

タバコ・モザイク・バイラス溶液の粘度

川 出 由 己

(1954年5月11日受理)

Viscosity of Solutions of Tobacco Mosaic Virus

Yoshimi KAWADE

(Received May 11, 1954)

ABSTRACT: Viscosity of solutions of tobacco mosaic virus (TMV) was measured by Ostwald-type viscometers with maximum velocity gradients of flow of about 100 sec^{-1} which make the effect of orientation of rod-like particles of TMV negligibly small. The viscosity of TMV solutions in 0.01 M phosphate buffer at pH 7.0 decreased slowly when the solutions examined were stored at a temperature near 0°C during several months after purification, and approached the probable stationary values which correspond to intrinsic viscosity of about $50(\text{cc}/\text{cc})$. At concentrations higher than 1%, the flow time increased steadily during measurement at 18° or 30°C , the rate of increase diminishing as the over-all relative viscosity lowered during storage in the cold. These phenomena are temporarily interpreted in terms of disaggregation while cold storage and aggregation at higher concentration and high temperature. In another series of experiments performed at about five months after the purification, phosphate was added to the stock solution of TMV (in 0.01 M phosphate buffer at pH 7.0) so as to make the phosphate concentration 0.1 M. The solution showed very high viscosity, indicating marked end-to-end aggregation of virus particles. The relative viscosity tended to increase when these solutions were stored at room temperature, and to decrease when stored in the cold. Thus, the importance of specifying the history of the solution (particularly concerning the temperature) in determining the size and shape of particles of TMV is emphasized. In the present experiment the solvent used for preservation of purified TMV (0.01 M phosphate buffer at pH 7.0) may not be the best.

タバコ・モザイク・バイラス (TMV) は細長い棒状の粒子で、条件によつて容易に会合や分裂を起すことが知られているが、その溶液の粘度は TMV 粒子の軸比の変化に対して敏感であるので、粘度測定による粒子の分散状態の研究はしばしば行われている¹⁾。

我々はさきに報告したように TMV を超遠心機で精製することに成功し、精製した試料について沈降速度、拡散その他の測定を行つて来たが^{2) 3)}、

その中で一つの試料の粘度について興味ある現象が見出されたのでここに報告する.*

実 験

粘 度 計

実験に当つて第一に注意したことは、粘度測定のための流れの速度勾配において TMV 粒子が流

* 一部は日本化学会第5年会で報告した(1952年4月、東京)。

れの方向に配向しないように、なるべく低い速度勾配を生じる粘度計を使うことである。TMV 粒子を、長さ 300 μ m、軸比 20 の回転楕円体とし、Perrin⁴⁾ の式を用いて回転の拡散定数を算出すると約 500 sec^{-1} となる。これに比べて速度勾配を充分小さくしなければならない。

測定は簡単のため Ostwald 型の毛細管粘度計によることとした。周知のように、毛細管粘度計では流れの速度勾配の最大値 β_m は、毛細管の半径および長さをそれぞれ a, l 、液面の圧力差を ρ 、粘度を η とすると、もつとも一般的に

$$\beta_m = \rho a / 2 \eta l$$

で与えられる⁵⁾。通常の Ostwald 型粘度計では、 $\beta_m = 1,000 \text{sec}^{-1}$ あるいはそれ以上のことが多いので、 β_m を小さくするにはかなり設計を変える必要がある。 ρ を小さくすることは、測定に用いる液量が多くなつたり、液にかかる圧力のわずかな誤差が大ききいてくるので好ましくない。 a を過度に小さくすることも操作上不便である。そこで l を大きくすることとしたが、その際 ρ を小さく保つために、毛細管を螺旋状にした。このことはまた粘度計を compact に保つて取扱いを容易にする。設計に当つて測定に必要な溶液の量を少くすることにも留意した。このような考えで第 1 表のような特性をもつた 2 つの粘度計を作つて使用した。表に示したように最大速度勾配が 100 sec^{-1} を僅かこえる程度であるから、TMV 粒子の配向の影響は全く無視できるであろう[†]。

第 1 表 用いた毛細管粘度計の特性

粘度計番号	C1	C2
毛細管内径* (cm)	0.052	0.061
毛細管全長 (cm)	120	120
液面の高さの差 (平均, cm)	12.5	9.5
上下印線間の液量 (cc)	0.20	0.27
最大速度勾配** (sec^{-1})	130	110
18°C の水の流出時間 (sec)	92.9	104.2
測定に要する液量 (cc)	1	1

* Poiseuille の式を用いて計算した値

** 18°C の水の場合

毛細管を螺旋状にした粘度計を用いた場合、毛

† 構造粘性についての Kuhn, Kuhn の理論^{6a)}によると、速度勾配が回転の拡散定数と同程度の大きさのときにも、粒子の配向による粘度の低下は、比粘度 η_{sp} で数%にすぎない。

細管内の流れの速度がある程度以上大きくなると乱流を起すよりはずつと低い流速で Poiseuille の法則からの偏差が生じることが早くから認められている⁶⁾。Grüneisen⁷⁾ は、この偏差が、流れの Reynolds 数の大きいほど、そして螺旋の径と毛細管の孔径との比が小さいほど大きくなることを実験的に示した。彼の実験結果を検討した結果、我々の用いた条件においては、この偏差が全く誤差範囲内であることが推論できた。また Dean⁸⁾ は螺旋状の管内を流れる流体の運動を理論的に考察し、Poiseuille の法則からの偏差を推定する近似式を導いたが、これを適用してみても上記の粘度計では毛細管を曲げたことによる誤差は全く無視してよいことがわかつた。

側管 (測定溶液が流出する側の管) の内径ははじめ 7~8 mm であつたが、のちに 20mm に拡げた。その結果、粘度計に導入される液体の量に 0.01cc 程度のくまりがあつても液面の高さの差の変動は約 0.03% となり、ストップウォッチによる流出時間の読取りの誤差以内となつた。なお粘度計に試料を入れるには常に同一のピペットを用いるようにした。

試料

分劃遠心によつて精製した TMV-9²⁾ について測定した。溶媒は pH 7.0, 0.01M または 0.1M の磷酸塩緩衝液である。精製後 pH 7.0, 0.01 M の磷酸塩緩衝液中に約 3.7% の濃度で 0°C 附近に保存したものを稀釈し、0.038~1.92 g/100cc の濃度範囲で測定した。TMV 濃度は micro-Kjeldahl 法で窒素を定量し、その濃度に 6.0₀²⁾ を乗じて決定した。各溶液の密度および TMV の容積分率は TMV の偏比容を 0.73⁹⁾ とし計算した値を採つた。

実験結果

A. pH 7.0, 0.01 M 磷酸塩緩衝液中での粘度

測定した溶液のうち 1% 以上のものは測定中にだんだん流出時間の増加するのが認められた。1% 以下の溶液は測定時間 (20~60 分) 内では一定の流出時間を示した。後者の測定結果を先に述べることにする。

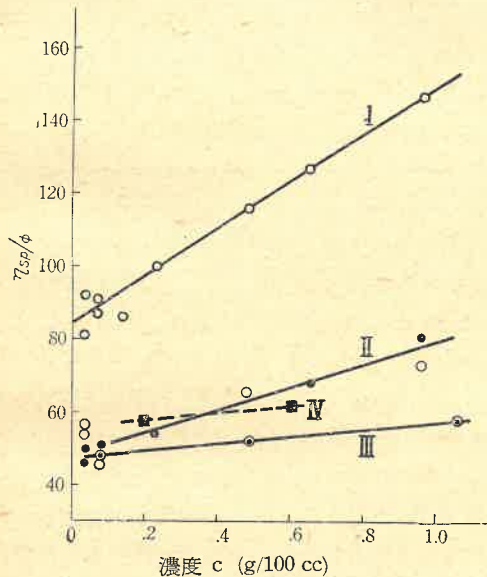
(i) 1% 以下の溶液の粘度 最初の測定は精製してから 8 週間後に行つたもので、その結果を

第2表に示した. 第1図(曲線 I) は比粘度 η_{sp} を TMV の容積分率 ϕ (cc/cc) で割つたものを重量濃度 c (g/100cc) に対して図示したもので, 測定値はよく一直線上に乗っており, $c \rightarrow 0$ に外挿して容積分率固有粘度 $\nu = 85$ と求められる. 測定温度は 18°C である.

第2表 pH 7.0, 0.01 M 磷酸塩緩衝液中での相対粘度の最初の測定値

TMV 濃度 (g/100cc)	相対粘度*
0.96 ₀	2.029
0.65 ₄	1.606
0.48 ₆	1.420
0.23 ₃	1.171, 1.170
0.13 ₇	1.086, 1.086
0.072	1.046, 1.048
0.036	1.024, 1.021

* 2 つの数字はちがつた粘度計による値を示す



第1図 pH 7.0, 0.01M 磷酸塩緩衝液中での η_{sp}/ϕ と濃度との関係
 I: 精製後8週間 (○, 18°C)
 II: 精製後16週間 (○は 18°C , ●は 12°C)
 III: 精製後22週間 (○, 20°C)
 IV: IIIと同じ時期に高濃度の保存原液を稀釈してただちに測定したもの (■, 20°C)

ところが, これらの溶液をそのままの濃度で 0°C 附近の冷凍室に保存し, 約 8 週間後にふたたび測定した結果, 第1図曲線 II のように粘度が著しく低下していることが見出された. これらの溶液をふたたび冷凍室に保存し, さらに約 6 週間後

(精製後約 22 週間) に測定すると, 同図曲線 III のようにより低い粘度の値が得られた. 固有粘度としてはこのときにはもうあまり変化がなく, 大体 $\nu = 50$ が定常状態の値と見られる.

曲線 II の測定温度は 18°C (○印) および 12°C (●印) である. このときの測定は曲線 I の測定に比べてやや精度がよくない* が, この 2 つの温度で相対粘度は同じと見てよいであろう. 次項 (ii) で述べるように 1% 以上の 2 溶液の相対粘度が 30°C と 18°C とでよく一致した(第3表参照)ことと考え合わせると, これらの温度範囲では比粘度, したがって固有粘度は温度によつて変化しないものと考えられる. このことから, TMV 粒子の配向がこの場合顯著ではないことが想像され, また TMV 粒子の軸比がこの程度の温度範囲では一定である(測定時間内では)という予想が裏書きされる.

第1図曲線 I, II, III に見られるように, 比粘度の低下は TMV 濃度の高低にかかわらず同様の比率で起つている. これらの溶液よりはるかに高い濃度で保存された溶液について調べるため, 3.7% の濃度の精製原液を III と同じ時期に稀釈してただちに測定した. 第1図曲線 IV の 2 点がそれで, 曲線 III よりやや粘度が高いが大體同程度の値と見られ, 濃厚な原液においても稀釈した状態で保存したものと同様な粘度低下が起つていることが想像される.

(ii) 1%以上の溶液の粘度 1.9%および1.3%の2つの溶液について測定したが, 流出時間が測定中に顕著に増加することが見出された. その増加の速さは2時間程度ではあまり減少してゆかず, 一定値に飽和する傾向が少い. ところがこれらの溶液を前項(i)と同様に試験管に戻して 0°C 附近の冷凍室に保存し, 数週間後に粘度を測定してみると, 第3表に示すように, 1%以下の溶液と同じく粘度が低下していることが見出された (η_{sp}/ϕ は大體において第1図 I, II, III の直線の延長上に来る). しかも表に示したように相対粘度は測定中にやはり少しずつ増加してゆく. その増加の速度は, 表の最後の列に示すように数週間保存した後

* 濃度は数週間前の値をそのまま用いてあるので, η_{sp}/ϕ の値の精度はやや低い. 曲線 III ではその時新しく分析した濃度が用いてある.

第3表 1%以上の溶液の粘度

測定時期 (精製後 の週 数)	測定 温度 (°C)	相対粘度 η_r^*	η_{sp}/ϕ	η_r の増 加の速 度**
(a) 1.9 ₂ % 溶液				
8	18	3.896→3.944 (50)	207→210	1.5
11	18	3.724→3.783 (130)	195→199	0.8
17	30	2.301→2.359 (90)	93→97	1.7
	18	2.368 (20)	98	0
22	20	2.224→2.231 (45)	84→85	0.4

(b) 1.2₈% 溶液

8	18	2.591→2.620 (45)	171→174	1.5
11	18	2.554→2.593 (120)	167→171	0.8
17	30	1.795 (30)	86	0
	18	1.791 (50)	85	0

* カッコ内は測定を続けた時間を示す(単位は分)

** 1時間あたりの相対粘度の増加の割合を%で表した
大体の数字

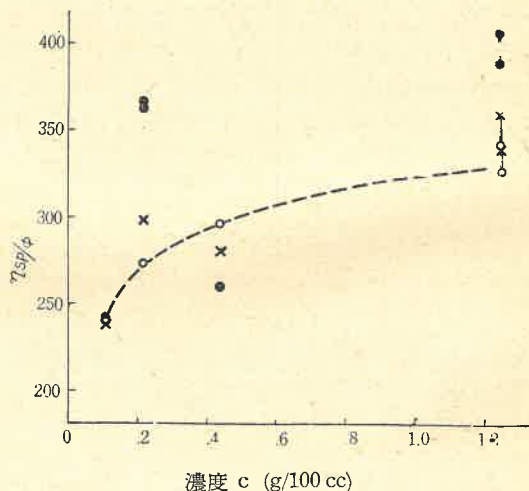
には小さくなり、1.3%溶液はついには1%以下の溶液と同様に一定の流出時間を示すようになった。第3表(a), (b)の第3, 4行(精製後17週間)は、はじめ30°Cで測定し、続いて18°Cに下げて測定した場合の値で、高温では測定時間中に見られる粘度増加が著しいことがわかる。なおこのとき30°Cでの相対粘度の(最後の)測定値と、18°Cでの値とが2つの溶液ともよく一致したので、前項に述べたように相対粘度の温度変化は充分誤差範囲内であると見られる。

B. pH 7.0, 0.1 M 磷酸塩緩衝液中での粘度

Schachmanら¹⁴⁾は中性のTMV溶液の溶媒の電解質(磷酸塩)濃度が0.01Mあれば荷電効果(electroviscous effect)はないと述べている。この点をたしかめるためと、また溶媒の電解質濃度をより高くすれば前項に述べた数カ月にわたる粘度低下が促進されるのではないかという可能性を調べるために、0.01M 磷酸塩緩衝液を溶媒として3.7%の濃度で保存した原液に適当に磷酸塩溶液を加えて0.1Mとした場合を測定した。TMV濃度は1.25, 0.44, 0.21₅, 0.11 g/100 ccの4つ、測定温度は23°C、実験時期は超遠心精製後5ヵ月あまりである。

溶媒の磷酸塩濃度を0.1Mに高めるとただちに白い濁りが顕著になり、試験管を振ると流動複屈折と思われる動きを示し、4,000 r.p.m. で遠心し

ても全く沈澱はできない。これらの溶液の粘度を測定した結果、第2図(○印)に示すように上記の予想に反して0.01 M中の溶液に比べて著しく高い値がえられ、TMV粒子の長軸方向の会合が顕著なことが推定された。しかも濃度のもつとも高い溶液では測定中に流出時間が減少してゆき、Joly¹⁰⁾が流動複屈折の測定において見出したのと同様に、端と端とで会合した粒子が流れの速度勾配において少しずつ切れてゆくように想像される。



第2図 pH 7.0, 0.1M 磷酸塩緩衝液中での粘度

- : 精製後約5ヶ月における値
- ×: それより11日後の値
- : さらに18日後の値

これらの溶液の粘度が保存したときにどう変化するかを見るにあたって、1.25および0.21₅%溶液は室温(15~20°C)に、0.44および0.11%溶液は0°C附近に置いて、保存温度の影響を調べた。第2図の×印は最初の測定の11日後、●印はそれからさらに18日後の測定値である。図から明かなように、室温においたものは顕著に粘度が増加し、0°C附近においたものはいくらか減少することが見出された。0.22₅%溶液は室温に約1ヵ月おかれた後に、わずかであるが1.25%溶液と同様に測定中に流出時間の減少してゆくことが認められた。

第2図の最初の測定(○印)で、 η_{sp}/ϕ 対 c の曲線が下向きに曲つて通常の溶液と比べて異常であることが注目される。ただしこの場合TMV粒子が著しく会合していると考えられるので、流れの

速度勾配において粒子の配向が起つている（とくに低濃度の溶液で）ことが予想される。また測定された濃度が少数であるから固有粘度を正確に求めることができない。

考 察

TMV 粒子は溶媒の pH や溶媒中の電解質の種類、濃度のいかによつて容易に会合、分裂（とくに長軸の方向について）を起すことが知られており、上記の TMV 溶液の粘度の時間的な変化は、粒子の会合状態に結びつけて説明さるべきであろう。かりに Simha¹¹⁾ の式を用いて固有粘度から軸比を算出してみると、 $\nu=85$ は軸比約 32 に、 $\nu=50$ は約 24 に相当する（ただし水合は無視する。水合があるとしても比較的少い¹²⁾ ようであるから定性的な考察には影響しない）。TMV のいわゆる monomer は直径 $15\text{ m}\mu$ 、長さ $300\text{ m}\mu$ の棒状粒子とされている¹³⁾ から、 0.01 M 磷酸塩緩衝液中に低温で保存した場合には、はじめいくらか長さの方向に会合していたものがゆつくり monomer にまで分散（あるいは一部はより小さいものにまで分裂）して行つたように見える。一方 1% 以上の高濃度の溶液では、溶液を 0°C から取出して測定温度におくと長さの方向の会合が速かに起り、粘度増加が測定中に見出されるのであろう。測定中における相対粘度の増加速度が 18°C よりも 30°C の方がかなり大きいこと（第 3 表）や、 0.1M 磷酸塩緩衝液を溶媒としたときの粘度に対する保存温度の影響（第 2 図）などを考えると、TMV 粒子の会合に対して温度が一つの重要な因子であることが暗示される。TMV 粒子の会合の傾向は低温では一般に顕著でないが、常温におくと促進されるということはよく言われることであり、最近も Joly¹⁰⁾ は流動複屈折の測定を用いて、著しく会合した TMV 試料を低温におくと粒子の長さが減少し、常温におくと増して行くことと述べているので、上のような説明は一応理解できるように思われる。

しかしながらここで見出された現象はかなり複雑なものといふべきであり、また粘度の測定は溶質粒子の均一性についての知見を全く与えないので、他の独立な測定を平行して行わなければ決定的な説明をすることはできない。この試料 TMV

-9 については粘度のほか沈降速度¹⁴⁾、拡散¹⁵⁾、電気泳動¹⁶⁾などの測定があるが、TMV 溶液の性質が時間的に変化する場合があることは我々の場合ここに述べた粘度の測定によつてはじめて明らかにされたことであり、各種の測定はこのような現象の起ることを充分予期しないで行われたために、前記のようなモデルが全体を包括しうるか否か充分明かにしえない*。しかしこの実験からの結論として、分子量・分子形状を測定しようとする場合に、用うべき溶媒の種類を適当に選ぶという周知の注意のほかに、その試料の経歴（おそらくとくに温度についての）に注意する必要があるということ、したがつて各種の独立な測定結果をたがいに関係づけうるためには、それらの測定に用いる試料溶液の経歴が同一である必要があること、がいえるであろう。

TMV 粒子の会合を防ぐために、分割遠心による精製および精製試料の保存に際して用うべき溶媒系が Schachman ら¹⁴⁾によつて研究されており、我々もその研究結果に大体従つてその溶媒系がほぼ満足であることを見た²⁾が、ここで扱つた試料において 0.01M 磷酸塩緩衝液中で粘度が時間的な変化を示したことは、この溶媒が少くもこの場合には必ずしも最善ではなかつたことを意味するように思われる。 0.1M の緩衝液中では粘度は軸比として大体 $50\sim 60$ に相当する値を示し、長さの方向の会合が明かである。このことはしかし pH 7.0、 0.1M の磷酸塩緩衝液中では常にこのように顕著な会合があることを示すのではなく、試料により、あるいは処理方法によつては、より低い粘度を示すことも大いにありうるであろう。 0.1M 緩衝液中での測定は精製後約 5 ヶ月におけるものであり、この試料の場合、 0.01M 緩衝液中で低温に保存された間に TMV 粒子に何らかの変化が起り、より高濃度の電解質によつて敏感に会合を起しうるような状態になつていたのかも知れない。

* 沈降測定は精製の直後に行われ、この試料は均一性が高く、monomer に相当する沈降定数をもつことが見出された。¹⁴⁾ これは前記のモデル（はじめ会合していたとする）と矛盾するように見えるが、粘度測定は精製後 8 週間以後におけるもので、その結果を精製直後にまで延長して考えることは困難であるからこの二種の測定結果は一応切離して考え、ここでは粘度測定を始めてから後のことを問題としたのである。

Schachman¹⁴⁾はこのような変化がTMVを電解質を含まない水の中に保存したときに起ると述べ、その意味でも0.01 Mの磷酸塩緩衝液が適当であるとしているのであるが、我々の実験はこの点でもこの溶媒が必ずしも適当ではなかつたことを暗示するように思われる。この種の実験は今のところこれだけしか行つてないので、ここで見られた現象を一般的に起るものと考えことはもちろんできないが、TMVのために適当な溶媒という問題はなお完全には解決されていないのではないかと注意する必要があるであろう。

第3表(a)第3,4行、すなわち1.9%溶液をはじめ30°Cで、続いて18°Cで測定したときのデータをもう少し詳しく述べると、30°Cでは流出時間が僅かずつ増加して、測定を続けた時間(約90分)内には一定の定常値に達する傾向が見られないのに、18°Cに下げると、200秒あまりの流出時間が、6回の測定(20分間あまり)において0.1秒以内で一定に保たれ、しかも相対粘度は30°Cにおける最後の値とよく一致した。このことは、もし30°Cにおける測定をより短く、あるいはより長く行つた場合には、18°Cにおいて表の値とはちがつた、しかも一定の相対粘度を示すという可能性を強く暗示する。いいかえれば表の18°Cにおける値は一種“metastable”な状態に対応するものという感が深い。これら1%以上のTMV溶液は溶液として異常な性質をもつてることが明らかであるが、高濃度のTMV溶液は2相分離を生ずることが知られており¹⁷⁾、このような「濃厚」溶液における粒子の分散状態ないし相互作用については研究の余地が非常に多い。

Schachman¹⁴⁾は η_{sp}/c 対 c の曲線が0.1%附近以下の濃度で下向きに曲ることを見出し、TMV粒子のmonomerとdimerとが動的平衡にあるという考えで定性的にこの傾向を説明した。我々の場合、このような傾向は0.01 M 磷酸塩緩衝液中では少くとも顕著には見出されなかつた。ただし低濃度では実験誤差が大きききいてくるので、Schachmanのいろいろな傾向が我々の場合にも存在するかどうか、したがつて η_{sp}/ϕ 対 c の直線部分の外挿で正確な固有粘度の値が求められるかどうかは、厳密にはより精度の高い測定を待つて決定されなければならない。

御指導と御討論を頂いた渡辺格助教授その他の方々、窒素の分析をして頂いた北村とも子嬢に厚く感謝する。研究費の一部は文部省科学研究費に仰いだ。

文 献

- 1) たとえば(a) J. R. Robinson: *Proc. Roy. Soc. A* 170(1939)519; (b) V. L. Frampton: *Arch. Biochem.*, 1(1942)83; (c) H. K. Schachman: *J. Am. Chem. Soc.*, 69(1947)1841; (d) H. K. Schachman, W. J. Kauzmann: *J. Phys. & Colloid Chem.*, 53(1949)150.
- 2) I. Watanabe, Y. Kawade: *Bull. Chem. Soc. Japan*, 26(1953)294.
- 3) 渡辺 格, 川出由己, 中村正好: 理工研報告, 8(1954)99.
- 4) F. Perrin: *J. phys. et radium*, [7] 5(1934)497.
- 5) たとえば E. Hatschek: “The Viscosity of Liquids,” Bell & Sons, London (1928) 参照.
- 5a) W. Kuhn, H. Kuhn: *Helv. Chim. Acta*, 28(1945)97.
- 6) G. Haffner: *Phys. Z.*, 2(1901)739.
- 7) E. Grüneisen: *Wiss. Abhandl. phys.-techn. Reichsanstalt*, 4(1905)151.
- 8) W. R. Dean: *Phil. Mag.*, 4(1927)208; 5(1928)673. なお C. M. White: *Proc. Roy. Soc.*, A123(1929)645 参照.
- 9) M. A. Lauffer: *J. Am. Chem. Soc.*, 66(1944)1188.
- 10) M. Joly: *Biochim. et Biophys. Acta*, 8(1952)134.
- 11) R. Simha: *J. Phys. Chem.*, 44(1940)25.
- 12) H. K. Schachman, M. A. Lauffer: *J. Am. Chem. Soc.*, 71(1949)536.
- 13) たとえば R. C. Williams, R. L. Steere, *J. Am. Chem. Soc.*, 73(1951)2057.
- 14) 渡辺 格, 川出由己, 水島三一郎: 日化, 73(1952)828.
- 15) 磯晃二郎ほか, 未発表.
- 16) N. Ui, I. Watanabe, in preparation.
- 17) たとえば N. W. Pirie: *Advances in Enzymol.*, 5(1945)1 参照.