

超遠心分析の基礎と新たな展開 — いまさら超遠心？ (1)

超遠心分析入門

有坂文雄

沈降速度法で観測される沈降界面の形状の経時変化には、溶質の沈降係数、拡散係数、分子の均一性、各溶質成分の濃度などさまざまな情報が含まれており、原理的には分子も求めることができる。他方、沈降平衡法ではセル内の溶質の濃度分布から分子の形によらない絶対分子量が求められ、分子量分布がある場合には重量平均分子量が求められる。その場合、分子間には特異的な相互作用がなく混合物として存在しているのか、あるいは解離会合の平衡にあるのかを区別することができ、平衡にある場合にはその平衡定数を求めることができる。超遠心分析は、相互作用を調べる分析機器としては中程度から比較的弱い相互作用を解析するのに適している。ベックマン社の超遠心分析機 XL-A/XL-I の登場と新しい解析法の発展によって超遠心分析法が新たな発展の段階に入っている。

Key words 【超遠心分析】【沈降速度法】【沈降平衡法】【分子量】
【分子間相互作用】

はじめに ベックマン社の超遠心分析機 XL-A/XL-I が登場して以来、超遠心分析が再び注目を集めている。*Biochemistry* 誌や Protein Society の発行する *Protein Science* 誌には超遠心分析を用いた研究に関する論文が頻繁にみられるようになってきた。ちなみに昨年から今年にかけて、超遠心分析を主たるテーマとした会議が相次いで開かれた*1。このほかにもアメリカ、ヨーロッパではここ数年来、毎年各地で講習会が開かれている。米国、英国の超遠心分析を主とした研究施設を参考までにあげた*2。これらの研究施設は比較的最近になってできたものであることが注目される。また、その研究施設も含めた超遠心関係のおもな Web site も示した*3。

超遠心分析は Svedberg の 1920 年代の先駆的な研究以来、1950 年代から大きく発展し、1970 年ごろにはすでに円熟期に入っていた。しかし、分子量決定装置としては装置が大型で高価であり（高価である点は現在

も変わっているわけではない）、必ずしも簡便とはいえないため、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) が普及するとともに用いられなくなり、ベックマン社も製造を中止してしまった。超遠心分析が衰退した理由はほかにもいくつか考えられる。すなわち、遺伝子工学の爆発的な進展によって分子遺伝学的な分野が脚光を浴び、蛋白質の溶液中の物性などに対する関心が薄れたこと、分子生物学の分野で続々と発見されてきた新しい生理学的に重要な蛋白質は物理化学的な測定に十分な量を単離することがむずかしかったこと、なども考えられる。

しかし、最近その状況が変わりつつある。ひとつには、塩基配列の決定や新規遺伝子のクローニングなどがひとつの山をこえ、再び蛋白質に対する関心が高まってきたこと、また、これまで単離が困難であった生体内に微量にしか存在しない生物学的に重要な蛋白質がクローニングと大量発現系への組込みによって物理

Fumio Arisaka, 東京工業大学生命理工学部生命理学科 (〒226-8501 横浜市緑区長津田町 4259) [Department of Life Science, Faculty of Bioscience and Bioengineering, Tokyo Institute of Technology, Nagatsuta, Midori-ku, Yokohama 226-8501, Japan] *Analytical Ultracentrifugation*

化学的測定を行なうに十分な量を単離できるようになってきたことも見逃せない。

他方、超遠心機自体にも大きな変革があった。ベックマン社の新しい超遠心分析機 XL-A と XL-I の登場である。以前のモデル E との大きな違いはまず装置の大きさである。幅、高さとも半分以下になってふつうの超遠心分離機と同じ大きさになり、場所をとらなくなったので、どこの実験室にも置けるようになった。もうひとつはパソコンによるデータの取り込みである。データは直接パソコンに転送され、インストールされているソフトウェアによって沈降係数や分子量がたちどころに求まるようになっただけでなく、データ解析も精密化して理論曲線のあてはめの際に系統的な誤差があるかどうかなどの判断が容易になった。また、最近になって dC/dt 法¹⁾ など新しい解析法も開発され、超遠心分析機が単なる分子量測定機器という枠をこえて、分子間相互作用の測定機器として新たな展開を始めている。

超遠心分析機は基本的には、①分子量と分子量分布の決定、②沈降係数と沈降係数の分布を決定する装置である。また、単分散の系では分子量と沈降係数から摩擦係数または拡散係数が求められ、分子のおおまかな形に関する情報も得られる。超遠心分析は簡便になったとはいえ、実際に実験を行なってみると、結果は常に容易に解釈できるようなものばかりとは限らない。予期しない結果が得られたときにそれをどう解釈するか、また、次にどのような実験をすればよいかは経験ばかりでなく、原理をどの程度理解しているにもかかっている。以下、まず超遠心分析と他の方法を比較することによって超遠心分析の特徴について述べ、さらに基礎的な理論を解説したのち、沈降速度法と沈降

平衡法についてそれぞれ解析の実際と留意点について述べる。

I. 超遠心分析で何がわかるか：他の分析法との比較

超遠心分析法はこれまで主として、①分子量の測定(沈降平衡法)と、②試料の均一性の検定(沈降速度法)に用いられてきた。天然状態の絶対分子量を分子の形状にかかわらず決定できること、溶液中の溶質の状態が均一であるかどうかを検定できることは、それ自体超遠心分析に存在価値を与えるに十分なものである。さらに測定条件として回転数、温度、溶質の濃度、測定波長(XL-Iではレイリー干渉計の使用も可能)などを変えたり、塩酸グアニジンなど変性剤存在下で測定を行なうことによって、種々の熱力学的なパラメータを決定することができるので、分子間相互作用を調べたり、サブユニット構造を調べたりすることができる。

超遠心分析のもうひとつの重要な特徴は、測定できる分子量(または沈降係数)の範囲がたいへん広いことである。分子量数千のものから数千万程度までとくに困難なく分子量を求めることができる。

まず、超遠心分析で得られる情報について、他の分析法と比較しながら述べておく。

1. 分子量の決定

分子量決定は構造解析、相互作用解析の基礎となるもので、また分子量の決定だけで構成成分の量比など多くのことが議論できる。その場合に、超遠心分析では分子の形によらずに正確な分子量が求められるのが大きな特徴である。たとえば、オリゴマー酵素の変性中間体が何量体であるかを決定するなどといった場合

-
- *1 Analytical Ultracentrifugation Symposia in Galveston TX on Solution Interactions of Macromolecules, November 14-17, 1997
 Reversible Associations in Molecular and Structural Biology, Satellite Meeting of the Lorne Conference on Protein Structure and Function, Melbourne, Australia, February 5-7, 1998
 1998 European Analytical Ultracentrifugation Workshop, U. of Nottingham, UK, March 28-30, 1998
 Ultracentrifugation & Molecular Association, A Workshop of the Protein Society Symposium, San Diego, USA, July 25-29, 1998
 2nd Annual Symposium on Solution Interaction of Macromolecules '98, Seattle, Washington, September 26-29, 1998
- *2 The UK National Centre for Macromolecular Hydrodynamics (NCMH, England), 1987年設立
 The National Analytical Ultracentrifugation Facility of the University of Connecticut Biotechnology Center (University of Connecticut, USA), 1988年設立
 Center for Analytical Ultracentrifugation of Macromolecular Assemblies (University of Texas Health Science Center at San Antonio, USA), 1992年設立
- *3 <http://www.uconn.edu/~wwwbiotc/uaf.html> FTP://spin6.mcb.uconn.edu
<http://www.bbri.harvard.edu/RASMB/rasmb.html>
<http://bioc09.uthscsa.edu/auc/>, UltraScanについては<http://bioc09.uthscsa.edu/UltraScan>を参照されたい。
<http://134.217.3.35/beckman/biorsrch/prodinfo/xla/xlahome.asp>

には、光散乱法以外には、超遠心分析より適した方法はないであろう。

生化学、分子生物学の研究室では分子量決定といえば日常的に SDS-PAGE が用いられているが、これはポリペプチド鎖の均一性の検定には適しているものの、試料を変性させるので天然の状態での分子量はわからないし、成分の量比は見当がついても、含まれるポリペプチド鎖の絶対数はわからない。また、アミノ酸組成や配列によっては検量線から大きくはずれる場合もあることはよく知られている。膜蛋白質は一般的に実際の分子量から期待されるよりも遅く泳動することが知られており、蛋白質によっては逆に期待されるよりも速く泳動するものもある。ただし、SDS-PAGE と超遠心分析を組み合わせると、さらに有用な情報が得られることは多い。

他方、もう一つの簡便法であるゲル濾過 (gel filtration, gel permeation chromatography, size exclusion chromatography) の利点は分子を天然状態で調べられることであるが、ゲル濾過の溶出位置は分子のストークス半径に依存するので、分子が球状であると仮定するなどしないと分子量の推定はできない。また、当該分子がゲル濾過の担体と親和性がないことが前提であるので注意を要する。これに対して、後述するように沈降平衡法は分子の形状によらずに分子量を求めることができる。

2. 分子量分布の決定

沈降平衡法では、後述するようにセル内の溶質濃度の対数 $\ln C$ を回転中心からの距離の 2 乗 (r^2) に対してプロットするとその傾きから分子量が得られるが、系が単分散ではない場合にはその場所 (r) に存在する溶質分子量の重量平均を与える。また、重量平均だけで

なく、Z 平均^{*4} も求めることができる。

合成ポリマーの分野では超遠心分析を用いて分子量分布を求めることがよく行なわれる。生化学の分野では多糖などの例外を除いて合成ポリマーのような連続的な分子量分布を示す試料はまれであるが、自己集合 (self-association) の系では単量体を単位として広い分子量分布を示すことがある。自己集合がオリゴマー程度で上限があれば、沈降平衡法によって集合の各段階の会合定数を求めることができる。詳細は後述する。

3. サブユニット構造の解析

蛋白質複合体を構成するポリペプチド鎖の数や配置を合わせてサブユニット構造とよぶ。沈降平衡法でサブユニットからなる複合体の総分子量がわかるので、ホモオリゴマーの場合にはただちにいくつのサブユニットからなるかが計算できる。ヘテロオリゴマーの場合もサブユニットの種類が多くなれば各サブユニットの数を決定できるが、SDS-PAGE での解析と組み合わせると解析が容易になることが多い。

4. 分子の形の推定

分子量と沈降係数が求めれば、摩擦係数 (または拡散係数) が求まり、流体力学的な形、すなわち回転楕円体に近似したときの軸比が求められる。軸比からは大まかな形しかわからないが、未知の蛋白質の場合、球状であるか、繊維状であるかを判定することができることは有用である。また、大きな構造体を小球の集合体としてモデル化すると、各球の摩擦係数から全体の摩擦係数を計算することができる²⁾。具体的な例は後述する。

*4 多成分系の分子量を測定したときに得られる平均値は、測定の方法によって以下に定義される数平均であったり、重量平均であったり、Z 平均であったりする。数平均は各分子量をモル数倍して足したのち、モル数の総和で割ったものであるが、重量平均は各分子量に重量濃度をかけて足しあわせたのち、重量濃度の総和で割ることによって求められる。これを延長して下記のように Z 平均分子量を定義することができる。数平均、重量平均、Z 平均となるにつれて大きな分子種により重みがかかるようになる。たとえば、分子量 1 万と 3 万のものが等モルあったとすると、数平均分子量は 2 万だが、重量平均は 2.5 万、Z 平均分子量は 2.8 万となる。

	N_i	C_i	測定法
数平均分子量	$\frac{\sum_i N_i M_i}{\sum_i N_i}$	$\frac{\sum_i C_i}{\sum_i (C_i/M_i)}$	浸透圧, 凝固点降下
重量平均分子量	$\frac{\sum_i N_i M_i^2}{\sum_i N_i M_i}$	$\frac{\sum_i C_i M_i}{\sum_i C_i}$	光散乱, 沈降平衡
Z 平均分子量	$\frac{\sum_i N_i M_i^3}{\sum_i N_i M_i^2}$	$\frac{\sum_i C_i M_i^2}{\sum_i C_i M_i}$	(沈降平衡)

(N_i は成分 i のモル数またはモル濃度, M_i は成分 i の分子量, C_i は成分 i の重量または重量濃度)

II. 測定装置

ベックマンの超遠心分析機 XL-I の概要を図 1 に示す。外見はまったく分離用超遠心機と変わらないが、チャンバーを開けて中を見ると、隅のほうにモノクロメーターを設置する穴、ローターを設置する場所の下にフォトマルチプライヤー（光電子増倍管）のレンズが見える。フォトマルチプライヤーの小さなレンズはセル内の溶質の濃度を測定するために半径方向に移動できるようになっている（図 1 b）。XL-I の場合はさらにレイリー干渉計のためのレーザー光の受光部が見える（図 1 c）。

ローターと光学系を設置してバキュームボタンを押したあとは、すべてパソコンで制御される。ローターは 4 穴の An-60Ti（または An-55Ti）と 8 穴の An-50Ti がある。試料を入れるセルにはいくつかの形があるが、通常図 2 (a) の形のダブルセクターセルが用いられる。セルは沈降する溶質粒子が側壁に衝突して濃度分布を乱すことがないようにくさび形（扇形）をしている。

図 1 (b), (c) に光学系の概要を示してある。モノクロメーターを通して単色となった光（波長 190 nm～800 nm）はセルの上から入って下に抜け、チャンバーの下にあって半径方向に移動する光電子増倍管に検知される。XL-I では、さらにレイリー干渉計 (Rayleigh interferometer) が設置されている。レイリー干渉計では 2 つのスリットを通してそれぞれ試料セルと対照セルを通ったレーザー光が干渉縞を形成するが、溶質の濃度勾配のあるところで縞の位置が変化することを利用している。吸収は感度がよく、特定の波長を利用することによって特定の溶質だけを選択的に検出することができるが、レイリー干渉計は吸収のないものでも測定できるだけでなく、測定できる濃度範囲が広く、精密な測定ができるのが特徴である。セルを挟むウィンドウ（図 3）は紫外・可視では石英 (quartz) のものを用いるが、レイリー干渉計ではサファイアのものを用いる。後者では、ウィンドウの微妙な歪みが測定に影響を与えるので、圧力による歪みのより少ないサファイアウィンドウを用いるのである。

1. XL-A と XL-I

XL-A には紫外・可視の吸収のモニターしかないが、XL-I にはレイリー干渉計も設置されている。当然それだけ高価であるので、レイリー干渉計が本当に必要か

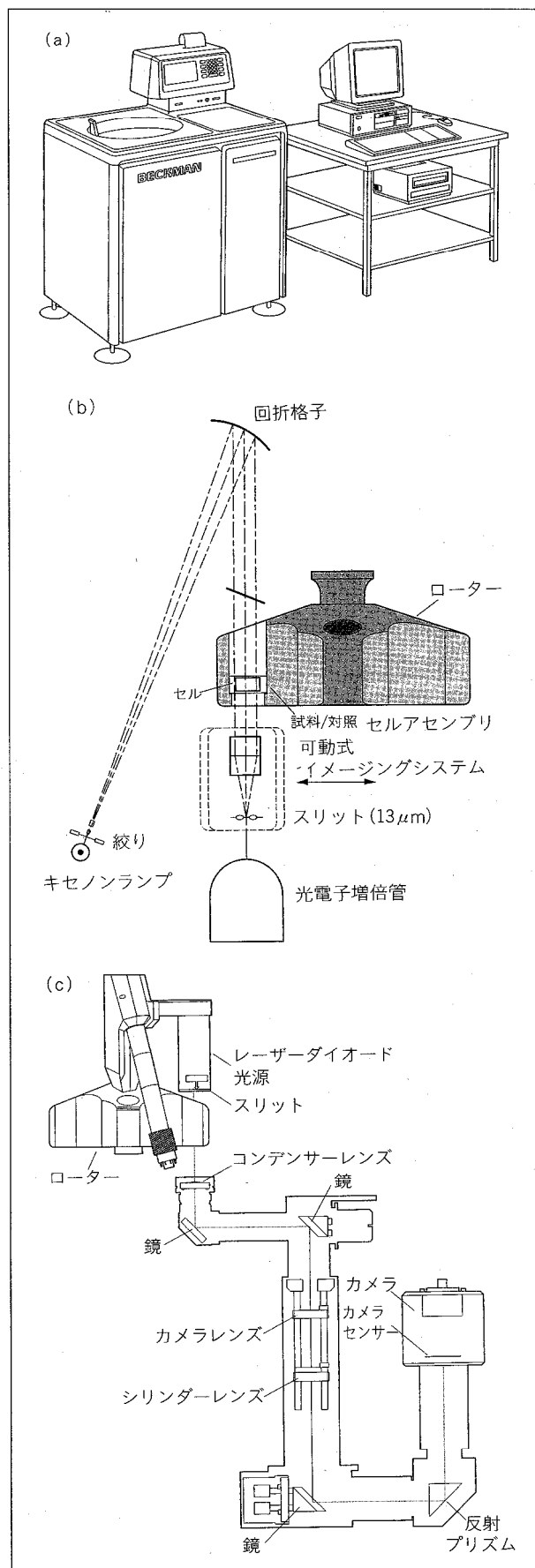


図 1 超遠心分析機





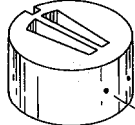
型	材質	容量 (ml)	許容量大回転数 (rpm)
(a) 標準ダブル セクターセル	 アルミニウム	0.45/ セクター	50,000
	 チャコール充填 エポキシ樹脂	0.45/ セクター	42,000
	 チャコール充填 エポキシ樹脂	0.12/ セクター	42,000
	 アルミニウム 粉末充填 エポキシ樹脂	0.45/ セクター	42,000
(b) キャピラリー型 合成界面セル	 チャコール充填 エポキシ樹脂	0.4 溶媒 0.15 試料溶液	42,000
	 アルミニウム 粉末充填 エポキシ樹脂		
(c) 沈降平衡用 6穴セル	 チャコール充填 エポキシ樹脂	0.12/穴	48,000
 <p>切り込みのある場所と 反対側の位置に試料注 入口がある。</p> <p>試料注入口</p>			

図 2 よく使われるセル (センターピース)

(a) ダブルセクターセル(速度法, 平衡法), (b) 合成界面セル(2つのセクターが細い間隙でつながっていて回転に伴って溶媒が試料溶液面に流れ込むようになっている), (c) 6穴セル(平衡法)。

どうかは十分検討すべき問題である。結論からすればレイリー干渉計はたいへん魅力のあるものであって、予算に余裕があればぜひ XL-I がほしいものである。ただし、最近の XL-A は購入後にレイリー干渉計を増設できるので、新たな予算が獲得できた折に設置する可能性もある。逆にいえば、XL-A でも十分仕事ができるということはいえる。

レイリー干渉計は吸収のない試料についても測定が可能なので、糖質や脂質などの分析にはたいへん都合がよい。しかし、レイリー干渉計のメリットはそれだけにとどまらない。ひとつには時間に依存するノイズが小さく、S/N 比がよいことである。もうひとつは試料の濃度に関するダイナミックレンジが非常に広い。また、スキニングに時間がかからないため、短い時間間隔で多くの沈降境界面を得ることができる。感度に関しては吸収より若干劣るが、実際に使ってみると、それほど劣る感じはしない。また、時間に依存するノ

イズも、標準添付されるソフトウェアとして供給されている dC/dt 法 (Walter Stafford 博士が開発) を用いると、短い時間間隔で走査した 2 つのスキンの差を取ることで時間に依存しないノイズは消去され、S/N 比は格段によくなる。平衡法の場合の S/N 比の向上については次節の「ローター・光学系の設置と運転の開始」の項で述べる。

III. 測定の実際

以下、吸収でモニターする場合を念頭に置いて説明し、レイリー干渉計の場合についてはコメントを加えるにとどめる。マニュアルに種々の注意点も述べてあるので実験前にマニュアルを必ず一読されたい。

1. 試料の準備

試料は遠心平衡法の場合は測定波長での吸光度約 0.3~0.5、遠心沈降法では 0.5~1.2 程度のものを用意する。溶質間の非特異的な相互作用を避けるためにイオン強度を 0.1~0.2 M 程度に設定し、緩衝液によって適当な pH に保つようにする。

試料は当然のことながら純度の高いものほどきれいな結果を出すことができるが、光散乱と違って混在する少量の塵などをことさら気にする必要はない。純度の基準としては、十分量添加したサンプルを SDS-PAGE で調べて、測定する成分のバンド以外にコンタミのバンドがなければ通常問題ない。筆者は測定の前に単一波長の吸収でなく、必ず UV スペクトルをとるようにしている。吸収のないはずの 320 nm より長波長で見かけの吸収が見られる場合は散乱があるため、大きな凝集体ないし複合体が存在することを示している。

2. 緩衝液・溶媒・塩濃度

超遠心分析に限らないが、蛋白質や核酸のような高分子電解質の溶液中の挙動を調べるような場合には分子間の非特異的な相互作用を抑えるために適当な塩を加えてイオン強度を 0.1 ないし 0.2 M 程度に保つ必要がある。沈降平衡法では、低イオン強度では異常な(電荷に依存して小さな)分子量を与えることが知られている。

まれに有機溶媒、酸、アルカリを使う必要があるかもしれないが、マニュアルを参照してセルの耐性を確認しておく必要がある。セルも高価なので十分注意して取り扱いなければならない。

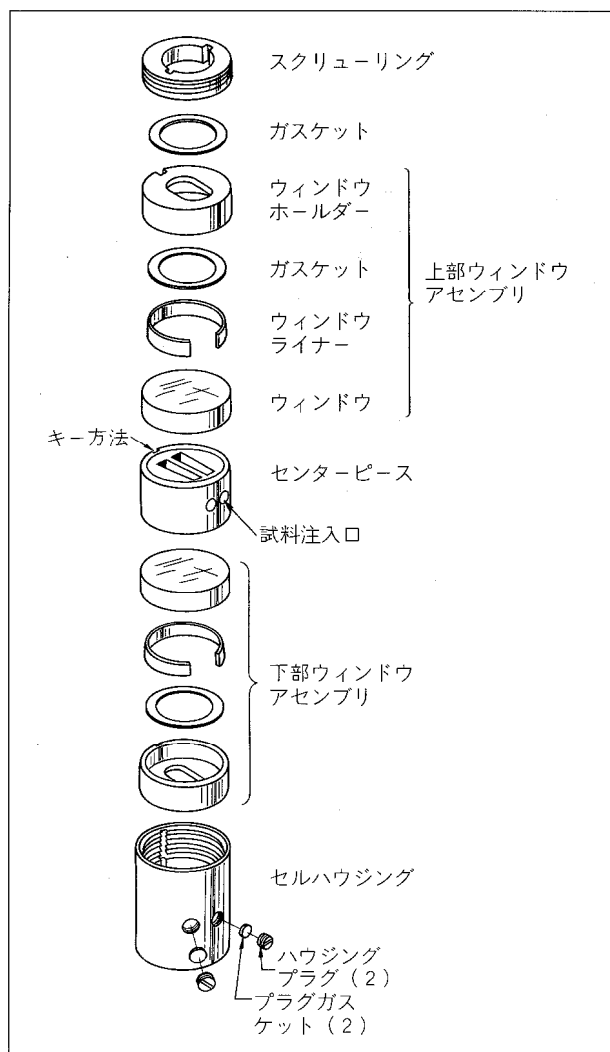


図3 セルの組立て

上部および下部のウィンドウアセンブリ(同一)をつくってから順に下のセルハウジングに収める。プラグガスケットは使い捨て。

高濃度の尿素や塩酸グアニジン存在下のように溶媒粘度が高い場合には、平衡に達するのに時間がかかるので注意を要する。

3. セルの組立て

通常のダブルセクターセルの組立て方を図3に示す。まず、セル(センターピース)の両側を挟むウィンドウアセンブリを2つ組み立てる。ウィンドウは吸光度測定用は石英(quartz)、レイリー干渉計用はサファイア製である。この2つのアセンブリでセンターピースを挟んでセルハウジングに納め、さらにベークライト製のスクリーリングを入れてトルクレンチを使って120 inch-poundで締める。スクリーリングにはグリースを薄く塗る。

6穴のセンターピースでは中にしきりのある特殊なセ

ルハウジングを用いる(図4)。センターピースと一方のウィンドウをスクリーリングによってレンチ(図5)で固定したのち(60 inch-pound)、この状態で試料と緩衝液を注入し、それからもう一方のウィンドウを上から挿入してこちらをスクリーリングで固定する。ダブルセクターセルとは違って両側にスクリーリングがあるので、試料を入れる穴と緩衝液を入れる対照の穴を間違えやすい。セルホルダーの横の数字の上下とセンターピースの数字の上下を一致させるなどして間違わないように注意する必要がある(次項参照)。

なお、筆者はまだ使用したことがないが、新しい8穴ショートコラムセンターピースは魅力的である。これは、沈降平衡用で、とくにレイリー干渉計を念頭に設計されたもので、①試料がわずか $15\ \mu\text{l}$ で測定できること、②1時間以内に平衡に達し、③同時に多くの試料を測定できる、などの特徴があるとされている。詳しくはベックマン社のTechnical Bulletinを参照されたい³⁾。

4. 試料の注入

試料は、沈降速度法ではプラトー領域が大きくとれるほどよいのでセルにほぼいっぱいになる程度(下記参照)入れる。他方、平衡法の場合には同じ量の試料溶液を用いると平衡に達するまでに1週間以上かかるといわれる。1953年にVan Holde & Baldwinは沈降平衡に達する時間はメニスカスから底までの距離の2乗に比例することを見いだした。それで現在では速度法の場合の1/4程度の量の試料を入れるのが標準になっている。この容量であると分子量5万以下の球状蛋白質では15~16時間以内に平衡に達する。

さて、ダブルセクターセルの場合、セルを組み立ててから横に開いている2つの穴を通して試料セルや対照セルに注射器で試料や緩衝液(透析外液を用いるのが理想的)を入れる。セルホルダーをスクリーリング端側から見たとき、左側に溶媒(透析外液が理想的。なければ同じ組成の緩衝液)、右側に試料溶液を注入する。注入には、1 mlのシリンジが使える。その際、針の先がとがっているので、セルの底を傷つけないように、注射針の先を摩耗させたもの、あるいはポリエチレン細管を使用する。沈降速度法の場合には、溶媒 $425\ \mu\text{l}$ 、試料溶液 $400\ \mu\text{l}$ 程度、沈降平衡法の場合には、溶媒 $140\ \mu\text{l}$ 、試料溶液 $120\ \mu\text{l}$ 程度を用いる。溶液を入れ終わったら、注入口に新しいプラグガスケットを入れ、ドライバーでネジを締めて閉じる。

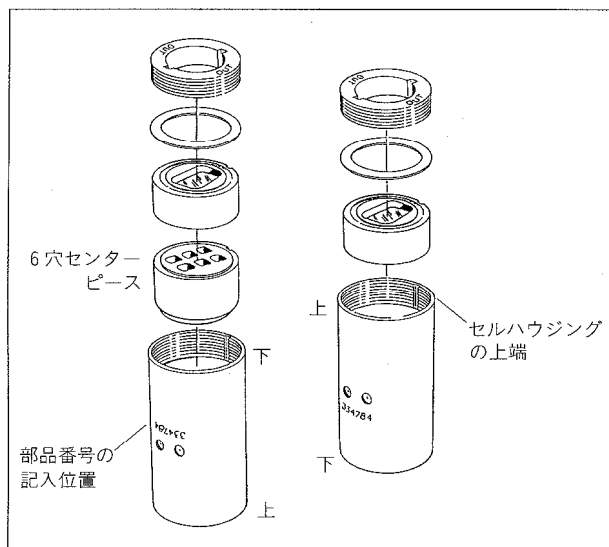


図4 6穴セルのアセンブリ

5. ローターの準備

ここでは標準のローターである An-60Ti を念頭に置いて述べる。ローターは熱容量が大きいため、設定温度が室温から遠く離れている場合には本体の加温・冷却装置では設定温度に達するまでに時間がかかりすぎる。その場合には、あらかじめその温度の空気恒温槽に5~6時間以上入れておくとよい。失活しやすい酵素などでは4°Cで運転したいこともあるので、その場合は前夜からコールドルームに置いておく。ただし、沈降速度法では最終的には $s_{20,w}$ を求めるので、試料に問題がなければ20°Cで運転するのが便利である。

試料を注入したセルは、カウンターバランスを含めて天秤で重量バランス(アンバランス0.5g以内)を確認したのち、ローターに装填する。カウンターバランスは常に4番の穴に入れることになっている。したがって、試料が1つだけの場合は2番の穴を用いる。カウンターバランスは半径方向の距離を検量するために用いているが、レイリー干渉計を用いる場合は必要ないので、その場合にはすべての穴を試料セルのために用いることができる。カウンターバランスの重量を調整するおもりは重さの種類に限られていて完全に同じ重さにすることはできないが、若干の差は差し支えない。その場合はサンプル側のほうが重くなるようにする。これは溶液が漏れたりする場合に、アンバランスがさらに広がらないようにする配慮である。

6. ローター・光学系の設置と運転の開始

ローターをチャンバー内に設置したのち、光学系(モ

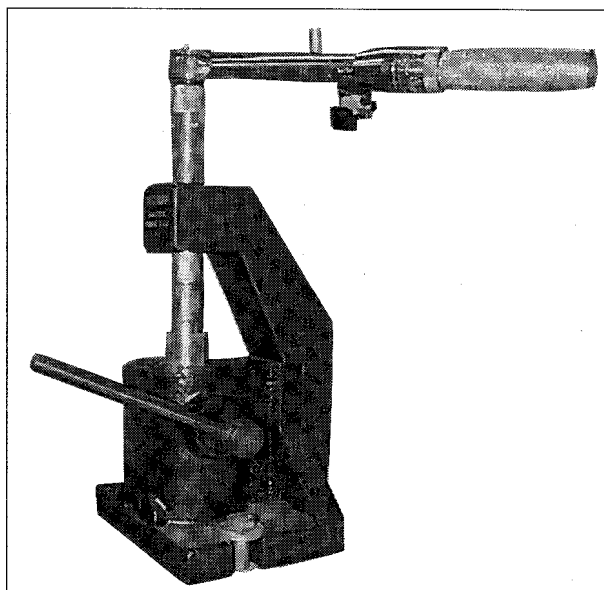


図5 セルトルクレンチ

ノクロメーターとレイリー干渉計) をセットし、チャンバーを閉じて真空系の作動を開始する。チャンバー内はロータリーポンプと拡散ポンプを使って真空にしているが、これはローターの回転によって生ずる空気との摩擦熱によるローターの発熱を防ぐためである。

ここで、コンピュータ側で実験条件の設定を行わなければならないが、筆者はとりあえず3,000 rpmで1回スキャンを行なって濃度その他、試料の状態が測定上問題ないことを確認するようにしている。3,000 rpmまではチャンバー内の真空度が50 mmHg以下にならなくても回転する。速度法ではあとの解析で試料の初濃度が必要になるので、このスキャンの結果はそのときにも利用できる。光学系(UV/VIS吸収)はダブルセクターセルの両溶液の吸光度の差をモニターするようになっている。レイリー法は吸収法に比べてノイズが多いが、ある程度試料濃度が高ければ実際上はそれほど問題ない。ただし、このノイズは時間に依存しないものなので、はじめにセルに水を入れて設定回転速度で回転させてスキャンし、これを差し引くとS/N比を上げることができる。また、速度法の解析はdC/dt法で行なうことにすれば、時間に依存しないノイズは解析の段階で差し引くことができる。

7. 実験条件の設定

図6に初期設定画面が示してある。まず、沈降速度法(velocity)であるか、沈降平衡法(equilibrium)であるかを設定する。第3の選択肢として波長スキャ

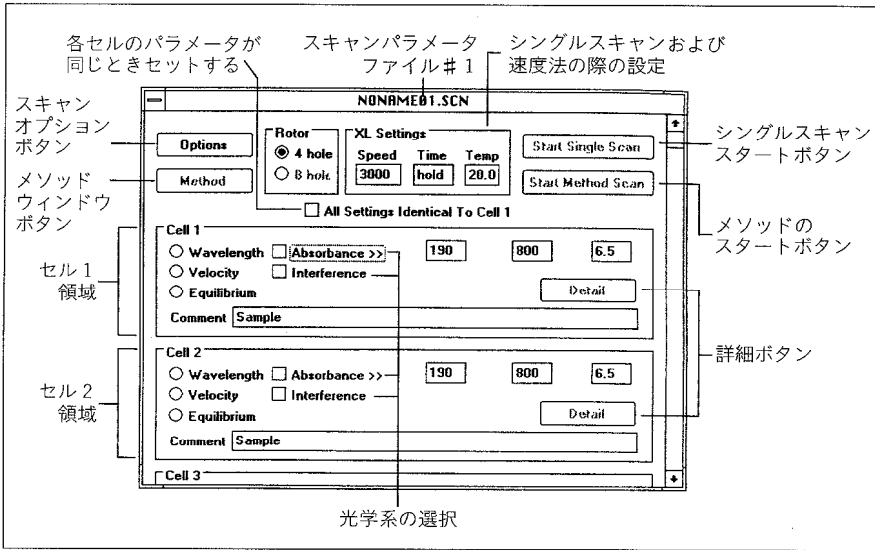


図 6 初期設定画面

ン (wave length scan) がある。波長スキャンモードではセル内の各点で吸収スペクトルを測定できる。これはいろいろな利用法が考えられ、とくにヘムなど、特定の吸収をもつものなどでは便利である。XL-I ではさらに吸収計 (absorbance) でモニターするか、レイリー干渉計でモニターするかを選択する。

実験条件として設定しなければならないパラメータは、温度と回転数の2つである。温度はとくに問題がなければ 20°C で測定するのが便利であるが、ものによっては 37°C のような生理的な温度で測定する必要があったり、失活を防ぐために 4°C など低温で測定する必要も生じる。また、相互作用を調べるためには温度依存性を調べる必要も生じる。0°C から 45°C まで測定可能である。

回転数は、沈降速度法では 40,000~60,000 rpm で行なうことが多いが、ウイルス粒子など沈降係数の大きなもの場合には回転数をさらに落とす必要がある。沈降平衡法は 3,000~20,000 rpm 程度で行なうが、分子量または沈降係数の推定値から適当な回転数を推定するためのグラフが与えられている (図 7)。最終的にはメニスカスと底の濃度比が 1:5 程度になるようにするのがよいとされているが、もっと大きな比にしてもよい。次に、スキャンを行なう半径方向の始点と終点を設定する。通常、速度法では 5.8 cm~7.3 cm, 平衡法では 6.8 cm~7.3 cm とする。また、波長もここで設定する。詳細設定で、スキャンモード (continuous か discontinuous か) や設定画面で設定した以外の波長をさらに 2 波長選んで計 3 波長でスキャンすることがで

きる。

沈降平衡のモードでは回転数をあらかじめ数段階設定して平衡に達するごとに次の回転数に変更して、いくつかの回転数で自動的にスキャンを行なうように設定できる。また、速度法、沈降法いずれにおいてもオプションボタンにより、モニターに過去何回のスキャンを表示させるかを設定でき、また、最終スキャン終了後にローターの回転を止めるかどうかを選択できる。

レイリー干渉計を選択した場合は、上記詳細設定で以下

のようにしてレイリー干渉計の調整を 3 ステップで行なう。すなわち、初期設定画面 (図 6) の詳細ボタンを押して、出てくる画面の Laser Setup ボタンを押して、① マウスを使ってメニスカスと底の中間あたりをクリックしてから Autoadjust ボタンで Laser Delay の調整を行なう。ここでは各セルを照射するレーザーのタイミングを、ローターに埋め込んである小さなマグネットの位置を基準としてそこからの角度として調整するが、これは一度設定して登録しておけば 2 回目からは調整を行なう必要はない。次に、② fringe あたりのピクセル数を Autoadjust ボタンによって調整したのち、最後に測定の設定回転数に加速してから、③ メニスカスおよび底の位置を設定する。ローターは高速回転中に若

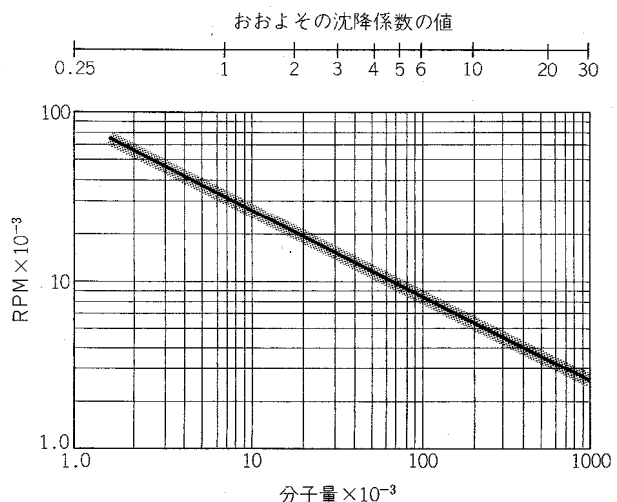


図 7 沈降平衡法の適正回転速度を選択するためのグラフ

干変形する（伸びる）ので、③の調節は設定温度で行なう必要がある。

8. フォルダー（ディレクトリー）の構造

データを収納するフォルダー（ディレクトリー）は、
c:\¥xlawin¥xlidata¥081498¥150117¥00001 . ra2 のように、XLAWIN の下に XLIDATA（または XLA DATA）があり、その下に日付（081498 など）を名前としたフォルダー、その下に開始時刻を名前としたフォルダー（150117 など、15時1分17秒の意）ができてデータはここに収納される。右端の 00001.ra2 は radial scan の 2 の位置のセルの 1 番目のデータである。なお、wave length scan の場合の拡張子は wa、レイリー干渉計では ip となる。

おわりに 超遠心分析法の現状と概要について述べた。

今回は超遠心分析の原理について沈降速度法を中心に述べる。沈降速度法は沈降平衡法に較べて分子の不均一性に敏感なので、分子量決定が目的の場合もできれば速度法も行なうようにしたい。速度法のデータを解析する方法として、dC/dt 法、Van Holde-Weischet 法の原理についても述べる。

文 献

- 1) Stafford, W.F. : *Anal. Biochem.*, **203**, 295-301 (1992)
- 2) Cantor, C.R., Schimmel, P.R. : *in* Biophysical Chemistry, Vol. II, pp. 557-570, Freeman and Company, San Francisco (1980)
- 3) Laue, T. : Technical Information Bulletin DS-835, Beckman Instruments, Inc., Spinco Business Unit