

令和 2 年 6 月 7 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19520

研究課題名(和文)精子プロテアソームの細胞外輸送機構とPA200の機能に関する挑戦的研究

研究課題名(英文) Studies on the extracellular transporting mechanisms of sperm proteasomes and the functions of PA200

研究代表者

澤田 均 (Sawada, Hitoshi)

名古屋大学・理学研究科・教授

研究者番号：60158946

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：ホヤの受精において、精子プロテアソームが細胞外で卵膜ライシンとして機能することを報告しているが、その局在性や活性化機構には不明な点が多い。本研究ではまず、マボヤ精子膜画分抽出物中に、確かにプロテアソームが存在することを免疫沈降法と質量分析で再確認した。しかし、共沈降される相互作用成分の同定には至らなかった。また、有性生殖への関与が指摘されているPA200のTALEN法による遺伝子破壊を行なったが、ホヤでは胚発生異常を引き起こすことが判明した。一方、受精阻害実験から、金属プロテアーゼがホヤの受精に関与することが示され、プロテアソームとともに卵膜ライシンとして機能する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

申請者は、受精実験が容易な脊索動物マボヤを用いて、その受精に精子ユビキチン-プロテアソーム系が関与すること、特に細胞外で卵膜ライシンとして機能することを初めて明らかにした。その後、哺乳類や鳥類や棘皮動物でも同様の現象が確認され、新口動物に共通するシステムであると考えられる。一般に、プロテアソームは細胞内のタンパク質分解で重要な役割を果たすが、細胞外での機能は不明な点が多い。しかし、近年、神経疾患等で細胞外プロテアソームが注目されつつある。本研究は、受精に関わる精子プロテアソームの細胞外での機能と輸送機構に焦点を当てた研究であり、不妊症診断治療薬の開発に繋がりうる基礎研究といえる。

研究成果の概要(英文)：We previously reported that sperm proteasomes are involved in sperm penetration of the vitelline coat, probably as a lysin. Here, the localization of sperm proteasome in sperm membrane fraction was re-examined. Furthermore, roles in fertilization of proteasome activator PA200, which appears to be involved in sexual reproduction, was examined. The results showed that sperm proteasome subunits were detected by LC/MS in the immunoprecipitated sperm membrane fraction using anti-proteasome antibody. However, it was not successful to identify the proteasome-associating proteins. Then, targeting of ascidian PA200 genes was carried out by genome editing. However, this was not successful due to the induction of abnormal embryonic development. On the other hand, we noticed that sperm metalloproteases may be involved in ascidian fertilization based on the inhibitory effects on fertilization. This enzyme may also play a key role in fertilization together with the proteasome.

研究分野：生化学

キーワード：プロテアソーム 精子 受精 PA200

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ユビキチン-プロテアソームシステム (UPS) は細胞内の主要なタンパク質分解経路であるが、細胞外での機能はほとんど知られていない。申請者は、海産脊索動物マボヤの受精に関する精子プロテアーゼを探索し、精子プロテアソームが卵膜上の精子受容体として機能する HrVC70 を分解するライシンとして細胞外で機能することを、初めて報告した (文献 1)。その後、哺乳類や鳥類においても精子 UPS がライシンとして細胞外で機能することが報告された。しかし、この酵素系がどのように細胞膜表面に輸送されアンカリングされるのか、さらに、細胞外で機能するプロテアソームはどのようにして活性化されるのか、に関しては殆ど知見が得られていない。

一方、プロテアソームアクティベーター-PA200 は精巣で高発現しており、その欠損マウスは雄性不稔になることが報告されているが、それ以外はほとんど研究が進んでいない。最近、PA28 と PA200 のダブルノックアウトマウスでは精子形成異常が起こり、運動性や受精率が低下することが報告されている。また、細胞培養液中にプロテアソームが遊離すること、そしてそこに PA200 が多く含まれていることも分かってきた。本研究では、PA200 が精子プロテアソームに会合し細胞表面への輸送に関与するのではないかと考え、その可能性について検討した。細胞外プロテアソームの機能や細胞膜への輸送機構については殆ど研究が進んでおらず、極めて独創的かつ挑戦的な課題といえる。

2. 研究の目的

ペルオキシソームへの輸送系においては、PTS1 と呼ばれる C 末端 3 残基の配列 ([SAGCN]-[RKH]-[LIVMAF]) が存在するだけで、巨大分子複合体であってもペルオキシソームに輸送できる。これがヒントとなり、UPS を先体胞や細胞外に輸送するシグナルがどこかにあるのではないかと考えた。そこでまず、精子プロテアソームと他組織のプロテアソームとの相違に着目し比較を行ったところ、精子プロテアソームの $\alpha 6$ サブユニットの C 末端 16 残基が、精子特異的に除去 (プロセッシング) されることを見出した (文献 2)。そこで、このプロセッシングにより出現する C 末配列が細胞膜表面への輸送やアンカリングに関わる可能性について検討した。また、プロテアソームアクティベーター-PA200 は、細胞外プロテアソームに多く会合しているとの報告されているので、PA200 がプロテアソームの精子細胞膜表面への輸送や受精に関わる可能性についても検討した。

3. 研究の方法

(1) 精子細胞膜画分抽出液の調製とプロテアソームの検出:

凍結マボヤ精子を融解後、9 倍量の 10 mM HEPES (pH 8.0) とプロテアーゼインヒビターカクテルを含む人工海水 (緩衝液 A) を加えてホモジナイズした。その遠心 (15,000xg, 30 分) 沈殿画分に、緩衝液 A を加えて同条件で遠心し上清を除去することにより洗浄を行った。この洗浄操作を 3 回行った後の沈殿画分に 0.1% Triton X-100 を含む緩衝液 A を加えて抽出し、その遠心 (15,000xg, 30 分) 上清画分を "精子膜画分抽出液" として使用した。以前の実験では、精子プロテアソーム $\alpha 6$ サブユニット C 末端ペプチドに対する抗体 (抗 Csp15 抗体) を Protein A-Sepharose に不溶化したビーズに精子抽出液を加え、直接免疫沈降実験を行っていた。しかし、精子抽出物には Protein A-Sepharose に反応する成分が多いことに気づき、Protein A-Sepharose で精子抽出液を前処理し (プレクリアー処理) その上清を用いて、抗 Csp15 抗体-Protein A-Sepharose またはウサギ IgG-Protein A-Sepharose (コントロール) で免疫沈降する実験を行った。その後、SDS-PAGE を行い、抗 Csp15 抗体で特異的に沈降するバンドを切り出して、質量分析を行った。

(2) ゲノム編集による PA200 遺伝子の破壊実験:

カタユレイボヤのゲノム情報をもとに、PA200 の遺伝子を標的とする特異的プライマーを複製し、TALEN mRNA を卵に注入してから媒精し、常法にしたがって発生させた。

(3) 金属プロテアーゼ阻害剤による受精阻害実験:

カタユレイボヤとマボヤの受精に及ぼす金属プロテアーゼ阻害剤 GM6001、TAPI-1、TAPI-2 の影響を、既報にしたがって検討した。

4. 研究成果

(1) 精子細胞膜画分抽出液の調製とプロテアソームの検出:

精子膜画分抽出液を用いて、ウサギ IgG-Protein A-Sepharose で沈降されず、抗 Csp15 抗体-Protein A-Sepharose で特異的に沈降されるタンパク質を SDS-PAGE で解析した。その特異的バンド領域を切り出して、ゲル内トリプシン消化を行い、LC/MS 解析を行った。その結果、20S プロテアソームの α と β サブユニットを複数検出することができた。このことは、精子膜画分にプロテアソ

ームが存在し、Triton X-100で抽出されること、またそのプロテアソーム複合体が、Triton X-100存在下で、抗Csp15抗体で認識され特異的に免疫沈降されることを示している。本実験において、共沈降される成分を解析した結果、ミトコンドリアのタンパク質や鞭毛タンパク質は検出されたが、プロテアソームと相互作用しうるドメインをもつ膜タンパク質を同定することはできなかった。今後は、抽出液を大量に調製することや、架橋試薬を用いてプロテアソームと不可逆的に結合させた条件で免疫沈降することが課題であると思われる。

以前に行った実験では、卵膜成分HrVC70と相互作用する精子HrUrafinやHrTTSP-1が共沈降されることが示唆されたが、今回の実験では、ウサギIgGでも免疫沈降された。これは、プロテアソームとの相互作用を否定するものではないが、更なる詳細な解析が必要と思われる。最近、マウスの精細胞で免疫プロテアソームに特異的に結合するPITHD1というチオレドキシンドメイン含有タンパク質が同定されており、その遺伝子欠損体は雄性不稔となることが報告されている（文献3）。しかし、今回のマボヤ精子の解析では、そのホモログは抗Csp15抗体で共沈降されなかった。

（2）ゲノム編集によるPA200遺伝子の破壊実験：

カタユレイボヤPA200のTALEN mRNAを作製し、卵に注入してから媒精して胚発生させ飼育を試みた。2種類のプライマーセットで検討した。一方では、6塩基欠失のみ見られ正常に発生したが、他方では、発生途中で致死になることが確認された。受精におよぼす影響を確認するためには、親個体に発生させてから精子を回収する必要がある、現在の方法ではPA200欠損精子を得ることは困難であると思われる。精子PA200の機能解析を行うためには、精巣特異的にTALENを発現させる方法を今後開発する必要がある。

（3）受精に及ぼす金属プロテアーゼ阻害剤の影響

カタユレイボヤでは、精子表面に1型トロンボスポンジン（TSP1）ドメインとアスタシン様金属プロテアーゼドメインを併せ持つプロテアーゼがLC/MSで複数検出されること、また金属プロテアーゼ阻害剤GM6001は正常卵の受精を阻害するが卵膜除去卵の受精を阻害しないこと、GM6001の不活性型アナログGM6001NCは受精を阻害しないこと、を明らかにしている（文献4）。また、卵膜に精子を加えて一晩4で反応させると、微弱ながら卵膜分解が観察されることなどから、アスタシン様金属プロテアーゼがカタユレイボヤの卵膜分解に直接的または間接的に関与すると考えている（文献4）。この酵素が卵膜を直接分解するという知見は得られておらず、プロテアソーム活性化因子である可能性もある。今回、マボヤでもこのGM6001とそのアナログであるTAPI-1, TAPI-2を用いて、受精阻害効果を検討した。基本的にはカタユレイボヤもマボヤも同様な阻害パターンを示すことが新たに明らかになった。今後は、本金属プロテアーゼを精製し、卵膜を直接分解するのかプロテアソーム活性化因子として機能するのかを明らかにすることが課題である。

<引用文献>

- 1) Sawada, H., Sakai, N., Abe, Y., Tanaka, E., Takahashi, Y., Fujino, J., Kodama, E., Takizawa, S., and Yokosawa, H. (2002). Extracellular ubiquitination and proteasome-mediated degradation of the ascidian sperm receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99(3), 1223-1228.
- 2) Yokota, N., Kataoka, Y., Hashii, N., Kawasaki, N., and Sawada, H. (2011). Sperm-specific C-terminal processing of the proteasome PSMA1/ α 6 subunit. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 410(4), 809-815.
- 3) Kondo, H., Matsumura, T., Kaneko, M., Inoue, K., Kosako, H., Ikawa, M., Takashima, Y., and Ohigashi, I. (2020). PITHD1 is a proteasome-interacting protein essential for male fertilization. *J. Biol. Chem.* 295(6), 1658-1672.
- 4) Nakazawa, S., Shirae-Kurabayashi, M., and Sawada, H. (2019). The role of metalloproteases in fertilisation in the ascidian *Ciona robusta*. *Sci. Rep.* 9(1), 1009.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Sawada, H., Yamamoto, K., Yamaguchi, A., Yamada, L., Higuchi, A., Nukaya, H., Fukuoka, M., Sakuma, T., Yamamoto, Sasakura, Y., and Shirae-Kurabayashi, M.	4. 巻 10(2514)
2. 論文標題 Three multi-allelic gene pairs are responsible for self-sterility in the ascidian <i>Ciona intestinalis</i> .	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-59147-4.	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 -
1. 著者名 Tanaka, Y., Yamada, S., Connop, S. L., Hashii, N., Sawada, H., Shih, Y., and Nishida, H.	4. 巻 449
2. 論文標題 Vitelline membrane proteins promote left-sided nodal expression after neurula rotation in the ascidian, <i>Halocynthia roretzi</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 52-61
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/febs.14066.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nakazawa, S., Shirae-Kurabayashi, M., and Sawada, H.	4. 巻 9(1009)
2. 論文標題 The role of metalloproteases in fertilisation in the ascidian <i>Ciona robusta</i> .	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-37721-1	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 -
1. 著者名 Nakazawa, S., Shirae-Kurabayashi, M., and Sawada, H.	4. 巻 85
2. 論文標題 Peanut agglutinin specifically binds to a sperm region between the nucleus and mitochondria in tunicates and sea urchin.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Molecular Reproduction and Development	6. 最初と最後の頁 464-477
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/mrd.22982	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakashima, K., Kimura, S., Ogawa, Y., Watanabe, S., Soma, S., Kaneko, T., Yamada, L., Sawada, H., Tung, C.-H., Lu, T.-M., Yu, J.-K., Briones, A. V., Kikuchi, S., and Satoh, N.	4. 巻 9 (3402)
2. 論文標題 Chitin-based barrier immunity and its loss predated mucus-colonization by indigenous gut microbiota.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-018-05884-0.	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 -

1. 著者名 Takahashi T., Mori, T., Ueda, K., Yamada, L., Nagahara, S., Higashiyama, T., Sawada, H., and Igawa, T.	4. 巻 145(23)
2. 論文標題 The male gamete membrane protein DMP9/DAU2 is required for double fertilization in flowering plants.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 dev170076.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/dev.170076	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 -

1. 著者名 Zhao, R., Takeuchi, T., Luo, Y.-J., Ishikawa, A., Kobayashi, T., Koyanagi, R., Villar-Briones, A., Yamada, L., Sawada, H., Iwanaga, S., Nagai, K., Satoh, N., and Endo, K.	4. 巻 35
2. 論文標題 Dual gene repertoires for larval and adult shells reveal molecules for molluscan shell formation.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Molecular Biology and Evolution	6. 最初と最後の頁 2751-2761
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/molbev/msy172	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Seo, T., Sakon, T., Nakazawa, S., Nishioka, A., Watanabe, K., Matsumoto, K., Akasaka, M., Shioi, N., Sawada, H., and Araki S.	4. 巻 284
2. 論文標題 Haemorrhagic snake venom metalloproteases and human ADAMs cleave LRP5/6, which disrupts cell-cell adhesions in vitro and induces haemorrhage in vivo.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 FEBS Journal	6. 最初と最後の頁 1657-1671
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/febs.14066.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sawada, H., Shirae-Kurabayashi M., and Numakunai, T.	4. 巻 84
2. 論文標題 Spawning of the ascidian <i>Halocynthia roretzi</i> .	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Molecular Reproduction and Development	6. 最初と最後の頁 93-93
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/mrd.22776.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Igawa, T., Yamada, L., Sawada, H., and Mori, T.	4. 巻 54
2. 論文標題 Isolation and GFP-tagged plasma membrane protein from <i>Arabidopsis</i> egg cells.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Plant Biotechnology	6. 最初と最後の頁 119-123
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) org/10.5511/plantbiotechnology.17.0522a	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計16件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 6件)

1. 発表者名 Hitoshi Sawada
2. 発表標題 Ascidian gamete self/nonself-recognition proteins (s-Themis and v-Themis) during fertilization of a hermaphroditic marine chordate <i>Ciona intestinalis</i>
3. 学会等名 Gordon Research Conferences "Fertilization & Activation of Development" (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yukinobu Isowa, Keiji Kito, Hitoshi Sawada and Kazuyoshi Endo
2. 発表標題 An Immunological Study of the Shell Matrix Protein ICP-1 in Brachiopods
3. 学会等名 15th International Symposium on Biomineralization (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 澤田 均
2. 発表標題 雌雄同体のホヤが自家受精しないしくみと精子の卵膜通過について
3. 学会等名 第90回日本動物学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 服部 郁也, 橋下 志津弥, 磯和 幸延, 白江-倉林 麻貴, 荒木 聡彦, 澤田 均
2. 発表標題 ホヤ精子アスタシン様金属プロテアーゼの性質と受精における役割
3. 学会等名 第90回日本動物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 糠谷 晴彦, 白江-倉林 麻貴, 澤田 均
2. 発表標題 カタコウレイボヤの自家不和合性に関わるs/v-Themis-B2アレルのcDNA cloningと発現解析
3. 学会等名 第90回日本動物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 橋本 志津弥, 澤田 均
2. 発表標題 カタコウレイボヤの自家不和合性は低Ca ²⁺ 海水により解除される
3. 学会等名 第90回日本動物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 澤田 均
2. 発表標題 ホヤの受精機構：自家不和合性とライシンについて
3. 学会等名 第89回日本動物学会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 成山 奏子、白江-倉林 麻貴、澤田 均
2. 発表標題 昆虫細胞を用いたカタコウレイボヤs-Themis, v-Themisタンパク質の相互作用解析
3. 学会等名 第89回日本動物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 成山 奏子、西尾 俊亮、白江-倉林 麻貴、松田 幹、澤田 均
2. 発表標題 カタコウレイボヤの自家不和合性に関わるs-Themisとv-Themisの相互作用に関する解析
3. 学会等名 日本動物学会中部支部大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 酒井 健有、澤田 均、荒木 聡彦
2. 発表標題 ADAM-LRP信号伝達経路に関わる新たな因子
3. 学会等名 日本動物学会中部支部大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tomoko Igawa, Lixy Yamada, Hitoshi Sawada, and Toshiyuki Mori
2. 発表標題 A method for isolation of specific Arabidopsis egg cell membrane protein without gamete isolation procedure.
3. 学会等名 Cold Spring Harbor Asia Conference on Plant Cell & Development Biology (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Taro Takahashi, Toshiyuki Mori, Lixy Yamada, Hitoshi Sawada, Kenji Ueda, Shiori Nagahara, Tetsuya Higashiyama, and Tomoko Igawa
2. 発表標題 Study on molecular players regulating male and female gamete interaction during double fertilization.
3. 学会等名 第59回日本植物学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 成山 奏子、白江-倉林 麻貴、中澤 志織、澤田 均
2. 発表標題 TALENを用いたカタコウレイボヤにおける精子タンパク質Urabinの機能解析
3. 学会等名 第88回日本動物学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Shiori Nakazawa, Maki Shirae-Kurabayashi, and Hitoshi Sawada
2. 発表標題 Roles of ascidian sperm metalloproteases in fertilization of a marine invertebrate <i>Ciona robusta</i>
3. 学会等名 Gordon Research Conference: Fertilization & Activation of Development (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Sawada, H., Inoue, S., Otsuka, K., and Shirae-Kurabayashi
2. 発表標題 cDNA cloning and expression of two ubiquitin-activating enzymes UBA1 and UBA6 in gametes of the ascidian <i>Halocynthia rotezi</i>
3. 学会等名 Gordon Research Conference: Fertilization & Activation of Development (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Seo, T., Kakon, T., Nakazawa, S., Nishioka, A., Watanabe, K., Matsumoto, K., Akasaka, M., Shioi, N., Sawada, H., and Araki, S.
2. 発表標題 Vascular endothelial cell-cell adhesion disruption and hemorrhage are induced by truncated LRP5/6 which is processed by hemorrhagic snake venom metalloproteases
3. 学会等名 Gordon Research Conferences (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計4件

1. 著者名 Inaba, k., Sawada, H., Yoshida, M., Shiba, K., and Shirae-Kurabayashi, M. ほか	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 367
3. 書名 Japanese Marine Life: A Practical Training Guide in Marine Biology (K. Inaba and J. Hall-Spencer, eds.) (執筆担当Gametes and fertilization, pp.93-107)	

1. 著者名 Sawada, H. and Shirae-Kurabayashi, M. ほか	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 379
3. 書名 Reproduction in Aquatic Animals: From Basic Biology to Aquaculture Technology (M. Yoshida, and J. F. Asturiano eds.) (執筆担当Chapter 9; Self- and nonself-recognition of gametes in ascidians. pp.179-192)	

1. 著者名 Sawada H., Nakazawa, S., and Shirai-Kurabayashi, M ほか	4. 発行年 2018年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 789
3. 書名 Reproductive and Developmental Strategies: The Continuity of Life (Y. Iwao, S. Kobayashi eds.) (執筆担当: Chapter 23 Ascidian sexual reproductive strategies: Mechanisms of sperm-egg interaction and self-sterility.)	

1. 著者名 澤田均 ほか	4. 発行年 2018年
2. 出版社 丸善	5. 総ページ数 800
3. 書名 動物学の百科事典(日本動物学会編)(受精の章を執筆)	

〔産業財産権〕

〔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
---------------------------	-----------------------	----