

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 22 日現在

機関番号：34419

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23658228

研究課題名(和文) マウス体細胞核移植卵子のリプログラミングを制御する核内高次構造の動態と機能の解明

研究課題名(英文) Dynamics of nuclear architecture involving in reprogramming of mouse somatic nuclear transfer embryos

研究代表者

三谷 匡 (MITANI, Tasuku)

近畿大学・先端技術総合研究所・教授

研究者番号：10322265

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：体細胞核移植(SCNT)卵子の初期発生における核内高次構造やクロマチンリモデリングの動態とヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)阻害剤による影響について検証した。その結果、(1)受精卵とSCNT胚の初期発生におけるヒストン構成の差異、(2)HDAC阻害剤によるヒストン置換効果、(3)HDAC阻害剤の種類や細胞種におけるヒストンバリエーションの置換に対する応答性の差異などについて新たな知見が得られた。

研究成果の概要(英文)：This study examined the dynamics of chromatin composition in the early development of somatic cell nuclear transfer (SCNT) embryos. The results are summarized as follows: (1) histone composition of the SCNT embryos differs from that of the fertilized ones, (2) a certain histone variant is removed from chromatin by histone deacetylase (HDAC) inhibitors, and (3) responsiveness of histone modification and disposition depends on HDAC inhibitors and/or the types of cells.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、応用動物科学

キーワード：体細胞核移植 リプログラミング クロマチンリモデリング ヒストン

1. 研究開始当初の背景

体細胞クローン (SCNT) 技術は、1996 年のクローンヒツジ・ドリーの作出以来 10 余年たった現在でも、個体作出効率が非常に低く、技術応用レベルには達していない。網羅的遺伝子解析から、SCNT 胚では分化体細胞核の初期化 (リプログラミング) が不十分であり、エピジェネティックな変異がゲノムワイドに生じていることが示されている。このリプログラミングの分子機構については精力的な研究が進められているが、人為的制御技術の開発についてはヒストン脱アセチル化酵素阻害剤のひとつであるトリコスタチン A (TSA) による発生能の改善 (Kishigami *et al.*, 2006) など少数に留まっている。研究代表者は、マウス SCNT 胚の着床前後の異常に着目し、初期の分化制御で重要な胚体と胚体外組織間のクロストークに乱れが生じ、急激な発生能の低下がもたらされていると予想し、FGF4/FGFR2 シグナル伝達経路による初期発生の改善効果を報告してきた (Mitani *et al.*, *Reprod. Fert. Dev.* 22, 2010, 他)。最近、Inoue らは X 染色体不活化に関わる *Xist* 遺伝子がマウス SCNT 胚では異常発現しており、常染色体上の遺伝子にもゲノムワイドに影響していることを突き止め、*Xist* を不活性化させた SCNT 胚を作製し、エピジェネティクスの修正により体細胞クローンマウスの作出効率を飛躍的に向上させることに成功した (*Science*, 2010)。

一方、真核生物のゲノムは、DNA 鎖からヌクレオソーム、クロマチンファイバーに至る階層構造を有したクロマチンを形成し、多様なゲノム機能に対応したドメインを形成している。このようなクロマチン内での機能ドメインに加え、細胞核は機能的また形態学的に様々なドメインを構成し、ダイナミックな構造変換を介して時期的・組織特異的な遺伝子発現を調節することによりゲノム機能を制御していることが明らかにされつつある。そこで本研究では、体細胞クローン技術においても分化した体細胞の初期化の過程では同様に核内高次構造による統合的なメカニズムが鍵を握っていると考えた。

2. 研究の目的

哺乳動物の受精・発生・配偶子形成の過程でおこるゲノムワイドな遺伝子発現の遷移における細胞核全体での統合的な制御機構についてはほとんど明らかにされていない。近年、真核生物の細胞核は、機能的また形態学的に様々なドメインを構成し、ダイナミックな構造変換を介して時期的・組織特異的なゲノム機能を制御していることが明らかになってきた。そこで本研究では、分化した体細胞が初期化される体細胞クローン技術においても同様のメカニズムが鍵を握っていると考えた。しかしながら、受精卵の初期発

生における核内高次構造やクロマチンリモデリング因子の解析は十分なされていない。本研究では、まずそれを明らかにするとともに、それらに関わる分子について核内高次構造の動態やクロマチンリモデリングにおける役割と機能を検証することにより、SCNT 胚で起こるリプログラミング現象について、細胞核内高次構造の視点から新たな分子基盤の解明に迫ることをめざす。本研究は、細胞核の高次構造の動態を解析し、さらにその制御機構を探ることにより、細胞核内の「場の作用」を理解し、さらに核内高次構造の人為制御技術を開発し、体細胞クローン胚の初期化を促すドナー細胞やレシピエント卵細胞質の新たな作製技術により体細胞クローン技術の実用化をめざすものである。

3. 研究の方法

マウス受精卵や SCNT 胚の核内高次構造の動態については、3D-FISH を用いた染色体テリトリーと発現遺伝子座の核内動態やクロマチンリモデリングの解析、DNA メチル化など、階層的で多面的な評価によって検討した。また、それらの動態制御の分子機構について、核内高次構造の形成に関わるクロマチンリモデリング複合体因子、核マトリクス因子、ヒストンバリエーションの構成、そして体細胞核移植卵子の発生能を改善するヒストン脱アセチル化酵素阻害剤が SCNT 胚のクロマチンに及ぼす影響等の解析により検証した。さらに、リプログラミングを誘導する核内高次構造やクロマチンリモデリング環境を作り出すドナー細胞について検討し、SCNT 胚の効率的な初期化誘導技術の開発について検討した。

(1) マウス ES 細胞を用いた未分化状態から分化状態への変移過程における染色体テリトリーと遺伝子座の動態モデルの解析

細胞核内高次構造については、核内機能ドメインとして空間的な制御を受ける染色体テリトリーと染色体テリトリー内に配置される遺伝子座の動態に着目した。しかし、卵子における解析手法が確立されていない現在、まず未分化から分化への変移過程の細胞解析モデルとして、マウス ES 細胞の体外分化誘導系を用いた。本研究では、単層培養法によるマウス ES 細胞の肝細胞への分化誘導系を用いて、間期細胞核染色体テリトリーと対象遺伝子座の核内動態について、3D-FISH 解析を行った。解析モデルとする染色体テリトリーと遺伝子座には、未分化マーカーである *Oct3/4* 遺伝子と第 17 番染色体、肝分化マーカーである *Tdo2* 遺伝子と第 3 番染色体の組み合わせを適用した。

(2) マウス体細胞核移植卵子の初期発生におけるヒストン構成の動態とヒストン脱アセチル化酵素阻害剤による影響

哺乳動物の初期発生過程では、核内高次構造やクロマチン構造は体細胞核とは異なっており、ゲノム全体のエピジェネティックな修飾に大きく影響している。例えば、ヒストン H2A.Z は真核生物で非常に高く保存されたバリエーションであり生存に必須であるが、初期胚では発現していない。また、ヒストン H2A.X、H3.3 についても初期胚では体細胞と比べて優位である。したがって、体細胞核移植ではリプログラミングの過程で、クロマチンレベルの制御が大きく影響しているとの着想の下、ドナー細胞から持ち込まれるヒストン H2A.Z がリプログラムに及ぼす影響に着眼し、SCNT 胚の発生過程におけるヒストン H2A.Z の発現と局在について免疫組織化学的解析を行った。さらに SCNT 胚の発生能を高めるトリコスタチン A (TSA) の他、Oxamflatin、Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA)、バルプロ酸 (VPA) も含めた HDAC 阻害剤によるヒストン H2A.Z の動態への影響について検討した。

(3) ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤がマウス ES 細胞及び線維芽細胞におけるヒストン構成の動態に及ぼす影響

クロマチンを構成するヒストンは、ヒストンアセチル基転移酵素 (HAT) とヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) によって調節を受けており、HDAC 阻害剤 (HDACi) は体細胞クローン動物の作製効率や iPS 細胞の樹立効率を改善する。本研究は、体細胞クローンにおけるヒストンバリエーションの影響に着目し、ドナー細胞核をリプログラミングを受けやすいクロマチン状態に誘導することを目的として行った。本研究では、ヒストンのアセチル化がクロマチンリモデリングによるヒストン置換などの調節に関わること、前述のヒストン H2A.Z の発現特性から、未分化細胞であるマウス ES 細胞と分化細胞である線維芽細胞に対して様々な HDACi がヒストン H2A.Z ならびに他のヒストン H2A バリエーションの動態に及ぼす影響について、ウエスタンブロット解析及び免疫組織化学的解析を行った。

4. 研究成果

(1) マウス ES 細胞を用いた未分化状態から分化状態への変移過程における染色体テリトリーと遺伝子座の動態モデルの解析

単層培養法によるマウス ES 細胞の肝細胞への分化誘導系 (Teratani *et al.*, 2005) の構築について検討した。その結果、分化誘導にともない肝臓特異的マーカーである *Alb*、*Ttr*、*Tdo2* の mRNA の発現がみられた。そこで、分化誘導過程のサンプルについて 3D-FISH により検討した。解析モデルとする染色体テリトリーと遺伝子座には、未分化マーカーである *Oct3/4* 遺伝子とマウス第 17 番染色体、

肝分化マーカーである *Tdo2* 遺伝子とマウス第 3 番染色体について行った。さらに、成熟した肝細胞を用いて肝分化マーカーである *Tdo2* とマウス第 3 番染色体の核内の時空間的配置を 3D-FISH 法によって解析した。染色体ペインティングプローブおよび領域特異的 (遺伝子座) プローブを用いて 3D-FISH を行った結果、分化誘導が進行するのにもとない、*Oct3/4* 遺伝子座と第 17 番染色体テリトリーでは顕著な変化を示さなかったが、第 3 番染色体テリトリーから *Tdo2* 遺伝子座がループアウトすることが示された。一方、初代培養肝細胞では、*Tdo2* 遺伝子座は第 3 番染色体テリトリーの境界面近傍に局在しているが、ループアウト現象はみられなかった。*Tdo2* 遺伝子の発現は成熟前の肝細胞で開始することから、*Tdo2* 遺伝子座のループアウトが分化過程での固有のイベントである可能性があり、形態形成、組織形成過程において特定の遺伝子が染色体テリトリーからループアウトする現象が生じる可能性を初めて提示した。以上より、ES 細胞の未分化維持機構や分化制御機構において、染色体テリトリーと遺伝子座の動態が密接に関連している可能性が初めて示された。また、ES 細胞の分化誘導系を用いた細胞核内構造の解析は、核内高次構造と発生イベントや高次生命機能との関わりを解き明かす有効なツールとなりうることを示された。

(2) マウス体細胞核移植卵子の初期発生におけるヒストン構成の動態とヒストン脱アセチル化酵素阻害剤による影響

受精卵におけるヒストン H2A.Z の発現と局在を解析した結果、排卵卵子の MII 期染色体に局在がみられるものの、受精後ただちに雌雄両前核から消失し、桑実期より再び発現がみられた。一方、SCNT 胚では核移植直後よりヒストン H2A.Z の局在がみられ、SCNT 後のクロマチンリモデリングに影響を及ぼしている可能性を示した。ドナー細胞とした卵丘細胞核ではヒストン H2A.Z の局在が確認された。さらに、TSA 処理を施すことにより核移植後のヒストン H2A.Z の局在が前核期から 4 細胞期で消失し、IVF 胚と同様の動態を示すことを見出した。一方、ヒストン H2A および H2A.X は、IVF 胚、SCNT 胚への TSA 添加の有無に関わらず胚発生の間、核内に局在していた。これらの結果は、TSA には SCNT 卵身に持ち込まれるヒストン H2A.Z をクロマチンから選択的に除去する作用があることを初めて示唆した。そこで、SCNT 胚におけるヒストン H2A.Z の動態と HDACi の選択性について検討した。TSA と同じ HDAC Class I, IIa/b の阻害剤である Oxamflatin あるいは SAHA で処理した SCNT 胚では、前核期から 4 細胞期でヒスト

ン H2A.Z の局在が消失し IVF 胚と同様の動態を示すこと、胚盤胞期への胚発生能が向上することを明らかにした。一方、HDAC Class I, IIa の阻害剤である VPA については、前核期ではヒストン H2A.Z が残留し、2 細胞期、4 細胞期で消失したが、桑実期でもヒストン H2A.Z の発現がみられず胚盤胞期より回復すること、桑実期までの胚発生は他の HDACi と同様に改善するものの、桑実期で停止する胚が多くみられることを見出した。

本研究では、体細胞核と受精卵でクロマチン構成が大きく異なることに着目し、ドナー細胞から持ち込まれるヒストン H2A.Z と、ヒストン修飾に係わる HDACi の作用に注目し、HDACi がヒストン H2A.Z を選択的に除去し、受精卵と類似したヒストン H2A バリエーションの発現動態をとることを明らかにした。また、VPA によるヒストン H2A.Z の除去作用は他の HDACi とは異なり、SCNT 胚の発生にも反映されている。これらの結果は、ヒストン H2A.Z の発現と局在は胚性ゲノム活性化や胚盤胞期での初期分化過程で何らかの影響を及ぼしている可能性を示しており、初期発生におけるクロマチンリモデリングの役割の解明や体細胞核のリプログラミング技術の開発の糸口になると期待される。

(3) ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤がマウス ES 細胞及び線維芽細胞におけるヒストン構成の動態に及ぼす影響

体細胞クローン動物の作製効率を改善する TSA が ES 細胞と線維芽細胞のヒストンバリエーションの動態に及ぼす影響について解析した。その結果、TSA は ES 細胞、線維芽細胞ともにヒストン H2A.Z のアセチル化を促進した。また ES 細胞においてはクロマチンからのヒストン H2A.Z の減少がみられた。さらに、ES 細胞において TSA 処理によりヒストン H2A.Z のアセチル化の大幅な増加が認められたが、アセチル化ヒストン H2A.Z の局在に変化はみられなかった。一方、非アセチル化ヒストン H2A.Z が減少する傾向がみられた。線維芽細胞においてもヒストン H2A.Z のアセチル化は増加したが、クロマチンからの減少傾向は示さなかった。また、ヒストン H2A.Z の局在にも変化はみられなかった。以上の結果より、HDACi に対するヒストン H2A.Z の応答性は ES 細胞と線維芽細胞で異なることが示された。

そこで、TSA 以外に体細胞クローンの発生率を改善する SAHA と Oxamflatin を用いて同様の実験を行った。SAHA を ES 細胞および線維芽細胞に処理した場合、ES 細胞では 10 μ M 添加区、線維芽細胞では 1 μ M、添加区でアセチル化ヒストン H2A.Z が増加した。しかしながら、いずれの細胞においてもヒストン H2A.Z の局在に変化はみられなかった。

Oxamflatin を ES 細胞および線維芽細胞に処理した場合、ES 細胞、線維芽細胞いずれもアセチル化ヒストン H2A.Z の増加や局在に変化はみられなかった。以上の結果より、SAHA は線維芽細胞に対してヒストン H2A.Z のアセチル化誘導活性を示した。一方、Oxamflatin は ES 細胞及び線維芽細胞のアセチル化誘導活性は示さなかった。

バルプロ酸(VPA)は、体細胞クローン効率には影響を及ぼさないものの、マウスやヒト iPS 細胞の樹立効率を改善することから、分化細胞に対するリプログラミング促進に効果を及ぼす可能性を検証するため、同様の実験を行った。その結果、ES 細胞、線維芽細胞ともに顕著なヒストン H2A.Z のアセチル化の誘導や局在に変化は認められなかった。以上の結果より、HDACi に対するヒストン H2A.Z の応答性は、HDACi や細胞の種類によって、ヒストンのアセチル化やクロマチンからの除去に差異があることが示された。

今後、体細胞核移植卵子のリプログラミングと発生の過程における細胞核高次構造の作用を明らかにしていく過程において、(1) 染色体テリトリーや遺伝子座の動態と分化制御のしくみが明らかになればリプログラミングに適した核内環境の誘導技術につながる。(2) ヒストン H2A バリエーションの動態が発生あるいはリプログラミングに果たす役割が明らかとなれば、発生に係わるクロマチンリモデリング機構の解明の糸口となる。(3) ヒストンバリエーションの動態などクロマチンリモデリングの観点からリプログラミングの評価指標が確立されれば、新規多能性幹細胞の開発や分化誘導技術など再生医学の発展に寄与するとともに、(4) マウスや家畜などの汎用動物以外の動物種での効率的なクローン技術の開発に貢献し、絶滅危惧動物の再生や遺伝資源保存など生物多様性の分野に展開されることが期待される。

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 4 件)

Shimizu N, Ueno K, Kurita E, Shin SW, Nishihara T, Amano T, Anzai M, Kishigami S, Kato H, Mitani T, Hosoi Y, Matsumoto K. Possible Role of ZPAC, Zygote-specific Proteasome Assembly Chaperone, during Spermatogenesis in the Mouse. *J. Reprod. Dev.* 60, 2014. (印刷中) (査読有)

Hatanaka Y, Shimizu N, Nishikawa S, Tokoro M, Shin SW, Nishihara T, Amano T, Anzai M, Kato H, Mitani T, Hosoi Y, Kishigami S, Matsumoto K. GSE is a maternal factor involved in active DNA demethylation in

zygotes. PLoS One 8, e60205, 2013.(査読有)
Yamochi T, Kida Y, Oh N, Ohta S, Amano T, Anzai M, Kato H, Kishigami S, Mitani T, Matsumoto K, Saeki K, Takenoshita M, Iritani A, Hosoi Y. Development of interspecies cloned embryos reconstituted with rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) oocytes and cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) fibroblast cell nuclei. *Zygote* 21, 358-366, 2013. (査読有)

城ヶ原貴通, 山田文雄, 越本知大, 黒岩麻里, 木戸文香, 中家雅隆, 望月春佳, 村田知慧, 三谷匡. トゲネズミ研究の最近 3~琉球諸島哺乳類保全の次世代を担う者達~. *哺乳類科学* 53, 170-173, 2013. (査読無)

[学会発表](計 16 件)

中家雅隆, 恵本哲矢, 石川裕子, 安齋政幸, 東里香, 細井美彦, 原田昌彦, 三谷匡. TSA 処理によるマウス体細核移植卵子におけるヒストン H2A バリエーションの動態. 第 35 回日本分子生物学会年会 神戸市(神戸ポートアイランド), 2013 年 12 月 3 日~6 日.

恵本哲矢, 中家雅隆, 加藤博己, 岸上哲士, 細井美彦, 原田昌彦, 三谷匡. マウス ES 細胞においてヒストン H2A.Z はヒストン脱アセチル化酵素阻害剤により選択的に除去される. 第 35 回日本分子生物学会年会 神戸市(神戸ポートアイランド), 2013 年 12 月 3 日~6 日.

中家雅隆, 高津永, 石川裕子, 恵本哲矢, 安齋政幸, 岸上哲士, 細井美彦, 原田昌彦, 三谷匡. トリコスタチン A がマウス体細核移植卵子におけるヒストン H2A バリエーションの動態に及ぼす影響. 第 31 回日本受精着床学会総会・学術講演会 別府市(別府国際コンベンションセンター), 2013 年 8 月 8 日~9 日.

恵本哲矢, 端保舞, 中家雅隆, 岸上哲士, 細井美彦, 原田昌彦, 三谷匡. リコスタチン A がマウス ES 細胞におけるヒストン H2A バリエーションの動態に及ぼす影響. 第 31 回日本受精着床学会総会・学術講演会 別府市(別府国際コンベンションセンター), 2013 年 8 月 8 日~9 日.

Kawaguchi S, Emoto T, Hirano D, Nakaya M, Hosoi Y, Tanabe H, Mitani T. Looping out model of tissue specific gene loci with hepatocyte differentiation process of mouse embryonic stem cells. 第 35 回日本分子生物学会年会, 2012 年 12 月 12 日, 福岡市.

Nakaya M, Emoto T, Kawaguchi S, Takatsu H, Anzai M, Hosoi Y, Harata M, Mitani T. The effect of trichostatin A on the dynamics of histone H2A variants in mouse somatic cell nuclear transfer embryos. 第 35 回日本分子

生物学会年会, 2012 年 12 月 14 日, 福岡市. Emoto T, Kawaguchi S, Nakaya M, Hirano D, Kishigami S, Hosoi Y, Harata M, Mitani T. Chromatin remodeling that take advantage of histone H2A.Z of mouse embryonic stem cells. 第 35 回日本分子生物学会年会, 2012 年 12 月 14 日, 福岡市.

Hatanaka Y, Shimizu N, Morita K, Nishikawa S, Nishihara T, Kato R, Takemoto A, Higuchi C, Amano T, Kishigami S, Anzai M, Kato H, Mitani T, Hosoi Y, Matsumoto K. GSE is a maternal factor for DNA demethylation in early embryos. 第 35 回日本分子生物学会年会, 2012 年 12 月 11 日, 福岡市.

Mitani T. Modulating the Distribution of Histone Variants in the Mouse Somatic Cell Nuclear Transfer Embryos. 4th Congress of Asia Pacific Initiative on Reproduction (ASPIRE2012) (招待講演) 2012 年 8 月 31 日~9 月 2 日, 大阪国際会議場、大阪市. 石川裕子, 恵本哲矢, 中家雅隆, 川口翔, 平野大起, 加藤博己, 安齋政幸, 岸上哲士, 入谷明, 細井美彦, 福田愛作, 森本義晴, 三谷匡. マウス体細胞核移植卵子におけるヒストン H2A.Z の動態に及ぼすトリコスタチン A の影響. 第 30 回日本受精着床学会総会・学術講演会, 2012 年 8 月 31 日, 大阪市.

加藤博己, 明野美穂, 北村亮, 山口広生, 沼田雄基, 木島隆之, 安齋政幸, 三谷匡, 松本和也, 佐伯和弘, 細井美彦, 入谷明. Dnmt1p ノックダウンマウスの解析. 第 30 回日本受精着床学会総会・学術講演会, 2012 年 8 月 31 日, 大阪市.

恵本哲矢, 川口翔, 中家雅隆, 平野大起, 加藤博己, 岸上哲士, 入谷明, 細井美彦, 原田昌彦, 三谷匡. マウス ES 細胞におけるヒストン H2A.Z の動態制御を介した人為的クロマチンリモデリング. 第 30 回日本受精着床学会総会・学術講演会, 2012 年 8 月 30 日, 大阪市.

Kawaguchi S, Emoto T, Hosoi Y, Tanabe H, Mitani T. Looping out of gene loci of hepatocyte specific gene *Tdo2* in chromosome territories under the in vitro differentiation of mouse embryonic stem cells. 第 34 回日本分子生物学会, 2011 年 12 月 13 日, 横浜市.

石川裕子, 西山有依, 川口翔, 平野大起, 加藤博己, 安齋政幸, 入谷明, 細井美彦, 三谷匡. マウス ES 細胞クローン卵子におけるクロマチンリモデリング因子ならびにヒストンバリエーションの動態とその人為制御. 第 29 回日本受精着床学会総会・学術講演会, 2011 年 9 月 9 日, 東京.

Kawaguchi S, Hirano D, Hosoi Y, Anzai M, Tanabe H, Mitani T. Nuclear dynamics in

chromosome territories and gene loci under *in vitro* differentiation of mouse embryonic stem cells. 44th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists, May 18-19, 2011, Okinawa, Japan.

〔図書〕(計1件)

三谷匡、他(共著) 朝倉書店、哺乳動物の発生工学、2014、pp103-117.

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等:

<http://www.waka.kindai.ac.jp/tea/sentan/kyoin/mitani.1/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

三谷 匡 (MITANI, Tasuku)

近畿大学・先端技術総合研究所・教授

研究者番号: 10322265

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

原田 昌彦 (HARATA, Masahiko)

東北大学・大学院農学研究科・准教授

研究者番号: 70218642

田辺 秀之 (TANABE, Hideyuki)

総合研究大学院大学・先端科学研究科・准教授

研究者番号: 50261178