

# 麹菌 *Aspergillus oryzae* Cohnの遺伝学的研究 : VI アミラーゼの生産に関する遺伝的研究

著者	瀬嵐 哲夫
著者別表示	Searashi Tetsuo
雑誌名	金沢大学教育学部紀要. 自然科学編
巻	12
ページ	7-30
発行年	1964-02-15
URL	<a href="http://doi.org/10.24517/00005215">http://doi.org/10.24517/00005215</a>



# 麴菌 *Aspergillus oryzae* Cohn の遺伝学的研究

瀬 嵐 哲 夫

## VI アミラーゼの生産に関する遺伝的研究

### 緒 言

澱粉分解酵素 Amylase は、生物体内の代謝中主要な酵素系の1にあげられているが、特にコウジカビ *Aspergillus oryzae* は酒類の発酵工業やタカジヤスターゼの製産等応用方面でも重要である。

アミラーゼ研究の多くは、従来微生物とくにコウジカビを材料として酵素学的に行われ、現在も複合酵素系としてのアミラーゼを構成している酵素の種類・その組成によるアミラーゼ活性の差異等についての諸報告があるが、アミラーゼ系の複雑さ多様さのため不明の点も又多い。そこで、従来のアミラーゼ研究とその趣きを異にし、近時他の2・3の酵素系で華々しい成果をあげている遺伝生化学的手法を用いてアミラーゼの遺伝的支配を明らかにし、更にこの酵素蛋白の生合成、代謝の微細機構解明の足がかりをうる意図をもって着手された。

アミラーゼの遺伝学的、遺伝生化学的研究としては、松村(1929, '34, '36, '48, )、吉川('50)、黒田('51, '54)によってカイコ *Bombyx mori* で、又阿部('58)、吉川・阿部('60)、吉川('60)によってショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* で、いづれも昆虫を材料として行われている。しかし微生物を材料とするこの様な試みはない。

*Asp. oryzae* は子のう菌類に属しているが、アオカビ *Penicillium* 類と同様にその生活史に有性生殖が見当らず、もっぱら無性的な分生胞子によって繁殖するので、遺伝的分析は不可能であった。しかし、Pontecorvo et al ('54) が子のう形成を行う *Asp. nidulans* で有性生殖とは別個に parasexual cycle (準有性生殖) を実験的に生起せしめ、続いて Pontecorvo.

Sermonti('54)が *Penicillium chrysogenum* で、石谷、池田、坂口('56)が *Asp. sojae* で、瀬嵐('57 III, IV)が *Asp. oryzae* でそれぞれ準有性生殖の存在を立証するに及んで、ここに不完全菌の遺伝学研究の途が開かれた。

この報告は、準有性生殖を通して、すなわち多数のアミラーゼ突然変異株を2株づつ組合せて合成された balanced heterocaryons (平衡異核混合体)、heterozygous diploids (ヘテロ2倍体)を用いて、アミラーゼ突然変異遺伝子の allele (対立性)の相互関係を調べ、アミラーゼ生産に関する遺伝子の支配を知るのを目的として行われたものである。

### 材 料 と 方 法

菌株：野生株N6は、東大、応用微生物研究所の飯塚氏の同定によって *Asp. oryzae* 標準株とされた菌株で、この研究に使用されたアミラーゼ、栄養要求、胞子色についての突然変異株はすべてこの株から由来された。

培地：詳細は瀬嵐('57 I)に述べてある通りで、最少培地(MM)は Czapek 培地を修正し、NaNO<sub>3</sub> 2.4gm, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 0.6gm, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.0gm, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5gm, HCl 0.5gm, glucose 20.0gm, 痕跡要素液1.0ml, 水 1000mlで、PHは6.5にして用いた。完全培地(CM)はMM 1000mlにイースト抽出物、カゼイン加水分解物を夫々 10g 添加した。

アミラーゼ活性の測定：アミラーゼ活性は常に糊精化力 Dextrinizing power(D.P.)と糖化力 Saccharifying Power(S.P.)の両方の値が示された。糊精化力(D.P.)の方は Wohlgenuth(1908)の変法(萩原'54)を採用し、1%澱粉液 5ml, m/10 醋酸緩衝液(P.H.4.0) 4ml, 酵素液(ポーリング10°の麦芽汁で30°C, 4日間の培養濾液) 1ml——以上の混合液を40°Cで作用させ、経時的に反応液の少量を採り、ヨ

ード呈色が変色時間のもっとも短い赤色に到達するまでの時間を測定し、10分間に一定基準色赤に達せしめる酵素力を1単位とした。糖化力 (S.P.) の測定は、0.55%澱粉の緩衝液 9 ml と酵素液 1 ml の混合液を40°C, 30 分間反応させ、反応前後の還元力の差を求めた。還元糖の定量は Somogyi 変法 (Somogyi '52) を用いて行ない、糖化力の値は m/10 チオ硫酸ソーダの滴定数から30分間で10mg のブドウ糖を生じせしめる力を1単位とした。

しかし上述の方法は、きわめて多数の株を取扱うこの様な遺伝的研究には適当ではないので次の簡便法を考案した。その D.P. 測定法 “Agar iodine method” は、Fig 1 に示す様に 9 cm 直径のペトリ皿に 2% 寒天

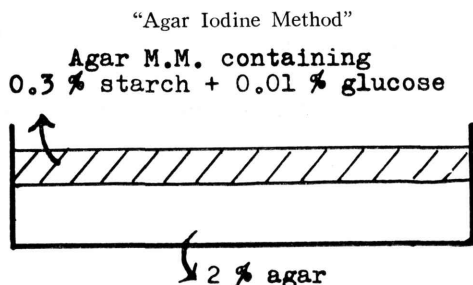


Fig.1. The scheme for determination of amylase activity (dextrinizing power) by iodine reaction on the agar surface with growing colony.

液を注いで基底にし、その上に 0.3% 澱粉と 0.01% ブドウ糖を含む MM 寒天 (栄養要求株の場合は要求物質を添加) 10ml を注いで一定の厚さに固ませた後、孢子をその上に接種する。35°C で 20~30 時間培養後、稀薄ヨード液を寒天培地の表面に流して呈色させると、発育したコロニーのまわりは糖化されてヨードに対して無反応な halo (透明円) を生ずる (Photo. 1)。

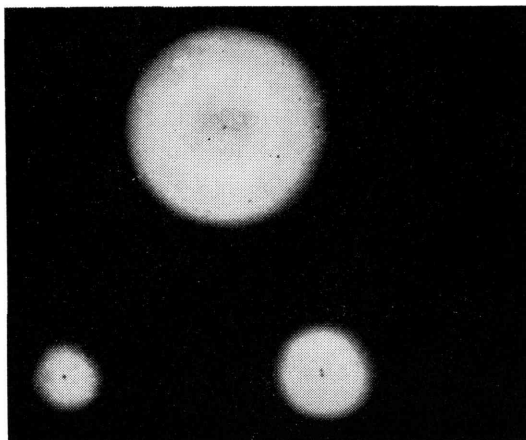


Photo. 1. Transparent halos correlating with growing of colony by mean of “Agar iodine method”. 3 days after. x1.

upper ...wild N.6 normal amylase production  
lower right...No.8(*ae*<sup>8</sup>) slight amylase production  
lower left...No.4(*ae*<sup>4</sup>) negative amylase production  
The growth of amylase mutants (*ae*<sup>8</sup>, *ae*<sup>4</sup>) do not decrease within two days against that of wild N6.

寒天培地中の澱粉量は、ハローの直径が大きくなる様に稀薄で、しかも出来るだけ明瞭なヨード呈色をする程度の濃度にし、ブドウ糖の方は、アミラーゼ突然変異株の生育が少くとも 2 日以内では正常な生育を示す程度に稀薄な濃度を採用した。Fig. 2 でみられる様に、

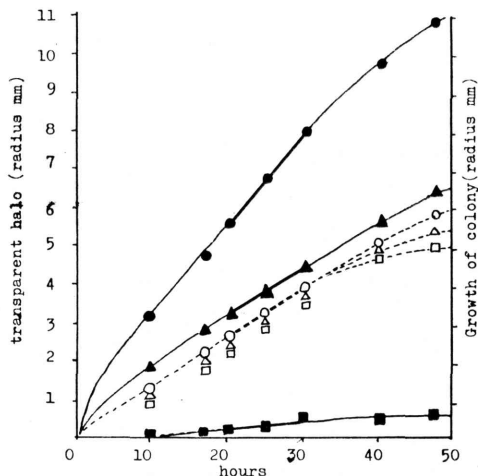


Fig.2. Radius curves of the halo and the colony correlating with the growth of the hyphae.

- wild N.6. radius of halo —●—
- radius of colony —○—
- No.4(*ae*<sup>4</sup>) radius of halo —■—
- radius of colony —□—
- No.8(*ae*<sup>8</sup>) radius of halo —▲—
- radius of colony —△—

Medium : M.M. agar consisted of 0.3% starch + 0.01% glucose. Incubation: at 35°C.

Radii of the colony and the halo increase at a constant rate between at least 20 and 30 hours.

コロニーとハローが直線的にしかも一定比率 (N 6 は 2.00) で増大してゆく 20~30 時間の間で測定し、D. P. を、生成したハローとコロニーの半径の比で表わした。この方法によると、1 ペトリ皿に 9~12 株を同時に接種して D.P. の測定が出来る。S.P. は澱粉を含む培

地での生長度で表わした。この研究の全コースにわたってアミラーゼの測定は主としてこれらの簡便法で行われた。

**実験結果**

アミラーゼその他の突然変異の誘発：突然変異誘発方法の詳細は以前の報告（'57 I）に述べてある。孢子懸濁液は生存率が5%になる

様な紫外線量で照射された。

1 アミラーゼ突然変異 filtration-concentration technique 濾過濃縮法(Lein et al '48, Woodward et al '52, '54)を採用し、MM液には炭素源として澱粉又は Amylopectin を入れ、選択的に多数のアミラーゼ欠突然変異株をえた (Table I)。

Table 1 Origin and frequency of amylase mutants

No. of expt.	Amylase mutants	Parent strains	Frequency of amy. mutants*		Further markers** added
			No. of amy. mutants	No. of colonies tested	
1	<i>ae</i> 1	wild N6.	3	26	<i>cys/me</i>
2	<i>ae</i> 2	wild N6.	2	18	<i>thi</i> 1
3	<i>ae</i> 3	wild N6.	1	21	<i>cys</i> 1
4	<i>ae</i> 4	wild N6.	3	23	<i>prol</i> 1
5	<i>ae</i> 5	<i>lys</i> 1	1	13	
6	<i>ae</i> 6	wild N6.	3	6	<i>arg</i> 1
7	<i>ae</i> 7	wild N6.	2	20	<i>arg</i> 2
8	<i>ae</i> 8	<i>arg</i> 3	4	10	
9	<i>ae</i> 9	wild N6.	4	45	<i>prol/arg</i>
10	<i>ae</i> 10	wild N6.	2	61	<i>try</i>
11	<i>ae</i> 11	wild N6.	3	18	<i>pan</i>
12	<i>ae</i> 12	wild N6.	1	10	<i>me</i> 1
13	<i>ae</i> 13	wild N6.	2	6	
14	<i>ae</i> 14	wild N6.	4	32	<i>thi</i> 3
15	<i>ae</i> 15	wild N6.	6	15	<i>lys</i> 2 <i>leu</i> <i>ad</i> 1
16	<i>ae</i> 16	wild N6.	1	7	<i>me</i> 2
17	<i>ae</i> 17	wild N6.	3	24	<i>his</i> 1 <i>ad</i> 2
18	<i>ae</i> 18	wild N6.	18	52	<i>prol</i> 2
19	<i>ae</i> 19	wild N6.	16	25	<i>lys</i> 3
20	<i>ae</i> 20	wild N6.	4	30	<i>nic</i> 1
21	<i>ae</i> 21	wild N6.	15	67	<i>me</i> 3 <i>prol</i> 3
22	<i>ae</i> 22	wild N6.	12	58	<i>his</i> 2 <i>lys</i> 4
23	<i>ae</i> 23	<i>ad</i> 3	2	6	
24	<i>ae</i> 24	wild N6.	7	61	<i>his</i> 3
25	<i>ae</i> 25	wild N6.	4	27	<i>lys</i> 5
Total	25		113	675	
Average			4.5	27	

\* The figures showed the tested number giving rise to grow by plating after filtration.

In the case of *ae* 1—*ae* 14, starch was used as a carbon source during the filtration procedure. In the case of *ae* 15—*ae* 25, amylopectin was used.

\*\* Each amylase mutant was further marked by conidial color (*w*, *y* and *b*) besides its requirement.

先ず 10ml の被照射胞子懸濁液 ( $2 \times 10^7/1ml$ ) を、澱粉 (表中の破線から上の実験) 又は Amylopectin (破線下の実験) を炭素源とした MM 液 90ml の入った 300ml 容三角瓶に注入し、35°C で培養する。適当な時間の間隔をおいて濾過し、発芽胞子を除去し続けて、もはや発芽しなくなったら CM 培地にプレイトし、澱粉や Amylopectin では発芽できなくて濾液中に残った胞子を発育させる。発生してきたコロニーは、それぞれ、ブドウ糖を含む MM と澱粉を含む MM に接種してみて、後者にだけ生育しない株をアミラーゼ突然変異株として分離した。濾過後 CM で発生するコロニー中、5.1 に 1 ケの高頻度で多数うる事が出来た。同

一突然変異株を 2 回以上分離するのを防ぐために、各回毎に 1 ケだけ取って残りは捨てた。従って、25 回で 25 株を独立にえて以後の実験に用いた。各アミラーゼ突然変異株は更に胞子色と栄養要求性のマークを付け二重又は三重突然変異株にした。

2 栄養要求突然変異 紫外線照射・濾過法を経て CM に発育してくるコロニー 40 ケに 5 ケの割合でえられた。

3 胞子色突然変異 紫外線照射後の生存率 0.37% で、白色:黄色:褐色の発生率は 2.30:1.15:1 の割合であった。

アミラーゼ突然変異株・正常株のアミラーゼ活性の測定: Table 2 に示す様に

Table 2 Characteristics of the amylase deficiency mutants and other mutants employed in this research.

Amylase mutant				Amylase activity	
Code No.	*Strain	symbol		Dextrinizing power by "agar iodine method". radius (mm) (halo / colony)	Saccharifying power growth on starch
No. 1	<i>w, y</i>	<i>cys/me</i>	<i>ae</i> 1	± / 4	- or slender
2	<i>w, y</i>	<i>thi</i> 1	<i>ae</i> 2	± / 3.5	- or slender
3	<i>w, y</i>	<i>cys</i> 1	<i>ae</i> 3	± / 4	- or slender
4	<i>y</i>	<i>prol</i> 1	<i>ae</i> 4	± / 3.5	- or slender
5	<i>w, y, b</i>	<i>lys</i> 1	<i>ae</i> 5	7.5 / 3.5(2.14)	- or slender
6	<i>w, y</i>	<i>arg</i> 1	<i>ae</i> 6	± / 3	- or slender
7	<i>w</i>	<i>arg</i> 2	<i>ae</i> 7	± / 3.8	- or slender
8	<i>w, y, b</i>	<i>arg</i> 3	<i>ae</i> 8	4.5 / 4(1.12)	±
9	<i>w</i>	<i>prol/arg</i>	<i>ae</i> 9	± / 3.5	- or slender
10	<i>w, y</i>	<i>try</i>	<i>ae</i> 10	+ / 4	±?
11	<i>w</i>	<i>pan</i>	<i>ae</i> 11	± / 4	- or slender
12	<i>w, b</i>	<i>me</i> 1	<i>ae</i> 12	± / 3.8	- or slender
13	<i>y, yb</i>	<i>thi</i> 2	<i>ae</i> 13	± / 3.5	- or slender
14	<i>w</i>	<i>thi</i> 3	<i>ae</i> 14	± / 3	- or slender
15	<i>w, y</i>	<i>lys</i> 2	<i>ae</i> 15	± / 3.2	- or slender
	<i>w, y, b</i>	<i>leu</i>			
	<i>w, y, b</i>	<i>ad</i> 1			
16	<i>y</i>	<i>me</i> 2	<i>ae</i> 16	± / 4	- or slender
17	<i>w, y</i>	<i>his</i> 1	<i>ae</i> 17	± / 3.2	- or slender

	<i>w</i>	<i>ad</i> 2					
18	<i>w, y</i>	<i>prol</i> 2	<i>ae</i> 18	±	/	3.5	- or slender
19	<i>w</i>	<i>lys</i> 3	<i>ae</i> 19	±	/	4	- or slender
20	<i>w, y</i>	<i>nic</i> 1	<i>ae</i> 20	±	/	3.3	- or slender
21	<i>w</i>	<i>me</i> 3	<i>ae</i> 21	±	/	4	- or slender
	<i>y</i>	<i>prol</i> 3					
22	<i>w</i>	<i>his</i> 2	<i>ae</i> 22	±	/	4	- or slender
	<i>y</i>	<i>lys</i> 4					
23	<i>w, y, b</i>	<i>ad</i> 3	<i>ae</i> 23	±	/	3.5	- or slender
24	<i>w, y</i>	<i>his</i> 3	<i>ae</i> 24	±	/	3.8	- or slender
25	<i>w</i>	<i>lys</i> 5	<i>ae</i> 25	±	/	4	- or slender
Amylase							
	normal mutant						
No. 1	<i>w, y, b</i>	<i>me</i> 4		8.2	/	4 (2.05)	+
2	<i>w</i>	<i>me</i> 4	<i>his</i> 4				
3	<i>w, y</i>	<i>his</i> 5		8.5	/	4 (2.13)	+
4	<i>y</i>	<i>his</i> 5	<i>nic</i> 2				
5	<i>w, wy</i>	<i>his</i> 5	<i>prol</i> 4				
6	<i>y, b</i>	<i>arg</i> 4		7	/	3 (2.33)	+
7	<i>b</i>	<i>me</i> 5		7	/	3 (2.33)	+
8	<i>w</i>	<i>cys</i> 2		8.5	/	4 (2.13)	+
9	<i>w</i>	<i>cys</i> 2	<i>lys</i> 6				
10	<i>w, y</i>	<i>arg</i> 3		7.5	/	3.5(2.14)	+
11	<i>lg</i>	<i>me</i> 6		5.5	/	2.5(2.20)	+
12	<i>w</i>	<i>me</i> 7		8	/	2.5(2.28)	+
13	<i>w, y, b</i>	<i>lys</i> 1		6.0	/	3 (2.0)	+
14	<i>w</i>	<i>lys</i> 1	<i>me</i> 8				
15	<i>w</i>	<i>lys</i> 1	<i>his</i> 6				
16	<i>w, y</i>	<i>thi</i> 2		8	/	4 (2.0)	+
17	<i>w, y</i>	<i>ad</i> 3		7.5	/	3.2(2.25)	+

\* Strain symbols represent as follow : *w*=white conidium in color ; *y*=yellow conidium in color ; *b*=brown conidium in color ; *cys/me*=cystine or methionine requirement ; *thi*=thiamine ; *prol*=proline ; *lys*=lysine ; *arg*=arginine ; *try*=tryptophan ; *pan*=pantothenate ; *leu*=leucine ; *ad*=adenine ; *his*=histidine ; *nic*=nicotinic acid ; *ae*=absence of amylase production.

\*\* ±symbol represent that radius of halo is shorter than that of colony.

アミラーゼ突然変異株の活性力は全くないか或いは痕跡的であって、Agar iodine 法では発育したコロニーの接種点付近に僅かにハローを生ずるだけであり、土で表わす。澱粉培地上の生育も全然ないか又は細い菌糸を僅かに生ずるにすぎない。常法のD.P., S.P.の測定にもほとんどかかって来ない (Table 4)。

これらアミラーゼ突然変異株のうち、特異なアミラーゼ力をもつ3株がある。No. 5 (*lys*

*ae*<sup>5</sup>) では、S.P. は微弱で他のアミラーゼ突然変異株と同様に澱粉培地上では痕跡的な生育しかしないが、D.P.の方は野生型に近い株である。No. 8 (*arg ae*<sup>8</sup>) とNo.10 (*try ae*<sup>10</sup>) は減退したアミラーゼ活性力を有する。

野生株から誘発された栄養要求、又は要求と孢子色の突然変異株は、heterocaryons・heterozygous diploidsの構成株の一部として用いられているが、勿論アミラーゼ力につい

ては正常である (Table 2, 4)。

次に、アミラーゼ突然変異株 No. 4 (*ae*<sup>4</sup>) が澱粉又はブドウ糖を含むMM液体培地中で野生株N6に較べて、どのような生育度を示すかは、Fig 3 にあげてある。すなわち、ブドウ糖では

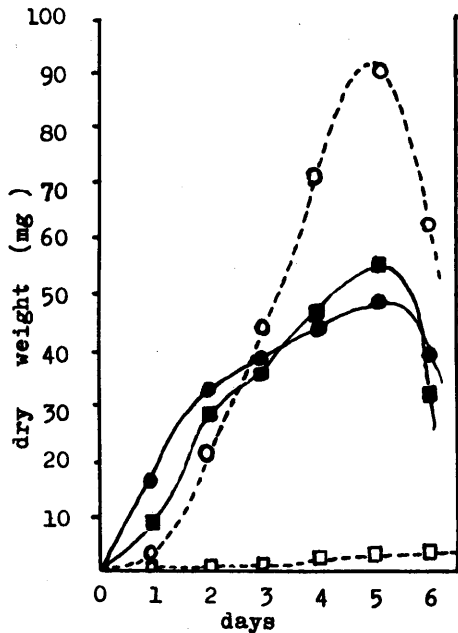


Fig. 3. Comparison of growth (dry weight) in starch medium and in glucose medium by wild strain (N.6) and amylose mutant (*ae*<sup>4</sup>). The culture were done, at 35°C, in 200 ml Erlenmeyer flasks of 50 ml of M.M. supplemented with 2% starch or 2% glucose as a C source.

wild N.6 in glucose medium —●—  
           in starch medium     ○·····  
*ae*<sup>4</sup>     in glucose medium —■—  
           in starch medium     □·····

Values averages of triplicate flasks.

両株ともに同じ生育であるが、澱粉ではNo. 4 (*ae*<sup>4</sup>) は培養6日後でも明瞭な生育はない。なおN6の澱粉での生育は3日まではおとるが、以後急激に発育し5日でピークに達する。

Balanced heterocaryons・heterozygous diploids の合成： heterocaryon, heterozygous diploid の作り方については瀬嵐('57 III, IV) の報告がある。

変異した遺伝子間の優劣関係, Allelism (対

立性)を知るために、Table 2 にあげたアミラーゼ突然変異株とアミラーゼ正常株の間、又はアミラーゼ変異株間で種々組合せて balanced heterocaryons, さらに heterozygous diploids を合成した。balanced heterocaryon を容易にしかも確実に分離し、又この異核が同一細胞内に混在する状態を維持し同じ核ばかりになった細胞は自動的に消滅してゆく様にするために、組合せる2つの菌株はそれぞれアミラーゼ形質のほかに劣性形質の孢子色と栄養要求が互いは異なり non-allelic (非対立性) な間で合成された。*Asp. oryzae* では balanced heterocaryon の孢子色は孢子内の核によらず分生子柄等の細胞の影響をうけて、non-autonomous (Pontecorvo '47) であるから、それらの細胞内の異核の比率によって野性色の緑色から両構成株の色まで種々の中間色であり、栄養要求は同一細胞内の要求性異核が互いに補い合って prototroph (非要求性) になり MM に生育出来る。heterocaryon であることの確認は、その菌糸片を経続的に MM 上に移植しても上述の性状をもち続けて生育することと、heterocaryon 上に生じた孢子子を CM 上にプレイトすると異核混在状態が解体して両構成株の色・要求をもつコロニーが出現することで判定された。

更に、これらの balanced heterocaryon から選択的に heterozygous diploid をえた。heterocaryon の菌糸細胞内に混在している異核は、 $10^{-7}$ ~ $10^{-8}$  のごく低率で無性的に融合して倍数体核を形成 (瀬嵐 '57 IV) するので、heterocaryon 孢子懸濁液を MM にプレイトして発生する多数のコロニーの中から緑色のコロニーを探し出す。時には heterocaryon のコロニー中に緑色の sector (扇形) として分離することがある。heterozygous diploid は孢子色が一樣に緑色で栄養要求は prototroph であるから構成株や heterocaryon と区別でき、又、野生株とはきわめて低率であるが色、要求についての vegetative segregants (無

Table 3 Amylase activity of heterocaryons and heterozygous diploids.

No. tested heterocaryons	No. tested heterozygous diploids	Tested combinations		Amylase activity					
				Dextrinizing power by "agar iodine method" radius(mm)	Saccharifying power growth on starch				
					Heterocaryons	Diploids			
<u>Combinations between <i>ae</i> / normal (Genotype)</u>				(halo / colony)					
* Amylase mutant + Amylase normal mutant									
17	13	<i>ae</i> 5	+	No. 1	-	No. 17			
17	10	<i>ae</i> 8	+	No. 1	-	No. 17			
17	15	<i>ae</i> 13	+	No. 1	-	No. 17			
17	7	<i>ae</i> 15	+	No. 1	-	No. 17			
68	45				(1.96 - 2.34)		± - +		+
				almost the same as wild type					
<u>Combinations between <i>ae/ae</i> (Genotype)</u>									
Amylase mutant + Amylase mutant									
9	6	<i>ae</i> 1	+	ae 2,3,4,6,7,9,10,11,12		± / 3-4		- or slender	- or slender
8	2	<i>ae</i> 2	+	ae 3,4,6,7,9,10,11,12		± / 3-4		- or slender	- or slender
7	4	<i>ae</i> 3	+	ae 4,6,7,9,10,11,12		± / 3-4		- or slender	- or slender
6	1	<i>ae</i> 4	+	ae 6,7,9,10,11,12		± / 3-4		- or slender	- or slender
24	24	<i>ae</i> 5	+	ae 1,2,3,4,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25		5.7 / 3(1.90)		± - +	+
5	1	<i>ae</i> 6	+	ae 7,9,10,11,12		± / 3-4		- or slender	- or slender
4	1	<i>ae</i> 7	+	ae 9,10,11,12		± / 3-4		- or slender	- or slender
10	8	<i>ae</i> 8	+	ae 1,2,3,4,6,7,9,10,11,12		± / 3-4		- or slender	- or slender
3	1	<i>ae</i> 9	+	ae 10,11,12		± / 3-4		- or slender	- or slender
2	0	<i>ae</i> 10	+	ae 11,12		± / 3-4		- or slender	- or slender
1	1	<i>ae</i> 11	+	ae 12		± / 3		- or slender	- or slender
23	20	<i>ae</i> 13	+	ae 1,2,3,4,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19		± / 3-4		- or slender	- or slender
102	69				ae 20,21,22,23,24,25	± / 3-4		- or slender	- or slender
				ae 18	3 / 2.5(1.20)		± ?		± ?
				ae 19	3 / 2.5(1.20)		± ?		± ?

\* Balanced heterocaryons and heterozygous diploids were synthesized between two multiple mutants which differ from each other in both color and in nutritional requirement. In this table, however, component strains were represented by only symbols concerning the amylase genes (*ae*).



性的分離株)を生ずることで区別出来る。

allelism のテスト :

各突然変異株と正常株間, 又は突然変異株間で作られた heterocaryons・heterozygous diploids のアミラーゼ活性の有無によって判定された。

1 *ae/+* のアミラーゼ活性

Table 2 のリストにあげてあるアミラーゼ欠突然変異株25株と, アミラーゼ活性は正常であるが色・要求についての突然変異株17株との間

で, Table 3 で示す様に組合せて合成された balanced heterocaryons 68株と, heterozygous diploids 45株のアミラーゼ活性はすべて正常株と同じ程度である。

従って, アミラーゼ突然変異遺伝子は正常に対して劣性である。

正常株間で作られた diploids は haploid の野生株とほぼ等しい活性を示す (Table 4 の D44)。

Table 4 Amylase activities in submerged culture by heterozygous diploids compared with those of components and wild strain.

Ploidy	Strain	Saccharifying power (S) (unit)	Dextrinizing power (D) (unit)	S / D	*Dextrinizing power by Agar iodine method halo / colony (radius mm)
Haploid	wild N6.	3.52	2.60	1.35	8 / 4 (2.00)
	<i>w me</i>	4.08	2.71	1.49	8.2 / 4 (2.05)
	<i>y thi ae 13</i>	0.0...	0.0...	—	± / 4
	<i>ad ae 15</i>	0.0...	0.0...	—	± / 4
	<i>y try ae 10</i>	0.24	0.0...	—	+ / 4
	<i>w arg ae 8</i>	1.26	0.83	1.52	4.5 / 4 (1.12)
	<i>lys ae 5</i>	0.13	2.45	0.05	7.5 / 4 (1.89)
Diploid	Genotype for amylase				
	+ / + D44( <i>w thi / b arg</i> )	3.85	2.78	1.38	8.5 / 4 (2.15)
	<i>ae</i> / + D582( <i>ad ae 15 / w me</i> )	3.26	2.50	1.30	7 / 3.5(2.00)
	<i>ae5</i> / + D217( <i>lys ae 5 / w me</i> )	4.56	3.84	1.19	8.5 / 3.5(2.43)
	<i>ae</i> / <i>ae</i> D328( <i>w arg ae 8 / y thi ae 13</i> )	0.0...	0.0...	—	± / 4
	<i>ae</i> / <i>ae</i> D577( <i>w ad ae 15 / y thi ae 13</i> )	0.0...	0.0...	—	± / 4
	<i>ae5</i> / <i>ae</i> D562( <i>b lys ae 5 / w ad ae15</i> )	3.24	2.55	1.27	6 / 3 (2.00)

\* Direct estimation by the agar iodine method for dextrinizing power, gave results in good agreement with those obtained by submerged culture. Figures represent averages of triplicate values.

2 *ae/ae* のアミラーゼ活性

同じく Table 3 に示す様に No5 (*ae<sup>5</sup>*) のぞくアミラーゼ欠突然変異株同士を組合せて合成された balanced heterocaryons 78株, heterozygous diploids 45株のアミラーゼ活性は全く無いか痕跡的である。常法によっても

測定にかかって来ない (Table 4 の D328・D577)。

したがって, これら24の突然変異遺伝子 (*ae<sup>1</sup> ~ ae<sup>4</sup>*, *ae<sup>6</sup> ~ ae<sup>25</sup>*) は allelic で, 同一遺伝子座 (*ae*) にあると考えられる。

*ae<sup>13</sup>*と*ae<sup>18</sup>*, *ae<sup>13</sup>*と*ae<sup>19</sup>*の組合せの heter-

ocaryons は僅かに回復する。これについては考察で論及する。

次に、アミラーゼ突然変異株同士でも、No. 5 (*ae*<sup>5</sup>) が他のアミラーゼ突然変異株 24 株と組合された場合、いずれも糊精化力のみならず糖化力も正常になり正常型のアミラーゼ活性にまで回復する (Table 3 と Table 4 の D217・D562)。

従って、アミラーゼ突然変異遺伝子 *ae*<sup>5</sup> は、他の 24 の突然変異遺伝子とは非対立性で異なる遺伝子座 (*ae*<sup>'</sup>) にある。

なお、Table 4 では、アミラーゼ突然変異

株, heterozygous diploids の数株について常法によるアミラーゼ活性の測定を行い、その値を示してある。D.P. については "agar iodine method" による値を対比してあるが、両者は殆んど一致しており、この簡易な直接糊精化力測定法の実用価値も又確認された。

多糖類培地での生長度：

アミラーゼの減退した突然変異株は、澱粉を炭素源とした瀘過法によって選択的にえられたので、澱粉上では当然生育し難いが、他の澱粉系多糖類での生長度も測定し、乾燥量で表わしたのが Table 5 である。それからの突然変異株

Table 5 Growth (dry weight) of wild strain, amylase mutants, heterocaryons and heterozygous diploids in various polysaccharides.

Ploidy	Strains	Glucose	Polysaccharides				
			Starch	Amylose	Amylopectin	Dextrin	Glycogen
<u>Haploid</u>							
	wild N.6	48.9mg	91.0mg	125.2mg	112.5mg	100.2mg	45.0mg
	<i>ae</i> 4	53.2	4.2	8.9	6.8	5.8	2.4
	<i>y thi ae</i> 13	35.6	1.0	2.5	1.3	1.6	1.0
	<i>ad ae</i> 15	35.2	1.5	3.2	2.7	2.1	1.1
	<i>y try ae</i> 10	39.9	6.7	8.0	8.3	7.5	5.4
	<i>w arg ae</i> 8	42.8	12.4	17.2	10.9	14.4	9.3
	<i>lys ae</i> 5	34.2	5.1	5.4	4.8	5.3	2.2
<u>Diploid, Heterocaryon</u>							
Genotype for <i>ae</i>							
	+ / + D44( <i>w thi/b arg</i> )	65.8	66.5	89.2	87.4	69.4	33.6
	<i>ae</i> / + D189( <i>y thi ae13/w me</i> )	48.6	59.2	71.8	67.3	61.1	34.2
	H189	39.4	40.5				
	<i>ae</i> 5 / + D217( <i>lys ae5/w me</i> )	40.9	46.2	67.3	58.8	50.6	21.7
	H217	36.2	39.3				
	<i>ae</i> / <i>ae</i> D328( <i>w arg ae8/y thi ae13</i> )	45.2	5.3	4.1	4.5	4.3	2.0
	H328	38.5	3.2				
	<i>ae</i> 5 / <i>ae</i> D562( <i>b lys ae5/w ad ae15</i> )	42.6	55.8	69.2	68.4	70.1	21.1
	H562	39.3	40.5				

Recorded growth as mg dry weight after 5 days at 35°C in liquid M.M. or added growth factors (50ml in 200 ml Erlenmeyer flask) supplemented each 2% saccharoid. Values averages of duplicate flasks.

で構成された heterocaryons, diploids についても表示してある。amylose, amylopectin, dextrine では澱粉よりも生育は少々よいが, glycogen では劣り, この傾向は野生株にもみられる。

## 考 察

アミラーゼの酵素学的研究によれば(岡崎'49, '56), 同じ *Aspergillus* 属でも種類によってアミラーゼ酵素系を構成する酵素の種類も量も異なる。*Asp. oryzae* では糊精化型酵素  $\alpha$ -アミラーゼが主体になり, ほかに微弱な糖化型酵素 amyloglucosidase が存在するとされている。

この実験の結果ではそれぞれ独立にえたアミラーゼ突然変異株25株のうち, 24株は糊精化力・糖化力共に減退しており, それらのアミラーゼ突然変異遺伝子は allelic で同一遺伝子座にあると考えられる。

従って,  $\alpha$ -アミラーゼを主とするアミラーゼの生産は, 単一遺伝子 (*ae*) の支配を受けていることが推定された。

そこで, アカパンカビ *Neurospora crassa* の ad- 遺伝子座 (Giles et al '59; Woodward '58 Woodward '59.), td- 遺伝子座 (Woodward et al '58, Lacy '61) pan-2 遺伝子座 (Case et al '60) 等の突然変異遺伝子間でみられる補償作用 (Complementation) が *ae* 遺伝子にも存在するかどうかについて検討し *ae* 遺伝子座内の細分化を試みた。*ae* 遺伝子座の突然変異株24株を夫々組合せた heterocaryons における Complementation の有無に着目した予備の実験をしたが, 現在のところ明瞭な結果が出ていない。ただ *ae*<sup>13</sup> と *ae*<sup>18</sup>, *ae*<sup>13</sup> と *ae*<sup>19</sup> の組合せでは胞子の混合接種から発生する heterocaryons は正常型の半分に近い活性の回復をみた。Complementation については目下研究中である。

カイコ(松村'34)の場合も, 体液と消化液のアミラーゼは別の遺伝子に支配されているが,

アミラーゼそのものについては単一遺伝子であり, 又ショウジョウバエ(吉川'60)でも, 同様で, 品種によってアミラーゼ力に著しい差はあるが, 不完全優性の単一遺伝子に支配されている。

アミラーゼ突然変異株 25 株中の 1 株 No 5 (*ae*<sup>5</sup>) は, 糊精化力が正常で糖化力が減退した株で  $\alpha$ -アミラーゼを有するが amyloglucosidase が欠けた変異株であると考えられ, 又他の24株とは非対立性であるから糖化型酵素を支配する遺伝子 *ae'* は別の遺伝子座にあることになる。

純粋な  $\alpha$ -アミラーゼでも還元糖も生ずるから, アミラーゼ活性の測定だけでなく, 実際アミラーゼ突然変異株について  $\alpha$ -アミラーゼ・amyloglucosidase を抽出し, 両酵素の有無を調べておく必要がある。アミラーゼ突然変異株の酵素的性状の詳細も後の報告にゆづる。

## 摘 要

*Asp. oryzae* 野生株から紫外線照射後, 炭素源として澱粉を用いた濾過法によって, 選択的に多数のアミラーゼ突然変異株をえた。

これらの変異株は, 澱粉培地では生育しないか, ごく僅か生育するが, ブドウ糖培地では正常に生育する。

アミラーゼに関する遺伝学的研究は, 独立に分離した 25 株の変異株を用いて parasexual cycle を通して行われた。

アミラーゼ突然変異遺伝子は正常に対して劣性であり, アミラーゼ生産は 2 つの遺伝子に支配されている。1 つは 24 の alleles を含む遺伝子座で, 主として  $\alpha$ -アミラーゼに関係があり, 他の 1 つは amyloglucosidase に関する遺伝子を含む遺伝子座である。

## 引用文献

- 阿部 (1958): 遺伝学雑誌 33: 138.  
Beadle, G.W. and Tatum, E.L., (1941). Proc. Nat. Acad. Sci., 27: 499.

- and Coonradt, V.L., (1944). *Genetics*, 29: 291.
- Caglioti, M.T. and Sermonti, G.**, (1956). *J. Gen. Microbiol.*, 14: 38.
- Garnjobst, L.**, (1953). *Am. Jour. Bot.*, 40: 607.
- Giles, N.H., Partridge, C.M.H. and Nelson, N.J.**, (1957). *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 43: 305.
- Hagihara, B.**, (1954). *Ann. Rep. Sci. Osaka Univ.*, 2: 35.
- Ishitani, C. and Ikeda, Y. and Sakaguchi, K.**, (1956). *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 2: 401.
- 吉川 (1950). *遺伝学雑誌* 25: 79.
- Kikkawa, H. and Abe, K.**, (1960). *Annot. Zool. Jap.*, 33: 14.
- Kikkawa, H.**, (1960). *Jap. J. Genet.*, 35: 382.
- 黒田 (1951). *遺伝学雑誌* 26: 246.
- (1954). *遺伝学雑誌* 29: 8.
- Lacy, A.M. and Bonner, D.M.**, (1961). *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 47: 72.
- Lein, J., Mitchell, H.K. and Houlahan, M.B.**, (1948). *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 34: 435.
- Lindgren, C.C. and Andrews, H.N.**, (1945). *Bull. Torrey. Bot. Club.*, 72: 361.
- 松村 (1929). *遺伝学雑誌* 4: 162.
- (1934). *長野県蚕糸業試験場報告* 28: 1.
- (1936). *植物及動物* 4: 1857.
- (1948). *遺伝学雑誌* 23: 28.
- 岡崎 (1949). *酵素化学シンポジウム I*: 60.
- (1956). *酵素化学シンポジウム II*: 215.
- Pontecorvo, G. and Gemmel, A.R.**, (1944). *Nature* 154: 514.
- , (1947). *Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol.*, 11: 193.
- , (1953). *Advances in Genet.* 5: 141.
- and **Sermonti, G.**, (1953) *Nature* 172: 126.
- and —, (1954). *J. Gen. Microbiol.*, 11: 94.
- Pontecorvo, G.**, (1954). *Caryogia* 6 (Supp.) vi: 192.
- and **Tarr Cloor, E. and Fobes, E.**, (1954). *J. Genet.*, 52: 226.
- Roper, J.A.**, (1952). *Experientia* 8: 14.
- 瀬嵐 (1957) I 金沢大学教育学部紀要 5: 79
- |     |   |       |
|-----|---|-------|
| II  | " | : 87  |
| III | " | : 93  |
| IV  | " | : 101 |
| V   | " | : 109 |
- Searashi, T.**, (1961). *Aspergillus News Letter* 2: 4.
- , (1962). *Jap. J. Genet.*, 37: 10.
- Sermonti, G.**, (1956). *J. Gen. Microbiol.*, 15: 599.
- , (1957) *Genetics* 42: 43.
- Somogyi, M.**, (1945). *Biol. Chem.*, 160: 61.
- , (1952). *J. Biol. Chem.*, 195: 19.
- Woodward, V.W., De Zeeuw, R. and Srb, A.M.**, (1952). *Genetics* 37: 637.
- , — and —, (1954). *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 40: 192.
- Woodward, D.O., Partridge, C.M.H. and Giles, N.H.**, (1958). *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 44: 1237.

GENETICAL STUDIES ON *ASPERGILLUS ORYZAE* COHNVI Genetical Studies on Amylase production in *Asp. oryzae*

## Summary

Fifty amylase deficient mutants have been independently obtained in wild strain of *Asp. oryzae* by U.V. irradiation, using filtration-concentration technique in which minimal solution was supplemented by starch or amylopectine as C source. These mutants do not grow or stunt in growth on the medium containing starch, but grow on glucose as well as wild strain.

Genetic study for amylase production was carried out through "parasexual cycle" by using twenty-five mutants. All twenty-five mutant genes are recessive to normal one. Amylase production is controlled by genes at two loci ; one locus (*ae*) contains twenty-four alleles (of which mutant genes show negative or a diminution both in D.P. and in S.P.) and another locus (*ae'*) includes one allele (of mutant gene shows normal in D.P. but not in D.P.).

## VII Mitotic recombination による遺伝子分析

(有性生殖によらない遺伝子分析)

## 緒 言

前の報告で、アマラーゼに関して2つの遺伝子の loci (座) を明かにしたが、次にそれらの座の連関の決定が問題になる。しかしコウジカビ *Asp. oryzae* では有性生殖が見当らないので遺伝子分析は不可能であった。

Pontecorvo 等 (Pontecorvo 1952, '53, Pontecorvo, Tarr Gloor and Forbes '54) は、有性生殖をもつ *Asp. nidulans* で子のう胞子形成とは別個に“Parasexual cycle” (準有性生殖) を生起せしめ、heterozygous diploid (ヘテロ2倍体) からの vegetative segregant (無性的分離株) を詳細に研究した結果、無性的分離核は、mitotic division (有糸分裂) の際2倍体核における2つの別個で独立的な過程によって生起するとの結論をえた。1つは haploid (単数体) を分離する haploidisation (単数体化現象) であり、ほかの1つは diploid (2倍体) を分離する mitotic crossing-over (有糸分裂交叉) である。

さらに Pontecorvo と Etta Käfer ('56) は同じく *Asp. nidulans* で、単数体化現象と有糸分裂交叉が染色体地図作製にどの程度の確実さで用いるかについて検定し、ほぼ減数分裂による普通の染色体地図作製と同意義で用いることを確めた。次いで Sermoniti ('57) は *Penicillium chrysogenum* の無性的分離株を分析し、*Asp. nidulans* でえられた原理を用いて連関群と遺伝子座の配列順序を決定した。

これらの研究は、もちろん同じく有性生殖をもたないで、無性的に分生胞子によって繁殖する *Asp. oryzae* の遺伝子分析に重要な手がかりを与える。しかし *Asp. oryzae* では分離株

の ploidy (倍数体) の判別に、*Asp. nidulans* や *P. chrysogenum* の様に胞子の大きさが用いられないので、desoxyribonucleic acid (DNA)量による独自の方法を採用した。

そこでこの報告では、*Asp. oryzae* のヘテロ2倍体からの無性的分離株によるアマラーゼ、胞子色、栄養要求に関する遺伝子の分析がなされた。

## 材料と方法

使用株： 野生株N6から紫外線照射によってえた胞子色、栄養要求性、アマラーゼに関する種々の突然変異株を用いて合成された8株のヘテロ2倍体が用いられた。それらのヘテロ2倍体株では、同じマークの胞子色、要求性はそれぞれヘテロカリオンテストを行い、同一対立性 (allele) であることが判明した突然変異株を構成株として使用している。

アマラーゼ活性の測定： 使用した培地の組成、アマラーゼ活性の測定法については、前の報告にのべてある。アマラーゼ活性のうち糊精化力の方は Agar iodine method (瀬風'61VI) を、糖化力の方は澱粉培地上の生長度によった。

first-order vegetative segregant (第一次無性的分離株) の採り方： 胞子色と要求性についての劣性遺伝子が異型接合している2倍体は緑色・無要求で野生の表現型をもつ。そのコロニー中にきわめて低い率で構成株の胞子色又は要求性についての分離株が、両親型又は組換型をもつ head, spot 又は sector となって生起する。この分離株は、もちろん減数分裂から由来したものではない。この無性的分離株を、容易にしかも多数うる為に、次の様な選択法を採用した。

1. 分離株の胞子色による選択法 ヘテロ2倍体を完全培地で1~2週間培養後、その胞子を完全培地に平板培養する。発生するコロニーは、ほとんどが緑色であるが、少数ながら構成株のマーク色をもつ colony, sector, spot 又は単一の head を生じ、肉眼で識別できる。単一 head の場合でも、一様に緑色の中

なので隔離しやすかった。注意深く隔離して斜面培養(完全培地)に移す。同じ clone を2度以上採る誤りを防ぐ為に、1つのコロニーに幾つかの同色の分離を生じている場合は1つだけ採った。純粹培養された分離株は、次に、生起する可能性のあるあらゆる組合せの要求物質添加培地のシーリスに接種され、その栄養要求性についてテストされた。このテストで要求の決定があいまいな分離株と、遺伝子分析に重要な意味をもつ分離株、たとえば組換え株は、さらに auxanographic test (pontecorvo '49) で再確認された。

2. 分離株の栄養要求性による選択法 栄養要求性について、分離株を選び出すのは労力的なので、主として孢子色について選択的に分離したが、1部については濾過法を用いて予め、prototroph (原栄養型) を出来だけ除き、完全培地に平板培養後発生するコロニーについて、孢子色による選択法の場合と同じ方法で、要求性をテストした。

second-order vegetative segregant (第二次無性的分離株) の採り方： 第一次分離株の孢子をさらに平板培養して生ずるコロニー中に分離してくる株、すなわち第二次分離株は、残っていたヘテロ型遺伝子座についての遺伝子の分離をしたものであって、第一次分離株の場合と同じ方法で採り出し、孢子色と要求性について検定された。

1核当りのDNAの定量： 先ず一定数 ( $5 \times 10^8$ ) の孢子のDNA量を測定して1孢子のDNA量を算出し、次に孢子内の核数を調べ1核当りのDNA量を決定した。

1. DNAの定量  $37^\circ\text{C}$ 、7日培養後の孢子懸濁液を作り、充分振盪しNo.2 ガラスフィルターで濾過する。次いでトーマ血球計算器でmL当りの孢子数を算定し、正確に  $5 \times 10^8$  個の孢子を含む様に孢子懸濁液を遠心管にとり水洗い後、氷水中で冷却しながら0.5N 過塩素酸5 mLを加えて10分間置き遠心し、更にもう一度繰返す。氷室で1~数日間保存する。0.5N 過塩素酸3 mLを添加して温浴中15分間  $90^\circ\text{C}$  におき時折攪拌してDNAを抽出し、遠心後の上清をとって試料とする。DNAの定量は Burton ('56) の方法によった。これは Dische ('30) の方法より3.5倍の鋭敏さがある。すなわちDNAの0.5N過塩素酸抽出液1 mLをとりこれに acetoaldehyde を含む diphenylamine 試薬2 mLを加えよく振って混合した後、密栓して  $37^\circ\text{C}$  で一夜おいて発色させ、バックマン分光光度計の600m $\mu$ で比色し、beef spleen DNA 標準液 (14.6 $\mu\text{g}$

-p/mL) の吸光度にもとづいて、試料の吸光度からDNA量を定量した。

2. 核数の算定 DNA量測定に用いる孢子試料の一部をあらかじめアルブミンでスライドに貼付し乾燥させておき、Delamater 染色 ('48) とフォルゲン染色法を併用して孢子内の核を染色し、顕微鏡下で100個の孢子の核数の平均値を求めた。

蛋白質の定量： DNAを抽出した後の孢子 ( $5 \times 10^8$ ) に1N NaOH 5 mLを加え、湯浴中  $100^\circ\text{C}$  で5~10分間加熱して蛋白質を抽出し、遠心して上清を蛋白質試料とする。蛋白質の定量はFolin法 (Dowry et al '51) によった。すなわち、蛋白質の1N NaOH 抽出液0.1 mLに1N NaOH 0.9 mLを加えて1 mLとし、これに0.01%硫酸銅を溶かしたアルカリ液を5 mL加える。10分後にFolin試薬0.5 mLを加えよく混合して室温で30分間おいて発色させ、バックマン分光光度計の750m $\mu$ で比色測定し、卵アルブミン結晶からえた標準液 (250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) の吸光度にもとづいて各試料の吸光度から蛋白質量を算出した。

この研究に用いられた mitotic recombination の原理：*Asp. nidulans* と *penicillium chrysogenum* の無性的分離株の研究からえられた結論と、それから導き出される知見は次の通りである。

haploidisation (単数体化現象)： ヘテロ2倍体核の有糸分裂で、全染色体が不規則に配置し、単数体核を生起するが、同一連関群の遺伝子は必ず完全な連関、すなわち一連なりになって分離する。又、有糸分裂交叉は同じ連関群の coupling (相引) の遺伝子の間で生ずるから、第一次分離株では有糸分裂交叉による組換えの表現型が生ずるうれいが無い。したがって、もし repulsion (相反) の関係にある劣性遺伝子が組換えすれば、その組換えした表現型を持つ分離株は単数体であると断定できる。しかも、組換えした遺伝子は、ほかの染色体上 (連関群) にあると考えられる。なぜなら、互いに異なる染色体上にある相反の遺伝子のみが単数体で組換えできるからである。同様に、相引の関係にある劣性遺伝子の一方のみ分離する場合は、分離しない遺伝子は異なる染色体上にあると考えられる。なぜなら、もし同じ染色体上にあれば単数体に必ず一連なりとなって分離してくるはずだからである。

mitotic crossing-over (有糸分裂交叉)： 有糸分裂交叉は Stern ('36) がショウジョウバエの体細胞で初めて発見した現象 (somatic crossing-over)

である。2倍体核における有糸分裂の4細糸期 (four strand stage) で、2 strand の間で生じ、これによって依然として娘2倍体核 (daughter diploid nuclei) が生起するが、この分離した娘2倍体核は、1つ又は幾つかの座については相同接合型 (homozygous) となり見出しやすくなったが、ほかの座では依然として異型接合型 (heterozygous) のままである。有糸分裂によって生ずる相同接合遺伝子 (homozygous gene) の頻度は、当然 centromere からの距離の函数である。又、その発生頻度は少いから、重複交叉は考慮しなくてよい。したがって、相引の関係にある遺伝子が同一染色体のうであって、その一部が分離すれば、その分離株は2倍体である。しかも分離しない遺伝子の座は、分離した遺伝子の座よりも centromere に近い。

以上の原理に基づいて遺伝子の分析を行うに際して、先づ最も重要なことはヘテロ2倍体からの分離株の倍数性の判定である。分離株の倍数性がわかって単数体と2倍体とに識別出来れば、それら分離株の表現型と、もとのヘテロ2倍体の予想される遺伝子型すな

わち、劣性遺伝子の組合せとの関係を考察すれば、単数体分離株からは連関群が、2倍体分離株からは連関する遺伝子間の配列順序が決定される。

### 実験結果

ploidy の判定： 分離株の倍数性を判定するには、核の大きさや核分裂における染色体数を調べればよいが、きわめて小さいのと、多数の菌株を取扱わねばならないので技術上いろいろの困難がある。

1 胞子の大きさ *Asp. nidulans* (pontecorvo et al '52, '54), *Penicillium chrysogenum* (Sermonti '56) では、2倍体の胞子の容積は単数体の約2倍なので、これを単数体と2倍体の識別に用いている。*Asp. oryzae* の野生株、突然変異株、ヘテロ2倍体の胞子の直径、容積を測定した (Table 1)。

Table 1 Average diameters and volumes of conidia from some of the haploids and diploids of *Asp. oryzae*.

Strain	Diameter of conidia( $\mu$ )	Volume of conidia( $\mu^3$ )
Haploid		
wild N 6	4.49	47.43
No. 1 <i>me</i>	4.46	46.48
No. 3 <i>y his</i>	4.69	54.02
No. 6 <i>b arg</i>	4.39	44.33
No. 2 <i>y thi ae</i>	4.57	50.01
No. 5 <i>lys ae'</i>	4.29	41.34
Diploid		
D44 ( <i>y thi/b arg</i> )	4.36	43.51
D189( <i>y thi ae/w me</i> )	4.52	48.38
D326( <i>w cys/y leu ae</i> )	4.67	52.97
D551( <i>y thi/w ad ae</i> )	4.46	46.48

Chains of five conidia were measured respectively and the average diameter was calculated from total 100 conidia for each strain.

Strains symbols represented as follows : *w*=white conidium, *y*=yellow conidium, *b*=brown conidium in color ; *me*=methionine, *his*=histidine, *arg*=arginine, *thi*=thiamine, *lys*=lysine, *leu*=leucine, *ad*=adenine requirement ; *ae*=amylaseless in both D. P. and S. P., *ae'*=amylaseless in D. P.



しかし単数体と2倍体の間には全然差が認められない。したがって *Asp. oryzae* では胞子の大きさによる倍数性の判定は出来ない。

2 1核当りのDNA量 体細胞(2倍体)の核のDNA量が生殖細胞(単数体)の

核の2倍であることは Boivin ('48) 以来多数の生物で知られており, Ogur et al ('52) は酵母の細胞当りのDNA量から倍数性を区別出来ると報告している。

*Asp. oryzae* のDNA量を測定する(Table 2)

Table 2 DNA contents per nucleus, conidia and protein of conidium from the wild type, components and heterozygous diploids of *Asp. oryzae*.

Strain	DNA per conidium $\times 10^{-8}r$	Num. of nucleus per conidium	DNA per nucleus $\times 10^{-8}r$	Protein per conidium $\times 10^{-8}r$	DNA per protein $r/r$
Haploid					
wild N 6	16.58	3.26	5.09	91.44	0.18
1140-126 w21 ( <i>w his ae</i> )	16.79	3.31	5.04	98.77	0.17
229-218 b161 ( <i>b lys ae'</i> )	16.65	3.53	4.70	81.86	0.20
229-218 w41 ( <i>w lys ae'</i> )	17.12	3.58	4.81	84.60	0.20
1634-740 w21 ( <i>w ad ae</i> )	16.53	3.12	5.29	76.01	0.22
146-48 y12 ( <i>y me ae</i> )	13.84	2.81	4.93	65.18	0.21
Average	16.10	3.27	4.92	82.93	0.20
Diploid					
D189 ( <i>y thi ae/w me</i> )	16.54	1.65	10.02	80.70	0.20
D217 ( <i>lys ae'/w me</i> )	15.76	1.71	9.21	69.56	0.22
D237 ( <i>b thi/me his ae</i> )	19.98	2.17	9.21	97.94	0.20
D242 ( <i>thi ae/b lys me</i> )	16.33	1.64	9.96	83.78	0.19
D326 ( <i>w cys/y leu ae</i> )	17.66	1.92	9.12	81.91	0.21
D327 ( <i>w lys his ae/y me</i> )	22.18	2.38	9.32	89.24	0.22
D362 ( <i>w cys/b lys ae'</i> )	16.93	1.56	10.85	99.52	0.17
D551 ( <i>w ad ae/y thi</i> )	19.17	1.74	11.02	105.24	0.18
D568 ( <i>b lys ae'/w his ae</i> )	15.92	1.53	9.75	71.03	0.21
D591 ( <i>w ad ae/y me</i> )	17.29	1.62	10.67	97.67	0.18
Average	16.71	1.79	9.91	85.55	0.20

と,胞子当りの量は単数体,2倍体でほとんど差がみられない。しかし,1胞子内の核数は,単数体では3.27であるのに対して2倍体では1.79で明瞭に差がある。したがって核当りのDNA量を計算すると,単数体核は  $4.92 \times 10^{-8}r$  であるのに対して2倍体核は  $9.91 \times 10^{-8}r$  で丁度単数体の核の2倍量となる。同じく Table 2 の右欄に示す様に,細胞全体としては単数体も2倍体もDNA量と蛋白質量の比は  $0.20r/r$  で一定である。すなわち, *Asp. oryzae* では,単数体から2倍体になり核のDNA量が倍加する

と,胞子の容積の増大をとまなわないう核数の方が半減し,核と細胞質の比は一定になり細胞の安定性が保持されている。

そこで Table 3 では3株の人工的に合成したヘテロ2倍体 D591 (*w ad ae/y me*), D551 (*w ad ae/y thi*), D189 (*y thi ae/y me*) について,それぞれ第1次分離株と1部の第2次分離株を取出し,1株当りのDNA量で倍数性を判定し,分離株の表現型と倍数性を比較検討した。*Asp. oryzae* では *Asp. nidulans* と同様にヘテロ2倍体から単数体株と2倍体株を

Table 3 DNA content per nucleus of conidia of vegetative segregants from some heterozygous diploids.

Strain	Phenotype	DNA per conidium $\times 10^{-87}$	Num. of nucleus	DNA per nucleus $\times 10^{-87}$	Ploidy
D591 ( <i>w ad ae/y me</i> )					
First order segregants					
<i>w3-34</i>	<i>w ad me ae</i>	16.51	3.18	5.19	Haploid
<i>w2-22</i>	<i>w ad ae</i>	14.22	3.00	4.74	Haploid
<i>w7-81</i>	<i>w ae</i>	15.52	1.63	9.52	Diploid
<i>y3-24</i>	<i>y me</i>	17.95	3.61	4.97	Haploid
<i>y4-36</i>	<i>y</i>	13.97	1.46	9.57	Diploid
<i>y1-2</i>	<i>y</i>	18.81	2.05	9.17	Diploid
<i>y1-12</i>	<i>y</i>	14.64	3.12	4.69	Haploid
<i>g1-1</i>	<i>me</i>	19.68	1.85	10.63	Diploid
Second order Segregants					
from <i>g1-1</i>					
<i>g2-4</i>	<i>me ae</i>	16.51	1.72	9.60	Diploid
<i>w2-26</i>	<i>w me ae</i>	19.96	1.84	10.74	Diploid
from <i>y4-36</i>					
<i>y2-16</i>	<i>y ae</i>	14.51	1.42	10.21	Diploid
D551 ( <i>w ad ae/y thi</i> )					
First order segregants					
<i>w2-7</i>	<i>w ad thi ae</i>	16.83	3.14	5.36	Haploid
<i>w6</i>	<i>w ad ae</i>	14.03	2.98	4.70	Haploid
<i>w33</i>	<i>w ae</i>	19.21	1.82	10.55	Diploid
<i>y2-16</i>	<i>y thi</i>	13.28	2.72	4.88	Haploid
<i>y4-12</i>	<i>y</i>	15.05	1.61	9.34	Diploid
D189 ( <i>y thi ae/w me</i> )					
First order segregants					
<i>w1-29</i>	<i>w thi</i>	20.66	3.62	5.71	Haploid
<i>w34-1</i>	<i>w me</i>	15.15	2.98	5.08	Haploid
<i>w3-1</i>	<i>w</i>	16.68	1.73	9.64	Diploid
<i>y4-7</i>	<i>y thi ae</i>	13.41	3.01	4.33	Haploid
<i>y1-6</i>	<i>y thi</i>	14.42	1.52	9.48	Diploid
<i>y3-25</i>	<i>y ae</i>	18.35	1.74	10.54	Diploid
<i>y2-3</i>	<i>y</i>	22.10	2.43	9.09	Diploid
Second order segregants					
from <i>w3-1</i>					
<i>w9-1</i>	<i>w me</i>	18.06	1.64	11.07	Diploid
<i>w6-2</i>	<i>w ae</i>	14.64	1.52	9.63	Diploid
from <i>y3-25</i>					
<i>y4-18</i>	<i>y me ae</i>	15.78	3.42	4.61	Haploid

分離するから、同じ過程が分離に際して行われていると考えられる。

単数体化現象による連関群の決定：

1 DNA量によって決定された単数体分離株の場合

Table 3 で倍数性が判定した各分離株の表現型とその発生数を Table 4 にあげてある。

D591からの分離株 *w ad me ae* と D189か

らの第二次分離株 *y me ae* は単数体であるから、有糸分裂における全染色体の不規則配列すなわち単数体化現象から導かれたに違いない。そして相反の関係にある劣性形質が組換えしているから、*me/ME* は、相反の関係にある *w/w*, *ad/AD*, *ae/AE*, *y/Y* を乗せている染色体とは異なる染色体上にある。

同様に、D551からの組換え型分離株 *w ad thi*

Table 4 Vegetative segregants from the some heterozygous diploids of *Asp. oryzae*.

Distinction of the segregants into haploid and diploid is based on the DNA content per nucleus of conidium.

First order segregants analysed			Second order segregants	
Phenotype	Number	Ploidy	Phenotype	Ploidy
D591 ( <i>w ad ae/y me</i> )				
<i>w ad me ae</i>	3	Haploid		
<i>w ad ae</i>	18	H, Diploid		
<i>w ae</i>	42	D		
<i>y me</i>	6	H		
<i>y</i>	64	D, H	<i>y ae, w ae</i>	D
<i>me</i>	8	D	<i>me ae, w me ae</i>	D
D551 ( <i>w ad ae/y thi</i> )				
<i>w ad thi ae</i>	6	H		
<i>w ad ae</i>	15	H, D		
<i>w ae</i>	34	D		
<i>y thi</i>	14	H		
<i>y</i>	23	D, H		
D189 ( <i>y thi ae/w me</i> )				
<i>w thi</i>	15	H		
<i>w me</i>	37	H		
<i>w</i>	72	D	<i>w me, w thi</i>	D
<i>y thi ae</i>	3	H		
<i>y thi</i>	1	D		
<i>y ae</i>	137	D	<i>w ae</i>	D
<i>y</i>	77	D	<i>w me</i>	D
<i>me</i>	2	D	<i>y me ae</i>	H

*ae* も, D189からの組換株 *w thi* も単数体であるから *the*/THI は *w*/W, *ad*/AD, *ae*/AE とは異なる染色体上にある。

これら3株のヘテロ2倍体からの第一次分離株中には以上の4株のほかに組換株を分離していないから, *me*/ME, *thi*/THI 以外の遺伝子は同一染色体にあるに違いない。

そこで各ヘテロ2倍体の遺伝子型を図表化して示すことが出来る。染色体は直線で表わし, ( ) 内は配列順序が未決定である。

$$D591 (w ad ae/y me) \text{ は } \frac{me}{\quad} \frac{y}{(ad w ae)}$$

$$D551 (w ad ae/y thi) \text{ は } \frac{thi}{\quad} \frac{y}{(ad w ae)}$$

$$D189 (y thi ae/w me) \text{ は } \frac{thi}{me} \frac{(ae y)}{w}$$

になる。この遺伝子型の図表に拠つて, 有糸分裂で全染色体が不規則配列後分離するとすれば, 生ずる可能性のある単数体を容易に考え出すことが出来る。また実際にこの図表から期待されるすべての単数体がえられた。上述した4株の組換以外に単数体分離株がある。相引の遺伝子が異なる染色体上にあつて単数体になった時にのみ一緒に分離できる組換しない単数体株で, D591からの *w ad ae*, *y me*, D551からの *w ad ae*, *y thi*, D551からの *w me*, *y thi ae* である。更に, 表現型だけでは倍数性不確定の分離株がある。それはヘテロ2倍体の構成

染色体の一方に marker がない場合で、もし単数体化現象から単数体が導かれても、もう一方の染色体上の全 markers のみを示す表現型になる。しかしこの表現型は1つの染色体の同じうでの全 markers が有糸分裂交叉した場合でも生起しうるから、表現型から単数体であるか2倍体であるかを断定できない。それらはD591とD551からの *w ad ae* と *y* である。D591からの *y* 分離株の多くは、DNA量でも更に*w*の第二次分離株を生ずることからも2倍体であるが、中には再分離をしない株でDNA量からも

単数体であると判定される株がある (Table 3でD591の分離株 $y^{1-12}$ )。

linkage (連鎖) は、以上の単数体分離株の結果から、*w/W*, *y/Y*, *ae/AE*, *ad/AD* の1群と、*me/ME*, *thi/THI* の別の1群とに分けられる。

アミラーゼ突然変異遺伝子 *ae* は D551 では *y*, *thi* とは相反の関係にあり、D189 では相引の関係にあり、又、*y* と同じ染色体上にあり、*thi* とは異なる染色体上にある。そして *ae* は *thi* に対しては D551 (相反), D189 (相引)

Table 5 Vegetative segregants from the other heterozygous diploids of *Asp. oryzae*.  
Distinction of the segregants into haploid and diploid is based on the phenotypes of them.

First order segregants analysed			Second order segregants	
Phenotype	Number	Ploidy	Phenotype	Ploidy
D237 ( <i>b thi/me his ae</i> )				
<i>b thi his ae</i>	8			
<i>b thi</i>	16			
<i>b</i>	67			
D566 ( <i>b lys ae'/w leu ae</i> )				
<i>w leu lys ae'</i>	3			
<i>w leu ae</i>	10			
<i>w ae</i>	32			
<i>b lys ae'</i>	2			
<i>b ae'</i>	14			
<i>b</i>	53			
D362 ( <i>b lys ae'/w cys</i> )				
<i>w lys cys ae'</i>	2			
<i>w cys</i>	13			
<i>w</i>	7			
<i>b lys ae'</i>	4			
<i>b ae'</i>	11			
<i>b</i>	35			
D325 ( <i>w cys/y leu ae</i> )				
<i>w cys</i>	5			
<i>w</i>	46			
<i>y leu ae</i>	2			
<i>y ae</i>	8		<i>w cys ae</i>	
<i>y</i>	31			
D702 ( <i>w [b] leu lys[ae] ae'/y me</i> )				
<i>w leu lys ae'</i>	2			
<i>w leu me ae</i>	4			
<i>w leu ae</i>	10			
<i>w ae</i>	35			
<i>y lys ae'</i>	1			
<i>y me</i>	11			
<i>y</i>	43			
<i>b ae'</i>	14			
<i>b</i>	8			

いずれでも、一緒に分離したり、しなかったりするが、*y*に対してはD551 (相反)からは決して一緒に分離しないし、D189 (相引)からは*ae*と*y*との間で有糸分裂交叉が生ずる場合をのぞいて普通一緒になって分離する。この様に*ae*が*thi*, *y*と相反・相引いづれの場合でも、*ae*分離株は期待された通りであり充分満足された。

2 表現型によって推定された単数体分離株の場合

以上DNA量による倍数性の判定にもとづいて連関群の決定を行なったが、他のヘテロ2倍体からの分離株については、上述した *Asp. nidulans* の原理を用いて、表現型による倍数性の判定にもとづいて遺伝子分析が行われた。Table 5 には、他の5株のヘテロ2倍体からえられた無性的分離株の表現型と、その発生数を示してある。

D237(*b thi/me his ae*)からの分離株 *b thi his ae* は、相反の劣性遺伝子が組換えしているから上述の原理にもとづいて単数体である。そして組換した *his/HIS*, *ae/AE* は、*b/B* や *thi/THI* のほかに相引の関係にあるが共に分離しない *me/ME* とは異なる染色体上にある。

D566 (*b lys ae'/w leu ae*), D362 (*b lys ae'/w cys*), D325 (*w cys/y leu ae*) の3株については、組換によって単数体であることが判定出来る分離株として次の2株がある。D566 からえられた *w leu lys ae'* の表現型を示す分離株では、*ae'* のアミラーゼ表現型であるが、*w* と同一連関群でしかも相引の *ae* が単数体には必らず *w* と一緒に分離してきているはずで、*ae'* によって mask されている。又、胞子色については *w* は *b* の epistasis (上位) であるから、両遺伝子 *w*, *b* が共に単数体核に位置すると *w* の表現型を示す。同様に *w* は *y* に対し、*y* は *b* に対していづれも上位である。そこでこの分離株 *w leu lys ae'* に更に *b* が mask されて存在するかどうかを推定する目的で、この分離株を一方の構成株として D702 (*w[b?]*)

*leu lys[ae?ae']/y me*) が合成され、その無性的分離株が分析された。分離株の表現型に mask されていた *b* と *ae* がそれぞれ出現した。したがってこの分離株は *w(b)leu lys ae'* (*ae*) の遺伝子構成であるから、相反の *w/W*, *leu/LEU*, *ae/AE* は、*b/B*, *lys/LYS*, *ae'/AE'* とは異なる染色体上にある。

D362の分離株 *w lys cys ae'* から相反の *w/W*, *cys/CYS* は、*lys/LYS*, *ae'/AE'* と異なる染色体上にある。これら3株のヘテロ2倍体からの第一次分離株には、ほかに組換株がみられないから、D237, D702とはじめの3株の分離株の分析結果も合せると、次の様にヘテロ2倍体の遺伝子型を図表化して表わすことが出来る。

$$D237 (b thi/me his ae) \text{ は } \frac{thi b}{me} \frac{\quad}{(his ae)}$$

$$D566 (b lys ae'/w leu ae) \text{ は } \frac{(lys ae' b)}{\quad} \frac{\quad}{(leu w ae)}$$

$$D362 (b lys ae'/w cys) \text{ は } \frac{(lys ae' b)}{\quad} \frac{\quad}{(cys w)}$$

$$D325 (w cys/y leu ae) \text{ は } \frac{\quad}{\quad} \frac{(cys w)}{(leu ae y)}$$

このヘテロ2倍の遺伝子型から期待される分離株中には、上述の単数体2株のほかに、倍数性不確定株がある。それはD237からの *b thi*, D566からの *b lys ae'*, *w leu ae*, D362からの *b lys ae'*, *w cys*, D325からの *w cys*, *y leu ae* である。これらを除く他の分離株はすべて2倍体であると判定される。

以上のヘテロ2倍体8株から単数体化現象を経て分離した単数体の遺伝子分析結果から連関群が次の様に推定された。

linkage (連関群) I に属する alleles は  
*ae/AE*, *w/W*, *y/Y*, *his/HIS*, *cys/CYS*, *ad/AD*,  
*leu/LEU*

linkage II に属する alleles は  
*lys/LYS*, *me/ME*, *ae'/AE'*, *thi/THI*, *b/B*

Centromere からの相対的遺伝子座配列の決定 :

2倍体分離株は有糸分裂交叉によって生ずるから、上述の原理にもとづいて、同一関連群の間の相対的な配列順序を決定することができる。

1 第一次分離株による場合

同じ染色体のうでにある相引の遺伝子は、centromereからの相対的な距離に応じて、有糸分裂交叉をして分離してくる。Table 5で、たとえばD591から明かに有糸分裂交叉で生じた2倍体 *w ae* と倍数性不確定株 *w ad ae* の2株を分離するので、*ad* は *w ae* よりも centromere に近い。

同様に、centromereからの相対的順序を推定できるのは

D551 から *w ae, w ad ae* を分離するから

。 *ad (w ae)*

のほかに

D189 *y, y ae* 。*ae y*

D237 から *b, b thi* 。*thi b*

D566 から *w ae, w leu ae* 。*leu (w ae)*

*b, b ae', b lys ae'* 。*lys ae' b*

D362 から *w, w cys* 。*cys w*

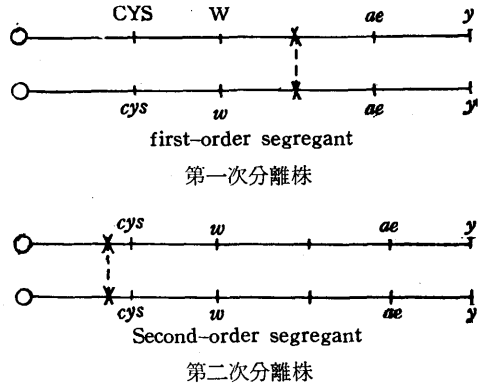
である。

2 第2次分離株による場合

有糸分裂交叉によってさらに第2次分離株が出れば、第1次で分離した遺伝子と centromere との間に位置する遺伝子と対になっている別の相同染色体上のすべての遺伝子が、ヘテロ(異型、接合型)であったことを示している。したがって第2次分離株は、相同染色体上において相反の関係にある遺伝子の間の相対的位置の順序を明かにする。

D326 では、第1次分離株 *y ae* (黄色胞子) から、第2次分離株 *w cys ae* (白色胞子) がえられた。第1次分離株のデータから *y/Y* は *ae/AE* より末端、*w/W* は *cys/CYS* より末端にある。もし *w/W* が *ae/AE* と *y/Y* の間に、又は *y/Y* より末端にあれば、*w* は *y* の

上位であるから *w* (白色胞子色) が第2次分離株で現れない。したがって、下図から判定できる様に、centromere-*cys-w-ae-y* の順序で配列している。



現在までに、このほかに同一関連群で相反の関係にある遺伝子の第2次分離株をえていないので、以上の第1次、第2次分離株の分析結果から1部の遺伝子座の位置を未決定のまま残して、次の13の遺伝子座を図表化すると、

linkage group I 。(*ad leu cys his*) *w ae y*

linkage group II 。*lys ae' b* (*me, thi*)※

( )内は順序未決定。

※ *thi* は *b* よりも centromere に近い。

考 察

*Asp. nidulans* の胞子は、単核で、2倍体の胞子当りのDNA量は単数体の2倍になり、胞子容積も2倍になる(Heagy, Roper '52)。多核胞子である *Asp. sojae* (石谷 et al '56)でも、2倍体と単数体の胞子当りのDNA量も胞子容積も差はないが、1胞子内の核数が半減するので1核当りに換算すると2倍体はやはり2倍のDNA量になっている。*Asp. nidulans* の様な1胞子内に1核を含む種類では、核の容積増大は細胞質の増大をとめない胞子が大きくなる。しかし *Asp. sojae* や *Asp. oryzae* の様に多核胞子を有する種類では、細胞質の量が増大しないので核数を減少させることによって、

核の容積が増大しても核と細胞質の比率は一定に保たれている。

この傾向は一般にカビ類の胞子の大きさと核数の関係にもうかがわれて興味深い。単核の *Asp. nidulans* では胞子の直径は  $2.5\sim 3.2\ \mu$  (倍数体は  $3.4\sim 4.2\ \mu$ )、同じく *penicillium chrysogenum* (Sermonti '54) では  $3.95\ \mu$  (倍数体は  $5.15\ \mu$ ) であり、1胞子内に4.5核を含む *Asp. sojae* では  $6.0\sim 6.8\ \mu$  (倍数体も同じ大きさ) である。*Asp. oryzae* はその中間にあって、3.27核を含み  $4.4\sim 4.7\ \mu$  の大きさである。

*Asp. oryzae* の分生胞子は multiple nucleate (多核) であるが homonucleate (ホモ) であることについては、すでに Pontecorvo ('46) が指摘している。しかし *Asp. oryzae* は品種によってはかなり変異があるので、野生株 N6 について実際に確認した (瀬嵐 '57II)。したがって、uninucleate (単数) の種類に準じて取扱った。

*Asp. oryzae* では、有性生殖がみあたらないが、人工的に合成したヘテロ2倍体から2倍体のほかに単数体も分離することから、有性生殖の必要要素が変則的ではあるが一応全部そろい、完全な parasexual cycle (準有性生殖) の存在が実証された。すなわち、balanced heterocaryon (平衡異核混合体) を作り同一細胞内に異核を混合せしめると  $10^8$  に1の低い頻度であるがこの菌系細胞内でも異核の融合が起りヘテロ2倍体を生ずる。構成株が互いに異なる胞子色と栄養要求性をもつ様に組合せると見出しやすくなる。このヘテロ2倍体は mitosis (有糸分裂) において有糸分裂交叉によって同じく2倍体を分離するが、時折全染色体の不規則配列から単数体を分裂し染色体数を還元しその際組換えが起る。したがって、栄養細胞内の核融合は有性生殖の受精に、有糸分裂中に生じる単数体化現象は有性生殖の減数分裂に匹敵する。

この準有性生殖を通して遺伝子の分析をした

が、このような mitotic な分析の結果を、標準的な meiosis (減数分裂) による分析と比較検討することは *Asp. oryzae* ではできない。しかし Pontecorvo ('56) は子のう形成も行う *Asp. nidulans* で、その染色体地図作製に関して、この mitotic な方法と meiotic な方法とでは根本的な差異がなく、ただ両交叉の相対的な発生頻度が異なるだけで、連関群の決定、centromere からの遺伝子座の配列順序の決定には、mitotic な方法の方がむしろ簡単であることを実証している。

この分析法では遺伝子間の正確な距離を決定するのが難しい。その根本的な原因は、ヘテロ2倍体からの分離核の遺伝子型とその発生頻度を正確に把握できないからである。現在行なっているのは取出ししやすい一部の分離株についてであって、確実にすべての分離株を取出すのによい方法を持ち合せていないし、又、できるだけ数量の正確さを期するには、非常に労力がかかる。したがってこの方法の有効さを meiosis のレベルまで引上げるには、分離株選択の自動的方法を考察し充分活用するほかに、単数体化現象と有糸分裂交叉の発生機構を、もっと詳細に知る必要がある。

なお、連関群決定に関係した事柄として、以前の研究 (瀬嵐 '57II) で、*Asp. oryzae* N6 の梗子における核分裂の観察を行い、その染色体数  $n=2$  であることを明かにしている。

連関についての以上の研究からえられた知見は、従来、遺伝的背景をもちえなかった *Asp. oryzae* におけるこの方面の今後の新しい研究を一歩容易にするとと思われる。

#### 摘 要

*Asp. oryzae* の遺伝子分析は、parasexual cycle を通して行われた。すなわち、連関群の決定は、ヘテロ2倍体から有糸分裂中単数体化現象を経て生起する単数性分離株を、DNA量、組換えの表現型で判別した後、*Asp. nidulans* でえられた知見にもとずいて行われた。同一連

関遺伝子座の centromere からの配列順序は、同じくヘテロ 2 倍体から有糸分裂における交叉を経て生起する 2 倍体分離株（第一次、第二次）の相同接合型遺伝子による表現型によって推定された。

その結果、胞子色・栄養要求性・アミラーゼ生産に関する 12 の遺伝子は、それぞれ 2 つの連関群に分けられた。アミラーゼ生産に関する 2 つの遺伝子 *ae* と *ae'* は異なる連関群に属する。各遺伝子座の配列順序も実験成績の末尾にあげた図表の様に推定された。

本研究を行うに当って、Prof. J. A. Roper (The University of Sheffield, England) から懇篤な御教示・御批判を給ったことを付記する。

#### 引用文献

- Boivin, A., Vendrelyr, R. and Vendrely, C.**, (1948). *Compt. Rend.* 226: 1061.
- Burton, K.**, (1956). *Biochem. J.* 62: 315.
- Case, M.E. and Giles, N.H.**, (1960). *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 46: 659.
- Delamater, E.D.**, (1948). *Micrologia* 40: 423.
- Dische, Z.**, (1930). *Microchemie* 8: 4.
- Heagy, F.C. and Roper, J.A.**, (1952). *Nature* 170: 713.
- Ishitani, G., Uchida, K. and Ikeda, Y.**, (1956). *Experimental Cell Research* 10: 737.
- Lacy, A.M. and Bonner, D.M.**, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 47: 72.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.**, *Jour. Biol. Chem.*, 193: 265.
- Ogur, M., Minkler, S., Lindegren, G. and Lindegren, C.C.**, (1952). *Arch. Biochem. and Biophys.*, 40: 175.
- Pontecorvo, G.**, (1946). *Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol.*, 11: 193.
- , (1949). *J. Gen. Microbiol.*, 3: 122.
- , (1952). *Nature* 170: 204.
- , (1953). *Advances in Genet.*, 5:141.
- , (1954). *Caryogia* 6(Supp.) VI: 192.
- and **Sermonti, G.**, (1954). *J. Gen. Microbiol.*, 11: 94.
- , **Tarr Gloor, E. and Forbes, E.**, (1954). *J. Genet.*, 52: 226.
- , and **Käfer, E.**, (1956). *Proc. Roy. Physical Soc.*, 25: part 1,16
- 瀬嵐 (1957) II 金沢大学教育学部紀要 5: 87  
VI " : 101
- Searashi, T.**, (1961). *Aspergillus News Letter* 2: 4
- , (1962). *Jap.J.Genet.*, 37: 10
- Sermonti, G.**, (1956). *J. Gen. Microbiol.*, 15: 599.
- , (1957). *Genetics* 42: 433.
- Stern, C.**, (1936). *Genetics* 21: 625.
- Woodward, D.O., Partridge, C.W.H., and Giles, N.H.**, (1958). *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 44: 1237.
- Woodward, D.O.**, (1959). *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 45: 846



GENETICAL STUDIES ON *ASPERGILLUS ORYZAE*.VII Mitotic Gene Analyses in an asexual Fungus, *Asp. oryzae*.

## Summary

Gene analyses of asexual fungi, *Asp. oryzae* were achieved without standard sexual cycle as a result of being carried out according to the scheme of vegetative segregation in *Asp. nidulans* (Pontecorvo et al).

Vegetative segregants derived from heterozygous diploids were, first of all, divided into haploid and diploid based on the DNA content per nucleus or the phenotypes of the segregants. Concerning 12 mutant genes, the two linkage groups were determined by analyzing haploid segregants originated from heterozygous diploids through haploidization, and the following relative order of loci of the two linkages was also determined respectively by informations of diploid ones segregated in consequence of mitotic crossing-over.

Linkage I ◦ (ad leu cys his) w ae y

Linkage II ◦ lys ae' b (me, thi)