分光超遠心分析とバンド沈降分析の利用

杉 本 悦 郎

Etsuro SUGIMOTO

京 都 大 学 農 学 部

近年、生体高分子の高次構造と機能との関係がいろいろの面から追究されつつある。たとえば、比較的高分子の酵素においてはサブユニットからなるものが多く、その解離会合、すなわち四次構造の状態が機能と密接に関係する。また、基質(またはアナログ)、補酵素、effectorなどとの結合により conformation が変化する(conformational adaptation) という現象が認められる例もある。これらの事実は、酵素の構造と機能との関係を究明するうえにおいて重要な知見を与えるものである。しかしながら、実際には蛋白質の四次構造を含む高次構造は、種々の物理化学的条件によって可逆的に変動するものであって、たとえばグルタミン酸脱水素酵素の分子量は、わずかの酵素濃度変化で著しく異なることが知られており、しかも補酵素(NADH)や、effector(ADP, GTPなど)の存在で分子サイズが変動し、かつ濃度依存性も変動する⁽¹⁾。可逆的な解離会合が同様な原因^(2,3)、あるいはpH⁽⁴⁾、温度⁽⁵⁻⁷⁾、尿素⁽⁸⁾、陽イオン⁽⁹⁾、陰イオン⁽⁹⁻¹¹⁾などの影響によっておこる酵素の例もいくつか知られている。また、このような現象は酵素以外の蛋白でも認められ、顕著な例として、ミルクの β -カゼインは、蛋白濃度、温度、pH、イオン強度などのいずれが変動しても容易に解離会合を含む高次構造の変化をおこす⁽¹²⁾。したがって、各種の研究手段で得た結果を互いに結びつけて蛋白質の構造と機能を論ずる場合、おのおの実験条件が一致しているかどうかを常に念頭におく必要がある。

核酸の高次構造と機能との関係においても、とくにDNAの構造や複製機構に関する研究などを中心に、多くの重要な問題があることはいうまでもない。

さて、現在、生体高分子の分子サイズや形状に関する知見を得るための代表的な方法の1つに超遠心分析があ

る。しかし、たとえば酵素蛋白を超遠心分析してその機能と関連した正確な知見を得ようとするならば、酵素活性の測定条件(通常きわめて低い酵素濃度)と同じレベルでの高精度の分析が必要であろう。従来、もっとも普通に行なわれているシュリーレン光学系を用いた分析では、高濃度かつ大量の試料を必要とするし、また濃厚な塩類中での分析では、塩類の濃度勾配が光学的な妨害をすることなどに難点がある。

沈降分析の原理は、大別して現在でも沈降速度法(移動境界面沈降法とバンド沈降法)と沈降平衡法(通常の沈降平衡法と密度勾配沈降平衡法〔バンド形成〕)のみであるが、近年、分析用超遠心機は、各種の光学系、モノクロメーター、photoelectric scanner(光電走査装置)をはじめとする付属装置の発達が著しく、利用範囲が非常にひろげられてきた。そこで、近年発達の著しい分光吸収光学系を用いた分析法について簡単に説明し、上述のような観点から、その利点といくつかの応用面にふれることにする。ここでは、超遠心機の性能についてはベックマンE型を対象としている。

なお、超遠心分析の理論や全般的な取り扱い方については、すでにいくつかのすぐれた成書や総説があり⁽¹³⁻¹⁸⁾、またベックマンE型のInstruction Manualにくわしい説明があるのでこれらを参照されたい。

I. 分光超遠心分析とバンド沈降分析の概要

1) 分析用超遠心機の光学系

沈降時における溶質の状態を観測するための光学系としては、3つのものがある。

第1は、濃度変化による屈折率勾配を光学的に観察、撮影することにより、沈降界面を図1-aのようなピークとして知りうるシュリーレン光学系である。図1-a

はダブルセクターセル (図 2-b) を用いたもので、シングルセクターセル (図 2-a) を用いれば溶媒による基線は見られない。

第2は、ダブルセクターセル (図 2-b) の各扇形槽に入れた溶媒と溶液との屈折率の差を高精度に観察、撮影しうる Rayleigh の干渉光学系 (図 1-b) であって、通常の沈降平衡法、とくにショートカラムセル (図 2-c) を用いた Yphantis の方法⁽¹⁰⁾ による分子量の測定などに有効である。

第3は、ここで問題とする光吸収光学系であって、蛋白質や核酸のように光を吸収する性質のある物質が沈降する場合、その沈降状態が吸光度の差によって図 1-c のごとく濃淡としてフィルムに記録される。

2) 分光吸収法と光電走査 (photoelectric scanner)

記録

光吸収光学系による分析において、従来用いられている $\text{Br}_2\text{-Cl}_2$ ガスフィルターを通した中圧水銀ランプを光源として適当なフィルムで撮影した場合、265 $\text{m}\mu$ 、254 $\text{m}\mu$ 、248 $\text{m}\mu$ の光が記録されるが、単色光でないため解像性に難点がある。また、この波長付近に吸収極大をもち、しかも吸光係数の大きな核酸類の分析には適するが、蛋白質、酵素の分析にはやや不都合である。

光源に輝度の明るいキセノンランプを用い、しかもモノクロメーターを設置すれば、活用面は非常に拡大される⁽²⁰⁻²⁶⁾。すなわち、任意の波長の単色光を選ぶことができるので、対象となる物質の特異的なまたは高感度な波長を選んで、敏感かつ特殊な分析が可能となる。

移動境界面沈降速度分析を光吸収光学系により測定して得た撮影図は図 1-c のようであって、その解析には、精密なデンストメーター (マイクロ濃度計) で各位置の濃度をトレースし、図 3 (次頁参照) のように沈降界面の状態を吸光度記録したものをを用いる。

しかし、近年開発された光電走査装置すなわち photoelectric scanner (以下、たんに scanner とよぶ) は、撮影せずに遠心中に直接沈降状態を記録できるものであって、迅速、高精度、広範囲の測定を可能とする。記録されるカーブは、図 4-a (次頁参照) に示すような距離に対する吸光度のほか、図 4-b のように濃度勾配をも記録でき、後者は吸光度記録では検出しにくいような少量成分の検出を容易にする。

図 3 または図 4-a においては、沈降界面の中点の位置 (x) の時間的変化を測定することにより、また図 4-b においては、ピークの位置 (x) の時間的変化の測定に

図 1 分析用超遠心機の3つの光学系により得られる移動境界面沈降の撮影図

- a : シュリーレン光学系
- b : Rayleigh 干渉光学系
- c : 光吸収光学系

図 2 各種セル用センターピース

- a : 標準シングルセクター
- b : 標準ダブルセクター
- c : ショートカラム沈降平衡用、6チャンネル
- d : キャピラリー型合成界面用、シングルセクター
- e : バンドフォーミング用、シングルセクター (カメラ測定用。e₁; I型, e₂; II型, e₃; III型)
- f : バンドフォーミング用、ダブルセクター (scanner測定用。f₁; I型, f₂; III型)

より沈降定数 s が求められる。

$$s = \frac{2.303}{60\omega^2} \cdot \frac{d \log x}{dt} \quad (1)$$

ω : 角速度 (radian/秒)
 t : 分単位で表わした時間

ここで得られる s は、いうまでもなく使用した試料の濃度、測定温度、使用溶媒中における s であって、常法^(15,17) によって $s_{20,w}$ に換算するとともに、濃度依存性を補正する必要がある。ただし、光吸収法は一般に低濃度の試料で分析できるので、濃度依存性は無視できる場合もある。

Scanner の使用においては、ダブルセクターセル (図 2-b) を用いることにより split beam 方式の採用が可能であって、一方の扇形槽に試料溶液、他方に溶媒を入れて沈降を行なえば、溶媒の吸光度を自動的にさし引いた試料の吸光度を直接記録することができる。

分光吸収光学系は、シュリーレン光学系や干渉光学系

図 3 光吸収光学系による移動境界面沈降撮影図 (図 1-c) のデンストメーターによるトレース

図 4 Photoelectric scanner による移動境界面沈降の記録

a : 吸光度記録
b : 濃度勾配記録

でも分析しうる通常の沈降平衡法や上記の移動境界面沈降速度法に対し、高感度に適用できるのみならず、他の光学系では測定困難なバンド沈降速度法や密度勾配沈降平衡法、ならびに II 章に応用例として示すような特殊な分析をも可能にするものである。

3) バンド沈降速度法

通常用いられる移動境界面沈降分析は、前節でのべたように、濃度が一樣な溶液を遠心して沈降する状態を測定する (図 1) のに比べ、バンド沈降は、Schachman や Vinograd らによって開発されたものであって^(23,27-29)、特殊なキャピラリー型 シングルセクター 合成界面セル (図 2-d) やバンドフォーミングセル (図 2-e) を用いて、扇形液槽に沈降用溶媒 (～0.7 ml) を入れ、扇形液槽からはなれた小さな試料槽に少量 (30 μ l 以下) の試料を入れて遠心すれば、遠心力によって試料が溶媒槽へ入り込み、上面に layer をつくる。機械的対流や拡散を防止するために、溶媒の密度は試料の密度より大にしておく (密度増加のためには普通 KCl, NaCl, CsCl などの塩類を用いる)。このようにして layering されたバンドの濃度最大の位置の沈降による時間的变化ならびに最大濃度値の時間的变化は、光吸収光学系を通して撮影され (図 5-a)、それをデンストメーターでトレースすることによって求められる (図 5-b)。

もちろん、scanner により直接記録すればより有効である。scanner で記録するときには、図 2-f に示すようなダブルセクターのバンドフォーミングセルを用いれば、溶媒の吸収を消去した試料のみの吸収を記録できる。この場合には、両扇形槽に同じ沈降用溶媒を入れ、一方の試料槽に試料溶液を、他方に試料の溶媒を入れて遠心する。

本法においては、一般にきわめて少量の高分子試料が用いられているので、検出は光吸収法によってのみ可能となる。また、バンドを安定化させるために加える溶媒中の塩類によって遠心中に密度勾配を生ずるが、それは充分小さい⁽¹⁶⁾ ので、高分子物質は均質溶媒中を沈降するとみなしてよい。

沈降定数 s は、バンドの濃度最大の位置 x の時間的变化の測定から (1) 式によって求めることができる。

また、吸光度で示される最大濃度

図 5 光吸収光学系によるバンド沈降図
a : 撮影図 (模式図)
b : デンシトメーターによるトレース

値 C_m の時間的減少と拡散定数 D との関係は, Rubin と Katchalsky によってみちびかれている⁽³⁰⁾.

$$C_m = C_0 e^{-2s\omega^2 t} \cdot \text{erf} \left\{ \frac{2r_a \ln \frac{r_a + \delta}{r_a}}{8\sqrt{Dt}} \right\} \quad (2)$$

$$\text{erf}(w) = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \cdot \int_0^w e^{-x^2} dx$$

C_0 : 初濃度 δ : バンドの初めの幅

r_a : メニスカスの位置

沈降定数を求めておけば (2) 式から D を計算することができ、(3) 式から分子量 M の決定も可能となる。

$$M = \frac{sRT}{D(1 - V\rho)} \quad (3)$$

R : 気体定数 T : 絶対温度
 V : 偏比容 ρ : 溶媒の密度

バンド沈降速度法は、移動境界面沈降速度法に比べていくつかの利点をもつが、主要な点は次のようなものである。

1) 試料の容量は溶媒に比べてきわめて少量であるから、試料中の溶媒の影響は無視できる。したがって、試料溶液のほうが沈降溶媒より密度が小であるという条件さえ満たされれば、とくに透析などで溶媒を交換することなしに任意の沈降溶媒が選べる。すなわち、同一試料溶液を用いて pH, イオン強度, 作用物質などの条件を

変化させての分析が容易にできる。

2) ごく少量の試料しか必要としない。

3) 沈降定数の異なる成分は分離して沈降するので、Johnston-Ogston 効果などの影響がなく、またそのほか互いの成分による影響もない。

4) 密度勾配沈降平衡法*

Cs 塩や蔗糖のような低分子化合物の濃厚溶液を長時間遠心すれば、セル中に一定の濃度 (密度) 勾配ができて平衡に達する。この溶液中に少量の高分子 (蛋白質, 核酸など) が存在し、かつ溶液の密度が適当な範囲にあれば、高分子はその buoyant density (溶媒和した高分子の偏比容の逆数) と溶液の密度 ρ と一致する位置に、安定でシャープなバンドを形成する。そのバンドの位置と形は、前述のバンド沈降速度分析におけると同様にして、光吸収光学系を用いて測定できる。

試料高分子の buoyant density はバンドの中心位置の密度で表われ、次のようにして求めることができる^(31~33)。低分子溶液の密度勾配、すなわちセル中の位置 r と密度 ρ との関係は (4) 式で表わされる。

$$\frac{d\rho}{dr} = \left(\frac{d\rho}{d \ln a'} \right) \frac{M'(1 - V'\rho)}{RT} \omega^2 r \equiv \frac{\omega^2 r}{\beta} \quad (4)$$

a' , M' , V' は低分子物質の活量, 分子量, 偏比容

よく用いられる低分子物質の ρ と β の関係を示せば、表 1 のごとくである。

表 1 溶液密度 (ρ) と密度勾配係数 (β) との関係⁽³²⁾

ρ	$\beta \times 10^{-9}$ 蔗糖	ρ	$\beta \times 10^{-9}$	
			CsCl	Cs ₂ SO ₄
1.02	8.091	1.20	1.984	
1.04	5.605	1.30	1.546	0.733
1.06	4.019	1.40	1.346	0.607
1.08	3.449	1.50	1.245	0.572
1.10	3.237	1.60	1.197	0.609
1.12	3.121	1.70	1.190	
1.14	3.091	1.80	1.215	

いま、2 点 r_1 , r_2 における密度をそれぞれ ρ_1 , ρ_2 とすれば、(4) 式から (5) 式が得られる。

$$\rho_2 - \rho_1 = \frac{\omega^2}{\beta} \cdot \frac{(r_2^2 - r_1^2)}{2} \quad (5)$$

$\bar{\beta}$: β の平均値

そこで、すでに buoyant density の判明している既

* 周知のように、分離用超遠心機によっても密度勾配遠心法が常用されている。この方法は、成分の単離という面できわめて重要な地位をしめている。

知物質 (marker) をいっしょに遠心して平衡に達すると, marker のバンドと試料のバンドの位置の関係から, (5) 式を用いて試料の buoyant density を求めることができる。

また, marker を用いる代わりに, 平衡状態において低分子溶液の最初の密度と等しくなるような位置 “iso-concentration distance” (r_e) を標準に用いて (5) 式から求めることもできる。isoconcentration distance は (6) 式から算出することができる。

$$r_e = \sqrt{\frac{(r_a^2 + r_b^2)}{2}} \quad (6)$$

r_a : メニスカスの位置
 r_b : ボトムの位置

さらに, 分子量および buoyant density が均一な高分子によって得られたバンドにおいては, 次の関係が成立する。

$$\sigma^2 = \frac{RT\rho_0}{M\left(\frac{d\rho}{dr}\right)_{eff}\omega^2 r_0} \quad (7)$$

σ : 濃度分布曲線 (ガウス分布) における標準偏差
 r_0 : バンドの中心の位置
 ρ_0 : バンドの中心における密度
 M : 高分子物質の分子量
 $\left(\frac{d\rho}{dr}\right)_{eff}$: 高分子の寄与を考えに入れた溶液の実効密度勾配

すなわち, バンドの幅は分子量が大きいくほどせまくなることがわかる。(7) 式の関係から分子量を求めることも可能である^(15,18)。

なお, 低分子塩の濃度分布に対する高分子や圧力の影響に対する補正, バンドの均一性, 近接バンドの解像力などの問題も実施上重要であるが, これらの問題については文献を参照されたい^(16,31-33)。

II. 分光超遠心分析およびバンド沈降分析の

利点と応用

1) 高感度で選択的な分析

分光吸収光学系を用いれば任意の波長の光を選んで測定することができるから, 対象となる物質の吸収極大の波長または特異的な波長を選んで, 高感度かつ選択的な分析が可能である。

一般に, 核酸類は 260 m μ 付近での吸光係数が大である (50 μ g/ml 程度の濃度で 1 cm 光路長での吸光度はだいたい 1.0 を示す) から, きわめて低濃度での分析ができる。単純蛋白質においては, 吸収の極大は 280 m μ 付近にあるが, 280 m μ での吸光係数は核酸の 260 m μ における吸光係数に比べてかなり小さい (アミノ酸

組成によって異なるが, 1 mg/ml の濃度で 1 cm 光路長での吸光度は約 1.0 を示すものが多い)。しかし, 240 m μ 以下では吸光係数は急増するので, 本機の使用限界 (現在のところ 235 m μ 付近) の短波長領域を用いれば, 感度は数倍に上昇する。また, 長光路セルを使用すればさらに有効である。

特徴ある吸収バンドをもつ高分子, たとえばヘムを補欠分子族にもつ酵素のような場合には, ヘムに由来するいわゆる Soret 吸収帯 (400 m μ 付近) は, 蛋白による紫外吸収より数倍大きい。いま, 単純蛋白質に少量のヘム蛋白質が混在しているような混合溶液について沈降分析した場合, 蛋白質の吸収極大である 280 m μ 付近で測定すれば, 大部分をしめる単純蛋白質の沈降状態が主に観察され, 少量成分のヘム蛋白の沈降パターンは検出困難である。しかし, 400 m μ 付近の光で測定すれば逆にヘム蛋白の沈降状態のみが観察され, 単純蛋白は量的に多いにもかかわらずこの波長に吸収をもたないから, その沈降パターンは認められない。測定 (写真撮影または scanner 記録) の時間をずらせば, 同一試料についての一回の遠心でいくつかの異なった波長における沈降パターンを得ることができる。したがって, 吸収スペクトルの異なる複数成分を含む試料を分析する場合には, 各成分の特異的な波長で測定することにより, おのおのの沈降パラメーターの測定が容易になる。また, 吸収スペクトルの異なる少量成分の混在の確認を容易にする。

このように, 分光吸収法では測定波長で吸収をもつもののみが選択的に測定できるわけであって, このことは密度勾配沈降平衡法のごとく, 高濃度の塩類 (吸収をもたない) によって濃度勾配が生ずる場で, 少量の高分子試料 (吸収をもつ) を分析する場合においても重要な意味をもつ利点である。

2) 沈降領域での吸収スペクトルの測定

Scanner を用いれば, 沈降途中において種々の沈降領域での吸収スペクトルを測定することができる。

いま, 400 m μ , 335 m μ , 280 m μ の波長にそれぞれ表 2 に示したような吸収をもつ 2 つの蛋白質, すなわち鉄を含む蛋白とヘム蛋白 (RHP) との混合物を 59,780 rpm で 90 分遠心後, 異なった沈降領域で各波長の吸光度を測定したとする。その結果, 表 2 に示すように, 吸収スペクトルは沈降界面近くでは沈降定数の小さい鉄蛋白に近いものが得られ, セル底のほうへ近づくにつれて各波長の吸光度比は変わって, だんだん混合液の最初のスペクトルに近づくことが認められる。

表 2 蛋白混液の沈降領域における吸収スペクトル分析⁽²³⁾

試料	沈降領域 (位置)	相 対 吸 光 度			沈降定数 (s)
		400 m μ	335 m μ	280 m μ	
鉄蛋白	—	1.00	0.93	2.6	1.5
RHP*	—	1.00	0.26	0.26	3
混合液	—	1.00	0.51	0.81	
混合液	沈 降 界 面**	1.00	0.80	2.2	
混合液	セル底へ向かって 1/3 の位置	1.00	0.81	1.7	
混合液	セル底へ向かって 3/4 の位置	1.00	0.53	0.97	

59,780 rpm で 90 分後に測定した。

* *Rhodospirillum* ヘム蛋白。 ** 吸光度は低い値である。

もし、試料高分子が均一なものであれば、すべての沈降領域において吸収スペクトルがまったく同一になる(各波長での吸光度の比が一定となる)はずであり、このような検定から、かなり厳密な意味での純度の確認ができる。

3) 蛋白質と ligand との結合(解離定数と結合数の決定)

蛋白質、酵素と低分子 ligand との相互作用の研究は、酵素と、基質(またはアナログ)、補酵素, effectors との関係をはじめとして、きわめて重要である。結合実験による解離定数, 結合数の決定は透析平衡法がもっとも一般的であるが、きわめて長時間を要するし、また比較的多量の試料を要するのが難点である。また、分光滴定によっても可能であるが、この場合は結合によって吸収、蛍光、旋光度などが変化する場合に限られる⁽³⁴⁾。

しかし、吸収をもつような ligand との結合を対象とする場合には、これが蛋白との結合により、なんら分光

学的性質が変化しなくても(変化してもかまわない)、分光超遠心分析により比較的容易にその測定ができる。たとえば、NADH, FAD, PALP や各種のヌクレオチドのような吸収をもつ補酵素や effector と酵素蛋白との相互作用の研究には、容易に用いることができる。

ここでは、aspartate transcarbamylase (ATCase) に対する effector である 5-bromocytidine triphosphate (BrCTP) の結合数と解離定数を決定した実験例を示す⁽³⁵⁾。

図 6 は、BrCTP $6.8 \times 10^{-5} \text{M}$ に対し ATCase (分子量 300,000) を種々の濃度に共存させた場合の移動境界面沈降分析を 298 m μ で行ない、scanner で記録したものである。右端の図は ATCase のみを沈降させた場合である(11.7 s)。遊離の BrCTP は各チャートの左側の界面で示されるおそい沈降(0.4 s)を示し、その界面の吸光度は濃度に対応するから、各実験条件における遊離の BrCTP 濃度を知ることができる。酵素を共存させた場合、酵素に結合した bound BrCTP は ATCase (11.7 s) とともに速く沈降する。したがって、おそく沈降する界面の吸光度、すなわち遊離の BrCTP の濃度は、酵素ゼロのとき(左端の図)の遊離 BrCTP 濃度よりも、酵素に結合した BrCTP のぶんだけ少なくな現れる。このようにして、各実験条件において遊離 BrCTP と bound BrCTP との量が求まる。たとえば、図 6 において ATCase $2.5 \times 10^{-6} \text{M}$ 存在時には 22% の BrCTP が、また ATCase $5.0 \times 10^{-6} \text{M}$ 存在時には 36% の BrCTP が酵素に結合しており、ATCase 濃度が $2.0 \times 10^{-5} \text{M}$ になればほとんどすべての BrCTP が結合していることがわかる。

酵素蛋白と ligand との結合に際しては、一般に(8)、(9)式で示されるような解離平衡の式が成立する。

図 6 ATCase と BrCTP との結合⁽³⁵⁾

50,740rpm で 60 分後 scanner で記録。沈降方向は左から右。
pH 7.0, 温度 $3 \sim 5^\circ \text{C}$, 光源波長 298 m μ 。

図7 ATCase 1分子当りの BrCTP に対する結合部位 (n) と解離定数 (K) の決定

A: 遊離の ligand (BrCTP) のモル濃度

b: 酵素 1 分子 (ATCase 300,000g) 当りに結合した ligand (BrCTP) の数

$$K = \frac{A(n-b)}{b} \quad (8)$$

$$\frac{b}{A} = \frac{n}{K} - \frac{b}{K} \quad (9)$$

A: 遊離の ligand (BrCTP) のモル濃度

b: 酵素 1 分子 (ATCase 300,000 g) 当りに結合した ligand (BrCTP) の数

K: 酵素-ligand (ATCase-BrCTP) 複合体の解離定数 (解離定数はすべての結合点で等しいと考えた場合)

n: 酵素 1 分子 (ATCase 300,000 g) 当りに結合する ligand (BrCTP) の総数, すなわち結合部位の数

そこで, 種々の実験条件で得た b に対し $\frac{b}{A}$ をプロットすれば, 図7のようになる. (9)式からわかるように, 勾配から K が, 切片から n がそれぞれ 3×10^{-5} M, 8個と求められた.

4) 差沈降分析による沈降定数の微小差 (変化) の直接測定

酵素蛋白に基質 (またはアナログ), 補酵素, effector などの ligand が結合したことにより, あるいはその他のなんらかの要因により沈降パターンが変化するかどうかは, conformation 変化がおこったかどうかを知るうえにおいて直接的な知見を与える. 四次構造の変化 (解離会合) がおこるような場合には, 通常の超遠心分析で容易にその変化を認めることができるが, ATCase の例に

みられるように^(36,37), 基質や effector の結合による conformation 変化に由来するきわめてわずか (数%以下) の沈降定数の変動を問題にする場合には, 別個に測定した沈降分析結果の比較によっては測定温度, 回転数, データの解析の精度などから考えてかなり困難である. 測定条件による誤差をなくして直接比較するには, ウェッジウィンドー (面がわずかに傾斜したセル窓であって光路を少し変えるので, 沈降図形の像が少しずれた位置にみえる) を用い複数のセルで複数の試料を同時に分析する必要がある. このような目的のために5つのセルを同時に遠心しうるローター (An-G 型) や, scanner と組合せることによって5つまでの試料を1回の遠心中に順次記録することができる multiplexer も開発市販されている*. このような方法を注意深く行なうことによって, Schachman らは数%以下の沈降定数の変化を証明することに成功している⁽³⁷⁾.

しかし, このような直接的比較によっても, なおわずかの差を確認することはかなり困難である. より直接的に微小差を確認するには, ダブルセクターセルの両扇形液槽に変化をおこさせる要因 (たとえば ligand を含むか含まないか) 以外はまったく同一条件 (液量, 蛋白濃度など) の試料を入れて遠心し, split beam 方式の scanner を用いて一方の吸収を自動的にさし引いた値を記録させると, 吸収スペクトルにおける差スペクトルの自記測定 (split beam 方式の分光光度計による) と似た原理によって両試料の沈降パターンの差が記録される. もし両者の沈降状態がまったく等しいなら, 得られる差沈降パターンは何も沈降物質がないかのように水平な直線をえがく. しかし, もし沈降定数にわずかでも差があれば, 差のぶんだけカーブした部分が現われる. そして, そのカーブした部分は沈降につれて底へ沈み, かつ両者の沈降定数の差に応じてカーブの幅はひろがる.

Schachman は, ここにのべた差沈降分析法を用いて *Rhodospirillum* ヘム蛋白を試料にし, 一方の扇形槽に D_2O を含ませる以外はまったく同一条件で沈降せしめたとき, ごくわずかの沈降定数の減少を明確に認めている⁽²³⁾.

また, この方法によれば, 沈降定数は変わらなくとも, 沈降界面がわずかに polydisperse したときや反対にシャープになった場合にも, その差 (変化) を容易に認めることができる.

* 沈降平衡法, とくに密度勾配沈降平衡法においては分析に長時間を要するので, この場合にもきわめて有効であり, よく用いられている.

図 8 白血病患者の白血球 DNA に関する密度勾配 (CsCl) 沈降平衡分析の scanner 記録⁽³⁸⁾

- a : 単離精製した“環状 dimer” DNA と marker DNA (中性)
 b : 変性分離した dimer DNA と marker DNA (アルカリ性)
 c : Monomer から得た第一鎖 (light strand) と dimer から得た第二鎖 (heavy strand) を等量に混和したものと marker DNA (中性)

5) 密度勾配沈降平衡法による DNA の異同の分析

分析用超遠心機による密度勾配沈降平衡法は、分離用超遠心機による密度勾配遠心法のように分離精製のための手段としては用いにくい、生体高分子の buoyant density の決定手段ならびにその差の鋭敏な検出手段として特徴がある。分析のためにかなりの時間がかかる* といふものの、きわめて微量の試料** でしかもきわめて正確に*** 測定できる点ですぐれており、近年 DNA の不均一性、二重鎖の分離と自己複製、hybrid の形成、環状およびねじれ構造などをはじめとする核酸、ウイルス類の研究に routine として用いられるようになった。

Buoyant density と DNA の構造や性質との関係に関しては、かなりの知見が集積されている⁽³³⁾。たとえば、1) n-DNA、すなわち未変性の DNA で二重らせん構造からなるものの密度は塩基組成によって決まる。2) d-DNA、すなわち変性して 2 本の鎖が分離したものの密度は n-DNA より大きい。3) 糖含量により密度は規則的に増加する。4) RNA と複合体をつくと密度は増加する。5) Ag^+ , Hg^{2+} などと密度の大きい複合体をつくるが、そのつくりやすさは塩基組成に支配されるし、また d-DNA は n-DNA よりつくりやすい、などである。さらにまた、重い同位元素のラベルにより、密度は大きい、他の性質はまったく等しいラベル DNA の生成といった技術との併用により、数々の成果が得られ

* 普通、CsCl 系では 44,770 rpm で 16~24 時間、 Cs_2SO_4 系では 22~30 時間ぐらいで平衡に達する。

** 核酸類を試料とする場合、一つの成分につき 1 μg 程度の試料で正確な分析ができる。

*** Buoyant density としては $\pm 0.001\text{g/l}$ の誤差で測定できる。

表 3 白血病患者の白血球 DNA の buoyant density

Buoyant density	Monomer	Dimer
未変性環状 DNA (中性)	1.700*	1.700
第一の鎖 (アルカリ性)	1.738*	1.738
第一の鎖 (中性)	—	1.707*
第二の鎖 (アルカリ性)	1.779*	1.779
Fused dimer DNA (中性)	—	1.700

* 図 8 の実験と同様な方法で求められた値。

ている。

次にあげる例は、白血病患者の白血球に存在する特異な“環状 dimer” DNA (このものは腫瘍には見いだされるが正常な組織には見いだされない)を対象としたものであって、この“環状 dimer” DNA と共存する“環状 monomer” DNA との関係、密度勾配沈降平衡法によって明らかにした実験例である⁽³⁸⁾。

単離した“環状 dimer”の中性における buoyant density は 1.700 (図 8-a, 表 3) であって、同様に求めて求めた monomer の buoyant density とまったく等しい (表 3)。そして、dimer をアルカリ中で変性して分離した 2 つの鎖の buoyant density は、それぞれ 1.738 と 1.779 であって (図 8-b, 表 3)、同様に monomer から得た 2 つの鎖と比較しても、おのおのの buoyant density はまったく等しい (表 3)。このことから、dimer は monomer とほとんど同じ構成成分 2 つからできていることが強く示唆される。また、monomer から単離した第一の (軽い) 鎖と dimer から単離した第二の (重い) 鎖とを中性で混和したとき、おのおのの鎖に相当するバンドはまったく認められず、すべてもとの未変

図 9 Dimer の構造

a : 未変性環状 dimer
b : Fused dimer

性なものの buoyant density にまったく等しい 1.700 という値をもつバンドのみが認められた (図 8-c, 表 3)。この事実は, dimer に相当する高分子量の hybrid が形成されたことを意味する。そして, 電子顕微鏡による観察の併用によって, この hybrid dimer は図 9-b に示されるような 2 本の monomer 鎖と 1 本の dimer 鎖とからなるヘテロ二重構造をもつことがわかり, Vinograd らは “fused dimer” とよんでいる。

6) 酵素活性を指標とする分光バンド沈降速度分析

普通バンド沈降速度法の利点についてはすでに前章でふれたとおりであって, そこでのべた方法に従ってすべての蛋白質, 酵素, 核酸の沈降速度分析に利用するので, とくに応用例を示す必要はないと思う。

はじめにのべたように, 酵素の構造と機能を考えるうに, 反応速度論的実験の条件と酵素分子の構造論的実験の条件との一致が必要であり, 理想的には反応中の酵素分子の状態を直接知ることが望ましい。このような観点から, 筆者らはバンド沈降速度法を応用して特殊な分析を行なった。すなわち, 酵素活性を指標として沈降定数を直接測定しえたので, その実験例について紹介する⁽³⁹⁾。

筆者らが *E. coli* から単離結晶化したリングリセリン酸脱水素酵素 (分子量 165,000) は, 代謝の終産物セリンにより強力なフィードバック阻害をうけるアロステリック酵素であって, 4つのサブユニットからなる^(34,39,40)。この酵素の一連の研究の途上, kinetics 解析の実験条件, すなわち活性発現の状態においても, 沈降定数や分子量を測定した比較的高濃度の条件における同様に tetramer であるのか, あるいは monomer か dimer であるのが問題となった。そこで, 下記の測定を行なった。

キャピラリー型シングルセクター合成界面セル (図 2-d) の扇形液槽に, 酵素を除く反応液, すなわち $1.8 \times 10^{-4}M$ ホスホヒドロキシピルビン酸 (基質), 1.3×10^{-4}

図 10 酵素反応による NADH の吸収消滅によって測定したリングリセリン酸脱水素酵素のバンド沈降図⁽³⁹⁾

59,780 rpm, 温度 25°C, 光源波長 340 mμ.

図は撮影後デンストメーターでトレースしたもの。

M NADH, 0.5 M K-リン酸緩衝液 pH 7.5 を含む液を入れ, セルの top compartment に 0.5 μg (さらに少量でも可能) のリングリセリン酸脱水素酵素を含む酵素液 25 μl を入れる。回転中に酵素液は反応液の上面に layer をつくり, バンド状で沈降する。モノクロメーターを NADH の吸収極大である 340 mμ にセットして測定すれば, 加えた酵素量は反応 (ホスホヒドロキシピルビン酸 + NADH → リングリセリン酸 + NAD) を速やかに進行せしめるに充分な量であるから, 酵素液のバンドの沈降は NADH の脱水素による 340 mμ の吸収の消滅によって観察され, 図 1-c, 図 3 と同様なパターンが得られる。一定時間ごとの測定結果 (図 10) から沈降定数を求めることができる。

この方法で求めた沈降定数は 7.8 s であって, 高濃度で測定した $s_{20,w}$ の濃度補正から求めた $s_{20,w}^0$ 値 7.9 と同じであることが判明し, kinetics 解析の条件でも, tetramer の形であることが確認された。

この方法の利点は, 1) 触媒活性を介して測定するため, 活性発現の状態そのものの沈降定数が簡単に求まる, 2) 同様の理由から, 不活性な不純高分子物質がいくら混在していても, 容易に対象とする酵素の沈降定数が求まる, 3) V_{max} や K_m を変化させるような effector の存在下での沈降定数の変化を, kinetics 解析と同様の実験条件下で測定できる, 4) 反応を進行させるのに充分な量さえあればよいから, 通常きわめて少量の試料で正確な分析ができる, などである。ただし, 特殊な場合

として、同一活性を示し、沈降定数の異なるような複数成分が存在するような系では、常にもっとも速く沈降するものの s のみが求まるという点に留意すべきである。

本法はすべての脱水素酵素に適用しうるのはもとより、その他にも基質または生成物の吸光度変化で直接追跡できるような反応を触媒する酵素に対してはすべて適用できる。また、それ以外の酵素でも、上記の範疇に属する酵素と共役できるものであれば、同様の原理によって本法を適用することが可能であろう。ただし、この場合には共役する酵素の s が対象とする酵素の s より小さくなければならないという制約がある。

以上、分光超遠心分析とバンド沈降分析の利点および特徴的な利用面について、いくつかの例にふれながらのべてきた。

現在、分析用超遠心機の精度の向上、新しいローターやセルの開発、さらにモノクロメーター、scanner、multiplexer、オシロスコープなど、付属装置の発達 はめざましく、より数多くの低濃度試料を、同時に、選択的に、あるいは特殊な目的のために測定することが可能になっている。これら性能面での進歩と理論面での進展とが相まって、酵素や核酸をはじめとする生体高分子の研究に、重要なパラメーターとそれから得られる知見が—そう増加することが期待される。

文 献

- 1) C. Frieden : Brookhaven Symposium in Biology, Subunit Structure of Protein, Biochemical and Genetic Aspect, 1964, p. 98.
- 2) 八木国夫, 小沢高将, 大石誠子 : 生化学, 40, 682 (1968).
- 3) 安部照子, 三宅可浩, 山野俊雄 : 生化学, 42, 571 (1970).
- 4) R. Sasaki, E. Sugimoto and H. Chiba : *Agr. Biol. Chem.*, 34, 135 (1970).
- 5) S. Numa, W. M. Bortz and F. Lynen : *Adv. Enzyme Regulation*, 3, 407 (1965).
- 6) M. C. Scrutton and M. F. Utter : *J. Biol. Chem.*, 240, 1 (1965).
- 7) H. C. Penefsky and R. C. Warner : *J. Biol. Chem.*, 240, 4694 (1965).
- 8) E. Sugimoto, R. Sasaki and H. Chiba : *Arch. Biochem. Biophys.*, 113, 444 (1966).
- 9) T. Isemura and K. Kakiuchi : *J. Biochem.*, 51, 385 (1962).
- 10) 中沢淳, 徳重正信, 早石修 : 生化学, 37, 546 (1965).
- 11) 杉本悦郎, 北川泰雄, 中西一男, 千葉英雄 : 43 回生化学大会発表 (1970).
- 12) 千葉英雄, 吉川正明, 佐々木隆造, 杉本悦郎 : 日本農芸化学会大会講演要旨集, 1969, p. 210.
- 13) H. K. Schachman : "Ultracentrifugation in Biochemistry", Academic Press, New York (1959).
- 14) J. W. Williams (ed.) : "Ultracentrifugal Analysis in Theory and Experiment", Academic Press, New York (1963).
- 15) 磯見二郎 : 蛋白質 核酸 酵素 別冊, 生物化学実験法 IX, 29 (1967).
- 16) 藤田博, 小高忠男, 内山敬康 : 続生物物理学講座 (2). 物理的測定法 II, 吉岡書店, 1968, p. 19.
- 17) 川出由己 : 生物物理化学実験法 (渡辺, 島内編), 培風館, 1962, p. 9.
- 18) 田代裕 : 生化学講座 (15), 生体成分分析法, 共立出版, 1962, p. 124.
- 19) D. A. Yphantis : *Ann. New York Acad. Sci.*, 88, 586 (1960); *Biochemistry*, 3, 297 (1964).
- 20) S. Hanlon, K. Lamers, G. Lauterbach, R. Johnson and H. K. Schachman : *Arch. Biochem. Biophys.*, 99, 197 (1962).
- 21) H. K. Schachman, L. Gropper, S. Hanlon and F. Putney : *Arch. Biochem. Biophys.*, 99, 175 (1962).
- 22) K. Lamers, F. Putney, I. Z. Steinberg and H. K. Schachman : *Arch. Biochem. Biophys.*, 103, 379 (1963).
- 23) H. K. Schachman : *Biochemistry*, 2, 887 (1963).
- 24) H. K. Schachman and S. J. Edelstein : *Biochemistry*, 5, 2681 (1966).
- 25) I. Z. Steinberg and H. K. Schachman : *Biochemistry*, 5, 3728 (1966).
- 26) S. J. Edelstein and H. K. Schachman : *J. Biol. Chem.*, 242, 306 (1967).
- 27) J. Vinograd, R. Radloff and R. Bruner : *Biopolymers*, 3, 481 (1965).
- 28) J. Vinograd and R. Bruner : *Biopolymers*, 4, 131 (1966).
- 29) J. Vinograd and R. Bruner : *Biopolymers*, 4, 157 (1966).
- 30) M. M. Rubin and A. Katchalsky : *Biopolymers*, 4, 579 (1966).
- 31) J. Vinograd : *Methods in Enzymology*, Ed. by S. P. Colowick and N. O. Kaplan, New York, Academic Press, 6, 854 (1963).
- 32) 小高忠男, 内山敬康 : 生物物理, 7, 85 (1967).
- 33) 内山敬康 : 生物物理, 7, 92 (1967).
- 34) E. Sugimoto and L. I. Pizer : *J. Biol. Chem.*, 243, 2090 (1968).
- 35) J. C. Gerhart and H. K. Schachman : *Biochemistry*, 4, 1054 (1965).
- 36) J. P. Changeux, J. C. Gerhart and H. K. Schachman : *Biochemistry*, 7, 531 (1968).
- 37) J. C. Gerhart and H. K. Schachman : *Biochemistry*, 7, 538 (1968).
- 38) D. A. Clayton, R. W. Davis and J. Vinograd : *J. Mol. Biol.*, 47, 137 (1970).
- 39) J. Rosenbloom, E. Sugimoto and L. I. Pizer : *J. Biol. Chem.*, 243, 2099 (1968).
- 40) E. Sugimoto and L. I. Pizer : *J. Biol. Chem.*, 243, 2081 (1968).