

Title	Trichodermaのプロトプラスト融合に関する研究
Author(s)	外山, 英男
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/33867
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/repo/ouka/all/>

【6】

氏名・(本籍)	と	やま	ひで	お
	外	山	英	男
学位の種類	工	学	博	士
学位記番号	第	6 4 4 2	号	
学位授与の日付	昭 和	59 年	3 月	24 日
学位授与の要件	工学研究科	醗酵工学専攻		
	学位規則第 5 条第 1 項該当			
学位論文題目	<i>Trichoderma</i> のプロトプラスト融合に関する研究			
	(主査)			
論文審査委員	教 授	岡田 弘輔		
	教 授	芝崎 勲	教 授	合葉 修一
	教 授	大嶋 泰治		
	教 授	田口 久治		

論 文 内 容 の 要 旨

近年エネルギー源としてセルローズ資源の有効利用に関心が持たれている。セルローズ分解能を有する微生物、Trichoderma はその遺伝的研究が殆んど行われておらず、育種法が全く制限されている。本研究は分生子から調製したプロトプラストを用いて融合を行い、融合物の形質分離させる方法を確立したものである。

第 1 章においてはセルラーゼ高生産性の T. reesei Q M 9414 株の分生子からプロトプラスト作成条件を決定している。未成熟分生子に T. viride BIA 株の生産する細胞壁溶解酵素を作用させ、再生可能なプロトプラストの作成に成功している。

第 2 章においては、T. reesei Q M 9414 株とセルラーゼ非生産性の T. reesei Q M 9136 株より二重栄養要求株を作成し、その分生子由来のプロトプラストを用いて融合を行った結果、すべての組合せで融合物を得ている。融合物の着生する分生子の表現型は、単核化によると考えられる両親型と、2 倍体形成の結果と思われる非両親型が存在する。非両親型分生子から生じるコロニーは局所的に菌糸の密な部分 (knob) を生じる。knob の菌糸の表現型は、両親型、非両親型と野生型が存在した。分生子中の DNA 含量の測定から、両親株と knob は分生子当り同量の DNA を含んでいたが、非両親型融合物の生じる分生子は 1.2~2 倍の DNA を含んでいる。Q M 9414 と Q M 9136 株の融合物から作成した knob のうちから Q M 9414 株の約 2 倍のセルラーゼ生産性菌が分離されており、この方法が育種に利用できることを示している。

第 3 章においては Trichoderma の異種間でのプロトプラスト融合を行っている。T. reesei と、T. viride または T. koningii それぞれの二重栄養要求株間でプロトプラスト融合を行い、同種間融合の場

合と同様に融合物やknob を得ることに成功している。Knob の中には、両親の生産するセルラーゼおよび β -グルコシダーゼの電気泳動度と異なる新しいセルラーゼや β -グルコシダーゼ成分を保持するものが存在した。

論文の審査結果の要旨

本論文は Trichoderma 属糸状菌の同種間および異種間の人工的交雑法として細胞融合法を開発したもので、この方法により親株の2倍のセルラーゼ生産性を有する株を得ることに成功し、その有用性を証明している。この研究は Trichoderma のプロトプラスト融合の最初の成功例であり次のような重要な結論を含んでいる

- 1) Trichoderma reesei QM 9414 株の未成熟分生子から T. viride BIA 株の生産する細胞壁分解酵素を用いて再生可能なプロトプラストを作成する方法を開発したこと。
- 2) T. reesei QM 9414 株（セルラーゼ高生産性株）と QM 9136 株（セルラーゼ非生産性株）から導いた二重栄養要求変異株間の細胞融合を行いその子孫株の表現型解析より倍数性の変化を推定していること。すなわち、プロトプラストを融合・再生して得られる菌糸はヘテロカリオンと考えられ、この菌糸から生じる分生子は1倍体の両親型の核を有するものが大部分であるが、一部両親の核が融合した二倍体の核を有するものも存在する。二倍体の核を有する分生子から生じたコロニー中の菌糸は二倍体と考えられるがコロニー中に knob と命名した一倍体の菌糸部分が生じる。二倍体と推定され菌糸から生じる新しいコロニーは knob を形成するが、knob 菌糸から生じるコロニーは均一である。
- 3) 分生子当りの DNA 含有量測定結果は上の倍数性の変化と一致する。
- 4) 細胞融合株およびその子孫株における表現型の変化は knob 株以外では上の倍数性の変化でよく説明されたが、knob 株では期待値より遥に高頻度で野性型が出現し問題を提供した。
- 5) Knob 株の中には両親株より2倍も高いセルラーゼ生産性を示す株が現われ、3世代以上も安定に遺伝した。
- 6) ここで開発したプロトプラスト融合は、T. reesei と T. viride または T. koningii 間でも適用が可能である。
- 7) 異種間融合により得られた knob 株には両親とは異なるセルラーゼ、および β -グルコシダーゼを生産する株が存在し異種間で酵素蛋白質のプロセッシングの差を推定させた。

以上のように本論文は工業酵素の生産のみでなく、微生物育種および真菌類の遺伝学にも貢献するところが大きい。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。