

沈降速度法と沈降平衡法

沈降速度法 (SV) では移動境界面の経時変化を解析し、沈降平衡法では沈降と拡散が平衡に達した濃度分布を解析した後の溶質の濃度分布を測定する。

1. 沈降と拡散の原理

沈 降

一様な大きさの砂粒または金コロイドを水に懸濁すると、重力で粒子はゆっくりと沈降していく (図1.1)。すると、粒子がなくなってしまった部分と粒子が存在している部分との間に境界が生じる。この境界面の移動する速さは重力の加速度 g に比例する。その比例定数が沈降係数 s である。

$$v = sg \quad (1.1)$$

すべての粒子が同じ s 値を持つ場合には、同じ速度で沈降し、底の、粒子が集積するところを除いて、粒子の濃度は一定になる。

沈降係数は粒子の質量 m 、比容 \bar{v} と水の密度 ρ と以下の関係にある：

$$s = \frac{m(1 - \bar{v}\rho)}{f} \quad (1.2)$$

ここで、 f は粒子の摩擦係数である。 $\bar{v}\rho$ は粒子の排除体積、 $m\bar{v}\rho$ は粒子によって排除された水の質量で、浮力を表す。 $m(1 - \bar{v}\rho)$ は浮揚分子量と呼ばれる。粒子が一様でない場合はそれぞれの大きさの粒子はその粒子固有の沈降係数で沈降し、沈降係数の分布が認められる。

分析用超遠心機が発明される以前にはスベドベリーは移動境界面を顕微鏡で観察して彼が実験で用いていた金コロイドの移動境界面を観察して沈降係数の分布を測定した。そのうちに、スベドベリーは生命に重要と考えられ始めた蛋白質に興味を持ち、これを測定したいと思ったが、蛋白質の沈降係数は小さく、拡散が勝って測定は困難だった。蛋白質の場合には重力よりももっと大きな力が必要だった。そこで、遠心力を利用することを思い立ち、超遠心機のプロトタイプを開発した。セルは特殊なローターに装填され、回転中に外からセル内のよう質の濃度分布が測定できるようにした。

移動境界面 r_b の速さ v は遠心力の加速度に比例し、沈降係数はその比例定数として定義された：

$$v = sr_b\omega^2 \quad (1.3)$$

ここで、 r_b は回転中心からの距離、 ω は回転の角速度である。(1.1) の g が $r\omega^2$ で置き換えられていることに注意。沈降係数は粒子の質量 m および摩擦係数 f と下記の関係で関係している：

$$s = \frac{m(1 - \bar{v}\rho)}{f} = \frac{M(1 - \bar{v}\rho)}{N_A f} \quad (1.2a)$$

ここで、 N_A はアボガドロ数、 ρ は溶媒の密度、 M は分子量、 s は S の単位を持ち、 $1S$ は 10^{-13}sec である。この式は単純な古典力学で導かれ、 \bar{v} は比容であるが、より厳密な

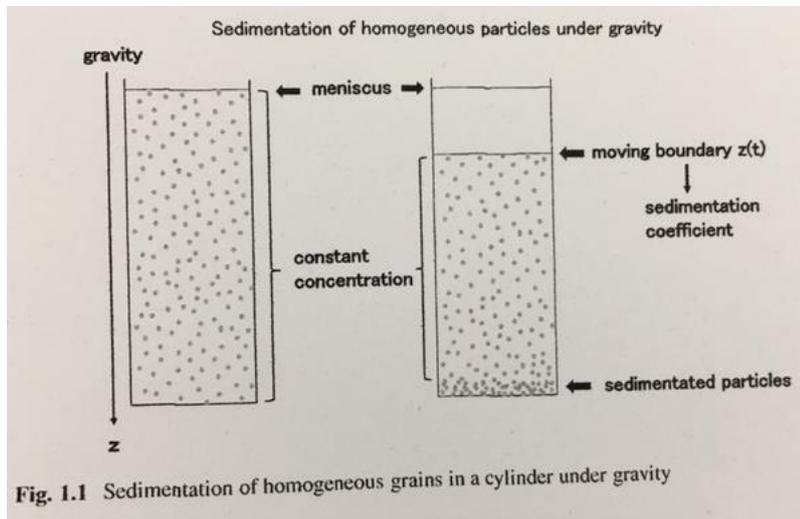


図1. 沈降 移動境界面と沈降係数

輸送過程、即ち不可逆過程の熱力学を用いると、これが偏比容であることが示される：

$$\bar{v} = \left(\frac{\partial V}{\partial m} \right)_{T,p} \quad (1.4)$$

\bar{v} は十分大きな容量の水に凍結乾燥した蛋白質を 1 g 溶かしたときに増加する容積となる。濃度が低いときには比容と近い値になる。式 (1.3) 即ち、 $(dr_b/dt) = sr_b\omega^2$ より、

$$\ln(r_b) = \ln(r_m) + s\omega^2 t \quad (1.5)$$

従って、

$$s = \ln(r_b/r_m) / (\omega^2 t)$$

ここで、 r_m はメニスカスの位置を指す。

スベドベリーは超遠心分析機 (AUC) の研究の初期の段階から、セルは仰木型にする必要があることに気づいていた。粒子は半径方向に沈降するので、直方形では一部の粒子が壁に衝突して移動境界面が乱れてしまうからである。その結果、セルの断面積が半径方向に向かって大きくなるため、プラトー領域の濃度は時間と共に減少する。これを半径方向希釈 (radial dilution) と呼ぶ (図 2)：

$$C_p = C_0 e^{-2s\omega^2 t} \quad (1.6)$$

移動境界面の解析については Lamm 方程式を導入するときにより詳しく記述する。移動境界面の位置 r_b は濃度がプラトー領域の濃度の半分になる位置と定義されており、沈降係数 s は r_b の変化から計算される。

こうして決定された沈降係数の値は、バッファの濃度や温度に依存する。バッファ濃度は溶媒の密度や粘度を変化させ、温度は主として水の粘度に影響する。沈降係数を溶質固有のパラメータとするために、沈降係数は実験条件について補正しなければならない。

上述の議論から明らかなように、実験ではこの粒子を見ているのではなくて、移動境界面の位置の変化を測定している。即ち、溶質分子の性質に関する情報はすべ

て、移動境界面の形と変化含まれている。実際、移動境界面は溶質の均一性／不均一性、拡散係数、溶質の相互作用、非理想性などの情報を含んでいる。

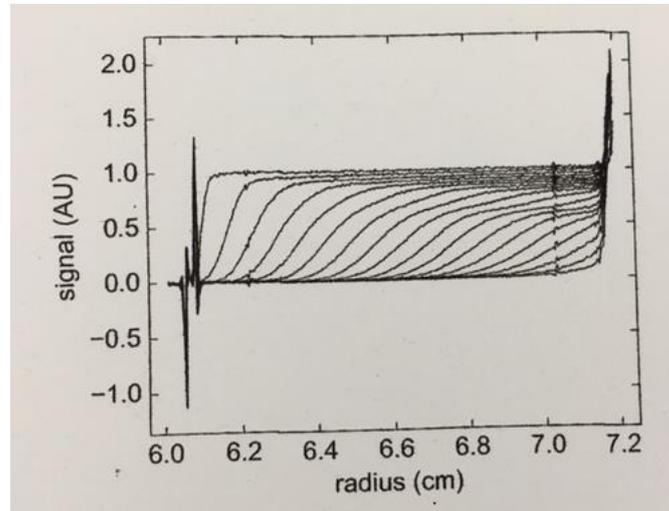


図2. 典型的な沈降パターンと半径方向希釈

拡散

沈降係数と摩擦係数は (1.2a) 式で結びついている。理想溶液の場合、拡散係数と摩擦係数はEinstein-Sutherland の式で関係している:

$$D = \frac{RT}{N_A f} \quad (1.7)$$

(1.2a) 式に (1.7) 式を代入すると、スベドベリーの式が得られる:

$$\frac{s}{D} = \frac{M(1 - \bar{v}\rho)}{RT} \quad (1.8)$$

(1.8) 式から、 s と D の値が得られれば、 \bar{v} と ρ の値を既知として分子量 M が求められる。こうして求められた分子量は式から明らかなように分子の形に依存しない。

非理想性を考慮すると、 D は次式のように書ける:

$$D = \frac{RT}{N_A f} \left\{ 1 + C \frac{\partial \ln \gamma}{\partial C} \right\} \quad (1.9)$$

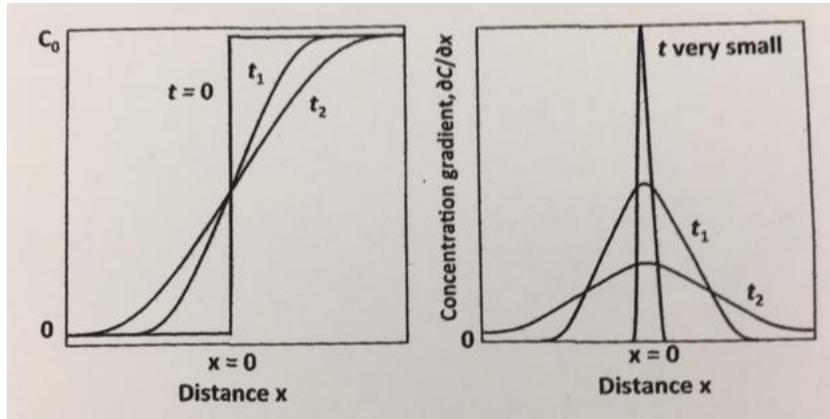


図3. 拡散 濃度の変化(左)、濃度勾配の変化(右)

対応するスベドベリーの式は

$$\frac{s}{D} = \frac{M(1-\bar{v}\rho)}{RT \left\{ 1 + C \frac{\partial \ln \gamma}{\partial C} \right\}} \quad (1.10)$$

となる。ここで、 γ は溶質の活動度係数である。

今、一様な断面積を持つ無限長のセルを想定し、 $t=0$ で $x=0$ に鋭い濃度勾配、即ち境界面を考える(図1.3)と、濃度勾配の時間変化はFickの第2法則(拡散方程式)で予測することができる:

$$\left(\frac{\partial C(x,t)}{\partial t} \right)_x = D \left(\frac{\partial^2 C(x,t)}{\partial x^2} \right)_t \quad (1.11)$$

ここで、 D は並進の拡散係数である。(1.11)式は初期条件と境界条件を与えれば解くことができる。自由拡散の条件下では(1.11)式の解は

$$C(x,t) = \frac{C_0}{2} \left\{ 1 - \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^{x/2\sqrt{Dt}} e^{-y^2} dy \right\} \quad (1.12)$$

となり、 $C(x,t)$ の x についての微分は単純なガウスの「誤差」関数となる:

$$\left(\frac{\partial C(x,t)}{\partial x} \right)_x = \frac{C_0}{2\sqrt{\pi Dt}} e^{-x^2/4Dt} \quad (1.13)$$

ここで、 c_0 は $t=0$ における溶質の濃度である。実験的には濃度勾配は実験で得られた濃度勾配から計算するか、伝統的なシュリーレン光学系でも測定できる。ベル型の曲線の高さは次式で与えられる:

$$\left(\frac{\partial C(x,t)}{\partial x} \right)_{x=0} = \frac{C_0}{2\sqrt{\pi Dt}} = H \quad (1.14)$$

および

$$\left(\frac{C_0}{H} \right)^2 = 4\pi Dt \quad (1.15)$$

Dは $(C_0/H)^2$ を時間に対してプロットすることによって得られる。シンセティックバウンダリーセルという特殊なセルがあり、これを用いて上記の方法で測定することもできる。現在ではラム方程式を実験データに当てはめる方法 (SEDFITなど) で決定することが行われている。

2. 沈降速度法

ラム方程式 (Lamm equation)

溶質分子がメニスカスを離れて沈降を開始するやいなや濃度勾配が生じる。移動境界面では沈降と拡散が同時に起こる。くさび形セルにおける沈降速度法の連続の方程式を最初に導いたのはスベドベリーの博士課程の学生だったOle Lamm だった (Ole Lamm, 1929):

$$\left(\frac{\partial C}{\partial t}\right)_r = -\frac{1}{r} \left\{ \frac{\partial}{\partial r} \left[s\omega^2 r^2 C - Dr \left(\frac{\partial C}{\partial r} \right)_t \right] \right\} \quad (1.16)$$

この式はOle Lammの名前を取ってラム方程式と呼ばれ、沈降と拡散が同時に起こる濃度勾配の経時変化を正確に記述する。くさび形セルであるために式の右辺は若干複雑になっているが、基本的には2つの項からなり、第1項の [] はsを含み、第2項の [] はDを含み、第1項が沈降、第2項が拡散を表す。

(1.16) 式はsとDが一定 (非理想性はないとする) で、測定されたsとD (温度T、バッファー中) は補正して水中、20°Cの値、 $s_{20,w}$ 、 $D_{20,w}$ の値を得る。

(1.2a) および (1.7) は摩擦係数を含んでおり、摩擦係数はストークスの法則によって溶媒の粘度と関係している:

$$f = 6\pi\eta R_s \quad (1.10)$$

ここで、 R_s はストークス半径で、種々の形の粒子に対して計算式が提出されている。いずれにしても、 R_s は溶媒の粘度に直接比例しており、測定された $s_{T,b}$ と $D_{T,b}$ は溶媒の粘度と密度に関して補正される:

$$s_{20,w} = \frac{(1-\bar{v}\rho)_{20,w}}{(1-\bar{v}\rho)_{T,b}} \frac{\eta_{T,b}}{\eta_{20,w}} s_{T,b} \quad (1.11)$$

$$D_{20,w} = \frac{293.1}{T} \frac{\eta_{T,b}}{\eta_{20,w}} D_{T,b} \quad (1.12)$$

沈降係数sと分子量Mの関係

分子量Mはスベドベリーの式 (1.8) で与えられ、sとDの値が必要になる。s値は1-2%の精度で求まるが、Dの値はAUCから正確に求めるのが難しく、DLSから求めることも行われる。しかし、最近のc(s)を求めるソフトウェア (SEDANAL, SEDFIT, ULTRASCAN) では、スケーリング則と呼ばれる下記のDと f/f_0 の関係を表す式が用いられている:

$$D(s) = \frac{\sqrt{2}}{18\pi} kTs^{-1/2} (\eta(f/f_0)_w)^{-3/2} ((1-\bar{v}\rho)/\bar{v})^{1/2} \quad (1.13)$$

その際、 f/f_0 はすべての分子種について共通であると仮定されるが、仮定しない方法も用いることができる（SEDFITにおける $c(s, f/f_0)$ やULTRASCANにおける 2 DSA）。

分子の形と f/f_0

摩擦比 f/f_0 に基づいて分子の形を考察することができる。SV解析で求められる摩擦比はペランの式に基づいて回転楕円体（長球prolateと扁球oblate）や棒状を仮定して軸比を求めることができる（図4）。図から明らかなように、 f/f_0 の値が少し変化しても軸比は大きく変わらず、逆に、軸比が大きく異なっても f/f_0 は大きく変化することはない。これがSEDFITなどで f/f_0 が分子種に依らず共通としている根拠である。なお、理論的には摩擦比は完全な球では1になるはずであるが、実際の球状蛋白質では約1.2となる。これは分母が同じ偏比容を持つ材料からできた仮想の球であるのに対して、分子は溶媒和をもつ実在の蛋白質の値を用いているためである。

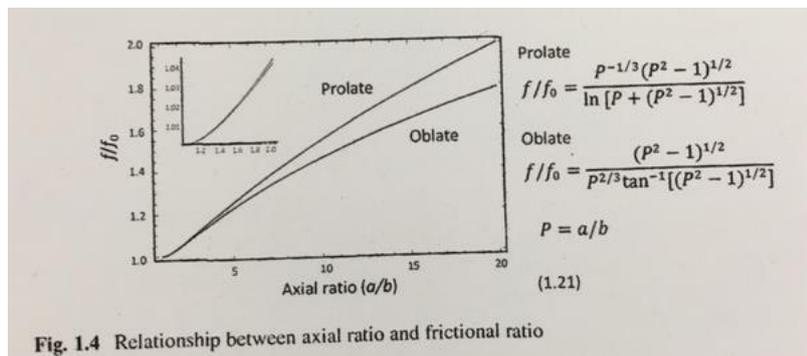


図4. 軸比と摩擦比

X線結晶構造に基づく沈降係数の推定

結晶構造が既知であれば、沈降係数や拡散係数を見積もることができる。沈降係数から構造を推定することは容易ではないが、いくつかの可能な構造がある場合、どれが妥当なモデルであるかは、この方法によって判断できる [Rocco & Olwyn 2015]。

3. 沈降平衡法

溶液をSV実験よりも比較的低速で回転させると、沈降と拡散が共に有意に反映する。この場合には、SV実験で見られたような移動境界面は見られず、メニスカス付近の濃度が減少し、底付近の濃度が上昇して最終的に平衡に達する。平衡に達した濃度勾配から分子量が求められる：

$$\frac{d \ln C}{d(r^2)} = \frac{M(1 - \bar{v}\rho)\omega^2}{2RT} \quad (1.14)$$

(1.14)式はセル内の重力場を含む化学ポテンシャルが一定である、という条件から求めることができるが、(1.9)式のラム方程式において $(\partial C / \partial t) = 0$ と置くことによっても求められる。(1.14)式を積分して、

$$C(r) = C(r_a) \exp\left(M_{w,app}(1 - \bar{v}\rho)(r^2 - r_a^2)\right) + baseline \quad (1.15)$$

$$c(r) = \sum_{i=1}^n c_i(r_a) \exp(M_i(1 - \bar{v}_i\rho)(r^2 - r_a^2)/2RT) \quad (1.16)$$

が求められる。これを超遠心分析機からの出力で表すと、

$$S(r) = S_{baseline}(r) + \sum_{i=1}^n \epsilon_i c_i(r_a) \exp(M_i(1 - \bar{v}_i\rho)(r^2 - r_a^2)/2RT) \quad (1.17)$$

以前は、 r^2 に対して $\log C$ をプロットすることによって分子量 M を求めたが、現在では、たいていのソフトウェアでは(1.17)式を用いて非線形の最小二乗法を用いて分子量を求めるようになっている。その場合、線形の最小自乗法と異なり、得られる分子量は溶質がヘテロナ場合には重量平均よりも z 平均に近くなる。

沈降速度法でスベドベリーの式(1.8)を用いて分子量を求める時と同様、 \bar{v} と ρ の値が必要である。偏比容 \bar{v} は精密密度計(Anton Paar DMA5000)を用いて測定できるが、溶質が10 mg程度必要で、ふつうは測定が困難なので、SEDNTERPを用いて計算する。SEDNTERPではCohn and Edsall(1963)に与えられている残基の偏比容の値を用いて蛋白質の偏比容を計算する。

昔は沈降平衡法は時間がかかりすぎると言うことで用いられることが少なかったが、Van Holde & Baldwin(1958)によって平衡に達するまでの時間は(1.18)式で与えられるように、溶液カラムの長さに比例することが分かり、溶液の容量を少なくして測定すると時間が大幅に節約できることが認識されてから沈降平衡法もよく使われるようになった。

$$t \approx 0.7 \frac{(r_b - r_a)^2}{D} \quad (1.18)$$

ここで、 r_b と r_a はそれぞれメニスカスと底の、回転中心からの距離であり、 D は溶質の拡散係数である。低温ではより長い時間を要する。一般的には平衡に達したかどうかは2-3時間おきに測定した濃度勾配の最後の3-4つが重なるか否かによって判断されるが、平衡判定のためのプログラムMatch(Jim Cole)では、最小2乗法によって判定するようになっている。また、ULTRASCANやSEDFITには平衡に達する時間を推定するプログラムが備わっている。

重量平均分子量 $M_{w,app}$ が非理想性のために濃度依存性を持つのはよく見られることで、濃度依存性から第2ビリアル係数 B_2 を求めることができる：

$$\frac{1}{M_{w,app}} = \frac{1}{M_w} (1 + B_2 C + D_2 C^2 + \dots) \quad (1.19)$$

濃度が10 mg/mL以下では、 $M_{w,app}$ は通常濃度に線形に依存するので、プロットして無限希釈により重量平均分子量 M_w と第2ビリアル定数を求めることができる。

(以上)

文 献

*Uchiyama & Arisaka (2016) Important and Essential Theoretical Aspects of AUC in Analytical Ultracentrifugation, Instrumentation, Software, and Applications, Uchiyama, Arisaka, Stafford, Laue, Eds.

Hiroshi Fujita, (1962) Mathematical Theory of Sedimentation Analysis. Physical Chemistry: A Series of Monographs., Academic Press.

Charles R. Cantor, Paul R. Schimmel (1980) Biophysical Chemistry, Part 2: Techniques for the Study of Biological Structure and Function. W. H. Freeman and Company.

Kensal E van Holde, Curtis Johnson, Pui Shing Ho (2005) "Methods for the Separation and Characterization of Macromolecules" pp213-248, in Principles of Physical Biochemistry. 2005, Prentice Hall.

Rocco Mattia, Byron Olwyn. (2015) Computing translational diffusion and sedimentation coefficients: an evaluation of experimental data and programs. Eur. Biophys. J. 44, 417-431.