

# 昆虫に学ぶ器官再生

Molecular basis of insect leg regeneration.

岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科 細胞組織学分野 助教 **板東 哲哉**

Tetsuya Bando (Assistant Professor)

Department of Cytology and Histology, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences

岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科 細胞組織学分野 博士研究員 **濱田 良真**

Yoshimasa Hamada (Postdoctoral fellow)

Department of Cytology and Histology, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences

岡山大学 医学部医学科 医学科学生 **奥村 美紗**

Misa Okumura (Undergraduate student)

Faculty of Medicine, Okayama University Medical School

岡山大学 医学部医学科 医学科学生 **坂東 優希**

Yuki Bando (Undergraduate student)

Faculty of Medicine, Okayama University Medical School

岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科 細胞組織学分野 教授 **大内 淑代**

Hideyo Ohuchi (Professor)

Department of Cytology and Histology, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences



## キーワード

再生芽、位置情報、エピジェネティック制御

## 01 | はじめに

ヒトは事故や怪我などで手足を失うと再生することはできず、義肢に頼る生活を余儀なくされる。ES細胞やiPS細胞などの幹細胞から特定の細胞を作り出して機能を補う再生医療の基礎研究と臨床応用は日進月歩で進んでいるが、現在の再生医療技術では複数種の細胞が立体的な構造を形成する手足のような器官を再生させることは未だ実現できておらず、失った体の組織や器官を再生することは人類の夢となっている。ヒトに限らずマウスやニワトリなど哺乳類や鳥類の再生能は低く、既存の実験モデル動物を用いた器官再生の基礎研究には困難が伴う。

しかしながら実験室の外に目を向けると、器官再生能の高い生物が多数存在することに気づく。トカゲは、敵に襲われると尻尾を自切し、その後に元通りに再生することができる。両生類の再生能が非常に高いことはよく知られており、イモリやサンショウウオは手足や尻尾、脳や心臓の一部すら再生できる。扁形動物のプラナリアに至っては、小さく切られた断片から体全体を再生することが可能である<sup>1)</sup>。昆虫類では、蛹期を経ずに成虫へと成長する不完全変態昆虫類の幼虫が非常に高い再生能を有している。ゴキブリを用いた器官再生の形態学的解析が1970年代に精力的に行われていたが、分子生物学的な解析が行われないままに研究が途絶えてしまっていた<sup>2)</sup>。我々は、亜熱帯に

生息するフタホシコオロギを再生モデル昆虫とし、脚再生過程に働く分子メカニズムの解明に取り組んでいる。

## 02 | コオロギの脚再生過程

フタホシコオロギ(以下、コオロギ)はペットショップから安価で購入できる(図1A)。卵から孵化した幼虫は8回の脱皮を経て約1ヶ月で成虫となる<sup>3),4)</sup>。脚再生の実験には、体長約5mmの3齢幼虫を使用する<sup>5)</sup>。コオロギのゲノムサイズは約1.7Gb、遺伝

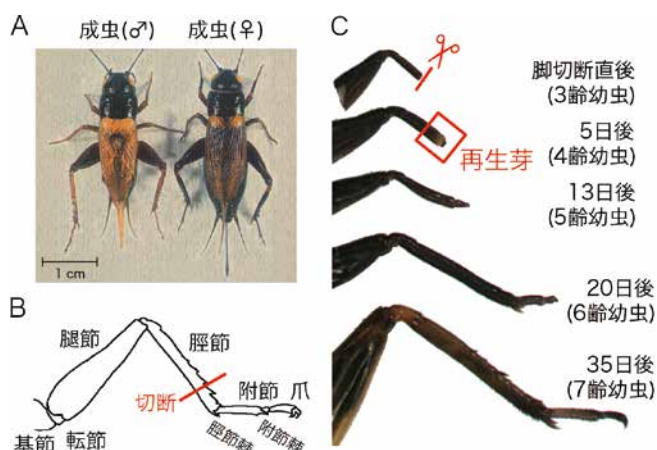


図1 再生モデル昆虫コオロギの脚再生過程

子数は約20,000と推定されている。幼虫および成虫のさまざまな組織に対して*in situ* hybridization法を用いた遺伝子の発現解析が可能であり、またRNA干渉法(RNAi)による遺伝子機能阻害、piggy/Bactトランスポゾンを用いた遺伝子導入、人工酵素ZFN、TALEN、CRISPR/Casによるゲノム編集などを応用することで、器官再生を遺伝子レベルで解析することができる<sup>6), 7)</sup>。

コオロギの脚は、体幹部に近い側から基節、転節、腿節、脛節、附節、爪に分かれている。後脚の脛節は背側に数対の棘が、遠位端に6本の脛節棘が形成される。附節はさらに3つの脚節に分かれており、附節第1節には附節棘が形成される(図1B)。コオロギの脚を脛節の中ほどで切断すると、以下の4つのステップを経て失われた部分が再生される。(1)創傷治癒;切断面が癒蓋で覆われた後、傷上皮が傷口を塞ぐ。(2)再生芽形成;脚の遠位端において、再生芽が形成される。再生芽細胞は分化細胞が脱分化した細胞で、幹細胞と同様に高い増殖能と多分化能を持つ細胞であり、再生する組織の元となる。(3)位置情報の認識;既存の組織の位置情報と遠位端に形成された再生芽の位置情報を元に、失われた部分が認識される。(4)再パターン形成;再生芽においてパターン形成遺伝子が再発現し、失われた部分のみが再生芽細胞から分化して再構築される<sup>8), 9)</sup>。これらのステップを経て、約2週間 で元通りの形態と機能を有する脚が再生する(図1C, 図2)。以下にコオロギ脚再生の各ステップの分子メカニズムを概説する。

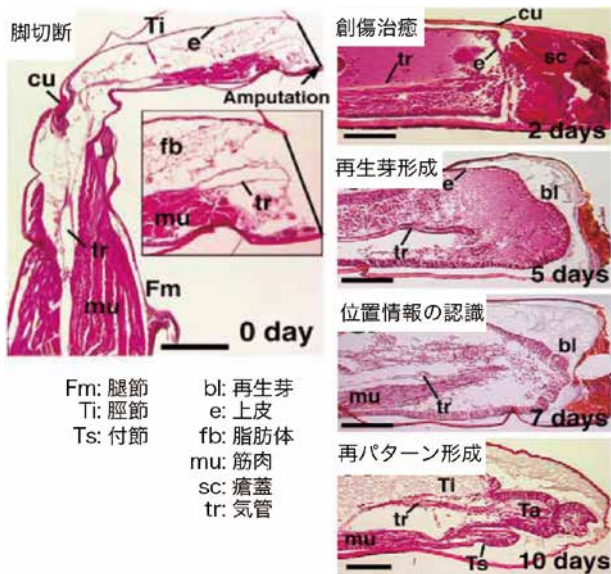


図2 脚再生過程の組織学的解析(文献 8)を一部改編)

### 2.1. 創傷治癒

ヒトと同様に昆虫も体が傷つくと癒蓋が形成されるが、昆虫は脊椎動物とは異なり開放血管系であるため血球成分は異なっている。ショウジョウバエを用いた研究から、癒蓋の形成にはプロフェノールオキシダーゼカスケードによる血漿成分の凝固が必要であることが分かっている。傷を受けた上皮細胞ではJNKやERKが活性化し、転写因子Grainy headの働きにより上皮細胞が移動して傷口を閉鎖することも明らかにされている<sup>10)</sup>。コオロギの創傷治癒についてはまだほとんど分かっていないが、同様の分子メカニズムで癒蓋や傷上皮の形成が起こると考えている。

### 2.2. 再生芽形成

器官再生において最も重要なステップが再生芽の形成である。再生芽は、傷上皮の直下、既存の組織の遠位端に形成される組織で、幹細胞と同様の高い増殖能と多分化能を有する再生芽細胞の塊である。再生芽には気管や筋肉が無く細胞の密度が高いため、既存の組織との判別は容易である。分化した細胞がIPS細胞のように脱分化を起こして再生芽細胞になると考えられており、速やかに細胞増殖を繰り返して再生芽を形成したのち、適切な時期に細胞増殖を停止し様々な細胞へと分化することで、失った組織を再生させる。

再生芽形成にはたらく分子メカニズムを明らかにするため、切断後24時間のコオロギの脚ならびに未切断の脚からRNAを抽出し、次世代シーケンサーを用いて比較トランスクリプトーム解析を行った。再生脚では、免疫や幹細胞の増殖に関わるJak/STATシグナル因子や、腫瘍形成の抑制にはたらくHippoシグナル因子の発現上昇が見られた。再生芽形成におけるこれらシグナル経路の役割を明らかにするため、RNAiを用いてシグナル因子の機能低下実験を行った。Jak/STATシグナルを構成するインターロイキン受容体Domeless (Dome)、ヤヌスキナーゼHopscotch (Hop)、転写因子Statに対してRNAiを行うと、*hop*<sup>RNAi</sup>個体では附節が小さく再生したが、*dome*<sup>RNAi</sup>個体と*Stat*<sup>RNAi</sup>個体では再生が全く起こらなかった(図3A)。*Stat*<sup>RNAi</sup>個体では、細胞分裂の進行に必須なサイクリンEの発現が半減していたことから、再生芽細胞の細胞増殖が低下して再生が阻害されたと考えられる(図3B)。またJak/STATシグナルの活性を抑制する*Socs2*や*Socs5*に対してRNAiを行うと、再生脚におけるサイクリンEの発現は上昇し、再生脚は正常脚よりも長くなった(図3A, B)。これらの結果からJak/STATシグナルは再生芽の細胞増殖を活性化する、再生に必須のシグナル経路といえる<sup>11)</sup>。また、Hippoシグナルを構成するセリンスレオニンキナーゼWarts (Wts)や、Hippoシグナルの上流ではたらくプロトカドヘリンFatやDachsous (Ds)に対してRNAiを行うと再生芽領

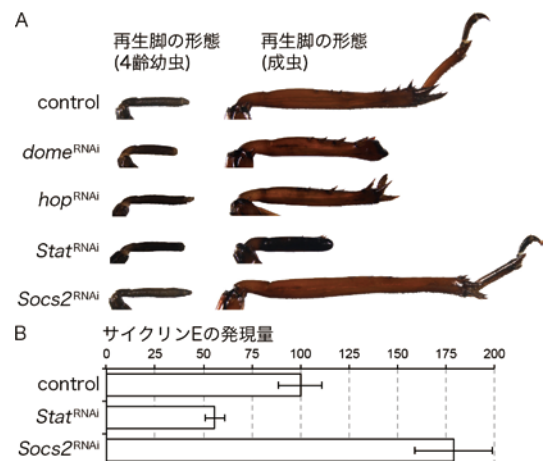


図3 Jak/STATシグナルによる再生芽形成の制御(文献 11)を一部改編)

域が肥大し(図4A)、再生芽での細胞分裂が増加した(図4B)。FatやDsとHippoシグナルを中継する非典型型ミオシンDachs (D)や、Hippoシグナルにより抑制的に制御される転写コアクチベーターYorkie (Yki)に対してRNAiを行うことで、*fat*<sup>RNAi</sup>、*ds*<sup>RNAi</sup>や*wts*<sup>RNAi</sup>による再生芽の肥大は抑えられた(図4A)。これらの結果から、Hippoシグナルは再生芽細胞の増殖を抑制するために必要であることが分かった<sup>12)</sup>。

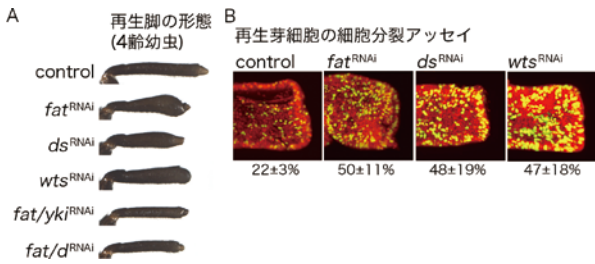


図4 Hippoシグナルによる再生芽形成の制御(文献 12)を一部改編

既存の組織の分化した細胞が脱分化する過程を制御する分子メカニズムは未だ不明な点が多い。分化した細胞では、特定の細胞系譜で発現する遺伝子の発現はオンに、不必要な遺伝子の発現はオフに制御されており、遺伝子発現のオンオフはエピジェネティックな機構により制御されると考えられている。実際、ヒトiPS細胞においても、ヒストンH3のメチル化状態がiPS細胞への脱分化の効率に影響することが分かっている。前述のコオロギ再生脚の比較トランスクリプトーム解析においてもヒストンの修飾酵素の発現が変化していることから、再生芽細胞への脱分化にエピジェネティックな機構が働いているのは確からしいが、詳細な分子メカニズムは未解明である。また近年、カエルの尾部再生やアホロートルの四肢再生において、切断に伴って傷害部位に遊走してくるマクロファージが再生に重要な働きをすることが報告された。コオロギの脚再生においてもマクロファージによる炎症と脚再生の関係が明らかになりつつある(板東、未発表)。

2.3. 位置情報の認識

切断された脚の遠位端に再生芽が形成される。再生芽の細胞は、既存の組織の位置情報を認識し、組織の失われた部分のみを再生させる。生物における位置情報とは、組織などの細胞集団の中でそれぞれの細胞が持つ空間的な場所の情報を指す概念である。発生過程においては前後、背腹、左右の3軸に沿って形成されるモルフォゲンの濃度勾配やホメオボックス遺伝子の発現などにより規定されると考えられている。器官再生においては、1970年代にFrenchらによるゴキブリの脚の移植実験から遠近軸方向と円周方向の位置情報の概念が提唱された<sup>2)</sup>。Bryantらは、イモリの四肢再生においても同様の位置情報の概念が適応できることを見出したが、位置情報の分子実体は未解明のままである。

コオロギを用いてFrenchらと同様の4種類の移植実験を行った。(1)脛節を近位で切断したホストに、脛節を遠位で切断したグラフトを移植すると、脛節の中位部分が欠失した脚になる。欠失した中位部分は数回の脱皮の後に挿入再生された(図5, 挿入再生)。(2)脛節を遠位で切断したホストに、脛節を近位で切断したグラフトを移植すると、中位部分が重複した長い脚になる。移植したコオロギを飼育すると、重複する中位部分がホストとグラフトの間にさらに逆向きに挿入再生され、より長い脚になった(図5, 逆挿入再生)。(3)脛節を中位で切断したホストに、脛節を中位で切断したグラフトを移植すると、脛節に脛節が直接繋がった脚になる。移植したコオロギを飼育し続けても、脛節や脛節の長さに変化はなく関節が再生されることはなかった。(4)右脛節を中位で切断したホストに、左脛節を中位で切断したグラフトを背腹軸の方向を揃えて移植すると、右脚に左脚が繋がった脚になる。移植したコオロギを飼育すると、グラフト

の移植部位から、前側と後側に過剰な脚が形成された(過剰肢形成)。これらの移植実験の結果から、コオロギの脚にも遠近軸方向や円周方向に沿った位置情報があること、移植により位置情報の不連続が発生した場合は連続性を回復するよう最短で位置情報を挿入するように挿入再生が起こること、各脚節の位置情報は等価であること、が示唆された<sup>8), 13)</sup>。



図5 遠近軸方向の位置情報と挿入再生

器官再生において位置情報を担う分子は、遠近軸方向または円周方向に濃度勾配を形成し、各脚節に繰り返して同じパターンで発現する、と期待される。位置情報を担う分子の候補として、我々はHippoシグナルの上流ではたらくプロトカドヘリンFatとDsおよび非典型ミオシンDに着目した。胚の肢芽と再生脚においてfatは近位から中位にかけて、dsとdは遠位から濃度勾配を形成し、各脚節で繰り返し同じパターンで発現した。そこでRNAiを用いてこれら遺伝子の発現を低下させたコオロギで移植実験を行うと、挿入再生や逆挿入再生が起こらなかった(図6A)。挿入再生や逆挿入再生は位置情報の不連続が生じたときに起こることから、RNAiによりfat, ds, dの発現が低下したコオロギでは位置情報が保持されていないと考えられた。位置情報が保持されていない脚を切断した場合、どの位置で切断されたか、どの部分を再生するべきかが認識されないため、

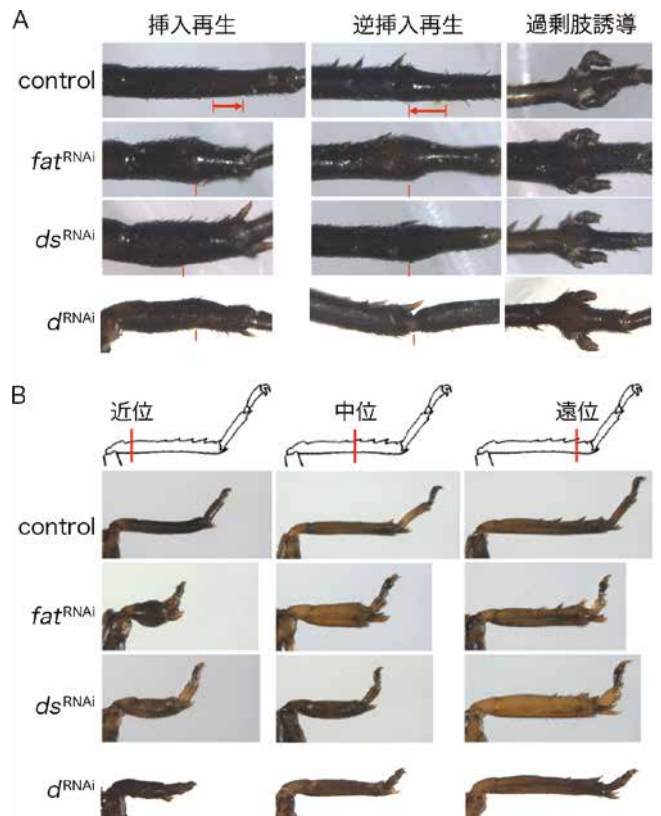


図6 Fatを介した位置情報の認識(文献 12)を一部改編

器官再生が正常に起こらずに切断位置に対応した短い再生脚になると推測される。そこでRNAiにより*fat*, *ds*, *d*の発現を低下させたコオロギの脚の脛節を近位、中位、遠位で別々に切断して再生脚の長さを比較した(図6B)。*fat*などの機能を低下させたコオロギの再生脚の長さをコントロール個体の再生脚の長さと比較すると、予想した通りに、遠位で切断した脚はやや短く、近位で切断した脚はより短く再生した。我々は*Fat*, *Ds*, *D*が位置情報を担う分子の候補と考えており<sup>12), 14)</sup>、コオロギ以外の再生可能動物での検証が待たれる。興味深いことに、*Fat*と*Ds*の細胞内ドメインに結合する2本鎖RNA結合タンパク質*Lowfat* (*Lft*)は、遠近軸方向の器官再生の際には位置情報の認識に必要であるが、挿入再生や逆挿入再生の際には必要でないことが分かっており<sup>15)</sup>、コオロギが再生過程に応じて異なる位置情報の分子メカニズムを利用している可能性が示唆されている。

Hippoシグナルの上流ではたらくアクチン結合タンパク質Expanded (*Ex*)とMerlin (*Mer*)は、Hippoシグナルを活性化させることで細胞増殖を抑制する。RNAiにより*ex*や*Mer*の発現を低下させたコオロギでは、再生芽と既存の組織において細胞分裂が亢進し、再生脚はもとの脚よりも長く再生した。また*ex*<sup>RNAi</sup>や*Mer*<sup>RNAi</sup>個体の脚を用いて移植実験を行うと、逆挿入再生のパターンが異常になり、過剰肢の形成が起こらなかった。野生型個体で見られる逆挿入再生ではより遠位の位置情報を有するグラフトからのみ逆挿入再生を起こすが、*ex*<sup>RNAi</sup>や*Mer*<sup>RNAi</sup>ではホストとグラフトの両側で細胞増殖が過剰になり両側から挿入再生を起こしていた<sup>12)</sup>。脊椎動物の*Ex*や*Mer*のホモログは接触阻害(contact-dependent inhibition of cell proliferation)の制御が必要であることが知られている。コオロギの再生脚で逆挿入再生が起こる際の細胞増殖の方向性は、*Ex*や*Mer*を介した接触阻害のメカニズムにより制御されているのかもしれない。*ex*<sup>RNAi</sup>や*Mer*<sup>RNAi</sup>により過剰肢形成が抑制されるメカニズムは未解明である。*ex*<sup>RNAi</sup>や*Mer*<sup>RNAi</sup>個体の再生脚では細胞分裂が亢進していたため、細胞増殖能の低下による過剰肢の形成不全とは考えにくい。*Ex*や*Mer*が円周方向の位置情報を担う分子メカニズムと関連している可能性を検討している。

#### 2.4. 再パターン形成

脚の先端に形成された再生芽の細胞は、脚の位置情報を認識し、失われた部分のみを再生させるため様々な細胞へと再分化して器官を再形成する。再パターン形成は発生過程の繰り返しと考えられており、発生過程にはたらく遺伝子の発現が再活性化されて器官を再形成すると考えられる。コオロギ肢芽発生の初期にはWntシグナル、TGF-βシグナル、Shhシグナルのリガンドである*wingless* (*wg*), *decapentaplegic* (*dpp*), *hedgehog* (*hh*)がそれぞれ肢芽の腹側、背側、後側で発現する。再生過程においても再生芽で*wg*, *dpp*, *hh*が肢芽と同様のパターンで発現し<sup>8), 9)</sup>、*wg*と*dpp*の発現が接する再生芽の遠位端から*Epidermal growth factor receptor* (*Egfr*)の発現が誘導される<sup>16)</sup>。また*wg*や*dpp*の発現を受けて、再生芽の予定附節領域で*Distal-less* (*Dll*)、予定脛節と予定附節第1節領域で*dachshund* (*dac*)が発現する(図7A)。コオロギにおいてβカテニンをコードする*armadillo* (*arm*)に対するRNAiを行うとWntシグナルが不活性化されて器官再生が起こらず<sup>13)</sup>、

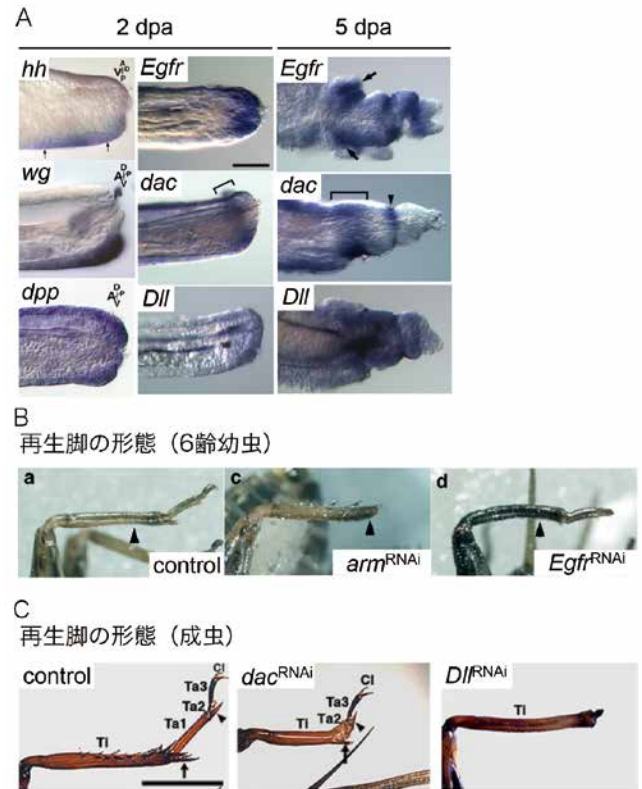


図7  
脚パターン形成遺伝子群による再パターン形成の制御  
(文献 8), 16), 9), 17) を一部改編)

*Egfr*<sup>RNAi</sup>を行うと脚の遠位端が再生しなかった<sup>16)</sup>。脚パターン形成遺伝子群*Dll*や*dac*に対するRNAiでは、*Dll*<sup>RNAi</sup>では脚の遠位側が再生せず*dac*<sup>RNAi</sup>では脛節の遠位側と附節の近位側が再生しなかった(図7C)<sup>17)</sup>。これらの遺伝子に対するRNAiの表現型は、ショウジョウバエの相同遺伝子の変異体において観察される肢芽形成異常の表現型とよく類似しており、再生過程における再パターン形成が発生の繰り返しであることが分かる。

未切断の脚では*wg*や*Egfr*は発現していないが、切断後の再生芽では*wg*や*Egfr*の発現が再活性化される<sup>13), 16)</sup>。再生過程における遺伝子発現の再活性化の分子メカニズムを解析するため、再生脚で高発現するエピジェネティック因子に着目した<sup>11)</sup>。遺伝子の発現はクロマチンの状態に強く依存し、クロマチンが凝集したヘテロクロマチン状態では遺伝子は発現せず、クロマチンが弛緩したユークロマチン状態に移行することで遺伝子発現が可能となる。クロマチンの状態はDNAのメチル化やヒストンの化学修飾により制御されるが、昆虫ではDNAのメチル化はほとんど使われていないため、ヒストンのメチル化とアセチル化を介したクロマチン状態制御が遺伝子発現の中心的な役割を担っている。なかでもヒストンH3の27番目のリジン残基のメチル化(ヒストンH3K27me3)はヘテロクロマチン化を誘導し、脱メチル化することでユークロマチン化を誘導して遺伝子発現を活性化できる。昆虫ではEnhancer of zeste (*E(z)*)がヒストンH3K27をメチル化し、*Utx*がヒストンH3K27me3を脱メチル化する酵素であり、未切断の脚と比較してコオロギの再生脚では*E(z)*と*Utx*はそれぞれ2.2倍と8.9倍に発現上昇していた<sup>11)</sup>。再生脚におけるヒストンH3K27me3は*E(z)*<sup>RNAi</sup>により低下し、*Utx*<sup>RNAi</sup>により亢進した(図8A)。*E(z)*<sup>RNAi</sup>個体の脚を脛節で切断して再生過程を観察すると、脛節の失われた部分と附節およ

び爪が再生され、脛節と附節の間に過剰な脛節が挿入再生された(図8B)。E(z)<sup>RNAi</sup>の再生脚では脚パターン形成遺伝子dacが強く発現する領域が遠位側に拡大していた。dac発現の異所的な再活性化により過剰な脛節形成が誘導されたと考えられる。またUtx<sup>RNAi</sup>個体の再生脚では、附節において関節の形成が抑制された(図8B)。Utx<sup>RNAi</sup>の再生脚では附節中位において脚パターン形成遺伝子Egfrの発現が再活性化されず、Egfr発現の低下により関節形成が阻害されたと考えられる<sup>18)</sup>。再生芽においてはヒストンH3K4やH3K9を修飾するエピジェネティック因子群の発現も変化しており<sup>11)</sup>、多くの遺伝子の再発現がエピジェネティックな制御を受けていると示唆されている。脚再生におけるE(z)<sup>RNAi</sup>やUtx<sup>RNAi</sup>の表現型は、胚発生におけるE(z)<sup>RNAi</sup>やUtx<sup>RNAi</sup>の表現型とは異なっており<sup>18), 19)</sup>、ヒストンH3K27me3によりエピジェネティックに制御される標的遺伝子が脚再生と肢芽発生では一部異なっているのかもしれない。今後より詳細な解析に期待が持たれる。

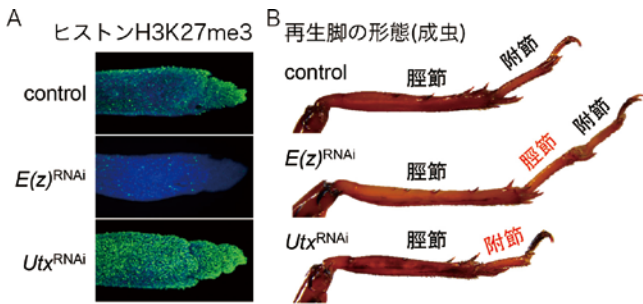


図8 ヒストンH3K27のメチル化を介した再パターン形成の制御 (文献 18)を一部改編)

### 03 | おわりに

コオロギを再生モデル昆虫とし、脚再生過程を経時的に遺伝子レベルで解析することで、器官再生を制御する普遍的な分子メカニズムを明らかにしてきた(図9A, B)。再生芽形成に重要

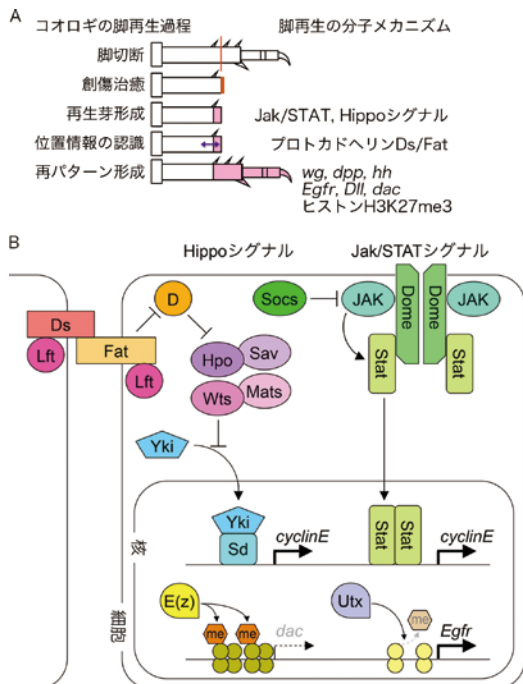


図9 器官再生を制御する分子メカニズム

なJak/STATシグナルやHippoシグナルは、脊椎動物においても細胞増殖を制御する重要なシグナル経路として知られており、再生芽細胞の再分化にはたらくヒストンH3K27メチル化制御因子E(z)とUtxはiPS細胞の分化においても重要なはたらきをすることが明らかになりつつある。昆虫からヒトへの進化には3億年以上の隔たりがあるが、発生に重要な分子メカニズムは普遍的に保存されており、昆虫で分かったことの多くはヒトへも応用できる。再生モデル昆虫から学んだ器官再生の分子メカニズムが、ヒトの器官再生を実現する一助となれば幸いである。

参考文献

- 1) K. Agata, T. Inoue, Survey of the differences between regenerative and non-regenerative animals. *Dev. Growth Differ.* **54**, 143-152 (2012).
- 2) V. French, P. J. Bryant, S. V Bryant, Pattern regulation in epimorphic fields. *Science*. **193**, 969-981 (1976).
- 3) T. Mito, S. Noji, The Two-Spotted Cricket *Gryllus bimaculatus*: An Emerging Model for Developmental and Regeneration Studies. *CSH Protoc.* **2008**, 331-346 (2008).
- 4) N. Niwa, M. Saitoh, H. Ohuchi, H. Yoshioka, S. Noji, Correlation between Distal-less expression patterns and structures of appendages in development of the two-spotted cricket, *Gryllus bimaculatus*. *Zool. Sci.* **14**, 115-125 (1997).
- 5) Y. Inoue, T. Mito, K. Miyawaki, K. Matsushima, Y. Shinmyo, T. A Heanueb, G. Mardonc, H. Ohuchia, S. Noji, Correlation of expression patterns of homothorax, dachshund, and Distal-less with the proximodistal segmentation of the cricket leg bud. *Mech. Dev.* **113**, 141-148 (2002).
- 6) T. Nakamura, M. Yoshizaki, S. Ogawa, H. Okamoto, Y. Shinmyo, T. Bando, H. Ohuchi, S. Noji, T. Mito, Imaging of transgenic cricket embryos reveals cell movements consistent with a syncytial patterning mechanism. *Curr. Biol.* **20**, 1641-1647 (2010).
- 7) T. Watanabe, H. Ochiai, T. Sakuma, H. W. Horch, N. Hamaguchi, T. Nakamura, T. Bando, H. Ohuchi, T. Yamamoto, S. Noji, T. Mito, Non-transgenic genome modifications in a hemimetabolous insect using zinc-finger and TAL effector nucleases. *Nat. Commun.* **3**, 1017 (2012).
- 8) T. Mito, Y. Inoue, S. Kimura, K. Miyawaki, N. Niwa, Y. Shinmyo, H. Ohuchi, S. Noji, Involvement of hedgehog, wingless, and dpp in the initiation of proximodistal axis formation during the regeneration of insect legs, a verification of the modified boundary model. *Mech. Dev.* **114**, 27-35 (2002).
- 9) T. Nakamura, T. Mito, T. Bando, H. Ohuchi, S. Noji, Dissecting insect leg regeneration through RNA interference. *Cell Mol. Life Sci.* **65**, 64-72 (2008).
- 10) S. Wang, V. Tsarouhas, N. Xylourgidis, N. Sabri, K. Tiklová, N. Nautiyal, M. Gallo, C. Samakovlis, The tyrosine kinase stitcher activates Grainy head and epidermal wound healing in *Drosophila*. *Nat. Cell Biol.* **11**, 890-895 (2009).
- 11) T. Bando, Y. Ishimaru, T. Kida, Y. Hamada, Y. Matsuoka, T. Nakamura, H. Ohuchi, S. Noji, T. Mito, Analysis of RNA-Seq data reveals involvement of JAK/STAT signalling during leg regeneration in the cricket *Gryllus bimaculatus*. *Development*. **140**, 959-964 (2013).
- 12) T. Bando, T. Mito, Y. Maeda, T. Nakamura, F. Ito, T. Watanabe, H. Ohuchi, S. Noji, Regulation of leg size and shape by the Dachshous/Fat signalling pathway during regeneration. *Development*. **136**, 2235-2245 (2009).
- 13) T. Nakamura, T. Mito, Y. Tanaka, T. Bando, H. Ohuchi, S. Noji, Involvement of canonical Wnt/Wingless signaling in the determination of the positional values within the leg segment of the cricket *Gryllus bimaculatus*. *Dev. Growth Differ.* **49**, 79-88 (2007).
- 14) T. Bando, T. Mito, T. Nakamura, H. Ohuchi, S. Noji, Regulation of leg size and shape: Involvement of the Dachshous-fat signaling pathway. *Dev. Dyn.* **240**, 1028-1041 (2011).
- 15) T. Bando, Y. Hamada, K. Kurita, T. Nakamura, T. Mito, H. Ohuchi, S. Noji, Lowfat, a mammalian Lix 1 homologue, regulates leg size and growth under the Dachshous/Fat signaling pathway during tissue regeneration. *Dev. Dyn.* **240**, 1440-1453 (2011).
- 16) T. Nakamura, T. Mito, K. Miyawaki, H. Ohuchi, S. Noji, EGFR signaling is required for re-establishing the proximodistal axis during distal leg regeneration in the cricket *Gryllus bimaculatus* nymph. *Dev. Biol.* **319**, 46-55 (2008).
- 17) Y. Ishimaru, T. Nakamura, T. Bando, Y. Matsuoka, H. Ohuchi, S. Noji, T. Mito, Involvement of dachshund and Distal-less in distal pattern formation of the cricket leg during regeneration. *Sci. Rep.* **5**, 8387 (2015).
- 18) Y. Hamada, T. Bando, T. Nakamura, Y. Ishimaru, T. Mito, S. Noji, K. Tomioka, H. Ohuchi, Leg regeneration is epigenetically regulated by histone H3K27 methylation in the cricket *Gryllus bimaculatus*. *Development*. **142**, 2916-2927 (2015).
- 19) Y. Matsuoka, T. Bando, T. Watanabe, Y. Ishimaru, S. Noji, A. Popadić, T. Mito, Short germ insects utilize both the ancestral and derived mode of Polycomb group-mediated epigenetic silencing of Hox genes. *Biol. Open*. **4**, 702-709 (2015).