

寒天と電気泳動用アガロースについて

Agar and Agarose for Electrophoresis

株式会社 鈴与総合研究所

流石 啓司
KEIJI SASUGA

石川 愛子
AIKO ISHIKAWA

伊藤 正高
MASATAKA ITO

SUZUYO RESEARCH INSTITUTE CO., LTD

清水食品株式会社 寒天事業部

天野 記彰
NORIAKI AMANO

石井 康史
YASUFUMI ISHII

北川 孝和
YOSHIKAZU KITAGAWA

白井 雅敏
MASATOSHI USUI

SHIMIZU SHOKUHIN KAISHA, LTD AGAR DIVISION

1. 寒天とは

寒天は紅藻類のうち主にテングサ属やオゴノリ属に属する海藻に含まれる粘質物を抽出し、水分を除去したものである。寒天の主成分は多糖類であり、その他の糖質、海藻由来のミネラル類、粗タンパク質、その他の夾雑物などが含まれる。寒天の特徴として以下のことが挙げられる。

- (1) 水と加熱すると溶解し、冷却すると凝固してゲルとなる。(凝固性)
- (2) 寒天はゲルになる際、大量の水を保持できる。(保水性)
- (3) ほとんどの細菌は寒天を消化することが出来ず、炭素源として利用されないため安定した支持体として利用できる。

このような特徴を生かして多くの分野で寒天が利用されている。寒天の主な用途を表1に示した。

用途により求められる寒天の品質が異なる。ところんでは海藻由来の磯の香りや弾力のあるテクスチャー、和菓子ではソフトで口当たりの良いテクスチャーと離水が少ない点等が重視される。一方、微生物培養用の寒天では、以下の事項が重視される。

(1) 透明度

微生物の数を検査する際、寒天ゲルの透明度が高い方が観察しやすい。

(2) 離水

寒天ゲルからの離水が多いとコロニーが拡散するなど判定が困難になるため離水は少ない方が良い。

(3) 精製度

培地中にりん酸などが含まれている場合、寒天由来のミネラル分(カルシウム、マグネシウム等)は反応し不溶物を形成し濁りの原因となることがある。また寒天中の夾雑物が、微生物の発育阻止物質となることがある。よって微生物培養用の寒天は精製度の高いものが好ましい。

微生物培養用の寒天をより高度に精製したものが電気泳動用のアガロースである。その他、いろいろな用途で寒天は使われている。

本稿では寒天の性質を記述すると共に、寒天の主な用途のうち、電気泳動用のアガロースについて記述したい。

表1 寒天の主な用途

用途	例
食品用	(1)ところてん (2)和菓子、ゼリー類 (3)みつ豆用 (4)その他
培養用	(1)微生物培養用 (2)植物組織培養用
学術研究用	(1)電気泳動用支持体 (2)ゲルろ過用担体 (3)その他
医薬用	(1)歯科印象剤 (2)粘滑薬、包摂薬 (3)その他

2. 寒天の原料

寒天の原料となる海藻類で主として使われているのはテングサ属(*Gelidium*)やオゴノリ属(*Gracilaria*)の海藻である。原料の海藻は、日本、東南アジア、南米、アフリカ等世界の多くの地域で収穫される。テングサ属の代表的な海藻はマクサ(*Gelidium amansii*)である。オゴノリ属の代表的な海藻はオゴノリ(*Gracilaria verrucosa*)である。マクサ、オゴノリの写真を図1に示す。

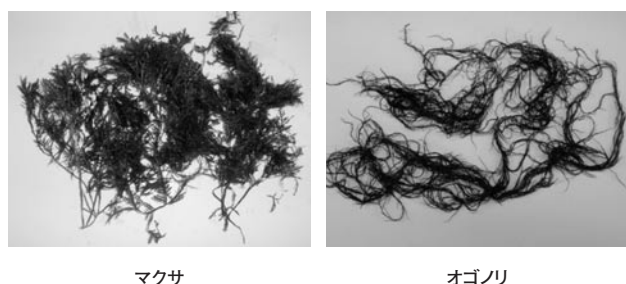


図1 マクサとオゴノリ

旧来、寒天の原料にはマクサが多く利用されてきた。一方、オゴノリより抽出した寒天は凝固力が弱いため、寒天製造の主原料としては使用されていなかった。オゴノリから抽出した寒天の凝固力が弱い理由として、寒天に含まれる硫酸基の量が影響することが分かっている。柳川¹⁾は多数の紅藻類の粘質物と凝固性の関係を研究し、凝固力の強い寒天では硫酸結合量が少ないのに対し、凝固力の弱い寒天では硫酸結合量が著しく多いという関係を報告している。柳川¹⁾のデータではテングサの粘質物における硫酸結合量は2.05%であるのに対し、オゴノリの粘質物における硫酸結合量は9.62%である。柳川¹⁾はオゴノリの粘質物をアルカリ溶液で加熱処理することにより、硫酸結合量が9.62%から2.18%に減少し、ゼリー強度が15g/cm²以下から306g/cm²に増加したと報告している。

その後、小島ら^{2~4)}によって、オゴノリをアルカリ溶液中で加熱処理し、含まれる粘質物を凝固力の強いものに変化させ、得られた寒天ゲルを圧力脱水することにより寒天を製造する方法が確立された。このような研究の結果、オゴノリは現在、寒天の原料として広く用いられるようになった。

3. 寒天の製法、種類

3.1 製法の違いによる分類

寒天は岐阜、信州など冬季の寒さを利用し屋外で凍結脱水を行なう天然寒天と、天然の冷氣を利用せず、機械等により年間を通じて工業的に脱水を行なう工業寒天に分類される。

3.2 形態の違いによる分類

天然寒天には糸状の細寒天(糸寒天)や棒状の角寒天などがある。工業寒天では粉末寒天がある(図2)。



細寒天(糸寒天)と角寒天

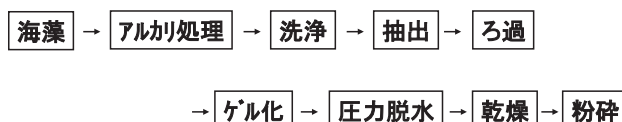
粉末寒天

図2 寒天の種類

3.3 寒天の製造工程

工業寒天の製造工程を図3に示した。

オゴノリ寒天



テングサ寒天



図3 工業寒天の製造工程

オゴノリを原料とする寒天では、前述したようにアルカリ処理することでオゴノリに含まれる硫酸基が除去されゼリー強度が高い寒天が製造可能となる。そのためオゴノリを原料とする寒天では、初めにオゴノリをアルカリで処理した後、付着したアルカリ液、貝殻などの不純物を洗浄によって除去する。洗浄したオゴノリに水を加え、オートクレーブなどにより加熱し寒天分を抽出する。抽出した寒天溶液に含まれる海藻滓やゴミ等はろ過により除去す

る。ろ液は冷却しゲル化させる。

一方、テングサを原料とする寒天では、ゼリー強度が高い寒天が得られるためアルカリ処理は行わない。テングサの洗浄からゲル化まではオゴノリとほぼ同様な製造工程である。

ゲルの脱水には圧力脱水と凍結脱水の2つの方法がある。オゴノリを原料とする寒天ゲルは圧力をかけると容易に脱水するため圧力脱水が用いられる。ろ布の中にとろてん状のゲルを入れ、圧力脱水することで薄いフィルム状となる。これを乾燥すると寒天となる。

テングサを原料とする寒天ゲルは粘性があり圧力脱水が困難なため、凍結脱水が用いられる。寒天ゲルを冷凍すると、寒天分と水分は、それぞれ別々に凍結する。凍結後、水をかけながら解凍すると、水分はかけた水と一緒に流れるが、寒天分は水に溶けず残存するため脱水が出来る。脱水した寒天ゲルを乾燥すると寒天となる。

4. 寒天の成分

寒天の主成分は多糖類である。寒天は均一な多糖類ではなく少なくとも2種類の多糖類から構成されている。それらはアガロース、アガロペクチンと呼ばれている。

寒天の凝固力の主体をなすアガロースの構造については荒木⁵⁾により詳細に研究されている。アガロースの化学構造については図4の構造式が示されている。

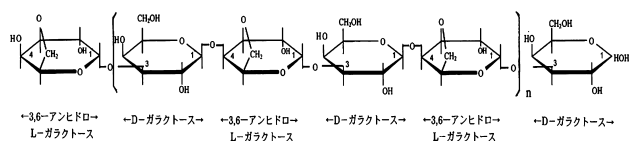


図4 アガロースの化学構造
荒木⁵⁾の化学構造式に基づき筆者が作図した。

アガロースは、C1位とC3位で結合するD-ガラクトースとC1位とC4位で結合する3,6-アンヒドロ-L-ガラクトースから成り、これら2種類の糖が交互に反復結合した中性多糖である。

アガロペクチンは、アガロースに比べ凝固力が弱い。このアガロペクチンの正確な構造は分かっておらず、アガロース以外の多糖類を漠然とアガロペクチンと称している。アガロペクチンには硫酸基、ウロン酸およびピルビ

ン酸が含まれる。⁶⁾

Yaphe ら⁷⁾は、DEAE-SephadexA50(CI⁻)クロマトグラフィーを用いて寒天を分画する試験を行っている。その結果、

- (1) 寒天は中性アガロース画分、ピルビン酸が結合したアガロース画分、硫酸ガラクトン画分(硫酸エステルを多く含む多糖類画分)から成る。
- (2) 凝固力は中性アガロース画分が一番強く、ピルビン酸が結合したアガロース画分、硫酸ガラクトン画分の順に減少する。
- (3) これらの3画分の比は、海藻の種類や生育の時期などにより変わる可能性がある。

と述べている。このような結果からYapheらは、寒天が同じ基本骨格を持ちながらも酸性基の存在量が種々の程度に異なった多糖類の複合体であると述べている。

西出ら⁸⁾は、DEAE-SephadexA50(CI⁻)クロマトグラフィーを用いて市販寒天(細菌培養用、食品化学用、生化学用)の構成多糖の分別を行なった。その結果、アガロースのような生化学用に用いられる寒天は中性アガロース画分、ピルビン酸が結合したアガロース画分が大部分を占め、硫酸ガラクトン画分は極めて少ない寒天であると述べている。

5. 寒天の物性

寒天の物性を比較する数値として、ゼリー強度、融点、凝固点等が良く用いられる。以下にこれらの数値について概説する。

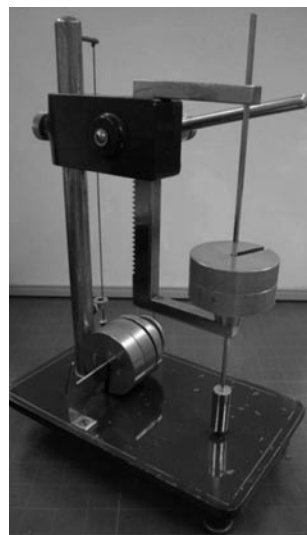


図5 日寒水式ゼリー強度測定器

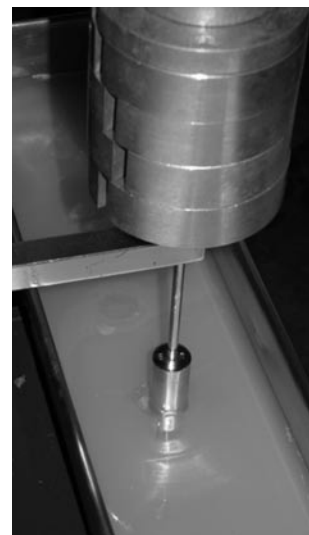


図6 ゼリー強度測定時の写真

5.1 ゼリー強度

寒天ゲルのゼリー強度の測定には、日本寒天製造水産組合が採用した日寒水式ゼリー強度測定器を用いる方法が広く使われている。この測定方法では「寒天1.5%溶液をつくり、20℃で15時間放置凝固せしめたゲルについて、その表面1cm²当り20秒間耐えうる最大重量(g)をもってゼリー強度とする」と定義される。⁹⁾

日寒水式ゼリー強度測定器の写真を図5に、ゼリー強度測定時の写真を図6に示した。底面積が1cm²のプランジャーをゲル表面に接触させ、荷重した時、20秒間耐えうる最大荷重を測定しゼリー強度(g/cm²)とする。

表2に各種寒天におけるゼリー強度の実測値の一例を示す。

表2 各種寒天のゼリー強度

	ゼリー強度(g/cm ²)
角寒天	400～500
微生物培養基用寒天	600～700
アガロース	1,000

その他のゼリー強度の測定方法として米国FMC社のgel testerという装置なども用いられている。ゼリー強度は測定する装置の違い、寒天ゲルの温度、凝固させる容器など測定条件により影響を受ける。そのためA社とB社の製品のゼリー強度の数値が同じ場合でも、測定条件の違いによってと思われるゼリー強度の差が見られる場合がある。

5.2 融点、凝固点

寒天ゲルが加熱されて溶ける温度を融点、寒天溶液が冷却されてゲル化する温度を凝固点と言う。寒天の融点や凝固点が着目されるケースとして以下のような例が挙げられる。

- (1) 缶詰のみつ豆などに使う寒天では加熱殺菌の際、寒天ゲルが溶解しないような融点の高い寒天が好まれる。
- (2) 微生物の混釈培養用に用いる寒天の場合、試験液と溶けた寒天培地を低温で混ぜた後、固化させるため凝固点の低い寒天が好まれる。

単独原藻から抽出した寒天の融点及び凝固点の一例を表3に示す。この結果を見ると、融点はマクサを原料

とした寒天の方が高く、凝固点はオゴノリを原料とした寒天の方が高いことが分かる。

表3 単独原藻から抽出した寒天の融点及び凝固点¹⁰⁾

原藻の種類	寒天濃度1.5%における温度	
	融点(℃)	凝固点(℃)
伊豆産マクサ	93	35
アルゼンチン産オゴノリ	81	44
チリ産アルカリ処理オゴノリ	86	45

融点の測定は、複雑な装置を要せず、比較的容易に再現性の高い結果が得られるという利点がある。そこで松橋¹¹⁾は寒天製造工場の品質管理の一手段として、融点測定による品質管理の実用化を検討している。そして、ある寒天製造工場の年度別製品群(細寒天)についてゲルの融点とゼリー強度の相関関係を調査した結果、同一系列の寒天製品については、ゲルの融点とゼリー強度の間に高度に有意な正の相関があったことを報告している。

6. ゲル化の仕組みと構造

Rees¹²⁾は、カラギーナンや寒天のゲル化の仕組みを図7のように説明している。寒天分子が溶解している時は、ランダムコイルの状態である(ソル)。寒天溶液を冷却すると、らせん状の構造を形成する(ゲルI)。さらに冷却すると、らせん状の分子が集合しネットワークを形成する(ゲルII)。

Rees¹²⁾は、寒天に含まれる硫酸基量の増加により二重らせんの形成が阻害されると述べている。二重らせんの形成が阻害されるとゼリー強度は弱くなる。

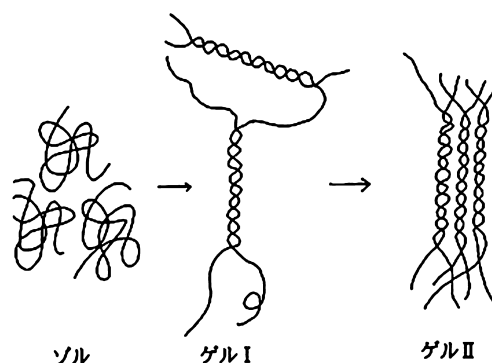


図7 ゲル化のメカニズム
Rees¹²⁾の図に基づき著者が作図した。

Arnottら¹³⁾は寒天の凝固力の主体をなすアガロースのゲル化について調査し、図8のようなアガロースゲルのネットワークの概要図を示している。

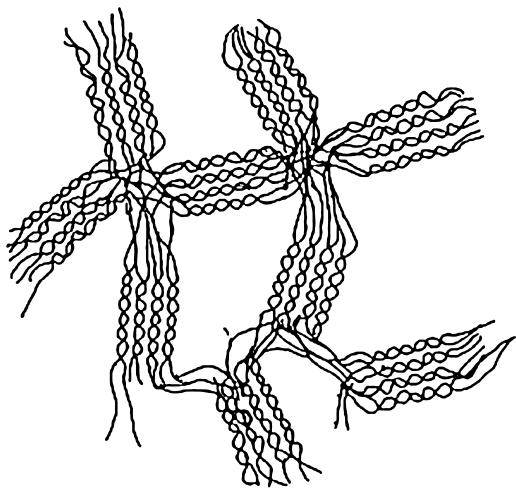


図8 アガロースゲルのネットワーク
Arnott¹³⁾の図に基づき著者が作図した。

寒天ゲルの走査電子顕微鏡写真を図9に示した。白く繊維状の網目構造をとっている部分が寒天分子の集合体である。きれいな寒天分子のネットワークが形成されている。この網目構造の中に水を蓄えと考えられる。

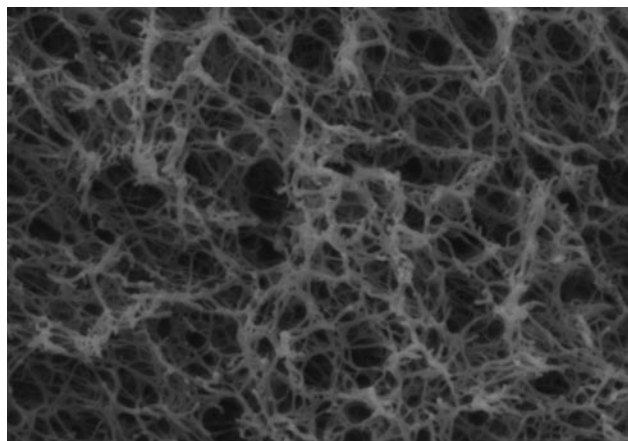


図9 寒天ゲルの走査電子顕微鏡写真(観察倍率 20,000倍)

図9の状態の寒天ゲルはしっかりとした弾力性が見られるが、この寒天ゲルをpH3.7の液に浸漬し35℃で3ヶ月保存すると、もろく崩れ易いゲルに変化していた。この変化後のゲルの走査電子顕微鏡写真を図10に示す。図9では寒天分子のきれいなネットワークが見られたが、図10では繊維状の網目構造が傷み、壊れた状態に見える。酸性、高温下に保存されたことにより寒天の分子のネットワークが変化したことが分かる。

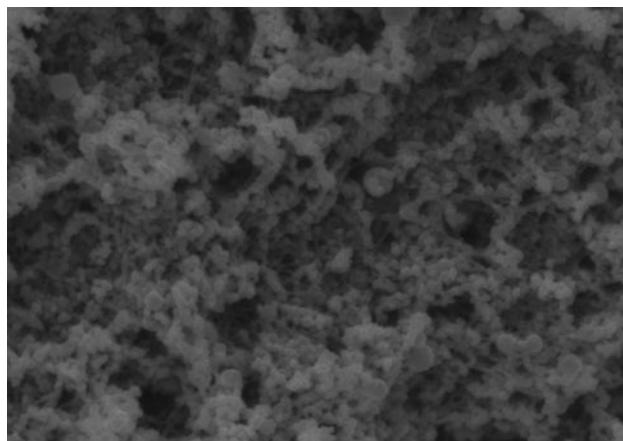


図10 劣化した寒天ゲルの走査電子顕微鏡写真(観察倍率20,000倍)

7. 電気泳動用アガロース

寒天を高度に精製しアガロペクチン分を除いたものをアガロースという。アガロースは核酸やタンパク質等を分離する電気泳動の支持体として用いられている。

7.1 電気泳動の原理

電解液を含むアガロースゲルに電圧をかけると、その中に電荷を持った物質があった場合、電気泳動により電荷を持った物質は(+)極側または(-)極側へと移動する。DNAを例として挙げると、DNAはりん酸基により中性～塩基性の緩衝液中では「-」の電荷を帯びているため、アガロースゲルの網目構造の中を(+)極側へと移動する。アガロースゲルの網目構造の中を移動する際、分子量の大きな分子は網目に引っかかりながら進むため移動速度が遅い。一方、分子量の小さい分子はあまり網目に引っかからず進むので相対的に移動速度が速くなる。この移動速度の差によりDNAを分子量によって分離することができる(図11)。

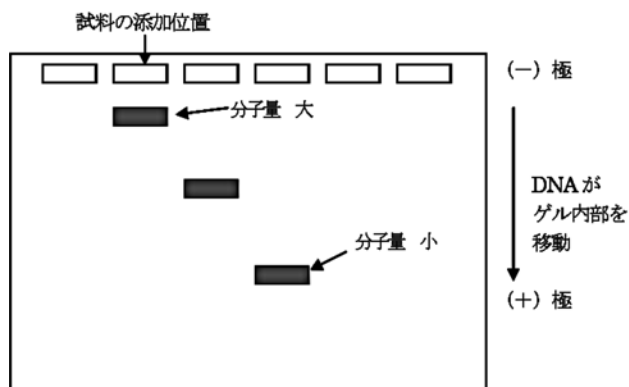


図11 電気泳動の原理

7.2 アガロースの品質

アガロースの品質は硫酸基量、電気浸透度、ゼリー強度の値などが指標となる。これらの値の違いにより電気泳動における分離が変化する。硫酸基量、電気浸透度の値が少ないアガロースほど精製度が高いとされている。目的とするDNAのバンドが1つのみであり、その有無をチェックする場合ならば精製度の低いアガロースでも差し支えないだろう。しかし、分子量の近いDNAを分離することが目的の場合、より精製度の高いアガロースを用いた方が分離能も高く好ましい。各項目の指標となる値を以下に挙げる。

7.2.1 硫酸基量

寒天はアガロースとアガロペクチンからなる。アガロースは精製されアガロペクチン分は極力除去してあるが、その精製度は製品によって異なる。硫酸基量を測定することでアガロペクチンがどれだけ残存するかが分かりアガロースの精製度の目安となる。

硫酸基量の測定は種々の原理に基づいて多くの方法が試みられている。Dodgson-Priceの比濁法¹⁴⁾、イオンクロマトグラフィーによる方法¹⁵⁾、フラスコ燃焼法による西出らの方法¹⁶⁾などがある。方法の多くはアガロース等の試料に酸を加えて高温で加水分解する前処理が必要であるが、フラスコ燃焼法は試料の加水分解の必要もなく非常に短時間で測定が出来るという利点がある。

精製度の低い寒天の硫酸基量は2～3%であるのに対し、電気泳動用アガロースで精製度の高いものの硫酸基量は0.1%以下である。

7.2.2 電気浸透度

電気泳動の際、電圧をかけると(+)極又は(-)極側に液体が移動する現象を電気浸透といい、その移動度を電気浸透度という。DNAは通常(+)極方向へ移動するため、(-)極方向への電気浸透があると内部対流によりDNAの移動や分離を妨げることになる。従って電気泳動を行う上で電気浸透度は低いほうが良い。

電気泳動を行なう際、アガロースに硫酸基等の負電荷の解離基が含まれていると、緩衝液中で正の電荷を帯びた対イオンを誘導する。そのため(-)極方向への電気浸透現象を起こして目的成分の電気泳動を妨げる。

電気浸透度の測定は、測定するアガロースゲルの中

央部にアルブミンとデキストランを添加し通電させ電気泳動後、染色を行ない、アルブミンおよびデキストランの各々の移動距離(それぞれaおよびb mm)を測定し、下記の式に従って電気浸透度(-Mr)を求める。

$$-Mr=b/(a+b)$$

市販アガロースの電気浸透度の規格を調べたところ、低電気浸透度のアガロースの-Mrはおおよそ0.05~0.13であった。

7.2.3 ゼリー強度

電気泳動の際に用いるアガロースゲルは、ゲルの状態で1,000g/cm²程度のゼリー強度のものが好ましい。ゼリー強度が1,000g/cm²以上あればゲルを取り扱う際に壊れにくい。電気泳動では、アガロースの濃度によりゲル内の網目のサイズが変わるため、目的とするDNAのサイズに応じ、アガロースの濃度を変える必要がある。表4に参考値を記した。

表4 アガロースゲルの濃度と分離するDNAのサイズ(bp)¹⁷⁾

アガロースゲルの濃度 (%)	分離するDNAのサイズ (bp)
0.7	800～10,000
0.9	500 ～ 7,000
1.2	400 ～ 6,000
1.5	200 ～ 3,000
2.0	100 ～ 2,000

分子量の大きなDNAを分離する際は、アガロースの濃度を低くして網目のサイズを大きくする。この際、濃度1.5%で2,000g/cm²以上のようなゼリー強度の高いアガロースを用いれば、0.5%といった低濃度でも1,000g/cm²程度のゼリー強度が得られる。このようなアガロースは高ゲル強度、高分子量核酸の分離用と称して販売されている。

一方、分子量の小さなDNAを分離する際は、アガロースゲルの濃度を高くして網目のサイズを小さくして使用する。ゼリー強度が低いアガロースであれば2～4%のような高い濃度でも比較的溶解しやすくゲルの調製が行える。このようなアガロースは短フラグメント用、低分子核酸の分離用と称して販売されている。

7.3 アガロースの品質と分離能

精製度の異なる二種類のアガロースを用い、DNAの分離度に与える影響を確認した。精製度は試料Aに比べ試料Bの方が高い(表5)。両試料を用いて、各々アガロースゲルを作成し、同一条件下で電気泳動を行なった。その結果を図12に示す。

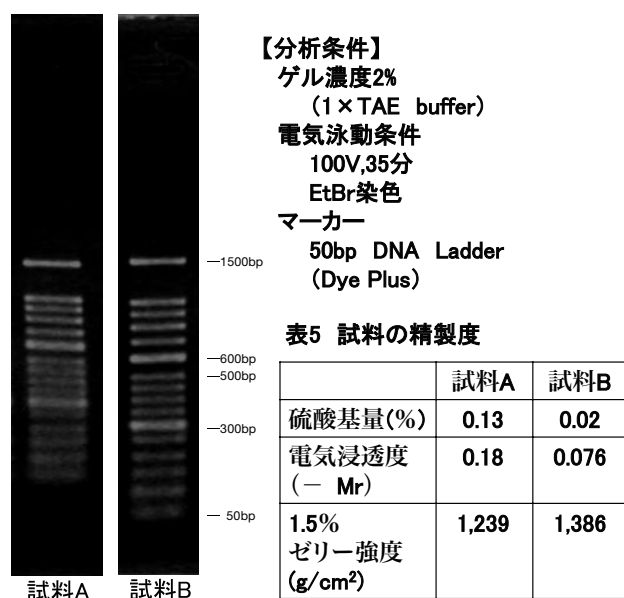


図12 精製度の違いによる分離能の違い

試料Aでは600bp～1,500bpのバンドは分離しているが50bp～500bpについてはDNAのバンドとバンドの間隔が狭く、分離がやや不明瞭であった。一方、試料Bは試料Aに比べ泳動速度が早く、50～1,500bpの全域にわたる16本のバンドがきれいに分離された。分子量の近いDNAを電気泳動する場合、精製度の高いアガロースを用いた方が良好な分離結果を得られる。

8. 終わりに

株式会社 鈴与総合研究所及び清水食品株式会社は静岡県を中心に事業を営んでいる鈴与グループに属している。清水食品株式会社 寒天事業部は、前身の大洋寒天の時代から寒天を生産している。本稿で述べたように、寒天は天然物の海藻を原料としており、その原料や製法により品質が左右される。しかし、清水食品株式会社 寒天事業部では品質が良く、ロット間差の少ない寒天の安定供給を目指し努めてきた。そして多くのお客様にご満足いただける製品を提供できるものと考え

る。広くご利用いただければ幸いである。

最後に寒天の分析など様々なご指導をしていただいた元日本大学教授 西出英一先生に深く感謝を申し上げます。

参考文献

- 1) 柳川鐵之助, 日水誌, **10**, 163-165 (1941).
- 2) 舟木好右衛門、小島良夫, 日水誌, **16**, 401-404 (1951).
- 3) 小島良夫、舟木好右衛門, 日水誌, **16**, 405-422 (1951).
- 4) 小島良夫、日下部重朗、舟木好右衛門, 日水誌, **18**, 245-248 (1952).
- 5) C. Araki, Bull. Chem. Soc. Japan., **29**, 543-544 (1956).
- 6) 林金雄、岡崎彰夫, 寒天ハンドブック. 255 光琳書院 (1970).
- 7) M. Duckworth, W. Yaphe, The Structure of Agar. Carbohydr. Res., **16**, 189-197 (1971).
- 8) 西出英一、奈村久士、安斉寛、内田直行, Bull. Coll. Agr. and Vet. Med., Nihon Univ., **53**, 62-64 (1996).
- 9) 林金雄、岡崎彰夫, 寒天ハンドブック. 333 光琳書院 (1970).
- 10) 原田篤也、三崎旭, 総合多糖類科学(下). 571-572 講談社 (1974).
- 11) 松橋鉄治郎, 日食工誌, **16**, 520-522 (1969).
- 12) D. A. Rees, Advan. Carbohydr. Chem. Biochem., **24**, 267-332 (1969).
- 13) S. Arnott, A. Fulmer, W.E. Scott, J. Mol. Biol., **90**, 269-284 (1974).
- 14) K. S. Dodgson, R. G. Price, Biochem. J., **84**, 106-110 (1962).
- 15) 鈴木寿、加島隆洋、澤井美伯, 岐阜県製剤技術研究所研究報告, **7**, 110-113 (2006).
- 16) 西出英一、伊東基彦、安斉寛、内田直行, Bull. Coll. Agr. and Vet. Med., Nihon Univ., **45**, 71-73 (1988).
- 17) J. Sambrook, D. Russell, Molecular Cloning A Laboratory Manual (3rd ed.), **1**, 5.4-5.13 (2001).