

## 論 文

# 電界中における植物プロトプラスト変形過程と 細胞膜破壊機構

原 雅 則\*, 末 廣 純 也\*, 外 村 浩 之\*

(1990年6月1日受理)

## Deformation Process of a Plant Protoplast in Electric Field and Membrane Breakdown Mechanism

M. HARA,\* J. SUEHIRO\* and H. HOKAMURA\*

(Received June 1, 1990)

This paper deals with deformation process of a plant protoplast isolated from *Daucus carota* in high frequency electric field, and also breakdown mechanism of the cell membrane with pulse electric field. A spherical protoplast is deformed into a rotational ellipsoid under the action of Maxwell stress in the high frequency electric field. The value of elastic area compressibility modulus of the membrane derived from the experimental results and an elastic theory is about 200 mN/m, and in good agreement with results by other measurement technique. With rather moderate high frequency electric field, a transient cell movement with pulse application is observed prior to cell rupture, and may be attributed to a hydrostatic flow generated by electroosmosis. The membrane tension produced by the electric field through cell deformation process is not high enough to lyse the membrane, although aggregation of intramembranous macro molecules such as proteins by the field may have a considerable effect on reversibility of the membrane electrical breakdown.

### 1. まえがき

近年、誘電泳動による細胞分離や、パルス電界を用いた細胞膜の電気穿孔、電気細胞融合など、バイオテクノロジーへの静電気応用が盛んに研究されている<sup>1,2)</sup>。電界中での細胞の挙動を理解するためには、細胞固有の物性や構造を考慮した考察が不可欠であり、電気細胞融合を例にとってみると、その要となるパルス電界による細胞膜破壊機構に関し、各種細胞や人工膜を用いて数多くの研究が行われている<sup>2)</sup>。現在広く受け入れられている破壊条件は、細胞膜の電気ならびに機械的特性としてそれぞれ誘電率と弾性率を考慮し、外部電界によるマクスウェル応力と、膜圧縮応力とのつり合いを定式化したものである<sup>3)</sup>。しかしながら、膜破壊条件はその他の様々な要因によっても大きく影響されることが報告されており、例えば膜内タンパク質分子、Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>などの各

種カチオン、膜張力および温度などの影響が指摘されている<sup>4)</sup>。ところで、電気細胞融合では、最初に高周波電界を細胞懸濁液に印加し、誘電泳動によって形成されたペールチェインを融合細胞対として用いる方法が一般的である<sup>5)</sup>。ペールチェイン形成にはある一定値以上の電界強度が必要であるが<sup>6)</sup>、電界強度を更に増加させると細胞が電界方向に伸長し、また細胞同士の接触部は平坦化する<sup>7)</sup>。Zimmermann ら<sup>5)</sup>は、融合用のパルス印加直前に高周波電界強度を増加させると融合効率が上昇することから、膜内タンパク質分子の外部電界による移動を示唆した。Bryant ら<sup>8)</sup>は、電界による細胞の変形とそれに伴って発生する膜張力を理論的に解析し、これらによる膜破壊の可能性を指摘している。これらの結果は、膜破壊条件が、パルス電界による膜圧縮だけでなく、本来誘電泳動のために使用される高周波電界によっても影響を受け得ることを暗示している。一方、細胞膜や原形質の粘性、弾性、表面力などの力学的性質は細胞の生理的状態と深く係わっており、細胞の物理的構造変化との関連性に興味が持たれている。Engelhardt ら<sup>9)</sup>はヒト赤血球にパルス電界を印加した際の変形量を測定し、理論モデルと対比することによって血球の剛性率、粘性率

キーワード：電界、プロトプラスト、変形、膜破壊、タンパク質分子

\* 九州大学工学部電気工学科 (812 福岡市東区箱崎 6-10-1)  
Department of Electrical Engineering, Faculty of Engineering, Kyushu University, 6-10-1, Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka, 812 Japan

を実測する方法を提案、更に各種疾患の診断への応用を試みている。このような細胞の粘弾性計測法は、臨床分野における将来の幅広い応用が期待されている。

本研究では、まず、植物プロトプラストに高周波電界を印加した場合の変形過程を実験により調べ、更に細胞の弾性体モデルから得られる解析結果を用いて、その弾性率と変形に伴い発生する膜張力の推定を行った。また、高周波電界により変形した植物プロトプラストにパルス電界を印加した場合の細胞破壊現象を観察し、膜破壊機構に及ぼす高周波電界の影響についても検討を行った。

## 2. 電界による細胞の変形と細胞膜破壊

本章では後の議論とも関連して、高周波電界中における細胞変形と、パルス電界による膜破壊機構に関するこれまでの研究を簡単にまとめ、その基本概念を説明する。

### 2.1 電界中における細胞の変形

誘電液体中に混入された液体粒子や気泡が外部電界の影響で電界方向に伸長する現象は、絶縁油などの絶縁破壊機構に関連して詳しく研究されている<sup>10)</sup>。このような変形は、異なる誘電率を持つ二種類の誘電体の境界に作用するマクスウェル応力によって引き起こされ、電界中における細胞変形も、基本的にはこれと同一の機構によるものと考えられている<sup>8,9)</sup>。また、マクスウェル応力は電界強度だけでなく誘電率にも依存するので、高周波電界やパルス電界を用いる場合が多い細胞操作の分野では、細胞および懸濁液の分散特性も考慮する必要がある。パールチェイン形成など、細胞操作に応用される現象の多くは、界面（Maxwell-Wagner）分極が支配的となる $\beta$ 分散以下の周波数領域で発生するものであり、その特性周波数は約1~10MHzである。このような周波数領域では、マクスウェル応力は周波数に依存せずほぼ一定である。また、細胞内の原形質は、細胞膜に比べて高い導電率を示すので、この部分の電界強度を零と見なすことができる。したがって、細胞膜に作用するマクスウェル応力 $P_M$ は、膜の外側方向を正に取ると

$$P_M = \epsilon_m E_s^2 / 2 \quad (1)$$

と表される<sup>8,9)</sup>。ただし、 $\epsilon_m$ は細胞膜誘電率、 $E_s$ は膜の懸濁液側表面における電界強度である。

### 2.2 電界による細胞膜破壊

Saleら<sup>11)</sup>はバクテリア、イースト菌、赤血球などの懸濁液にパルス電界を印加し、細胞の破壊、変形について観察を行った。また、彼らは外部電界によって誘起される膜電位差に着目し、実験的に定まる膜破壊条件として、これを約1Vとすることを提案した。周波数 $f$ の外

部電界 $E_0$ によって半径 $R$ の細胞に誘起される膜電位差 $\Delta V$ は、次式で与えられる<sup>4)</sup>。

$$\Delta V = 1.5 R E_0 \cos \theta / \sqrt{1 + (\omega \tau)^2} \quad (2)$$

ここで、 $\theta$ は膜上の任意の点と電界方向がなす角度、 $\omega (=2\pi f)$ は電界の角周波数である。また、 $\tau$ は

$$\tau = RC_m(\rho_1 + 0.5\rho_s) \quad (3)$$

と表される。ただし、 $C_m$ は膜の単位面積当たりの静電容量、 $\rho_1$ 、 $\rho_s$ はそれぞれ原形質、懸濁液の抵抗率である。

Crowley<sup>3)</sup>は、細胞膜を平行平板コンデンサとしてモデル化し、膜電位差 $\Delta V$ によるマクスウェル応力と圧縮応力のつり合いを考慮した膜破壊条件として次式を提案している。

$$\epsilon_m \Delta V^2 / 2 Y_m h_0^2 = C_m \Delta V^2 / 2 Y_m h_0 \approx 0.18 \quad (4)$$

ここで、 $Y_m$ は膜のヤング率、 $h_0$ 、 $h$ は圧縮前、後の膜厚である。典型的な細胞膜の物性値として、 $\epsilon_m = 10^{-10}$  F/m、 $h_0 = 10$  nm、 $Y_m = 10^7$  N/m<sup>2</sup>、 $C_m = 10$  mF/m<sup>2</sup>を用いると、(4)式より膜破壊に必要な膜電位差の値は

$$\Delta V \approx 1.9 \text{ V} \quad (5)$$

となり、実験結果とよく一致する。ところで、膜や細胞の破壊は、マクスウェル応力のような電界力だけではなく、膨圧などの様々な機械的外力によって引き起こされ、そのために必要な膜単位面積当たりのエネルギー、すなわち膜張力は約4mN/mとされている<sup>12)</sup>。先に示した電界による破壊条件 $\Delta V \approx 1$ Vを、この時コンデンサに蓄えられる単位面積当たりの電気エネルギーとして表現すると、

$$C_m \Delta V^2 / 2 = 5 \text{ mJ/m}^2 = 5 \text{ mN/m} \quad (6)$$

となり、機械的破壊条件とほぼ同じ結果が得られることがわかる。Needhamら<sup>13)</sup>は、膜張力 $T$ とマクスウェル応力による膜圧縮の両方を考慮した破壊条件として、次式を提案している。

$$T + C_m \Delta V^2 / 2 = T + \epsilon_m (\Delta V^2 / h) / 2 = k_A \alpha \quad (7)$$

ここで、 $k_A$ は膜の面積弾性率、 $\alpha$ は圧縮による膜面積の相対増加率である。(7)式は、膜張力と膜圧縮によって膜に注入されるエネルギーの和が、臨界値 $k_A \alpha$ に達すると膜破壊が起きることを示している。

## 3. 実験装置と方法

### 3.1 実験装置

本研究に用いた実験装置の概略を図1に示す。実験系は、(1)電界発生用電源、(2)電極系、(3)観測系の3つに大別できる。以下、各々の部分について説明する。

(1) 電界発生用電源：本研究では、誘電泳動と細胞変形のための高周波電界と、細胞膜破壊用のパルス電界との二種類の電界を使用した。各々の電界を発生させるための電圧は、ファンクションジェネレータおよびパルス

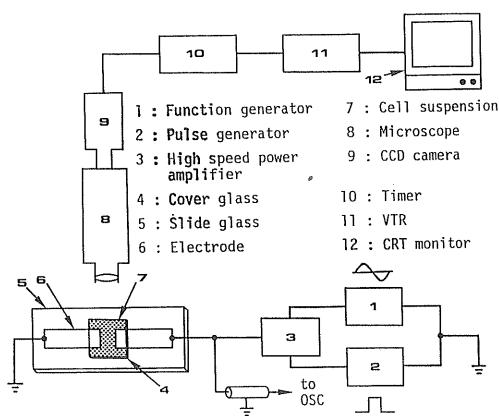
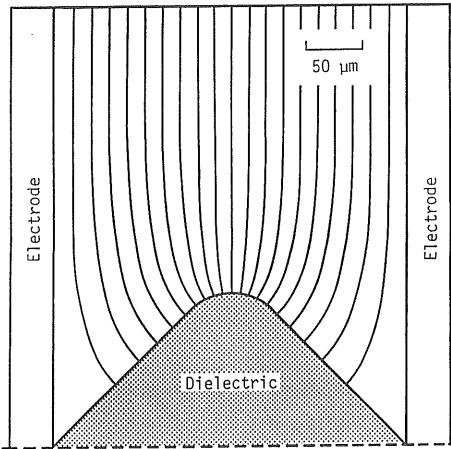


図1 実験装置の概略

Fig. 1 Schematic diagram of experimental setup.

図2 誘電体を挿入した電極系における電位分布計算結果  
Fig. 2 Calculated potential distribution in electrode system with dielectric insertion.

ジェネレータの出力信号を、高速電力増幅器によって電圧増幅したものである。

(2) 電極系：電気細胞融合では、一般に平行平板電極系や平行線電極系が用いられているが、このような電極系では電極表面の微小な凹凸部に電界集中部が形成され、誘電泳動によって細胞が電極表面に固定されやすい。この場合、(2)式からもわかるように、膜電位差が最大となり、破壊が最初に起こると考えられる電界方向の細胞極部が電極に接触し、細胞の破壊過程の詳細な観察が困難となる。また、細胞は電極垂直方向に伸長するので、変形過程の観察にも支障を来たすこととなる。そこで、本研究では、図2のように加工した誘電体(PET)フィルムを、スライドグラス上に固定したギャップ長300 μmのアルミ平行平板電極間に挿入し、ギャップ間

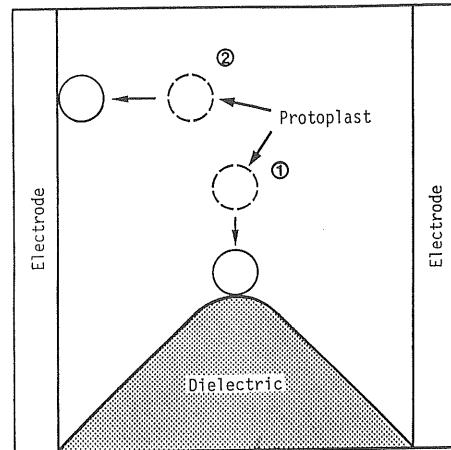


図3 電極系内の誘電泳動による細胞挙動

Fig. 3 Dielectrophoretic cell motion in electrode system.

の電界制御を行った<sup>14)</sup>。同電極系内の電位分布を、紙面垂直方向を無限長とし、境界要素法によって求めた結果を図2に示す<sup>14,15)</sup>。本研究で用いた電極およびPETフィルムの厚さは約500 μmであり、細胞径の約10倍であるので、細胞が感じる電界はこのような二次元近似で求めることができる。図2からも明らかなように、同電極系では誘電体先端に電界が集中し、先端から数十 μm離れた位置では平均電界強度  $E_{AV}$  の1.2倍程度である。そこで、本研究では、細胞近傍の電界強度は  $E_{AV}$  にはほぼ等しいものとし、次式より近似的に求めた。

$$E \approx E_{AV} = V/d \quad (8)$$

ただし、Vはギャップ印加電圧(高周波電界の場合は実効値)、dはギャップ長である。図3は同電極系内の細胞懸濁液に高周波電界を印加した時の細胞の挙動を模式的に表したものである。誘電体から離れた位置では、細胞は電極表面に固定されるが(同図中②)、誘電体近傍に浮遊する細胞は、誘電泳動力によって先端部に引き寄せられ、更には固定されること(同図中①)が実際に確認できた。

(3) 観察系：細胞挙動の観察には、偏光顕微鏡を使用した。鏡筒にはモノクロCCDカメラを接続し、CRTモニタ上でも観察できるようにするとともに、画像をVTRに記録、再生画像を用いて詳細な観察、測定を行った。

### 3.2 実験試料

本研究では、植物プロトプラストを研究対象とし、ニンジン根(*Daucus carota*)から分離したプロトプラストを試料として用いた。洗浄・殺菌したニンジン根の細片を、マセロザイムとセルラーゼの両方を含む酵素液を用

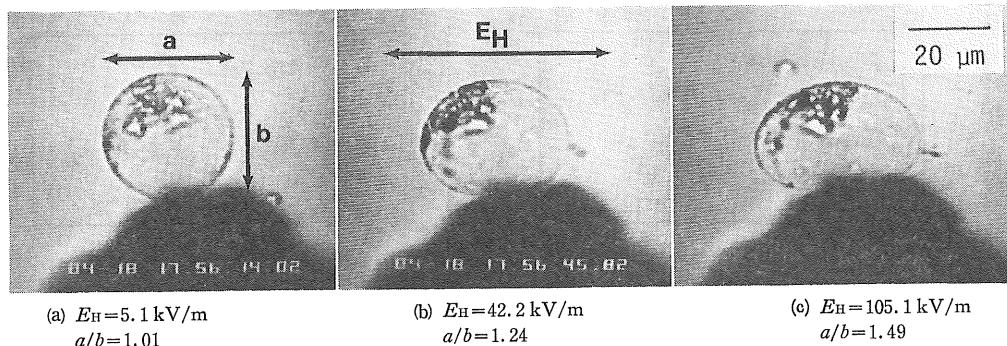


図4 高周波電界中における細胞の変形過程

Fig. 4 Cell deformation process in HF electric field.

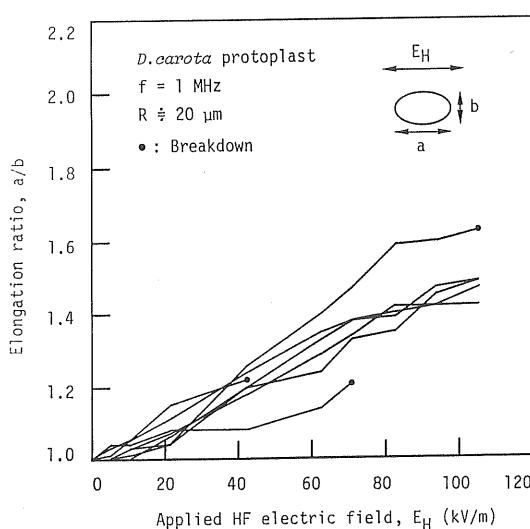


図5 細胞変形率の高周波電界強度依存性

Fig. 5 Dependence of cell deformation on HF electric field strength.

いた一段階法で処理<sup>16)</sup>、単離したプロトプラストを導電率  $10^{-4} \text{ S/m}$  の  $0.5 \text{ M}$  マンニトール溶液に懸濁した。プロトプラストの初期形状はほぼ完全な球形で、大きさは直径  $30\sim60 \mu\text{m}$  程度である。

### 3.3 実験方法

実験はすべて室温条件下で行った。電極間に懸濁液を滴下(約  $10 \mu\text{l}$ )、カバーガラスで蓋をした後、 $10 \text{ kV/m}$  程度の正弦高周波電界(周波数  $1 \text{ MHz}$ )を印加し、誘電泳動によって一個のプロトプラストを誘電体の先端に図3中①のように固定した。その後、高周波電界を最大  $100 \text{ kV/m}$  の範囲内で変化させ、その時の変形過程を観察した。また、細胞破壊の実験は、各高周波電界強度において、パルス幅  $1 \text{ ms}$  の单発矩形パルス電界を重畳して印加し、細胞が機械的に破壊するまで、徐々に強度を増すことによって行った。以上の実験を同一組織から分

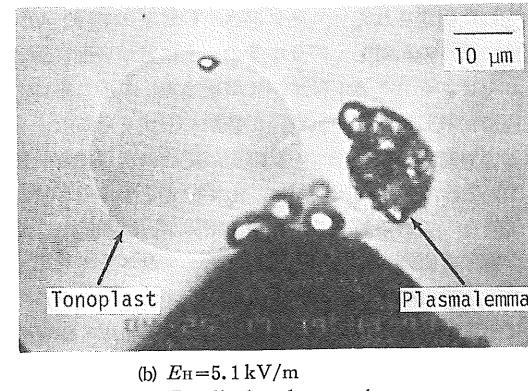
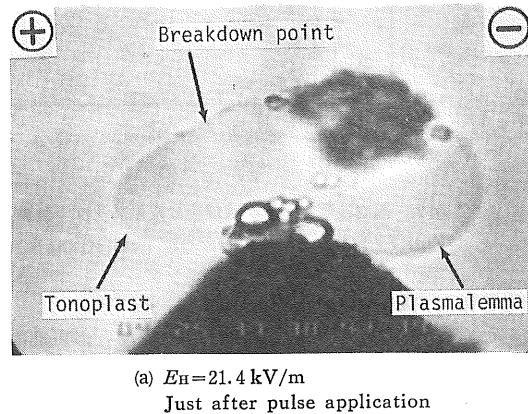


図6 パルス電界によって破壊した細胞

Fig. 6 Cell lysis with pulse electric field application.

離した多数のプロトプラストについて繰り返し行った。

## 4. 実験結果

### 4.1 高周波電界によるプロトプラストの変形

高周波電界強度  $E_H$  の増大に伴うプロトプラスト形状変化の一例を、図4に示す。プロトプラストは、電界方

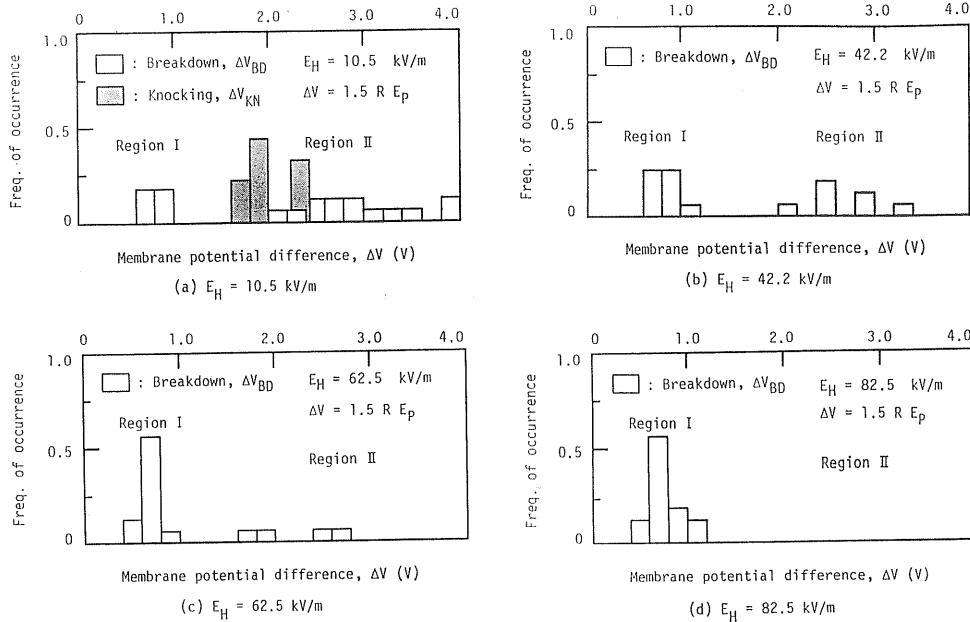


図7 高周波電界強度が破壊膜電位差に及ぼす影響

Fig. 7 Effect of HF electric field strength on lethal potential difference across membrance.

向を長軸とする回転梢円体状に変形し、電界増大に伴い変形の度合いも大きくなることがわかる。また、一部のプロトプラストでは、変形途中で破壊する場合も認められた。最高電界  $E_H=100 \text{ kV/m}$  を印加した場合、誘電体先端に固定されたプロトプラストの破壊率は約 40% 程度であるのに対し、図3中②のように電極表面に固定されたプロトプラストはすべて破壊する。このことは、電極に接触した状態の細胞膜が破壊しやすくなることを示しており、本研究で用いた細胞固定法の有用性を物語っている。また、同図(c)では、上半分と下半分の形状が若干異なっているが、これは印加電界が比較的高い場合、電界垂直方向に誘電体からプロトプラストに作用する誘電泳動力の反力を細胞変形に寄与するようになるためであると考えられる。図5は、直径約  $40 \mu\text{m}$  のプロトプラストを選び、長軸と短軸の比 ( $a/b$ ) として定義した変形率の電界依存性を示したものである。個々の細胞ごとに詳細な変形過程は多少異なっているが、全体的な特性はほぼ一致しており、 $100 \text{ kV/m}$  の高電界中における変形率は、約 1.5 程度である。

#### 4.2 パルス電界による細胞膜破壊

図6は、パルス電界によるプロトプラストの破壊過程を示したものである。図中の+、-の記号は、パルス電界の極性に対応している。(2)式から予想されるように、破壊は電界方向の細胞極部において発生することが確認された。同図(a)は、高周波電界により変形したプロ

トプラストにパルス電界を重畠して印加し、破壊した陽極側の細胞膜内部から同じように変形した液胞が露出した瞬間の様子である。更に、破壊部からは原形質や色素体などが勢いよく噴出し、その周囲には一時的に乱流が形成される。多くの場合、細胞膜が破壊した後の誘電体先端には、液胞が残留しているのが認められた。これら液胞は、内部に小器官を全く含んでおらず、プロトプラストとは容易に識別できる。また、破壊後に高周波電界を除去すると、液胞は変形前のプロトプラストとほぼ同じ大きさ、形状に復帰する(同図(b))。これらのことから、本研究で用いたニンジン根プロトプラストでは、細胞膜の内側に液胞膜が同心球状に密着して存在し、その間に原形質や小器官がごく薄い層状に分布しているものと考えられる。Gimsa ら<sup>17)</sup>は、回転電界中における各種植物プロトプラストの回転スペクトルを調べ、その構造を4種類に分類しているが、その内の一つとして、前述の密着同心球モデルをあげている。

図7は、各高周波電界強度  $E_H$  における破壊時の膜電位差  $\Delta V_{BD}$  の分布を示したものである。 $\Delta V_{BD}$  の算出にあたっては、先の観察結果から(2)式において  $\theta=0, \pi$  とした。更に、 $1 \text{ MHz}$  の高周波電界  $E_H$ 、 $1 \text{ ms}$  のパルス電界  $E_p$  の  $\omega\tau$  は、(3)式よりそれぞれ約  $10^8$ 、1 となるので、膜電位差への  $E_H$  の寄与分は無視し、破壊時のパルス電界強度  $E_{pBD}$  より、次式を用いて  $V_{BD}$  を求めた。

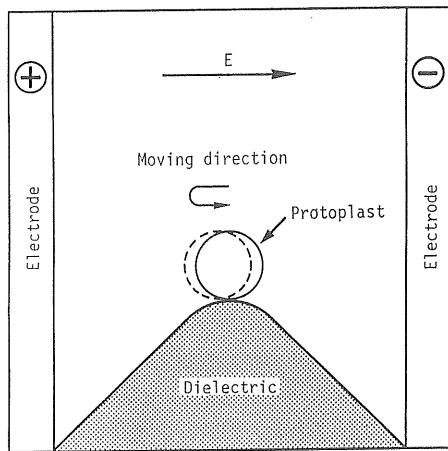


図 8 パルス印加時のノッキング現象

Fig. 8 "Knocking" phenomenon observed with pulse application.

$$\Delta V_{BD} \approx 1.5 R E_{PBD} \quad (9)$$

$E_H < 80 \text{ kV/m}$  の場合、 $\Delta V_{BD}$  は二つの領域 I, II にわかれて分布する傾向を示す (図 7(a), (b), (c))。破壊膜電位差の平均値は領域 I では約 1 V、領域 II では 2~3 V である。また、領域 II で破壊が起こる場合、破壊に先立ち、固定されたプロトプラストが、パルス印加に同期して、図 8 に示したように微動する現象が確認された。移動方向は常に電界方向に平行で、陽極方向に動いた後に直ちに元の位置に復帰し、その移動量は数  $\mu\text{m}$  程度である。筆者らは、この現象をその動きからノッキング (knocking) と名付けた。ノッキングが出現する時の膜電位差  $\Delta V_{KN}$  は、領域 I と II のほぼ中間に分布している (図 7(a))。 $E_H$  の増加に伴い領域 II の出現確率は漸減し、 $E_H > 80 \text{ kV/m}$  では領域 I のみが出現するが、その平均値は  $E_H$  に依存せず、やはり約 1 V である (図 7(d))。また、破壊前駆現象としてのノッキングも観察されず、静止状態から直接破壊に至る。

## 5. 考 察

### 5.1 細胞の弾性体モデルと変形率の推定

Bryant ら<sup>8)</sup>によれば、外部電界  $E_H$  中における初期半径  $R$  の細胞のマクスウェル応力による変形率  $a/b$  は、次の非線形方程式の解  $\eta$  を求めることによって決定できる。

$$K_4 \eta^3 - \eta^2 - (2 + K_4) \eta + (K_3 - 1) = 0 \quad (10)$$

ただし、

$$\eta = E_H^2 / K_2 \quad (11)$$

$$K_1 = K_1(C_m, R, \mu), K_2 = K_2(\beta, C_m, R, \mu), \quad (12) - (15)$$

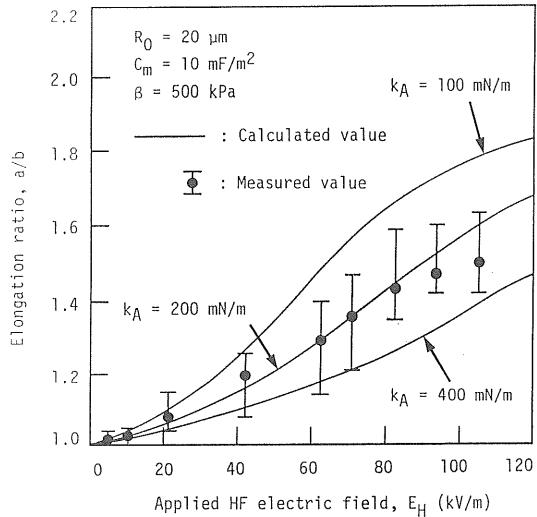


図 9 弾性体モデルによる細胞変形率の理論値

Fig. 9 Theoretical dependence of cell deformation on HF electric field strength.

$$K_3 = K_3(\mu), K_4 = K_1 K_2 / k_A$$

$\beta$  は細胞内原形質の弾性率、 $\mu$  は変形後の細胞 (回転椭円体) の離心率の逆数である。変形率  $a/b$  は次式で与えられる。

$$a/b = \mu / \sqrt{\mu^2 - 1} \quad (16)$$

また、膜張力  $T$  は

$$T = (P + P_M) / \zeta \quad (17)$$

と表される。ここで、 $P$  は変形時の体積変化に伴う原形質応力、 $\zeta$  は細胞表面の曲率である。

図 9 は、(10)~(16)式を用いて、変形率の高周波電界強度  $E_H$  に対する依存性を、細胞膜の面積弾性率  $k_A$  をパラメータとして求めた結果である。更に、図 5 に示した変形率実測値の平均値も、比較のために併せて示した。同図より、 $k_A = 200 \text{ mN/m}$  とした場合、解析結果と実験結果が比較的よく一致していることがわかる。Wolfe ら<sup>12)</sup>によれば、マイクロビペット吸引法によって測定した植物プロトプラスト細胞膜の  $k_A$  の値は約 230  $\text{mN/m}$  であり、先の結果とほぼ一致している。

### 5.2 高周波電界中における細胞変形に伴う膜張力

図 10 は、(17)式より求めた電界方向の細胞極部における膜張力  $T_P$  の高周波電界強度依存性である。最高電界強度 100  $\text{kV/m}$  を印加した場合の膜張力は 40  $\text{mN/m}$  にも達し、これは(6)式で与えられる破壊条件の約 10 倍である。しかしながら、高周波電界のみを用いた先の実験結果によれば、(6)式の条件下 ( $E_H \approx 30 \text{ kV/m}$  に対応) におけるプロトプラストの破壊は全く認められず、また、最高電界印加時においてさえ、半数以上のブ

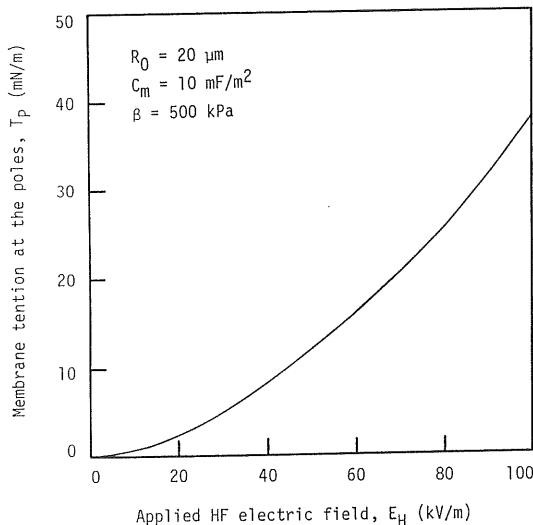


図 10 弾性体モデルによる膜張力の理論値

Fig. 10 Theoretical dependence of membrane tension on HF electric field strength.

ロトプラストが破壊に至らない。更に、(7)式によれば、膜張力が存在する場合には破壊に必要な膜電位差、すなわちパルス電界強度が低下するはずである<sup>18)</sup>。ところが、図7からもわかるように、高周波電界は $\Delta V_{BD}$ の値そのものよりも、その分布特性に影響を与える。以上のことから、高周波電界によってプロトプラストが変形した場合であっても、それに伴い発生する膜張力は、実際には(17)式で予測される値よりもかなり小さいものと考えられる。Bryantらのモデルでは、膜張力の発生源としてマクスウェル応力と共に細胞内原形質の応力を考慮している。しかし、3章で述べたように、本研究で用いたニンジンプロトプラストでは、液胞がプロトプラスト内部の大部分を占め、原形質は薄い層状に分布しているものと考えられる。このような細胞では、体積変化に伴う原形質応力はそれほど大きくなるとは考えられず、このために図10の計算結果は、実際の値よりもかなり高い値になっているものと考えられる。

### 5.3 高周波電界が膜破壊に及ぼす影響

前節で述べたように、高い強度の高周波電界によってプロトプラストが変形した場合であっても、膜破壊を引き起こす程の膜張力は発生していないと考えられる。しかし、図7からも明らかのように、パルス電界による膜破壊機構に高周波電界が何らかの影響を及ぼしていることも確かである。本節では、この点について考察を行う。

#### 5.3.1 ノッキング現象の発生メカニズム

パルス電界によるプロトプラストのノッキング現象の

特徴として、その方向が常に正電極方向であることがあげられる(図8)。Dimitrovら<sup>18)</sup>は、蛍光色素で染色した血球ゴーストにパルス電界を印加すると、負電極側の細胞極部から蛍光色素が懸濁液中へ放出される現象を観察している。同氏らは、この現象をパルス電界による膜の可逆破壊と電気浸透(electroosmosis)によって以下のように説明している。通常、細胞表面は負極性に帶電しており、カウンタイオンとして分布する正電荷と共に電気二重層を形成している。ここでパルス電界による電気穿孔を行うと、これらの正電荷は電気泳動力によって小孔中を負電極方向に瞬時に駆動され、その周囲に同じ方向の過渡的な流れ場を形成する。このような細胞内部から外部への流体移動は、細胞に正電極方向の反動力を及ぼすはずである。したがって、ノッキングの発生機構は、その方向性から、電気浸透による負極方向への流体移動によって説明できるものと考えられる。

### 5.3.2 高周波電界による非可逆破壊から可逆破壊への移行

既に述べたように、高周波電界強度が比較的低い場合に観察されるノッキング現象は、パルス電界による細胞膜の可逆破壊と密接に関連している。ノッキング発生時の膜電位差 $\Delta V_{KN}$ は、図7(a)に示したように $\Delta V_{BD}$ の分布領域I, IIの中間に分布しているが、ノッキング現象の確認を検鏡により行ったことなどを考慮すると、可逆破壊そのものは更に低い膜電位差で発生していると考えられる。そこで、可逆破壊発生時の膜電位差の分布が $\Delta V_{BD}$ の領域Iと一致していると仮定すれば、図7に示した実験結果を次のように解釈することができよう。すなわち、 $E_H$ が低い場合には、領域Iにおいて可逆的、非可逆的膜破壊が混在して観察される。前者に更に大きな膜電位差を印加すると非可逆破壊に転じ、これが領域IIに対応する。これに対し、 $E_H > 80 \text{ kV/m}$ 程度になると、領域Iの破壊はすべて非可逆破壊となり、領域IIにおける破壊は観察されなくなる。したがって、高周波電界は、パルス電界による膜破壊の特徴の一つであるその可逆性を失わせる効果を持っていると考えられる。高強度の高調波電界によって、膜破壊現象にこのような変化が起きるメカニズムを、筆者らは膜内タンパク質の分布に関連づけて、以下のように考えている。生体膜の動的構造は、リン脂質二重層内に多数のタンパク質分子が混在した、いわゆる流动モザイクモデルによって説明されている<sup>19)</sup>。電界による膜破壊部位に多数のタンパク質分子が存在する場合、電界除去後にリン脂質分子が再整列する過程が阻害され、その後の速やかな膜修復に支障を来し、膜破壊が非可逆的になりやすい<sup>5, 20)</sup>。Zimmermannら<sup>5)</sup>は、高周波電界によってタンパク質分子が電

界方向の細胞極部に集中する可能性を指摘している。本研究においても、高周波電界強度が比較的高い場合には、電界方向の細胞極部の膜内に含まれるタンパク質分子が増加し、同じ場所で発生するパルス電界による膜破壊機構に前述のような影響を及ぼすものと考えられる。しかしながら、細胞膜内のタンパク質分子の分布が、高周波電界によって実際にどのように変化しているかは現時点では明らかではなく、これについては今後の検討課題としたい。

## 6. む　す　び

本研究では、電気細胞融合において本来誘電泳動による融合細胞対形成のために用いられる高周波電界が、細胞の形状およびパルス電界による細胞膜破壊現象にどのような影響を及ぼすかを、植物プロトプラストを用いて調べた。主な結果を要約すると、以下のようになる。

1. 球形であるプロトプラストは、高周波電界によって球形から回転橢円体に変形し、その変形率は電界強度と共に増大する。
2. 細胞の弾性体モデルを用い、マクスウェル応力によるプロトプラスト変形過程の解析を行った。解析結果と実験結果との比較から、細胞膜の面積弾性率は約 200 mN/m と推定され、他の方法による値とはほぼ一致する結果が得られた。
3. 高周波電界強度が比較的低い場合、破壊時にパルス電界によって誘起される膜電位差  $\Delta V_{BD}$  は、二つの領域に分かれて分布する。これらの中間の膜電位差では、電気浸透によるものと考えられるプロトプラストの正電極方向への微動が観察される。
4. 高周波電界による細胞変形は、破壊をもたらすほど膜張力を伴わない。一方、膜内タンパク質分子の分布状態の変化は、膜破壊の可逆性に影響を及ぼすものと考えられる。

最後に、本研究の一部は、文部省科学研究費および稲盛財団助成金によったことを記し、謝意を表する。

## 参 考 文 献

- 1) H.A. Pohl : *Dielectrophoresis*, p. 350, Cambridge, London (1978)
- 2) E. Neumann, A.E. Sowers and C.A. Jordan : *Electroporation and Electrofusion in Cell Biology*, p. 59, Plenum Press, New York (1989)
- 3) J.M. Crowley : *Biophys. J.*, 13 (1973) 711
- 4) U. Zimmermann : *Biochim. Biophys. Acta*, 694 (1982) 227
- 5) U. Zimmermann and J. Vienken : *J. Membrane Biol.*, 67 (1982) 165
- 6) H.P. Schwan and L.D. Sher : *J. Electrochem. Soc.*, 116 (1969) 22 C
- 7) W. Mehrle, R. Hampp, U. Zimmermann and H.P. Schwan : *Biochim. Biophys. Acta*, 939 (1988) 561
- 8) G. Bryant and J. Wolfe : *J. Membrane Biol.*, 96 (1987) 129
- 9) H. Engelhardt and E. Sackmann : *Biophys. J.*, 54 (1988) 495
- 10) K.C. Kao : *Nature*, 208 (1965) 279
- 11) A.J.H. Sale and W.A. Hamilton : *Biochim. Biophys. Acta*, 163 (1968) 37
- 12) J. Wolfe and P.L. Steponkus : *Plant Physiol.*, 71 (1983) 276
- 13) D. Needham and R.M. Hochmuth : *Biophys. J.*, 55 (1989) 1001
- 14) S. Masuda, M. Washizu and T. Nanba : *Conference Record of IEEE/IAS '87*, p. 1549, Atlanta, Georgia (1987)
- 15) 末廣純也, 原 雅則 : 静電気学会講演論文集 '89, p. 197, 静電気学会 (1989)
- 16) 竹内正幸 : 植物の組織培養, p. 108, 裳華房 (1987)
- 17) J. Gimza, G. Fuhr and R. Glaser : *Studia Biophysica*, 109 (1985) 5
- 18) D.S. Dimitrov and A.E. Sowers : *Biochim. Biophys. Acta*, 1002 (1990) 381
- 19) S.J. Singer and G.L. Nicolson : *Science*, 175 (1972) 720
- 20) G. Pilwat, H.P. Richter and U. Zimmermann : *FEBS Lett.*, 133 (1981) 169