The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

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	大阪大学, 1984, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/33867
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【6】

氏名・（本籍）	外山英男（とやまひでお）
学位の種類	工学博士
学位記番号	第 6442 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	***Trichoderma*** **のプロトプラスト融合に関する研究**
論文審査委員	（主査） 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 QM 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 QM 9414株とセルラーゼ非生産性のT．reesei QM 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の菌系の表現型は，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。QM 9414とQM 9136株の融合物から作成したknobのうちからQM 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。