

論 文

植物プロトプラスト用セルソータの開発,  
および融合プロトプラストの選別利用

川上友則\*, 熊谷友良\*  
ロナルド ダヨン\*, 水野彰\*

(1993年2月17日受理)

Development of a Specialized Cell Sorter for Plant Protoplasts  
and Its Application in the Separation of Electrically-Fused  
Plant Protoplasts

Tomonori KAWAKAMI,\* Tomoyoshi KUMAGAI,\* Lonald DAYON\*  
and Akira MIZUNO\*

(Received February 17, 1993)

Cell sorters have been applied in the field of immunology and genetic engineering because they can analyze the optical characteristics of cells and evaluate their survival conditions at high speed. Plant biology is a new field of application for these devices.

Conventional cell sorter have been developed for animal cells having a diameter of 5 to 10  $\mu\text{m}$ . But for plant protoplasts, having a diameter of about 10 to 100  $\mu\text{m}$ , the cell sorters cannot be applied, because plant cells are fragile. The plant protoplasts are destroyed when they come out of the nozzle or when they are recovered in the collecting system. In order to solve these problems, the authors developed a special "air-sheath nozzle" which uses air pressure to squeeze the liquid spray, and a parafilm collecting system, which reduces the impact forces on the plant protoplasts.

The combined effect of these improvements was a substantial rise in the sorting speed. The frequency of droplet formation increased from 3.0 kHz to 15.0 kHz. The characteristic features of the air-sheath nozzle are: —inner nozzle diameter: 250  $\mu\text{m}$ ; —inner nozzle squeezing angle: 25°; —outer nozzle diameter: 300  $\mu\text{m}$ ; —outer nozzle squeezing angle: 24°. The authors analyzed the effect of outer nozzle pressure on the trajectory stability of deflected droplets and on the constancy of droplet-charging voltage delay time. At the optimum pressure of 14.2 kPa and at the droplet formation frequency of 15.0 kHz, almost 90% of the plant protoplasts passed undamaged through the nozzle.

Using this system, the fusions of different kind of protoplasts has been sorted. The initial experiments were made with FITC-dyed cabbage protoplasts and non-stained chinese cabbage protoplasts. The fusion rate between different kind of protoplasts was 1%. The concentration of fused cells increased to 80-90% by using the improved cell sorter. When RITC dye was employed to stain chinese cabbage protoplasts, the concentrate obtained after sorting contained 100% fused cells.

キーワード: 植物プロトプラスト, セルソータ, フローサイトメトリ, 細胞融合, 細胞操作

\* 豊橋技術科学大学工学部電気電子工学専攻 (441 愛知県豊橋市天伯町雲雀ヶ丘 1-1)

Department of Electrical and Electronic Engineering, Faculty of Engineering, Toyohashi University of Technology, 1-1, Hibarigaoka, Tenpaku-cho, Toyohashi-shi, Aichi, 441 Japan

1. はじめに

近年、遺伝子導入や融合等の操作による植物品種の研究において、有用プロトプラストの高速度分離技術の重要性が高まっている。セルソータはこのための有用な装置ではあるが、現時点では機械的強度の小さい植物プロ

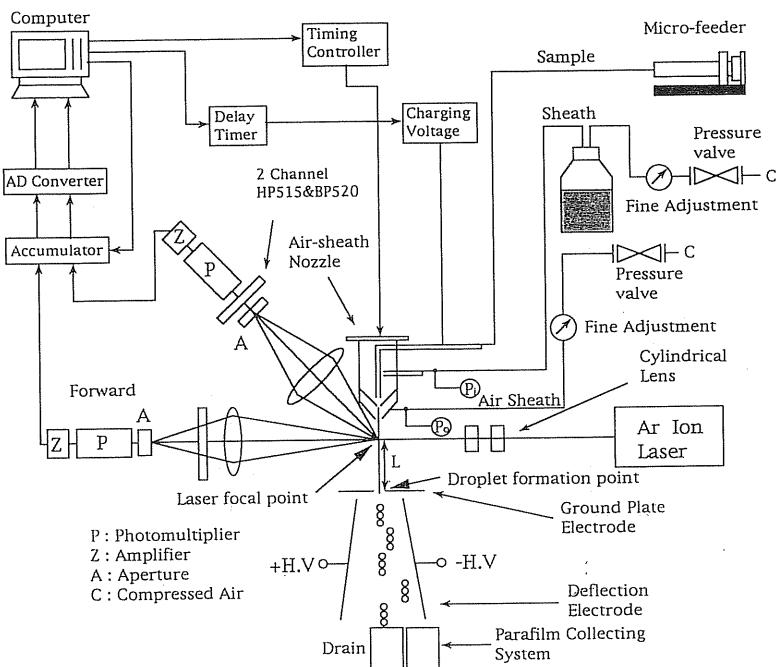


図1 セルソータの構成図

Fig. 1 Structure diagram of the cell sorter.

トプラストの高速度選別は困難である。その原因は、ノズルから噴出される時および液滴を回収する時にプロトプラストが破壊されるためである<sup>1,2)</sup>。

これらの問題を解決するため、ノズル出口液流速やノズル口径等の改良がいくつかの研究グループによって行われている<sup>3-5)</sup>。また、それらの改良型セルソータで FITC (Fluorescein-5-isothiocyanate) と RITC (Rhodamine Bisothiocyanate)<sup>6)</sup>, FDA (fluorescein diacetate) とクロロフィル<sup>7)</sup>, Carboxyfluorescein とクロロフィル<sup>8)</sup>の蛍光を用いて融合プロトプラストの選別を行った報告がなされている。しかし、それらの改良型セルソータはプロトプラストの損傷を防ぐために大きい液滴を用いる必要があることから液滴化周波数が 3.0 kHz 以下と、従来型セルソータの 10 分の 1 程度の速度で動作させている<sup>9)</sup>。著者らはセルソータにおいてプロトプラストの破壊を低減して選別速度を向上させるため、エアーシースノズルとパラフィルム捕集器を開発し、それらが有効であることを報告した<sup>1,10)</sup>。それらを組み込んだ植物プロトプラスト用セルソータを製作し、エアーシースノズルの偏向液滴の安定性、および液滴荷電遅延時間特性を調べ、エアーシースノズルをセルソータに用いることのできる動作条件を求めた。そして、その動作条件で FITC と RITC、および FITC とクロロフィル蛍光を用いて、異種間融合プロトプラストの高速度選別を行った

ので報告する。

## 2. 植物プロトプラスト用セルソータ

### 2.1 全体構成

植物プロトプラスト用セルソータの構成を図1に示す。プロトプラストを含むサンプル液は、シリンジ(10 ml)を利用して定量供給装置(マイクロフィーダ)で供給している。シース液(バッファ液)は溶液の入っている容器を加圧してエアーシースノズルに圧送している。また、エアーシースノズルのエアーフローは、直接ポンベから圧送している。ノズルから噴出した液柱にレーザ(NEC 製: 0.7 W: 波長 488 nm)を集光して照射し、プロトプラストが通過する時の前方散乱光強度および 2 種類の蛍光強度を光電子増倍管(P.M.T)で電気信号に変換しコンピュータ(NEC PC9801RA)に取り込み、事前に設定してある目的サンプルの信号かどうかを判断する。ノズル上部の超音波振動子により、ノズル出口から一定の距離において、液柱から均一な液滴を形成する。目的サンプルの信号を受けたときのみ、一定の遅延時間(レーザ焦点を通過したサンプルが液柱先端部まで移動する時間: 荷電遅延時間)を経てノズルに液滴荷電用のパルス電圧を印加し、静電誘導で電荷を与える<sup>11)</sup>。この時、荷電量を安定に保つため荷電電圧を振動子電圧に対し一定の位相で印加する<sup>12)</sup>。荷電液滴は、直角高電圧を

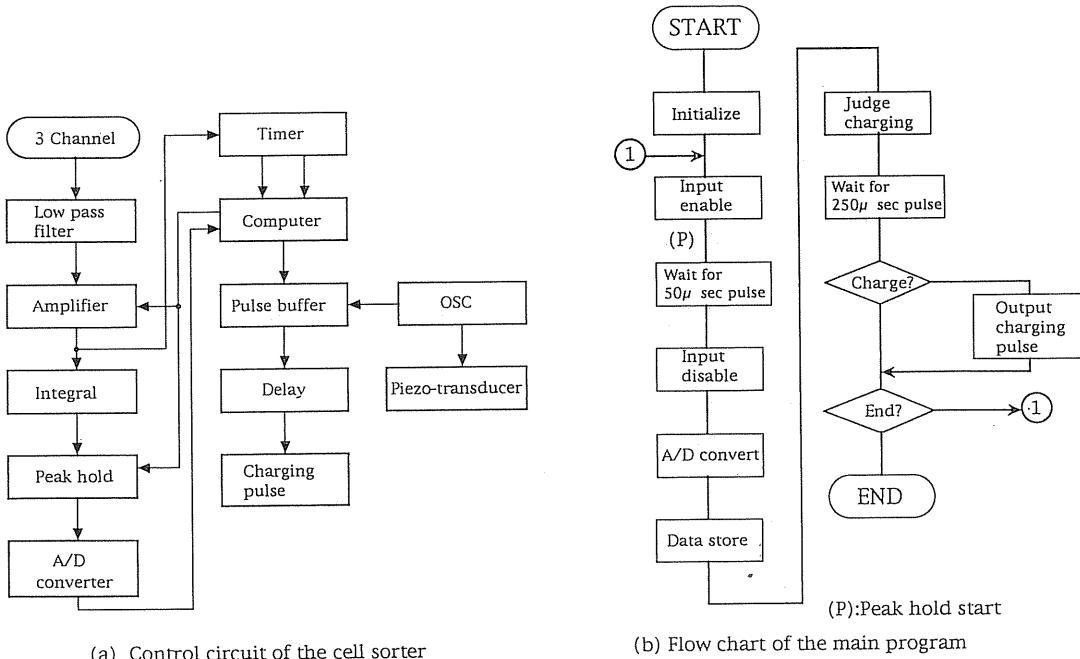


図2 セルソータの制御回路のブロック図および制御プログラムのフローチャート

Fig. 2 Block diagram of the control circuit and flowchart of the main control program of the cell sorter.

印加した偏向電極により分離され、捕集時の破壊が極めて少ないパラフィルム捕集器により回収される<sup>11</sup>。

## 2.2 エアーシースノズルの形状および動作条件

エアーシースノズルは、太い液柱を作るための内側ノズルと、液柱を空気で絞り込むための外側ノズルで構成されている<sup>10</sup>。内側ノズルは、従来型ノズルと同様に噴出する液柱の中心をサンプルが常に流れる構造をしている<sup>11</sup>。内側ノズルから噴出した太く低速の液柱は、外側ノズル内で液柱周りの空気流で絞り込まれて、細く高速の液柱に変換される。このノズルはプロトプラストに与える損傷を極めて小さくでき、かつ高い周波数で液滴化可能である。液流速および径の制御は、内側ノズルに加える圧力  $P_1$  と外側ノズルに加える圧力  $P_0$  で行う。内側ノズルは口径  $250 \mu\text{m}$ 、絞り角度  $25^\circ$ 、外側ノズルは口径  $300 \mu\text{m}$ 、絞り角度  $24^\circ$ とした。このエアーシースノズルは、内側ノズル圧力  $P_1 = 19.0 \text{ kPa}$ 、外側ノズル圧力  $P_0 = 11.7 \sim 15.0 \text{ kPa}$  の範囲で安定した液柱を噴出でき、液滴化周波数  $15.0 \text{ kHz}$  で動作させることができる<sup>10</sup>。

## 2.3 光学系および電極

レーザは、2枚の円筒型レンズを用いて液柱中心部に集光する。レンズの焦点位置は、サンプルを流したとき、最も散乱光が大きくなるよう調整している。

前方散乱光のうち、散乱角  $3 \sim 6^\circ$  の範囲を集光すると

ともに、円筒状の液柱を通ったレーザ屈折光が直接P.M.Tに入らないよう留意した。蛍光強度測定用P.M.Tはレーザ照射方向に対して  $90^\circ$  に設置し、各波長の選択は P.M.T 前方のフィルタで行っている。

静電誘導用の接地電極は、 $20 \times 20 \text{ mm}$  の正方形であり、中心に液滴が通過するための直径  $2 \text{ mm}$  の穴を有している。また、偏向電極は、電極長  $140 \text{ mm}$ 、入口幅  $10 \text{ mm}$ 、出口幅  $40 \text{ mm}$  であり、偏向電圧 (DC) は最大  $\pm 5000 \text{ V}$  である。

## 2.4 セルソータの制御回路および制御プログラム

図2(a)にセルソータ制御回路のブロック図、(b)にセルソータ制御プログラムのメインフローチャートを示す。本セルソータは前方散乱光および2種類の蛍光用に、3チャンネルの光信号入力回路を有している。P.M.T出力は、ノイズを取り除き增幅して計測回路に取り込む。まず、Initializeで解析対象とするサンプルの信号の最大値および最小値(サンプルデータ範囲)を最大3チャンネル分設定する。この範囲内の信号をサンプルからの信号とする。次に選別したい目的サンプルの信号の最大値および最小値(選別データ範囲)を、サンプルデータ範囲内で設定する。サンプルデータ範囲の信号がきたときのみ、ピークホールドを開始する。50 μs 後、ピークホールドした信号電圧をA/Dコンバータで数値化して、コンピュータに取り込み、その値が選別データ範囲かど

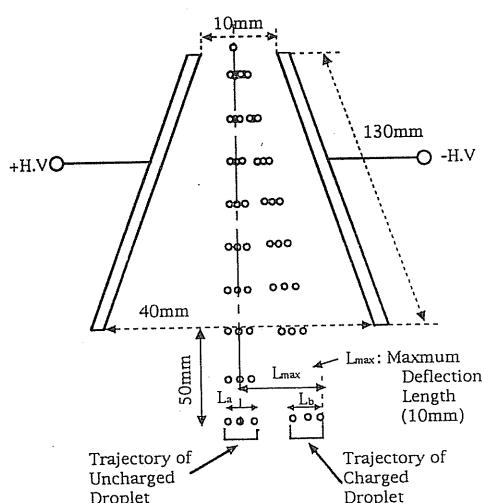


図3 液滴軌道安定性の測定

Fig. 3 Droplet position measurement of scattering of the droplet trajectory.

うかを判定する (Judge charging)。このとき、取り込む信号のチャンネル数によって判定に必要な時間が異なるが、遅くとも  $250 \mu\text{s}$  以内で判定が終了できるので、判定時間を  $250 \mu\text{s}$  とし、いつも一定の遅延時間で荷電パルスを発生できるようにしている。各チャンネルの入力信号が選別データ範囲内であった場合、一定の遅延時間を経てノズルに荷電パルス電圧を印加する (Output charging pulse)。目的サンプルの選別効率を高めるため、目的サンプルが含まれていると予想される液滴およびその前後各 1 滴の 3 滴を荷電して回収している。

## 2.5 エアーシースノズルの液滴形成

以下の実験は、プロトプラスト浮遊液、バッファ液とともに  $0.5 \text{ M}$  マンニトール溶液を用い、温度は約  $20^\circ\text{C}$  で行った。

### 2.5.1 荷電液滴分離条件

荷電パルス電圧  $90 \text{ V}$  で液滴を荷電しつつ、偏向電極の下  $50 \text{ mm}$  において図 3 に示すように最大偏向距離が  $10 \text{ mm}$  になるよう、偏向電圧を調整する。この状態で荷電液滴の軌道は中心軸から  $(10 - L_b) \sim 10 \text{ mm}$  の範囲に分布している。また、非荷電液滴は中心軸上  $\pm L_a$  の範囲に分布している。したがって、 $(L_a/2) + L_b > 10 \text{ mm}$  になると荷電液滴の分離ができなくなる。外側ノズル圧力  $P_o$  を大きくすると液滴化周波数を高くできるが、同時に  $L_a$ ,  $L_b$  が増加し、荷電液滴の分離ができなくなるため、 $P_o$  を変化させて  $L_a$  と  $L_b$  を測定し、荷電液滴の分離可能な限界値を求めた。なお振動子電圧と荷電パルス電圧との位相差およびパルス幅を、 $L_b$  が最小になるよう調整している<sup>18)</sup>。結果を図 4 に示す。 $L_a$  と  $L_b$

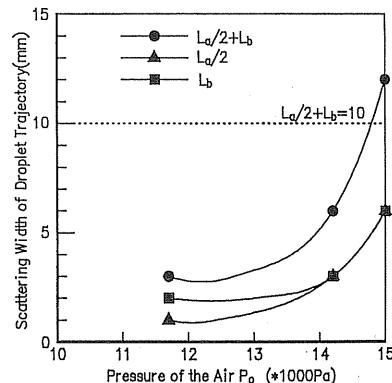


図4 荷電液滴分離のための外側ノズル圧力  $P_o$  の限界値の測定

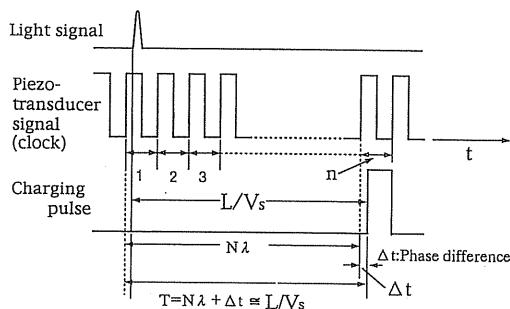
Fig. 4 Maximum value of the outer nozzle pressure,  $P_o$ , for the recovery of charged droplet.

は、 $P_o$  の増加とともに徐々に増え、特に  $P_o=14.2 \text{ kPa}$  から  $15.0 \text{ kPa}$  では急激に  $L_b$  が増加した。 $P_o=15.0 \text{ kPa}$  以上では、液柱表面の乱れが大きくなり、これに起因する光が前方散乱光に混ざるようになるため細胞の計測が困難となり、セルソータで使用不可能となる。このため、 $P_o < 15.0 \text{ kPa}$  で実験を行った。 $P_o=15.0 \text{ kPa}$  では  $(L_a/2) + L_b$  が  $10 \text{ mm}$  以上になり、荷電の有無による液滴の分離ができなくなった。確実に分離するためには荷電の有無による液滴通過点の差、すなわち  $\{10 \text{ mm} - (L_a/2 + L_b)\}$  が  $3 \text{ mm}$  以上必要であるので、本エアーシースノズルは  $P_o=14.2 \text{ kPa}$  以下で動作させる必要がある。 $P_o=14.2 \text{ kPa}$  において液滴化周波数は最高  $15.0 \text{ kHz}$  である。

### 2.5.2 荷電遅延時間の安定性

荷電遅延時間  $T$  は、レーザ焦点から液滴形成点までの距離  $L$  (図 1 参照) とノズル出口液流速  $V_s$  でほぼ決定し、図 5 のように  $T=L/V_s=N\lambda+\Delta t$  と表すことができる。ただし、 $N$  は最適遅延波数、 $\lambda$  は振動子の周期、 $\Delta t$  は位相である。荷電遅延時間  $T$  が一定していないとエアーシースノズルをセルソータに使用できないのでその安定性を調べた。

荷電遅延時間  $T$  を、 $(N-2)\lambda+\Delta t \sim (N+3)\lambda+\Delta t$  の範囲で変化させ、1 滴荷電を行い、回収した液滴 20 個中のサンプル含有率をエアーシースノズルと従来型ノズルとで測定し、その分布の比較を行った。両ノズルとも噴出した液柱は、液柱径  $150 \mu\text{m}$ 、液流速  $10 \text{ m/s}$  であり、液滴化周波数  $15.0 \text{ kHz}$  で動作させた。サンプルは従来型ノズルでも破壊されないように石松子を用いた。その結果を図 6 に示す。エアーシースノズルは従来型ノズルと同様、さらに前後 2 滴を合わせた 3 滴のうちのいずれ



T: Delay time of the droplet charging voltage  
N: Optimum number of clock for the delay  
λ: Clock period  
L: Length between the laser focal point and the droplet formation point.  
Vs: Spray Velocity

図5 荷電パルス印加タイミング

Fig. 5 Timing chart of the charging pulse.

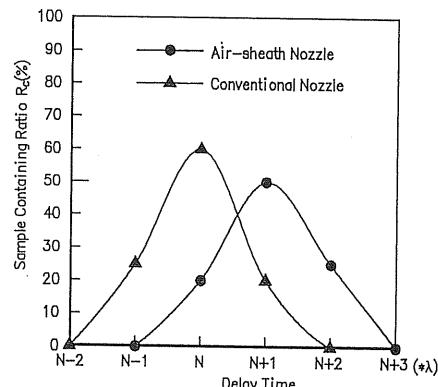
かにサンプルが含まれている。したがって、荷電遅延時間を最適値に調整して3滴荷電を行うことで、目的サンプルをほぼ100%の確率で選別できる。従来型ノズルの場合、サンプル含有率の最も高くなる荷電遅延時間は $T = N\lambda + \Delta t$ となり、最適荷電遅延時間は $L$ と $V_s$ とではほぼ算出することができる。しかし、エアーシースノズルの場合、最適荷電遅延時間が従来型ノズルの場合より $\lambda$ だけ長くなっている。この原因は、従来型ノズルと比べてエアーシースノズルのサンプル通過位置(液柱中心部)での液流速が、液柱全体の平均液流速より遅いためと考えられる。

### 3. 植物プロトプラストの解析と選別

#### 3.1 蛍光染色法および蛍光染色プロトプラストの光学的性質

サンプルはキャベツプロトプラストと小松菜プロトプラストを用いた。蛍光染色液は、FITCの場合3 mg/ml, RITCの場合5 mg/mlの濃度でエタノールに溶かした蛍光溶液40 μlを、酵素液20 mlに加えたものである<sup>14)</sup>。キャベツと小松菜のサンプルを、この蛍光染色液に2時間浸して蛍光染色した。これらを青色励起(488 nm)の蛍光顕微鏡で蛍光染色プロトプラストを観察すると、FITCでは緑色蛍光が、RITCではオレンジ色蛍光が見られ、細胞膜の周りに蛍光物質が付着していることがわかる。

セルソータを用いて測定した蛍光染色サンプルと非染色サンプルとの蛍光強度分布の違いを図7に示す。横軸はFITC蛍光強度( $F_g$ )およびRITC蛍光強度( $F_o$ )、縦軸はその強度を持ったサンプルの個数である。蛍光強度は対数で表示した。FITC蛍光強度測定用フィルタは

図6 外側ノズル圧力  $P_o$  に対する荷電遅延時間の変化Fig. 6 Variation of the delay time of the droplet charging voltage as a function of outer nozzle pressure,  $P_o$ .

520 nm以上の波長を通すハイパスフィルタ(520 HP)と520 nmを中心とする8 nmの半幅を持つバンドパスフィルタ(520 BP)を組み合わせ、またRITC蛍光強度測定用フィルタは520 HPと580 BPを組み合わせて用いた。染色サンプルの蛍光強度は $2 \leq F_g \leq 7$ の強度を示しているが、非染色サンプルは $F_g \leq 1$ に分布している。したがって、蛍光強度 $F_g=2$ をしきい値として染色の有無を識別し、高速度選別できる。

ここで、蛍光染色が植物プロトプラストの生存に影響を与えている可能性があるため、液体培養を行って、分裂することを確かめた。サンプルはFITC染色キャベツプロトプラストとRITC染色小松菜プロトプラストを用い、培養液は別報<sup>15)</sup>に示すもの、培養密度は $1 \times 10^5$ 個/mlで行った。5日後に分裂したキャベツプロトプラストと小松菜プロトプラストを図8に示す。両サンプルとも分裂率が10~15%であり、非染色プロトプラストの分裂率と比べて、有意な違いは認められなかった。

#### 3.2 キャベツおよび小松菜プロトプラストのクロロフィル蛍光

クロロフィルは青色励起によって赤色(680 nm)の自然蛍光を発する<sup>16)</sup>。両サンプルとも、クロロフィルの存在する部分で赤色蛍光を発しており、キャベツプロトプラストは細胞内の限られた部分に、小松菜プロトプラストは細胞全体にクロロフィルが分布していることが観察できる。

図9に両サンプルのクロロフィル蛍光強度分布を示す。横軸はクロロフィル蛍光強度の対数 $F_r$ 、縦軸はその蛍光強度を持ったサンプルの個数である。(a)はキャベツプロトプラスト、(b)は小松菜プロトプラスト、(c)はキャベツと小松菜を混合した場合である。クロロフィル蛍

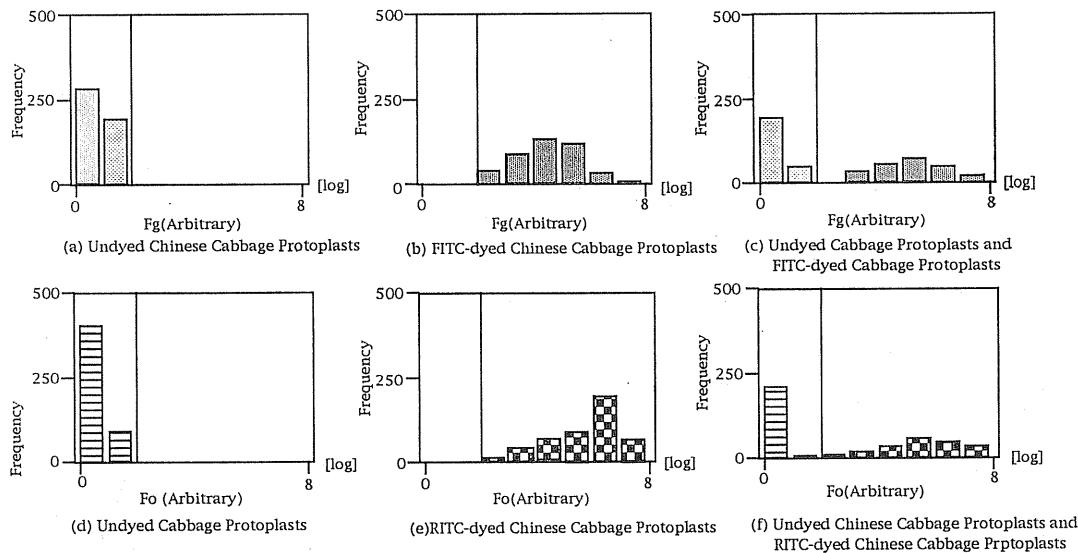


図 7 非染色および蛍光染色プロトプラストの蛍光強度分布

Fig. 7 Fluorescence intensity distribution of undyed and dyed protoplasts.

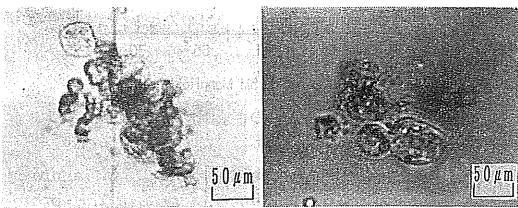


図 8 液体培養によって分裂した 5 日後の蛍光染色プロトプラスト

Fig. 8 Cell division of dyed protoplasts by liquid culture after 5 days.

光観察用フィルタは、520 HP と 680 BP を組み合わせたものを用いた。キャベツプロトプラストはほぼ  $F_r = 0$ 、小松菜プロトプラストはほぼ  $1 \leq F_r \leq 7$  に分布していることがわかる。したがって、しきい値  $F_r = 1$  とすれば両サンプルの識別および選別をクロロフィル蛍光強度を用いて高い確率で行うことが可能である。

### 3.3 プロトプラスト融合処理

キャベツおよび小松菜プロトプラストの融合は、電気的に行った<sup>17)</sup>。図 10 に融合装置の構成および印加電圧波形を示す。融合チャンバは、平行平板電極（電極広さ 50 × 100 mm、電極間隔 0.5 mm）である。計算機制御により、パルス電界波高値（1.9 kV/cm 以下）、パルス幅（10 μs 以上）およびパルス印加回数を任意に設定することができ、またパールチェーン形成のための交流電圧を自動切換で印加できる。

プロトプラストは、精製後に 0.3 M ショ糖懸濁液の表

面に浮上してしまうため、この状態では融合チャンバ内で正常なパールチェーンを形成することが難しい。そのため、0.3 M ショ糖溶液よりほんの少し密度の低い 0.5 M マンニトール溶液を徐々に混合し、プロトプラストが浮遊する条件（浮上も沈降もしない）を調べた。厚み 200 μm のフックス・ローゼンタール血球計算盤に 3 分間浮遊し続けることのできるプロトプラストの割合を測定した。その結果を図 11 に示す。浮上していたキャベツプロトプラストは、0.5 M マンニトール溶液の比率が 50% になるくらいから浮遊が始まり、65% で最も浮遊しやすい状態になった。また、65% からはキャベツプロトプラストが沈みやすくなり、75% で全部が沈降した。この結果より、融合処理時の懸濁液には、0.3 M ショ糖溶液 35%、0.5 M マンニトール溶液 65% の混合液が最も適していると考えられる。小松菜プロトプラストの浮遊条件もキャベツと同様であった。

浮遊状態の FITC 染色キャベツプロトプラストと RITC 染色小松菜プロトプラストを等量に混ぜ、パルス波高値、パルス幅およびパルス回数を変え最適電気融合条件を調べた。プロトプラストのパールチェーン化のための交流電界は、ピーク電界強度 200 V<sub>p</sub>/cm、周波数 1.0 MHz である。融合したプロトプラストは約 2 分以内に球形となり、FITC と RITC の 2 つの蛍光を有している。異種間融合プロトプラストの濃度を蛍光顕微鏡で測定し、その値が最大となるような最適融合条件を求めた。この融合条件はパルス波高値 1.7 kV/cm、パルス幅 10 μm、パルス回数 3 回であり、そのときの異種間

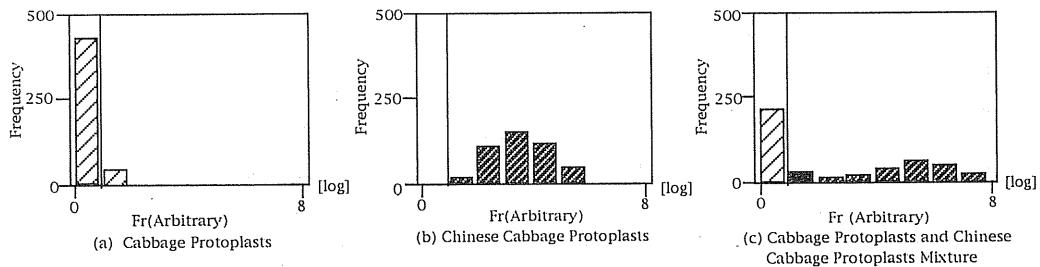


図9 キャベツプロトプラストと小松菜プロトプラストのクロロフィル蛍光分布

Fig. 9 Chlorophyll fluorescence distribution of cabbage protoplasts and chinese cabbage protoplasts.

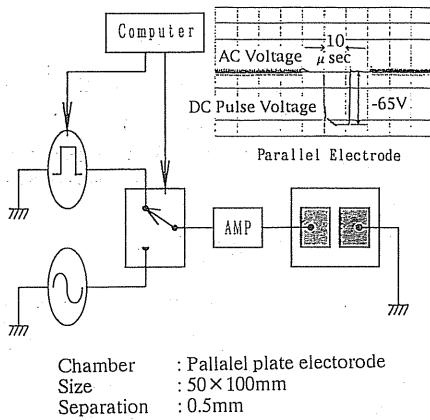


図10 電気融合装置

Fig. 10 Electrofusion system.

融合プロトプラスト濃度の最大値は1.0%であった。

### 3.4 FITCとRITCを用いた異種間融合プロトプラストの選別

エアーシースノズル型セルソータを用いて、融合処理後のサンプルから異種間融合プロトプラストの選別を試みた。液滴化周波数15.0 kHzで動作させた。

図12(a)にサンプル解析結果、図12(b)(c)に選別した異種間融合プロトプラストを示す。3.1節の結果からA領域( $F_g \leq 1, 2 \leq F_o \leq 7$ )が融合しなかったFITC染色キャベツプロトプラスト、B領域( $2 \leq F_g \leq 7, F_o \leq 1$ )が融合しなかったRITC染色小松菜プロトプラスト、C領域( $2 \leq F_g \leq 7, 2 \leq F_o \leq 7$ )が異種間融合プロトプラストと考えられ、選別範囲を $2 \leq F_g \leq 7$ 、かつ $2 \leq F_o \leq 7$ にした。選別したサンプル20個を蛍光顕微鏡で観察したところ、すべて2種類の蛍光を有している異種間融合プロトプラストであった。中には図12(c)のように分離したまま結合したサンプルも見られた。

以上の実験において、選別前に約1%の異種間融合プロトプラスト濃度を100%に高めることができた。

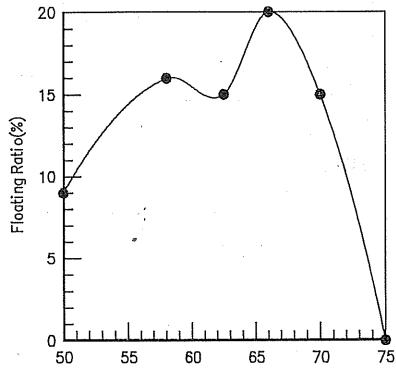


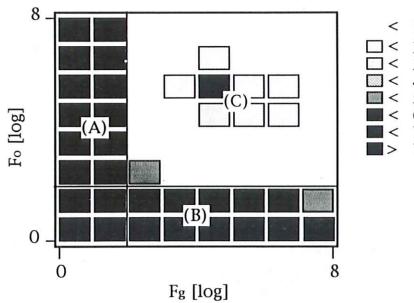
図11 0.5M マンニートールの混合比と浮遊プロトプラストの割合

Fig. 11 Influence of the ratio of 0.5 M mannitol solution on the floating rate of the protoplasts.

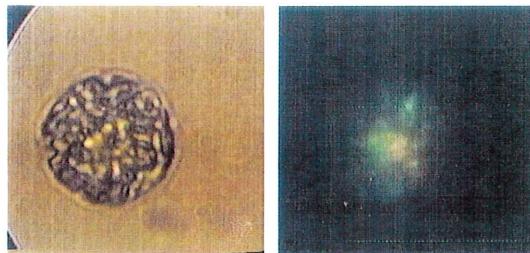
### 3.5 FITCとクロロフィルを用いた異種間融合プロトプラストの選別

キャベツプロトプラストと小松菜プロトプラストではクロロフィル強度に大きな違いがあるため、キャベツプロトプラストをFITC蛍光染色するだけで異種間融合プロトプラストを選別する方法を試みた。セルソータの動作条件は3.4節と同じである。

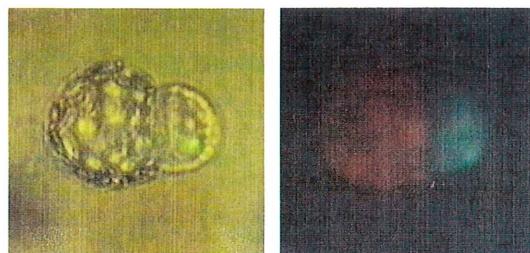
図13(a)にサンプル解析結果、図13(b)に選別した異種間融合プロトプラストを示す。3.2節の結果からA領域( $F_g \leq 1, 1 \leq F_r \leq 7$ )が融合しなかったFITC染色キャベツプロトプラスト、B領域( $2 \leq F_g \leq 7, F_r = 0$ )が融合しなかった小松菜プロトプラスト、C領域( $2 \leq F_g \leq 7, 1 \leq F_r \leq 7$ )が異種間融合プロトプラストであると思われる。選別範囲 $2 \leq F_g \leq 7$ 、かつ $1 \leq F_r \leq 7$ に設定して選別したところ、選別されたサンプル20個中の18個は2種類の蛍光を有している異種間融合プロトプラストであることが確認できた。しかし、残り2つは明らかにキャベツプロトプラストと認められるサンプルが選別された。これは、キャベツどうしが融合してクロロフィル含



(a) FITC &amp; RITC fluorescence intensity distribution



(b) Sorted fused protoplasts and its FITC and RITC fluorescence



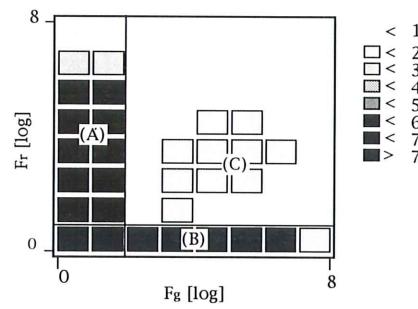
(c) Sorted fused protoplasts and its FITC and RITC fluorescence

図 12 電気融合したプロトプラストの FITC と RITC の蛍光強度分布

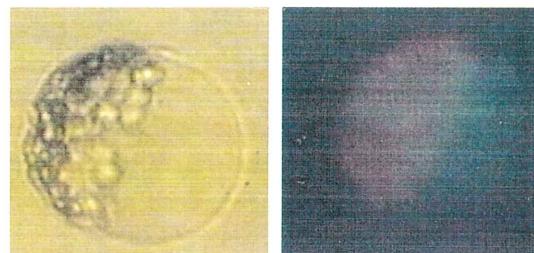
Fig. 12 FITC &amp; RITC fluorescence intensity distribution of the sorted sample of electrically-fused plant protoplasts.

有量が多くなり、小松菜プロトプラストのクロロフィル蛍光強度領域に入ってきたためと考えられる。また、キャベツプロトプラストの中にごく小量ではあるが多くのクロロフィルを持っているものがあり、それらが小松菜プロトプラストと間違って選別されるためと考えられる。

この場合、選別前には約 1% だった異種間融合プロトプラスト濃度を 90% に高めることができた。数回の追試を行ったところ異種間融合プロトプラストの濃度を 80~90% に高めることができた。



(a) FITC &amp; chlorophyll fluorescence intensity distribution



(b) Sorted fused protoplasts and its chlorophyll and FITC fluorescence

図 13 電気融合したプロトプラストの FITC とクロロフィルの蛍光強度分布

Fig. 13 FITC &amp; chlorophyll fluorescence intensity distribution of the sorted sample of electrically-fused plant protoplasts.

#### 4. ま と め

内側ノズル口径 250  $\mu\text{m}$ , 内側ノズル絞り角度 25°, 外側ノズル口径 300  $\mu\text{m}$ , 外側ノズル絞り角度 24° のエアーシースノズルは、内側ノズル圧力  $P_1=19.0 \text{ kPa}$ , 外側ノズル圧力  $P_0=14.2 \text{ kPa}$  以下でセルソータに利用できることが、液滴偏向特性および荷電遅延時間安定性から判明した。この動作条件において、液滴化周波数を 15.0 kHz まで高めるとともに、サンプルプロトプラストの 90% 程度を破壊することなく選別することができる。また、本セルソータを、異種間融合プロトプラストの高速度選別に適用できることも実験的に確かめた。キャベツと小松菜プロトプラストを電気的に融合させたサンプル（異種間融合プロトプラスト濃度：約 1 %）を、FITC および RITC 蛍光を用いて選別した場合には濃度を 100% に、FITC およびクロロフィル蛍光を用いた場合には濃度 80~90% に高めることができた。

#### 参 考 文 献

- 1) 川上友則, 水野 彰: 静電気学会誌, 16 (1992) 411
- 2) 川上友則, Nor Aishah, 水野 彰: 静電気学会講演論

- 文集 '91, p. 295, 静電気学会 (1991)
- 3) J.H. Jett : *Cytometry*, 6 (1985) 484
  - 4) D.W. Galbraith : *Cytometry*, 8 (1987) 60
  - 5) D.W. Galbraith : *Plant Cell Rep.*, 3 (1984) 151
  - 6) D.W. Galbraith : *Z. Pflanzenphysiol.*, 98 (1980) 129
  - 7) R.G. Alexander, E.C. Cocking, P.J. Jackson, J.H. Jett : *Protoplasma*, 128 (1985) 52
  - 8) K. Glimelius : *Plant Science*, 45 (1986) 45
  - 9) 山形 光, 高橋 澄 : *Bio Engineering*, 4 (1987) 887
  - 10) 川上友則, 水野 彰 : 静電気学会誌, 16 (1992) 427
  - 11) M.R. Melamed, T. Lindomo and M.L. Mendelsohn : *Flow Cytometry and Sorting Second Edition*, p. 147, John Wiley & Sons, Toronto (1990)
  - 12) 川上友則, 水野 彰 : 静電気学会講演論文集 '89, p. 185, 静電気学会 (1989)
- 13) A. Mizuno, T. Nakashima, H. Masago and K. Hasegawa : *Conference Record of IEEE/IAS '87*, p. 1558, Oct., Atlanta, Georgia (1987)
  - 14) M.R. Melamed, T. Lindomo and M.L. Mendelsohn : *Flow Cytometry and Sorting Second Edition*, p. 228, John Wiley & Sons, Toronto (1990)
  - 15) 平井篤志, 内宮博文, 杉浦昌弘 : 植物細胞育種入門, p. 38, 学会出版センター (1983)
  - 16) M.R. Melamed, T. Lindomo and M.L. Mendelsohn : *Flow Cytometry and Sorting Second Edition*, p. 642, John Wiley & Sons, Toronto (1990)
  - 17) H.G.L. Coster and U. Zimmermann : *J. Membrane Biol.*, 22 (1975) 73