

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H02539

研究課題名(和文)病害防御機能を持つ魚類表皮由来プロバイオティクス の作用メカニズムの解明

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanism in disease protection of the fish epidermis-derived probiotics.

研究代表者

中谷 肇(Nakatani, Hajime)

名古屋大学・工学研究科・講師

研究者番号：80456615

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：魚類の病原菌の増殖を抑える細菌*Pseudomonas mosselii* KHZF1を水中に複数回投入すると、魚への病原菌感染を抑える効果があることを示した。その効果は、水中投与することで、KHZF1の表皮細菌叢における割合が大きく増加する効果と、KHZF1が生産する抗菌物質により発揮されることが示唆された。KHZF1が生産する抗菌物質の同定を試み、抗菌物質がPseudoiodinineと呼ばれる既知の物質であることが明らかとなり、この物質は低濃度で様々な魚類病原菌に対して増殖抑制効果を示した。今後は病害防除効果の発揮に抗菌物質がどのように関わっているかを明らかにする。

研究成果の学術的意義や社会的意義

広い科学の観点から魚介類表皮プロバイオティクス技術の基盤となる研究は、魚介類の表面をモデルとしたホスト-微生物叢間の相互作用に関する基礎的研究ともいえる。次世代シーケンス技術の発達によりDNAの網羅的なシーケンスが可能となって以来、動物や植物の表面や、環境に形成されている微生物叢がそれらの動植物の健康や生態系サービスにとって重要な役割を持つことが明らかになっている。このように現在、微生物叢の構成の重要性が様々な分野で認識されつつあるなかで、本研究開発で得られた知見は、将来的に魚介類の養殖にとどまらず、環境・医療・農業・水産など様々な分野での活用がみこまれる。

研究成果の概要(英文)：It has been shown that multiple administrations of the bacterium *Pseudomonas mosselii* KHZF1, which suppresses the growth of fish pathogens, into water, have an effect on suppressing pathogenic infections in fish. The effect is suggested to be due to a significant increase in the proportion of KHZF1 in the fish's skin microbiota by administration into the water and the antibacterial substances produced by KHZF1. Attempts to identify the antibacterial substances produced by KHZF1 have revealed that the antibacterial substance is a known substance called Pseudoiodinine, which showed inhibitory effects on the growth of various fish pathogens at low concentrations. Further research is needed to clarify the role of the antibacterial substance in the manifestation of disease control effects.

研究分野：応用微生物学

キーワード：プロバイオティクス 細菌叢 魚病

1. 研究開始当初の背景

魚類は水中で生活することから、空気中よりもはるかに多くの活性の高い微生物に表皮がさらされている。したがって、魚類の表皮は腸上皮と同様に、病原体から身を守るための重要なバリアーとしての役割を担っている。そこでは、腸管同様に表皮粘膜層の微生物フローラと表皮の免疫組織が病原体の体内への侵入を阻止していると考えられており、表皮の傷や表皮細菌フローラの変動は病原体の感染リスクを高めることが示唆されている (1, 2, 3)。そこで申請者らのグループは近年、表皮を対象とした魚病の微生物防除という視点(魚類表皮版のプロバイオティクス)での研究を開始し、魚類の表皮由来有用細菌が病原菌の感染を防ぐことを明らかにした。一方で、ヒトや動物の腸内細菌を対象としたプロバイオティクスに関する先行研究から、プロバイオティクスを実用的な病害防御法として確立するためには、有用微生物による病害防除の作用メカニズムを明らかにし、それが定着作用する場所にどのような性質の細菌フローラが形成されており、有用微生物やホストの免疫作用によってどのような影響を受けるかを知る必要があるものと考えられるが (4, 5)、申請者らが提唱した魚類表皮プロバイオティクスについては上記の知見がほとんどないに等しい。そこで本研究では、「魚類表皮プロバイオティクスがどのようなメカニズムで病原菌感染を防ぐのか」を明らかにするために、1. 抗菌物質を介した表皮由来プロバイオティクスと表皮細菌フローラおよび病原性細菌との相互作用、2. ホストへの定着、3. ホスト表皮の免疫作用に与える影響について注目した。

2. 研究の目的

本研究では、魚類表皮由来プロバイオティクスが病害防除作用を示すメカニズムを表皮細菌フローラや病原菌との関係、およびホストの免疫作用との関係を切り口に明らかにすることを目的とした。これにより、病害防除に有効な表皮細菌フローラを魚類に構成するための方法論である「魚類表皮版プロバイオティクス」という新たな病害防除の実現可能性を示すことを目指した。

3. 研究の方法

・微生物の培養

Aeromonas hydrophila, *Edwardsiella tarda*, *Vibrio ordalii*, *Vibrio anguillarum* の培養には Nutrient broth No.2 (NB2) 培地および Trypticase soy broth (TSB) 培地を用い、28°C で振盪培養した。*Bacillus subtilis*, 有用細菌 *Pseudomonas mosselii* KH-ZF1 の培養には Nutrient broth No.2 (NB2) 培地を用い、感染防除試験に用いる菌体は 20°C で振盪培養することにより得た。*Yersinia ruckeri* の培養には LB 培地を用い、28°C で振盪培養した。*Streptococcus iniae* には TSB 培地 28°C で振盪培養した。酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) と *Candida cylindracea* には YPAD 培地を用い 30°C で振盪培養した。合成培地中への抗菌物質の生産を行う場合には、0.4% のグルコースを含む M9 培地を用いた。合成培地での Pseudoiodinine 生産条件および非生産条件は 0.4% グルコースを含む M9 培地に塩化鉄 (II) を終濃度 10 µg/mL を添加する条件および添加しない条件で培養することで実現した。

・次世代シーケンサーによるシーケンス解析と細菌叢解析

次世代シーケンサーのライブラリー調製はイルミナ社より提供されているプロトコル (16S Metagenomic Sequencing Library Preparation ; 15044223 Rev. A; illumina) を参考にして行った。得られたライブラリーをイルミナ社より提供されているプロトコル (iSeq 100 Sequencing System Guide; 1000000036024 v00 JPN; illumina) を参考にして希釈し、シーケンスに供した。シーケンスによって得られた配列情報を CLC Genomic Work Bench (Filgen) を用いて *in silico* 解析を行った。iSeq によって得られた fastq データをソフトウェアにインポートし、クオリティーチェックとトリミング後、OTU Clustering の機能を用いて operational taxonomic unit (OTU) ごとに分類分けした。リファレンスデータベースとして上記の SILVA 16s 97% を用い、さらに一致率が 97% 未満 90% 以上の配列を再度分類した。データベース上の配列と一致率が 90% 以下の配列は破棄した。得られた分類結果は積み上げグラフにより表現した。

・PCR による細菌特異的な遺伝子および遺伝子発現の検出

Yersinia ruckeri を検出するためのプライマーとして *gluA* 特異的プライマー(6)を用いた。また、ゼブラフィッシュの各種サイトカイン・ケモカイン・β アクチンを検出するプライマーはデータベース上の遺伝子配列を参考に設計した。遺伝子発現量の解析にはゼブラフィッシュ表皮より取得した RNA から逆転写酵素によって cDNA ライブラリーを調製し、これをテンプレートにリアルタイム PCR を行った。

・抗菌活性試験

KH-ZF1 による液体培地中での抗菌活性を確かめるために、カナマイシン耐性をもつ *Y. ruckeri*::lacZ と KH-ZF1 を NB2 培地で共培養し、*Y. ruckeri* の生菌数の変化を経時的に測定した。

また、カナマイシン耐性を付与した KH-ZF1 と野生型 *Y. ruckeri* を用いて同様のアッセイをし、KH-ZF1 の生菌数の変化を経時的に測定した。抗菌活性試験にはディスク拡散法を用いた。好気条件下での抗菌物質による増殖阻害を検証するために、液体振とう培養に抗菌物質を添加したときの病原菌の増殖曲線を測定した。培養開始から 0、12、24、36、48 時間毎に培養液 150 μ L 程度をサンプリングし、O.D.₆₀₀ を測定した。病原菌には *A. hydrophila*、*E. tarda*、*V. ordalii*、*V. anguillarum*、*Y. ruckeri* を使用した。

・KH-ZF1 が生産する抗菌物質の分離精製と抗菌物質の同定・最小増殖阻止濃度 (MIC) の測定
KH-ZF1 の培養上清を有機溶媒抽出し、さらに抗菌物質を分離するために、シリカゲルクロマトグラフィーを行い、目的物質を含む赤紫色の画分得た。溶出画分について、高速液体クロマトグラフィーによるさらなる分離精製を行った。分取精製物は必要に応じてクロロホルムで分液抽出し、クロロホルム相を回収・減圧留去して次の実験に適した溶媒で再溶解した。目的の抗菌物質の分子量を得るために、LC/MS 分析を行った。さらに構造情報を得るために、核磁気共鳴スペクトル測定を行った。最終的な構造決定に X 線結晶構造解析を行った。X 線結晶構造解析は、多層膜モノクロメーター Mo K α ラジオ波を搭載した Rigaku Xta LAB P200 diffractometer を用いて測定した。MIC 測定方法は先行論文 (7) を参考にして行った。使用培地について、*E. tarda*、*V. ordalii*、*V. anguillarum*、*Bacillus subtilis* には NB2 培地、*Streptococcus iniae* には TSB 培地、酵母と *C. cylindracea* には YPAD 培地を用い、それ以外の細菌については Mueller Hinton broth (MHB) 培地 (17.5 g/L カザミノ酸、2 g/L 牛肉エキス、1.5 g/L デンプン) を用いた。

・KH-ZF1 のゲノム解析および RNAseq による遺伝子発現解析

イルミナシーケンサー (iSeq 100) およびナノポアシーケンサー (MiniON) でのシーケンスを行い、シーケンスデータを得た。シーケンスデータはデータクオリティーを確認後、Unicycler を用いてハイブリッドアセンブリを行った。ハイブリッドアセンブリ得られた環状ゲノム配列につて、RAST を利用してアノテーションを行った。RNAseq に用いる RNA は抗菌物質を生産している培養条件 3 サンプルとしていない培養条件 3 サンプルよりトータル RNA を抽出した。RNAseq によるデータの取得は外部に委託し、得られた fastq シーケンスデータを CLC Genomic Work Bench を用いて、アノテーション済 KH-ZF1 ゲノム配列にマッピングし、マッピングされたリードの数をもとに発現解析を行った。

・動物実験

ゼブラフィッシュへの *Y. ruckeri* の感染実験と飼育水およびゼブラフィッシュの表皮のサンプリング、サンプルからのゲノム抽出は先行研究 (6) と同様の方法で行った。感染防除実験は感染実験の期間の特定の日に 1 回又は 2 回 KH-ZF1 を水中に O.D.₆₀₀ 0.01 (2 回投与の場合) 又は 0.02 (1 回投与の場合) となるように加え、魚の生存率を約 1 週間観察した。生存時間解析の計算には R-studio (<https://rstudio.com/>) を使用した。生存時間解析の結果は Kaplan-Meier 曲線で表した。各曲線の有意差はログランク検定を用いて計算した。ゼブラフィッシュの表皮上 KH-ZF1 および *Y. ruckeri* 絶対量の計測は、KH-ZF1::mCherry もしくはカナマイシン耐性をもつ *Y. ruckeri*::lacZ を暴露したゼブラフィッシュを麻酔後、選択培地にスプレッティングし、現れた mCherry を発現する KH-ZF1 のコロニーもしくは青色を呈する *Y. ruckeri* のコロニーの数を計測した。サンプルの希釈率から魚あたりの KH-ZF1 および *Y. ruckeri* の絶対数を求めた。In situ における *Y. ruckeri* および KH-ZF1 の観察は、KH-ZF1::mCherry もしくはカナマイシン耐性をもつ *Y. ruckeri*::lacZ を暴露したゼブラフィッシュを用いた。KH-ZF1::mCherry の蛍光観察に用いる顕微鏡は Axio Zoom.V16 (Carl Zeiss) を使用した。KH-ZF1::mCherry を暴露したゼブラフィッシュにトリカイン溶液で麻酔をかけ、滅菌飼育水で軽く洗浄後、蛍光観察した。*Y. ruckeri* の観察はゼブラフィッシュを X-gal で染色後、魚全体をマイクロスコブを用いて観察した。



図 1. KH-ZF より分離同定された抗菌物質 Pseudoiodinin

4. 研究成果

ゼブラフィッシュの表皮粘液由来の有用細菌 *Pseudomonas mosselii* KH-ZF1 株が生産する抗菌物質の同定

ゼブラフィッシュの表皮粘液から得られた有用細菌 *Pseudomonas mosselii* KH-ZF1 株について、これが産生する抗菌物質を探るため、液体培地での抗菌物質の産生を試み、*Yersinia ruckeri* との共培養の結果から抗菌物質が液体培養によって 12 時間以降に産生されることが示唆された。次に、培養上清液からの抗菌物質の分離・精製を試み、最終的に、赤紫色の抗菌活性を含む画分が得られた (図 1)。LC-MS による質量分析と MNR 測定、X 線結晶構造解析の結果、Pseudoiodinin (3-methoxy-7-methyl-7H-pyrazolo[4,3-e][1,2,4]triazine) として同定された (図 1)。この物質は、*Pseudomonas fluorescens* var. *pseudoiodinum* が産生する色素として知られており (8)、本研究では初めて *Pseudomonas mosselii* KH-ZF1 もこの物質を産生することを示した。魚類病原菌に対する

Pseudoiodinine の抗菌活性を決定するために、最小抑制濃度 (MIC) をさまざまな魚病原菌に対して測定した。その結果、以前の報告 (9) とは対照的に、多くの魚類病原菌に対して、Pseudoiodinine が低い MIC (0.5-4.0 µg/mL) で抗菌活性を示すことが明らかとなった。これらの病原菌に対して、Pseudoiodinine が振とう培養条件下でも増殖抑制効果を示した。さらに、Pseudoiodinine の生産に関与する遺伝子を探るために KH-ZF のゲノム解析および RNAseq による遺伝子発現解析を行ったが、Pseudoiodinine の合成に直接つながる代謝系の同定には至らなかった。

Pseudomonas mosselii KH-ZF1 株投与による表皮細菌叢への影響

KH-ZF1 投与による細菌叢への影響について探索を行った。KH-ZF1 を飼育水に入れた後の魚の表皮、鰓、腸における KH-ZF1 の存在比を菌叢解析により探索したところ、表皮では KH-ZF1 に関連する OTU の占有率が初回投与後 24 時間後に増加したが、占有率は次の投与まで徐々に減少した。2 回目の投与後、占有率が再び増加したが、初回投与後の増加率よりも低かった。投与後、*Shewanella* 属、*Flavobacterium* 属および *Acinetobacter* 属の占有率が徐々に増加した。これらのことから、KH-ZF1 の投与は表皮細菌叢の特定の細菌種の占有率に影響することが示唆された。KH-ZF1 の他の組織での挙動を確認するために、投与後にエラと腸管内容物の細菌叢分析を行った。その結果、鰓、腸管内容物共に KH-ZF1 関連 OTU の占有率が投与後 1 日で上昇し、投与後 3 日で低下したことが示された。表皮の KH-ZF1 について、投与後の絶対量を測定したところ、投与後 24 時間後には、表皮上の KH-ZF1 の数は約 $10^6 \sim 10^7$ CFU/魚であったが、投与後 2 日目と 3 日目には 10^4 CFU/魚に減少した。追加投与を 1 回目の投与後 3 日目に行ったところ、2 回目の投与後 24 時間後には、KH-ZF1 の数は 10^6 CFU/魚に増加した。2 回目の投与後 4 日目 (1 回目の投与後 7 日目) には、KH-ZF1 の数は約 10^5 CFU/魚に減少した。一方、追加の投与を行わなかった場合、1 回目の投与後 7 日目には KH-ZF1 の数が 10^3 CFU/魚に減少した。次に、投与後の KH-ZF1 について、ゼブラフィッシュの表皮上で観察を試みた。曝露後 24 時間後、KH-ZF1 株は魚の表面に観察され、特に *Y. ruckeri* に感染するための感染経路としてつけられた表皮の傷近くに観察された。ゼブラフィッシュに暴露した *Y. ruckeri* を X-gal 染色により観察したところ、主に表皮に検出され、鰓の組織にも一部検出された。これらのことから *Y. ruckeri* の感染を防止している主な部位は、表皮の傷口付近であることが示唆された。

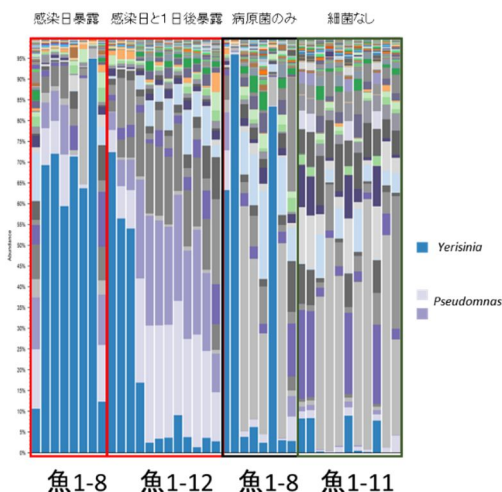


図 2. 感染防除実験における表皮細菌叢の解析 *Y. ruckeri* を暴露した 3 日後の各実験群のゼブラフィッシュ表皮細菌叢を解析した。

与条件では、多数の個体において表皮における KH-ZF1 関連 OTU (*Pseudomonas* 属) の占有率が高くなっており、生存率が低下した投与条件では多数の個体の表皮が *Y. ruckeri* に占有されていた (図 2)。これは、KH-ZF1 を 2 回投与した後に生存率が向上したメカニズムに、表皮細菌叢における KH-ZF1 の割合の大幅な増加が関係していることを示していた。魚表皮への病原菌の付着とそこでの増殖に対する KH-ZF1 投与の効果を探るために、感染防除実験において、生存魚と死亡魚の表皮上の *Y. ruckeri* の絶対量を CFU で測定した。その結果、死亡魚の表皮では非常に多くの *Y. ruckeri* が検出され、生存魚ではどの投与条件でも少ない量の *Y. ruckeri* しか検出されなかった。KH-ZF1 の 2 回投与により斃死魚の数が減少しているため、KH-ZF1 の連続投与が *Y. ruckeri* の増殖を抑えたと思われる。一方で生存個体上での *Y. ruckeri* の絶対量は KH-ZF1 を 1 回投与した群でやや増加する傾向がみられた (図 3)。この結果と、複数回投与で KH-ZF1 の絶対量が増加することも加味すると、KH-ZF1 の 1 回目の投与は水中の病原菌および KH-ZF1 自身の付着を促進することが示唆された。KH-ZF1 投与による魚の免疫系への影響を探索するために、有用菌、病原菌暴露後の表皮組織におけるサイトカイン・ケモカイン遺伝子発現の検出について検討したが、病原菌及び有用菌を暴露した場合について、各種サイトカインの発現パターンに再現性がなく、詳しい解析にはプライマー配列や増幅条件の検討などの多くの検証が必要となった。

KH-ZF1 株投与による感染防除効果と表皮細菌叢の関係

次に、KH-ZF1 株と *Y. ruckeri* を同時に投与し、KH-ZF1 による感染防除実験を行なった。KH-ZF1 の投与回数を 1 回または 2 回とし、投与のタイミングを変化させた場合に、魚の生存率がどのように変化するかを観察した。その結果、*Y. ruckeri* に暴露した直後と暴露後 24 時間後に再度 KH-ZF1 を投与すると、生存率が有意に上昇することが明らかとなった。KH-ZF1 を単回投与した場合は、最終的な生存率の改善は見られなかった。また、病原体に暴露した直後に KH-ZF1 を単回投与した場合は、病原菌のみを暴露した場合と比べて生存期間が短くなる傾向がみられた。感染防除実験で生存率が改善された 2 回投与を行った条件と、生存率が低くなった 1 回投与を行った条件、および *Y. ruckeri* を単独で暴露した条件において、病原体曝露後 3 日目における表皮細菌叢を分析した。その結果、生存率が向上した投

表皮粘液由来抗菌性細菌による水中細菌の付着促進

より養殖環境に近い条件での表皮粘液由来抗菌性細菌の投与効果を検証するため、*Y. ruckeri* が本来感染する魚種であるニジマスを用いて検証を行った。以前の研究で分離されたニジマスの表皮由来の抗菌性 *Pseudomonas* 属細菌 (KH-RT1, KH-RT2, KH-RT3, KH-RT3) をニジマスに投与することで、ゼブラフィッシュでみられた表皮細菌叢の変化がみられるか検証した。4種類の菌株を、飼育温度 15 一定に保ち飼育した、ニジマスに 2 回投与し、1 回目の投与時には *Y. ruckeri* を 1 回暴露したところ、2 回投与後にニジマス表皮細菌叢が変動し、変動時に抗菌性細菌もしくは *Y. ruckeri* 表皮細菌叢における占有率が増加した。この結果から表皮由来の抗菌性細菌の投与が水中の細菌の付着を促進することが示された (10)。

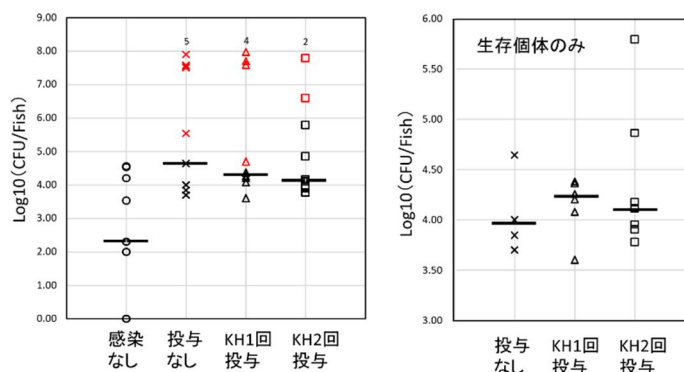


図 3. 感染防除実験における表皮の *Y. ruckeri* の絶対量の比較

Y. ruckeri を暴露した群の斃死率が 40% 以上となったときの KH-ZF1 投与群のゼブラフィッシュ表皮上の *Y. ruckeri* の絶対量を比較した。図中の赤色マーカーの個体は斃死個体を示す。図中の数字は斃死数を示す。図中の横線は中央値を示す。各群 10 個体より細菌数を計測した。

参考文献

1. Liu, X.; Wu, H.; Liu, Q.; Wang, Q.; Xiao, J.; Zhang, Y. Skin-injured zebrafish, *Danio rerio*, are more susceptible to *Vibrio anguillarum* infection. *J. World Aquac. Soc.* 2015, 46, 301–310.
2. Reid KM, Patel S, Robinson AJ, Bu L, Jarungsriapisit J, Moore LJ, Salinas I. Salmonid alphavirus infection causes skin dysbiosis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) post-smolts. *PLoS One.* 2017, 12, e0172856.
3. Zhang X, Ding L, Yu Y, Kong W, Yin Y, Huang Z, Zhang X, Xu Z. The change of teleost skin commensal microbiota is associated with skin mucosal transcriptomic responses during parasitic infection by *Ichthyophthirius multifiliis*. *Front Immunol.* 2018, 18, 2972.
4. Shreiner AB, Kao JY, Young VB. The gut microbiome in health and in disease. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 2015, 31, 69-75.
5. Giatsis C, Sipkema D, Ramiro-Garcia J, Bacanu GM, Abernathy J, Verreth J, Smidt H, Verdegem M. Probiotic legacy effects on gut microbial assembly in tilapia larvae. *Sci. Rep.* 2016, 6, 33965
6. Nakatani H, Hori K. Establishing a Percutaneous infection model using zebrafish and a salmon pathogen. *Biology.* 2021, 10, 116.
7. Imai Y, Meyer KJ, Iinishi A, Favre-Godal Q, Green R, Manuse S, Caboni M, Mori M, Niles S, Ghiglieri M, Honrao C, Ma X, Guo JJ, Makriyannis A, Linares-Otoya L, Böhringer N, Wuisan ZG, Kaur H, Wu R, Mateus A, Typas A, Savitski MM, Espinoza JL, O'Rourke A, Nelson KE, Hiller S, Noinaj N, Schäberle TF, D'Onofrio A, Lewis K. A new antibiotic selectively kills Gram-negative pathogens. *Nature*, 2019, 576, 459–464.
8. Korth, H. *Pseudomonas fluorescens* var. *pseudoiodinum*. *Zbl. Bakteriologie. I Abt. Orig.* 1970, 215, 461–465.
9. Smirnov VV, Kiprianova EA, Garagulya AD, Esipov SE, Dovjenko SA. Fluviols, bicyclic nitrogen-rich antibiotics produced by *Pseudomonas fluorescens*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1997, 153, 357–361.
10. Nakatani H, Yamada N, Hashimoto N, Okazaki F, Arakawa T, Tamaru Y, Hori K. Perturbation by antimicrobial bacteria of the epidermal bacterial flora of rainbow trout in flow-through aquaculture. *Biology.* 2022, 11, 1249.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nakatani H., Yamada N., Hashimoto N., Okazaki F., Arakawa T., Tamaru Y., Hori K	4. 巻 11
2. 論文標題 Perturbation by antimicrobial bacteria of the epidermal bacterial flora of rainbow trout in flow-through aquaculture.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biology	6. 最初と最後の頁 1249
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/biology11081249.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 2件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 中谷肇
2. 発表標題 魚介類の表皮由来プロバイオティクスによる病害防除技術の研究開発
3. 学会等名 生物工学会中部支部 CHUBU懇話会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hajime Nakatani
2. 発表標題 Study on the fish epidermal bacterial flora for fish disease control
3. 学会等名 MISC symposium in Oslo 2023（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中谷肇 堀克敏
2. 発表標題 Establishment of a percutaneous infection model using zebrafish and <i>Yersinia ruckeri</i> , a fish pathogen causing enteric redmouth
3. 学会等名 Sakura-Bio Meeting 2021（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中谷肇 堀克敏
2. 発表標題 サケ・マス類のレッドマウス病原因菌 <i>Yersinia ruckeri</i> の経皮感染モデルの構築
3. 学会等名 第73回日本生物工学会 沖縄大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中谷肇 山田尚毅 荒川友子 橋本直樹 岡崎文美 田丸浩 堀克敏
2. 発表標題 魚類 病原菌の生育を抑える ニジマス表皮由来有用細菌 の取得と その 感染 防除効果の検証
3. 学会等名 令和4年度日本魚病学会春季大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中谷肇 堀克敏
2. 発表標題 <i>Yersinia ruckeri</i> を用いた経皮感染モデルの構築と 経皮感染における表皮細菌叢への影響解析
3. 学会等名 日本魚病学会 春季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中谷肇 山田尚毅 荒川友子 橋本直樹 小幡宏志郎 岡崎文美 田丸浩 堀克敏
2. 発表標題 飼育環境によるニジマス表皮細菌叢の変遷
3. 学会等名 日本水産学会 春季大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 新規フラボバクテリウム科細菌および魚類の保護	発明者 岡崎文美 田丸浩 堀 克敏 中谷肇	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-202121	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	堀 克敏 (Hori Katsutoshi) (50302956)	名古屋大学・工学研究科・教授 (13901)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 協力者	荒川 友子 (Arakawa Tomoko)	名古屋大学・工学研究科・技術補佐員 (13901)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
ノルウェー	University of Oslo			
インドネシア	Research Center for Applied Microbiology	Research Center for MLB		
インドネシア	Research Center for Applied Microbiology			