

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25462638

研究課題名(和文) 感覚毛成熟化におけるFGFシグナルの役割～内耳再生に向けて

研究課題名(英文) The role of FGF signal for the maturation of stereocilia in hair cells

研究代表者

喜多 知子(嶋知子)(Kita, Tomoko)

京都大学・医学研究科・特定助教

研究者番号：20362519

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：我々はFGFシグナルがkinociliaの形態形成に関与していることを報告した後に、内耳有毛細胞のstereociliaの先端に局在するFGFR1の役割解明を行った。まず、自作抗体での免疫染色により、特徴的かつ一過性(P2-P7の蝸牛、P1-P10の前庭)にFGFR1が発現することを見つけた。また共通の抗原部位を認識する市販抗体でも同様の染色像を確認した。更にP4マウス蝸牛からクローニングしたFGFR1遺伝子の配列に、膜貫通および細胞内ドメインを含まない新規のisoformが存在した。一方、時期限定のFGFR1 cKOマウス作製を試みたが、KO効率にバラつきがあり評価が困難であった。

研究成果の概要(英文)：The aim of this project is to clarify the effect of FGF signal on the morphology of stereocilia and transductional channel of hair cells. We've reported that FGF signal helps not only the ear formation in early embryo stage but also kinocilia formation. FGFR1 exists in the tip of stereocilia temporary (P2-P7 in cochlea organ and P1-P10 in vestibular organ) using lab-made antibody. This was confirmed using the purchased antibody which recognize same region. Sequencing of FGFR1 gene from mouse cochlea sample on that transient stage, we found the new isoform which doesn't contain neither transmembrane nor intracellular domain. Although we tried to produce FGFR1 conditional KO mice, the estimation of these mice because of the variability of KO ratio.

研究分野：耳科学

キーワード：内耳有毛細胞 感覚毛 FGFシグナル 形成

1. 研究開始当初の背景

(1) FGFR1 と kinocilia

Cilia 上に FGFRs が局在することが発見されたのは 2005 年、Hirokawa らによるマウス胎児 nodal であった。その後 Neugebauer らは、zebrafish 等の motile cilia での FGFR1 阻害実験で、cilia の短縮化と特異的遺伝子の発現低下を示した (2009)。FGFR1 研究が進まない一番の理由は、特異性の高い抗体が市販されていない事であり、in situ hybridization が唯一の検出手段であった。我々はニワトリおよびマウス FGFR1 を認識する抗体を自作することにより、世界にさきがけて内耳の kinocilia 上に FGFR1 が存在することを確認した。

(2) FGFR1 と stereocilia

Kinocilia での結果から我々は、FGFR1 が Pcdh15 の輸送に何らかの影響を及ぼしていると考えている。ニワトリ内耳蝸牛 (E10; stereocilia 形成時期) の pcdh15 抗体による免沈の結果、FilaminA (stereocilia において、Pcdh15 と相互作用: Ramakrishnan NA et al, 2012) と FGFR1 が検出された。また ift57 抗体 (cilia 輸送体) の免沈から Pcdh15 と Dab2 (Myosin6 や Clathrin と相互作用: Cong Yu et al, 2009) が検出された。よって Pcdh15 と FGFR1 は、kinocilia と stereocilia において、直接もしくはアダプターを介してベシクル内で複合体を形成している可能性が高い。

2. 研究の目的

Stereocilia に局在する FGFR1 のシグナル分子機構を解明する。特異性の低い市販抗体と比べ、マウスとニワトリに特異性が高い自作抗体 (FGFR1-SSD) により得られた FGFR1 発現パターンは、特徴的で一過性 (マウス蝸牛: P2-P7、マウス前庭: P1-P10) であった。FGFR1 が感覚毛の成熟化 (形態及び機械電気変換) において重要な役割を果たしていると期待される。本研究に関する講演では、国内外の内耳研究者から高い評価を得ている。FGF シグナルによる Pcdh15 介在ベシクル輸送制御に関する報告は未だなく、感覚毛の形態維持や機械電気変換における FGFR1 の新たな役割を解明することは非常に意義深い。

3. 研究の方法

期間は 3 年とし、kinocilia と stereocilia の先端に局在する FGFR1 の新たな分子機構を解明する。これまでに我々の得た知見から、tip link 分子 pcdh15 のベシクル輸送と関わり、機械電気変換に影響する可能性が高い。研究内容および予想される結果はクリアで、複数の動物種を用いて期間内に遂行する。

(1) FGFR1 阻害と stereocilia 形態・機械刺激受容能解析

[stereocilia の形態解析]

in vitro 実験では、新生児マウス (P2-5) の内耳器官培養を用いて、FGFR1 阻害剤 (SU5402) および soluble FGFR1 を添加し、感覚毛の形態解析を行なう。in vivo 実験では、FGFR1 conditional KO マウス (Atoh1-cre ER induced, tamoxifen 経口投与) について、新生児、15 日齢、2 ヶ月齢での感覚毛の観察を行なう。

[機械刺激受容能解析]

上記の cKO マウス (Atoh1-cre/+; FGFR1 fl/fl) について、新生児 (器官培養)、15 日齢 (ip 投与) での蛍光色素 FM1-43 の染色像を control マウス (Atoh1-cre/+) と比較する。両者で違いがみられれば、Ca キレーターの BAPTA-AM や calmodulin 阻害剤の TFP による影響も調べる。

2 ヶ月齢マウスについては、聴覚機能評価として ABR 検査を行い、異常があればパッチクランプによる機械電気変換 (mechano-electrical transduction: MET) 機能解析も行なう。

(2) stereocilia での FGFR1 相互作用タンパクの同定

2 種類の cKO マウス (Atoh1-cre または Six1-cre) について、stereocilia 上で FGFR1 と相互作用を行なうと予想されるタンパクの抗体を購入し、免疫染色像をみる。免疫沈降の結果から、Pcdh15、FilaminA、Dab2、そして Pcdh15 と結合すると報告されている Myosin15a、Myosin7a、Harmonin などが stereocilia 上で分布の変化をおこしていないか調べる。一方で、Case Western Reserve 大学 Alagramam 氏より Pcdh15-Tg2742 (null) マウスの内耳サンプルを分与してもらい、FGFR1 の stereocilia での染色像に異常がないか調べる。また、感覚毛へのベシクル輸送に、FGFR1 または Pcdh15 が関与していることを確認するために、免疫電顕 (TEM) をおこなう。

(3) 細胞株を用いた FGFR1 相互作用タンパクの機能解析

LLC-PK1 clone4 細胞株 (Zheng L et al, 2010) に Espin の遺伝子を導入することにより microvilli を伸長したものをを用いる。2) において、stereocilia 上で FGFR1 あるいは Pcdh15 と同局在が確認されたタンパクを、この LLC-PK1 clone4 誘導細胞に遺伝子導入し、microvilli の形状、タンパクの局在を観察する。必要があれば、siRNA を用いた阻害実験も行なう。

(4) iPS 細胞の感覚毛発現効率化と FGF

の役割

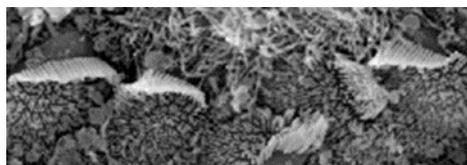
ヒトおよびマウスの iPS 細胞ならびに ES 細胞を用いる。既報の分化培養条件 (Oshima K et al, 2010) のうち、Atoh1 の発現時期より、FGF の種類、添加開始のタイミング、添加期間、濃度勾配などを変化させる。まずは、MyoVIIa 陽性細胞から有毛細胞 like 細胞の感覚毛 (Phalloidin 陽性) が効率的に形成される培養条件を見つける。次に、この細胞の感覚毛を様々な cilia 特有の抗体で染め、本来の内耳有毛細胞との違いを探す。異常が見つければ、それを改善するために必要なタンパク (遺伝子) を補充する。

4. 研究成果

内耳有毛細胞の stereocilia の先端に特異的に局在する FGFR1 の役割解明を行った。一過性 (マウス蝸牛: P2-P7、マウス前庭: P1-P10) の発現であるため、時期限定の FGFR1 の KO モデル作成およびその解析に難航した。一方で、この時期に内耳に発現する FGFR1 が新規 isoform であるという仮定のもと、3'Race を行った結果、膜貫通ドメインの一部と細胞内ドメインが欠失した分子である可能性が示された。この結果は、stereocilia の先端から分泌されているような FGFR1 の免疫染色像とも一致する。

(1) FGFR1 阻害と stereocilia 形態・機械刺激受容能解析

Six1-cre による FGFR1 cKO では、新生仔期に感覚毛異常 (fragmented, mis-oriented) を認め (図 1)、この形状は Usher 関連タンパク変異マウスと類似していた。3 ヶ月齢のマウス内耳蝸牛は、有毛細胞およびラセン神経節ともに顕著な細胞数減少が認められた。



[図 1]

よって、FGFR1 の floxed マウスを induced Atoh1-CreER マウスと交配し、時期限定の conditional KO マウスの作製を試みた。タモキシフェン投与を出産直後の母マウスに行った結果、1 回投与よりは 2 回連投の方が、腹腔内投与よりは経口投与の方が KO 効率は高かった。また仔マウスへの腹腔内投与はバラつきが多く評価できなかつた。最もよい KO 効率でさえも 20%に過ぎず、そのためレポーターマウス (R26R-YFP マウス) との交配による KO 細胞の同定が避けられず、そのため免疫染色による評価効率もさがるとい

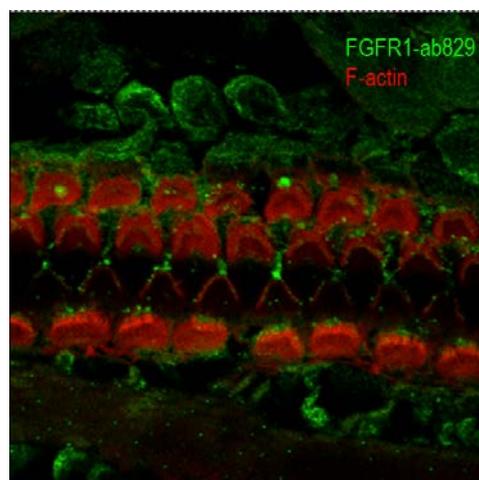
う結果になった。

一方で、*ex vivo* 器官培養条件では高濃度のタモキシフェンが添加可能のため、KO 効率は 70%と *in vivo* の KO 効率よりは高かったが、実験系としては従来の FGFR1 阻害剤 (SU5402) を使用の方が簡便であると考えられた。

機械刺激について、FGFR1 cKO マウス (Six1-cre) の蝸牛器官培養系で FM1-43 を用いた検討を行ったが、コントロールとの有意な差は認められなかつた。

(2) stereocilia での FGFR1 相互作用タンパクの同定

市販抗体のうち、共通の抗原部位 (N 末端 10 アミノ酸) を認識する抗体では、自作抗体と同様の染色像が確認された (図 2)。



[図 2]

また、新生仔マウス内耳蝸牛サンプルから抽出した cDNA の 3'Race からクローニングされた FGFR1 の新規 isoform について、全配列決定した。N 末近傍の膜貫通ドメインおよび細胞内ドメインをもたない分子で、抗体認識部位を含んでいた。よって、stereocilia に発現している FGFR1 は新規の isoform であり、FGF シグナルを介在しておらず、別の役割を果たしている可能性が示された。

(3) 細胞株を用いた FGFR1 相互作用タンパクの機能解析

BMT10 細胞株を用いた *in vitro* 結合実験では、Pcdh15 のうち stereocilia に特異的に局在する isoform (CD3) と FGFR1 full length とが結合し、その結合は FGFR1 阻害剤 (SU5402) 添加により低下して CD3 のリン酸化も消失した。すなわち、CD3 と FGFR1 との相互作用が確認された。今後、3'Race から発見された FGFR1 isoform について、その結合特性を調べる。

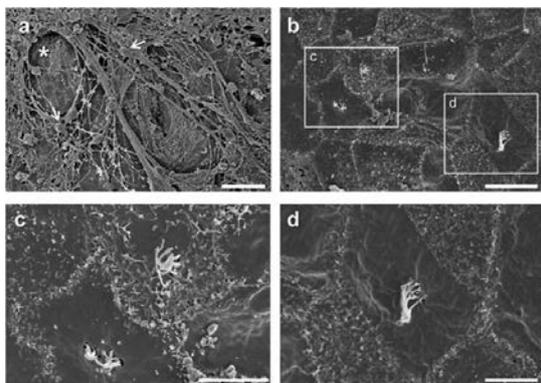
また、LLC-PK1 clone4 細胞を用いた検討では、Espin 導入により microvilli の伸長が見

売られたが、FGFR1 full length および pcdh15 CD2 の局在は主に primary cilia に限られた。一方で、エレクトロポレーション法により、マウス胎仔 (E13.5) の感覚上皮に Pcdh15 CD2 遺伝子を導入した結果、その大半が stereocilia に局在していたことから、細胞株と用いた検討で microvilli に局在しなかったのはタンパク輸送に関与する何らかの結合相手、すなわちモータータンパク (Myosin VIIa, XVa 等) が必要であると考えられた。

さらに、(2) から得られた新規 FGFR1 isoform についても遺伝子発現による局在の検討が必要であると考えられた。

(4) iPS 細胞の感覚毛発現効率化と FGF の役割

既報 (Oshima K, et al. Cell. 2010;141:704-16.) に従い、iPS 細胞から有毛細胞への分化を試みたが、有毛細胞の産生効率が非常に低かった (0.01%)。また感覚毛の形態自体も本物と大きく異なり、kinocilia の欠落、microvilli の形成不良が考えられた (図 3)。追加検討により、progenitor 細胞の分化効率は顕著に向上した (数%)。これは、BMP-4/SB-431542(TGF-beta 阻害剤)/FGF-2/LDN-193189(BMP 阻害剤) という stepwise treatment に加え、Wnt アゴニスト (CHIR-99021) の添加が効果的であった。



[図 3]

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 28 件)

- 1: Ladher RK. Changing shape and shaping change: Inducing the inner ear. Semin Cell Dev Biol. 2017;65:39-46. doi: 10.1016/j.semcdb.2016.10.006.
- 2: Yamahara K, Nakagawa T, Ito J, Kinoshita K, Omori K, Yamamoto N. Netrin 1 mediates protective effects exerted by insulin-like growth factor 1 on cochlear hair cells. Neuropharmacology.

2017;119:26-39.

doi: 10.1016/j.neuropharm.2017.03.032.

- 3: Hayashi Y, Yamamoto N, Nakagawa T, Omori K, Ito J. Activation of IGF1 Signaling in the Cochlea Induces the Transcription of Its Mediators During the Protection of Cochlear Hair Cells Against Aminoglycoside. Otol Neurotol. 2017;38:278-282.

doi: 10.1097/MAO.0000000000001276.

- 4: Ishikawa M, Ohnishi H, Skerleva D, Sakamoto T, Yamamoto N, Hotta A, Ito J, Nakagawa T. Transplantation of neurons derived from human iPS cells cultured on collagen matrix into guinea-pig cochleae. J Tissue Eng Regen Med. 2017;11:1766-1778. doi: 10.1002/term.2072.

- 5: Taura A, Nakashima N, Ohnishi H, Nakagawa T, Funabiki K, Ito J, Omori K. Regenerative therapy for vestibular disorders using human induced pluripotent stem cells (iPSCs): neural differentiation of human iPSC-derived neural stem cells after in vitro transplantation into mouse vestibular epithelia. Acta Otolaryngol. 2016;136:999-1005.

doi: 10.1080/00016489.2016.1183169.

- 6: Taura A, Taura K, Koyama Y, Yamamoto N, Nakagawa T, Ito J, Ryan AF. Hair cell stereociliary bundle regeneration by espin gene transduction after aminoglycoside damage and hair cell induction by Notch inhibition. Gene Ther. 2016;23:415-23. doi: 10.1038/gt.2016.12.
- 7: Mak SS, Wrabel A, Nagai H, Ladher RK, Sheng G. Zebra finch as a developmental model. Genesis. 2015;53:669-77.

doi: 10.1002/dvg.22900.

- 8: Mak SS, Alev C, Nagai H, Wrabel A, Matsuoka Y, Honda A, Sheng G, Ladher RK. Characterization of the finch embryo supports evolutionary conservation of the naive stage of development in amniotes. Elife. 2015 Sep 11;4:e07178.

doi:10.7554/eLife.07178.

- 9: Sai X, Ladher RK. Early steps in inner ear development: induction and morphogenesis of the otic placode. Front Pharmacol. 2015;6:19.

doi:10.3389/fphar.2015.00019.

eCollection 2015. Review.

- 10: Mulvaney JF, Amemiya Y, Freeman SD, Ladher RK, Dabdoub A. Molecular cloning and functional characterisation of chicken Atonal homologue 1: a comparison with human Atoh1. Biol Cell. 2015;107:41-60.

doi: 10.1111/boc.201400078.

- 11: Freeman SD, Keino-Masu K, Masu M,

- Ladher RK. Expression of the heparan sulfate 6-O-endosulfatases, Sulf1 and Sulf2, in the avian and mammalian inner ear suggests a role for sulfation during inner ear development. *Dev Dyn*. 2015;244:168-80. doi: 10.1002/dvdy.24223.
- 12: Yamahara K, Yamamoto N, Nakagawa T, Ito J. Insulin-like growth factor 1: A novel treatment for the protection or regeneration of cochlear hair cells. *Hear Res*. 2015;330(Pt A):2-9. doi: 10.1016/j.heares.2015.04.009.
- 13: Ohnishi H, Skerleva D, Kitajiri S, Sakamoto T, Yamamoto N, Ito J, Nakagawa T. Limited hair cell induction from human induced pluripotent stem cells using a simple stepwise method. *Neurosci Lett*. 2015;599:49-54. doi:10.1016/j.neulet.2015.05.032.
- 14: Sai X, Yonemura S, Ladher RK. Junctionally restricted RhoA activity is necessary for apical constriction during phase 2 inner ear placode invagination. *Dev Biol*. 2014;394:206-16. doi: 10.1016/j.ydbio.2014.08.022.
- 15: Ono K, *Kita T*, Sato S, O'Neill P, Mak SS, Paschaki M, Ito M, Gotoh N, Kawakami K, Sasai Y, Ladher RK. FGFR1-Frs2/3 signalling maintains sensory progenitors during inner ear hair cell formation. *PLoS Genet*. 2014;10:e1004118. doi:10.1371/journal.pgen.1004118.
- 16: Hall J, Jheon AH, Ealba EL, Eames BF, Butcher KD, Mak SS, Ladher R, Alliston T, Schneider RA. Evolution of a developmental mechanism: Species-specific regulation of the cell cycle and the timing of events during craniofacial osteogenesis. *Dev Biol*. 2014;385:380-95. doi:10.1016/j.ydbio.2013.11.011.
- 17: Honda A, Freeman SD, Sai X, Ladher RK, O'Neill P. From placode to labyrinth: culture of the chicken inner ear. *Methods*. 2014;66:447-53. doi:10.1016/j.ymeth.2013.06.011.
- 18: Nakagawa T, Kumakawa K, Usami S, Hato N, Tabuchi K, Takahashi M, Fujiwara K, Sasaki A, Komune S, Sakamoto T, Hiraumi H, Yamamoto N, Tanaka S, Tada H, Yamamoto M, Yonezawa A, Ito-Ihara T, Ikeda T, Shimizu A, Tabata Y, Ito J. A randomized controlled clinical trial of topical insulin-like growth factor-1 therapy for sudden deafness refractory to systemic corticosteroid treatment. *BMC Med*. 2014;12:219. doi: 10.1186/s12916-014-0219-x.
- 19: Yamamoto N, Nakagawa T, Ito J. Application of insulin-like growth factor-1 in the treatment of inner ear disorders. *Front Pharmacol*. 2014;5:208. doi: 10.3389/fphar.2014.00208. eCollection 2014.
- 20: Taura A, Ohnishi H, Ochi S, Ebisu F, Nakagawa T, Ito J. Effects of mouse utricle stromal tissues on hair cell induction from induced pluripotent stem cells. *BMC Neurosci*. 2014 Nov 6;15:121. doi: 10.1186/s12868-014-0121-7.
- 21: Kikkawa YS, Nakagawa T, Ying L, Tabata Y, Tsubouchi H, Ido A, Ito J. Growth factor-eluting cochlear implant electrode: impact on residual auditory function, insertional trauma, and fibrosis. *J Transl Med*. 2014;12:280. doi:10.1186/s12967-014-0280-4.
- 22: Hayashi Y, Yamamoto N, Nakagawa T, Ito J. Insulin-like growth factor 1 induces the transcription of Gap43 and Ntn1 during hair cell protection in the neonatal murine cochlea. *Neurosci Lett*. 2014;560:7-11. doi:10.1016/j.neulet.2013.11.062.
- 23: Paschaki M, Cammas L, Muta Y, Matsuoka Y, Mak SS, Rataj-Baniowska M, Fraulob V, Dollé P, Ladher RK. Retinoic acid regulates olfactory progenitor cell fate and differentiation. *Neural Dev*. 2013;8:13. doi: 10.1186/1749-8104-8-13.
- 24: Cai Z, Tao C, Li H, Ladher R, Gotoh N, Feng GS, Wang F, Zhang X. Deficient FGF signaling causes optic nerve dysgenesis and ocular coloboma. *Development*. 2013;140:2711-23. doi: 10.1242/dev.089987.
- 25: Yang L, O'Neill P, Martin K, Maass JC, Vassilev V, Ladher R, Groves AK. Analysis of FGF-dependent and FGF-independent pathways in otic placode induction. *PLoS One*. 2013;8:e55011. doi: 10.1371/journal.pone.0055011.
- 26: Lou XX, Nakagawa T, Nishimura K, Ohnishi H, Yamamoto N, Sakamoto T, Ito J. Reprogramming of mouse cochlear cells by transcription factors to generate induced pluripotent stem cells. *Cell Reprogram*. 2013;15:514-9. doi:10.1089/cell.2013.0020.
- 27: Hori R, Nakagawa T, Yamamoto N, Hamaguchi K, Ito J. Prostaglandin E receptor subtype EP4 agonist serves better to protect cochlea than prostaglandin E1. *Auris Nasus Larynx*. 2013;40:539-42. doi: 10.1016/j.anl.2013.05.003.
- 28: Hayashi Y, Yamamoto N, Nakagawa T, Ito J. Insulin-like growth factor 1 inhibits hair cell apoptosis and promotes the cell cycle of supporting cells by activating different downstream cascades after

pharmacological hair cell injury in neonatal mice. Mol Cell Neurosci. 2013;56:29-38.
doi:10.1016/j.mcn.2013.03.003.

〔学会発表〕 (計 6 件)

1: Honda A, Kita T, Misaki K, Ahmed Z, Richardson G, Yonemura S, Ladher RK. FGFR1 regulates a transport of PCDH15 during inner ear hair cell specialization. 53rd Inner Ear Biology Workshops, Sept 17th to 21st, 2016, Montpellier.

2: 喜多知子、山本典生、小野和也、Raj, Ladher、田中かおり、門田満隆. 内耳発生における Sox2 転写因子による Nrarp の制御機構の解明 2016 Dec. 1-3 第 39 回日本分子生物学会年会 (横浜)

3: Ohnishi H, Kitajiri SI, Lou X, Taura A, Taniguchi M, Ebisu F, Sakamoto T, Yamamoto N, Ito J, Omori K, Nakagawa T. A Trial of Establishment for TRIOBP KO In Vitro Model Using Induced Pluripotent Stem Cells. 53rd Inner Ear Biology Workshops, Sept 17th to 21st, 2016, Montpellier.

4: Honda A, Kita T, Misaki K, Nakagawa R, Yonemura S, Ladher RK. FGFR1 Regulates the Kinocilia-specific Transport during Hair Cell Development. Inner Ear Biology Workshop 2014 in Kyoto. Nov1-4 Kyoto.

5: Kita T, Honda A, Matsumoto Y, Aruga J, Kudo M, Nagao S, Ladher RK. CASK Function in The Inner Ear. Inner Ear Biology Workshop 2014 in Kyoto. Nov1-4 Kyoto.

6: Ladher RK, Kita T, Honda A, Freedman S, Sai XR. Controlling Inner Ear Fate and Shape. Inner Ear Biology Workshop 2014 in Kyoto. Nov1-4 Kyoto.

〔図書〕 (計 3 件)

1: Kita T, Katsuno T, Kitajiri SI. (2014) Hair Cell Regeneration in the Avian: Regenerative Medicine for the Inner Ear (ed. Ito Juichi) p181-188 Springer

2: Kita T, Katsuno T, Kitajiri SI. (2014) Stereocilia: Regenerative Medicine for the Inner Ear (ed. Ito Juichi) p31-38 Springer

3: Kita T, Freeman SD, Ladher RK. (2013) The birth of a mechanosensor: development of vertebrate of hair cells in Inner ear development and Hearing Loss (ed. Riazuddin and Ahmed) p1-24 New York: Nova Science

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

喜多 知子 (KITA Tomoko)
京都大学・医学研究科・特定助教
研究者番号 : 20362519

(2) 研究分担者

中川 隆之 (NAKAGAWA Takayuki)
京都大学・医学研究科・講師
研究者番号 : 50335270

(3) 研究分担者

本田 晶 (HONDA Akira)
独立行政法人理化学研究所・感覚器発生研究チーム・研究員
研究者番号 : 50443023

(4) 研究分担者

ラージ・ラダ (Raj Ladher)
独立行政法人理化学研究所・感覚器発生研究チーム・チームリーダー
→ National Center for Biological Sciences, India
研究者番号 : 70392173

(5) 連携研究者

(6) 研究協力者

Sabyasachi Rakshit
Indian Institute of Science Education and Research, Assistant Professor