麴菌の自然変異に関する研究 (第12報)

Biochemical Mutants (Double-less Strains)

による Heterocaryosis の検討

石谷千代子, 池田庸之助, 坂口謹一郎 (東京大学応用微生物研究所)

昭和 30 年 4 月 27 日 受理

Studies on the Natural Variation of Koji-molds (*Asp. oryzae* and *Asp. sojae*)

-Part 12. Genetic Studies of Heterocaryosis by using

Biochemical Mutants (Double-less Strains)

By Chiyoko ISHITANI, Yonosuke IKEDA and Kin'ichirô SAKAGUCHI

(Institute of Applied Microbiology, University of Tokyo)

緒 言 著者等は前報において, *Asp. sojae* の単一栄養要求株 (single-less mutant 又は mono auxotrophic mutant) を用いて, heterocaryosis の検討をおこなったが, single requirement を genetic marker として用いる事は, reverse mutation^(2~4) 又は他の菌株の contamination による実験の誤差を生じる可能性が極めて大きい。

従来複栄養要求株 (double nutritional mutant 又は double auxotrophic mutant) を用いての heterocaryosis は BONNER⁽⁵⁾, EMERSON⁽⁶⁾ 及び RYAN^(2,3) が *Neurospora* において, single-less mutant 間の交雑により double-less mutant をつくつて行っている報告及び PONTECORVO 等が *Asp. nidulans*⁽⁷⁾ 及び *Pen. chrysogenum*^(8,9) の single-less mutant に更に mutagen を作用させて, double-less mutant を造成して行

っている報告の他にはみられない。

本報ではまず井口氏から分譲された *Asp. sojae* の single-less mutant 中, 主として leucineless 及び histidineless の 2 株に紫外線照射を行つて, double-less mutant を造成し, mutant の種類及び stability の検討を行つた結果及びのこれら mutant を用いて, prototroph 法による allelism-test^(10~13), heterocaryon-test 及び生じた heterocaryon の phenotype 等をしらべた結果につき報告する。なお上記 2 株の紫外線処理によつて得た color mutant 間の heterocaryon から極めて stable な緑色株の新変種を育成する事が出来たが, これらについては後報⁽¹⁴⁾にゆずる。

実 験 の 部

1. Double-less mutant の育成

(i) 原株: 井口が *Asp. sojae* に X 線⁽¹⁵⁾ 照射を行つて得た biochemical mutant 中, 比較的 stable⁽¹⁾ な leucineless X-793 (14 *S leu*), histidineless X-398 (10 *S his*) 及び著者等が後者に紫外線処理して生じた Albino mutant H 158 (*al his*) の 3 株。

(ii) 照射 使用した装置は三共電気会社製の紫外線殺菌灯 (GL-10 Watt 型) で電流の強さは, 電流計で常に一定 (0.22A) になるよう調整した。7~10 日の koji-agar slant に前培養した胞子を, 20 cc の殺菌水中に懸濁させ, No. 1 の濾紙又は No. 2 の硝子濾過器で濾過し, 1 cc 中約 100,000 の胞子濃度で,

Fig. 1. Survival Curves of the U. V. Treated Single-less Mutant Strains of *Asp. sojae*.

Wild type K. S. ○—○

leucineless mutant 14 *S leu* ■—■

histidineless mutant 10 *S his* ×—×

Albino type, histidineless *al his* mutant ○—○

光源から 37 cm の距離で $\frac{1}{12}$ ～ 10 分照射した。各菌株について 10 回ずつ照射して生存曲線をしらべた結果が Fig. 1 の如くで、leucineless (14 S *leu*) 及び histidineless (10 S *his*) の survival ratio は wild type K. S と殆んど同じであつたが、Albino type (*al his*) のみは前 3 者に比し、照射 2 分以後漸次低くなり、5 分以後は著しく低かつた。なお変異株の分離には 14 S *leu* 及び 10 S *his* では 5 分及び 8 分照射の conidia を、*al his* では 3 分及び 5 分照射の conidia を用いた。

(iii) 変異株の分離方法 (Table 1 参照) : 本実験では minimal medium (M. M.) として CZAPEK-agar を complete medium (C. M.) としては koji-agar を用いて total isolation⁽¹⁶⁻¹⁸⁾ と starvation technique⁽⁷⁾

Table 1. Double Auxotrophic Mutants obtained from Single-less Mutants of *Asp. sojae* by Ultraviolet-irradiation.

Strains treated	No. of survivors	No of isolates	Mutant strains obtained			
			Color mutants		Biochemical mutants	
			Albino-type	Yellow or Brown type	Reduced nitrate req.	other nutrient requirer
14 S <i>leu</i> *	14144	330**	9	4	10	4
		180**	0	0	13	7
		403	18	1	6	0
10 S <i>his</i> *	13598	402	2	1	8	3
		98		0	3	0
<i>al his</i>	4998	101		0	3	2

* The mutants figured with Roman type were isolated by "Total isolation method" contrasting to the italicized ones which were isolated by "Starvation technique".

* J. Agr. Chem. Soc. Japan, 28, 939 (1954).

S : sporogeneous, *al* : albino, *leu* : leucine, *his* : histidine, *arg* : arginine, *meth* : methionine

の 2 方法を行つた。後者については、まず紫外線処理した懸濁液と、無処理のものを、M. M. 上に plate し、24 時間毎に Koji-agar を約 0.2～0.3 cm 重層して、starvation の期間の長さにより、viability に差があるかどうかをしらべた (Fig. 2 参照)。その結果 PONTECORVO の報告する如く biochemical mutant の種類により差が認められ、本実験では histidineless の方が leucineless より高く、

又無処理のものと、処理したものでは、後者の方が高かつた。なお double-less mutant と single-less mutant との viability の差を後に検討して前者の方が高い事を明らかにした。かくして total isolation においては、照射直後の胞子を plate して、koji-agar 上に生じた colony を、starvation technique に於いては、5 日間 starvation 後生じた colony を何れも koji-agar slant に任意に pick up し、次に M. M. 上の生育の状態を検討して、生育しないもの、及び極めて粗に生えるもの (これについては後述) を保存して、次の変異株決定を行つた。

(iv) 変異株の栄養要求の決定 まず常法によつて 2% casein hydrolysate, ビタミン混合液、及び 2% 酵母エキスの 3 種の培地上の生育状態をしらべて、アミノ酸、ビタミン、又は核酸成分要求の何れかを検討し、更に auxanography^(19,20) (シャーレーに菌を高孢子濃度で plate して、その上に多くの被検物質を spot-inoculation して生育の反応を検討する) によつて、特定の物質要求を決定した。なお colony type が yeast type 又は sterile type^(21,22) で移物困難なもの、上記 3 種のいずれの培地にも生えないもの (これは Koji-agar 中に未知物質が存在すると考えられる) 及び酵母エキスを生えるが、既知の核酸成分に生えないもの等は "Unknowns" として記載した。

(v) Double-less mutant の種類 (Table 2 参照) : さきに井口が wild type の *Asp. sojae* K. S. に紫外線、X 線⁽¹⁵⁾ 及び nitrogen mustard⁽²³⁾ を作用させて得た single-less mutant と、本実験で得られた double-less mutant とでは、種類はほぼ似ていた。しかし

Fig. 2. Survival Degrees of Single-less, Irradiated Single-less, and Double-less Mutant Strains kept in starved condition.

Single-less Mutant Strain 14S *leu* ▲—▲, 10S *his* ●—●
Irradiated Single-less
Mutant Strain 14S *leu* △—△, 10S *his* ○—○
Double-less Mutant Strain 1415 *y leu nic* △—△ H123
(*al his arg*) ●—●—●

Table 2. Comparison of Auxotrophs obtained by Different Authors (*Asp. sojae*).

Type of Auxotrophs	Obtained from K.S. (wild type) by Iguchi	Obtained from by the authors		
		X-793 (14S leu-)	X-398 (10S his-)	H 158 (al his-)
Reduced nitrate	(1)	(23)	(14)	(6)
Amino acid	(20)	(5)	(3)	(1)
arginine	4	1	2	
glycine	1			
histidine	3	1		
leucine	3			
lysine	4	1		
methionine	5	2	1	
multiple				1*
Vitamins	(7)	(1)		
biotin	1	1		
nicotinic acid	4	1		
P. A. B. A.	1			
riboflavin	1			
Nucleic acid components	(3)	(1)		
adenine/hypoxanthine		1		
adenine/guanine	3			
Unknowns	(6)	(4)		(1)
Totals	(37)	(34)	(17)	(7)

* Requiring alanine, arginine, glycine and proline besides histidine

Reduced nitrate (N源として, nitrite を利用するが nitrate を利用出来ない菌株で, これは既に著者の一人により "Nitratophobe"⁽²⁴⁾と命名され, 又 *Asp. oryzae* の natural variant⁽²²⁾, 及び induced mutant⁽²¹⁾でも多数に得られている) については, 井口の single-less mutant 37 株中 1 株であつたのに反し, 著者等は 59 株中 37 株の多数を得た. なおこれらの mutant について, 硫酸塩同化の状態を CZAPEK medium 11 に $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ を 1g 加えた培地で検討した結果, 何れの菌株も生育の状態は CZAPEK 培地

と変わらなかつた. 即ち之等の菌株は "Reduced sulphur"⁽⁷⁾⁽²⁵⁾ (S 源として, sulphate を利用出来ず, sulphite 等を利用する) ではないと考えられる.

塩基要求株については, 井口により得られた 3 株はいずれもアデニン, 又はグアニン要求であると報告されているが, 著者等の得た L 387 はアデニン又はヒポキサンチン要求で, 培地中に濃紫色の色素を分泌した. この色素生成については, *Neurospora* において MITCHELL and HAULAHAN⁽²⁶⁾ が 45 のアデニン要求株中 1 株は濃紫色色素をつくる事, 及び TATUM⁽¹⁸⁾等もアデニン要求株には 2 つの group があり, 1 つは normal な色で, 他は紫色色素を形成すると報告しており, その原因について BONNER⁽²⁷⁾ はアデニン合成の途中に蓄積された precursor に由来するものであらうと述べている. ニコチン酸要求株 L 415 も培地中に赤褐色の色素を分泌したが, BONNER^(27,28) は上記アデニン要求株と同様に蓄積された precursor の異常な利用にもとづくものとして報告している. Albino type (al his) から得られた Multiple mutant^(7,18) (A139) は, アラニン, アルギニン, グリシン又はプロリンの 4 種の個々のアミノ酸に僅かに生え, それらの混合物にかなりよく生育した.

2. Double-less mutant の Stability (Table 3 参照)

まず Reduced nitrate を除く 10 株の mutant の colony type の segregation の有無を検討した. 即ち Koji-

Table 3. Genetic Stability in Double Auxotrophic Mutant Strains of *Asp. sojae*.

Isolation number	Substance required	Colony		Stability***		
		Type*	Color**	for Colony type (X106)		for Requirement F ₂
X-793	leucine	S	Parrot G~Calliste G (V)			
L 326	" methionine	S	"	0/252	0/1357	0/6.5
L 367	" histidine	S	Ceder G (V)	286	685	3.1
L 467	" methionine	FDW	"	237	332	1.4
L 490	" arginine	S	Parrot G~Grass (V)	540	963	5.5
L 520	" lysine	S	Naples Y (XV)	587	444	5.6
L 387	" adenine or hypoxanthine	B	Army B (XI) (Purple pigmentation)	632	434	2.8
L 415	" nicotinic acid	YR	Mustard Y (XV)	356	560	6.1
X-398	histidine	S	Ceder G~Grass G (V)			
H123	" arginine	S	Calla G (V)	439	1452	7.2
H215	" arginine	S	Yellowish G (V)	671	1854	8.9
H249	" methionine	SR	Cerro G (V)	1772	677	3.2

* J. Agr Chem. Soc. Japan., 28, 18 (1952); 28, 441 (1954).

** RIDGWAY: Colour Standards and Colour Nomenclature.

*** As to the both of colony type and nutrient requirement no segregation or reversion was observed in F₁ and F₂ so far as the figured number concerned.

Component Strain

H249 (SR his meth₃)

L467 (FDW leu meth₂)

Prototrophic Heterocaryon

(Koji extract)

Minimal (Czapek) med.

Component Strain

H123 (S his arg₂)

L490 (S leu arg₁)

Prototrophic Heterocaryon

(Koji extract)

Minimal (Czapek) med.

Photograph 1

agar slant に 7 日前培養したものを Parent として, 常法の如く単胞子分離を koji-agar 上で行つて, 5 日培養後 colony type を検討したが, 約 500 個の colony 中では segregation を認めなかつた. なお上記 plate 上に生じた colony を 48 時間後に, 任意に koji-agar slant に pick up し, これを F_1 として, 同様な方法で F_2 における colony type の segregation 及び栄養要求の reversion の有無を M.M. にロイシン又はヒスチジンのみを加えた培地に孢子濃度約 10^4 /cc で plate して検討したが, いずれも stable であつた. なお栄養要求の reversion の検討には, 孢子濃度 10^4 /cc 位の heavy suspension で行いたかつたが, 前述の濾過器では得られなかつた.

3. Allelism-test (Table 4 参照)

Double-less mutant 中同一アミノ酸要求をもつ arginineless 3 株, methionineless 3 株及び histidineless 4 株を得たので, これら 3 種類のアミノ酸の mutant allele が, allelic か又は non-allelic かどうかを調べるため, 前報⁽¹⁾と同様にして, prototroph 法により Allelism-test を行つた. 即ち前培養 7 日の koji-agar slant から 2 株の conidia を koji-agar (Ballg. 1°) の plate 上に point inoculum して, よく混合し, 30° , 5~7 月培養後, 10^4 /cc の孢子濃度で M.M. 上に plate した. なお各 component strain の混合の割合をしらべるため, 孢子懸濁液を適宜に稀釈して, koji-agar 上に plate した. もし M.M. 上に heterocaryon が生じれば, non-allelic (1 つの共通な細胞質の中に, 異つた mutant allele をもつた核が共存するために, 補足作用を行つて, M.M. 上に生育する heterocaryon を生じる)であり, 生じなければ allelic である (同一の mutant allele を持つ核の共存では補足作用がないために M.M. 上に生えない). 以上の実験によつて, arginineless 及び methionineless の各菌株は, それぞれあらゆる組合せに於いて, heterocaryon を生じ, non-allelic の様相を示したので, 前者に (arg_1, arg_2, arg_3), 後者に ($meth_1, meth_2, meth_3$) の記号を仮りに附して 3 つの mutant allele を区別した. なお histidineless は孢子濃度 10^4 /cc に於て heterocaryon を生じなかつたので, allelic であるとした. arginineless mutant 間 (L490+H123) の組合せによつて生じた heterocaryon は他の組合せによつて生じたものに比し, M.M. で極めて粗に生えて, 発育が悪く, yeast type に似ていた (photograph I 参照). 又 colony の色に関しても, koji-agar 上で他のすべての heterocaryon が, wild type に似て緑色 (Ceder-green ~ Grass-green VI) であるに反し, 黄緑色 (Oil Yellow ~ Yellowish Green V) であつた. これはこれらの 2

Table 4. Allelic Relation of Certain Double Auxotrophic Mutant Strains tested by Prototrophic Heterocaryon method.

Combinations	*S.R.	*P.R. (%)	Colony type of heterocaryon (on Minimal med)
L 490 + H123 <i>S leu arg₁ S his arg₂</i>	1:1	0.9	Very slight growth
L 490 + H215 <i>S leu arg₁ S his arg₃</i>	1:1 3:1 4:1	4.5 2.1 5.1	S
H123 + H215 <i>S his arg₂ S his arg₃</i>	1:2.5	0.5	S
L 326 + L 467 <i>S leu meth₁ FDW leu meth₂</i>	3:1	1.2	S
H 249 + L 326 <i>SR his meth₃ S leu meth₁</i>	1:2	0.7	S
H 249 + L 467 <i>SR his meth₃ FDW leu meth₂</i>	2:1	4.7	S
L 367 + H123 <i>S leu his S his arg₂</i>	1.5:1 2:1	0 0	
L 367 + H215 <i>S leu his S his arg₃</i>	1:5 2:1	0 0	
L 367 + H249 <i>S leu his SR his meth₃</i>	3:1 1:8	0 0	

* J. Ag. Chem. Soc. Japan., 28, 939 (1954).

S.R. : Ratio of each strain

P.R. : Ratio of prototrophic heterocaryon

菌株が pseudo allelism^(4,5,9) (非常に緊密に link した mutant allele は形態的にも, 生理的にも似た pheno type を決定する) に似た関係があるために, heterocaryon によつて相互の核の補足作用が不完全なためであらうと推察される.

4. Prototrophic heterocaryon-test (Table 5 参照)

Histidineless ($10 S his$) mutant から生じた 3 株の double-less mutant の中 2 株の arginineless mutant H123 ($S his arg_2$) 及び H215 ($S his arg_3$) は上記 3 の allelism-test により non-allelic の様相を示したので, これらの 2 株及び methionineless mutant H249 ($SR his meth_3$) の 3 株を tester strain として leucineless ($14 S leu$) mutant から得た double mutant 6 株と組合せて, 実験 3 と同様にして heterocaryon 生成の状態をしらべた. Heterocaryon 率は 0.5~8.9% で single-less mutant の heterocaryon 率 0.2~4.8% と大き

な差は認められなかつた。

Table 5. The Prototrophic Heterocaryon occurred between Certain Double Auxotrophic Mutant Strains of *Asp. sojae*.

Strains used for Combination	Tester Strains								
	H123 (<i>s his arg₂</i>)			H215 (<i>S his arg₃</i>)			H249 (<i>SR his meth₃</i>)		
	S.R.*	P.R.* (%)	colony type of Het.	S.R.	P.R. (%)	colony type of Het.	S.R.	P.R. (%)	colony type of Het.
L326 <i>S leu meth₁</i>	1:1	8.9	S	1:1	2.1	S	1:2	0.7	S
L467 <i>FDW leu meth₂</i>	2:1	2.8	S	1:1	1.6	S	2:1	4.7	S
L490 <i>S leu arg₁</i>				1:1	4.5				
				3:1	2.5				
	1:1	0.8	S	4:1	5.1	S	1:7	1.6	S
L520 <i>S leu lys</i>	1:2.5	3.4	S	1:2	1.3	S	1:4.5	0.5	S
L387 <i>b leu ad/hyp</i>	1:3	7.1	S	1.5:1	0.2				
				5:1	0.3	S	1:1	2.3	S
L415 <i>y leu nic</i>	1:2	7.0	S	1:2	0.5				
				5:1	0.3	S	1:3	5.2	S

* See Table 4

5. Prototrophic heterocaryon の phenotype (Photograph I, Table 4, 5 参照)

Heterocaryon の colony の外観的性質については、例えば孢子形成の悪い sterile type 間⁽³¹⁾又は growth-rate の低い restricted type^(10,31,32)間の heterocaryon が何れも wild type に近い正常な状態になり、又 colony の色⁽³³⁾についても、color mutant 間例えば Yellow-type と Albino-type の heterocaryon が wild type に似た緑色の colony を示す事は既に著者等も認めている。これらの現象は前述した如く一つの共通な細胞質中に遺伝的に補足な核が存在するための相互作用によつて、1種の heterocaryotic vigor を生じたものと考えられる。又或る形質の優劣については、PONTECORVO⁽⁴⁾等が conidial と non-conidial mutant 間の heterocaryon は non-conidial の phenotype を示したので、後者が優性であると述べている。

著者等も既に固定した変異株⁽³⁵⁾間、又は single-less mutant⁽¹⁾間の heterocaryon において、上述の形質が両親の中間、いずれかの親に似た状態か、又は heterocaryotic vigor (孢子の直径が両親より大きくなる場合^{1,33,35,36})も含む)を示す場合を認めているが、本実験に於ても tester strain として用いた1株の restricted type H249 (*SR his meth₃*)と normal type の heterocaryon はすべて、normal の growth rate を示し、sterile type L467 (*FDW leu meth₂*)と3株の tester strain の sporogenous type 間のそれはすべて wild type に似た tester strain に近い色を示した。pigmentation については、purple pigmentation を行う L387 と3株の tester strain との heterocaryon において、いずれも M.M. 中に色素が分泌されなかつた。

なお heterocaryon の segregation の割合については、実験3及び4によつて得た各組合せの heterocaryon の3株づつを koji-agar に giant colony をつくつて検討したが、明らかに一定の培地では component strain の growth-rate に影響された。即ち restricted type の tester strain を用いた場合は、いずれも normal な growth-rate をもつ component strain が大部分の sector を占めた (Photograph I 参照)。

要 約

1. *Asp. sojae* の single-less mutant の中 leucineless (*14S leu*) 及び histidineless (*10S his*) に紫外線照射を行つて得た double auxotrophic mutant の種類は次の通りである (Table 2 参照)。

14S leu からは reduced nitrate (23株), arginineless (1株), histidineless (1株) lysineless (1株), methionineless (2株), nicotinic-acidless (1株) 及び adenine 又は hypoxanthineless (1株)。

10S his からは reduced nitrate (11株), arginineless (2株) 及び methionineless (1株)。

2. 上記1の reduced nitrate を除く 10 株の mutant に於て colony type 及び栄養要求の如き genetic marker は single-less mutant より stable であつた。

3. Arginineless (3株), methionineless (3株) 及び histidineless (4株) については, prototroph 法による allelism test^(32~35)を行つたところ前2者に属する菌株はいずれも non-allelic の様相を示し、後者の histidineless は allelic の様相を示した。

4. *10S his* から得た3株の mutant を tester strain として heterocaryon test を行つたが, prototrophic

heterocaryon 率は 0.5~8.9% で single-less mutant の 0.2~4.8% と大きな差は認められなかつた。

5. Wild type の colony の形質をもつ tester strain と mutant の形質をもつ strain との heterocaryon の phenotype の検討により, colony の色, conidia 形成量, 及び growth-rate 等の形質は, wild type の形質が優性であつた。

(本稿の概要は1955年2月日本農芸化学会支部会において口演した)

終りに臨み有益な御助言にあつかつてゐる, 東京大学理学部 和田, 田中両先生, 並びに *Asp. sojae* の mutant を分壊された野用産 研井口氏に謝意を表する。

- (1) C. ISHITANI and K. SAKAGUCHI : *J. Agr. Chem. Soc. of Japan.*, 28, 939(1954).
- (2) F. J. RYAN: *Cold Spring Harbour Sym. Quant. Biol.*, 11, 215 (1946).
- (3) F. J. RYAN: *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 32, 163 (1946).
- (4) N. H. GILES *Cold Spring Harbour Sym. Quant. Biol.*, 16, 283 (1951).
- (5) D. M. BONNER *ibid.* 16, 143 (1951).
- (6) S. E. EMERSON : *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 34, 72 (1948).
- (7) G. PONTECORVO *Advances in Genetics*, 5, 142 (1953).
- (8) G. PONTECORVO and G. SERMONTI *Nature*, 172, 127 (1953).
- (9) G. PONTECORVO and G. SERMONTI : *J. Gen. Microbiol.*, 11, 94 (1954).
- (10) G. W. BEADLE and V. L. COONRADT *Genetics*, 29, 291 (1944).
- (11) D. G. CATHESIDE : *The Genetics of Microorganism*, p. 30 (1949).
- (12) G. W. BEADLE *J. Biol. Chem.*, 156, 633 (1944).
- (13) D. NEWMAYER *Genetics*, 39, 604 (1954).
- (14) C. ISHITANI, Y. IKEDA and K. SAKAGUCHI Meeting of J. Agr. Chem. Soc. of Japan (April 1955).
- (15) N. IGUCHI : *J. Agr. Chem. Soc. Japan*, 26, 146 (1952).
- (16) G. W. BEADLE and E. L. TATUM : *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 27, 499 (1941).
- (17) G. W. BEADLE and E. L. TATUM : *Amer. J. Bot.*, 32, 678 (1945).
- (18) E. L. TATUM et al. : *ibid.*, 38, 37(1950).
- (19) G. PONTECORVO : *J. Gen. Microbiol.*, 3, 122 (1949).
- (20) D. D. PERKINS : *Genetics*, 34, 607 (1949).
- (21) C. ISHITANI : *J. Agr. Chem. Soc. Japan*, 25, 98 (1951).
- (22) K. SAKAGUCHI and C. ISHITANI *ibid.*, 26, 18 (1952); 28, 441 (1954).
- (23) N. IGUCHI : *ibid.*, 27, 541 (1953).
- (24) K. SAKAGUCHI and O : *ibid.*, 10, 475 (1934).
- (25) N. FRIES : *Nature*, 159, 199 (1947).
- (26) H. K. MITCHELL and M. B. HOULAHAN : *Federation Proc.*, 5, 370 (1946).
- (27) D. M. BONNER : *Cold Spring Harbour Quant. Biol.*, 11, 14 (1946).
- (28) D. M. BONNER and G. W. BEADLE *Arch. Biochem.*, 11, 319 (1946).
- (29) J. A. ROPER : *Nature*, 166, 956 (1950).
- (30) G. PONTECORVO : *Symp. Soc. Exp. Biol.*, 6, 218 (1952).
- (31) B. O. DODGE : *Bull. Torrey Bot. Club.*, 69, 75 (1942).
- (32) E. R. SONSOME : *Proc. Roy. Soc. Edin.*, 62, 299 (1947).
- (33) C. ISHITANI and K. SAKAGUCHI *J. Agr. Chem. Soc. Japan*, 28, 898 (1954).
- (34) G. PONTECORVO and A. R. GEMMELL : *Nature*, 154, 514 (1944).
- (35) K. SAKAGUCHI and C. ISHITANI *J. Agr. Chem. Soc. Japan*, 26, 279 (1952).
- (36) K. SAKAGUCHI and C. ISHITANI *ibid.*, 28, 445 (1954).

Summary

1. The leucineless and histidineless mutant strains of *Asp. sojae*, which had been known to be comparatively stable, were irradiated with ultraviolet rays, and the following double auxotrophic mutants were isolated.

From 10S *his*⁺ strain; reduced nitrate⁽¹⁾ strains, arginineless⁽¹⁾, and methionineless⁽¹⁾.

From 14S *leu*⁺ strain; reduced nitrate⁽²³⁾, arginineless⁽¹⁾, histidineless⁽¹⁾, lysineless⁽¹⁾, methionineless⁽²⁾, nicotinic-acidless⁽¹⁾, and adenine or hypoxanthineless⁽¹⁾— (Table 2).

2. As to the genetic markers such as colony type and nutrient requirement, 10 double-less mutant strains excepting reduced nitrates, were proved to be more stable than single-less mutant strains.

3. Allelism-tests were carried out in every combination of 3 arginineless strains, 3 methio-

nineless strains, and 4 histidineless strains, by prototrophic heterocaryon method. with the results that the strains belonging to the two formers were observed to be non-allelic each other and the latter (histidineless mutants) were allelic.

4. Prototrophic heterocaryon-tests between 3 tester strains originating from 10S *his* and 6 auxotrophs from 14S *leu* were performed. The frequencies of prototrophic heterocaryon formation were found to be 0.5~8.9%, indicating that there is little difference between single-less (0.4~4.8%) and these double-less mutants.

5. The heterocaryons formed between wild type tester strains and mutant strains were proved to have the character of wild type in their phenotypes such as colour of colony, sporulation, and growth factor etc.

Therefore, it may be reasonable to say that wild type characters are dominant to mutant ones so far as the above mentioned characters concerned.

* (Sporogenous type, histidineless) ** (Sporogenous type, leucineless)

飼料用ビート (*Beta vulgaris crassa*, ALEF) の グルタミン酸含有量について

小幡彌太郎, 石川 芳典 (北海道大学農学部農芸化学科)

昭和 30 年 5 月 2 日 受 理

L-Glutamic Acid Content of Mangold (*Beta vulgaris crassa*, ALEF).

By Yatarô OBATA and Yoshinori ISHIKAWA

(Dept. of Agr. Chem., Fac. of Agr., Hokkaido Univ., Sapporo)

甜菜糖製造の際の Steffen 廃液にグルタミン酸を含むことは STOLZENBERG⁽¹⁾によつて報告され、BARTOW⁽²⁾がこれより MSG の量産化を行い、近年主として米国で Accent なる商品名で市販されはじめた。

甜菜の栽培条件と甜菜根中のグルタミン酸含有量との関係について 2, 3 の報告が行われている^(3~5)。我々は甜菜よりも含糖量は低いグルタミン酸含量の多い 4 種類の飼料用ビートを栽培し、収穫量、L-グルタミン酸含有量その他を分析したのでこの結果について報告する。

実 験 の 部

I. 供試種子と栽培経過

本実験に使用した種子は次の 4 種であつて、それぞれ恵与されたものである。

品 種 名	入 手 先
(1) Mangold Eckenlorfer gellow	北大農学部食用作物学教室
(2) バールス ストリーネ (A)	北大農学部附属第 1 農場
(3) バールス ストリーネ (B)	北大農学部附属第 2 農場
(4) ハーフシュガー	北大農学部附属第 2 農場

北海道大学農学部実験圃場の一部を使用し、窒素源として硫酸又は尿素を、リン酸源に過リン酸石灰、加里源としては硫酸加里を施与した。1954年 5 月 19 日播種、株間 6 寸、畦幅 1 尺 7 寸とした。6 月 26 日間引、8 月 15 日農薬撒粉、11 月 1 日収穫、調査分析に供した。

II. 窒素源と収穫量との関係

収穫量は畦幅 1 尺 7 寸、株間 6 寸のとき 1 エーカー当りのビート数を 40,000 本として、調査によつて得た平均重量を 40,000 倍したものを kg 単位で表示した (Table 1)。各品種それぞれ 3~5 列栽培してその中央部

Table 1. Yield of Mangold which were dressed with Ammonium Sulfate or Urea.

Variety	Ammonium sulfate			Urea		
	No. of samples	Average weight of root (g)	Yield per acre (kg)	No. of samples	Average weight of root (g)	Yield per acre (kg)
Mangold Eckenlorfer gellow	13	311	12,440	12	190	7,600
Barres stryne (A)	16	653	26,120	14	479	19,160
Baars stryne (B)	13	654	26,160	12	607	24,280
Half sugar	13	507	20,280	15	409	16,360