあう

<sup>2</sup> 食塩〔NaCl〕のように、電子を失った原子〔Na<sup>+</sup>〕と電子を獲得した原子〔Cl<sup>-</sup>〕の間に生じる結合

<sup>3</sup> 水素原子は原子核(陽子)のまわりに1個の電子しかなく、他の電気陰性度の大きい原子(窒素N、酸素O、フッ素Fなど)との化学結合にその電子を使うと、その電子は相手原子に引き寄せられ、自身は陽に帯電した裸の原子核だけになりやすく、近くに陰性の強い別の原子があると、これと引き合って弱いながらも結合を作ること

<sup>4</sup> 原子核の回りを回る電子の位置が瞬間ごとにちがうため、1つの分子の中の電子のマイナスと隣の分子の中の原子核のプラスが引き合うことがあり、その総和を言う

<sup>5</sup> 別紙参考文献1：Bruce Albertsら「細胞の分子生物学」第4版2004年発行。

(別紙参考文献 2<sup>6</sup>59 頁。3.2 非共有結合 1 行目以下)

のです。そして、本件のディフェンシンと細胞壁との結合は非共有結合の典型例であるイオン結合です(乙 18 号証の黒田意見書 1 頁下から 7 行目)から、この結合は《強力な共有結合とは異なり、相対的に弱いので容易に切断される》からです。

つまり、本ディフェンシンと細胞壁との結合であるイオン結合は可逆的な結合であり、これによって、生物体内における分子間の離合集散の可変性と動的性格が担保されているのです(別紙参考文献 2。59 頁 3.2 非共有結合 7 ~ 8 行目参照)。

(2)、もっとも、別紙参考文献 2 で明らかにしている通り、《弱い相互作用が多数集まったときの効果はかなり大きい》(3.2 非共有結合 4 行目)ことがあるので、念のため、この場合について検討しておきます。非共有結合であっても、強い結合が認められる例として、

- ・ 抗原抗体結合<sup>7</sup>
- ・ 基質と酵素の結合<sup>8</sup>
- ・ レセプターとリガンド(ホルモンなど)の結合<sup>9</sup>

などがあります。ただし、そのような強固な結合が認められるためには、

ア． カギとカギ穴の関係のように、一方の特定の部位が他方の相補的なくぼみにはまるという分子の立体構造に依拠した特異的な結合が必要であり(別紙参考文献 1 の 1380 頁 Fig.24-28 参照)

イ． イオン結合、水素結合、ファン・デル・ワールス引力を含む多数の非共有結合の総和が必要(別紙参考文献 1 の 1380 頁 5 行目以下参照)

とされます。

しかし、被告から、本件ディフェンシンと細胞壁との相互作用について、このような特異的な結合を示す事実関係は何ひとつまったく明らかにされていません。つまり、本件ディフェンシンと細胞壁との結合は、たとえそれが成立する場合でも、特異的なものではなく、正電荷の物質と負電荷の物質との間にたまたま存在する「非特異的な」結合と考えるべきものです。非特異的な結合は、生物体内で

---

<sup>6</sup> 別紙参考文献 2 : Trudy McKee ら「マッキー生化学」2003 年発行。

<sup>7</sup> 免疫を発動させる物質である抗原に、抗原の刺激により産出されるタンパク質である抗体が結合すること。

<sup>8</sup> 酵素によって化学反応を触媒される物質である基質に、酵素が結合すること。

<sup>9</sup> レセプターは受容体ともいい、外界や体内からの刺激を受けとる分子やその複合体のこと。リガンドは受容体と結合する能力をもつ物質(ホルモンなど)のこと。

の秩序の形成や情報伝達に関わるものではないため、その結合力も強固なものではありません。

もっとも、百歩譲って仮に本件 GM イネについて特異的結合を示す事実関係が明らかにされたとしても、しかし、この強固な結合は《可逆的であり》(別紙参考文献 1 の 1380 頁 5 行目) ます。上記の抗原抗体結合、酵素と基質の結合、レセプターとリガンドの結合はいずれも特異的結合ではあっても、あくまでも結合と解離のバランス(平衡)の上に成立しており、結合が恒久的に維持されるものではありません。それゆえ、特異的な結合を証明したからといって解離の可能性を否定することはできないのです。

#### 4、反論3 イオン交換の原理

さらに、実は、本件では、本ディフェンシンが細胞壁から解離しないかどうかを問う前に、そもそも、本ディフェンシンが細胞壁と結合できるのかが問題となります。

以下、このことを、「イオン交換の原理」から明らかにしたいと思います。

##### (1)、イオン交換クロマトグラフィーの原理

多くのタンパク質の混合物を分離する手法のひとつとしてイオン交換クロマトグラフィーというものがあります。これは、イオン結合で働く静電相互作用を利用したもので、別紙参考文献 3<sup>10</sup>の図 2 の通り、

- ・ まず、正または負に荷電した固定相(図 2 では正に荷電)が入ったカラムに、タンパク質の化合物(移動相という)を流し込む。その結果、固定相と反対の極に荷電した(図 2 では負)タンパク質が固定相と結合し、それ以外のタンパク質は結合しないままカラムから溶出する(図 2 の )。
- ・ 次に、塩(NaCl)を少しずつ移動相に加える。塩の濃度が低いときでも、固定相と結合力の弱いタンパク質はイオンと置換(交換)し、固定相から解離して、カラムから溶出する(図 2 の )。
- ・ さらに、塩を加え続け、塩の濃度を上げていくと、固定相と結合力の強いタンパク質も、弱い順にイオンと置換(交換)し、固定相から解離してカラムから溶出する(図 2 の )。

つまり、溶液の食塩(Na<sup>+</sup>、Cl<sup>-</sup>イオン)を加えることにより、《Cl<sup>-</sup>はたんぱく

---

<sup>10</sup> 別紙参考文献 3 : 江崎信芳ら「生化学 基礎の基礎」2002 年発行。

質とカラム上の正電荷をめぐって競合する》(別紙参考文献4<sup>11</sup>。62頁)関係に立つことを利用してタンパク質とイオンを交換し、その結果、特定の荷電状態にあるタンパク質を分離するのです。

なぜイオン交換クロマトグラフィーを問題にするかといいますと、それは、本質的にはこれと全く同じ状況が、本 GM イネの細胞壁においても生じているからです。すなわち、イネの細胞壁の周りには、乙 18 号証の黒田意見書添付の引用参考文献 1 の表 1 - 1〔導管液〕及び表 8〔師管液〕にも指摘されている通り、細胞外液中に  $K^+$ 、 $Na^+$ 、 $Ca^{2+}$  イオンなど(ここでは以下、金属イオンと呼びます)が存在し、どちらが負に荷電した細胞壁と結合するかをめぐって、これら正に荷電した金属イオンと正に荷電したディフェンシンとが競合関係に立つからです(参考までに、その対応関係を表にすれば以下の通りです)。

イオン交換クロマトグラフィー	本 GM イネ
正または負に荷電した固定相	負に荷電した細胞壁
正または負に荷電したタンパク質	正に荷電したディフェンシン
$Na^+$ 、 $Cl^-$ イオン	$K^+$ 、 $Na^+$ 、 $Ca^{2+}$ イオン

(2)、(1)から導かれる帰結

( )、では、この競合関係はどのようにして勝負が決められるでしょうか。一般にそれは、一方で、 $K^+$ 、 $Na^+$ 、 $Ca^{2+}$  イオンなどの金属イオンとタンパク質との存在量(濃度)のちがいにより、他方で、タンパク質の全体の電荷の状態<sup>12</sup>により決まります。たとえば、金属イオンの濃度がタンパク質の濃度に比べ相当程度高ければ、数に勝る金属イオンがタンパク質との競合に勝ち、細胞壁に結合するか、たとえタンパク質が先に細胞壁に結合していたとしても金属イオンにより追い出されてしまいます(別紙参考文献 3 の図 2 の 参照)。

そこで、この状況に対抗して、タンパク質が金属イオンとの競合に勝って細胞壁に結合するためには、或いは既に結合していた細胞壁から解離されないためには、タンパク質の電荷の状態が金属イオンとの濃度差を打ち消すほどに大きなものであることが必要です。

( )、ところで、イネの体内の金属イオン濃度は、乙 18 号証の黒田意見書も《い

<sup>11</sup> 別紙参考文献 4 : B.D.Hames ら「生化学キーノート」2002 年発行。

<sup>12</sup> 「タンパク質の全体の電荷」というのは、タンパク質は多数のアミノ酸の鎖でできているため、その電荷の状態も、各アミノ酸の側鎖の荷電状態(例えば、グルタミン酸なら負、アルギニンなら正、アスパラギンなら中性)の総和で決まるからである。

ずれのイネ科作物の葉も陽イオン濃度は水田水の陽イオン濃度の数十倍から数百倍高い》(3頁 17行目)と指摘されている通り、非常に高く、それは細胞外液であっても基本的に変わりません(乙18号証の黒田意見書添付の引用文献1の表1-1〔導管液〕及び表8〔師管液〕参照)。さらに、ディフェンシンと競合する金属イオンは、ディフェンシンの周辺に存在する  $K^+$ 、 $Na^+$ 、 $Ca^{2+}$ 、 $Mg^{2+}$ イオン等すべてがその対象となりますので、それら金属イオンの各濃度を合計することになります(もっとも、2価の  $Ca^{2+}$ イオンなどは  $K^+$ 、 $Na^+$ の2倍の電荷を持つので、濃度も2倍したものを合計することになります)。

具体的に指摘すれば、乙18号証の引用文献1の表8のイネ(水稻)について、細胞外液における  $K^+$ イオンの濃度と  $Ca^{2+}$ 、 $Mg^{2+}$ イオンの濃度を2倍したものを合計すると、1lの溶液に66.6~212.6mM(ミリモル)の金属イオンが存在することになります。

これに対し、本件のカラシナ・ディフェンシンの濃度について、被告は明らかにしていません。しかし、甲3号証の被告職員らの論文「抗菌蛋白質ディフェンシンの多様な機能特性」に次の事実が明らかにされています。

「カラシナ由来のディフェンシンを用いて、イネの主要病害の原因菌であるいもち病菌に対する抗菌活性を調べてみた。ディフェンシンの増殖抑制程度は、I.E.50(対照区と比較して50%の増殖抑制程度を示す濃度)を用いて定量化することができる。カラシナ由来のディフェンシンの場合、I.E.50は約1  $\mu$ g/mlと算出され、きわめて高い抗菌活性を示すことが確認された」(231頁左3行目以下)

つまり、本GM実験と同じカラシナ由来のディフェンシンを使って、約1  $\mu$ g/mlの濃度で、いもち病菌に対してI.E.50の増殖抑制程度が得られたということです。この1  $\mu$ g/mlの濃度を、モル濃度に換算すると、約0.175  $\mu$ M(マイクロモル)<sup>13</sup>となります。

そして、被告の特許出願の書類(公開特許公報。公開番号：特開2003-88379)の図5(別紙2)に、いもち病に対するGMイネの抵抗性の結果を示していますが(このグラフは、横軸の指数は無発病を(0)とし、軽症(1)から重症(10)で表したもの)、これによると、GMイネの約半数が無発病であり、I.E.50の増殖抑制程度にあるとあってよいでしょう。つまり、このGMイネのディフェンシン(ここでは、キャベツ・ディフェンシン)の濃度も、上の実験の場

---

<sup>13</sup>カラシナ・ディフェンシンの分子量を被告の主張する5,700とし、1  $\mu$ g/ml = 1 mg/l = 0.001 g/l だから、5700g : 0.001 g = 1 M : x M を解くと、x = 0.000000175M (= 0.175  $\mu$ M)となる。

合とだいたい同じ濃度、つまり約 0.175  $\mu$ M (= 0.000175 mM、ここでは被告に有利に四捨五入して 0.00018mM とします) 付近にあると考えてよいでしょう。

そして、本実験のカラシナ・ディフェンシンの濃度もこれとほぼ同じ範囲内にあるに考えることができるでしょう。

したがって、上記の金属イオン濃度とカラシナ・ディフェンシンの濃度を対比すると、

$$66.6 \sim 212.6 \text{mM} : 0.00018 \text{mM} = 370000 \sim 1180000 : 1$$

つまり、カラシナ・ディフェンシンの濃度は金属イオンの濃度と比べ、約 37万 ~ 118万倍もの差があることが分かります。

つまり、濃度で比べてみる限り、金属イオンの濃度がディフェンシンの濃度と比べ圧倒的に高く、その結果、数に優に勝る金属イオンがタンパク質との競合に圧倒して細胞壁に結合するか、或いはたまたま先に細胞壁に結合していたディフェンシンをたちまちのうちに追い出してしまおうでしょう。

( )、そこで、この劣勢を挽回して、ディフェンシンが金属イオンとの競合に勝つためには、前述した通り、ディフェンシンの《電荷の状態が金属イオンとの濃度差を打ち消すほどに大きなものであることが必要です。》

この点、既に原告から被告に対し、ディフェンシンの電荷の状態を明らかにされたいという質問が出ているようですが、まだ被告からの回答がないため、ここではディフェンシンの電荷の状態について直接論じることはできません。

しかし、本ディフェンシン(カラシナ・ディフェンシン)と同じアブラナ科のキャベツとコマツナのディフェンシンについて、被告の前記特許出願の書類の【0066】【配列表】にアミノ酸配列が記載されていますので、それに基づきその全体の電荷の状態を計算してみます。

キャベツおよびコマツナのディフェンシンは、その成熟タンパク質(細胞外に分泌される部分)のアミノ酸配列はいずれも以下の通り、同一です。

QKLCERPSGTWSGVCGNNACKNQICINLEKARHGSCNYVFP AHKCICYFP  
C

この分子の電気的性質を決めるアミノ酸は、酸性アミノ酸(マイナス電荷)として E(グルタミン酸)2つ、D(アスパラギン酸)なし、塩基性アミノ酸(プラス電荷)として K(リジン)4つ、R(アルギニン)2つ、H(ヒスチジン)2つであり、差し引き塩基性アミノ酸の数が勝っているため、主に中性の pH に保た

れる植物体内の細胞壁周辺では、プラスに荷電した分子といえます。しかし、塩基性アミノ酸のうち H (ヒスチジン) の寄与はごくわずか (等電点<sup>14</sup>がわずかに塩基性) であり、リジンとアルギニンの総和 6 のうち、2 つは酸性アミノ酸によってほぼ相殺されるので、4 アミノ酸分プラス電荷が勝ることになります。

そこで、等電点を遺伝子解析ツール ExPasy によって計算しますと、以下の表のようになります<sup>15</sup>。

タンパク質		等電点 (pI)
キャベツ・ディフェンシン	総分子量 8728.31	8 . 4 7
	成熟型 <sup>16</sup> (総分子量 5694 . 55)	8 . 7 2
コマツナ・ディフェンシン	総分子量 8697.26	8 . 1 5
	成熟型 (総分子量 5694 . 55)	8 . 7 2

ここから、キャベツとコマツナのディフェンシンについていずれの場合も、等電点は 8 台の数値を越えることはなく、電氣的に中性のタンパク質の等電点 7 . 0 0 からただ 1 . 7 2 ユニット程度を隔てるだけであることが分かります。つまり、キャベツおよびコマツナのディフェンシンはその等電点がプラス側にあるとはいえ、極端にプラス電荷に偏ったアミノ酸組成を有する特殊なタンパク質ということとはできません。言い換えれば、これらについては、前述した金属イオンとの圧倒的な濃度差を打ち消すほどに大きな電荷の状態にあるとは到底言えないということです。

そして、同じアブラナ科であるカラシナ・ディフェンシンとコマツナ・ディフェンシンのアミノ酸配列を部分的な配列を比較した公表データ (甲 58 号証の金川

<sup>14</sup> タンパク質の電荷の程度を示す尺度のこと。タンパク質を構成するアミノ酸にはイオン化される基が含まれており、溶液中のアミノ酸の優位なイオン形態は溶液の pH に依存する。そこで、溶液の pH を変更していくと、タンパク質全体の電荷平均が 0 となるときがあり、このときの溶液の pH を等電点 (pI) と言う。たとえば pI = 4 であればマイナスがまさり、pI = 7 であれば電氣的に中性であり、pI = 10 であればプラスがまさる。等電点が高ければ高いほど、それだけ強いプラスの電荷の状態にあるということが出来る。

<sup>15</sup> これはアミノ酸配列から算出される理論値であり、タンパク質の修飾等により実測値が異なることもあり得るが、ディフェンシンについて等電点に大きな影響を及ぼす知見は既存のデータとしては得られておらず、また被告からも提示はない。したがって、実測値はおおむね理論値を外れないと推定できる。

<sup>16</sup> ディフェンシンは細胞内で合成されたあと、分泌 (細胞外に放出) される前に、アミノ酸配列のうち先頭部分 (シグナル配列) の切断をうけるので、その部分を取り除いたものをこう呼ぶ。

報告書 2 頁図 1 ) によれば、そのちがいは先頭から 4 1 個のアミノ酸のうちわずか 1 つだけです ( 5 番目 )。したがって、両者の等電点にも大きな差異はないと考えられます。つまり、本件のカラシナ・ディフェンシンについても、極度にプラス電荷に偏った特殊なタンパク質であると推定することはできず、言い換えれば、前述した金属イオンとの圧倒的な濃度差を打ち消すほどに大きな電荷の状態にあるとは到底言えないこととなります。

タンパク質中のアミノ酸に由来するプラス電荷と金属イオンのプラス電荷のイオン化傾向 ( どの程度電離しやすいか ) を同等に比較するのは厳密には不正確ですが、あえて近似すれば、上記の推計から、ディフェンシン一分子には 4 価のプラス電荷があることとなりますので、金属イオンとの濃度比が 37 万 ~ 118 万倍あるとき、これを 4 分の 1 程度には縮めることができるという主張は成り立つでしょう。しかしここにはなお 9 万 ~ 3 0 万倍程度という圧倒的な濃度差が存在します。仮に、カラシナ・ディフェンシンにはさらにプラス電荷アミノ酸が多いとしてもこの濃度差を相殺することは不可能だと考えられます。

( )、以上のように、いずれの観点からも、被告が主張するように、ディフェンシンが不可逆的に細胞壁と結合し、そこから遊離しえないとする推定は支持することができません。

#### 5、反論 4 被告主張の矛盾 ( 背理法 )

反論の最後として、もし被告の言う通り、「プラスの電気を帯びたディフェンシンは、細胞膜を通過後、直ちにマイナスの電気を帯びた細胞壁とイオンの強く結合したまま細胞壁から解離しない」としたら、どんな結果になるでしょうか。

##### (1)、病原菌の殺菌方法

まず最初に問題となるのは、細胞壁と電氣的に強固に結合したままのディフェンシンはどうやって病原菌を殺菌できるのか、です。

被告の本実験承認申請書 ( 甲 1 号証 ) によれば、

《ディフェンシン F は正の電気を帯びており、病原菌の細胞膜に付着し、細胞膜のイオンチャンネルに影響を及ぼして抗菌活性を示すと考えられている。<sup>14)</sup> ( 8 頁 )

とあり、そこに示された脚注 14 「M. Zasloff (2002) Antimicrobial peptides of multicellular organisms, Nature, 415: p389-395」によれば、ディフェンシンが病原菌の細胞膜に付着する図が書かれています ( 別紙 3 の Figure 2 と 3 参照 )。つまり、ディフェンシンはその本来の機能である病原菌を殺菌するときには病原菌

の細胞膜に付着する以上、少なくともそれまでには植物の細胞壁から解離していなければならない筈です。しかし、被告に言わせれば、ディフェンシンは細胞壁から決して解離しないのですから、いったいどうやって、ディフェンシンはその本来の仕事を実行するのでしょうか。

そして、もしこのときには解離するのだと弁明するのであれば、一体このときにどうして解離が可能になったのでしょうか。それは、病原菌が来たから初めて解離可能になったのではなく、病原菌の襲来の有無にかかわらずもともと解離可能だからだと言うべきでしょう。

### (2)、正に荷電した分泌タンパク質の矛盾

植物には、ディフェンシン以外にも正に荷電した分泌タンパク質（例えば、抗菌タンパク質）が沢山あります。それらもまた、被告の主張によると、《細胞膜を通過後、直ちにマイナスの電気を帯びた細胞壁とイオンの強く結合したまま細胞壁から解離しない》ことになりそうです。なぜなら、正に荷電したタンパク質という点で、ディフェンシンと区別して扱う理由がないからです。

しかし、もしそうだとしたら、これらの分泌タンパク質は、細胞壁と電氣的に強固に結合したままの状態、分泌タンパク質本来の機能をどうやって果せるのか、極めて疑問となります。

### (3)、飽和点による限界

また、「ディフェンシンと細胞壁とのイオン結合は非可逆的である」という被告主張を仮に認めた場合、次のような新たな矛盾が生まれます。

もともと細胞壁上のマイナス電荷部位は有限個しかない筈ですが、他方で、本 GM イネはディフェンシンを常時生産し続けるという特性を持つため、上記被告主張を仮定すれば細胞壁上のマイナス電荷部位はやがて結合したディフェンシンに占有されて飽和点に達します。しかし、にもかかわらず、本 GM イネは依然ディフェンシンを常時生産し続けます。その結果、それ以降に生産されたディフェンシンは、飽和した細胞壁に結合することはできなくなり、ほかに移動するほかありません。結局、被告の上記主張を前提にすれば、「ディフェンシンは細胞壁を通過して、ほかに移動することはない」という被告主張の結論部分が否定されることになるのです。

## 6、結合しないディフェンシンまたは解離したディフェンシンの外部流出について

被告は、さらに次のように主張して、ディフェンシンが植物体外に出ることを

否定しています。

「表皮細胞の外側の細胞壁は、植物体内の細胞壁より何倍も厚く、さらにそれを水（分子量 18）も通さないクチンやロウ状の物質でできたクチクラで覆われており、水溶性のディフェンシンが外部に流出することはありません」（準備書面(2) 8 頁下から 3 行目以下）

しかし、これは植物学の一般的理解に反しています。

というのは、まず、既に前記 2 で紹介した通り、ダイコンのディフェンシンが種子の外部にしみ出すことが実証済みだからです。

さらに、一般に病原体が植物に浸入する経路として、

(1)、傷口からの浸入

(2)、気孔や水孔、皮目などの自然開口部からの浸入

があることは異論のないところだからです（別紙参考文献 5 久能 均ら「新編 植物病理学概論」24 頁ほか）。

ここで、病原体の侵入経路について補足すると、Trigiano, R. N., Windham, M. T. and Windham, A. S. (共編著.) (2004) の「植物病理学書」"Plant pathology : Concepts and Laboratory Exercises" (CRC Press, Boca Raton, Fla. USA) の 49 ~ 50 頁に、「植物表面の貫通」(病原菌が表面から植物組織内に侵入する方法の意味) の解説があります。この貫通には受動的貫通と能動的貫通があり、受動的貫通は上に示す (1) (2) の孔穴から菌が侵入することであり、傷口については植物の成長過程でクチクラなどの表面構造が傷つき、葉が擦り合わさったり昆虫などの食害による傷の他に、成長にともなって生じる自然の傷口などのことが記されています。また、能動的貫通は、菌が植物表面を溶かしながら穴を開けて入る貫通法のことです。

このように、実際には体外に通じる様々な経路が植物体に存在する以上、細胞壁と結合しないディフェンシンまたは細胞壁から解離したディフェンシンが、これらの経路を通じて外部に流出することを否定することはできません。

ディフェンシンの外部流出に関連して付言すれば、「ディフェンシンが植物体外に出るか否か」が争点となっている背景には、さまざまな菌がディフェンシンにさらされることによって耐性菌が自然選択を受けやすい状態が危惧されるか否かということがあります。この原点に立ち戻ってみれば、植物体への病原体の侵入が受動的か能動的かにかかわらず、耐性菌の自然選択の場は当該イネの栽培水田に限らず、あるいはそれ以上に植物体上が格好の自然選択の場となり得ることを申し添えます。

## 7、被告が実施した検証実験に関する乙18号証（黒田意見書）に対する論評

被告は、昨年の仮処分事件の中で、ディフェンシンの溶出実験の報告（乙19号証の黒田報告書に添付）を行ないましたが、これに対し、金川貴博氏が意見書（甲20号証。4頁以下）で、その実験方法には種々の問題があると指摘しました。今回、これに対する反論が黒田意見書（乙18号証。3～4頁）で明らかにされましたので、以下、これについて論評しておきたいと思います。

### a．超純水へのイネ茎葉の浸せき（乙18号証3頁）

これは、金川氏の次の指摘に反論したものです。

「a．まず、実験1で、イネの茎葉を10の超純水に浸すという不可解な溶出方法が用いられています。この実験では、できるだけ、水田に近い条件にして、ディフェンシンが溶出するかどうかを調べるべきであるのに、なぜ溶出に超純水を使ったのでしょうか。水田の水または、それに近い水を使うとなると、 $Ca^{2+}$ などのイオンが多量に含まれているので、それではbで前述した通り、ディフェンシンが溶出してしまうから、超純水を使ったのではないかと疑われてもしかたがない実験です。」（甲20号証4頁）

これに関して黒田氏は、超純水を使用したのは、「水中の微生物が増殖し、微生物のプロテアーゼも作用して、イネの茎葉からディフェンシンタンパク質が溶出したか否かを正確に調べることはできません」と説明されています。確かに、ディフェンシンが溶出したとしても、微生物のプロテアーゼで分解されてしまい検出できないかもしれません（ただし、実際にはディフェンシンが分解されないかもしれませんが、黒田氏の実験ではこの点のデータがありません）。しかし、もしもこの実験でディフェンシンが検出されれば、ディフェンシンが溶出するという確かな証拠になります。つまり、この実験では、ディフェンシンが検出されなかった場合には、黒田氏の言われるとおり、ディフェンシンが溶出したか否かを正確に調べたことにはなりません。もし、ディフェンシンが検出されれば、GMイネからディフェンシンが溶出するという明確な証拠になります。したがって、ディフェンシンが溶出するかどうかの実験としては、まず、第一段階として、水田の水を使うのが当然なのです。ここで、もしもディフェンシンが検出されればそれで実験は終了で、検出されなかった場合にさらに次の実験が必要になるだけのことです。

そして、仮に、水田の水でディフェンシンが検出できなかつたら、次の段階としては、超純水を使用するのではなく、水田の水の成分とできるだけ近い組成の

滅菌水を用いた溶出実験を行うべきです。特に、 $\text{Ca}^{2+}$ などのイオンが溶出に影響することが十分に予想されるのですから、溶出実験の液として、イオンの組成と濃度が水田中のイオンの組成や濃度とできるだけ同じであるものを使う必要があります。これをどうして行わなかったのか理解できません。黒田氏の実験は、本来の実験手順を無視したものだと言わざるをえません。

b．水温10℃での茎葉の浸せき（乙18号証4頁）

これは、金川氏の次の指摘に反論したものです。

「b．さらに、温度が10℃というのも不可解です。ディフェンシンが溶出しにくい条件をわざと選んだのではないかと疑われる実験です。」（甲20号証4頁）

これに関する黒田意見書の反論のおかしさも、前述の「超純水の使用」の場合と同様です。

黒田氏は、水温10℃で実験した理由として、「a．と同様の理由で正確な実験が行えないと判断し」と弁明しますが、しかし、これも、室温での実験でディフェンシンが検出されなかった場合には、ディフェンシンが溶出したか否かを正確に調べることができないということにすぎず、水田環境に近い室温実験で検出されれば、ディフェンシンの溶出が実証されることとなります。ですから、まず、室温での実験を行い、その結果、ディフェンシンが検出されなかったときには、さらに10℃での実験を行うというのが当然の手順です。

しかも、黒田意見書によれば、最初、室温での実験を行いながら、ディフェンシンの測定をしないまま、10℃での実験を行ったことを今回初めて明らかにされましたが（4頁4行目以下）、どうして室温実験のときにディフェンシンの検出測定をしなかったのか、これも不可解なことです。

c．実験の対照区と濃縮操作（乙18号証4頁）

これは、金川氏の次の指摘に反論したものです。

「c．また、実験1において、ディフェンシンが検出されなかったことをもって、イネからのディフェンシンの溶出がないと述べていますが、このような実験を行う場合、もしも、イネからディフェンシンが溶出しているなら、この実験方法でディフェンシンが検出されるはずであるということを確認した実験（ポジティブコントロール実験）と一対になっていなければ、意味のある実験になりません。すなわち、この実験は、もしも、イネからディフェンシンが溶出したとしたら、ディフェンシンが検出されるはずであるのに、検出されなかったから溶出はない

ということをお願いいたしますので、このためには、たとえば、1 ページの実験 1 の実験区 A において、ディフェンシンを加えたものを用意し、加えていないもの（黒田報告書に示されているもの）と同様の処理（濾過や濃縮など）を行って、その結果として、ディフェンシンが検出されるという実験が必要です。

d . この点、黒田報告書では、参考 1（2 ページの最終段落）に、濾過してもディフェンシンが検出されることが記載されていますが、濃縮操作の影響がどうだったのかがまったく示されていません。実験 1 には、「濃縮なし」と記された実験の結果が示されていますが、これは、溶出した液を濾過してそのまま用いたのではなくて、わざわざこれを濃縮して、水分を飛ばしてから、水に溶きなおし、それを希釈するという面倒な操作をした試料を使っています。「濃縮なし」なら、濾過したものをそのまま用いればよいものを、なぜこんな不可解な実験するのか考えると、もしかしたら、濃縮操作でディフェンシンが消滅するのではないかという疑念が起ってきます。」(甲 20 号証 4 ~ 5 頁)

対照区或いは対照実験というのは、一般に、

「ある因子(物質, 刺激, 温度, 食物など)の作用を調べてみる実験の際, 研究しようとする因子以外はすべてこの実験と同じ条件にした実験を並行して行い, 両実験の結果を比較することが必要である。この後者の実験を対照実験という。対照実験を行わないと, 実験で得られた結果がほんとうにその因子の作用によるものかどうか確信が得られない。とくに生物についての実験の場合には, 研究対象が複雑であるため, 生物の遺伝的系統, 育てた条件, 実験時の条件などすべてのことについて厳密に同じ条件にした対照実験がなければ, 実験はほとんど無意味に等しい」(平凡社大百科事典。日高敏隆執筆)

と解説されている通り、生物の実験において必要不可欠なものです。

この点については黒田氏も、「この実験では確かに正確な意味での対照区を併設していません」と認めるとおりで、もともと不十分な実験でしかありません。金川意見書も指摘する通り、「イネからディフェンシンが溶出しているなら、この実験方法でディフェンシンが検出される」ということの実証がない限り、「ディフェンシンが検出されなかったことで、ディフェンシンの溶出がなかった」という対偶命題が成立しないからです。

また、黒田意見書は、「(精製したディフェンシンを超純水に)溶解した後遠心濃縮操作を行い再度超純水に溶解し」た予備実験をもって対照区に替えようとしています。しかし、ここで必要なポジティブコントロール実験とは、金川意見書が指摘するとおり、イネの茎葉を浸漬した液にディフェンシンを加えて濃縮操

作を行うことです。超純水にディフェンシンを溶解した液では、正確な比較になりません。また、この点について問題はないと仮定しても、そもそも、前項で述べたとおり、10 超純水を使用した溶出実験に大きな問題があるのですから、この実験では、ディフェンシンが溶出しないという結論を、科学的実験に基づいて得たことにはなりません。

d . 浸漬水を加えた培地でのいもち病菌の増殖（乙 18 号証 4 頁）

これは、金川氏の次の指摘に反論したものです。

「 e . 実験 1 の（ 2 ）の、いもち病菌を用いた実験でも、ポジティブコントロール実験が欠如しています。ここには、増殖抑制効果がなかったという実験だけしか示されていません。ここでも、浸出水中にディフェンシンを加えて同様の実験を行えば、増殖抑制効果がでるといふ実験が必要です。

ただし、実験 1 では、浸出に超純水を用いていることがそもそもの問題点ですから、正しくコントロール実験が行われたとしても、その結果から、水田の水にディフェンシンが浸出してこないという証明にはなりません。」（甲 20 号証 5 頁）

この点について黒田氏は、「組換えイネの茎葉浸せき水を含む培地が、いもち病菌の増殖をまったく抑制しなかった事実で十分と考えています」と述べておられますが、金川意見書のとおり、水田水とはその性状を全く異にする超純水の浸せき水を試料とした培地がいもち病菌の抑制効果を示さなかったことが、水田水にディフェンシンが溶出していないことを科学的に実証するものではありませんし、この実験には、対照区も併設されていません。

e . 組換えイネの株もとの水の濃縮操作（乙 18 号証 4 頁）

これは、金川氏の次の指摘に反論したものです。

「 f . 実験 2（圃場での組換えイネの株元の水を用いた実験）でも、全く同じことが当てはまります。ここでも、「濃縮なし」と記された実験は、わざわざ濃縮して水分を飛ばしてから、水を加えて溶きなおし、それを希釈するという面倒な操作をしたあとの実験です。」（甲 20 号証 5 頁）

黒田氏は、濃縮操作をした理由として、「イネからつくられたディフェンシンが水中に存在すると仮定してもごく微量と推定されることから」濃縮して調べたと述べられていますが、株もとの水にはさまざまな成分が含まれていますから、濃縮時にこれがディフェンシンに大きく影響する可能性が考えられます。濃縮という面倒なことをする前に、何の操作もせずにそのまま用いる実験をすべきです。

黒田氏は、予備実験において、超純水に溶かしたディフェンシンでは、濃縮しても問題なかったと述べておられますが、それが正しいと仮定しても、超純水と性状の異なる株もとの水を濃縮したときにもディフェンシンは問題なしということにはなりません。

以上のとおり、今回提出された黒田意見書によっても、被告が実施した検証実験は不十分なものと評価され、これをもって、GMイネからディフェンシンが漏出ししないことを科学的に証明したとは、到底言えないと考えます。

以上

## 別紙

1 : Terras FR, Eggermont K, Kovaleva V, Raikhel NV, Osborn RW, Kester A, Rees SB, Torrekens S, Van Leuven F, Vanderleyden J, Cammue, BPA; and Broekaert, WF. *The Plant Cell*. 7: 573-588 (1995)の 573 ~ 574 頁

### 【574 頁の図 ( Figure 1 ) の解説】

この図は、菌類が繁殖しやすい人工培地の中心に菌類（葉枯病菌）を接種して繁殖させ、コロニーの縁 1 , 2 , 3 の 3 ヶ所にダイコン種子などを置いて培養し、菌類の繁殖の程度をみたシャーレの上面写真 4 つ ( A ~ D ) です。

3 箇所 ( 1 , 2 , 3 ) の処理は次の通り。

1 の箇所：抽出した純粋な Rs-AFP1 ( ダイコン抗菌タンパク質 ) を置く。

2 の箇所：種皮を被った無傷のダイコン種子を置く。

3 の箇所：種皮を傷つけたダイコン種子を置く。

4 種類のシャーレ ( A、B、C、D ) への添加物などは次の通り。

A のシャーレ：無添加。

B のシャーレ：タンパク分解酵素 ( プロナーゼ E ) を添加。

C のシャーレ：無添加であるが、3 箇所に置くものを高圧熱処理。

D のシャーレ：植物ホルモン ( アブシジン酸 ) を添加。

4 種類のシャーレの結果をざっと見比べると、

A : 3 箇所とも Rs-AFP1 ( ダイコン抗菌タンパク質 ) が作用して、菌糸の増殖が抑制されたため、処理部のところだけが窪んでいる。2 と 3 では種子が発芽している。

B：タンパク分解酵素を添加したせいで、Rs-AFP1（ダイコン抗菌タンパク質）が作用しないため、3箇所とも何も影響を受けず、正円形に菌類が増殖している。

C：Rs-AFP1（ダイコン抗菌タンパク質）が熱処理で分解してしまい作用しないため、Bと同様。

D：3箇所のうち、1と3のところで、窪みがみえる。アブシジン酸処理の影響で種子が発芽しないため、2のところではディフェンシンが産生されなかったが、3は種皮が傷つけてあったためディフェンシンが産生されたわけである。

このように、正常な Rs-AFP1（ダイコン抗菌タンパク質）=ダイコン・ディフェンシンは、種子から離れた所にまで滲出していき、菌類の増殖を抑制する作用があるわけです。

2：公開特許公報（公開番号：特開2003-88379）の図5

3：M. Zasloff (2002) Antimicrobial peptides of multicellular organisms, Nature, 415:p389-395. の389～391頁

### 別紙参考文献

1：Bruce Alberts ら「細胞の分子生物学」第4版 2004年発行。

2：Trudy McKee ら「マッキー生化学」2003年発行。

3：江崎信芳ら「生化学基礎の基礎」2002年発行。

4：B.D.Hames ら「生化学キーノート」2002年発行。

5：久能均ら「新編植物病理学概論」2001年発行。