

自己評価報告書

平成23年 5月17日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2011

課題番号：20380112

研究課題名（和文） 消化酵素トリプシンの魚類配偶子形成および受精に対する新規機能の解明

研究課題名（英文） The study on function of trypsin in fish gametogenesis and fertilization.

研究代表者

三浦 猛 (MIURA TKAKESHI)

愛媛大学・南予水産研究センター・教授

研究者番号：00261339

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産学一般

キーワード：生殖

1. 研究計画の概要

本申請は、新しい配偶子保全技術および生物生産技術の確立に必要な、配偶子形成制御機構の全貌解明の一環として行われている研究である。本研究では、特に減数分裂開始の引き金を引くホルモンである、 $17\alpha, 20\beta$ -ジヒドロキシ-4-プレグネン-3-オン（DHP）の刺激により精巣で発現が誘導されるタンパク質分解酵素「トリプシン」の精子形成およびその関連過程への作用およびその分子機構を明らかにすることを目的として行われている。

具体的な研究内容は、(1)トリプシン関連因子のクローニング、(2)トリプシン機能解析系の開発、(3)トリプシンの減数分裂への作用機構の解析、(4)トリプシンの精子変態への作用機構の解析、(5)トリプシン関連因子と卵形成の関係の解析、(6)トリプシン関連因子の受精への作用機構の解析である。

2. 研究の進捗状況

(1)トリプシン関連因子のクローニング

トリプシン関連因子として、精巣型ウナギトリプシン、プロテアーゼ活性化レセプター（PAR1）、セリンプロテアーゼインヒビター（Serp2）のクローニングに成功した。

(2)トリプシン機能解析系の開発

代表者が独自に開発した生殖細胞の培養系を改良し、トリプシンの減数分裂、精子変態等精子形成の各過程、および受精への作用を調べるための生体外の実験系を開発することに成功した。メダカトランスジェニック

による解析系は、現在構築中である。

(3)トリプシンの減数分裂への作用機構の解析

生体外の実験系を用いてトリプシンの減数分裂への作用を解析した。その結果トリプシンは、減数分裂の開始の引き金を分子レベルで引くことが明らかとなった。しかし、減数の進行には、トリプシン以外のDHPにより制御される因子の存在が必要である可能性が示された。

(4)トリプシンの精子変態への作用機構の解析

生体外の実験系を用いてトリプシンの精子変態への作用を解析した。その結果、トリプシンは、本来精子変態を起こさない、未熟な生殖細胞に対しても、核の伸張、鞭毛の伸張、マンシェット様構造の構築を誘導し、精子変態の過程に重要な役割を演じることが明らかとなった。

(5)トリプシン関連因子と卵形成の関係の解析

トリプシンは魚類卵巣でも発現していることが確認され、卵形成の制御にも関与している可能性が示された。

(6)トリプシン関連因子の受精への作用機構の解析

トリプシン抗体、およびセリンプロテアーゼインヒビターを用い、ウナギおよびマハタを用いて、受精へのトリプシンの作用を解析し

た。その結果、トリプシンは精子の頭部の細胞膜上に存在し、受精に対し重要な役割を担っていることが、明らかとなった。

3. 現在までの達成度

①当初の計画以上に進展している。

理由：一年の研究期間を残し、(2)の「メダカのトランスジェニック系の開発」を除き、予定していた計画は、ほぼ達成されており、現段階での本研究全体の達成度は当初の計画の90%である。生体外培養系による解析により、トリプシンの精子形成への作用は、ほぼ明らかとなったので、当初の機能解析の目標は既に達している。研究の進行の過程で、成長ホルモンとその関連因子、およびアミノ酸誘導体であるタウリンがトリプシンと相互関係を保ちながら、減数分裂を始めとする精子形成過程の制御に関わる可能性が新たに示された。この発見により、本研究は今後飛躍的に発展する可能性が出てきた。

4. 今後の研究の推進方策

今後は、残された課題を行うと共に、本研究の進行により生じた、トリプシンと配偶子形成に関する新たな研究の展開の可能性を追求する。

具体的には、(1)トリプシン関連因子と成長ホルモン関連因子との相互関係と、配偶子形成への作用および(2)トリプシンと同様にDHPの刺激により精巣での産生量が増加するタウリンとトリプシンの減数分裂に対する分子相互関係の解析である。

5. 代表的な研究成果

〔雑誌論文〕(計11件)

- ① Celino F. T., Yamaguchi, S., Miura, C., Ohta, T., Tozawa, Y., Iwai, T. and Miura, T., Tolerance of spermatogonia to oxidative stress is due to high levels of Zn and Cu/Zn superoxide dismutase. *PLoS ONE* (査読有り) 6巻2011年 E16938頁
- ② Celino, F. T., Yamaguchi, S., Miura, C., and Miura, T., Arsenic inhibits *in vitro* spermatogenesis and induces germ cell apoptosis in Japanese eel (*Anguilla japonica*). *Reproduction* (査読有り) 138巻2009年 279-287頁
- ③ Yamaguchi, S., Miura C., Kikuchi, K., Celino, F. T., Agusa, T., Tanabe, S., and Miura, T., Zinc is an essential trace element for spermatogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (査読有り) 106巻2009年 10859-10864頁.
- ④ Miura, T., and Miura, C., Progesterin is an essential factor for the initiation of the meiosis in spermatogenesis and early oogenesis in fish. *Cybium* (査読有り) 32(2)巻別冊, 2008年. 130-132頁.

- ⑤ Miura, C., Ohta, T., Ozaki, Y., Tanaka, H. and Miura, T., Trypsin is a multifunctional factor in spermatogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (査読有り) 106巻2009年 20972-20977頁.

〔学会発表〕(計8件)

- ① 三浦猛ら, 魚類の成長を直接コントロールする器官としての生殖腺, 日本水産学会春季大会, 2011年3月28日, 東京(震災のため講演は行われなかった。)
- ② 三浦猛, 魚類精巣培養系を用いた精子形成の制御機構の解析, 日本生殖医学会, 2010年11月12日, 徳島.
- ③ 三浦智恵美ら, ニホンウナギ精子形成でのトリプシン関連因子の発現解析. 平成20年度日本水産学会春季大会, 2009年3月28日, 東京海洋大学品川キャンパス.
- ④ Miura, C. et al., Testicular trypsins are important substances for the control of initiation of meiosis. *Sex Determination and Gametogenesis in Fish*. 2008年5月31日, ハワイ・ホノルル(アメリカ合衆国).
- ⑤ Miura, T., Studies on the control mechanisms of spermatogenesis using eel model. *Sex Determination and Gametogenesis in Fish*. 2008年5月31日, ハワイ・ホノルル(アメリカ合衆国).

〔図書〕(計1件)

三浦猛(共著), 東海大学出版, 分子でよむ環境汚染, 2009年102-121頁