

超遠心分析法の基礎と新たな展開 — いまさら超遠心？ (3)

沈降平衡法

有坂文雄

沈降平衡法では比較的低速でローターを回転させ、溶質分子の沈降と拡散が平衡に達した時点における濃度勾配を観測する。 $\ln C$ を r^2 に対してプロットしたときの傾きから分子量が求められる。沈降平衡法で求められる分子量は分子の形によらないのが特徴である。高度に荷電している溶質や非対称性の大きい溶質のように理想溶液として扱えない場合には、濃度依存性を調べることによって真の分子量とビリアル係数を決定できる。複数の溶質からなる場合には、それらが単なる混合物であるか、会合平衡にあるかを決定でき、平衡定数を見積もることができる。

Key words 【沈降平衡法】【分子量】【ビリアル係数】【平衡定数】
【ストイキオメトリー】

はじめに 沈降速度法が比較的高速の遠心で沈降中の界面を観測するのに対して、平衡法は比較的低速で遠心し、平衡に達したセル内の溶質の濃度分布を観測する。平衡法では平衡に達する時間を短縮するためにカラム柱（メニスカスから底までの距離）を短くするので、沈降速度法の場合の1/4程度の容量で測定でき、濃度も半分以下でよいため、少量の試料(50 μg くらい)で行なえる。ただし、試料に余裕があれば、できる限りあらかじめ沈降速度法を行なうことが望ましい。試料の均一性を調べる目的には沈降速度法は平衡法よりも感度がよく、均一性を確認したうえで平衡法が行なえれば結果の解釈がより明確になる。

X. 分子量の決定

平衡状態ではセル内で $J=0$ (J は前回説明したように、溶質の流束)になるので、理想溶液を仮定すると、(21)式(本シリーズ第2回参照)から

$$\frac{1}{C} \frac{dC}{dr} = \frac{\omega^2 r M (1 - \bar{v} \rho)}{RT} \quad (36)$$

が得られる。ここで、 C は重量濃度(g/l など)である。すなわち、

$$\frac{d(\ln C)}{d(r^2)} = \frac{\omega^2 M (1 - \bar{v} \rho)}{2RT} \quad (37)$$

これを積分して、

$$\ln \frac{C(r)}{C(a)} = \frac{\omega^2 M (1 - \bar{v} \rho) (r^2 - a^2)}{2RT} \quad (38)$$

を得る。ここで、 $C(a)$ は位置 a における濃度を表わす。 a は通常メニスカスの位置を取る。 \bar{v} は溶質の偏比容、 ρ は溶媒の密度であり、その他は既知なので、(38)式に従って $\ln C$ を r^2 に対してプロットすれば、傾きから M を求めることができる。 ρ については水の密度の正確な値が表になっており(表2, 本シリーズ第2回参照)、また各種の塩溶液について測定がなされているのでそれを参考にすることができる。(38)式からわかる重要なことは、沈降平衡法で求められる分子量は分子の形に依存しないことである。図15に(38)式で溶質の

濃度と回転数を変えたときに濃度分布がどのように変化するかを T4 フェージ gp10-gp11 複合体を用いて行なった実験結果を例として示す。

1. 偏比容について

(38)式からわかるように、分子量の計算には偏比容 \bar{v} が必要である。偏比容は 1 g の溶質を多量の溶媒に溶かしたときの溶液の容積増加として定義される。低濃度の場合は比容に等しい。偏比容測定は現在、精密振動密度計を用いる方法が最も精度が高い。通常、偏比容の測定は数~10 mg 程度の試料を必要とし、手間もかかるため、構成アミノ酸残基の偏比容の重量平均を計算することによって求める簡便法がとられている(表4)。しかし、原理的には蛋白質では残基間相互作用なども偏比容

に影響を与えるはずで、実際に測定した例を見ると、とくに比較的小さな蛋白質では計算値からずれているものも多い。この点については本誌に月向により詳しく述べられている¹²⁾のでそちらを参照されたい。なお、表4には各アミノ酸残基への水和水の数も記されている。精密振動密度計 (Anton-Parr 社など) は“く”の字型をした試料管に溶液を満たし、その管の固有振動数を測定することによって重量、したがって密度を正確に測定する機器である。いくつかの濃度で試料溶液の密度を測定することによって、次式に基づいて偏比容が求められる。

$$\rho = \rho_0 + (1 - \bar{v}\rho_0)C \quad (39)$$

分子量を求めるときには(38)式からわかるように(1- $\bar{v}\rho$)で割る操作が入るため、 \bar{v} がたとえば0.72から0.73(1.4%の違い)になると、分子量は3.7%の誤差となり、偏比容の正確な値は分子量の決定にとって重要であることがわかる。

ここで、Laue らによって開発された“sednterp”というプログラムを紹介しておきたい。このユーティリティはアミノ酸組成から偏比容や水和水を計算したり、

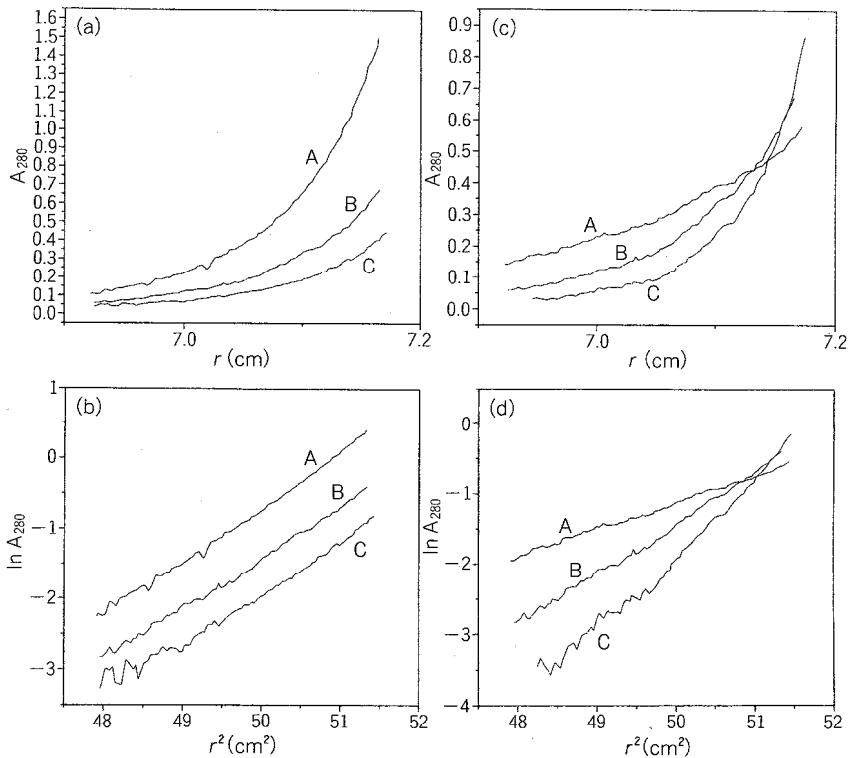


図 15 沈降平衡法
T4 フェージの蛋白質複合体 gp10-gp11 について行なった沈降平衡の実験結果 (20°C) を式 (38) に基づいてプロットしたもの。(a, b) A: 0.2 mg/ml, B: 0.35 mg/ml, C: 0.6 mg/ml, 7,000 rpm。(c, d) 0.35 mg/ml, A: 9,000 rpm, B: 7,000 rpm, C: 5,000 rpm。(a)と(c)は A₂₈₀ を r に対してプロットしたもの。(b)と(d)は ln A₂₈₀ を r² に対してプロットしたもの。

ポリペプチドの分子量を計算するほか、緩衝液や塩溶液の密度、粘度のデータベースにもなっており、上記 ρ の計算にも便利である。また、これらのデータベースにさらに自分のデータを加えてデータベースを充実させることができ、超遠心分析結果のデータベースも構築することができて便利である。このプログラムも RASMB の web site(本シリーズ第1回参照; <http://www.bbri.harvard.edu/RASMB/rasmb.html>) からダウンロードできる。

2. 平衡到達に関する時間

系が平衡に達するまでに要するおよその時間 t は次式で与えられる¹³⁾。

$$t \cong 0.7 \frac{(r_b - r_a)^2}{D} \quad (40)$$

ここで、 r_a , r_b はそれぞれ底およびメニスカスの位置、 D は拡散係数である。この式から平衡に達するのに要する時間はカラム柱の長さの2乗に比例し、拡散係数の大きさに反比例することがわかる。実験的には2~3時間おきに濃度分布を測定し、変化が認められなくな

表 4 アミノ酸の残基量偏比容, 水和

アミノ酸	残基量	\bar{v} (ml/g)	水和	
			モルH ₂ O/モルaa (pH 6~8)	モルH ₂ O/モルaa (pH 4)
Ala	71.1	0.74	1.5	1.5
Arg	156.2	0.70	3	3
Asn	114.1	0.62	2	2
Asp	115.1	0.60	6	2
Cys	103.2	0.63	1	1
2Cys	204.3	0.63	—	—
Gln	128.1	0.67	2	2
Glu	129.1	0.66	7.5	2
Gly	57.1	0.64	1	1
His	137.2	0.67	4	4
Ile	113.2	0.90	1	1
Leu	113.2	0.90	1	1
Lys	128.2	0.82	4.5	4.5
Met	131.2	0.75	1	1
Phe	147.2	0.77	0	0
Pro	97.1	0.76	3	3
Ser	87.1	0.63	2	2
Thr	101.1	0.70	2	2
Trp	186.2	0.74	2	2
Tyr	163.2	0.71	3	3
Val	99.1	0.86	1	1

った時点で平衡に達したと判断する。

XI. 非理想溶液の場合

さて, (38)式の導出では, 理想溶液を仮定してある。理想溶液が仮定できない場合には同式の下母に第2項が加わる。

$$\frac{d(\ln C)}{d(r^2)} = \frac{\omega^2 M (1 - \bar{v}\rho)}{2RT [1 + C(d \ln y / dC)]} \quad (41)$$

ここで, y は溶質の活動度係数である。右辺の下母第2項は通常正なので, この項が無視できない場合には $\ln C \sim r^2$ のプロットでは直線が高濃度側で直線の下側にずれる (図 16)。 $\ln y$ を濃度の多項式として

$$\ln y = BMC + DMC^2 + \dots \quad (42)$$

のように展開し, 濃度の低いところで第1項だけとって,

$$\frac{d(\ln C)}{d(r^2)} \approx \frac{\omega^2 M (1 - \bar{v}\rho)}{2RT (1 + BMC)} \quad (43)$$

を得る。したがって, 通常の方法で求められる見かけの分子量 M_{app} は

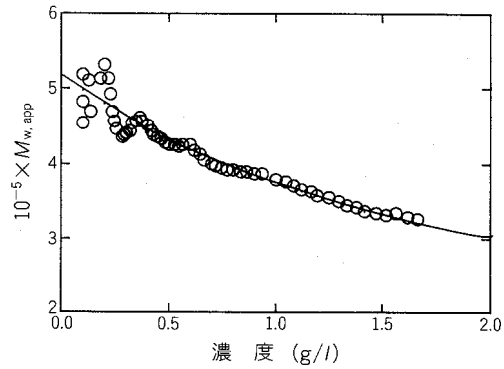


図 16 非理想項 (ビリアル係数) の影響¹⁴⁾
重量平均の分子量を濃度に対してプロットすると(44)式から予想されるように濃度の増加とともに分子量が減少するように見える。

$$M_{app} = \frac{M}{1 + BMC} \quad (44)$$

となる。ここで, B は第2ビリアル係数とよばれている。 B は正であることが多く, その場合には溶質-溶媒間の強い相互作用(溶媒和), 溶質間の静電的反発, 排除体積効果が考えられる。溶質間の静電的反発の影響はイオン強度を高めることで抑えることができる。等電点から極端に離れていなければ, イオン強度 0.1~0.2 程度でこの影響は無視できると考えられている。表 5 に示されるように, 棒状分子やランダムコイル (変性蛋白質など) では天然状態の球状蛋白質に比べて B 値が大きいことがわかる。逆に, 負の B 値は溶質-溶媒間相互作用よりも溶質どうしの方に大きな相互作用があることを示している。

いずれにしても, 非理想性を無視できるようにするためには, 低濃度で測ることが必要で, 一般的には濃度をゼロに外挿することによって真の分子量が求められる。球状蛋白質では, 1 mg/ml 程度以下の濃度では適当なイオン強度があれば理想溶液の条件が満たされると考えてよい。

表 5 分子の形状と第2ビリアル係数

分子	B^a	$(1 + BM_2C_2)^b$
球 $M=10^5$	3×10^{-5}	1.015
棒状 $L/d=100$ $M=10^5$	7.5×10^{-4}	1.375
ランダムコイル $M=10^5$ (良溶媒)	5×10^{-4}	1.250

a) 単位は $\text{cm}^3\text{mol}/\text{mg}^2$ 。

b) $C_2=5 \text{ mg/ml}$ を仮定してある。

XII. 多成分系の解析：相互作用のない場合

前述の議論では溶質が1種類であることを仮定していた。複数種類の溶質が存在する場合はどうか^{15,16)}。各成分間には相互作用はないものとする、(38)式から成分*i*について

$$\frac{dC_i}{d(r^2)} = \frac{\omega^2(1-\bar{v}\rho)}{2RT} M_i C_i \quad (45)$$

が成り立つ。ここで、

$$C = \sum_2^n C_i \quad (46)$$

と置くと、(添え字*i*は溶媒を表わすものとし、溶質を2から*n*までで表わしてある。)

$$\sum_2^n \frac{dC_i}{d(r^2)} = \frac{dC}{d(r^2)} = \frac{\omega^2(1-\bar{v}\rho)}{2RT} \sum_2^n C_i M_i \quad (47)$$

さらに、

$$M_w = \frac{\sum_2^n C_i M_i}{\sum_2^n C_i} \quad (48)$$

を用いると [*C_i*は重量濃度 (g/l など) であることに注意]、(47)式は

$$\frac{d \ln C}{d(r^2)} = \frac{\omega^2(1-\bar{v}\rho)}{2RT} M_w \quad (49)$$

と表わすことができる。すなわち、溶液が複数の分子種を含む場合には全濃度の対数を *r*² に対してプロットしたときに、セル内の各点における傾きから求められる分子量は各点における構成分子種の重量平均になっていることがわかる。さらに、分子量の *z* 平均も次式を用いて求めることができる。

$$M_z = \frac{\sum_2^n C_i M_i^2}{\sum_2^n C_i M_i} = \frac{2RT}{\omega^2(1-\bar{v}\rho)} \frac{d[\ln\{C(r)M_w(r)\}]}{d(r^2)} \quad (50)$$

XIII. 相互作用の解析(1)：自己会合

新たに精製した蛋白質の分子量を測定したときに、分子量が予想したより大きく出て自己会合の可能性が示唆されることがある。単量体と2量体の存在が認められたとする。その場合、その2分子種が単なる混合物であるのか、平衡にあるのかが問題になる。これらの

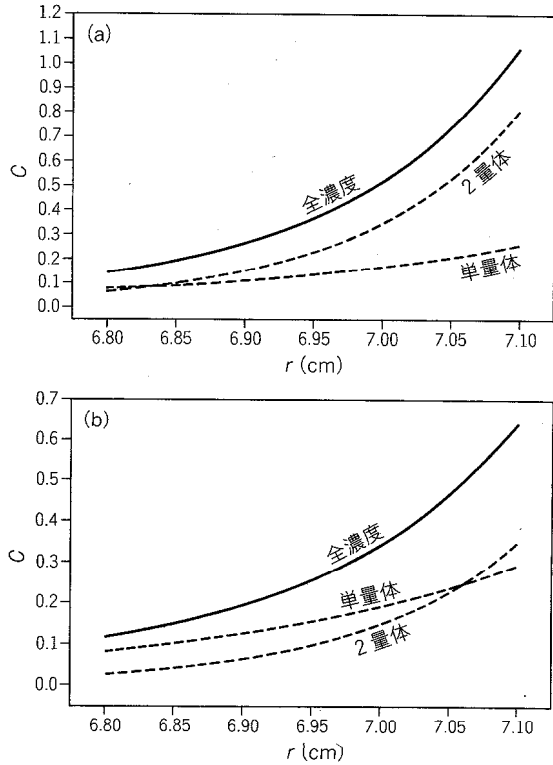


図 17 単量体と2量体間に相互作用がある場合とない場合 (シミュレーション)

単量体の分子量=50 K, 回転数 10,000 rpm。(a) 単量体 (50 K) と2量体 (100 K) の混合物で相互作用のない場合。(b) 単量体と2量体が平衡にある場合 [2(50 K) ⇌ 100 K]。平衡定数=10⁵ M⁻¹。この場合にはセル内の各点で単量体と2量体が平衡にあり、それぞれの成分は単独である場合とは異なる濃度分布になる。

状況はどのように区別できるだろうか^{15,16)}。いま、上記2分子種が混合物で相互作用がないとすると、(38)式から

$$C(r) = C_1(r) + C_2(r) = C_1(r_0) e^{\frac{\omega^2 M_1(1-\bar{v}\rho)}{2RT}(r^2-r_0^2)} + C_2(r_0) e^{\frac{\omega^2 M_2(1-\bar{v}\rho)}{2RT}(r^2-r_0^2)} \quad (51)$$

が成り立つ。ここで、*r*₀ はメニスカスの位置である(図 17 a)。

次に、2M ⇌ D の平衡を考え、平衡定数を *K*₁₂ とすると、[D] = *K*₁₂[M]² である。ここで、[D] と [M] はモル濃度である。*C* は重量濃度を表わすのに用いてきたが、モル濃度との間には

$$K_{12} = \frac{[D]}{[M]^2} = \frac{(C_D/2M_M)}{(C_M/M_M)^2} = \frac{M_M}{2} \frac{(C_D)}{(C_M)^2} \quad (52)$$

の関係があるので、

$$K'_{12} = \frac{2}{M_M} K_{12} = \frac{C_D}{(C_M)^2} \quad (53)$$

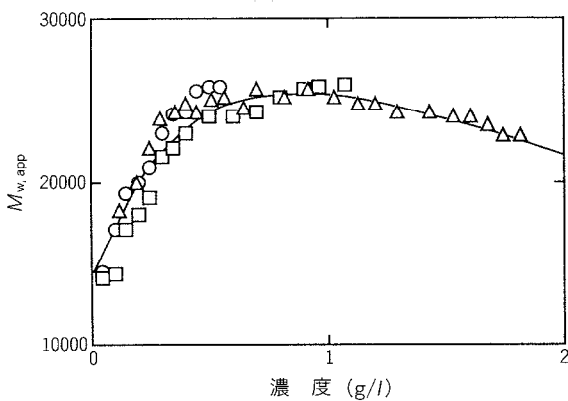


図 18 会合の影響¹⁴⁾

濃度に対して (重量平均) 分子量をプロットしたとき、右上がりの曲線が得られる場合には溶質分子の会合が考えられる。さらに濃度を上げたときに右下がりになっているのは非理想溶液であることを示している。○ : 0.25 g/l, □ : 0.5 g/l, △ : 1.0 g/l。

を用いて、

$$C_T = C_M + C_D = C_M + K'_{12}(C_M)^2$$

$$= C_M(\gamma_0) e^{\frac{\omega^2}{2RT} M(1-\bar{v}\rho)(r^2-r_0^2)}$$

$$+ K'_{12}[C_M(\gamma_0)]^2 e^{\frac{\omega^2}{2RT} 2M(1-\bar{v}\rho)(r^2-r_0^2)} \quad (54)$$

が成り立つ (図 17 b)。したがって、問題は実験により得られる曲線に (51) 式と (54) 式のどちらがよくあてはまるかを調べることになる。通常、パラメータ数の少ない (51) 式をまずあてはめ、これがうまくあてはまらない場合に (54) 式を検討する。その場合、単一の条件では両者を区別することは困難なので、蛋白質の濃度と回転数の 2 つのパラメータを変えて測定を行ない、グローバルフィッティング (複数の条件で行なわれたデータを同時に満足する最適の解を探す) によって両者の可能性を検討する (図 17, 次回解説する)。なお、濃度に対して重量平均の分子量をプロットすることによって、単量体が会合する傾向があるかどうかを検定することができる (図 18)。

XIV. 相互作用の解析 (2) : 異種会合

オリゴマー蛋白質は同一のサブユニットからなる場合もあれば異なるサブユニットからなる場合もある。また、蛋白質どうしではなく、蛋白質と核酸や糖質との相互作用を調べたいこともある。超遠心分析で異種分子間の会合を調べる際に問題になるのは解析の際に吸光係数が溶質によって異なることである¹⁷⁾。もう一つの問題は、解析の際に常に $(1-\bar{v}\rho)$ という項がかかって

くることである。 \bar{v} が大差なければ問題ないが、大きく異なる場合は無視すれば誤差の原因となる。逆に、蛋白質と核酸のように吸収スペクトルが大きく異なる場合にはこれを利用して解析する方法も報告されている¹⁸⁾。

最も簡単な異種会合として



の平衡を考え、平衡定数を K_{AB} とすると、 $[AB] = K_{AB}[A][B]$ である。ここで、 $[X]$ は X のモル濃度である。(52) 式と同様に重量濃度とモル濃度との間には、

$$K_{AB} = \frac{[AB]}{[A][B]} = \frac{C_{AB}/M_{AB}}{(C_A/M_A)(C_B/M_B)}$$

$$= \frac{M_A M_B}{M_{AB}} \frac{C_{AB}}{C_A C_B} = \frac{M_A M_B}{M_{AB}} K'_{AB} \quad (56)$$

の関係がある。(54) 式を導いたのと同様に

$$C_0 = C_A + C_B + C_{AB}$$

$$= C_A(\gamma_0) e^{\frac{\omega^2}{2RT}(1-\bar{v}_A\rho)(r^2-r_0^2)}$$

$$+ C_B(\gamma_0) e^{\frac{\omega^2}{2RT}(1-\bar{v}_B\rho)(r^2-r_0^2)}$$

$$+ K'_{AB} C_A(\gamma_0) C_B(\gamma_0) e^{\frac{\omega^2}{2RT}(1-\bar{v}_{AB}\rho)(r^2-r_0^2)} \quad (57)$$

ここで、溶質濃度を吸収でモニターすることになると、両者の吸光係数は一般的に異なる。そこで、 A の吸光係数を α_A 、 B の吸光係数を α_B 、 AB の吸光係数を α_{AB} とすれば、セル内の位置 r における吸光度は

$$S_\lambda(r) = S_{\lambda,A}(r) + S_{\lambda,B}(r) + S_{\lambda,AB}(r)$$

$$= \alpha_{\lambda,A} C_A(r) + \alpha_{\lambda,B} C_B(r) + \alpha_{\lambda,AB} C_{AB}(r) \quad (58)$$

ここで、添え字の λ は測定に用いた波長を表わす。簡単のために、複合体 AB の吸光係数は A の吸光係数と B の吸光係数の寄与の単純な和である場合を考える。すなわち、

$$\alpha_{\lambda,AB} = f_{A,AB} \alpha_A + f_{B,AB} \alpha_B \quad (59)$$

ここで、 $f_{A,AB}$ と $f_{B,AB}$ はそれぞれ複合体 AB における A と B の重量分率であり、

$$f_{A,AB} + f_{B,AB} = 1$$

である。いま、吸光度 $S_{\lambda,h}$ を濃度の代わりに用いて K'_{AB} を下記のように定義すると、この量は K'_{AB} と次のような関係にある。

$$K'_{AB} = \frac{S_{\lambda,AB}}{S_{\lambda,A} S_{\lambda,B}} = \frac{\alpha_{\lambda,AB}}{\alpha_{\lambda,A} \alpha_{\lambda,B}} K'_{AB} \quad (60)$$

K'_{AB} は K_{AB} や K'_{AB} と異なって測定する波長 λ によって変化することに注意されたい。

上記の解析の結果は、2 種の異分子が会合する際に、各分子種が理想溶液として扱うことができ、各分子種の吸光係数が既知であれば、若干の仮定 (会合体の吸収が両者の吸収の単純な和になる) の下に、同種分

子種と同様に解析できることを示している。詳しくは文献17を参照されたい。また、蛋白質-核酸の相互作用については次回に例をあげて説明する。

XV. 変性剤存在下での沈降平衡

変性剤存在下で分子量を測りたいことがある。ひとつは可溶化した膜蛋白質の分子量を求める場合で、この場合には正確な分子量を得るためには結合している界面活性剤の量とその偏比容が必要になる。この点については文献19などを参照されたい。

もうひとつの一般的な問題として、比較的強く結合したオリゴマー蛋白質のサブユニット数を見積もる目的で、塩酸グアニジンまたは尿素存在下で分子量を測定したい場合がある。すなわち、変性剤によって複合体をサブユニットに解離させ、その状態で分子量を測定する。この場合、厳密に言えば、変性状態では蛋白質自体の偏比容が若干変化するはずであり、結合した変性剤の量とその偏比容が問題になる²¹⁾。しかし、実際上は蛋白質の偏比容は変化しないと仮定し、塩酸グアニジンや尿素の結合は無視して溶媒の密度の変化のみ考慮されることが多い。変性剤存在下ではこのような問題があるので、厳密な測定は困難であるが、ホモオリゴマー蛋白質の場合、オリゴマーの分子量と比較してサブユニットの数を推定するような目的にはこれで十分なことが多い。図19にT4ファージ gp57A のグアニジン塩酸による4量体から単量体への解離の例を示す。

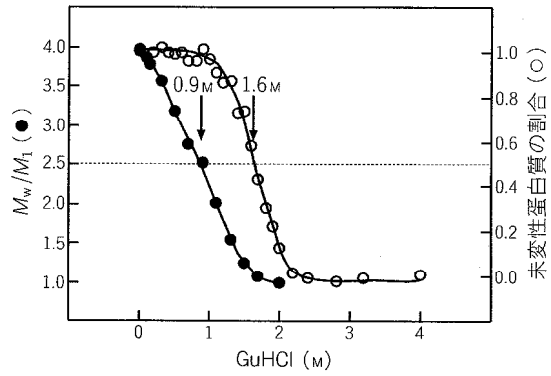


図19 塩酸グアニジン存在下での沈降平衡 T4 ファージ gp57A の例。●：沈降平衡法，○：CD (220 nm)。

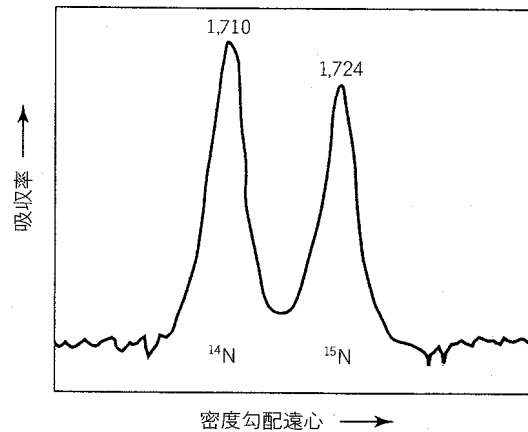


図20 塩化セシウム密度勾配遠心による拡散の分離²⁰⁾ 塩化セシウム密度勾配遠心による¹⁵Nを含むDNAと¹⁴Nを含むDNAの分離。ごく微小の密度差で両DNAがよく分離されている。MeselsonとStahlはこの手法を用いてDNAの半保存的複製を証明した。

XVI. 密度勾配遠心

もう一つのまったく異なった原理に基づく超遠心分析が高濃度の塩化セシウムなどの塩濃度勾配を利用した密度勾配遠心である。原理はプラスミドの単離・精製に用いられている塩化セシウムの密度勾配遠心と同じであって、当該の生体高分子が遠心力場の中で自発的に形成される塩の密度勾配中で自身の密度と同じ密度の位置に移動することを利用するものである。この方法はとくに核酸の分析に有用であり、MeselsonとStahl(1958)²⁰⁾がDNAの半保存的複製を証明したことでよく知られている(図20)。いま、溶質の偏比容を \bar{v} とし、 r_0 の位置が $1/\bar{v}$ に等しくなるとすると、その近傍では塩の濃度勾配は直線と見なせるので、

$$\rho = \frac{1}{\bar{v}} + (r - r_0) \frac{d\rho}{dr} \quad (61)$$

である。ここで、 $d\rho/dr$ は塩の種類とローターの回転数によって決まる。これを、(36)式に代入すると、

$$\frac{1}{C} \frac{dC}{dr} = -\frac{\omega^2 r M}{RT} \bar{v} (r - r_0) \frac{d\rho}{dr} \quad (62)$$

が得られる。 r_0 の近傍では $(r - r_0) dr = (1/2) d(r - r_0)^2$ と近似できるので、上式を積分して

$$\ln C \cong -\frac{\omega^2 r M}{2RT} \bar{v} (r - r_0)^2 \frac{d\rho}{dr} \quad (63)$$

が得られる。または、

$$C = e^{-\frac{\omega^2 r M}{2RT} \bar{v} (r - r_0)^2 \frac{d\rho}{dr}} \quad (64)$$

すなわち、溶質は $r = r_0$ を中心としてガウス分布をする

ことがわかる。図 20 に通常の ^{14}N を含む DNA と ^{15}N を含む DNA を分離した例を示す。

おわりに 沈降平衡法の基礎原理と応用について理論的な背景を中心に述べた。沈降平衡法は分子の形状によらずに天然状態の生体高分子の分子量を決定できる優れた方法であるが、SDS 電気泳動と組み合わせることによってサブユニット構造を簡便に決定することができるほか、解離会合系の平衡定数も決定できる。パソコンにデータを直接取り込ませることによって高度な統計処理が可能になってきたことが契機となって新しい解析方法も開発されつつあり、より高度な相互作用解析の方法として新しい発展の段階を迎えている。

文 献

- 12) 月向邦彦：蛋白質 核酸 酵素, **41**, 2026-2035 (1996)
- 13) 野田春彦：医学生物学のための物理化学, p. 24, 東京化学同人 (1971)
- 14) Ralston, G.: *in* Introduction to Analytical Ultracentrifugation, pp. 48-49, Beckman (1993)
- 15) Van Holde, K. E., Johnson, C. W., Ho, P. S.: *in* Principles of Physical Biochemistry, pp. 544-566, Prentice Hall (1998)
- 16) McRorie, D. K., Voelker, P. J.: Self-Associating Systems in the Analytical Ultracentrifuge, Beckman (1993)
- 17) Minton, A. P.: *Progr. Colloid Polym.*, **107**, 11-19 (1997)
- 18) Lewis, M. S., Shrager, R., Kim, S. J.: *Progr. Colloid Polym.*, **94**, 46-53 (1994)
- 19) Kleinekofort, W., Germeroth, L., van den Broek, J. A., Schubert, D., Michel, H.: *Biochim. Biophys. Acta*, **1140**, 102-104 (1992)
- 20) Meselson, M., Stahl, F. W.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **44**, 671-682 (1958)
- 21) Prakash, V., Timasheff, S. N.: *in* Methods in Enzymology (ed. Harris, C. H. W., Timasheff, S. N.), **17**, p. 53, Academic Press, Florida (1985)

お詫びと訂正

前号 p. 2152 の (33) 式に誤りがありましたので、下記のように訂正しお詫びいたします。

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