

超遠心機は高分子の研究にどのように役立つか

大阪大学理学部 藤 田 博

1. 序

超遠心機 (Ultracentrifuge) は高価な測定機器である。現在、附属品をあわせると1200~1500万円もする。従ってどの研究所も手軽に常備するわけにゆかない^{*}。10年前にはわが国の超遠心機保有台数はわずか数台にすぎなかった。しかし1960年前後からはじまったわが国の目覚ましい経済的発展のせいもあり、またとくに生化学、医化学研究者達の強い要望もあって、ここ数年保有台数は急速に増えつつある。これは日本のみならず世界的傾向でもある。このような時にあたって、超遠心機が高分子物質の研究にどのように役立つかを解説しておくのも無駄ではないと思われる。

一口にいえば、超遠心機は溶液 (希薄な) 中の溶質分子の性質に関する情報を得るための道具である。溶質分子として対象になるのはいわゆる巨大分子 (macromolecules) であって、次のものが含まれる。

- a) タンパク質; リポタンパク (lipoproteins), 酵素, 粒状タンパク
- b) 核酸; DNA, RNA
- c) ヴィルス
- d) ミクロゾーム (microsomes) などの細胞粒子
- e) 合成高分子 (繊維素などの天然高分子も含む)

本稿で述べたいのは合成高分子の研究に対する超遠心機の応用である。それは過去10年余筆者が主として興味をもってきた分野である。a) から d) までのいわゆる生体高分子への応用については、たとえば H.K. Schachman 著 "Ultracentrifugation in Biochemistry" (Academic Press, New York, 1959) に優れた解説がある。

溶液を強大な遠心力場におくと〔これには溶液をいれた容器 (セルという) を固定軸のまわりに高速で回転させればよい〕、溶質は移動をおこし (それに伴って溶媒分子も移動するが) いわゆる溶液の遠心分離がおこる。これは溶液内の濃度分布の時間的变化として現われる。

^{*} 当大阪大学は日本でも特に保有台数の多い所である。蛋白研に二台、微研に一台、医学部に一台ある。残念ながらまだ理学部に備えられていない。

この変化は溶質分子の質量 (即ち、分子量), 形, 大きさ, また分子間の相互作用などに関係している。従って、遠心中の溶液内の濃度分布を測定することができれば, このような溶質分子に関する知見が求められるはずである。超遠心機はこの期待を実現するために作り出された機器である。即ち, それは強大な遠心力場を作りしかも遠心中の溶液の濃度分布 (または濃度勾配分布) が精密に測定できるような機器である。強大な遠心力場を得るには高速回転が必要である。現在世界で最もひろく用いられている超遠心機は米国 Beckman 社の Spinco E型機であるが, 毎分2千回から毎分6万回転までの速度がほとんど連続的にえられるようになっている。そして各回転数で何時間遠心を行っても速度がほとんど変動しない。最高回転数 6万 r.p.m. (revolutions per minute) では溶液をいれたセル (これは回転子の軸から約 7 cm のところに挿入される) には重力加速度の約30万倍に達する遠心加速度が生ずる。通常巨大分子とよばれているもの (分子量が1万以上) は, 溶質と溶媒の密度差があまり小さくない限り, この程度の加速度があると測定可能な速度で溶液中を沈降 (sediment) する。即ち溶質と溶媒の遠心分離が行われ, 沈降解析 (sedimentation analysis) に必要なデータがえられる¹⁾。超遠心機の「超」という修飾語はしばしばこのような高速度の回転を意味するものと考えられている。しかしこれはあやまりである。超遠心機の発明者である Svedberg が注意しているように²⁾, ultra (超) は遠心をしながら溶液中の濃度分布が測定できるように特別に設計された器械という意味をもつ。従っていくら高速回転がえられるように作られた遠心機 (centrifuge) でも超遠心機とはいわない。かかる遠心機は supercentrifuge とよぶべきことを Svedberg は提唱している。現在回転数が5万 r.p.m. にも達する分離用の遠心機も市販されているが, これは単に溶質の分離, 不純物の除去などに用いるもので, 遠心中の濃度分布を測定する装置をそなえていないから, Ultracentrifuge でなく, supercentrifuge である。遠心中の溶液の模様を観測するには光学的方法が用いられる。現在三つの光学系が常用されている。第一はシュリーレン光学系, 第二は Rayleigh 干渉縞系, 第三は紫外吸収光

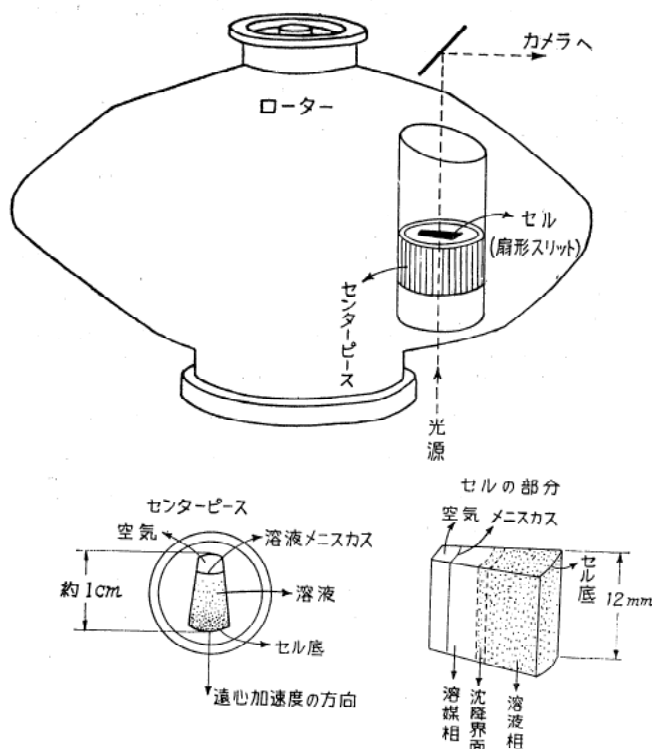


図1 超遠心機のロータとセンターピース

学系である。大抵の超遠心機にはこれら三つの光学系が組み込まれており、必要によってどの光学系によってもデータがえられるように設計されている。シュリーレン法では溶液内の濃度勾配分布がえられ、干渉縞法及び紫外吸収法では濃度そのものの分布が測定される。ただし紫外吸収法は溶質分子が強く紫外線を吸収する基をもっていないと利用できない。普通の目的にはシュリーレン法でデータをとれば十分であるが、精度がおとり、余り稀薄な溶液には用いられない。今の所、干渉縞法が最も高い精度のデータを与える。

図1は回転子（ローターとよぶ）及びそれに挿入されるセルを示したものである。

2. 遠心実験の種類

超遠心機を用いて行う実験には現在次の四種類がある。これらは求めようとする情報の種類によって適当に使われる。

a) 沈降速度実験 (Sedimentation Velocity Experiment) 沈降係数 s を求めるために行われる。ここに s とは単位の加速度によって生ずる溶質の沈降速度で、その単位は秒である。通常測定される s は 10^{-13} sec のオーダーとなるので、 10^{-13} sec を単位として表わす。質量、この単位を S で表わし、Svedberg 単位という。 s は溶質の沈降しやすさ、直観的には溶液が溶質と溶媒に遠心分離しやすさを表わす量である。分子的には s は溶質の

形、大きさ、溶媒の粘度、溶質間の相互作用（熱力学的及び流体力学的）に関係している。一般に s は、はじめセルにいれる溶液の濃度 c_0 (g/cc) によって変る（ふつう c_0 がますと s は小さくなる）重要なのは $c_0 \rightarrow 0$ の極限における s の値である。これはいくつかの c_0 で s を測定し、 s 対 c_0 のグラフ（多くは $1/s$ 対 c_0 のグラフが直線になる）を $c_0 \rightarrow 0$ へ外挿して求める。外挿値を s_0 と書き極限沈降係数 (limiting sedimentation coefficient) という。

s は遠心に伴って溶液内にあらわれる溶媒と溶質の分離界面が移動する速度から求める。この速度が十分な精度で求めよう（速度はローターの回転数の自来に比例するので）ローターをできるだけ高速に加速する。普通、沈降速度実験はローターの最高回転速度（6万 r.p.m.）又はその近くで行う。

b) 沈降平衡実験 (Sedimentation Equilibrium Experiment)

遠心を行うとセル内溶液の濃度は遠心側に高く、求心側に低くなる。この濃度勾配のために溶質は求心側に拡散して濃度分布の不均化を防ごうとする。この傾向と遠心力によって濃度分布がより一層不均一なものになるようにする傾向がちやうど相殺するある濃度分布が実現する。この状態は一種の熱力学的平衡状態で、沈降平衡とよぶ。この状態における濃度分布（又は濃度勾配分布）を測定する実験を沈降平衡実験という。この実験から系の熱力学的性質に関する知見がえられる。沈降平衡実験には毎分数千から一万位の低い回転速度が用いられる。高速で回転すると、平衡状態では溶質がほとんどセルの底（図1参照）に集中してしまって濃度分布が正確に求まらないからであり、また理論上都合の悪いことがおこるからである。

c) Archibald 型実験 (Archibald-Type Experiment)

沈降速度実験を比較的低回転数（沈降平衡実験に用いられる程度）で行うと、溶質と溶媒の分離界面が溶液のメニスカス（図1参照）からはなれない。即ちメニスカスの部分でも濃度は0にならず、濃度勾配も0にならない。このメニスカスでの濃度と濃度勾配とを時間の関数として測定すると、沈降平衡実験の与える情報と同等なものがえられる。この原理は Archibald (1947) の発見したもので、のちに筆者らによって完全な理論に仕上げられた。

この種の実験を Archibald 型沈降実験という。

d) 密度勾配沈降実験 (Density Gradient Centrifugation)

沈降平衡実験の一種であって、Meselson ら³⁾ (1957)

の発案になる。最近 DNA などの生体高分子の研究に大いに威力を発揮した。しかし合成高分子に利用するにはいくつかの難点があり、報告もまた数例に限られている。くわしいことは前掲の Schachman の書を参照されたい。

3. どんな知見がえられるか

さて、前節にのべた沈降実験を合成高分子に適用するとどんな情報がえられるかを述べよう。

a) 分子 量

もともと超遠心機は Svedberg がタンパク質の分子量及び分子量に関する均一性を知るために考え出したもので、それは1923年にさかのぼる。Svedberg は極限沈降係数 so を沈降速度実験から求め、極限拡散係数 Do (拡散係数 D の溶質濃度 O の極限における値) を別の拡散実験から求めると次式によって溶質の分子量 M がえられることを理論的に導いた：

$$M = \frac{RTso}{Do(1-\bar{v}\rho_0)} \quad (1)$$

ここに R は気体定数、 T は溶液の絶対温度、 ρ_0 は溶媒密度の、 $\bar{v}$ は溶質の部分比容である。(1) を Svedberg の式という。超遠心機の開発、沈降解析の理論の発展は少くとも第二次世界大戦のはじまるまではほとんどスウェーデンの Uppsala 大学の Svedberg 研究室で行われたが、努力の大きな部分は(1)式にふくまれる so , Do , $\bar{v}$ の測定技術の発展にそそがれたといって過言でない。合成高分子物質はタンパク質のように分子量的に均一な物質でない。化学的構造は同一でも分子量の種々異なる多数の分子の集合である。即ち分子量的に多分散 (polydisperse) である。(1)式は分子量的に均一 (単分散 (monodisperse)) の溶質と単一の溶媒から成る溶液、即ちいわゆる二成分系にしかあてはまらない。従って分子量的に多分散な物質の溶液に対して so と Do とを測定し、(1)式から分子量を計算しても溶質のある平均の分子量がえられるにすぎない。ところがこの平均分子量 (通常 M_{SD} と書く) はあまり物理的意味のないものである。溶媒の種類を変えると値が変わってしまう。従って M_{SD} は光散乱法で測定される溶質の重量平均分子量 M_w や浸透圧法でえられる数平均分子量 M_n のような溶質に固有な量でなく、みかけの量にすぎない。このことがはっきりして以来、 so と Do とから分子量を求めることは、合成高分子物質に関する限り、ほとんどやられなくなってしまった。大体1950年代の中頃からと思われる。

現在、超遠心機を用いて合成高分子の分子量をもとめるには、沈降平衡実験、Archibald 型実験のいずれかが

用いられる。いずれも溶質の重量平均分子量 M_w を与えることが理論的に保証されている。

沈降平衡法が原理的には M_w を求めるのに最も適した方法であることは以前から知られていたが、高分子溶液のように熱力学的非理想性のつよい系では、正しい M_w を求めるには実験からえられるみかけの分子量 M_{APP} を溶質濃度 O へ外挿しなければならないこともよく知られていた。ところが、この外挿を正確にやる方法がみつからず (現在でも そうである)、1950 年代の中頃には沈降平衡法は高分子の研究には向かないと結論されるまでにいたった。しかも、当時の実験法では、沈降平衡に到達するには10日またはそれ以上の長期間を要し、とても実用に役立ちそうにないのも事実であった。この困難に対するピンチ・ヒッターとして登場したのは Archibald 型実験を高分子溶液に用いようとする試みであった [Kegeles ら⁴⁾ (1955)] かれらはこの方法によると格段に短時間で沈降平衡法と同じ知見のえられることを指摘したが、その理論的な裏づけ、実験的な証明は筆者らの研究にまたねばならなかった。以来、Archibald 法は、合成高分子のみならず生体高分子に対しても、応用されてきた。

いったん見捨てられたかにみえた沈降平衡法は最近見事によみがえりつつある。その第一の原因は1958年の Van Holde と Baldwin⁵⁾ の理論的研究である。以前は沈降平衡をはやく到達せしめるにはローターの回転速度を上げるより仕方がないと考えられていた。しかしそうすると溶質が必然的にセルの底の部分に集中してしまい、平衡状態における濃度分布が正確に測定できないばかりか、理論的にも色々具合の悪いことが起る。Van Holde と Baldwin はもしセルの中に入れる溶液の量を少くし、メニスカスとセル底との距離 (図1参照) を小さくすればするほど平衡到達速度は大きくなること、この速さにはローターの回転数はほとんど関係しないことを証明した。理由は省略するが解析に都合のよいデータをうるにはローターの速度をおとす方がよい。Van Holde-Baldwin の提唱した方法を short-column の方法という。最近の実験はほとんど例外なしにこの方法を採用している。第二の原因は θ 状態の認識である。すでに1940年の後半 Flory は高分子はそれに特有なある溶媒 (貧溶媒に限る) 中、ある特定の温度で θ 状態又は理想状態とよばれる特殊な状態になることを知った⁶⁾。この状態にある高分子の稀薄溶液では溶質分子間の熱力学的相互作用は O となり、溶液は理想溶液の如く振舞う。ゆえに、沈降平衡をかかせる溶液において到達せしめれば、以前学者を苦しめた一つの問題、即ち溶液の熱力学的非理想性によってみかけの分子量 M_{APP} の濃度 O への外挿が困難

になる問題からのがれることができる。原理的にはただ一つの濃度での測定で十分である。

このようなわけで、short-column 法を用い、試料高分子に対してそれを θ 状態にもたらし溶媒（これを θ 溶媒という）、温度（ θ 温度又は Flory 温度と呼ぶ）をえらんで沈降平衡実験をやれば、きわめて迅速にかつ正確に試料の M_w を求めることができることになった。現在、光散乱法とならんでこれが最も正確な M_w の決定法とされている。しかもこの二つの方法は相補的である。光散乱法によってはかれる M_w の下限は大体数万であり、上限は約 300 万程度とみられる。これに対し沈降平衡法による M_w の上限は約 20 万で、これ以上大きい M_w に対しては通常平衡に到達するに 2 日又はそれ以上も要し、実用にならない。これに反し下限は数百にまで達する。小さい分子量の分子ほどはやく平衡に達しますます都合がよい。現在の所 1000 から数万までのいわゆるオリゴマーや比較的分子量の低い高分子の M_w を測定するには実に沈降平衡法しか手段がないのである。この点は十分強調されてよい。今後とも沈降平衡法は益々盛んに利用されてゆくであろう。すでに最近の生化学関係の雑誌をみると、まさにこの方法が分子量決定の標準法になりつつあるかにみえる。一時は盛んであった Archibald 法の利用も影をひそめたようであり、すでに Svedberg の式による方法は過去のものとなってしまったといつてよい。なお数千程度の M_w の合成高分子や数万程度の M_w の粒状タンパク分子の場合には、溶液は θ 溶媒を用いなくてもほとんど理想的に振舞うので、実験は一層容易であることを付け加えておこう。

b) 分子量分布

合成高分子の特長の一つは、それが分子量的に多分散である事実である。すなわち、試料は化学構造は同一であるが長さが異なる鎖状分子から成り立っている。試料中に異なる分子量の分子が混在している模様を分子量が分布しているといい、分布の有様を表わすのに分子量分布関数を用いられる。1 グラムの試料中分子量が M と $M+dM$ の間にふくまれる分子の総重量を dW で表わすとき、

$$f(M) = dW/dM \quad (0 < M < \infty) \quad (2)$$

で定義される関数 $f(M)$ のことである。つぎに

$$F(M) = \int_0^M f(M) dM \quad (3)$$

で定義される $F(M)$ を積分分子量分布関数という。通常の合成高分子試料では $f(M)$ は一つの極大をもつ山形の曲線になる。原理上 $M=0$, ∞

では $f(M)$ は 0 である。分子量的に均一な試料ほど山はするどく高くなる。これを分布が狭いという。最近アニオン重合法によって非常に狭い分布の高分子試料がえられるようになった（たとえばポリ α メチルスチレン）。ポリエチレンは一般に非常にひろがった分子量分布をもつことが知られている。 $f(M)$ の形は試料の物理的性質とくに力学的性質に大きな影響を及ぼすので、分子量分布を決定する技術は実用上甚だ大切である。また重合の機構を研究する上にも重要であることが知られている。

このために $f(M)$ を決める方法が種々考案されてきた。その一つとしてすでに Uppsala 時代から注目をあびてきたのは沈降速度実験を利用する方法である。これは分子量の大きい分子ほど速く溶液中を沈降するという原理にもとづいている。しかし分子量 M と一対一に対応するのは s_0 であって、有限濃度（0 でない濃度のこと）において測定される s でない。一般に高分子溶液では s の濃度変化が著しく、 s と s_0 とには大きな違いがある。従って沈降速度実験から分子量の分布を求めようとすれば、有限濃度での実験データから計算されるみかけの分布関数を濃度 0 へ外挿しなければならない。この操作は極めてやっかいなものであり、また多くの場合正確を欠く。このために、高分子の $f(M)$ を沈降速度データから求める試みも長い間見捨てられていた。しかし 1950 年代の後半、McCormick⁷⁾ や Cantow⁸⁾ らが θ 溶媒中では s の濃度変化がほとんどなくなることを見出して以来、再び脚光をあびることになった。すなわち、 θ 溶媒を用いて沈降速度実験をやれば、データを濃度 0 へ外挿する操作が著しく簡単化されると同時に外挿値に対する信頼度が格段に高まる。本間ら⁹⁾ はこの問題について更にくわしく研究を行い、一つの標準的な方法を確立するに到

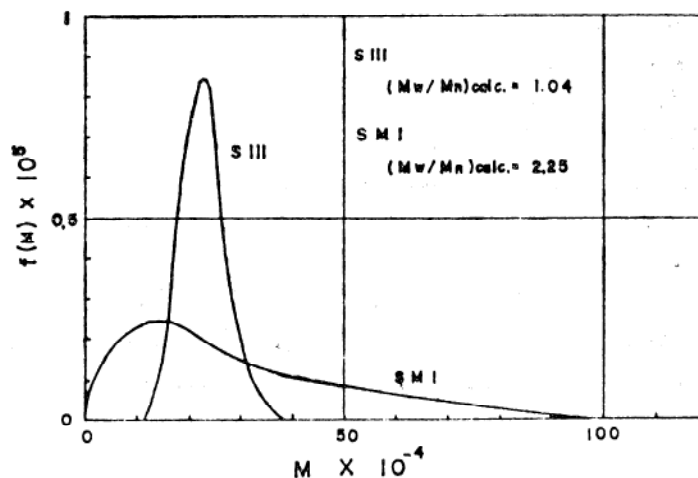


図2 沈降速度実験からえたポリエチレンの分子量分布曲線。溶媒、シクロヘキサン（35°C）（ポリスチレンの θ 溶媒）。SIII, アニオン重合物。SMI, 熱重合物。

った。図2に本間らの方法によって求めた結果の例を示す。現在、2～3日の作業によって一試料の $f(M)$ を決定することができる。今日、この方法はカラム・クロマト法及びゲル透過法とならんで分子量分布を求める標準法とみなされている。

沈降平衡法も $f(M)$ を求めるのに有力な方法であると考えられた。これについて最も精力的な研究をしたのは(1940年代の後半から1950年代のはじめにわたる)Walesとその共同研究者達である。しかし結論は空しいものであった。すなわち、沈降平衡法から $f(M)$ は(原理的にはともかく実際的には)決定できない。しかし沈降平衡法には、 M_w ばかりでなく、 M_z , M_{z+1} , ...といった高次の平均分子量を求める可能性が存在する；ちなみに、 M_w , M_z , ...は $f(M)$ を用いて次の如く表わされる：

$$M_w = \int_0^\infty f(M) M dM,$$

$$M_z = \int_0^\infty f(M) M^2 dM / \int_0^\infty f(M) M dM, \dots$$

M_z/M_w , M_{z+1}/M_w , ...といった比は試料が分子的に単分散であれば1で、多分散である程1より大きくなる。従って、 $f(M)$ そのものは求まらなくても、分子量分布の広さに関してある目安はえられるのである。なお、現在他の方法によっては、 M_z , M_{z+1} などの高次の平均分子量は求まらないことを注意しておきたい。

c) 分子の形、大きさ

分子量決定に s_0 を利用することは少なくなったが、 s_0 を測定する意義は少しもうすれていない。今日では s_0 は高分子の流体力学的性質をしらべるために主として用いられている。ここに分子の流体力学的性質とは、巨大分子が溶媒中を運動するときに分子がどんな流体抵抗を受け、どんな形や大きさをもった粒子として振舞うかといったことである。このような知識は巨大分子が溶液中でとる形態、それと分子の化学構造との関連を明かにする上に重要な資料となる。また、溶質分子にどれだけの溶媒分子が溶媒和(solvation)するかを調べるのにも役立つ。

s の濃度依存性は、沈降速度実験から分子量分布をもとめたり、正確な s_0 の値を決定するには邪魔ものであるが、溶質分子相互の間の流体力学的な干渉を反映する

ので、かかる相互作用を研究するのに役立つ、このための理論が最近著しく進歩してきた。

d) 熱力学的相互作用、解離会合

繰り返し述べたように、高分子溶液の特長は一には溶質が分子的に多分散なこと、一にはその熱力学的な非理想性である。この後者について詳しく研究することは高分子溶液論の最も重要な課題の一つである。通常この問題は第二ビリアル係数 A_2 とよばれる量をしらべることに帰せしめられる。 A_2 を決定するには光散乱法、浸透圧法があるが、沈降平衡法、Archibald型沈降法も役に立つことが最近の研究によって証明されている。ここにも超遠心機が高分子の基礎研究に有益な一つの例がある。

さらに最近の研究によると、沈降速度実験及び沈降平衡実験は溶液中の溶質分子の解離会合の模様をしらべるのに有力な方法であることがわかってきた。これはとくにタンパクの水溶液に対して見事な応用を見つつある。

4. む す び

以上、超遠心機が高分子、とくに合成高分子の研究にどのように役立つかを概観した。しかしこれは現時点での応用状況に基づいた展望であって、今後もっと色々な応用用途が開発されると思われるし、またそう信じたい。筆者としては、高分子鎖のもっと微細な性質、たとえばその立体規則性、枝わかれの度合、共重合物の組成比などと沈降挙動との関連が明かにされ、超遠心機がこのような問題の研究に役立つ日が来ることを希望したい。

文 献

- 1) 沈降解析の基礎理論は筆者が次の書にまとめた：
H. Fujita, *Mathematical Theory of Sedimentation Analysis*. Academic Press, New York, 1961.
- 2) T. Svedberg, K. O. Pedersen, *The Ultracentrifuge*. Oxford Univ. Press, 1940の序文参照。
- 3) M. Meselson ら, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **43**, 581 (1957).
- 4) G. Kegeles ら, *J. Phys. Chem.*, **61**, 1286 (1957).
- 5) K. E. Van Holde, R. L. Baldwin, *J. Phys. Chem.*, **62**, 734 (1958).
- 6) P. J. Flory, *Principles of Polymer Chemistry*. Cornell Univ. Press, Ithaca, New York, 1953.
- 7) H. W. McCormick, *J. Polymer Sci.*, **36**, 341 (1959).
- 8) H.-J. Cantow, *Makromol. Chem.*, **30**, 169 (1959).
- 9) T. Homma ら *Makromol. Chem.*, **67**, 132 (1963); *J. Appl. Polymer Sci.*, **8**, 2853 (1964); **9**, 1701 (1965); **9**, 2549 (1965).