

酵母菌の変異に関する研究 (第7報) 雑種の遺伝的解析に就いて

小田 雅夫・若林謙太郎・奥野 敏男・大嶋 泰治 (大阪大学工学部醸酵工学教室)

緒 言

前報¹⁾に於て得た162株の雑種に就いて Galactose (GA) 及び α -Methylglucoside (α MG) の醗酵性並びに皮膜形成能の如き生理的性質の遺伝を調べた。大多数の雑種は此らの諸性質に関して期待されるが如き正常の表現型を示すが、例外的に極少数の雑種は異常な表現型を示した。次に単相株を約8カ月間保存した所呼吸能の欠失変異が高頻度で生じた。それは交配実験の結果 Cytoplasmic factor の欠失に起因する様であり、保存中に於ける雑種の胞子形成力の衰退とも関聯のある事を認めた。

実験方法

(1) 糖類の醗酵性: 最初 LINDNER 小醗酵試験法 (30°C, 5日間) により調べ、次に此の方法で Negative の結果を示すものは更に Sugar 2%, Peptone 1%, Yeast extract 0.5%なる Medium 3ml を入れたV型醗酵管(30°C, 5日間)を用いて決定した。

(2) 皮膜形成: MH に接種し30°C, 1カ月間培養後調べた。唯し茲に皮膜とは *Hansenula* や *Pichia* のそれと異り、長期間培養後皮輪から発達して膜となる如き性質のものである。

(3) 呼吸能: Alkali production test²⁾の方法により調べた。24時間以内に Medium を赤色に変化するものは+, 2~5日後に赤変するものは Negative であるがその程度を表わすため—²—⁵として示し、5日以上振盪しても変化しない株は—として示した。

(4) Cytochrome bands: 既報³⁾の如く Micro-spectroscope を用いて調べた。

実験結果並びに考察

(1) Galactose の醗酵性の遺伝

Table 1 に示す如く GA の醗酵性に関して162株の雑種の中160株は期待されるが如き正常の表現型を示したが、2株丈が異常な表現型であつた。そこで Table 2に示す如き遺伝的解析を試みた。即ち正常の表現型を示すものに於て $g \times g$ の雑種の Segregant は全部 Negative であり、 $g \times G$ の雑種は2g:2Gの Segregation ratio を示し、 $G \times G$ の Segregant は全部 Positive であつた。之に反して異常の表現型を示した雑種No. 20は g/g なる因子型であるにも拘らず Positive であり、その Segregation ratio は2g:2Gであつた。茲にその Positive segregant は接種後3~4日目にやつと醗酵を開始する Slow fermenter である。従つて最近 DOUGLAS 等⁴⁾が証明

Table 1. Galactose fermentation of parent haploids and hybrids.

α	a	KM-40-5	KM-46-47	HS-2-1	HS-19-2	HS-21-3	ST-6-1	TO-1-1	TO-17-1	NO-6-30	HS-27-6	HS-9-4	HS-13-5	HS-24-1	ST-23-4	B-6-4
		+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
KM-40-4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
KM-46-50	-	+	-	+	+	+	-*	+	+	-	+	+	+	+	+	+
HS-2-4	+	+	+	/	+	+	+	+	+	/	+	+	+	+	+	+
HS-19-3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	/	+	+	+	+	+	+
HS-21-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ST-6-5	+	+	+	+	/	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
TO-1-2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
TO-17-4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NO-6-40	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
KM-1-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
HT-32-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

* Abnormal type.

Table 2. Genetic analysis of hybrids showing normal and abnormal phenotypes for galactose fermentation.

Phenotype	Hybrid No.		Genotype of segregants				Ratio of g : G (%)
			ag	aG	α g	α G	
Normal :							
- x - = -	13	a/ α g/g	25	0	18	0	100 : 0
- x + = +	89	a/ α g/G	12	11	18	18	51 : 49
	92	a/ α g/G	14	11	15	16	52 : 48
	93	a/ α g/G	20	16	7	9	52 : 48
	94	a/ α g/G	15	24	15	6	50 : 50
+ x + = +	49	a/ α G/G	0	19	0	14	0 : 100
Abnormal :							
- x - = +	20	a/ α g/g	2	4	17	23	42 : 58
+ x - = -	57	a/ α G/g	0	0	48	0	100 : 0

している様に GA の醗酵に 2 種の Gene が関与しているとすれば説明出来るが、今後の研究に俟つ所である。次にもう一つの例外たる雑種 No. 57 は G/g なる因子型であると考えられるにも拘らず Negative であつた。然しその Segregant は全部 α g から成っている所から此のものは雑種ではなく、恐らく平板培養の際間違つて α Mating type の Homozygous diploid colony を取り上げたものと思われる。

(2) α -Methyl glucoside の醗酵性の遺伝

α MG の醗酵性に関しては Table 3 に示す如く 158 株は期待されるが如き正常の表現型を示したが、4 株が異常な表現型であつた。Table 4 の如き遺伝的解析の結果は GA の醗酵性の場合の様に単純ではなかつた。即ち正常の表現型を示す雑種に於て、mg x mg の雑種の Segregant は殆ど Negative であり、mg x MG の雑種では 1 mg : 3MG の Segregation ratio を示し、MG x MG の雑種の Segregant は殆ど Positive であるが Negative のものも若干認められた。次に異常の表現型を示す 4 株の雑種 No. 89, No. 92, No. 93, No. 94 は何れも Mg/mg なる因子型であると考えられるにも拘らず Negative であつたが、その Segregant は 3mg : 1MG なる Ratio を示した。此の Positive Segregant は前の場合と同様に接種後 3 ~ 4 日目にやつと醗酵を開始する Slow fermenter であつた。之らの説明は未だ不明である。

Table 3. α -Methyl glucoside fermentation of parent haploids and hybrids.

α	a	KM-40-5	KM-46-47	HS-2-1	HS-19-2	HS-21-3	ST-6-1	TO-1-1	TO-17-1	NO-6-30	HS-27-6	HS-9-4	HS-13-5	HS-24-1	ST-23-4	B-6-4
		-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+
KM-40-4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-*	+	-	-	-	+	+
KM-46-50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+
HS-2-4	-	-	-	/	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+
HS-19-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	/	+	-	-	-	+	+
HS-21-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-*	+	-	-	-	+	+
ST-6-5	-	-	-	-	/	-	-	-	-	-*	+	-	-	-	+	+
TO-1-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-*	+	-	-	-	+	+
TO-17-4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+
NO-6-40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+
KM-1-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
HT-32-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+

* Abnormal type.

(288)

(小田, 若林, 奥野, 大嶋) 酵母菌の変異に関する研究 (第7報)

Table 4. Genetic analysis of hybrids showing normal and abnormal phenotypes for α -methyl glucoside fermentation.

Phenotype	Hybrid No.	Genotype of segregants				Ratio of mg : MG (%)
		amg	aMG	α mg	α MG	
Normal :						
$- \times - = -$	20 a/ α mg/mg	6	0	40	0	100 : 0
	13 a/ α mg/mg	23	2	16	2	91 : 9
$- \times + = +$	21 a/ α mg/MG	10	14	6	23	30 : 70
$+ \times + = +$	97 a/ α MG/MG	5	41	1	9	11 : 89
Abnormal :						
$+ \times - = -$	89 a/ α MG/mg	18	5	25	11	73 : 27
	92 a/ α MG/mg	19	7	27	4	82 : 18
	93 a/ α MG/mg	29	7	12	4	79 : 21
	94 a/ α MG/mg	19	20	18	3	62 : 38

(3) 皮膜形成能の遺伝

皮膜形成能に関しては Table 5 に示す如く 161株は期待されるが如き正常の表現型を示したが 1株のみが異常

Table 5. Film formation of parent haploids and hybrids.

$\alpha \backslash a$																
		KM-40-5	KM-46-47	HS-2-1	HS-19-2	HS-21-3	ST-6-1	TO-1-1	TO-17-1	NO-6-30	HS-27-6	HT-9-4	HT-13-5	HT-24-1	ST-23-4	B-6-4
		-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
KM-40-4	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
KM-46-50	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
HS-2-4	-	-	-	-	/	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
HS-19-3	-	-	-	-	-	+	-	-	-	/	-	-	+	*	-	-
HS-21-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ST-6-5	-	-	-	-	/	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
TO-1-2	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
TO-17-4	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
NO-6-40	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
KM-1-1	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
HT-32-1	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-

* Abnormal type.

Table 6. Genetic analysis of hybrids showing normal and abnormal phenotypes for film formation.

Phenotype	Hybrid No.	Genotype of segregants				Ratio of f : F (%)
		af	aF	α f	α F	
Normal :						
$- \times - = -$	13 a/ α f/f	25	0	18	0	100 : 0
$+ \times - = +$	95 a/ α F/f	28	21	3	6	53 : 47
$+ \times + = +$	49 a/ α F/F	0	19	0	14	0 : 100
Abnormal :						
$- \times - = +$	124 a/ α f/f	15	12	12	16	49 : 51

の表現型であつた。此の雑種 No. 124は Table 6 に示す如くその因子型は f/f であると考えられるにも拘らず Positive の表現型を示した。その遺伝的解析の結果は $2f:2F$ の Segregation ratio を示し、此の説明も亦現在の所不明である。

(4) 呼吸能欠失の遺伝

単相株は分離直後に於ては呼吸能に関しすべて Positive であつたが、8 カ月間 MH 寒天斜面で保存すると122株の単相株の中17株は呼吸能を欠失してしまった。既報³⁾に於て述べた如く複相株を同様に保存した場合には或る特定の Culture のみに於てその Cell populationの約1~2%が欠失細胞であつたのに較べると、単相株はその Culture の約14%が呼吸能を欠失した。Cell population に成つてしまう所から如何に単相株は不安定であるかが分かる。Table 7 に示す如く呼吸能に関して162株の雑種の中158株は Positive であり、4株が Negative であ

Table 7. Respiration ability of parent haploids and hybrids after 8 months' preservation.

α	a	KM-40-5	KM-46-47	HS-2-1	HS-19-2	HS-21-3	ST-6-1	TO-1-1	TO-17-1	NO-6-30	HS-27-6	HT-9-4	HT-13-5	HT-24-1	ST-23-4	B-6-4
		+	+	- ₂	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
KM-40-4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
KM-46-50	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
HS-2-4	- ₄	+	+	/	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	- ₂
HS-19-3	-	+	+	+	- ₂	+	+	+	+	/	+	+	+	+	+	+
HS-21-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ST-6-5	+	+	+	+	/	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
TO-1-2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
TO-17-4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NO-6-40	- ₂	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
KM-1-1	- ₂	+	+	+	- ₂	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
HT-32-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

つた。そして興味のある事は此の4株の雑種の Parent haploid の両方又は何れか一方も亦全く呼吸能を欠失しており、雑種の呼吸能の欠失は殆ど遺伝的に運命づけられている様に思われる。

呼吸能を欠失した単相株は次第に接合能力も欠失して来る場合もあるが、全く呼吸能を欠失したものでも相当大なる接合能力を示すものも存在する。兎角呼吸能欠失変異は漸進的な性格のもの様であり、Alkali production testに於て2~3日目に変色する変異株では最早や Cytochrome a band は認められないが、b band は痕跡程度認められる。然し4~5日目に変色する変異株では a, b band 共に認められず、c band 又は正常株より著明である。

種々の段階的に呼吸能を欠失した Negative の単相株同志及びそれらと Positive の単相株とを交配して呼吸能欠失の遺伝を験べた。先づ $- \times -$ の Diploid zygote は殆ど Negative であるが孢子形成は僅かに認められた。然し $- \times -_4$ 、 $- \times -_2$ 、 $-_4 \times -_2$ 、 $-_2 \times -_2$ 、 $- \times +$ 、 $-_2 \times +$ の如き交配で得た Diploid zygote は全部 Positive であり良好な孢子形成を示した。此らの

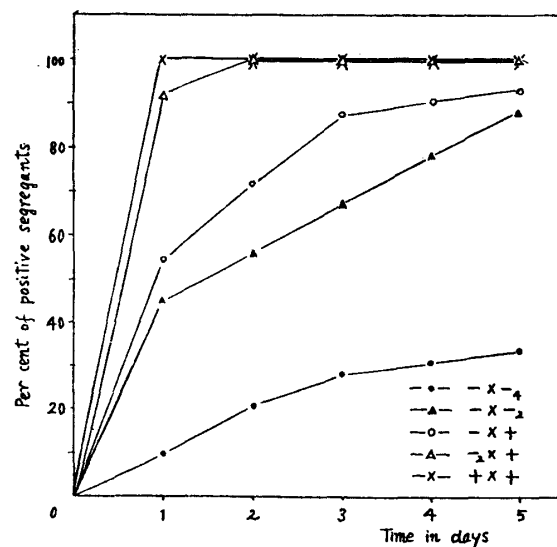


Fig. 1. Alkali production tests for respiration abilities of haploid segregants from the hybrids mated negative- by positive-, weak- by positive-, and positive- by positive- haploids.

Diploid zygote から Haploid segregant を取出しその呼吸能を検べた結果は Fig. 1 の如くなる。即ち $- \times -4$ の如き Diploid zygote からでも約10%の Positive segregant を生じ、 $- \times -2$ 又は $- \times +$ の如きものからは約50%前後の Positive segregant を得、 $-2 \times +$ のものからは約90%の Positive segregant が得られた。而して Positive : Negative segregant の比は Alkali production test の振盪培養の時間に比例して増大する。換言すれば今 $- \times +$ の Diploid zygote を見ると $2-:2+$ に segregate しており、呼吸能欠失変異は Gene の変化として説明出来る様に見掛けられる。然し振盪培養5日目には大部分は Positive となる所から見れば、此の変異は Mutated gene として説明されるよりも EPHRUSSI⁵⁾⁻⁶⁾等が述べている如く寧ろ Cytoplasmic mutation の様である。即ち呼吸能欠失変異は呼吸酵素系の合成に関与する Cytoplasmic particle の減少或は消失によるものと考えられる。而して呼吸能欠失の種々の段階は此の Cytoplasmic particle の減少度に対応するものの如く示唆される。

次に Table 8には162株の雑種を MH 寒天斜面で8ヵ月間保存後の胞子形成力を示す。分離直後の胞子形成力(前報¹⁾ 参照)の $\frac{1}{2}$ 以下に衰退した雑種は41株あつた。而してそれらの雑種の両方又は何れか一方の Parent

Table 8. Sporulating ability of hybrids after 8 months' preservation and its relation to respiration ability of parent haploids.

α	a	KM-40-5	KM-46-47	HS-2-1	HS-19-2	HS-21-3	ST-6-1	TO-1-1	TO-17-1	NO-6-30	HS-27-6	HT-9-4	HT-13-5	HT-24-1	ST-23-4	B-6-4
		+	+	-2	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
KM-40-4	+	10	70	50	80	40	80	40	30	30*	50	60	40	15	60	80
KM-46-50	+	70	90	80	80	70	<1*	80	70	15*	60	60	60	80	70	60
HS-2-4	-4	20*	50	\	1*	50	10*	10*	20*	0*	30*	50	2*	30*	40*	70
HS-19-3	-	50	70	60	0*	40	30*	50	10*	\	40	30*	20*	80	60	50
HS-21-1	+	50	70	50	80	50	70	50	70	20*	70	50	70	40	70	50
ST-6-5	+	70	90	60	\	80	90	70	80	30*	35	60	70	90	60	70
TO-1-2	+	80	80	50	80	50	80	50	60	40*	40	60	50	60	75	80
TO-17-4	+	80	80	60	60	70	20*	60	30	10*	50	50	30	60	20	80
NO-6-40	-2	40*	50	10*	80	35*	5*	10*	5*	1*	20*	10*	20*	20*	30	50
KM-1-1	-2	90	80	50	60	50	50	10*	20*	40	40	70	1*	20*	70	50
HT-32-1	+	30	60	5*	60	85	70	30	15*	10*	40	20	15	30	35	70

* This indicates that sporulating ability is decreased over one half of the initial.

haploid も呼吸能を欠失していた。即ち保存中の雑種の胞子形成力の衰退は呼吸能の欠失と密接な関係がある様であり、Cytoplasmic な意味で遺伝的に略々決定されている様である。既報⁷⁾に於て保存中の複相株の胞子形成力の衰退は要するに培地の栄養的欠陥による細胞のエネルギー準位の低下に帰因するであろうと推定し、細胞のエネルギー準位とは本質的に呼吸系の活性度であろうと意識していた。此の仮説は上述の如く胞子形成力の衰退は呼吸酵素系に関与する Cytoplasmic particle の減少又は欠失と現象的に略々平行関係にあると云う事により、一層確からしく思われる。

要 約

(1) 162株の雑種に就き Galactose, α -Methyl glucoside の醗酵性並びに皮膜形成能に関して験べた。大多數の雑種は期待されるが如き正常の表現型を示すが、数株のものは異常の表現型を示した。後者の遺伝的解析の結果は未だ十分説明出来ない。

(2) 保存中に於ける単相株の呼吸能欠失変異は高頻度(14%)で生じた。雑種の中には呼吸能を欠失したものは4株認められ、それらの両方又は何れか一方の Parent haploid も亦呼吸能を欠失していた。

(3) 呼吸能欠失変異は交配実験と遺伝的解析の結果 Cytoplasmic mutation 即ち呼吸酵素系に関与する Cytoplasmic particle の減少又は欠失と考えられる。

(4) 保存中に於ける雑種の胞子形成力の衰退は此の Cytoplasmic particle の減少又は欠失と密接な関係のある

事を認めた。

終りに Yeast extract 製品を恵与下さったオリエンタル酵母工業KKの桜田親明氏, 並びに Micro-spectroscope の使用に便宜を与えられた岡田弘輔氏に深謝致します。

尚本研究結果の概要は昭和30年10月15日開催の大阪醸造学会講演会に於て発表した。

文 献

- 1) 小田・若林・奥野・大嶋: 本誌, **34**, 210 (1956). 2) OGUR, M. et al: J. Bact. **68**, 391 (1954). 3) 小田・若林・大嶋・奥野: 本誌, **33**, 379 (1955). 4) DOUGLAS, H. C. and CONDIE, F.: J. Bact. **68**, 662 (1955). 5) EPHRUSSI, B. and HOTTINGUER, H.: Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. **16**, 75 (1951). 6) EPHRUSSI, B: Nucleo-Cytoplasmic Relations in Microorganisms p. 13 (1952). 7) 小田・若林・吉田: 本誌, **33**, 80 (1955). (昭和31, 3, 14 受理)

麦芽アミラーゼに関する研究 (第2報) 主として吸光濃度に就て

今 井 富 雄 (合同酒精株式会社)

緒 言

前報に於ては Malt amylase の作用の内主として其の糖化力即ち基質に作用させた場合に於ける還元力の変化に就て測定すると共に其々の場合に於ける反応速度恒数に就て検討した結果を報告した。

本報では其の糊精化作用即ち沃度呈色反応の変化の測定に対して Photoelectric spectrophotometer による測定法が適用出来るか否かに就て検討したので其の結果に就て報告する。

実 験 の 部

I 実験条件並びに方法

(1) 作用混液並びに実験条件

本実験に用いた作用混液並びに実験条件は前報と同様である。

(2) 実 験 方 法

吸光度 (E) の測定 —— 作用混液より経時的に採取した試料に就て前報の如く処理した後其の一定量を採用 (透過率が大体20~80%の範囲になる程度), N/100 I₂-KJ solution 5ml. を添加して沃度呈色反応を行わせた後全量を100ml. として Photoelectric spectrophotometer を用いて其の透過率を測定し此より吸光度を算出した。

$$T = \frac{I}{I_0} \quad T \cdots \cdots \text{透過率} \quad I_0 \cdots \cdots \text{照射光線} \quad I \cdots \cdots \text{透過光線}$$

$$E = \log \frac{I_0}{I} \quad E \cdots \cdots \text{吸光度}$$

II 実 験 結 果

(1) Soluble starch の濃度と吸光度との関係

先づ基質として使用した Soluble starch (和光純薬)の濃度と吸光度との関係に就て BEER's law が成立するか否かを見るために各種の濃度の Soluble starch solution を用いて其の吸光度を測定した。実験条件並びに測定方法は次の通りである。

即ち0.1% soluble starch solution (1mg. soluble starch/ml.) の 1, 2, 3...10ml. を用いて此に N/100 I₂-KJ solution 5ml. を添加し沃度呈色反応を行わしめた後全量を100ml. として Photoelectric spectrophotometer を用いて波長570mμに於ける透過率 (T) を測定した。此の場合同時に N/100 I₂-KJ solution 5ml. を用いて其の透過率も測定した。此の様に得られた透過率 (T) より常法により其の吸光度 (E) を算出した。実験結果は Table 1 並びに Fig. 1 の通りである。

以上の実験より次の事が分つた。即ち HANES et. al.³⁾ の報告と同じく Soluble starch の濃度の変化と吸光度の変化との関係は Fig. 1 の如く直線関係にある事、即ち BEER's law に従う事が認められた。

但し上記の実験に供試した Soluble starch は相当量の水分を含有して居るために Table 1 並びに Fig. 1 に表示した数字は此の場合何れも見掛けの Soluble starch の重量を示して居る。従つて供試 Soluble starch の水分含