

10. 遠心理論

10-1 遠心分離

10-1-1 遠心分離の原理

試験管に土と水を入れ、よくかき混ぜた後静かに立てておくと、土の粒子の中で大粒の重いものは速く、細かくて軽いものはゆっくりと沈降し、粒子の大きさの順に試験管の底に分離・堆積していくのが見られます。また、微細な粒子は沈降せず、上層に濁った液として残ります。(図 10-1)

これは、地球の重力で粒子を大きさや重さの順に沈降分離した例です。

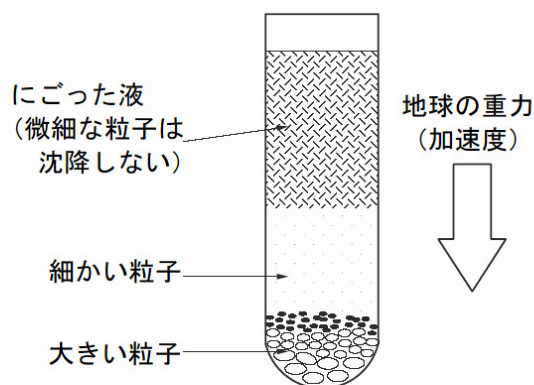


図 10-1

次に、この試験管を図 10-2 のように回転させてやると、重力だけでは沈降しなかった微細な粒子も沈降していくのが見られます。

これは回転している試験管中の粒子には遠心力が働き、この力が粒子を拡散させようとする拡散力より大きくなった時、いままで沈降しなかった微細な粒子も沈降するようになるからです。

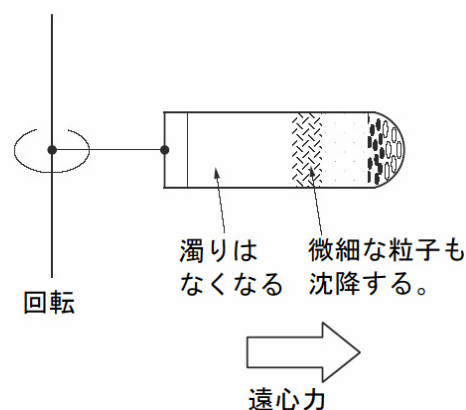


図 10-2

この原理を種々の物質の分離に応用したものが遠心機です。

10-1-2 遠心力

この大きな力を出す「遠心力」はどのように計算されるかを説明します。

質量 m の粒子を、回転半径 r ・回転角速度 ω で回転すると、遠心加速度 $r\omega^2$ が発生し、その粒子には遠心力 f が働きます。

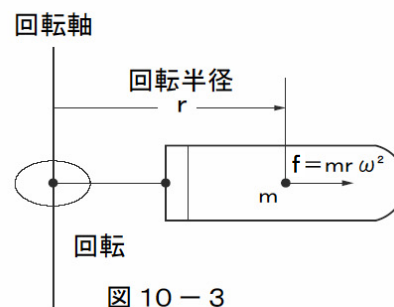
この遠心力は次の式で表すことができます。

$$f = mr\omega^2 \quad \dots\dots\dots (1)$$

m : 粒子の質量 (g)

r : 回転半径 (cm)

ω : 回転角速度 (rad/s)



一般に遠心分離を行う場合には、遠心加速度の単位として、地球の重力加速度との比で表した「相対遠心加速度」(RCF: Relative Centrifugal Force) を用います。相対遠心加速度は、通常”G” または” × g” 等を付けて表します。

ここで、この粒子が回転軸を中心に1分間当たりN回転しているとすると、
 $\omega = 2\pi N/60$ (rad/s)、地球の重力加速度 = 980.665 (cm/s²) ですから、
 相対遠心加速度 RCF は

$$\text{RCF} = \frac{\text{遠心加速度}}{\text{地球の重力加速度}} = r \cdot \left(\frac{2\pi N}{60} \right)^2 \cdot \frac{1}{980.665}$$

となり、これを整理すると、次の式で表すことができます。

$$\text{RCF} = 1118 \times r \times N^2 \times 10^{-8} (\times g) \quad \dots\dots\dots (2)$$

r : 回転半径 (cm)
 N : 一分間当たりの回転数 (rpm)

遠心分離を行う際に、ただ単に「遠心加速度」というと、通常この「相対遠心加速度」をさします。

[例: ロータの最大遠心加速度の計算]

分離用超遠心機用ロータである、「P100AT2 アングルロータ」を例にとって、最大遠心加速度を計算してみます。

最大遠心加速度は、そのロータの最大回転半径と最高回転数から計算されます。

P100AT2 アングルロータでは

最大回転半径 : $r_{\max} = 7.18$ (cm)
 最高回転数 : $N_{\max} = 100000$ (rpm)

ですので、(2) 式より最大遠心加速度 RCF_{max} は

$$\text{RCF}_{\max} = 1118 \times 7.18 \times (100000)^2 \times 10^{-8} = 802724 (\times g)$$

すなわち、P100AT2 アングルロータの最大遠心加速度は $802724 \times g$ と計算され、このロータが重力加速度の約80万倍の遠心加速度を出せることを意味しています。

10-2 沈降の理論

ここでは溶液中の粒子が遠心力によってどのように沈降するかを、沈降速度、沈降係数、沈降時間、Kファクタなどの関係式を導きながら説明します。

10-2-1 沈降速度・沈降係数

ある溶液中を粒子が遠心加速度 $r\omega^2$ を受けて沈降するとします。

この粒子が完全球形である場合、粒子を沈降させる力 f_1 は次の式で表されます。

$$f_1 = (\text{粒子の体積}) \times (\text{相対密度}) \times (\text{遠心加速度})$$

$$= \frac{1}{6} \pi d^3 \cdot (\sigma - \rho) \cdot r\omega^2 \quad \dots\dots\dots (3)$$

d : 粒子の直径 (cm)
 σ : 粒子の密度 (g/c)
 ρ : 溶液の密度 (g/c)

また、溶液中を沈降する粒子には、沈降方向と逆方向に摩擦力が働きます。

今、この粒子を完全球体と仮定すると、Stokesの法則により摩擦力 f_2 は次の式で表すことができます。

$$f_2 = 3 \pi d \eta v \quad \dots\dots\dots (4)$$

d : 粒子の直径 (cm)
 η : 溶液の粘度 (poise : $\text{g} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)
 v : 粒子の移動速度 (cm/s)

遠心力場を粒子が一定速度で沈降する場合には、 f_1 と f_2 は釣り合っていると考えることができるので、(3) 式と (4) 式より

$$\frac{1}{6} \pi d^3 \cdot (\sigma - \rho) \cdot r\omega^2 = 3 \pi d \eta v$$

となり、これを整理すると沈降速度 v は次の式で表すことができます。

$$v = \frac{d^2}{18} \cdot \frac{(\sigma - \rho)}{\eta} \cdot r\omega^2 \quad \dots\dots\dots (5)$$

(5) 式より、溶液が変わらなければ、粒子の沈降速度は遠心加速度 $r\omega^2$ に比例することがわかります。

この比例定数を s とすると (5) 式は次のようになります。

$$v = sr\omega^2 \quad \dots\dots\dots (6)$$

$$\text{ただし} \quad s = \frac{d^2}{18} \cdot \frac{(\sigma - \rho)}{\eta}$$

比例定数 s は沈降係数と呼ばれ、秒 (s) の単位で表されます。しかし、一般に生物学的粒子に対しては値が小さすぎて不便なため、 10^{13} 倍した値を S (Svedberg unit : スベドベリ単位) で表して用いています。

すなわち、沈降係数 s と S 値は、

$$s = S \times 10^{-13}$$

という関係にあります。

この S 値を使って (6) 式を書き替えると

$$v = S \cdot r \omega^2 \cdot 10^{-13} \quad \dots\dots\dots (7)$$

$$S = \frac{d^2}{18} \cdot \frac{(\sigma - \rho)}{\eta} \times 10^{13} \quad \dots\dots\dots (8)$$

となります。

S 値は粒子の沈降のしやすさを示す尺度となるもので、生物学の分野では沈降係数といえば通常この S 値のことを指します。多くの単純タンパク質の場合には、 S 値はほぼ 3~12 の間に分布しています。

(8) 式より S 値は粒子の直径の二乗および粒子の密度 σ と溶液の密度 ρ の差に比例し、溶液の粘度 η に反比例することがわかります。このように、試料の S 値は周囲にある溶液によって変化しますが、通常は 20℃ の水中を沈降していく場合の値を用います。(これを特に $S_{20, w}$ と記す場合もあります。) つまり、試料の S 値が 30 といえば、20℃ の水中を沈降する場合の S 値が 30 であることを意味します。

また、 S 値と移動の方向との関係は次のようになります。

- ① $S > 0$ の場合、粒子は沈降する。(粒子密度 σ が溶液密度 ρ より大きい)
- ② $S < 0$ の場合、粒子は浮上する。(粒子密度 σ が溶液密度 ρ より小さい)
- ③ $S = 0$ の場合、粒子は移動しない。(粒子密度 σ と溶液密度 ρ が等しい)

10-2-2 沈降時間・Kファクタ

沈降時間は、粒子が遠心チューブの液面の位置 (= 最小回転半径 R_{min}) から遠心チューブの底の位置 (= 最大回転半径 R_{max}) まで沈降するのに要する時間 T として計算することができます。

沈降速度 v は、時間の変化に対する回転半径の変化、すなわち $v = dr/dt$ で表すことができますから、(7) 式より

$$\frac{dr}{dt} = S \cdot r \omega^2 \cdot 10^{-13}$$

これを R_{\min} から R_{\max} まで積分し、整理すると以下のように沈降時間 T が求められます。

$$T \text{ (sec)} = \frac{\ln (R_{\max}) - \ln (R_{\min})}{S \cdot \omega^2} \cdot 10^{13} \quad \dots\dots\dots (9)$$

$$T \text{ (hr)} = \frac{\ln (R_{\max}) - \ln (R_{\min})}{S \cdot \omega^2} \cdot \frac{10^{13}}{3600} \quad \dots\dots\dots (10)$$

R_{\max} : 遠心チューブの最大回転半径 (cm)

R_{\min} : 遠心チューブの最小回転半径 (cm)

T : R_{\min} から R_{\max} までの沈降時間

ここで次のように K を定めます。

$$K = \frac{\ln (R_{\max}) - \ln (R_{\min})}{\omega^2} \cdot \frac{10^{13}}{3600} \quad \dots\dots\dots (11)$$

こうすると (10) 式は次のような簡単な式で表すことができます。

$$T \text{ (hr)} = \frac{K}{S} \quad \dots\dots\dots (12)$$

K は K ファクタと呼ばれる値で、1S の粒子が R_{\min} から R_{\max} まで沈降するために要する時間を表わします。

(11) 式を整理すると、 K ファクタは以下の式で表すことができます。

$$K = \frac{2.53 \times 10^{11}}{N^2} \cdot \ln \left(\frac{R_{\max}}{R_{\min}} \right) \quad \dots\dots\dots (13)$$

この K ファクタは各ロータの回転数ごとに決まった値となるため、分離する試料の S 値がわかれば分離時間は簡単に算出することができます。各ロータの K ファクタはロータに付属の取扱説明書に記載してありますので、参照してください。

[例：P90AT アングルロータを使用して、90000rpmで5Sの試料を分離する場合。]

P90AT アングルロータを90000rpmで回転させた場合のKファクタは25になります。
分離する試料は5Sですから、(12)式より

$$T \text{ (hr)} = \frac{K}{S} = \frac{25}{5} = 5 \text{ (hr)}$$

すなわち5時間の遠心で分離できることになります。

10-3 沈降時間の補正

10-3-1 S値の補正

(12)式より、試料のS値とロータのKファクタがわかれば沈降時間を計算することができます。S値が未知の場合には、(8)式を用いてS値を計算することができますが、その場合には次の因子を考慮する必要があります。

①試料の濃度

(8)式では、溶液の粘度に対する試料の濃度の影響は、試料の濃度がきわめて低いと仮定することにより無視しました。試料が球状粒子で試料の濃度が数%以下の場合には、(8)式により計算した値はほとんど誤差を生じません。

試料が非対称形粒子の場合には、濃度が1%増加するとS値は5~10%小さくなるといわれています。

②試料粒子の形状

(8)式は試料が完全球形の粒子であることを仮定して導きだしたものです。

粒子の形状が球に近い場合には、dをその粒子と同体積の球直径として計算することができます。

対称な長楕円形の場合には、その直径比によってS値が変わります。

完全球形の粒子を1Sとした場合の、直径比に対するS値の変化を表10-1に示します。

表 10-1

直径比	1 : 1	3 : 1	5 : 1	10 : 1	20 : 1
S 値	1	0.9	0.8	0.7	0.5

S値が概知の場合には、(12)式にその値を代入することにより沈降時間を計算することができます。ただし、試料のS値は通常20℃の水中での値($S_{20,w}$)で記載されているのに対して、実際の分離にはシヨ糖や塩化セシウム等の高濃度溶液を用いることが多く、しばしばS値を補正することが必要になります。

いま試料がmという溶液中を沈降し溶液の温度がT℃だとすると、その時のS値($S_{T,m}$)は(8)式を変形することにより次のように計算することができます。

$$S_{T,m} = S_{20,w} \cdot \frac{\sigma - \rho_{T,m}}{\sigma - \rho_{20,w}} \cdot \frac{\eta_{20,w}}{\eta_{T,m}} \quad \dots\dots\dots (14)$$

- $\rho_{T,m}$: T℃における溶液mの密度 (g/c)
- $\rho_{20,w}$: 20℃における水の密度 (g/c)
- $\eta_{T,m}$: T℃における溶液mの粘度 (poise : $g \cdot cm^{-1} \cdot s^{-1}$)
- $\eta_{20,w}$: 20℃における水の粘度 (poise : $g \cdot cm^{-1} \cdot s^{-1}$)

10-3-2 K*ファクタ

S値の補正は煩雑な計算を行わなくてはならないため、S値はそのままKファクタを補正することにより計算を簡便化する方法が取られることがあります。

例えば、試料粒子の密度を1.3 (g/c)とし、5~20%のシヨ糖直線密度勾配液を用いた沈降速度法(温度5℃)による分離を行う際の、S値の変動量をKファクタに与えたものを、K*ファクタとし、シヨ糖溶液中のDNAやタンパク質の分離時間を簡単に算出できるようにしたものです。すなわち、K*ファクタとは1Sの粒子が5~20%のシヨ糖直線密度勾配液中を沈降するのに必要な時間を示しています。