

## 超遠心分析の基礎と新たな展開——いまさら超遠心？(2)

## 沈降速度法

有坂文雄

沈降速度法では、比較的高速でローターを回転させ、溶質分子が沈降するときを生じる溶媒-溶液界面をモニターする。この方法は溶液中の分子が流体力学的に均一であるかどうかを検定する簡便な方法であって、化学構造としては均一な分子であってもそれがオリゴマーであるか、または会合する傾向があるかどうかを調べることができる。さらに、均一な分子の場合には沈降係数と同時に拡散係数も決定でき、そこから分子量も決定できるため、不安定で沈降平衡実験ができない場合にとくに有用である。分子の大まかな形状の情報も得られる。

**Key words** 【沈降速度法】【沈降係数】【拡散係数】【 $dC/dt$  法】

はじめに 蛋白質や核酸の密度はそれぞれ  $1.3 \text{ g/ml}$ 、 $1.5 \text{ g/ml}$  程度で水より高いが、静置した溶液中で底に沈むことはない。これは地球の重力で沈降しようとする傾向よりも拡散によって濃度勾配を打ち消すように働くブラウン運動のほうが優勢だからである。しかし、遠心機のローターを回転させて重力の数千倍程度の遠心力をかけると、沈降する傾向が無視できなくなる。拡散は Fick の法則により濃度勾配に比例するので、濃度勾配が大きくなるとそれにつれて拡散する傾向も大きくなる。回転数がある範囲内の場合、溶質の適当な濃度勾配が形成されて両者の傾向が釣り合い、平衡に達する。このときのセル中の溶質の濃度勾配を測定するのが沈降平衡法 (図 8 a) であり、最初からより大きな遠心力をかけて沈降しつつある溶質の溶媒・溶液境界面を観測するのが沈降速度法である (図 8 b)。

沈降する界面の移動速度と形状はさまざまな情報を含んでおり、原理的には沈降速度法によって、沈降係数、拡散係数、分子量、多成分系の各分子種の濃度、それらの粒子が相互作用するならばその平衡定数などが求まる。すでに述べたように、最近開発された  $dC/dt$

$dC/dt$  法<sup>9)</sup> では比較的精度よく分子量や平衡定数を求めることができる。しかし、通常は分子量や平衡定数は沈降平衡法によって求められ、一般的にはそのほうが精度がよい。

沈降係数は、溶液を遠心したときにある溶質がどのくらい沈降しやすいかを示す指標である。沈降速度法では沈降係数を決定することができるが、沈降平衡法に比べて試料の不均一性 (heterogeneity) に敏感なので、平衡法を行なう前に速度法を行なって凝集がないかなどチェックしておくことが望ましい。平衡法に比べて 5 倍以上の試料が必要なのが難点であるが、セルの底にたまった試料が不溶性にならなければ試料は 90% 以上回収できる。

## IV. 沈降係数の決定

沈降係数  $s$  は (1) 式で定義される。

$$v = \frac{dr}{dt} = sr\omega^2 \quad (1)$$

ここで、 $v$  は沈降速度、 $r$  は回転中心からの距離、 $\omega$

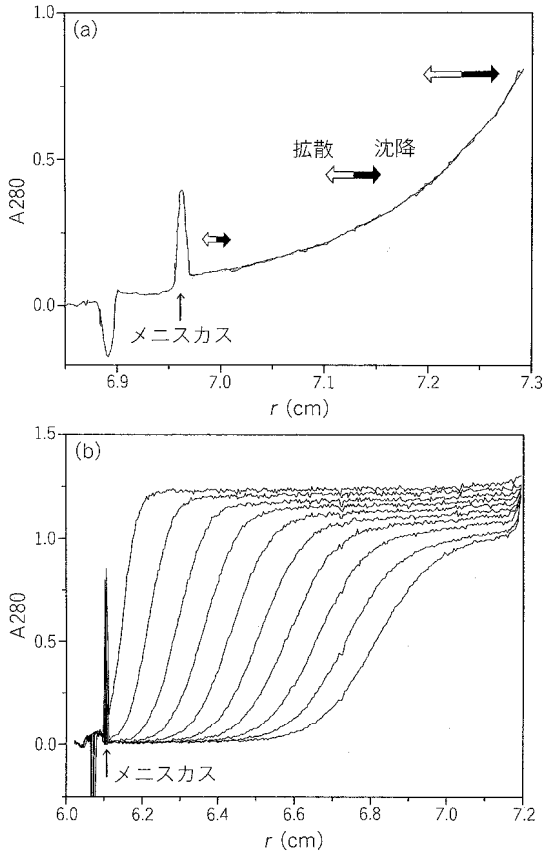


図 8 沈降平衡法 (a) と沈降速度法 (b)

は回転の角速度であり、 $s$  が沈降係数である。沈降していく粒子を直接観察するわけにはいかないが、遠心を開始し、メニスカス（気液界面）にあった粒子が沈降しはじめると、粒子のなくなった領域と存在する領域の間に、移動する界面を生じる。この界面は溶質（粒子）の濃度が変わるところなので、UV モニターやレイリー干渉光学系などで観察することができる。界面の位置  $r_b$  は UV モニターで各時刻におけるセル内の濃度分布を測定することによって求められる。ここで、(1) 式の  $r$  を  $r_b$  で置き換えて変数分離のあとに積分すると、

$$\ln \frac{n_b(t)}{n_b(t_0)} = s\omega^2(t-t_0) \quad (2)$$

したがって、 $\ln [n_b(t)/n_b(t_0)]$  を  $t-t_0$  に対してプロットすれば、傾きから  $s\omega^2$ 、したがって  $s$  が求まる。 $s$  は秒の単位をもち、 $10^{-13}$  秒を Svedberg 単位 S として 10 S のように表わす。図 9 に T4 ファージ小尾繊維についての実験例を示す。

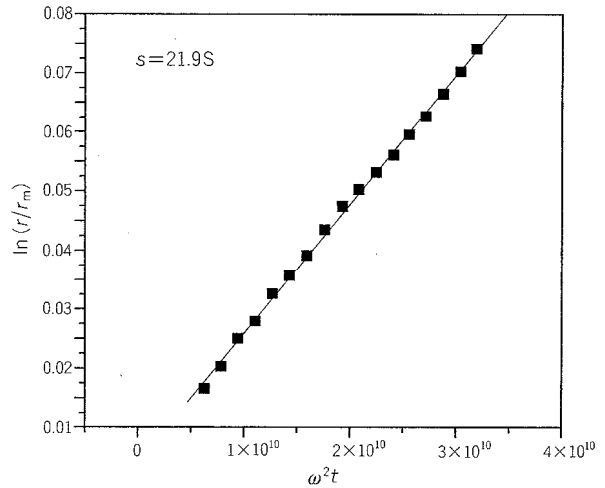


図 9 沈降係数の算出

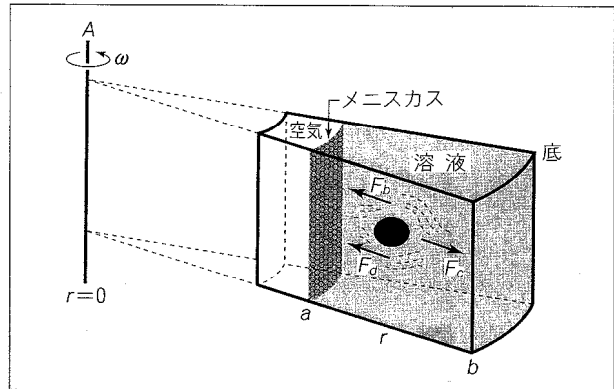


図 10 重力場で沈降する粒子に加わる力  
角速度  $\omega = (\text{rpm}) \times (2\pi/60)$  である。

界面の位置  $r_b$  は通常プラトー領域の濃度の半分の濃度をとる位置、または界面の濃度の変曲点として求められるが、次式で得られるセカンドモーメントの平方根  $r_M$  をとるのが理論的には最も適切<sup>5)</sup>で、こうして求められる  $r_b$  を用いて得られる沈降係数  $s$  は多成分系では重量平均の沈降係数を与える。

$$r_M^2 = \frac{\int_{r_m}^{r_p} r^2 \left( \frac{\partial C}{\partial r} \right) dr}{\int_{r_m}^{r_p} \left( \frac{\partial C}{\partial r} \right) dr} = r_p^2 - \frac{2}{A_p} \int_{r_m}^{r_p} r A dr \quad (3)$$

ここで、 $r_m$  はメニスカスの位置、 $r_p$  はプラトー領域の任意の位置、 $A_p$  はプラトー領域の濃度である。

いま、遠心力場内の粒子に加わる力を考えると、遠心力が沈降する粒子に及ぼす力  $F = mr\omega^2$  は浮力

\*5 沈降係数とセカンドモーメント：セカンドモーメントの平方根  $r_M$  は  $D$  (拡散係数) = 0、すなわち広がりのない場合の仮想的な境界面の位置に相当し、 $\ln r_M$  を  $\omega^2 t$  に対してプロットしたときに得られる沈降係数  $s$  はプラトー領域の濃度  $C_p$  における値であることが示される<sup>4)</sup>。

表 1 0.1M 塩溶液と水の密度差 ( $\Delta\rho$ ) および粘度比 ( $\eta/\eta_w$ )<sup>a)11)</sup>

	$\Delta\rho$	$\eta/\eta_w$
NaCl	0.0041	1.009
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.0098	1.029
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.0141	1.066
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.0079	0.030
CH <sub>3</sub> COOH	0.0008	1.012
CH <sub>3</sub> COONa	0.0043	1.036
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.0109	1.049
Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub>	0.0187	1.089
HCl	0.0018	1.007
NaOH	0.0046	1.023
Na citrate	0.0195	1.101

a) Svedberg および Pedersen の著書より 0.1M の濃度, 20°C またはこれに近い温度での値を抜粋したもの。これらの値の温度変化は小さいから,  $\rho$  を求めるには表 2 の  $\rho_i$  に  $\Delta\rho$  を加え,  $\eta/\eta_w$  は  $\eta/\eta_w$  に等しいとみなしても, 通常誤差は小さい。0.1M 以外の濃度に対しては  $\Delta\rho$ ,  $\eta/\eta_w - 1$  に加成性が成り立つと考えても希薄塩溶液に関するがぎり問題はない。

$-m\bar{v}\rho\omega^2$  と速度  $v$  に比例した粘性抵抗  $-fv$  の和と拮抗しており, この 3 つの力が各位置で釣り合って一定速度  $v$  で沈降しようとする (図 10)。すなわち,  $fv = m\bar{v}\rho\omega^2 - m\bar{v}\rho\omega^2$  を得る。この関係から (1) 式を用いて

$$s = \frac{M(1 - \bar{v}\rho)}{Nf} \quad (4)$$

を得る。ここで,  $M (= mN)$  は分子量,  $\bar{v}$  は偏比容,  $\rho$  は溶媒の密度,  $f$  は摩擦係数,  $N$  はアボガドロ数である。摩擦係数  $f$  は球, 回転楕円体などごく少数の単純な形に対してしか求められていないが, 半径  $R_0$  の球の場合はストークスの法則から

$$f_0 = 6\pi\eta R_0 \quad (5)$$

と与えられ, 摩擦係数は溶液の粘度に比例することがわかる。ここで,  $\eta$  は粘度である。(4) 式中の  $\bar{v}$ ,  $\rho$ ,  $f$  はいずれも温度に依存し, 緩衝液の組成にも依存する。そこで, 比較のために標準条件を 20°C, 純水中と定めて, 測定結果をこの条件に換算して求めることになっている。

$$s_{20,w} = s_{T,b} \frac{(1 - \bar{v}\rho_{20,w})}{(1 - \bar{v}\rho_{T,b})} \left( \frac{\eta_{T,b}}{\eta_{T,w}} \right) \left( \frac{\eta_{T,w}}{\eta_{20,w}} \right) \quad (6)$$

緩衝液の粘度をこのように相対粘度 ( $\eta_{T,b}/\eta_{T,w}$ ) で表わしておくと, この相対粘度はほとんど温度に依存しない。ここで,  $\eta_{T,b}$  の添え字 b は緩衝液を表わし,  $\eta_{T,w}$  の添え字 w は水を表わす。表 1 にはよく用いられる 0.1M 塩溶液と水との密度差と相対粘度, 表 2 には水の相対粘度 ( $\eta_{T,w}/\eta_{20,w}$ ) の温度依存性を示してある。

また, 表 3 にはいくつかの蛋白質または複合体分子の沈降係数が示してある。

ここでもう一つ考慮しなくてはならないのは沈降係数の濃度依存性である。球状蛋白質では濃度 1 mg/ml 以下ならほとんど  $s_{20,w}$  に等しいが, 非対称な分子や電荷のとくに大きい核酸のような分子では濃度依存性が大きいので注意を要する。最も一般的な場合では, 分子は互いに干渉し合って濃度が高くなるにつれて摩擦係数が大きくなるので,

$$f = f_0(1 + kC + \dots) \quad (7)$$

とおくと,  $f_0$  は  $C=0$  での  $f$  の値である。1 次の項だけとると沈降係数は

$$s = \frac{s^0}{1 + kC} \quad (8)$$

となる。 $k$  は通常正であり, 沈降係数は濃度の増加とともに小さくなる (図 11)。分子の形状がまったく未知の場合は濃度依存性を調べておいたほうがよい。

なお, (4) 式に Einstein-Sutherland の方程式

$$D = \frac{RT}{Nf} \quad (9)$$

を代入して得られる式

$$\frac{s}{D} = \frac{M(1 - \bar{v}\rho)}{RT} \quad (10)$$

は Svedberg の式とよばれる。この式は, 拡散係数と沈降係数が求めれば分子量が求まることを示している。

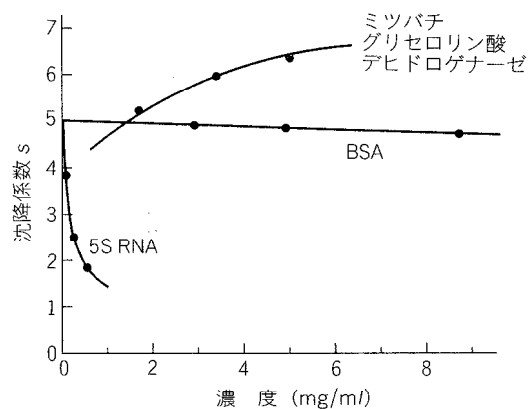


図 11 沈降係数の溶質濃度依存性

天然の球状蛋白質では BSA (血清アルブミン) のように濃度依存性は小さい。5S RNA は伸びて高度に電荷を帯びた高分子であるため濃度依存性が大きい。グリセロリン酸デヒドロゲナーゼは可逆的に会合が起こる。

表 2 水の粘度および密度の温度変化<sup>11)</sup>

温度 (°C)	$\eta_{r,w}/\eta_{20,w}$											$\rho$
	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	0.0	
0	1.778	0.772	0.766	0.760	0.754	0.747	0.741	0.735	0.729	0.723	0.99987	
1	1.717	0.711	0.705	0.700	0.694	0.688	0.682	0.676	0.671	0.665	0.99993	
2	1.659	0.653	0.648	0.643	0.637	0.632	0.627	0.621	0.616	0.610	0.99997	
3	1.605	0.600	0.595	0.590	0.585	0.580	0.574	0.569	0.564	0.559	0.99999	
4	1.554	0.549	0.544	0.538	0.534	0.530	0.525	0.520	0.515	0.510	1.00000	
5	1.505	0.501	0.496	0.492	0.487	0.483	0.478	0.474	0.469	0.465	0.99999	
6	1.460	0.456	0.451	0.447	0.442	0.438	0.434	0.429	0.425	0.420	0.99997	
7	1.416	0.412	0.408	0.404	0.400	0.396	0.391	0.387	0.383	0.379	0.99993	
8	1.375	0.371	0.367	0.363	0.359	0.356	0.352	0.348	0.344	0.340	0.99988	
9	1.336	0.332	0.328	0.324	0.320	0.317	0.313	0.309	0.305	0.302	0.99981	
10	1.298	0.294	0.291	0.287	0.284	0.280	0.276	0.273	0.269	0.266	0.99973	
11	1.262	0.259	0.255	0.252	0.248	0.245	0.242	0.238	0.235	0.231	0.99963	
12	1.228	0.225	0.221	0.218	0.215	0.211	0.208	0.205	0.201	0.198	0.99953	
13	1.195	0.192	0.189	0.185	0.182	0.179	0.176	0.173	0.170	0.167	0.99941	
14	1.165	0.162	0.159	0.156	0.153	0.150	0.147	0.144	0.141	0.138	0.99927	
15	1.135	0.132	0.129	0.126	0.123	0.120	0.118	0.115	0.112	0.109	0.99913	
16	1.106	0.103	0.100	0.098	0.095	0.092	0.089	0.087	0.084	0.081	0.99897	
17	1.078	0.075	0.073	0.070	0.067	0.065	0.062	0.059	0.057	0.054	0.99880	
18	1.051	0.049	0.046	0.043	0.041	0.038	0.036	0.033	0.030	0.028	0.99862	
19	1.025	0.023	0.020	0.018	0.015	0.013	0.010	0.008	0.005	0.003	0.99843	
20	1.000	0.998	0.995	0.993	0.990	0.988	0.986	0.983	0.981	0.978	0.99823	
21	0.976	0.974	0.971	0.969	0.967	0.964	0.962	0.960	0.957	0.955	0.99802	
22	0.953	0.950	0.948	0.946	0.944	0.941	0.939	0.937	0.934	0.932	0.99780	
23	0.930	0.928	0.926	0.923	0.921	0.919	0.917	0.915	0.913	0.910	0.99757	
24	0.908	0.906	0.904	0.902	0.900	0.898	0.896	0.894	0.891	0.889	0.99733	
25	0.887	0.885	0.883	0.881	0.879	0.877	0.875	0.873	0.871	0.869	0.99708	
26	0.867	0.865	0.863	0.861	0.859	0.857	0.856	0.854	0.852	0.850	0.99681	
27	0.848	0.846	0.844	0.842	0.840	0.838	0.837	0.835	0.833	0.831	0.99654	
28	0.829	0.827	0.826	0.824	0.822	0.820	0.818	0.816	0.815	0.813	0.99626	
29	0.811	0.809	0.808	0.806	0.804	0.802	0.801	0.800	0.797	0.795	0.99598	
30	0.794	0.792	0.790	0.788	0.787	0.785	0.783	0.782	0.780	0.778	0.99568	
31	0.777	0.775	0.773	0.772	0.770	0.769	0.767	0.765	0.764	0.762	0.99537	
32	0.760	0.759	0.757	0.756	0.754	0.753	0.751	0.749	0.748	0.746	0.99506	
33	0.745	0.743	0.742	0.740	0.739	0.737	0.736	0.734	0.732	0.731	0.99473	
34	0.729	0.728	0.726	0.725	0.724	0.722	0.721	0.719	0.718	0.716	0.99440	
35	0.715	0.713	0.712	0.710	0.709	0.709	0.706	0.705	0.703	0.702	0.99406	

表 3 蛋白質や複合体分子の沈降係数と拡散係数<sup>5)</sup>

蛋白質/複合体分子	$s_{20,w}^0 \times 10^{13}$ (秒)	$D_{20,w}^0 \times 10^7$ (cm <sup>2</sup> /秒)	$\bar{v}_{20}$ (cm <sup>3</sup> /g)	$M_{s,D}$
リパーゼ	1.14	14.48	0.732	6,667
リゾチーム	1.91	11.20	0.703	14,400
血清アルブミン	4.31	5.94	0.734	66,000
カタラーゼ	11.3	4.10	0.730	250,000
フィブリノーゲン	7.9	2.02	0.706	330,000
ウレアーゼ	18.6	3.46	0.730	483,000
ヘモシアニン	105.8	1.04	0.727	8,950,000
トムプスウイルス	132	1.15	0.740	10,700,000

V. 沈降係数の解釈

沈降係数  $s$  が摩擦係数  $f$  に依存するという事は、沈降係数は分子量だけでなく分子の形にも依存することを意味している。このため沈降係数は加算的ではない。たとえば、30 S 粒子と 50 S 粒子の複合体であるリボソームの沈降係数は 80 S でなくて 70 S である。摩擦係数は球状の粒子で最も小さく、ストークスの法則 (5) 式で与えられる。粒子の形状が球形からはずれてくると摩擦係数は大きくなるが、同じ分子量の球状粒子の摩擦係数  $f_0$  との比を摩擦比とよんでいる。図 12 に棒状粒子と回転楕円体 (フットボール形と円盤形) の場合についての摩擦比をグラフにしたものが示してある。

分子が球形で水和していないければ、球の容積  $V_0$  は半径  $R_0$  または偏比容と分子量を用いて次式で与えられる。

$$\frac{4}{3} \pi R_0^3 = V_0 = \frac{M\bar{v}}{N} \quad (11)$$

(11) 式を  $R_0$  について解き、(5) 式に代入して、

$$f_0 = 6 \pi \eta \left( \frac{3M\bar{v}}{4\pi N} \right)^{\frac{1}{3}} \quad (12)$$

ここで、 $f_{sp}$  を、水和を考慮した仮想的な球状分子の摩擦係数として、 $f/f_0$  を

$$\frac{f}{f_0} = \frac{f}{f_{sp}} \cdot \frac{f_{sp}}{f_0} \quad (13)$$

と表わすと、水和を  $\delta$  として  $f_{sp}/f_0$  は

$$\frac{f_{sp}}{f_0} = (1 + \delta)^{\frac{1}{3}} \quad (14)$$

となる。したがって、求める

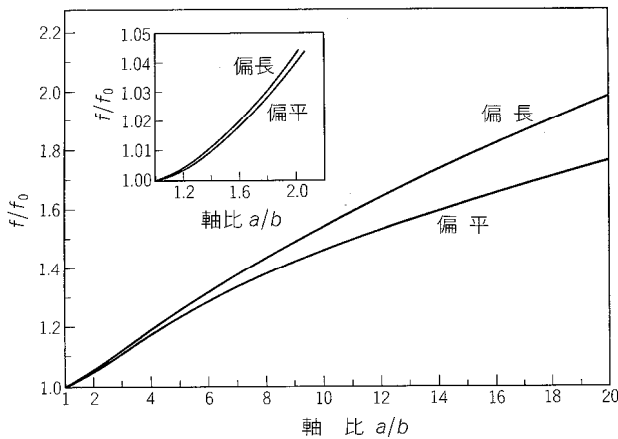


図 12 回転楕円体の摩擦比と軸比の関係

偏長 (フットボール形) :  $f/f_0 = \frac{P^{-1/3}(P^2-1)^{1/2}}{\ln [P + (P^2-1)^{1/2}]}$

偏平 (円盤形) :  $f/f_0 = \frac{(P^2-1)^{1/2}}{P^{2/3} \tan^{-1} [(P^2-1)^{1/2}]}$

ここで  $P = a/b$ ,  $a$  は主軸,  $b$  は副軸。

べき形状因子は

$$\frac{f}{f_{sp}} = \frac{f}{f_0} (1 + \delta)^{-\frac{1}{3}} \tag{15}$$

となる<sup>5)</sup>。

超遠心分析ではこれ以上詳細な形状について議論することはできない。しかし、形状に関してもう一つ有用な理論を紹介しておきたい。Kirkwood は 1954 年、摩擦係数既知の同一のサブユニットからなる複合体の摩擦係数を求める理論式を導いた。すなわち、

$$F_N = N f_1 \left( 1 + \frac{f_1}{6 \pi \eta N} \sum_{i=1}^N \sum_{j \neq i}^N \frac{1}{R_{ij}} \right)^{-1} \tag{16}$$

ここで、 $f_1$  はサブユニットの摩擦係数、 $N$  はサブユニットの数、 $R_{ij}$  はサブユニット間の距離で、すべてのサブユニット間の距離について総和をとる。原理的には任意の形の構造体を小球の集合体と近似して摩擦係数が求まる。Bloomfield ら (1967) は Kirkwood の理論を拡張して同一のサブユニットからなる複合体の沈降係数を求める公式を報告している。

すなわち、

$$\frac{S_N}{S_1} = 1 + \frac{f_1}{6 \pi \eta N} \sum_{i=1}^N \sum_{j \neq i}^N \frac{1}{R_{ij}} \tag{17}$$

ここで、 $S_N$  は複合体の沈降係数、 $S_1$  はサブユニットの沈降係数である。 $f_1 = 6 \pi \eta R_s$  ( $R_s$  はサブユニットのストークス半径) を代入するとさらに簡単化されて

$$\frac{S_N}{S_1} = 1 + \frac{R_s}{N} \sum_{i=1}^N \sum_{j \neq i}^N \frac{1}{R_{ij}} \tag{18}$$

となる。この式はたとえば同一のサブユニットからな

る 4 量体酵素とサブユニットの沈降係数がそれぞれわかっているときにサブユニットの配置がどのようになっているか (線状であるか、平面的な正方形か、正四面体状かなど) を推定するのに用いることができる<sup>5)</sup>。

### VI. 超遠心の基本方程式：Lamm 方程式

さて、前記の古典的力学的な取り扱いでは、拡散による境界の広がりが考慮されていない。遠心沈降は輸送過程なので、厳密には非可逆過程の熱力学を適用して、流れの方程式を導かなければならない。結論として得られる Lamm 方程式からは古典力学的に求められたのと同じ沈降係数の表現が得られるだけでなく、境界の拡散による広がりを含めて沈降の過程を調べることができ、平衡の条件を加えることによって沈降平衡によって分子量を求める式も導くことができる。

通常の化学平衡を取り扱うときには、溶質の化学ポテンシャルが系内で一定になるという条件を用いるが、超遠心分析では、通常の化学ポテンシャル  $\mu$  に遠心力場のポテンシャルを加えた全ポテンシャル  $\tilde{\mu}$  を考えなくてはならない。すなわち、

$$\tilde{\mu} = \mu - \frac{1}{2} M \omega^2 r^2 \tag{19}$$

この式から、二成分系における流れの方程式は、

$$J = -L \frac{\partial \tilde{\mu}}{\partial r} = -L \left( \frac{\partial \mu}{\partial r} - M \omega^2 r \right) \tag{20}$$

となる。 $L$  は一般化伝導度 (generalized conductivity) とよばれる量である<sup>4)</sup>。系内で温度一定、理想溶液を仮定 ( $\mu = \mu_0 + RT \ln C$ ) し、 $L = C/Nf$  <sup>6)</sup> を用いて

$$J = \underbrace{\frac{M(1-\bar{v}\rho)}{Nf}}_{(a)} \omega^2 r C - \underbrace{\frac{RT}{Nf}}_{(b)} \frac{\partial C}{\partial r} \tag{21}$$

を得る。ここで、 $J$  は沈降方向に垂直なセル断面 (位置  $r$ ) を単位時間 (単位面積あたり) に通過する溶質の量である。(4) 式より、(21) 式で (a) は沈降係数  $s$  にあたることがわかり、また、(b) は拡散係数  $D$  である。すなわち、

$$J = s \omega^2 r C - D \frac{\partial C}{\partial r} \tag{22}$$

$$s = \frac{M(1-\bar{v}\rho)}{Nf}, \quad D = \frac{RT}{Nf} \tag{23}$$

ここで、セクター型のセルでは半径方向の断面積が中心からの距離に比例することを考慮すると、連続の方程式 (流体中における質量保存の方程式) は

$$\left(\frac{\partial C}{\partial t}\right)_r = -\frac{1}{r} \cdot \left(\frac{\partial rJ}{\partial r}\right) \quad (24)$$

となる。この式に (22) を代入すると、Lamm 方程式が導かれる。

$$\left[\frac{\partial C}{\partial t}\right]_r = -\frac{1}{r} \left\{ \frac{\partial}{\partial r} \left[ s\omega^2 r^2 C - Dr \left[ \frac{\partial C}{\partial r} \right]_t \right] \right\} \quad (25)$$

この式が沈降速度法、沈降平衡法を含め超遠心分析の基本となるものである。すでに述べたように  $s$  と  $D$  は一般的には濃度の関数である。

この方程式を沈降速度法の際のプラトー領域 ( $C=C_p$ ) に適用すると、この領域では  $(\partial C_p / \partial r) = 0$  なので、

$$\left(\frac{\partial C_p}{\partial t}\right)_r = -2s\omega^2 C_p \quad (26)$$

ここで、 $C_p$  はプラトー領域の濃度である。これを積分して、

$$C_p = C_0 \cdot e^{-2s\omega^2 t} \quad (27)$$

を得る。この式は遠心が進むにつれてプラトー領域での濃度が下がっていくことを示しており、半径方向の希釈効果 (radial dilution) とよばれている。図 8 (b) にもその効果が見えている。遠心が進むにつれて濃度が下がってくるのは、セクター型のセル中で微小な容積をもつ断面を考えると、セルがくさび形をしているために断面が遠心力場と同様に  $r$  に比例して増加し、そ

\*6  $L=C/Nf$  の導出<sup>9)</sup> :

$r$  方向への流れを考え、濃度  $C$  の溶質が速度  $v$  で沈降しているとする、

$$J = vC \quad (A1)$$

ここで、 $J$  は単位時間に  $r$  に垂直な面の単位面積を通過する溶質の量である。他方、不可逆過程の熱力学によれば、ポテンシャル  $U$  における粒子の流れは、

$$J = -L \frac{\partial U}{\partial r} \quad (A2)$$

と表わされる。ここで、 $L$  は電場におけるオームの法則との対応から一般化伝導度とよばれる。(A1), (A2) より

$$vC = -L \frac{\partial U}{\partial r} \quad (A3)$$

また、ポテンシャル  $U$  に存在する粒子には、

$$F = -\frac{1}{N} \frac{\partial U}{\partial r} \quad (A4)$$

の力が働く。ここで、 $N$  はアボガドロ数である。(A4) 式を (A3) 式に代入して、

$$vC = LF$$

この条件下では  $F=fv$  なのでこれを上式に代入して

$$L = \frac{C}{Nf}$$

を得る。

のために溶質の流入よりも流出のほうが大きくなることを考えると定性的に理解できる。

Lamm 方程式は特殊な場合を除いて解析的な解を求めることができないが、いくつかの近似解が求められている。Demeler の開発している超遠心分析のパッケージ UltraScan には Fujita-Macosham の近似解<sup>7)</sup> を用いて数値解析を高速で求めるソフトウェアがあり、ランダムなノイズを入れることもできるので、実際に超遠心分析を行なったときの臨場感でシミュレーションが行なえる。このようなシミュレーションで  $s$ ,  $D$  をパラメータとして変化させたり、多成分系の場合、どの程度  $s$  値が異なれば分離できるかなどを調べてみる事ができる。

最近、この方程式の数値解を用いて、最小二乗法で速度法の実験データにあてはめて沈降係数と拡散係数を同時に求める方法が SVEDBERG というプログラムとして紹介されている(第IX節参照)。この方法は比較的拡散係数が大きい場合に有効なようである。下記に述べる  $dC/dt$  法でも沈降係数と拡散係数が求められ、Svedberg の式を変形した次式を用いて分子量を見積もることができる。

$$M = \frac{sRT}{D(1-\bar{v}\rho)} \quad (28)$$

逆に、後述するように平衡法で独立に分子量  $M$  を求めると、 $M$  と  $s$  の値から (23) 式を用いて、摩擦係数  $f$  が求まる。摩擦係数、または拡散係数から分子の形状についての情報を得る方法についてはすでに述べた。

VII.  $dC/dt$  法

ここで、XL-I の解析プログラムに含まれている新しい解析法  $dC/dt$  法<sup>8)</sup> について簡単に述べておきたい。このプログラムはとくにレイリー法で威力を発揮するが、吸収でモニターする場合でも有効で便利な方法である。レイリー法の特徴として、感度はよいのだがノイズが多いということがある。長所としてはとくに高濃度まで測定可能なこともあげられる。また、CCD カメラでデータを取り込むため、スキャンによって吸収でモニターする場合に比べて 1 回のデータ取り込みの時間が大幅に短縮される。つまり、短い時間間隔で多くのデータ収集ができるわけである。

一般的に、取り込まれるデータには常にノイズが含まれるが、ノイズは時間に依存する部分と時間に依存しない成分とからなる。後者にはセルの汚れや歪みが

含まれる。dC/dt 法では時間的に近接する2つの沈降パターンを差し引くことによってこの時間に依存しないノイズを除いている。Staffordはこの方法によってS/N比を格段に向上させることができることを示した。具体的な手順は以下のとおりである。

半径方向の距離  $r$  に対して濃度  $C$  (レイリー法ではフリンジの数) をプロットした通常の沈降パターンを短い時間間隔で数回分取り込み、あとのパターンから先のパターンを差し引くと  $r$  に対して  $dC/dt$  をプロットすることができる (図 13 a)。Bridgman は 1942 年にすでに  $\partial C/\partial r$  から沈降係数の分布関数  $g(s)$  を導く関係式を導出しているが、Stafford は非常によく似た関係式が  $\partial C/\partial t$  を使って導かれることを示した。すなわち、

$$g(s^*)_t = \left( \frac{\partial C}{\partial t} \right)_{\text{corr}} \left( \frac{1}{C_0} \right) \left( \frac{\omega^2 t^2}{\ln(r_m/r)} \right) \left( \frac{r}{r_m} \right) \quad (29)$$

ここで、 $g(s^*)_t$  は下記の式 (30) によって定義されるみかけの沈降係数の分布であり、沈降係数だけでなく拡散係数の情報も含まれている。添字の  $t$  はこれが  $\partial C/\partial t$  から得られたものであることを示し、 $\partial C/\partial r$  から得られる分布関数と区別している。

$$s^* = \frac{1}{\omega^2 t^*} \ln(r^*/r_m) \quad (30)$$

ここで、境界上の各点  $r^*$  におけるみかけの沈降係数を  $s^*$  と表わしている。式 (29) と (30) を使って、 $dC/dt$  vs.  $r$  のグラフ (図 13 b) を  $g(s^*)$  vs.  $s^*$  のグラフ (図 13 c) に変換することができる。

超遠心分析機 XL-I 付属の解析プログラムでは  $C(t)$  vs.  $r$  のグラフを  $\partial C/\partial t$  vs.  $r$  のグラフに変換したのち、データの解析したい部分だけを切り出してからさらに各ピークをガウス分布で近似するプロトコールが備えられている。 $g(s^*)$  vs.  $s^*$  のガウス関数 (誤差関数) の半値幅から次式を用いて拡散係数が求められる。

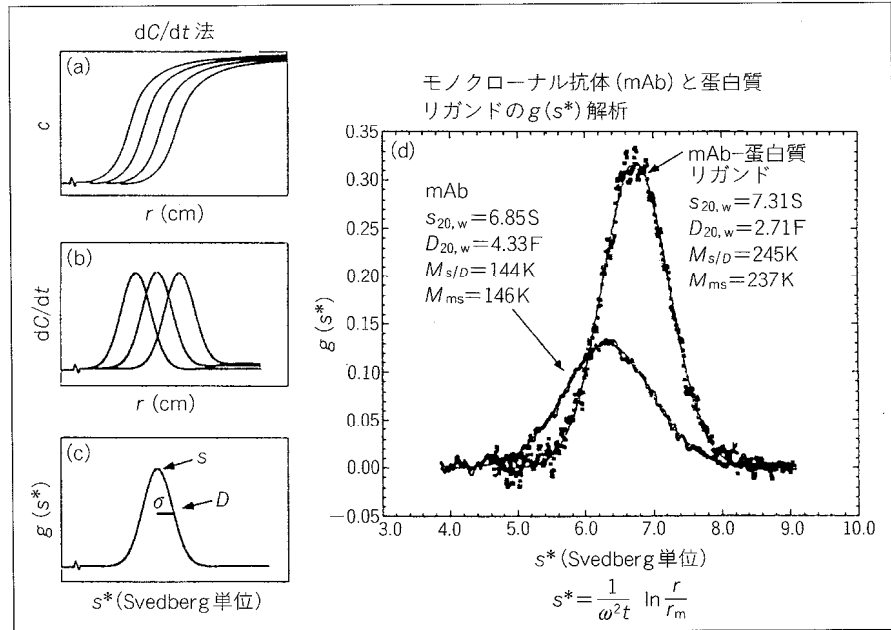


図 13 dC/dt 法

(a) 速度法の連続した4つのスキャン ( $C$  vs.  $r$ ), (b)  $dC/dt$  vs.  $r$ , (c)  $g(s^*)$  vs.  $s^*$ , (d) モノクローナル抗体 (mAb) と蛋白質リガンドの  $g(s^*)$  解析。

$$D = \frac{(\sigma \omega^2 t r_m)^2}{2t} \quad (31)$$

ここで、 $r_m$  はメニスカスの位置である。 $\sigma$  は次式で定義される。

$$g(s^*) = A \exp \left\{ -\frac{1}{2} \left( \frac{s^* - s}{\sigma} \right)^2 \right\} \quad (32)$$

ここで、 $s$  は  $g(s^*)$  のピークの  $s^*$  の値である。この  $s$  と (31) 式の  $D$  を (28) 式に代入することによって分子量を求めることができる。この方法の応用例は次号 [(4) 解析の実際] で述べる。

### VIII. Van Holde-Weischet 法

一般的に速度法で界面を測定する場合に問題になるのは、観測される界面の広がりや拡散のみによるのか、それとも沈降係数の近い複数の溶質が混在することにも起因しているのかの判断である。Van Holde と Weischet はこの問題を解決するために次の事実注目した<sup>9)</sup>。すなわち、拡散による界面の広がりや時間  $t$  の平方根に依存するのに対して、溶質の不均一性に起因する界面の広がりや時間  $t$  に依存するというのである。そこで、まず、境界に沿った各点で見かけの沈降係数を定義する。

$$s^* = \frac{\ln(r/r_0)}{\omega^2 t} \quad (30 a)$$

また、境界の各点の位置を表わすパラメータとして  $w$  を  $w = C(r)/C_p$  として定義する。ここで、 $C(r)$  は回転中心からの距離  $r$  における溶質の濃度、 $C_p$  はプレート領域の濃度である。つぎに、境界の形状を表わす関数として Lamm 方程式の解が必要であるが、簡単のために Faxen の近似解を採用している。この近似では  $s$  および  $D$  に濃度依存性がないこと、セルは十分長くて端の効果がなく、すなわち底に溶質がたまっていくための効果はないとする。界面では溶質の濃度が 0 から  $C_p$  まで変化する。この条件で、

$$s^*_w = s - \frac{D^{1/2}}{r_0} \frac{2}{\omega^2} \Phi^{-1}(1-2\omega) t^{-1/2} \quad (33)$$

と表わされる。ここで、 $\Phi$  は誤差関数を積分したもので、

$$\Phi(x) = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^x e^{-y^2} dy \quad (34)$$

であり、その逆関数  $\Phi^{-1}$  は

$$\Phi^{-1}\Phi(x) = x \quad (35)$$

として定義される。(33)式によれば、界面の各点における見かけの沈降係数を  $t^{-1/2}$  に対してプロットして  $t$  を無限大に外挿すれば  $s$  が得られる(図 14)。条件がよければ直線の傾きから拡散係数も求めることができる。Van Holde - Weischet 法は Borries Demeler の UltraScan パッケージに収録されている。

### IX. SVEDBERG

SVEDBERG<sup>10)</sup> は John Philo によって開発されたプログラムで、沈降速度法の沈降プロファイルに直接 Lamm 方程式の近似解 (Faxen の解) を最小自乗法に

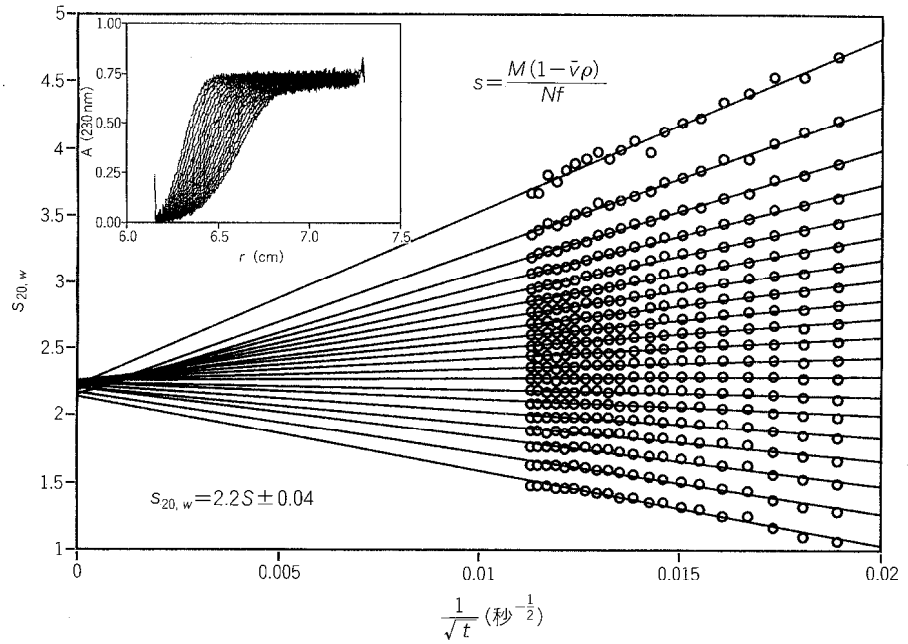


図 14 Van Holde-Weischet 法

速度法の各スキャンでベースラインからプレートまでの間を 20 等分し、各時刻  $t$  において界面上の各点で  $s$  値を計算し、 $1/\sqrt{t}$  に対してプロットしたもの。  $t$  を無限大に外挿することによって真の  $s$  値を求める。多成分の場合は  $s$  値の分布が求められる。

よってあてはめ、沈降係数と同時に拡散係数を決定することができる。とくに小さな蛋白質で拡散係数が比較的大きい場合に良い結果が期待される。このプログラムは RASMB の Web site (前号 p. 2025) からダウンロードできる。

### 文 献

- 4) Fujita, H. : in "Foundations of Ultracentrifugal Analysis" John Wiley and Sons, New York, pp. 106-111 (1975)
- 5) Cantor, C., Schimmel, P. : in "Biophysical Chemistry" Vol. II, pp. 591-641 (1980)
- 6) Van Holde, K. E., Johnson, C. W., Ho, P. S. : in "Principles of Physical Biochemistry", Prentice Hall, pp. 564-586 (1998)
- 7) Fujita, H. : *ibid*, pp. 81-86
- 8) Stafford, W. F. : *Anal. Biochem.*, **203**, 295-301 (1992)
- 9) Van Holde, K. E., Weischet, W. O. : *Biopolymers*, **17**, 1387-1403 (1978)
- 10) Philo, J. : *Biophys. J.*, **72**, 435-444 (1996)
- 11) 宇井信夫：タンパク質化学 2 (安藤・今堀・鈴木編), pp. 129-201, 共立出版 (1978)