

## プロトプラストの誘電泳動スペクトル

栗延俊太郎\*・小野 尊史\*

### Dielectrophoretic Spectra of Protoplasts

Shuntaro KURINOBU and Takasi ONO

#### ABSTRACT

The effective dielectric constants of protoplasts which are proportional to dielectrophoretic force are investigated by impedance measurements. *Daucas carota* is used as a plant in this experiment. Protoplasts are washed and suspended in sucrose solution. The spectrum of conductivity and that of relative dielectric constants for both a suspension of protoplasts and a suspending medium are measured, respectively. Then, the spectra of conductivity, relative dielectric constants and effective dielectric constants for a protoplast are calculated in the range of 100kHz to 10 MHz. The spectrum of effective dielectric constants shows one peak. The peak is considered to be due to the difference between relative dielectric constant of suspending medium and that of protoplast.

In addition, the single shell model of a cell that consists of a membrane and an interior is used. The conductivity and the relative dielectric constant for both a membrane and a interior using a curve fitting method to the spectrum of complex dielectric constants of a protoplast, are calculated. Also, the spectra of effective dielectric constant are obtained as a function of conductivity of a suspending medium. The frequency range of positive dielectrophoretic force is from about 200 kHz to about 400 MHz for a conductivity of 100 S/cm. It is found that a suspending medium of low conductivity is suitable for dielectrophoretic manipulation of protoplasts.

キーワード：インピーダンス、プロトプラスト、誘電泳導  
key words: Impedance, Protoplast, Dielectrophoresis

#### 1. まえがき

誘電泳動は細胞融合等のための細胞の操作や、細胞の電気的特性を明らかにするために広く用いられている<sup>(1)</sup>。細胞の誘電泳導については、今までに多くの報告があるが、実用上重要な植物プロトプラストについてはまだ多

くの研究が必要であると思われる。

プロトプラストの誘電泳動力の周波数特性を測定する場合、直接誘電泳動力を測定する方法としては、細胞の捕獲数を測定する方法<sup>(2)</sup>、levitation法<sup>(3)</sup>や誘電泳動速度測定法<sup>(4)</sup>があり、間接的方法としては、プロトプラ

ストのインピーダンスや回転<sup>(5)</sup>を測定し、それから計算により誘電泳動力を算出する方法がある。

直接誘電泳動力を測定する方法の中で、levitation法や誘電泳動速度測定法は、1個のプロトプラストの誘電泳動力が直接求められる点が長所であるが、測定上制約が生じ、いろいろな条件のもとでの誘電泳動力のスペクトルの測定が困難である。一方インピーダンス法は測定に多くの試料を必要とするが、プロトプラストの膜やその内部に関する詳細なデータを得ることが可能である。

筆者らは文献(2)で、酵母のプロトプラストが、針対針電極に捕獲される場合の捕獲数の周波数特性を、7 MHzまでの周波数で測定し、5 MHzの周波数で捕獲数が最大になることを明らかにしている。また文献(4)では100 kHzから10 MHzの範囲で、ニンジンのプロトプラストの誘電泳動速度を測定し、その値から誘電泳動力に比例する等価誘電率のスペクトルを得た。

本研究では、ニンジンのプロトプラストの懸濁液とその溶媒のインピーダンスのスペクトルを測定し、プロトプラストの等価誘電率のスペクトルと、プロトプラストの細胞膜とその内部の誘電率と導電率を求めた。またその結果を、文献(4)の結果と比較した。

## 2. インピーダンスによる理論

図1に示すように、プロトプラストが溶媒に懸濁している場合、懸濁液中のプロトプラストの溶媒に対する体積比が $\phi$ 十分に大きい場合には、懸濁液の複素誘電率 $\epsilon^*$ 、プロトプラストの複素誘電率 $\epsilon_q^*$ 、溶媒の複素誘電率 $\epsilon_a^*$ の間には次の関係がある<sup>(6)</sup>。

$$\left(\frac{\epsilon_a^*}{\epsilon^*}\right)^{1/3} \frac{1}{(1-\phi)} \frac{\epsilon^* - \epsilon_q^*}{\epsilon_a^* - \epsilon_q^*} = 1 \quad (1)$$

ここで、懸濁液の複素誘電率 $\epsilon^*$ とその誘電率 $\epsilon$ と導電率 $\sigma$ 、溶媒の複素誘電率 $\epsilon_a^*$ とその誘電率 $\epsilon_a$ と導電率 $\sigma_a$ 、プロトプラストの複素誘電率 $\epsilon_q^*$ とその誘電率 $\epsilon_q$ と導電率 $\sigma_q$ には、それぞれ下記の関係がある。

$$\begin{aligned} \epsilon^* &= \epsilon - j \frac{\sigma}{\omega} \\ \epsilon_a^* &= \epsilon_a - j \frac{\sigma_a}{\omega} \\ \epsilon_q^* &= \epsilon_q - j \frac{\sigma_q}{\omega} \end{aligned} \quad (2)$$

従って懸濁液と溶媒の誘電率と導電率の周波数特性がそれぞれ測定されると、式(1)(2)によりプロトプラストの誘電率と導電率の周波数特性が算出される。

一方、不均一電界が加えられた懸濁液中のプロトプラストには、誘電泳動力が働く。半径 $a$ の粒子に働く誘電

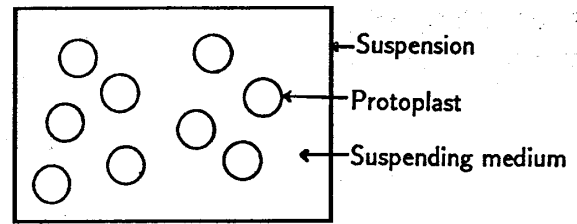


図1 プロトプラスト懸濁液  
Fig.1 Suspension of protoplasts.

泳動力 $\vec{F}$ は、次式により与えられる<sup>(7)</sup>。

$$\vec{F} = 2\pi a^2 K \nabla \vec{E}^2 \quad (3)$$

ここで $\vec{E}$ は電界強度で、等価誘電率 $K$ は次式で与えられる。

$$K = \text{Re} \left[ \epsilon_a \frac{\epsilon_q^* - \epsilon_a^*}{\epsilon_q^* + 2\epsilon_a^*} \right] \quad (4)$$

ここで $\text{Re}$ は実数部を示す。 $\epsilon_q^*$ と $\epsilon_a^*$ はそれぞれプロトプラストの複素誘電率と溶媒の複素誘電率である。依って誘電泳動力 $F$ に比例する等価誘電率は式(4)に $\epsilon_q^*$ と $\epsilon_a^*$ を代入することにより求めることができる。

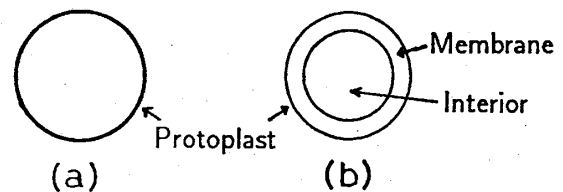


図2 プロトプラストの2つの電氣的モデル  
(a) 球モデルと (b) 1層モデル

Fig.2 Two electrical models of protoplast  
(a) Sphere model (b) Single shell model

一方実際のプロトプラストは細胞膜とその内部に分けられるので、プロトプラストを図2のような殻を持った球と仮定することができる。図2(a)のような球と、図2(b)のような球が等価なインピーダンスを持っている場合、式(5)が成り立つことが明らかにされている<sup>(6)</sup>。

$$\epsilon_q^* = \epsilon_m^* \frac{2\epsilon_m^* + \epsilon_i^* - 2(\epsilon_m^* - \epsilon_i^*)[D/(D+d)]^3}{2\epsilon_m^* + \epsilon_i^* + (\epsilon_m^* - \epsilon_i^*)[D/(D+d)]^3} \quad (5)$$

ここで $\epsilon_m^*$ と $\epsilon_i^*$ は細胞膜とその内部の複素誘電率をそれぞれ表しており、

$$\epsilon_m^* = \epsilon_m - j \frac{\sigma_m}{\omega}$$

$$\epsilon_i^* = \epsilon_i - j \frac{\sigma_i}{\omega} \quad (6)$$

で表される。また  $D$  はプロトプラストの直径で、 $d$  は細胞膜の厚さである。従って、式 (5) の  $\epsilon_m^*$  と  $\epsilon_i^*$  に適当な値を代入し、それらの値が式 (5) をできるだけ満足するように合わせる方法で、細胞膜とその内部のインピーダンスを求めることができる。

実験に用いた測定装置は、図3に示すような構造で、白金板の間にアクリルパイプを入れて作製されている。この実験ではアクリルパイプ中にプロトプラスト懸濁液を入れ、懸濁液と溶媒のインピーダンスがインピーダンスアナライザにより、100kHzから10MHzの間で測定された。

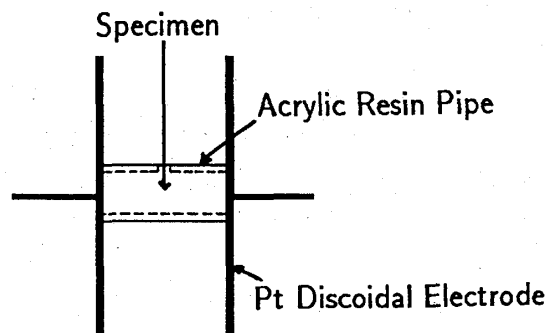


図3 電極の模式図

Fig.3 Schematic diagram of electrodes.

本実験ではニンジンが植物として使われた。なぜならば、ニンジンの根のプロトプラストは得るのに容易であり、得られたプロトプラストの構造が単純で、図2のモデルに良く合うと思われるからである。

プロトプラストの作製は、文献(4)に示すのと同じ方法で行った。プロトプラストの直径は光学顕微鏡で計られ、懸濁液の溶媒の導電率は  $\text{CaCl}_2$  で約  $100 \mu\text{S/cm}$  に調整された。

## 6. インピーダンス測定の結果と考察

測定されたプロトプラスト懸濁液と溶媒の導電率と誘電率を、式(2)に代入し懸濁液と溶媒の複素誘電率を求めた。次にその値を式(1)に代入して求めた際の、プロトプラストと溶媒の導電率と比誘電率が、図4と図5に示されている。

次に式(4)に、上記で求めた結果を入れ、得られたプロトプラスト等価誘電率のスペクトルが、図6に黒丸で示してある。図で  $\sigma_a$  は溶媒の導電率を示す。また比較のため、文献(4)に示される速度測定から得られた試料A2とB3の結果が白丸で示してある。

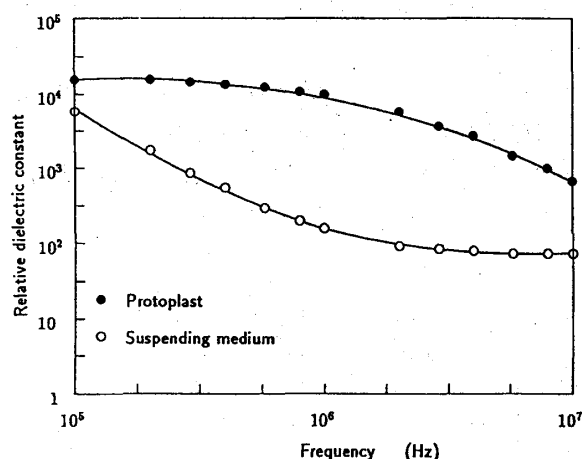


図4 プロトプラストと懸濁液の比誘電率の周波数特性

Fig.4 Frequency dependence of relative dielectric constant for a suspending medium and a protoplast.

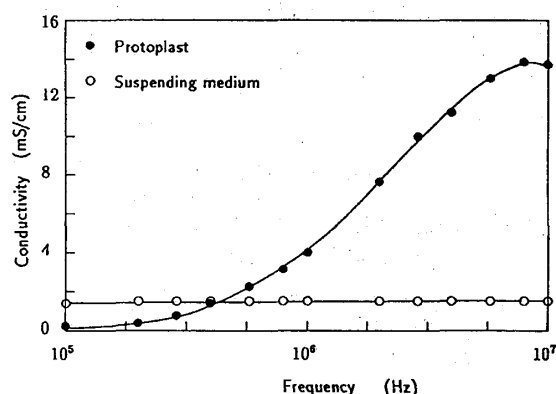


図5 プロトプラストと懸濁液の導電率の周波数特性

Fig.5 Frequency dependence of conductivity for a suspending medium and a protoplast.

また測定装置の性能から、10MHz以上でインピーダンスを測定することができなかったので、プロトプラストを、図2(b)のように細胞膜を殻としその内部を球としたモデルで表した式(5)を用いて、細胞膜とその内部の比誘電率及び導電率が求められた。図4、図5の結果に最も良く合うパラメータの値を求めると、表1のような結果が得られた。なお計算において細胞膜とその内部の比誘電率及び導電率は、共に周波数に依存しないとし

表1 パラメータ  
Table 1 Parameters

Parameter	value
Diameter of a protoplast	$3.5 \times 10^{-5} \text{m}$
Thickness of a membrane	$1.0 \times 10^{-8} \text{m}$
Volume fraction of protoplasts	0.6
Conductivity of a membrane	0 S/m
Relative dielectric constant of a membrane	3.7
Conductivity of a interior	2.0 S/m
Relative dielectric constant of a interior	60

た。また細胞膜の導電率はゼロとし、細胞膜の厚さは100Åとした。

次に表1のパラメータの値を用いて、式(4)から求めた等価誘電率のスペクトルを図6に破線で示す。なお破線の結果は、周波数に関わらず、溶媒の比誘電率が77で導電率が100  $\mu\text{S}/\text{cm}$ の場合の計算値である。

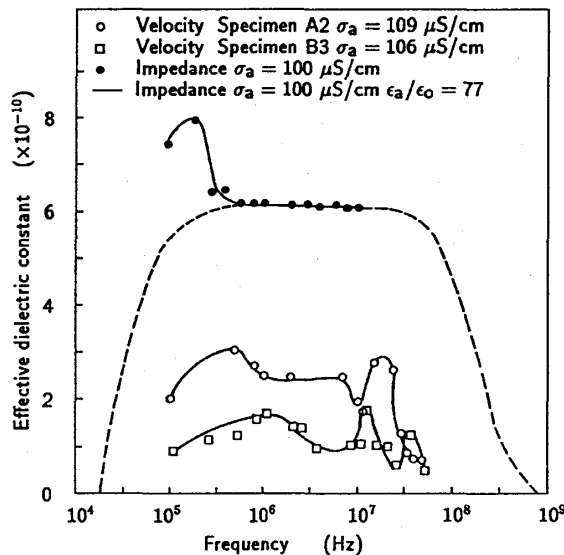


図6 等価誘電率Kのスペクトル (インピーダンス測定と速度測定)

Fig.6 Spectra of effective dielectric constant K. (Impedance measurement and velocity measurement)

この図の結果から、次のことがわかった。黒丸の結果は150kHz付近にピークを示しているが、これは図4に示すように、周波数が低くなるにつれて、プロトプラストの残査等により溶媒の誘電率が急に大きくなり、一方プロトプラストの誘電率は、図5に示すように、100kHzから1MHzの間では余り変化がないため、このピークが生じる。また白丸の速度測定法の場合においても、700kHz付近でピークが生じており、このピークは同じ理由に起因しているものと思われる。当然のことながら、溶媒の誘電率が周波数に依存していない破線ではピークは生じない。

白丸の速度測定法による等価誘電率と黒丸のインピーダンス法による等価誘電率の値の違いについては、明かでない。また速度測定の結果得られた等価誘電率の、高周波での低下が、破線のモデルに基づいた計算にも現れていることがわかる。

図7に表1の条件で、溶媒の導電率を変えた場合の等価誘電率の周波数特性を示す。なお溶媒の比誘電率は77で、周波数に依存せず一定であるとする。図7からわかるように、細胞を電界の強い方向に動かす誘電泳動力が生じる周波数帯域は、限られている。その帯域の導電率

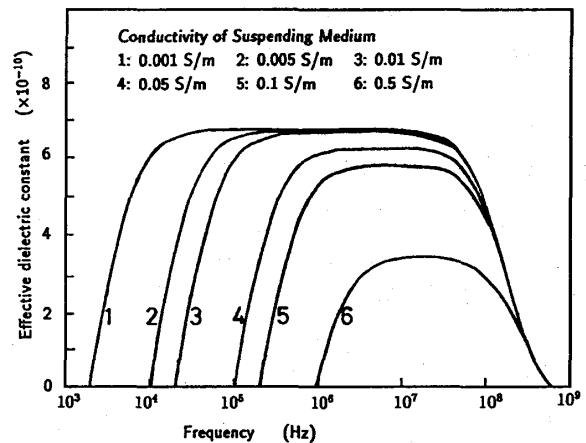


図7 等価誘電率のスペクトルにおける溶媒の導電率の効果

Fig.7 Spectra of effective dielectric constant K as a function of conductivity of a suspending medium.

が高いと周波数帯域が狭く、特に低周波側の帯域が減少することがわかる。実際は溶媒の誘電率は、低周波においては急激に大きくなるので、低周波領域ではその等価誘電率の特性は、ピーク等が生じて少し異なったものになると思われる。

したがって細胞の実用的なパラメーターの範囲では、溶媒の導電率が低い方が誘電泳動力が大きくかつ帯域が広いので、細胞操作においては良いことは明かであるが、実用上から、細胞融合等を安定した状態で行うためには、プロトプラストの誘電泳導による移動を安定に行う必要から1MHz以上の周波数が、むしろ望ましいと思われる。

さらに特性の異なった誘電体の結合による誘電分散の理論から、細胞の実用的なパラメーターの範囲では、等価誘電率の低周波での低下は、溶媒の導電率及び細胞膜の誘電率に強く依存し、高周波での低下はプロトプラストの内部の誘電率及び導電率に強く依存していると考えられる。すなわち等価誘電率の低周波での低下は細胞膜と溶媒の界面の分極に、高周波での低下はプロトプラスト内部と細胞膜の界面での分極に依存していると考えられる。

## 7. まとめ

ニンジンのプロトプラストの懸濁液とその溶媒のインピーダンスをそれぞれ測定することにより、等価誘電率のスペクトルと、プロトプラストの細胞膜とその内部の誘電率と導電率を求めた。その結果下記のことが明らかになった。

(1) 100kHzから10MHzの範囲で、プロトプラストの等価誘電率のスペクトル求め、スペクトルにピークが存

在することがわかった。またそのピークが溶媒の誘電率とプロトプラストの誘電率の差により生じることを明らかにした。

(2) 得られた等価誘電率のスペクトルのピークに対応したピークが、筆者らが以前報告した速度測定から得たスペクトルにも見られる。また等価誘電率が大きい周波数帯域は、インピーダンスによる方法と速度測定による方法においてほぼ一致している。

(3) プロトプラストの細胞膜とその内部の誘電率と導電率を求め、その値からプロトプラストが電界の強い方向へ動く場合の周波数帯域を算出した。その値を用いて溶媒の導電率を変えた場合の、等価誘電率の周波数特性を算出し、導電率の高い溶媒が実用上良いことを示した。

#### 参考文献

- (1) U. Zimmermann and W.M. Arnold: J. Electrostatics, **21** (1988) 309.
- (2) 栗延俊太郎、岩部睦: 福山大学工学部紀要, **13** (1991) 31.
- (3) K.V.I.S. Kaler and T.B. Jones: Biophys. J., **57** (1990) 173.
- (4) 藤井和夫、栗延俊太郎: 福山大学工学部紀要, **13** (1991) 37.
- (5) G. Fuhr and P.I. Kuzmin: Biophys. J., **50** (1986) 789.
- (6) K. Asami, Y. Takahashi and T. Takahima: Biochim. Biophys. Acta, **1010** (1989) 49.
- (7) T.B. Jones: J. Electrostatics, **6** (1979) 69.