

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月16日現在

機関番号：16101  
 研究種目：基盤研究（B）  
 研究期間：2010～2012  
 課題番号：22370080  
 研究課題名（和文） 昆虫（コオロギ）を用いた脚切断による再生芽形成メカニズムの解明  
 研究課題名（英文） Mechanisms of blastema formation after leg amputation  
 in Gryllus bimaculatus  
 研究代表者  
 野地澄晴（NOJI SUMIHARE）  
 徳島大学・本部・理事  
 研究者番号：40156211

研究成果の概要（和文）：コオロギの脚の再生に着目して、そのメカニズムを解明した。特に、基礎データとして、コオロギのゲノム解析を行った。研究方法の新規開発を行い、人工核酸分解酵素を用いたノックアウトコオロギを作製することに成功した。また、コオロギの再生芽の形成に Jak/Stat 系が関与していることを証明した。これらの結果から、新規ゲノムデータとノックアウト法を組み合わせ、さらに再生メカニズムを解明できることがわかった。

研究成果の概要（英文）：We attempted to elucidate molecular mechanisms underlying leg regeneration of the cricket nymph. We obtained cricket genome data, using new sequencers to know basic genetic data. We also developed a new method to edit cricket genome by artificial nucleases such as TALEN or CRISPR/Cas. We made successfully knockout crickets. We found that the Jak/Stat signaling system is involved in formation of blastema. With our results, we may facilitate elucidation of regeneration mechanisms in general.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
2011年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
2012年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
総計	14,700,000	4,410,000	19,110,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：コオロギ、脚再生、ゲノム編集技術、Jak/Stat 系、ノックアウトコオロギ

## 1. 研究開始当初の背景

コオロギの幼虫の脚を切断すると、再生芽が形成され、最終的にはほぼ正常な脚が再生される。この再生のメカニズムは、脊椎動物の脚の再生メカニズムと基本的には類似しており、再生原理は同じであると考えられている。しかし、コオロギを用いた研究は近年行われておらず、分子生物学的な方法を用いた研究はわれわれ以外にはまったく行われていない。そこで、本研究では、再生現象を分

子レベル、遺伝子レベルから解明することを目的としている。コオロギについてはノックアウトコオロギが作製できないので、遺伝子の機能解析が遅れている。また、ゲノムサイズが 1.7Gbp もあり、ゲノム配列がまだ決定されていない。これらの基礎的なデータや技術を開発しながら、本研究では特に初期において再生芽が形成されるが、その過程を詳細に研究し、再生芽がどのように形成されるかについて、解明する。さらに、再生に関与する他の遺伝子も解析し、再生芽形成の全体像

を解明する。

## 2. 研究の目的

(1) 脊椎動物の脚の再生には、FGF, BMP, Wnt, Shh などが関与していることが示唆されている昆虫においても同様に EGF, dpp, wg, hh 遺伝子が関与しているため、再生原理が同じである可能性が高い。そこで、コオロギのゲノム配列を解析し、対応する遺伝子を同定し、さらにその dsRNA を作製することにより、rdRNAi により、脚再生過程における目的遺伝子の機能を調べる。一方、過剰発現やレスキュー実験を行う必要があることから、トランスジェニックコオロギを用いて、その機能をさらに調べる。さらに、TALEN を用いたノックイン法を開発し、マーカー遺伝子を標的遺伝子の一部にノックインすることにより、得られたタンパク質の発現挙動をリアルタイムで観測できるようにしたい。結果を得るにはリスクがあるが、この研究が再生脚研究の基盤となればと考えている。

一方、Jak/Stat シグナル経路が脚再生に関与することが遺伝子発現解析からわかったため、そのシグナル経路の遺伝子の再生における機能を再生依存的 RNAi (rdRNAi) により解明する。再生芽において、Jak/Stat シグナル経路に関与する遺伝子の発現を調べる。

Jak/Stat シグナル経路は傷修復過程に関与すると考えられるため、傷修復における役割についても、rdRNAi 法により調べる。この実験により、Jak/Stat シグナル経路が脚が切断されることにより誘導されることを調べ、その誘導因子について同定する。同定された因子がコオロギの遺伝子として販売できれば、市場があると考えられる。このようにして得られて結果を総合的に判断して、昆虫の脚が再生する初期の過程を解明する。

## 3. 研究の方法

(1) 再生芽を構成する細胞の系譜の解明 : GFP トランスジェニックコオロギの作製 piggyBac トランスポゼーズを用いて、トランスジェニックコオロギの作製を行った。特に、組織特異的に GFP を発現させる系の開発を Gal4-UAS システムなどを用いて行ったが、結果的に成功しなかった。さらに、ヒートショックプロモーターを用いた系の作製も試みたが、トランジェントなアッセイではヒートショックがかかるが、トランスジェニックラインでは恒常的に発現するラインしか得ることができなかった。その原因については、シスエレメントの長さが関係しているかもしれないので、さらにシスエレメントを広げて試みる予定である。

(2) 移植実験 : コオロギの幼虫の脚を切断すると、約 20 日でほぼ完全に再生する。再生芽は切断後 5 日までに形成され、切断後 10 日目までには先端から切断面までの微小な構造ができる。GFP を発現するトランスジェニックコオロギの脚を、GFP を発現しないコオロギの脚を移植した。神経細胞と予想される細胞が、ホストの脚からドナーの脚へ移動することがわかった。この細胞についてさらに詳細に研究する予定である。

(3) 再生芽を誘導する遺伝子群の同定 : (1) 脚再生過程で発現する遺伝子の EST データベース作成 脚切断前、切断直後の傷修復期、再生芽形成期の cDNA の EST データを、次世代シーケンサーを用いて集め、ショウジョウバエのデータなどを参考に再生関連遺伝子のデータベースを作成した。(2) 再生芽形成初期の組織における遺伝子発現パターンの網羅的解析の結果、Jak/Stat 系の遺伝子発現が活性化されていることがわかった。そこで、再生依存性の RNAi を用いて、その機能を解析した。

## 4. 研究成果

(1) コオロギのゲノム解析  
遺伝子の機能解析に必要な配列情報やシス調節配列情報の取得をスムーズに進めるために、次世代シーケンサーによるフタホシコオロギ (ゲノムサイズ推定 1.7Gb) の全ゲノムシーケンス解析を実験室維持系統 (白眼変異体系統) を用いて行った。当初は複数個体に由来するゲノム DNA を用いてイルミナ GAIIX と HiSeq2000 によるシーケンス (ペアエンド解析約 100Gb) とアセンブリを行ったが、予想以上の多型頻度の高さなどが問題となりアセンブリの連結性が非常に低かった (スキャフォールド N50 : 約 1.4kb)。この問題を解決するために、1 個体から抽出したゲノム DNA からインサートサイズ 375bp、および 500bp のライブラリを作製し、イルミナ HiSeq2000 によるシーケンス解析を行った。この 1 個体由来のペアエンド解析データ (約 100Gb) に、インサートサイズ 3kb、5kb、10kb のメイトペア解析データを加えてアセンブリを行った (伊藤武彦教授 (東工大) との共同研究)。その結果、スキャフォールド N50 が約 504kb (前年度までの結果 : 約 1.4kb) まで伸長した。本アセンブリ結果を用いて主要な遺伝子について調べたところ、コオロギの遺伝子サイズはショウジョウバエやトリボリウムなど他の昆虫と比較して顕著に大きい傾向があることがわかった。また、Wnt ファミリーの一部の遺伝子にクラスター構造のシンテニーが示唆された。さらに、コオロギゲノムに、完全変態類の昆虫では見つからない Wnt16 が存在することが明らかにな

った。また、脚のパターン形成に関与する dachshund 遺伝子の構造から、本遺伝子の特徴的なオルタナティブスプライシングの様式が明らかとなった。現アセンブリについてはコンティグの連結性 (N50 約 7.8kb) を向上させるなどの課題がまだ残っているものの、遺伝子数や遺伝子構造の情報が容易に得られるようになり、再生に関わるゲノム機能解析の基盤が格段に向上した。本ドラフトシーケンスをもとに全ゲノムにわたるアノテーションとゲノムデータベース構築に移行した。

(2) コオロギにおけるゲノム編集実験  
フタホシコオロギは、RNAi による機能解析とトランスジェニック作製技術を駆使して、発生・再生研究を進めており、新たなモデル生物として注目されている。これらの技術はコオロギにおいては簡便であり、発生・再生研究において大変有用である。しかし、RNAi 実験では標的遺伝子の機能を完全に阻害する事はできず、現在のトランスジェニック作製技術では外来遺伝子の挿入位置や挿入遺伝子数を制御する事は不可能である。だが、発生・再生研究を進める上で遺伝子の機能阻害実験や標的的特異的な遺伝子導入技術は必要不可欠である。そこで人工制限酵素である Zinc Finger Nuclease (ZFN) 及び TAL effector Nuclease (TALEN) を用いてコオロギへの遺伝子改変技術の導入を目的として研究を行った (広島大学・山本卓教授らと共同研究)。遺伝子改変の第一歩として、標的配列への変異導入を行った。

① 外来遺伝子 eGFP への変異導入: まず、コオロギで人工制限酵素が働くかどうかを確かめるために、eGFP を全身で発現するトランスジェニック系統に eGFP に対する ZFN を導入し、変異導入を試みた。その結果、導入した世代では予想されたような蛍光の消失は観察されなかった。しかし、導入した世代を掛け合わせたところ、次世代において、蛍光を消失した卵が得られた。これらの卵の持つ eGFP には ZFN により変異が導入されていた。この結果より、人工制限酵素がコオロギ内で働く事が明らかになった。

② 内在遺伝子 laccase2 (lac2) への変異導入及びノックアウト系統の作製: 次に、内在遺伝子に対する効果を検証するために、コオロギ lac2 に対する ZFN/TALEN を用いて変異導入及びノックアウト系統の作製を試みた。lac2 はクチクラの黒色化に必須の遺伝子で、RNAi 実験により白色に近い個体を得られており、ノックアウト系統の表現型の観察が容易であると考えられる。ZFN/TALEN をコオロギ内に導入した結果、ふ化した幼虫の体表に白い斑点が観察された。この斑点領域の細胞は ZFN/TALEN によって両アレルに変異が導入されたと考えられる。

次に、ノックアウト系統作製技術の確立を行った。lac2 の場合では、表現型の観察が容易であるため、単純に掛け合わせるだけでもノックアウトが得られる可能性があるが、その他の遺伝子の場合、困難となる。そこで、SURVEYOR Nuclease を用いて、次世代の卵及び幼虫期での二段階の選抜を行う事で、次世代でのヘテロ変異体を同定する方法を確立した。そして得られたヘテロ変異体同士を掛け合わせる事で、孫世代においてホモ変異体 (ノックアウト) を得る事ができた。この SURVEYOR Nuclease を用いた方法は lac2 だけでなくその他の内在遺伝子に対しても有効な方法であると考えられる。以上の研究成果は、2012 年に Nature Communication 誌に発表した。

### ③ CRISPR/Cas システムの導入

2013 年に最新のゲノム編集技術として CRISPR/Cas (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated) システムが報告された。この技術は、バクテリアが持つ対ウイルス免疫システムを利用したもので、ZFN/TALEN よりもさらに汎用的ではないかと期待されている。そこで、フタホシコオロギに CRISPR/Cas システムの導入を試みた。これまでに、lac2 を含めコオロギゲノム中で 6 カ所の標的を設定し、その全てで変異を導入することに成功している。この技術は ZFN/TALEN と比較して、大変容易にコンストラクトを作製する事ができ、高効率に変異を導入する事ができるため、今後コオロギにおいてもゲノム編集の主役になると期待される。

### (3) コオロギ再生芽における JAK/STAT シグナルの機能

コオロギなど不完全変態昆虫は高い再生能を持ち、幼虫の脚を切断すると数回の脱皮を経て未切断の脚と同様の大きさや形態に再生することができる。再生される領域は、切断後すぐに断端近くに形成される再生芽に由来する。再生芽細胞は分化細胞が脱分化した細胞で増殖が高い。分化細胞と再生芽細胞とで発現が変化する遺伝子を網羅的に単離するため、脚切断により再生を誘導して 24 時間の再生芽領域と、未切断の領域からトータル RNA を抽出し、次世代シーケンサーでそれぞれ 1 Gb ずつシーケンスした。得られたリードをアセンブルしてコンティグを構築し、コンティグに対して再生芽由来リードと分化組織由来リードをマッピングして発現強度を比較した。約 5 万本のコンティグのうち約 1 万本が再生芽で 2 倍以上に発現上昇しており、約 9 千本が 1/2 以下に発現低下していた。再生芽細胞で発現上昇していたコンティグには、初期発生や細胞増殖に関連する JAK/STAT シグナル分子が含まれていた。トラ

ンスクリプトーム解析の結果が妥当なものかどうかを検討するため、トランスクリプトームにおいて再生芽細胞で強く発現上昇していた JAK/STAT シグナル分子に対する機能解析を行った。JAK/STAT シグナルの受容体をコードする *domeless* (*dome*), キナーゼをコードする *hopscotch* (*hop*), 転写因子をコードする *Stat*, JAK/STAT シグナルを抑制的に制御する *SOCS2* などをクローニングした。リアルタイム qPCR により *dome*, *hop*, *Stat* は脚切断後 24 時間に 2~2.5 倍に発現が上昇することが確認出来たため、コオロギ 3 齢幼虫に対して RNAi を行って脚再生過程での機能解析を行った。コオロギ *dome* (RNAi), *hop* (RNAi), *Stat* (RNAi) 個体は生存可能であったため脚を切断したところ、切断した脚は再生しなかった。野生型と比較して、*Stat* (RNAi) 個体の再生芽ではサイクリン E の発現が半減した。また *SOCS2* (RNAi) により JAK/STAT シグナルを恒常的に活性化するとサイクリン E の発現は 1.7 倍に上昇し、再生脚の長さは通常よりも長くなった。以上の結果より、再生芽で働く因子が比較トランスクリプトーム解析により単離できることが分かった。

#### (4) コオロギ再生芽におけるエピジェネティック因子の機能

コオロギの脚を切断すると、失われた脚の領域は、脚の断端に形成される再生芽から再生される。再生芽細胞は分化細胞が脱分化した多分化能を持つ細胞で、増殖能が高い。分化細胞と再生芽細胞では様々な遺伝子の発現が変化していると考えられ、エピジェネティック因子は再生芽細胞への脱分化過程で遺伝子発現を変化させるキーと考えられてきたが、再生過程における機能解析の報告はほとんど無かった。

再生過程に働くエピジェネティック因子を同定するため、既知の 37 種類のエピジェネティック因子のコオロギホモログをクローニングし、RNAi により機能的スクリーニングを行った。ヒストンのメチル化やアセチル化を制御する 11 因子に対する RNAi により再生不能や再生脚の形態異常の表現型が得られた。また次世代シーケンサーを用いた比較トランスクリプトーム解析から、分化細胞と比較して再生芽細胞で発現が 2 倍以上に上昇したエピジェネティック因子が 24 種類同定された。ヒストン H3 27 番目のリジン残基 (H3K27) の脱メチル化に働く *Utx* の発現は約 9 倍、またヒストン H3K27 のメチル化に働く *Enhancer of zeste* (*E(z)*)、メチル化ヒストン H3K27 に結合する *Polycomb* (*Pc*) の発現は 2.2 倍、4.5 倍に上昇しており、ヒストン H3K27 のメチル化状態が器官再生に重要であることが示唆された。*E(z)* や *Utx* に対する RNAi を行ったところ、*E(z)* (RNAi) 個体は再生脚の

脛節と付節の間に脚節が 1 つ過剰に形成され、*Utx* (RNAi) 個体は再生脚の付節第 1 節と第 2 節の関節が融合する形態異常の表現型を示した。抗メチル化ヒストン H3K27 抗体を用いた免疫染色から、*E(z)* (RNAi) 個体ではヒストン H3K27 のメチル化は消失しており、*Utx* (RNAi) 個体ではメチル化が亢進していた。これら RNAi 個体の再生脚では、形態異常を示した領域において脚のパターン形成を促進する遺伝子群の異所的な発現誘導や発現の消失が観察され、脚再生過程においてパターン形成遺伝子群の再発現にヒストン H3K27 のメチル化を介したエピジェネティックな発現制御機構が働いていることを明らかにした。

#### (5) *Distal-less* と *dachshund* の再生における機能

コオロギは幼虫期に脚切断後、完全な再生能を持つ。しかし、再生脚の遠近軸再構築に関与する遺伝子はこれまで明確ではない。我々は、RNAi 法により遠近軸に沿った再生過程において *dachshund* が脛節及び第 1 附節で位置情報獲得に関与し、*Distal-less* が第 2、3 附節の形成及び *dachshund* の発現制御を介して第 1 附節の脚長に関与することを見出した。さらに、再生脚の位置情報の形成に関与する *Dachsous/Fat* のノックダウン表現型が *dachshund* と類似することからこれらの関係に着目し、*Dachsous* または *Fat* ノックダウン後の *dachshund* 発現を解析した結果、*Dachsous/Dachsous homophilic* が *dachshund* の発現に必要であることが明らかとなった。しかし、*Fat* で *dachshund* の発現に影響はなく、また *dachshund* は DNA 結合能を保持しないことから他の転写因子の関与が示唆された。これまでに、*dachshund* は *dpp* シグナル伝達因子 *Mad* と複合体を形成し、*dpp* シグナルに対し抑制的に機能することや、ショウジョウバエ脚の *distal joint* が *dpp* 活性の境界によって誘導される局所的細胞死により形成されることが報告されている。そこで我々は、*Mad* と抑制型 *Mad* である *dad* に着目し、RNAi 法により再生脚での機能解析を行った。*Mad* RNAi では附節の欠損と脛節先端が遠位側にシフトするのに対し、*dad* RNAi では脛節先端が近位側にシフトする結果が得られ、*dpp* シグナルが位置情報の形成に関与することが示唆された。以上の結果から、脛節の近位側では *Dachsous/Dachsous homophilic* により正に制御される *dachshund* が *Mad* と複合体を形成することで *dpp* シグナルを負に抑制し、遠位側では *Dachsous/Fat heterophilic* による *dachshund* の負の発現制御に伴う機能的 *Mad* の細胞死誘導による分節形成、さらに *Hippo pathway* を介した細胞増殖抑制によって遠近軸に沿った位置情報が決定されると考察され、今後さらに解析を進める予定であ

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 8 件)

- ① Bando T, Ishimaru Y, Kida T, Hamada Y, Matsuoka Y, Nakamura T, Ohuchi H, Noji S, Mito T. Analysis of RNA-Seq data reveals involvement of JAK/STAT signalling during leg regeneration in the cricket *Gryllus bimaculatus*. *Development*. 2013;140(5): 959-964. 査読有り. Select item 22910363 DOI:10.1242/dev.084590.
- ② Watanabe T, Ochiai H, Sakuma T, Horch HW, Hamaguchi N, Nakamura T, Bando T, Ohuchi H, Yamamoto T, Noji S, Mito T. Non-transgenic genome modifications in a hemimetabolous insect using zinc-finger and TAL effector nucleases. *Nat Commun*. 2012;3:e1017. 査読有り. DOI:10.1038/ncomms2020.
- ③ Takagi A, Kurita K, Terasawa T, Nakamura T, Bando T, Moriyama Y, Mito T, Noji S, Ohuchi H. Functional analysis of the role of eyes absent and sine oculis in the developing eye of the cricket *Gryllus bimaculatus*. *Dev Growth Differ*. 2012 Feb;54(2):227-240. 査読有り. DOI:10.1111/j.1440-169X.2011.01325.x.
- ④ Mito T, Shinmyo Y, Kurita K, Nakamura T, Ohuchi H, Noji S. Ancestral functions of Delta/Notch signaling in the formation of body and leg segments in the cricket *Gryllus bimaculatus*. *Development*. 2011 Sep; 138(17): 3823-3833. 査読有り. DOI:10.1242/dev.060681.
- ⑤ Dabour N, Bando T, Nakamura T, Miyawaki K, Mito T, Ohuchi H, Noji S. Cricket body size is altered by systemic RNAi against insulin signaling components and epidermal growth factor receptor. *Dev Growth Differ*. 2011 Sep;53(7):857-869. 査読有り. DOI:10.1111/j.1440-169X.2011.01291.x.
- ⑥ Bando T, Hamada Y, Kurita K, Nakamura T, Mito T, Ohuchi H, Noji S. Lowfat, a mammalian Lix1 homologue, regulates leg size and growth under the Dachous/Fat signaling pathway during tissue regeneration. *Dev Dyn*.

2011 Jun; 240(6): 1440-1453. 査読有り. DOI:10.1002/dvdy.22647.

- ⑦ Bando T, Mito T, Nakamura T, Ohuchi H, Noji S. Regulation of leg size and shape: involvement of the Dachous-fat signaling pathway. *Dev Dyn*. 2011 May;240(5):1028-1041. 査読有り. Select item 21261610 DOI:10.1002/dvdy.22590.
- ⑧ Nakamura T, Yoshizaki M, Ogawa S, Okamoto H, Shinmyo Y, Bando T, Ohuchi H, Noji S, Mito T. Imaging of transgenic cricket embryos reveals cell movements consistent with a syncytial patterning mechanism. *Curr Biol*. 2010;20(18):1641-1647. 査読有り. DOI:10.1016/j.cub.2010.07.044.

[学会発表] (計 38 件)

- ① Watanabe T, Ochiai H, Sakuma T, Nakamura T, Mito T, Yamamoto T, Noji S. Generation of knockout crickets using ZFNs and TALENs, 第 35 回日本分子生物学会年会, 2012 年 12 月 11~14 日 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡 (福岡県)
- ② Bando T, Ishimaru Y, Kida T, Mito T, Ohuchi H, Noji S. Molecular mechanism of regulation of blastemal cell proliferation during leg regeneration in *Gryllus bimaculatus* 第 35 回日本分子生物学会年会, 2012 年 12 月 11~14 日 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡 (福岡県)
- ③ Watanabe T, Ochiai H, Sakuma T, Horch H, Hamaguchi N, Nakamura T, Bando T, Ohuchi H, Yamamoto T, Noji S, Mito T. Gene knockout in a hemimetabolous insect *Gryllus bimaculatus* by nontransgenic genome modification with zinc-finger and TALE nucleases Asia-Pacific Developmental Biology Conference, 2012 年 10 月 5~8 日 Taipei Innovation City Convention Center (Taiwan)
- ④ Watanabe T, Ochiai H, Sakuma T, Nakamura T, Mito T, Yamamoto T, Noji S. Efficient production of knockout crickets using custom designed nucleases ZFNs and TALENs, FASEB Science Research Conferences: Genome Engineering; Research & Applications 2012 年 9 月 2~7 日 Il Ciocco Risort and Spa (Italy)
- ⑤ 渡辺 崇人, 中井 綾, 三戸 太郎, 野地 澄晴 ZFN/TALEN を用いたフタホシコオ

- ロギにおける遺伝子改変について, 第 2 回ゲノム編集研究会, 2012 年 9 月 20 日、岡崎コンファレンスセンター (愛知県)
- ⑥ Nakamura T, Mito T, Bando T, Noji S. Role of Wnt and BMP signaling pathways in the regional specification of early blastoderm in the cricket *Gryllus bimaculatus*, 24<sup>th</sup> International Congress of Entomology 2012 年 8 月 19~25 日. The Exco-Daegu Convention Center, Daegu (Korea)
- ⑦ Bando T, Hamada Y, Nakamura T, Mito T, Ohuchi H, Noji S. Dachous/Fat signaling via Hippo/Salvador/Warts pathway regulates cell proliferation and pattern formation during leg regeneration in the cricket, 24th International Congress of Entomology 2012 年 8 月 19~25 日 The Exco-Daegu Convention Center, Daegu (Korea)
- ⑧ Mito T, Nakamura T, Bando T, Watanabe T, Noji S. Exploring mechanisms of embryonic patterning in *Gryllus bimaculatus*, a hemimetabolous insect model system, [Symposium: From embryo to metamorphosis: Genes for insect development. (Organizers: Sumihare Noji and Martin Klingler)], 24th International Congress of Entomology 2012 年 8 月 19~25 日 The Exco-Daegu Convention Center, Daegu (Korea)
- ⑨ Nakamura T, 三戸 太郎, 大内 淑代, 野地 澄晴 Regulation of orthodenticle and Wnt/Cad signaling pathway in anterior-posterior axis patterning during cricket early embryogenesis, 第 45 回日本発生生物学学会年会 2012 年 5 月 28~31 日, 神戸国際会議場(兵庫県)
- ⑩ Bando T, 三戸 太郎, 大内 淑代, 野地 澄晴 Angiotensin regulates cell proliferation cooperatively with Expanded and Merlin during leg regeneration in *Gryllus bimaculatus*, 第 45 回日本発生生物学学会年会 2012 年 5 月 28~31 日, 神戸国際会議場(兵庫県)
- ⑪ Watanabe T, Ochiai H, Sakuma T, Nakamura T, 三戸 太郎, 大内 淑代, Yamamoto T, 野地 澄晴 Efficient production of knockout crickets using zinc-finger nucleases, 第 45 回日本発生生物学学会年会 2012 年 5 月 28~31 日, 神戸国際会議場(兵庫県)
- ⑫ 野地 澄晴, Bando T, 三戸 太郎, 大内 淑代 Molecular mechanisms underlying insect leg regeneration: from wound healing to leg size determination, 第 34 回日本分子生物学会年会 2011 年 12 月 13~16 日, パシフィコ横浜 (神奈川県)
- ⑬ 三戸 太郎, Nakamura T, Watanabe T, Ochiai H, Sakuma T, Bando T, 大内 淑代, 野地 澄晴 Exploring molecular mechanisms of early embryogenesis in the cricket *Gryllus bimaculatus*, 第 34 回日本分子生物学会年会 2011 年 12 月 13~16 日, パシフィコ横浜 (神奈川県)
- ⑭ Watanabe T, Ochiai H, Sakuma T, Nakamura T, 三戸 太郎, 大内 淑代, Yamamoto T, 野地 澄晴 Making knockout crickets with zinc-finger nucleases, 第 34 回日本分子生物学会年会 2011 年 12 月 13~16 日, パシフィコ横浜 (神奈川県)
- ⑮ Bando T, 三戸 太郎, 大内 淑代, 野地 澄晴 Angiotensin regulates leg size cooperatively with Expanded and Merlin during regeneration in *Gryllus bimaculatus*, 第 34 回日本分子生物学会年会 2011 年 12 月 13~16 日, パシフィコ横浜 (神奈川県)
- ⑯ Matsuoka M, Bando T, Nakamura T, 三戸 太郎, 大内 淑代, 野地 澄晴 Polycomb group genes epigenetically determines segmental identity in the cricket, *Gryllus bimaculatus*, 第 34 回日本分子生物学会年会 2011 年 12 月 13~16 日, パシフィコ横浜 (神奈川県)
- ⑰ Mito T, Nakamura T, Bando T, Noji S. Ancestral developmental mechanisms in insects revealed by RNAi analysis of cricket genes, [Symposium: RNA interference - comparative studies of gene functions in invertebrates], 8th International Congress on Comparative Physiology and Biochemistry. 2011 年 5 月 31 日~6 月 5 日, 名古屋国際会議場 (愛知県)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

野地 澄晴 (NOJI SUMIHARE)

徳島大学・本部・理事

研究者番号: 40156211

### (2) 研究分担者

大内 淑代 (OHUCHI HIDEYO)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号: 00253229

三戸 太郎 (MITO TARO)

徳島大学・大学院リソテクノサイエンス研究部・

助教、研究者番号: 80322254

### (3) 連携研究者 なし