


平成 18 年 6 月 29 日

新潟地方裁判所高田支部 御中

カラシナ・ディフェンシンが陽イオン交換により溶出する際における、イオン濃度計測結果についての報告

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 

1、 本件実験の経緯

- (ア) 中央農業総合研究センターの北陸研究センターにおいて、平成 18 年 4 月 10～20 日に、カラシナの種子からカラシナ・ディフェンシンの精製抽出をおこなった。
- (イ) その精製抽出過程において、陽イオン交換カラムトグラフを実施し、その際の記録に基づき、今般、カラシナ・ディフェンシンが陽イオン交換により溶出する際におけるイオン濃度が計測されたので、ここに報告する。

2、 実験に基づく結論

カラシナのディフェンシンを精製する過程で用いた陽イオン交換カラムトグラフィーにおいて、図 1-a,b に示したように、カラシナ・ディフェンシンは 0.5M 付近の塩(NaCl)濃度で溶出する。50mM Mes-NaOH 緩衝液(pH6.0)中で NaCl 濃度が少なくとも 0.25M 以下では溶出しない。

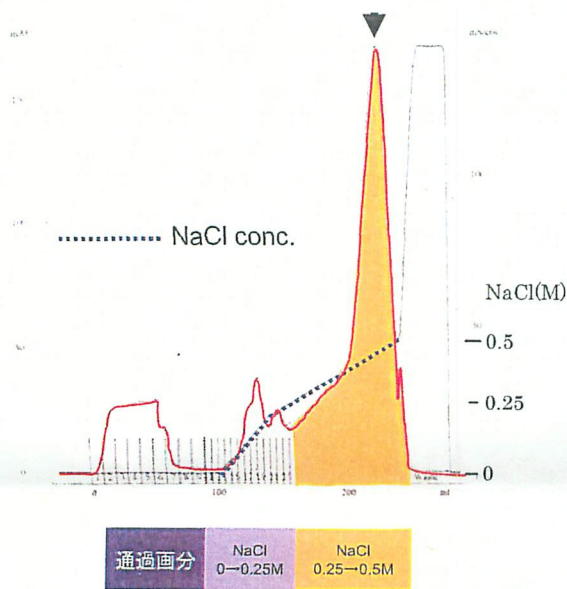


図1-a 溶出パターン

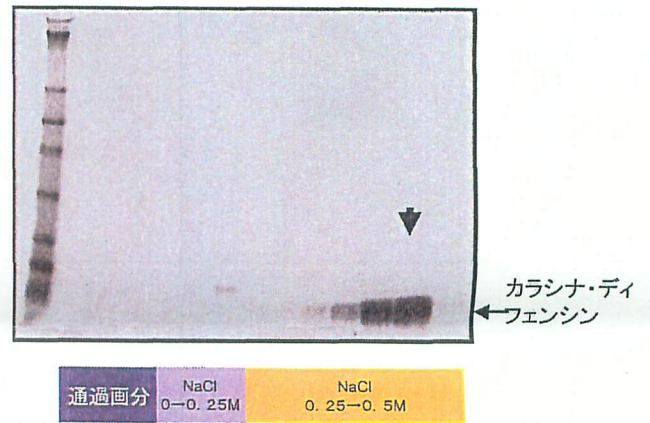


図1-b 各画分における SDS 電気泳動の結果

### 3、解説

陽イオン交換樹脂 HiTrap SP FF を 50mM Mes-NaOH 緩衝液 (pH6.0) で平衡化した後、蛋白質サンプルをカラムにチャージし、非吸着物を 50 mM Mes-NaOH 緩衝液 (pH6.0) でよく洗い流した後、NaCl 濃度 0 ~ 0.2M, 0.2M~0.5M までの連続勾配でカラシナ・ディフェンシンの溶出を図った (図 1-a の青点線)。それぞれ洗浄した溶液 (図 1-a の紺色の通過画分)、NaCl 濃度が 0 ~ 0.25M (図 1-a の紫色の画分)、NaCl 濃度が 0.25M ~ 0.5M (図 1-a の橙色の画分) を SDS 電気泳動にかけ、カラシナ・ディフェンシンの溶出を確認したのが図 1-b である。

細胞壁の pH に近い pH6.0 の 50mM Mes-NaOH 緩衝液ではカラシナ・ディフェンシンは陽イオン交換樹脂に吸着し、さらに、少なくとも 50mM Mes-NaOH 緩衝液中で NaCl 濃度が 0.25M 以上でないと溶出しない。

なお、図 1-a 中の赤線は 280nm の吸収を示す。蛋白質の溶出がないと

この吸収は、蛋白質サンプル中に存在した色素によるものである。