

超遠心分析の基礎

有坂 文雄

超遠心分析法について、特に沈降速度法に焦点を合わせて理論の概略と解析法を解説し、その応用例について述べる。

超遠心分析とは

超遠心分析機は、特殊なローターとセルを用い、高速で回転しているローター内に設置されたセル内の溶質の濃度分布をリアルタイムで測定できるようにした遠心機である。超遠心分析機によって得られるデータに基づいて溶質の溶液中での性状を解析するのが超遠心分析である。超遠心分析には沈降速度法と沈降平衡法の2つのモードがある。

超遠心分析は最も理論的研究の進んだ解析法の一つであるが、1980年代に一時衰退した。しかし、1992年に新しい型の超遠心分析機XLA, XLIが市販されて以来、タンパク質への関心が再び高まってきたことと相まって、研究者の関心を集め、データ解析の方法も大きく発展し、現在も発展しつつある。

沈降速度法と沈降平衡法

タンパク質分子の比重は約1.3で水より重い。超分子と呼ばれる大きな複合体でも水溶液中で沈むことはない。これは重力によって沈降する力に較べて、熱運動による拡散が圧倒的に大きいからである。しかし、ローターに装填したセルを大きな遠心力で回転させると、遠心力が拡散に打ち勝って、セル内のタンパク質は沈降するようになる。

そこで、生体高分子を含む溶液を十分高速で回転させると、溶質は沈降し、すでに溶質が沈降してしまった部分とまだ溶質が沈降中である部分との間に移動境界面が生じる。この移動境界面の形や移動の速度には、溶質の沈降係数や拡散係数、不均一な場合には沈降係数の分布関数などの情報が含まれている。移動境界面の時間変化を測定するのが沈降速度法である。それに対して、より低速でローターを回転し、平衡状態に達したときにその濃度曲線から分子量に関する情報を求めるのが沈降平衡法で、溶液の非理想性に関する第2ビリアル係数も求められる。

沈降速度法は基本的には輸送現象であって、厳密には非平衡の熱力学に基づく方法であるのに対して、沈降平衡法は熱力学に基づく方法である。そのため、後者は理論がより単純で曖昧さが少ない。しかし、沈降速度法の

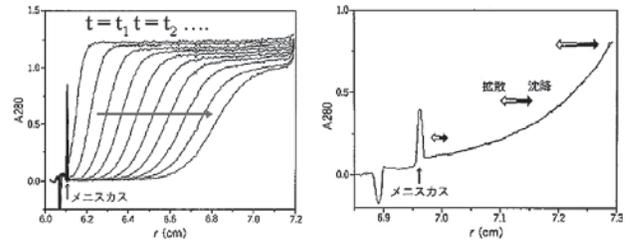


図1. 沈降速度法(左)と沈降平衡法(右)

方が試料の不均一性に関して圧倒的に精度が高く、情報量も多い。また、最近の解析法を用いると、溶質の解離会合反応の結合定数だけでなく、解離会合の速度に関する情報も得られる。

ここでは、最近最も一般的な解析法となりつつあるSEDFITプログラム、すなわちc(s)解析法¹⁾について述べ、その応用例を紹介する。

沈降速度法とLamm方程式

沈降速度法における濃度分布、すなわち移動境界面を含む濃度分布 c は時刻 t と半径方向の回転中心からの距離 r の関数になっている。半径方向に沈降する溶質分子が沈降の過程で側面の壁にぶつからないようにするためにセルは幅の狭い方を内側に向けたくさび形をしている。くさび形をしたセルにおける移動境界面を含む濃度分布 $\chi(r,t)$ はLammの方程式によって表される：

$$\left(\frac{\partial \chi}{\partial t}\right)_r = -\frac{1}{r} \left[\frac{\partial}{\partial r} \left\{ s\omega^2 r^2 \chi - D r \left(\frac{\partial \chi}{\partial r} \right)_i \right\} \right]$$

ここで、 s は沈降係数、 D は並進の拡散係数、 χ は溶質の濃度である。 $\{ \}$ 内の第1項は沈降を、第2項は拡散を表す。すなわち、移動境界面は沈降係数に従って沈降するが、同時に拡散によって(Fickの法則)境界面の濃度勾配は小さくなっていく。すなわち、境界面はぼやけていく(図2上)。

Lamm方程式の一つの解 χ は一对の s と D によって定まるが、溶質が複数種の分子を含む場合には、観測される濃度分布 $a(r,t)$ は、複数個の (s_i, D_i) ペアによって決まる χ に重み $c(s_i)$ をかけて足したものになる。数値解析を用い、実験データとの最小2乗法によって $c(s)$ 、すなわち沈降係数の分布関数を求めるプログラムがSEDFITである¹⁾。このプログラムによって、拡散による移動境界面

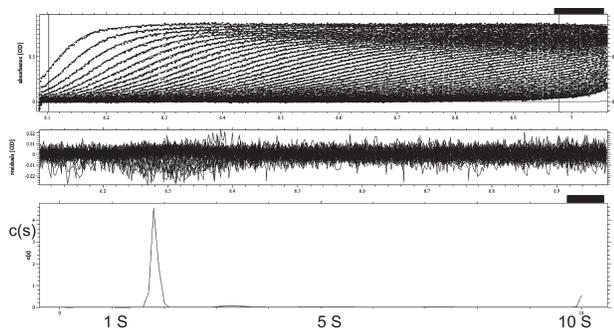


図2. c(s)解析

の広がりの影響を排除して、シャープな分布関数が得られるようになった。なお、求められた沈降係数 $s_{T,b}$ はある温度における、ある溶媒中での沈降係数の値である。これを溶媒の粘度、密度、温度について次式に基づいて水中の 20°C における値 $s_{20,w}$ に補正することによってこの分子または複合体に固有な物理的パラメータが得られる。

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

厳密には $s_{20,w}$ は溶質濃度依存性があるので、いくつかの濃度で測定し、濃度0に外挿することによって $s_{20,w}^0$ を求める。しかし、一般に球状タンパク質では濃度依存性は小さく、1 mg/ml程度またはそれ以下では $s_{20,w}^0$ に十分近い値が得られる。こうして求めた沈降係数 s は溶質分子の分子量 M 、摩擦係数 f と以下の関係にある。

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

ここで、 \bar{v} は溶質の偏比容、 ρ は溶媒の密度、 N はアボガドロ数である。

SEDFITを用いて、あるバクテリオファージの18 kDaのタンパク質を解析した例を図2に示す。上段が生データ、中段が生データと求められた理論曲線との残差、下段が求められた沈降係数の分布関数 $c(s)$ である。ほぼ均一な試料で、水溶液中で単量体として存在することが分る。

以下、SEDFIT (c(s)解析) の応用について述べる。

抗体溶液中の微量のオリゴマー分子の解析

SEDFITを用いて、抗体溶液に含まれる微量オリゴマーを解析した例について述べる。

あるモノクローン抗体について得られた沈降係数の分布関数 $c(s)$ を図3(a)に示した。一見したところ、沈降係数6.30 Sの均一な標品のように見えるが、10 S付近に小さなピークの存在が認められる。そこで、縦軸 ($c(s)$) を100倍に拡大してみたのが図2(b)である。ピーク面積を積分して全体の抗体中での割合を調べると、この場

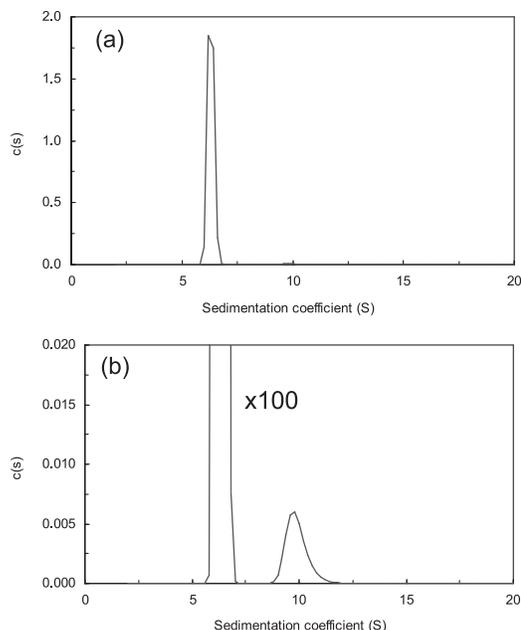


図3. 沈降速度法による抗体溶液中のオリゴマーの解析²⁾

合、0.8%という値が得られる。このように、SEDFITによる解析で1%以下のオリゴマー含量の測定が可能になったが、このような精度でオリゴマータンパク質を再現性よく定量的に測定するためには、測定時のローター中のセルのアラインメントを正確に行う、測定中の温度を一定に保つ、など、よいデータを取るための注意が必要である。

ペプチドのc(s)解析

超遠心分析の特徴は測定できる分子量範囲が広いことである。大きなものではウイルスから小さなものはペプチドまで解析が可能である。ペプチドの解析は、以前は平衡法でのみ行われたが、速度法でもSEDFITによって解析が可能になった。図4に7残基のアミノ酸からなるペプチドADNFの測定結果を示す。60,000 rpmで測定しているが、移動境界面が見られる通常の方法とは異なり、平衡法と同じ時間経過をたどって平衡に達する。以前はこのようなデータは速度法データとして解析することは不可能だったが、SEDFITによって解析することが可能で、沈降係数0.368 S、分子量 2300 ± 510 の値が得られた。沈降平衡法では分子量が 2504 ± 120 の値が得られた。配列から計算される分子量は2,645であり、このペプチドが水溶液中でモノマーとして存在することを示している。円2色性スペクトルからはこの条件でペプチドは構造をもたないことが明らかで、単量体であるという結論と一致する³⁾。

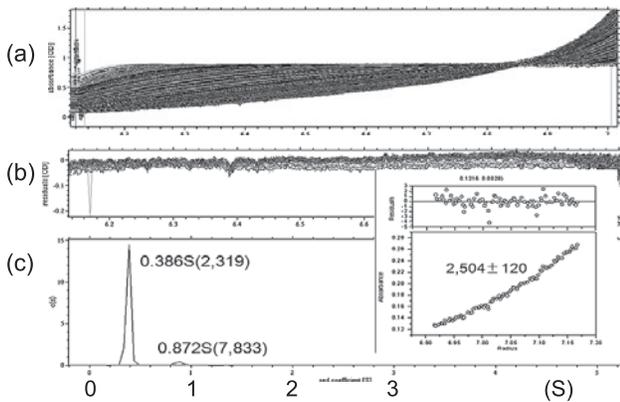


図4. 沈降速度法と沈降平衡法によるペプチドの解析

SEDFITを用いたタンパク質間相互作用の解析

SEDFITは分子間相互作用のない理想溶液を仮定しているが、SEDFITを用いて相互作用のある系の測定データを解析するのは意味があるだろうか。答えはYesで、たとえば単量体-2量体間の動的平衡にある系の沈降速度法の結果をSEDFITで解析すると、解離会合の速度に対応して $c(s)$ のピークとして単量体と2量体の中間の沈降係数を持つひとつまたは2つのピークが見られる。非常に速い動的平衡にある場合には単量体と2量体の中間の沈降係数を持つひとつのピークが得られる。ここで重要なのはいずれの場合でも、 $c(s)$ を全体にわたって積分して得られる沈降係数は正しい重量平均の沈降係数となることが示されていることである⁴⁾。ただし、動的な解離会合平衡にある場合には、観測されるピークは必ずしも実在の分子の沈降係数に対応しないことに留意すべきである。

上記をふまえて、ヘモグロビンの2量体-4量体間の平均を求めることができる⁵⁾。ヒトヘモグロビンのpH7および6における重量平均の沈降係数を0.1 mg/mlから10 mg/mlまでの濃度範囲で測定し、最小2乗法でデータの理論曲線へのフィッティングを行うことによって、各pHにおける結合定数 K_a はそれぞれ $3.2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ および $8.1 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ と求められた(図5)。なお、SEDFITを拡張したSEDPHATプログラムではデータを単量体-2量体などの種々のモデルに最小自乗法によりフィットさせて結合定数を求めることができる(本特集の内山の項参照)。

ヘモグロビン変異体の2量体-4量体平衡に及ぼす影響

ヘモグロビンは安定な $\alpha\beta$ ダイマーが2つ会合して4量体を形成している。2量体同士の会合面に変異をもつ、ないしは導入した3つの変異体(Hb Hirose, rHb(bW38H), rHb(aY42S)) および野生株Hbの沈降速度法を行い、SEDFITで解析した結果を図6に示す。

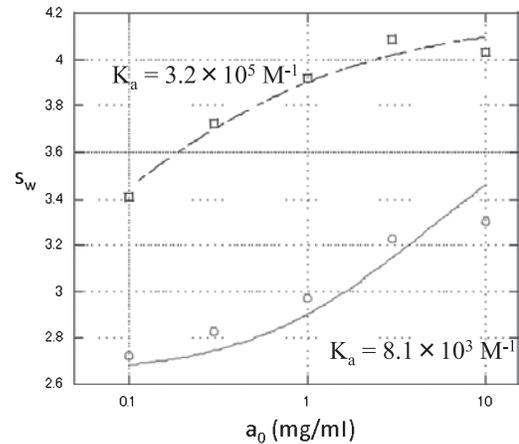


図5. ヘモグロビンの2量体-4量体間の結合定数の決定

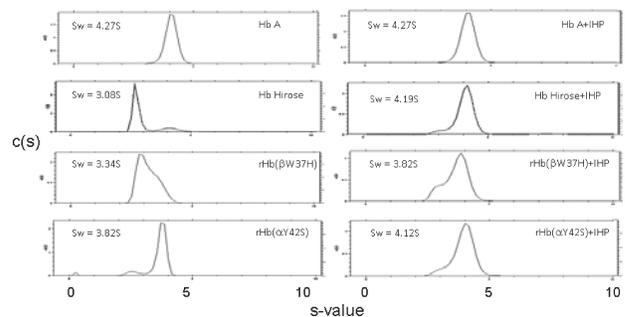


図6. ヘモグロビンの2量体-4量体の解離平衡に及ぼすアミノ酸置換の影響

図6から以下のことが分かる。1. アミノ酸残基1個の置換が解離平衡に大きな影響を与える。2. 影響の大きさは変異の位置と置換アミノ酸に依存する。3. IHP(イノシトール六リン酸)によって平衡が4量体側に大きくシフトする。4. $c(s)$ の形状は解離会合の速度を反映する。

まとめ

1. 近年、 $c(s)$ 解析をはじめとして、沈降速度法データ解析法の進歩が著しい。
2. 沈降速度法データの $c(s)$ 解析は溶液中の少量のオリゴマーを定量的に解析する有効な方法である。
3. SEDFITはペプチドの解析にも威力を発揮する。
4. SEDFITによる $c(s)$ 解析は相互作用のない系の解析のために作製されたが、相互作用解析にも有用である。

文献

- 1) Schuck, P.: *Biophys. J.*, **75**, 1503 (1998).
- 2) 有坂文雄, 井浦貴史: 超遠心分析を応用したタンパク質会合凝集の評価法, p.216, シーエムシー出版 (2010).
- 3) Arakawa, T. *et al.*: *J. Pept. Sci.*, **14**, 631 (2008).
- 4) Schuck, P.: *Protein Reviews*, **5**, 469 (2007).
- 5) Arisaka, F. *et al.*: *Methods*, Epub ahead of print (2011).