

## 水産増養殖における微生物バイオテクノロジー

誌名	養殖研究所研究報告 = Bulletin of National Research Institute of Aquaculture
ISSN	03895858
巻/号	23
掲載ページ	p. 1-15
発行年月	1994年3月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター  
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council  
Secretariat



## 水産増養殖における微生物バイオテクノロジー

前田昌調

(1994年1月31日受理)

### Biotechnology of Microorganisms in Aquaculture

Masachika Maeda\*

The research reports are summarized in this review paper which includes bioremediation and biocontrol of the aquaculture environment for improving the quality of the fish biotope and promoting the growth of fishes using bacteria, microalgae and protozoa. This report also mentions the useful roles of the bioreactor which contains microorganisms on it to remove or eliminate the pathogenic microbes and polluted materials. Genetic engineering of plasmid DNA is pointed as the significant area of the further studies for producing more useful functions of the microorganism.

*Key words:* aquaculture, biocontrol, bioreactor, bioremediation, environment, genetic engineering, microalgae, microorganisms, pathogens

#### 1. はじめに

養殖、種苗生産環境では、自然界と同様、水容積  $1\text{ cm}^3$  の場に数百万細胞の微小生物が生息している。この微小生物と環境および生物相互の間には、代謝生産物を介して、あるいは生物のより直接的な活動を通して、種々の作用過程が存在し、これらの作用は総合的に生物の特性・機能として表現される。生物の機能には多かれ少なかれ特異性があり、その検定過程においてのみ具体化される。従って、今後も新たなスクリーニング方法の開発などにより、より多くの、従来のものとは異なった、生物機能が発見されると考えられる。

これらの微生物の果たしている機能が明らかにされるに従って、諸機能を積極的に利用しようとする試みがなされている。特に農業分野では生産物を病気や害虫から守る手段として、微生物を利用する技術が実用化されるに至った。自然界の微生物群集の分布は、種間の平衡関係の上に成り立っており、生産物生物から見れば、病害微生物と有益微生物とのバランス関係の過程において生産物の成長が行われているといえる。この平衡関係の内容は、拮抗（寄生、捕食、抗生作用、競争）、共生等であるが、拮抗作用を利用した病害防除が有効な方法として行われるようになった。これらの方法は生物防除（生物的防除、生物学的防除、biological control, biocontrol）と呼ばれる。例えば、現在の植物生産の場における病害虫防除は、合成化学薬剤異存型であり、その使用量は膨大なものになっているが、その結果生態系のバランス崩壊、環境汚染、薬剤耐性の害虫、病原菌の出現など大きな問題となっている。このような病害に対して薬剤を使用せず、自然のバランスを維

---

\* 養殖研究所 (National Research Institute of Aquaculture, Nansei, Mie 516-01, Japan)

持っている微生物の機能を利用して生産物生物を保護する方法が開発されている。

以下にこれまでの生物防除研究の経緯について述べる。

細菌 *Bacillus thuringiensis* は、経口的に侵入した昆虫の体内で毒素を生産し、昆虫を死亡させる (Norris, 1964)。この菌の亜種間の遺伝子を組換える事により遺伝子のキメラ体を造り、新しい毒素タンパク質を造りだす研究が行われ (中村ら, 1988)、昆虫の駆除に使用された結果、その効果が増大した。この *B. thuringiensis* 薬剤は北米で年間消費量3000トン、ヨーロッパで800トンなど、その使用が広まってきている。また、薬剤として登録されている昆虫駆除ウイルスの研究も進展し (川瀬, 1984)、baculovirus の殺昆虫効果および脊椎動物への安全性についても良好な結果が報告された (Ignoff, 1975)。糸状菌を利用した昆虫の防除は、コガネムシ幼虫駆除を目的とした *Metarhizium anisopliae* の大量培養が行われた (Krassiltschik, 1888)。また、ボウフラの防除に有効な鞭毛虫類 *Coelomomyces* sp. は培養が困難であったが、中間寄生種としてミジンコやケミジンコが有効であることが判明し、以降の大量培養への道を開いた (Whisler *et al.* 1974)。

線虫にも、食害をおよぼす昆虫に対する防除効果があり (Byers and Poinar, 1982)、さらに線虫と薬剤との混合使用によりその効果が増幅し、結果として薬剤の使用量が減少した。

植物ウイルス病予防には、ワクチン療法が有効である。同種の植物ウイルスには種々の自然変異株があり、それらは一般に系統と呼ばれる。あるウイルスにすでに感染している植物では、近縁のウイルスの感染や増殖が抑制される現象が知られており、これは同種系統間の干渉作用と呼ばれている。そこで植物に被害の少ない弱毒ウイルスを接種しておく、その干渉作用により他の近縁ウイルスの感染増殖を防ぐことができる (McKinney, 1929; Salaman, 1933)。大島ら (1965) は、ある種のウイルスを接種した植物の茎を 35°C で15日間処理して選抜を重ね、弱毒株 L11 を作出した。その後改良された L11 株 (後藤・根本, 1971) の接種により植物生産物の収穫は、2-4 倍におよんだ (青木, 荻原, 1974)。同様にして、ワクチン療法による種々の植物ウイルス病への対策がとられている。

微生物間の拮抗作用を利用した例では、植物白絹病菌 *Sclerotium rolfsii* に拮抗作用を示す *Trichoderma lignorum* が分離され (大島, 1960) 商品化された。植物の苗に大害を与える根頭がんしゅ病は、*Agrobacterium tumefaciens* によるが、この微生物は環境水中より根に侵入し植物にこぶを形成する。他方、*Agrobacterium radiobacter* が抗菌物質の一種を生産することがわかり、これはアグロシン84と命名された。この *A. radiobacter* の菌培養液あるいはアグロシン溶液に、種子あるいは苗を浸漬した後、播種、移植すると、根頭がんしゅ病の発生がおさえられることがわかった (牧野, 1986)。この生物を細菌懸濁液に浸漬する方法をバクテライゼーションと呼ぶが、このバクテライゼーションは拮抗微生物が種子、幼植物の発芽、成長とともに増殖して、植物体上に広がることにより、土壌から侵入してくる病原菌を防ごうとする考えで行われている。本法はいくつかの生産物植物に対して応用され (Burr *et al.* 1978; Howell and Stipanovic, 1979)、この操作により病害が減少すると共に、発芽率や、小苗の成長の向上効果も報告された (Burr *et al.* 1978)。

水圏における生物制御手法の実用化研究はいまだ少ないが、上記農業分野での実績を基盤にして、さらに進展するものと考えられる。ここでは特に水産増養殖における細菌相を制御したガザミ種苗生産について述べる。

## 2. 微生物使用による養殖環境の修復・向上 (Bioremediation) と病害防除 (Biocontrol)

ガザミ, *Portunus trituberculatus*, は成長が早いいため1年で漁業対象甲殻類となる。水産上の価値も高いことから、栽培漁業種としても重要な位置にあり、年間約5,000万尾の放流用稚ガニが全国の種苗生産事業場において生産されている。ガザミの成長は、水温24℃以下の場合、ゾエアⅠ, Ⅱ, Ⅲ, Ⅳ期およびメガロバ期の各成長段階において、通常それぞれ3, 2, 3, 4, 5日を要し、稚ガニまでの育成日数は合計約17日である。種苗生産において、減耗がみられる時期は、ゾエアⅣ期からメガロバ期に集中する傾向にある。その減耗の主要原因がゾエアⅢ期までの育成過程に関係していることがわかった (Nogami and Maeda, 1992)。

このガザミの種苗生産において、水作り過程は重要である。現状では、有機懸濁物や植物プランクトンを飼育水に添加し、ガザミに適した細菌、原生動物、植物プランクトンの自然増殖を待つことによって、ガザミ幼生の好適な生育環境を作り出している。しかし、自然増殖という間接的な手法のため、常にガザミに好適な微生物群集が作り出されるとは限らない (前田ら, 1991; Maeda *et al.* 1992)。そのため、特定の微生物相を優占させる微生物管理方法の実用化が要請されるにいたった。

また水作りは、有効な餌料微生物群集の形成をも意味する。我々は、自然海水中的の食物連鎖をしらべ、次のような、これまでの概念とは異なる特徴的結果を得た (Maeda *et al.* 1983; 前田, 1986; 前田, 1987)。

- 1) 第1次生産量の約56%が細菌に利用され、40%が菌体となる。
- 2) デトリタスの餌料価値は主として付着微生物による。
- 3) 細菌現存量は、植物プランクトンに匹敵する場合もある。
- 4) 水圏には原生動物数が多い。
- 5) 動物プランクトンには、植食性の種より広食性種が多い。
- 6) 動物プランクトンに原生動物、細菌を餌料として与えると産卵、成長等の代謝活性が増大する。
- 7) 魚介類孵化幼生の餌料として植物プランクトンは適当でない場合が多い。

これらの結果より、食物連鎖の出発点となる生物群集は、第1次生産者ではなく、第1次生産者を基にして形成される微生物、原生動物、微小藻類を含む餌料微生物群集であると考えられた。このように水作りでは、環境の構築者および餌料としての好適微生物群集の形成という2つの側面が同時に展開されている (前田, 1987)。ガザミにおいても細菌を蛍光色素で染色し、ガザミ幼生の飼育水に添加したところ、幼生消化管内に細菌蛍光の強い発色が認められ、添加細菌はガザミ幼生に摂食されることが明らかとなっている (前田ら, 1992)。

バイオコントロール法に用いる細菌を選択するために、飼育水や自然海水中より、寒天平板培地を用いて多くの従属栄養細菌を分離した。これらの菌株を純粋株とした後、液体培地で培養し、ガザミ幼生を飼育している水中に添加、一定日数後、幼生の生存率、活力の度合を数値化して、その添加細菌の有効性を判定した。この試験結果では、多くの菌株が幼生に対して毒性を示したが、その生残および活性を促進する細菌も数株分離することが出来た (Maeda and Liao, 1992)。さらに、分離菌株の病原細菌に対する拮抗作用を、*Listonella (Vibrio) anguillarum* を試験株として検定した。こうして、ガザミ幼生の生残・成長を促進し、かつ抗病原細菌作用のある菌株を選択した (Nogami and Maeda, 1992)。

この細菌の飼育水への添加量は、最終濃度 $10^5 \sim 10^6$  cells/mLとした。いくつかの有機物濃度の異なる海域の細菌と原生動物（鞭毛虫と繊毛虫）の数を測定したところ、有機物濃度の低い太平洋の中心付近（溶存態炭素量約 $0.7$  mg-C/mL）から、その濃度の高い東京湾の湾奥（約 $1.3$  mg-C/mL）のような環境でも細菌の数は約 $10^6$  cells/mL以下である。しかし、原生動物、特に鞭毛虫の数は有機炭素濃度の増加に従って増している。すなわち、細菌は、ある数以上になると原生動物に摂食され、その数が制限される。同様に種苗生産の飼育水においても、細菌数は $10^6$  cells/mLのレベルにある。

ガザミ幼生飼育には、 $200$  m<sup>3</sup> のコンクリート製水槽を用いた。水槽には熱交換器、攪拌器、通気装置を設置してある。餌料系列としては、ワムシ、孵化直後のアルテミア、養成アルテミア、魚貝肉碎片を順次使用した。飼育水の微生物相を安定させるために、最初に海水を次亜塩素酸ナトリウムで滅菌し、幼生収容直前に中和して、前述の量の細菌を添加し、続いてケイ藻、孵化幼生とワムシを収容した。細菌は、ゾエアⅠ期からⅢ期までの間毎日添加した（Nogami and Maeda, 1992）。

この $200$  m<sup>3</sup> 水槽中の細菌、ケイ藻および鞭毛虫の変動関係において、実験開始時には上記滅菌処理により、細菌数は少なかったが、有効細菌株の添加により増加した。その後添加した有効細菌数は添加と同時に急激に減少する傾向を示した。この減少は、ガザミⅠ期幼生が細菌を摂食したことによるものと考えられた（前田, 1986）。この期間ガザミ幼生の成長に伴って、幼生は細菌を摂食しなくなるが、この時期より飼育水中の細菌数が増加し、その値は $10^7$  cells/mL以上に達した。しかし細菌の増加に対応して短時間内に原生動物鞭毛虫数が増加し、細菌数は再び $10^6$  cells/mLのレベルに減少した。この細菌数の減少は、原生動物の摂食によるものと思われた（図2）。

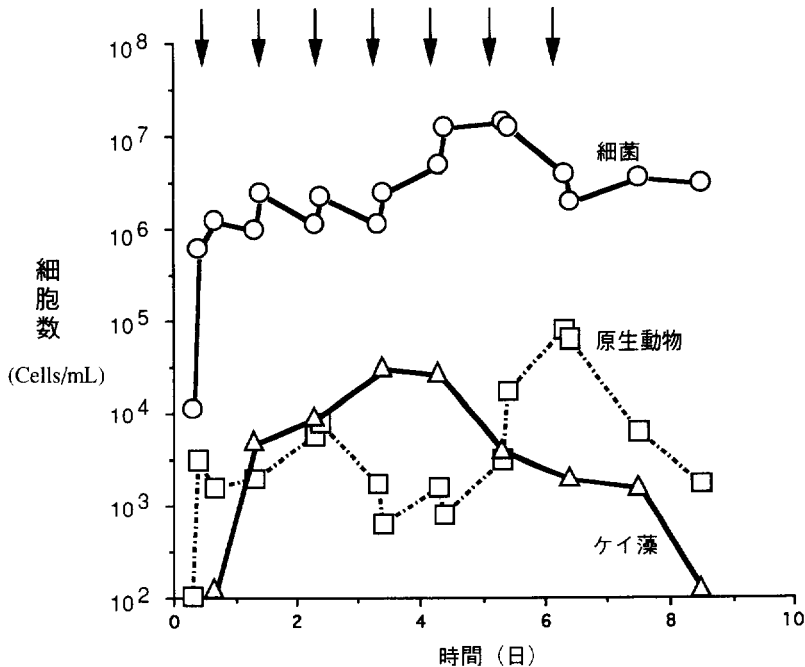


図1. 甲殻類（ガザミ）幼生飼育水中の細菌，原生動物，ケイ藻数の変動。  
↓：有効細菌の添加

生産槽水中の添加細菌株の占有率は、株を毎日添加したために割合高い。占有率の低下時には、*Vibrio* 属細菌群が出現したが、占有率の上昇とともに *Vibrio* は減少、あるいは全く検出されなかった (Nogami and Maeda, 1992)。

1990年のガザミ種苗生産結果では、本方法 (バイオコントロール法) 実施例7例中、生産尾数の変動はあるものの、全ての事例において稚ガニまでの生産に成功したが、通常法では9例中6例の生産事例で幼生は斃死した。総生産尾数は、前者では831万尾、通常法では292万尾であった。その後、1991, 1992, 1993年においても、バイオコントロール法は良好な生産結果を残した。この生産過程において、通常法では、疾病が現れなくても幼生は脱皮不全等の栄養不良と思われる症状で斃死した。しかし、本方法での斃死は全く見られなかったことより、細菌の添加は栄養補強の効果もあらわしているものと考えられた (前田ら, 1991)。

土壤において、その環境を滅菌した後病原菌を接種すると、病原菌の増殖速度はさらに増すことが知られている。滅菌後の土壤に植物を移植するか、あるいは有機物を添加した場合には、病原菌の増殖は抑制される事例が多い。すなわち移植された植物、添加有機物により他の微生物が増加し、病原菌の増殖を抑制していることが判明している。この事実は微生物同士の相互作用により、病原菌の増殖が抑えられたり、あるいは促進されることを示している。例えば、海水を紫外線、オゾンあるいは次亜塩素酸ナトリウムを加えることにより滅菌し、常在細菌を駆除した後放置するか、または次亜塩素酸ナトリウムを中和すると、細菌群は10数時間以内に元の数まで復帰する。抗生物質使用においても1~2日で同様に菌数は復元する。この復元過程において当然病原菌が侵入、優占することもありうる。このように海水の滅菌だけでは飼育に適した環境が構築出来ない場合が多い。養殖環境には餌料生物や、種苗の成長を促進させる、あるいは阻害する微生物が分布している。これらの微生物群と生産生物との相互作用が良好に推移した場合に、生産量の向上が得られると考えられるので、これらの微生物群集の総合的な管理が必要となってくる (図1)。

上記ガザミ種苗生産における微生物利用研究の他にも、いくつかの報告がなされている。Yuら (1989) は、ワムシがビタミン B<sub>12</sub> の存在下でよく増殖することに着目し、B<sub>12</sub> 生産菌を分離、これを大量にワムシ生産水中に添加することにより、高いワムシ生産量を得た。Kameiら (1987, 1988) は、魚病ウイルスの増殖を抑制する細菌を分離した。Yoshimizuら (1989) は、本菌体をア

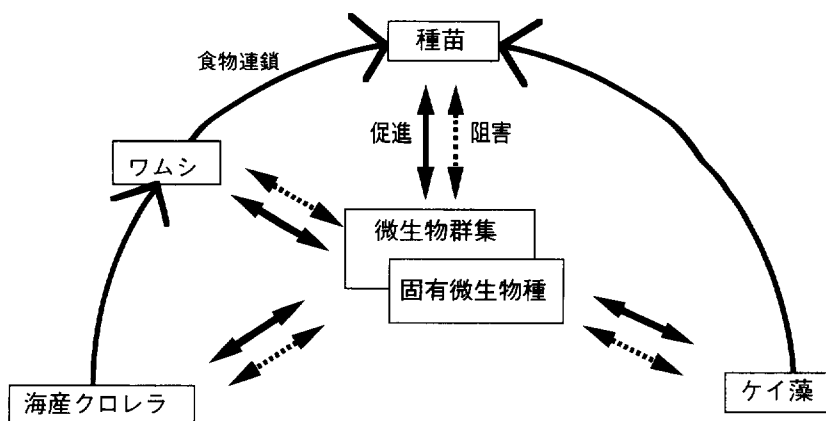


図2. 水産種苗および餌料生物と微生物との相互作用。

ルギン酸ナトリウムビーズ中に包埋して、バイオリアクターとしたが、この固定化菌体によってもウイルスが抑制されることを報告した。

ファージは宿主細菌と共生しており、その細菌株を分離した同一海水試料中に生息している場合が多い。単離した細菌と栄養塩とを混合して調整した寒天平板二重層培地に、細菌株と対応するファージがいると考えられる試料水を塗抹し静置培養する。ファージが存在する場合には、寒天培地中の細菌が溶菌されて、溶菌斑と呼ばれる透明な斑点が生ずる。これを白金耳ですくいと、試験管中で培養を繰り返すことによりファージの濃厚液が得られる。荒木 (1991) は海水中に浸漬したチタン板より分離したファージが、複数の細菌を溶菌することを見いだしている。一般に、ファージと細菌は「一対一」の対応関係にあるといわれているが、このような機能を保有するファージの存在は、その利用範囲を広げるものとして注目されている。荒木 (1986) は、細菌の付着している付着板が投入されている海水中に、このようなファージを添加したところ、短時間 (数時間) で付着細菌が消失したと報告している。

水圏の細菌のなかでは、蛋白質分解酵素 (プロテアーゼ) 阻害剤を生産する種があり、その阻害剤は魚類病原菌 *Aeromonas hydrophila* の産生するプロテアーゼを強く阻害した (Imada *et al.* 1985)。その他、貝類の餌料となっている硫黄細菌 (Pennek *et al.* 1984)、ウズマキゴカイ幼生の着底や変態に関与する細菌フィルム (Kirchman *et al.* 1982)、カキ幼生の着底、変態を促進する細菌 (Weiner *et al.* 1985)、クラゲのプラヌラ幼生の着底、変態に関与する細菌 (Neumann, 1979) などが報告されている。なお、河合ら (1988) および門田・多賀 (1985) の著書に、養殖環境や海洋微生物の基本的実験方法が詳細にまとめられている。

### 3. 原生動物の機能

原生動物も前項で言及したように、微生物群集の中では重要な役割を担っている。自然海水中では、大きさ  $200 \mu\text{m}$  以下の微小動物プランクトン量は、全動物プランクトン量の数10%を占めるが、その主たる構成種は、原生動物繊毛虫である (Beers *et al.* 1971)。この原生動物は微小藻類、細菌などを餌料とし、自身はより大型の生物の餌となる (Ryder, 1881; 笠原ら, 1960; Seki, 1966; Tezuka, 1974; Maeda, 1988) ため、食物連鎖中の key animals の一つとしての役割を担っている。さらに、繊毛虫 oligotrichs (少毛類) の多くが渦鞭毛藻を摂食する。この少毛類繊毛虫については、Maeda and Carey (1985), Maeda (1986) の総説がある。また、高山 (1979) も、原生動物 *Noctiluca scintillans* と *Gyrodinium sp.* が、赤潮藻類 *Gymnodinium sp.* を摂食すると報告している。原生動物は、活発な摂食活動により、懸濁態有機物の溶存化速度をはやめ (Fenchel and Harrison, 1976)、さらに、栄養塩の回転速度を増大させる働きも行う (Johannes, 1964)。このため増養殖環境においても、生物制御手法における原生動物の利用は今後の重要な課題になると思われる。

### 4. 微細藻類の諸機能

クロレラは、ワムシの餌料として使用されていると共に、水産増養殖種苗生産時に水作りの一構成種として添加される場合が多い。また魚類の活力低下時に、クロレラ細胞を添加することもあり、その効果については生産現場において軽視できないものとなっている。Miyazawa ら (1988) は、クロレラの抽出液に、免疫抗体細胞を活性化する効果のあることを報告している。また、Konishi

ら (1985), Tanaka ら (1984) は, クロレラの抽出液中に抗腫瘍活性を発見しているように, クロレラの機能は, その栄養面のみならず, 生物活性の点においても注目されている。なお, 海産のクロレラの多くは *Nannochloropsis* 属の種であることが, Maruyama ら (1986) によって指摘されている。藻類の免疫活性増大効果, 抗腫瘍活性については, 他に, 大型藻類で西沢 (1990) の総説, あるいは, 中沢ら (1974) の多くの報告があり, さらに Kashiwagi ら (1980), Patterson ら (1984) が, ケイ藻の抗腫瘍活性についても報告している。

ケイ藻は貝類の着底を促進させる効果を持つ。即ち, アワビ幼生の着底率は, アワビ稚貝の足蹠からの分泌物の存在によって増大するが, ケイ藻を摂食したアワビからの足蹠分泌物は, アワビ着底をより向上させた (関・菅野, 1981)。

植物プランクトン種間には, 有機物の関与した相互関係がある。実際ほとんどの藻類がある種の増殖阻害, 促進物質を細胞外に生産する。この物質を介した生物の相互作用は, アレロパシーと呼ばれている。植物プランクトンのアレロパシーについては, 本城 (1989), 本城・浅川 (1990) の詳細な総説があるので, ここでは渦鞭毛藻とケイ藻, および藍藻の相互作用過程における諸機能について述べる。Pratt (1966) は, 内湾の植物プランクトンの遷移を観察し, ケイ藻 *Skeletonema costatum* とラフィド藻 *Olisthodiscus luteus* の赤潮が, 交互に発生する現象を報告し, この赤潮藻類の培養濾過液が, *S. costatum* の増殖を著しく阻害することを明らかにした。本城ら (1978) は, 博多湾において, 赤潮種, *Heterosigma* sp. と *Skeletonema costatum* の出現の様相に負の相関のあることを報告し, この前者の培養濾過液が, いくつかの種のケイ藻の増殖を強く阻害することを確認した。同様の結果は, Pincemin (1969, 1971) によっても得られている。Kutt and Martin (1975) は, 藍藻 *Gomphosphaeria aponina* を分離し, これが渦鞭毛藻の増殖を阻害することを示した。これらのアレロパシー物質の内容については, グリコカリックス様物質, アルカロイド様物質, ステロール系の物質, 不飽和脂肪酸のリノレン酸とリノレイン酸などが単離されている。この他に, 渦鞭毛藻などを殺傷する細菌が報告され (Imai *et al.* 1993), さらにウイルスによる防除の可能性も示唆されている (Nagasaki *et al.* 1993)。微細藻類, 特にケイ藻はクルマエビ, ウシエビ養殖においては餌料, 水質安定因子として重要である。また渦鞭毛藻は, 夏季には養殖池に大量発生し, 甲殻類の成長, 生残に悪影響を与える場合が多い。しかし一方では, 渦鞭毛藻の *Peridinium bipes* と *Cryptocodinium cohnii* には, 魚類に対するさまざまな摂餌誘因物質が含まれ, これらの物質が, ブリ, マダイ稚魚の成長を促進することも報告されている (Nakajima *et al.* 1989 a, b)。このように養殖環境制御過程においては微小藻類の果たす役割は重要である。

Droop and Elson (1966) は, 増殖期のケイ藻には細菌が付着しては, 一方, ケイ藻の増殖静止期には, 多くの細菌が付着していることを報告し, ケイ藻の抗菌作用について示唆した。ケイ藻の抗菌物質は, *Asterinella japonica* (Pesando, 1972), *Navicula delognei* (Findlay and Patil, 1984) において単離されており, 特に *A. japonica* が, 実際に抗菌物質 goniodomin 類を細胞外に生産していることが確認された。この研究に先立ち, Pratt ら (1944) は, 緑藻 *Chrolorella* sp. より抗菌物質クロレリンを分離している。また, Nagai ら (1990) は, 渦鞭毛藻類よりのブタノール画分に抗カビ活性を検出し, 供試藻類のある種では, 藻体外培養液中においても活性が測定されることを報告した。抗菌, 抗カビ, 抗藻性のスクリーニングについては, Metting and Pyne (1986) が詳しく報告しているが, 概して, 遊離の脂肪酸が活性の本体として分離, 同定されている。一方, 細菌 *Alcaligenes denitrificans* subsp. *xyloxydans* の生産するヒドロキサム型シデロフォアは, 鉄と結合し可溶化する作用を行い, この細菌は, 本作用をとおして, 鉄イオンを藻類に供給していることが示唆された



(西尾・石田, 1987; Nishio *et al.* 1988)。また、緑藻アオサの遊走子から葉体への分化にかかわる細菌 (Provasoli and Pintner, 1980) についての報告もある。

## 5. バイオリアクターの利用

昔より醸造工業において、種々の固形物の添加が発酵に有効であることは知られており、このような効果は、固形物表面に高濃度に付着した微生物に由来するものと考えられてきた。これらも一種の固定化菌体とみなしうる。

現在、一般的となっている固定化生体触媒の概念は、骨炭の微粉末に吸着した酵素インペルターゼが、たまたま活性を保持していることを見いだしたことに端を発している。もっとも、酵素を有効に利用する目的で積極的に“固定化”するようになったのはずっと後のことであり、ジアゾ化ポリアミノスチレン樹脂への共有結合、ポリアクリルアミドゲルへの包括、グルタルアルデヒドによる架橋、マイクロカプセルによる包括、リポソームへの包括などの技術が次々と生み出され、これらはさまざまな改良を受けながら、現在でも重要な固定化法として利用されている。これらの研究成果の概要は、田中 (1985) の総説に詳しく述べられている。

現在、バイオリアクターについては、世界各国で次の課題についての研究が盛んに行われている。

- 1) 補酵素の再生システムを含む複合酵素システムの固定化と利用。
- 2) 脂溶性や水に難溶性の物質を対象とする有機物中での固定化生体触媒の利用。
- 3) 動・植物細胞の固定化と利用。
- 4) 遺伝子工学や細胞工学によって新しい性能が与えられた酵素、微生物菌体、動・植物細胞の固定化と利用。
- 5) バイオセンサーやバイオチップのような生命現象と情報工学との結合。

これらの研究をとおして現在必要とされる基礎知識としては、次のような課題があげられている。

- 1) 固定化される生体触媒と応用目的とに応じた最適の固定化用担体を選択するための評価基準。
- 2) 固定化される生体触媒と担体間にはたらく相互作用と、それに基づいて生体触媒に新しい機能 (安定性の増大、基質特異性などの目的に応じた調節など) を与えるための理論の確立。
- 3) バイオリアクター設計と運転のための化学的アプローチ。
- 4) バイオリアクターを用いる反応の最適化へのコンピュータの利用。

これまでのバイオリアクターの開発目的は、有用物質生産に限られてきた。一方、この機能を水域環境の保全・向上に利用する方法が開発されようとしている。アンモニアの除去には、硝化細菌の働きが有効であり、また、病原生物の増殖抑制には拮抗微生物を利用することができる。水圏での微生物細胞の直接添加は、拡散、流出等のため効果が希薄となるので、バイオリアクターのように細菌を大量に保持しているシステムの設置は、微生物作用を永続させる上での効果を期待することができる。なお、水圏へのバイオリアクターの設置においては、付着生物の除去、あるいはリアクターの規模等の検討が必要となる。さらに底土環境の改善についてもバイオリアクターの利用が有効であると考えられている (谷口, 1993)。

## 6. 細菌における真核生物遺伝子の発現

有用微生物への機能付加のためには、遺伝子組換えが有効な手段となる。これらの操作により、

例えば養殖環境向上細菌に、さらに魚介類の成長ホルモンや消化酵素の生産性を付加することができる。微生物の遺伝子組換えにはベクターが使用されるが、ベクターの特性としては次の条件が満たされていなければならない。

- 1) 宿主細胞のなかで自己複製出来る。
  - 2) ベクター DNA が切断されて外来の DNA が挿入されても、複製能力や組換え分子の選択能力に影響のない、いわゆるクローニングサイトを保持している。
  - 3) 宿主細胞に対して容易に識別できる表現型を与える遺伝子を持ち、これを利用してベクターを持つ細胞を選択出来る。
  - 4) 組換え DNA 実験によるバイオハザードの危険性を考慮して、宿主細胞の外では生存不可能であること、および宿主の範囲が狭く制限されていて、接合によって他の宿主に伝達できないこと。
- 現在、原核細胞でクローニングされた DNA の分離、増殖、発現に用いられているベクターとしては、プラスミド、コスミド、ファージの3種類がある。

天然のプラスミドでは、選択マーカーを持つものはサイズが大きく、細胞への導入が困難であり、かつ細胞中で不安定である。そのためにベクターとして使用できるプラスミドの探索と構築が必要となる。

$\lambda$ ファージは二つの方法で自己複製している。いわゆる溶菌サイクルでは、細菌細胞へファージが附着しファージ DNA が注入され、細胞内でファージ DNA が複製する。タンパク質殻のキャプシドの中に DNA 分子が詰め込まれると、細菌細胞が溶解して子ファージが放出される。他の複製様式、溶原性とよばれているものでは、感染の初期過程は同じであるが、ファージが独立に複製するのではなく、細菌の染色体に組み込まれて染色体の一部として複製する。この場合には細胞は溶菌することではなく、ファージは無言のパッセンジャーとなる。頭部に約5万塩基対の2本鎖の線状 DNA を1分子含んでいる  $\lambda$ ファージは、その増殖に必須な遺伝子群と、必ずしも不可欠でない遺伝子群とからなる。後者は、 $\lambda$ ファージ DNA のほぼ中央の3分の1をしめており、制限酵素を用いて、前者から切り離すことができる。そして、この部位に外来 DNA を挿入してもファージは生育を行うので、ベクターとして使用しうることになる。

細胞内ではプラスミドの形で存在するが、ヘルパーファージなどで誘導すると、プラスミドがファージの殻の中につつまこまれる性質をもつベクターをコスミドベクターという。ファージの殻(頭部)へのファージ DNA のパッケージングには COS 領域が必要で、この COS 領域 DNA 断片をプラスミドに組み込んだものがコスミドベクターである。ファージが細菌に感染すると、ファージの DNA を菌に注入するこのベクターの性質を利用し、形質導入ができる。導入率もプラスミドと比べて通常 $10^2 \sim 10^3$ 倍高い。

細菌における、真核生物有用遺伝子の機能発現のためには、適当なベクター中に当該遺伝子を組み込み、微生物細胞に導入する方法が用いられる。ファージベクターは、宿主細胞に感染するため、宿主が溶解してしまうことが多いので、細菌への遺伝子導入にはプラスミドベクターが用いられる。遺伝暗号(コドン)がユニバーサルであるため、外来 DNA がまったく関係のない種の DNA 中で発現するであろうとした仮定は、細菌の DNA 断片ばかりでなく、下等な真核生物の酵母やカビの DNA 断片によって大腸菌が形質転換されたときに支持された。しかし、同じような実験を高等真核生物の DNA 断片で行ったときには、通常外来遺伝子は発現しない。

真核生物の DNA を細菌細胞中で発現させるためには、真核生物と宿主細菌との間の遺伝子発現機構の相違を明らかにしなければならない。とくに真核生物におけるイントロンの存在、細菌と

動・植物との間に存在するプロモーター配列の差、真核生物の mRNA のリボソーム結合部位の欠如等の知見は重要である。

外来遺伝子中にイントロンがあると細菌細胞中では発現しない。これを克服するためには、mRNA より相補的 DNA (cDNA) を構築し、ベクターに挿入する。なお、真核生物 DNA 中のイントロンは、転写に際し RNA スプライシングにより切り取られる。他方、生産物蛋白質のアミノ酸配列が分かっている場合には、化学的に DNA を合成することができるため、イントロン混入の心配はなくなる。しかし実際には、合成 DNA 断片の統合に時間を要すること、またアミノ酸に対応するコドンが複数個あること等の困難な課題があり、対応する DNA の構築は必ずしも容易ではない。

転写に必要な DNA 配列であるプロモーターは、細菌では、RNA ポリメラーゼによって RNA 合成の第 1 段階として認識される。細菌のプロモーターのあいだには著しい類似性があるが、真核生物の mRNA 合成のプロモーターは細菌のものとは異なり、細菌の RNA ポリメラーゼによって認識されない。細菌の RNA ポリメラーゼにとって重要な部位は、転写開始点より 35 塩基対と 10 塩基対上流にある -35 配列 (TTGACA) とプリブナウ配列 (TATAAT) である。RNA ポリメラーゼは、コア酵素と  $\sigma$  因子とで構成されており、-35 領域は  $\sigma$  因子の認識部位である。 $\sigma$  因子が -35 配列に統合するときにコア酵素はプリブナウ配列に結合する位置にくる。このため真核生物 DNA 配列を発現させるためには、細菌のプロモーターから下流にコード配列をおく必要がある。

原核生物においては、リボソームにある 16 SrRNA の 3' 末端領域と mRNA の開始コドンから 3 ~ 12 塩基上流にある 3 ~ 9 塩基配列とが相補的な関係にある。この mRNA の相補的部、シャイン・ダルガルノ (S-D) 配列により、mRNA が認識され、mRNA と 30S リボソームサブユニットとの間に複合体が形成されるため蛋白質合成が開始する。細菌において外来遺伝子を発現させるには、組換え DNA 分子にリボソーム結合部位を組み込む必要がある。

このように蛋白質の発現には、細菌プロモーターの下流に翻訳開始コドン (ATG)、リボソーム結合部位、コード配列をおかなければならない (図 3)。

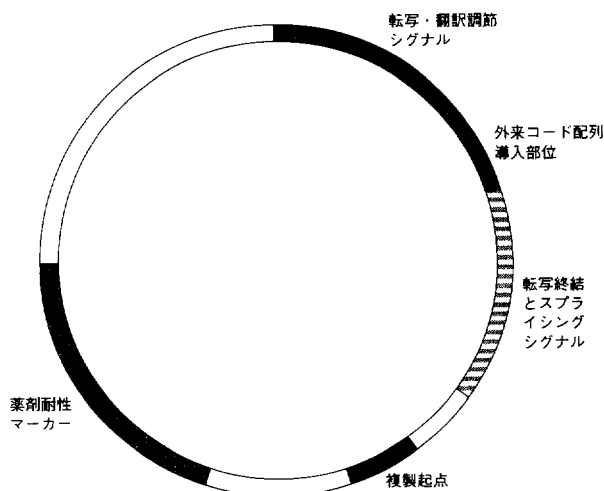


図3. 微生物中で発現するベクターの構成。

これらの条件と同時に、ベクターの発現のためには複製開始点 (ori) が、宿主細胞と適合していなければならない。この点で、大腸菌ベクターが海洋細菌細胞中で発現するとは限らないこととなる。このため、海産微生物の遺伝子操作には、海洋細菌の宿主ベクター系の開発が必要である。符ら (1993a) は海洋細菌数10株より、プラスミド保持菌3株を選択した。これらのプラスミドは約6~8 Kbp であり、ベクターとして使用し得る大きさと考えている。また、これらのプラスミドの中に薬剤耐性を示すものがあれば、マーカーとしての活用が可能となる。現在、これらプラスミドについては、ブルースクリプトにてクローニングを行い、デオキシ法を使用して全塩基配列の決定を試みている (符ら, 1993b)。これまで海産病原細菌のプラスミドの解析が精力的になされている (青木, 1991; Aoki and Takahashi, 1986) が、これらはサイズが大きく、ベクターとしては細胞中において不安定である可能性がある。

一方、海洋細菌への RK2 由来プラスミドの導入が行われた (吉枝ら, 1993)。電機穿孔法 (エレクトロポレーション法) によって導入されたベクターは、宿主細胞中ではプラスミドとしては存在せず、染色体 DNA に組み込まれていることが、パルスフィールド電気泳動とサザンブロット解析との組み合わせにより確認された。また、接合による導入もヘルパープラスミド pRK 2013 の利用により行われ、宿主細胞の形質発現が確認された。

ベクターの導入に用いる宿主細胞の選定も重要である。宿主細胞に毒素がなく、生産物が菌体外に分泌されること、また、細胞内外の強いプロテアーゼによる生産物の生産効率低下の防止等、いくつかの検討課題があげられる。また、新しい海産微生物用ベクターが特異な制限酵素切断部位を保持する場合には、新たな核酸分解酵素の探索が必要となる。海洋には核酸分解能を保持する細菌が多く分布すること、および酵素ヌクレアーゼの性状について報告されているが (Maeda and Taga, 1974; 1976a, b; Maeda *et al.* 1977)、今後の本分野研究の一層の進展が必要であろう。

以上述べた内容は、当所餌料生物研究室で現在行っている研究を基にしてまとめたものであるため、日頃参照している文献を中心に掲載した。他にも、魚病診断に新しい手法 (Arakawa *et al.* 1990; Arimoto *et al.* 1992) が採用されるなど、多くの優れた業績がある。これらを含め種々の領域の報文を掲載出来なかったことをお詫びする。

## 文 献

- 青木宏史・荻原佐太郎 1974. 弱毒ウイルスによるハウストマトのタバコモザイクウイルス防除 千葉県農試研報, 14: 135-143.
- 青木 宙 1991. 海洋微生物の遺伝子工学 宮地重遠 (監修) ラボマニュアル・マリンバイオテクノロジー, 裳華房, p. 130-155.
- Aoki, T. and A. Takahashi 1986. Tetracycline-resistant gene of a non-transferable R plasmid from fish-pathogenic bacteria *Aeromonas salmonicida*. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 52: 1913-1917.
- Arakawa, C. K., R. E. Deering, K. H. Higman, K. H. Oshima, P. J. O'hara and J. R. Winton. 1990. Polymerase chain reaction (PCR) amplification of a nucleoprotein gene sequence of infectious hematopoietic necrosis virus. Dis. Aquat. Org., 8: 165-170.
- 荒木道郎 1986. バクテリオファージを用いる新しいスライム生成防止方法. 工業用水, No. 332: 25-30.
- 荒木道郎 1991. バクテリオファージを用いた生物防除. 江草周三・駒田 且・岩花秀典 (編), バイオ農薬・水産薬の開発と利用, シーエム・シ出版, 194-291.
- Arimoto, M., K. Mushiaki, Y. Mizuta, T. Nakai, K. Muroga and I. Furusawa 1992. Detection of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Gyobyō Kenkyū, 27: 191-195.

- Beers, J. R., Stevenson, M. R., Eppley, R. W. and Brooks, E. R. 1971. Plankton populations and upwelling off the coast of Peru, June 1969. *Fishery Bull.*, **69**: 859-876.
- Burr, T. J., Schroth, M. N. and Suslow, T. 1978. Increased potato yields by treatment of seedpieces with specific strains of *Pseudomonas fluorescens* and *P. putida*. *Phytopathology*, **68**: 1377-1383.
- Byers, J. A. and Poinar, G. O. Jr. 1982. Location of insect hosts by the nematode, *Neoplectana carpocapsae*, in response to temperature. *Behaviour*, **79**: 1-10.
- Droop, M. R. and Elson, K. G. R. 1966. Are pelagic diatoms free from bacteria? *Nature*, **211**, 1096-1097.
- Fenchel, T. and Harrison, P. 1976. The significance of bacterial grazing and mineral cycling for the decomposition of particulate detritus. pp. 285-299, In "The role of terrestrial and aquatic organisms in decomposition processes". J. M. Anderson and A. Macfadyen (eds.), Blackwell, Oxford.
- Findlay, J. A. and Patil, A. D. 1984. Antibacterial constituents of the diatom *Navicula delognei*. *J. Nat. Prod.* **47**: 815-818.
- 符 勇・荒木和男・前田昌調 1993b. 海洋細菌由来プラスミド pTS1 の塩基配列について. 日本水産学会秋季大会講演要旨集, p. 77.
- 符 勇・吉枝 恵・前田昌調 1993a. 海洋細菌プラスミドの精製と性状比較. 日本水産学会秋季大会講演要旨集, p. 76.
- 後藤忠則・根本正康. 1971. 弱毒ウイルスによるウイルス病の防除. 安定弱毒ウイルスの選出と各種植物に対する影響. 北農試彙報, **99**: 67-76.
- 本城凡夫 1989. 水生植物のアレロパシー—微細藻類—植物間相互作用に関する化学物質—アレロパシー研究の現状と文献解題— 農水省農技研 p. 135-149.
- 本城凡夫・浅川牧夫 1990. アレロパシー物質 安元健編, 海洋微生物の生物活性物質. 恒星社厚生閣, p. 41-53.
- 本城凡夫・下鶴瀬忠・上田直子・花岡 資. 1978. 赤潮発生期における植物プランクトン組成の推移とその特徴. 日本プランクトン学会報, **25**: 13-19.
- Howell, C. R. and Stipanovic, R. D. 1979. Control of *Rizoctonia solani* on cotton seedlings with *Pseudomonas fluorescens* and with an antibiotic produced by the bacterium. *Phytopathology*. **69**: 480-482.
- Ignoff, C. M. 1975. Evaluation of *in vivo* specificity of insect viruses. pp. 52-57, In "Baculoviruses for insect pest control: Safety considerations." M. Summers *et al.* (eds.), American Society of Microbiology, Washington, D. C.
- Imada, C., Maeda, M. and Taga, N. 1985. Purification and characterization of the protease inhibitor "monastatin" from a marine *Alteromonas* sp. with reference to inhibition of the protease produced by a bacterium pathogenic to fish. *Can. J. Microbiol.*, **31**: 1089-1094.
- Imai, I., Y. Ishida and Y. Hata. 1993. Killing of marine phytoplankton by a gliding bacterium *Cytophaga* sp., isolated from the coastal sea of Japan. *Mar. Biol.*, **116**: 527-532.
- Johannes, R. E. 1964. Phosphorus excretion and body size in marine animals: microzooplankton and nutrient regeneration. *Science*, N. Y., **146**: 923-924.
- 門田 元・多賀信夫 (編) 1985. 海洋微生物研究法. 学会出版センター, 307 pp.
- Kamei, Y., Yoshimizu, M., Ezura, Y. and Kimura, T. 1987. Screening of bacteria with antiviral activity against infections hematopoietic necrosis virus (IHNV) from estuarine and marine environments. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **53**: 2179-2185.
- Kamei, Y., Yoshimizu, M., Ezura, Y. and Kimura, T. 1988. Screening of bacteria with antiviral activity from fresh water salmonid hatcheries. *Microbiol. Immunol.*, **32**: 67-73.
- 筧原正五郎・平野礼次郎・大島泰雄. 1960. クロダイ人工孵化仔魚の飼育とその成長について. 日水誌, **26**: 239-243.
- Kashiwagi, M., Minderse, J. S. Moore, R. E. and Norton, T. R. 1980. Antineoplastic evaluation of pacific basin marine algae. *J. Pharm. Sci.*, **69**: 735-738.
- 河合 章・杉田治男・出口吉昭 1988. 水族環境学実験. 恒星社厚生閣, 106 pp.
- 川瀬茂実 1984. 昆虫のウイルス. 遺伝, **38** (11): 169-181.
- Kirchman, D., Graham, S., Reish, D. and Mitchell, R. 1982. Lectins may mediate in the settlement and metamorphosis of *Janua (Dexiospira) brasiliensis* Grube (Polychaeta: Spirorbidae). *Mar. Biol. Lett.*, **3**: 131-142.
- Konishi, F., Tanaka, K., Himeno, K., Taniguchi, K. and Nomoto, K. 1985. Antitumor effect induced by a hot

- water extract of *Chlorella vulgaris* (CE): Resistance to Meth-A tumor growth mediated by CE-induced polymorphonuclear leukocytes. *Cancer Immunol. Immunother.*, **19**: 73-78.
- Krassiltschik, I. M. 1888. La production industrielle des parasites vegetaux pour la destruction des insectes nuisibles. *Bull. Sci. France et Belgique*, **19**: 461-472.
- Kutt, E. C. and Martin, D. F. 1975. Report on a biochemical red tide repressive agent. *Environ. Lett.*, **9**: 195-208.
- 前田昌調 1986. 餌料微生物—細菌. 河合 章編, 水産増養殖と微生物, 恒星社厚生閣, p. 101-114.
- Maeda, M. 1986. An illustrated guide to the species of the Families Halteriidae and Strobiliidae (Oligotrichida, Ciliophora), free swimming protozoa common in the aquatic environment. *Bull. Ocean Res. Inst., Univ. Tokyo*, No. 21, 67 pp.
- 前田昌調 1987. 微生物食物連鎖. 微生物の生態, 学会出版センター, No. 15, 27-35.
- 前田昌調 1988. 微生物食物連鎖と水産増養殖. *海洋科学*, **20** (1): 24-28.
- Maeda, M. 1988. Microorganisms and protozoa as feed in mariculture. *Prog. Oceanog.*, **21**: 201-206.
- Maeda, M. and Carey, P. G. 1985. An illustrated guide to the species of the Family Strombidiidae (Oligotrichida, Ciliophora), free swimming protozoa common in the aquatic environment. *Bull. Ocean Res. Inst., Univ. Tokyo*, No. 19, 68 pp.
- Maeda, M., Lee, W. J. and Taga, N. 1983. Distribution of lipopolysaccharide, an indicator of bacterial biomass, in subtropical areas of the sea. *Mar. Biol.*, **76**: 257-262.
- Maeda, M. and I. C. Liao 1992. Effect of bacterial population on the growth of a prawn larva, *Penaeus monodon*. *Bull. Natl. Res. Inst. Aquaculture*, No. 21: 25-29.
- Maeda, M., K. Nogami and N. Ishibashi. 1992. Utility of microbial food assemblages for culturing a crab, *Portunus trituberculatus*. *Bull. Natl. Res. Inst. Aquaculture*, No. 21: 31-38.
- 前田昌調・野上欣也・廖 一久 1991. バイオ水産薬としての微生物を用いた魚介類の成長促進および病害防除. 江草周三, 駒田 旦, 岩花秀典 (編), バイオ農薬・水産薬の開発と利用, シーエムシー出版, 178-193.
- 前田昌調・野上欣也・廖 一久 1992. 水産増養殖におけるバイオコントロール. 微生物の生態, 学会出版センター, No. 18: 133-148.
- Maeda, M., U. Simidu and N. Taga. 1977. Generic composition of deoxyribonucleic acid-hydrolyzing bacteria in seawater. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **43**: 47-52.
- Maeda, M. and N. Taga 1974. Occurrence and distribution of deoxyribonucleic acid-hydrolyzing bacteria in sea-water. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **14**: 157-169.
- Maeda, M. and N. Taga. 1976a. Extracellular nuclease produced by a marine bacterium I. Extracellular deoxyribonuclease formation by a marine *Vibrio* sp. *Can. J. Microbiol.*, **22**: 1437-1442.
- Maeda, M. and N. Taga. 1976b. Extracellular nuclease produced by a marine bacterium II. Purification and properties of extracellular nuclease from a marine *Vibrio* sp. *Can. J. Microbiol.*, **22**: 1443-1452.
- 牧野孝宏 1986. 根頭がんしゅ病の新防除法. 今月の農薬, **30** (1): 116-121.
- Maruyama, I., Nakamura, T., Matsubayashi, T., Ando, Y. and Maeda, T. 1986. Identification of the alga known as "marine *Chlorella*" as a member of the Eustigmatophyceae. *Japan. J. Phycol.*, **34**: 319-325.
- McKinney, H. H. 1929. Mosaic diseases in the Canary Islands, West Africa and Gibraltar. *J. Agr. Res.*, **39**: 557-578.
- Metting, B. and Pyne, J. W. 1986. Biologically active compounds from microalgae. *Enzyme Microb. Technol.*, **8**: 386-394.
- Miyazawa, Y., Murayama, T., Ooya, N., Wang, L. F., Tung, Y. C. and Yamaguchi, N. 1988. Immunomodulation by a unicellular green algae (*Chlorella pyrenoidosa*) in tumor-bearing mice. *J. Ethnopharmacol.*, **24**: 135-146.
- Nagai, H., Satake, M., Murata, M. and Yasumoto, T. 1990. Screening of marine phytoplankton for antifungal substances. In: E. Graneli *et al.* (ed.), *Proceedings of 4th International Conference on Toxic Phytoplankton*, Elsevier, North-Holland, p. 385-390.
- Nagasaki, K., M. Ando, I. Imai, S. Itakura and Y. Ishida. 1993. Virus-like particles in an apochlorotic flagellate in Hiroshima Bay, Japan. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **96**: 307-310.
- Nakajima, K., Uchida, A. and Ishida, Y. 1989a. A new feeding attractant, dimethyl- $\beta$ -propiethetin, for freshwater fish. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **55**: 689-695.

- Nakajima, K., Uchida, A. and Ishida, Y. 1989b. Effect of supplemental dietary feeding attractant, dimethyl- $\beta$ -propiothetin, on growth of goldfish. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 55: 1291.
- 中村啓子・押柄和幸・清水将年・高田容司・西岡里佳・大江田憲治・大川秀郎 1988. *Bacillus thuringiensis aizawai* 株殺虫蛋白の構造と機能. *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, 62(3): 83.
- 中沢昭三・黒田浩之・安部史志・西野武志・大槻雅子 1974. 海藻成分の抗腫瘍作用に関する研究, 第1報. *Chemotherapy*, 22(9): 1435-1442.
- Neumann, R. 1979. Bacterial induction of settlement and metamorphosis in the planula larvae of *Cassiopea andromeda* (Cnidaria: Scyphozoa, Rhizostomeda). *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 1: 21-28.
- 西尾孝之・石田祐三郎 1987. 琵琶湖内湖における鉄の可溶化に関わる微生物の役割. 水資源研究センター(京都大学) 研究報告, 7: 3-12.
- Nishio, T., Tanaka, N., Hiratake, J., Katsube, Y. and Ishida, Y. 1988. Isolation and structure of the novel dihydroxamatesiderophore Alcaligin. *J. Amer. Chem. Soc.*, 110: 8733-8734.
- 西沢一俊 1990. ガンと海藻. *食品と開発*, 25: 32-38.
- Nogami, K. and M. Maeda. 1992. Bacteria as biocontrol agents for rearing larvae of the crab *Portunus trituberculatus*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 49: 2373-2376.
- Norris, J. R. 1964. The classification of *Bacillus thuringiensis*. *J. Appl. Bacteriol.*, 27: 439-447.
- 大島信行・小餅昭二・後藤忠則 1965. 弱毒ワクチンによるウイルス病の防除. トマトモザイク病の防除(1) 北農試彙報, 85: 23-33.
- 大島俊市 1960. 拮抗菌利用による白絹病の防除. *植物防疫*, 14(3): 117-118.
- Patterson, G. M. L., Norton, T. R., Furusawa, E., Furusawa, S., Kashiwagi, M. and Moore, R. E. 1984. Antineoplastic evaluation of marine algal extracts. *Bot. Mar.*, 27: 485-488.
- Pennec, M. Le, Prieur, D. and Lucas, A. 1984. Studies on the feeding of a hydrothermal-vent mytilid from the East Pacific Rise. In: P. E. Gibbs (ed.), *Proc. 19th European Mar. Biol. Sympo.*, Cambridge Univ. Press, p. 159-166.
- Pesando, D. 1972. Etude chimique et structurale d'une substance lipidique antibiotique produite par une Diatomee marine, *Asterionella japonica* (Cleve). *Rev. Int. Oceanogr. Med.*, 25: 49-70.
- Pincemin, J. M. 1969. Apparition d'une eau rouge a *Cochlodinium* sp. devant Juan les-Pins. *Rev. Int. Oceanogr. Med.* 13/14: 205-216.
- Pincemin, J. M. 1971. Telemediateurs chimiques et equilibre biologique oceanique. Troisieme partie. Etude *in vitro* de relations entre populations phytoplanktoniques. *Rev. Int. Oceanogr. Med.* 22/23: 165-196.
- Pratt, D. M. 1966. Competition between *Skeletonema costatum* and *Olisthodiscus luteus* in Narragansett Bay and in culture. *Limnol. Oceanogr.*, 11: 447-455.
- Pratt, R., Daniels, T. C., Eiler, J. J., Gunnison, J. B., Kurler, W. D., Oneto, J. F., Strait, L. A., Spoehr, H. A., Hardin, G. J., Milner, H. W., Smith, J. H. C. and Strain, H. H. 1944. Chlorellin, an antibacterial substance from *Chlorella*. *Science*, 99: 351-352.
- Provasoli, L. and Pintner, I. J. 1980. Bacteria induced polymorphism in an axenic laboratory strain of *Ulva lactuca* (Chlorophyceae). *J. Phycol.*, 16: 196-201.
- Ryder, J. A. 1881. The protozoa and protophytes considered as the primary or indirect source of the food of fishes. *Bull. U. S. Fish Commission*, 1: 236-251.
- Salaman, R. N. 1933. Protective inoculation against a plant virus. *Nature*, 131: 468.
- Seki, H. 1966. Studies on microbial participation to food cycle in the sea. III. Trial cultivation of brine shrimp to adult in a chemostat. *J. Oceanogr. Soc. Japan*, 22: 27-32.
- 関 哲夫・菅野 尚 1981. アワビ足隠粘液状物質によるエゾアワビ被面子幼生の着底誘起. 東北水研研究報告, No. 43: 29-36.
- 高山晴義 1979. *Noctiluca scintillans* および *Gyrodinium* sp. による *Gymnodinium* 属の捕食について. In: *Gymnodinium* 属赤潮の挙動と増殖機構の解明に関する研究, 昭和53年度報告書, 水産庁, 環境庁, p. 107-113.
- 田中渥男 1985. 固定化生体触媒—基礎から応用へ. 福井三郎監修・編, バイオリクター, 講談社サイエンスティフィク, p. 1-75.
- Tanaka, K., Konishi, F., Himeno, K., Taniguchi, K. and Nomoto, K. 1984. Augmentation of antitumor resistance by a strain of unicellular green algae, *Chlorella vulgaris*. *Cancer Immunol. Immunother.*, 17: 90-94.

- 谷口道子 1993. 生物的手法による漁場改善. 水産増養殖における環境研究の現状と展望 —好適な生産環境の構築にむけて, 水産養殖研究推進全国会議要旨集, 水産庁養殖研, p. 24-25.
- Tezuka, Y. 1974. An experimental study on the food chain among bacteria, *Paramecium* and *Daphnia*. Int. Rev. Gesamten Hydrobiol., 59: 31-39.
- Weiner, R. M., Segall, A. M. and Colwell R. R. 1985. Characterization of a marine bacterium associated with *Crassostrea virginica* (the Eastern oyster). Appl. Environ. Microbiol., 49: 83-90.
- Whisler, H. C., Zebold, S. I. and Shemanchuk, J. A. 1974. Alternate hosts for mosquito parasite *Coelomomyces*. Nature, 251: 715-716.
- 吉枝 恵・中山一郎・符 勇・前田昌調 1993. 海洋細菌への RK2 プラスミド由来遺伝子の導入. 日本水産学会秋季大会講演要旨集, p. 77.
- Yoshimizu, M., Myouga, H., Kamei, Y., Ezura, Y. and Kimura, T. 1989. Production of antiviral substances by bacterial cells immobilized alginate beads. In: Miyachi, S. *et al.* (eds.), Current Topics in Marine Biotechnology, Japan, Soc. Mar. Biotechnol., Tokyo, p. 77-80.
- Yu, J-P., Hino, A., Ushiro, M. and Maeda, M. 1989. Function of bacteria as vitamin B<sub>12</sub> producers during mass culture of the rotifer *Brachionus plicatilis*. Nippon Suisan Gakkaishi, 55: 1799-1806.