

---



---

 原 著
 

---



---

## 発生期の神経筋活動遮断時のポリグルタミン 毒性について

安戸方邦

新潟大学大学院医歯学総合研究科生体機能調節医学専攻

機能再生医学大講座肉眼解剖学分野

(主任：佐藤 昇教授)

Polyglutamine Pathogenesis in a Blockade of Neuromuscular Activity During Development  
Course for Biological Function and Medical Control

Masakuni YASUDO

*Regenerative and Transplant Medicine, Gross Anatomy and Morphogenesis*

*Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences*

*(Director: Prof. Noboru SATO)*

### 要 旨

脊髄運動ニューロンはその発生時に軸索先端を標的である筋原基に向かって伸長し、ほどなく標的筋と接触し初期のシナプスを形成する。この初期シナプス形成の後で運動ニューロンは「プログラムされた細胞死」を起こし、その約半数が失われる。この時期にアセチルコリン受容体の阻害剤である curare などの d-tubocurarine の投与によって神経筋間の活動を遮断するとプログラムされたニューロン死が回避され、そのメカニズムについては長く不明であるが、何らかの運動ニューロンの保護作用が知られている。

ポリグルタミン (polyQ) 病は、遺伝性の神経変性疾患の一種であり、各遺伝子中にあるグルタミンをコードする CAG 反復配列の伸長によって引き起こされることが知られている。神経毒性を引き起こす機序については不明な点も多いが、一部にプログラムされた細胞死と同様の分子メカニズムが作用することが指摘されている。そこで神経筋活動の遮断が異常伸長 polyQ タンパク断片による運動ニューロン障害に影響を及ぼし得るか否かを検討するために、神経毒性が知られる polyQ タンパク断片を導入し、その効果が神経筋活動の遮断により影響を受けるのかを検討した。

解剖学的及び実験発生学的に解析に有利な点が多いニワトリ胚の縫工筋とその支配ニューロ

---

Reprint requests to: Masakuni YASUDO  
Division of Gross Anatomy and  
Morphogenesis Niigata University  
Graduate School of Medical and Dental Sciences,  
1-757 Asahimachi-dori, Chuo-ku,  
Niigata 951-8510, Japan.

---

別刷請求先：〒951-8510 新潟市中央区旭町通 1-757  
新潟大学大学院医歯学総合研究科肉眼解剖学分野  
安戸方邦

ンをモデルとし、*in ovo* electroporation 法により孵卵開始3日目胚の神経管に GFP 発現プラスミドを導入した。GFP を発現する腰髄前角の運動ニューロンを観察したところ、細胞体は細胞死の後半の時期に当たる孵卵開始8日目から10日目には大きくなることが判明した。同様の方法で Machado-Joseph 病（脊髄小脳失調症Ⅲ型）から単離された ataxin-3 遺伝子の CAG 配列の77回繰り返し遺伝子断片を発育鶏胚に導入し、ポリグルタミン蛋白断片を運動ニューロンに発現させると孵卵開始10日目～11日目の胚では対照と比して細胞体が小さくなることが観察されるが、curare を投与した胚でも同様に細胞体の変性が認められた。従って神経筋活動の遮断によってポリグルタミンによる神経毒性は回避されることが明らかになった。このことから、ポリグルタミンによる神経毒性と「プログラムされた細胞死」の神経障害メカニズムは異なっているものと考えられた。

キーワード：神経筋活動，ポリグルタミン病，運動ニューロン，細胞死，発育鶏胚

## 緒 言

発生過程において、最終分裂が終了した脊髄前角の運動ニューロンはその軸索を特異的且つ正確に標的（骨格筋）に向かって伸長する。標的との初期接触の後、運動ニューロンの約半数は「プログラムされた細胞死」によって失われることが古くから知られている<sup>1)</sup>。この細胞死は標的由来の栄養因子に依存することから「標的依存性細胞死」とも呼ばれる<sup>2)</sup>。運動ニューロンの神経伝達物質はアセチルコリンであるが、初期の軸索はその標的である筋線維上にその受容体（アセチルコリンレセプター）を誘導し<sup>3)–5)</sup>、「プログラムされた細胞死」の時期に一致して運動ニューロンと骨格筋には初期の回路が形成されていることは電気生理学的研究によって明らかになっている<sup>6)</sup>。興味深いことにニコチン型アセチルコリンレセプターの競合的阻害剤である curare (d-tubocurarine) の投与によって神経筋活動を遮断すると、①この運動ニューロン死の抑制、②骨格筋でのアセチルコリンレセプターの発現誘導、③軸索分枝やシナプス（神経筋接合部）の増加、が認められる<sup>7)–9)</sup>。この機序については明らかではないが、curare による神経細胞死回避は、細胞死抑制分子である Bcl-2 発現や細胞死促進分子である Bax の KO マウスでみられるような結果として生存するのが痩せ細ったニューロンで占められるのとは異なり、健康的な運動ニューロンが多く残存するのが

観察されるのが特徴である<sup>8)</sup>。従って神経筋活動の遮断が、この時期の運動ニューロンに対する強い保護作用を有することが想定される。

ポリグルタミン (polyQ) 病は、遺伝性の神経変性疾患の一種であり、各遺伝子中にあるグルタミンをコードする CAG 反復配列の伸長によって引き起こされることが知られている<sup>10)–12)</sup>。運動ニューロンが障害される遺伝性の脊髄小脳失調症 (SCA) には polyQ 病であるものも多く、Machado-Joseph 病 (SCA3) をはじめ原因遺伝子に CAG 反復配列の異常伸長 (35～40以上) が特徴とされる<sup>10)</sup>。PolyQ 病の発症機序については不明な点も多いが、caspase などの細胞死関連分子が関わっているとする報告も見られ、一部プログラムされた細胞死の機序と共通のメカニズムが働くことも想定されている<sup>11)12)</sup>。そこで本研究において、運動ニューロンのシナプス形成期（プログラムされた細胞死が起こる時期）に見られる神経筋活動の遮断による運動ニューロンへの保護作用が、異常伸長 polyQ 蛋白断片による神経毒性に如何に作用するのかを検討することを計画した。

今までの先行研究によって PolyQ 病は原因遺伝子の機能喪失ではなく、機能獲得によるものが強く示唆されている<sup>13)</sup>。私の所属する研究グループでは発育鶏胚の脊髄運動ニューロンへ遺伝子導入する技術を予てより開発・整備しており、これらの技術は分子の機能獲得による生理的・病理

的な変化を解析するには十分応用可能であると想定された<sup>14)15)</sup>。そこで本研究においては、GFP (Green Fluorescent Protein) と異常伸長 polyQ 断片を発育鶏胚の脊髄運動ニューロンへ導入し、GFP 発現で運動ニューロンの細胞体の大きさをモニターし、神経筋活動の遮断によってどのように変化するか検討することとした。

## 材料と方法

### 1. 鶏胚

研究には白色レグホン種の鶏胚を用い、その種卵は竹内孵卵場（奈良県）より入手した。種卵を 37.6℃ に設定した孵卵器（showa 孵卵器）にて培養し、孵卵開始 3 日目 (E3) に注射針で卵白のみを約 3ml 抜き取った。その後、卵殻に眼科剪刀にて卵黄を傷つけないよう穴を開け実体顕微鏡下で胚を確認した。胚の発育ステージは Hamburger and Hamilton (1951) の分類に従った<sup>16)</sup>。

### 2. *In ovo* electroporation

GFP 発現ベクターは、発生運動ニューロンに特異性の高い *islet-1* 遺伝子のエンハンサー領域に GFP を連結することで作成した。ポリグルタミン断片の発現用には、*ataxin-3* 遺伝子の CAG 配列の 77 回及び 10 回繰り返す遺伝子断片 (Q77 及び Q10) をそれぞれ強毒性型及び対照として用い<sup>17)</sup>、*islet-1* エンハンサー/プロモーターに連結したベクターを作製した。

発育鶏胚を E3 の時点で、卵殻に眼科剪刀にて開けた穴から発現プラスミドを実体顕微鏡下で神経管に注入後、電極を神経管の両側に配置し、*in ovo* electroporation 法により遺伝子導入した。ポリグルタミン断片の発現実験には GFP と Q77 あるいは Q10 の発現ベクターを混合したものを導入した。導入後 1 日目に、脊髄への GFP の導入を蛍光実体顕微鏡 (SZX12, OLYMPUS) にて確認した。

### 3. 逆行性標識

発育鶏胚を E10-E20 で取り出し、4% PFA を

心臓に注入後、同溶液にて浸漬固定した。大腿部の縫工筋を実体顕微鏡下で割出し、縫工筋に逆行性のトレーサーである DiI (Carbocyanine fluorescent dyes, Invitrogen) の結晶あるいはゲルを安置、またはトレーサー溶液を注入した。トレーサーの安置・注入された位置を直視あるいは蛍光実体顕微鏡にて確認し、胚を 4% PFA 中で 37℃ にて 10 週間ほど反応を行った。続いて脊髄を肋骨下端のレベルから切り出し、リニアスライサー (PRO7, 堂坂 EM) で厚さ 300  $\mu$ m の横断切片を作成した。脊髄横断切片は DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole, Invitrogen) で核を染色した後、共焦点レーザースキャン顕微鏡 (LSM 710 NLO, Carl Zeiss) にて観察した。

### 4. Curare 投与による神経筋活動の遮断

生理食塩水に対して 5% 濃度になる様に curare (D-Tubocurarine Chloride Pentahydrate, Wako) の溶液を作製、4℃ の冷蔵庫に保管して随時使用した。卵殻に眼科剪刀にて開けた穴から鶏胚を傷つけないように羊膜をスクラッチした後、curare 溶液 300  $\mu$ l (1.5  $\mu$ g) または同量の生理食塩水を胚上に 1 日 1 回 E6 ~ E10 の期間にわたって滴下した。curare 投与群は投与前後に 1 分間ほど胚の動きを計測し、神経筋活動の遮断が十分な胚を以後の解析に使用した。

### 5. イメージングと細胞体面積の測定

発育鶏胚を E6, E8, E10 の各ステージで取り出し、腹部内臓等を取り除き 4% PFA により一晚浸漬固定 (4℃) を行った。続いて胚を 5%, 10%, 20% の各種濃度の Sucrose に順に 4℃ で浸漬した後、肋骨下端のレベルから下部を Tissue-tek (Sakura) と 20% Sucrose を 1:2 の割合で混ぜた溶液にて -80℃ で包埋した。凍結試料をクリオスタット (HM560, Microm) にて薄切し、脊髄横断面を含む凍結切片 (厚さ 10  $\mu$ m) を作成した。脊髄レベルを光学顕微鏡にて脊髄神経節 (DRG) を参考に決定し、第一腰髄節を含む切片を -20℃ にて保存した。

凍結切片は PBST (0.2M PBS, 0.1% Tween20)

で5分間3回洗浄後, DAPIを含む封入剤(VEC-TASHIELD, Vector)を滴下し切片を封入した. 横断切片は共焦点レーザースキャン顕微鏡(LSM 710 NLO, Carl Zeiss)にて観察・イメージングを行った.

細胞体の面積は, 画像解析にて行った. 共焦点レーザースキャン顕微鏡で取入れた画像を画像処理ソフトウェア Image J (public domain) を使用し計測した. GFPにて脊髄前角の神経細胞体全体を確認し, DAPIにて核を確認し, 共に映っている部位を取り囲み面積を測定した. 取り囲んだ部位は核の存在と複数の細胞体が重なっていないか再度確認した.

## 6. 統計学的処理

測定値は平均値と標準偏差で表現した. 多群間の比較は一元配置分散分析法で行い,  $P < 0.05$  を

もって有意とした.

## 結 果

### 1. 発育鶏胚における腰髄運動ニューロン細胞体の発達

腰髄の運動ニューロンはE6から「プログラムされた細胞死」を起こし, これはE10程度までで収束することが知られている<sup>1)</sup>. 私が最も表層の大腿伸筋である縫工筋とその支配運動ニューロンの形成を調べた際も, この時期に細胞死が起こり, 縫工筋にアセチルコリン受容体の発現が認められ, 軸索先端がシナプスを形成する過程が確認された(安戸, 修士論文). この時期に運動ニューロンの細胞体がどのように発達するのかを明らかにするために, GFPを発現するプラスミドをE3胚の神経管に注入し, *in ovo* electroporation 法によ

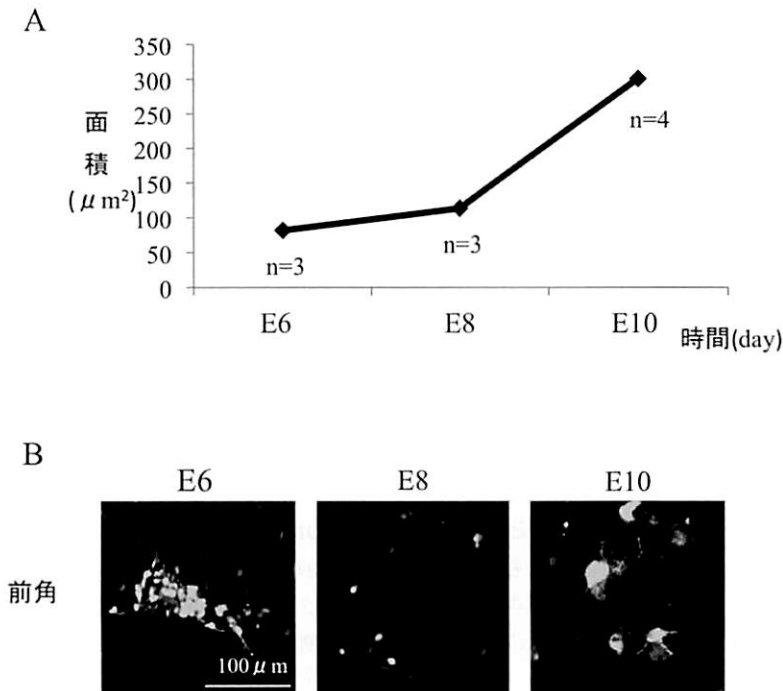


図1 運動ニューロン細胞体の発達

- A 細胞体面積の経時変化  
B 各ステージでの GFP 発現運動ニューロンの形態

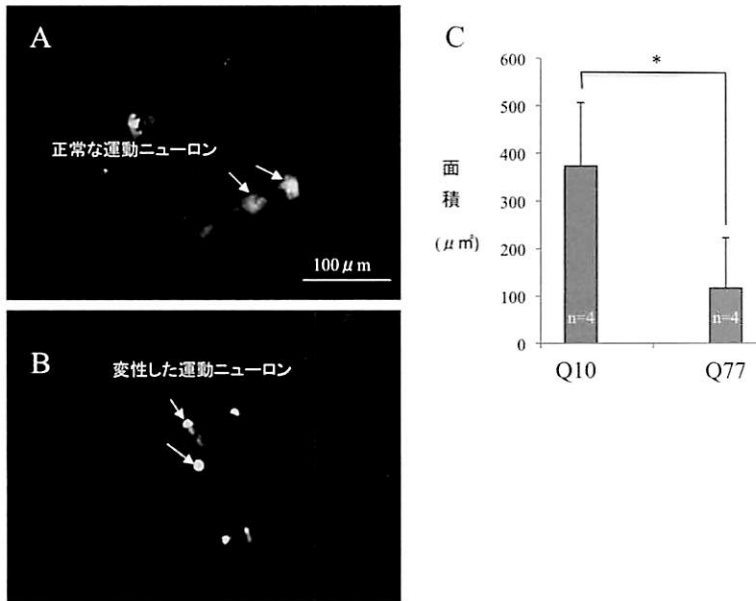


図2 ポリグルタミン導入による発生運動ニューロンの変性  
 A Q10とGFPを導入したE10胚で観察される運動ニューロン  
 B Q77とGFPを導入したE10胚で観察される運動ニューロン  
 C 面積の比較(E10) \*P < 0.05

って遺伝子導入した。E6, E8, E10の各ステージにおける胚の脊椎横断切片の蛍光観察から、脊髄前角部分の蛍光画像を取得し、GFP発現の細胞体の面積を測定した。その結果、運動ニューロンの細胞体はE8からE10にかけて良く発達することが明らかになった(図1)。

## 2. 異常伸長 polyQ 断片の導入による細胞毒性

次に異常伸長 polyQ 断片をこの時期の運動ニューロンへ発現させた場合の細胞体発達を検討した。異常伸長 polyQ (77 回繰り返し: Q77) を有するヒト ataxin-3 遺伝子から単離された細胞毒性が強い断片<sup>17)</sup> を GFP 発現プラスミドと共に導入したところ、対照である 10 回繰り返し polyQ 断片 (Q10) を導入した場合と比べて、E10 胚において明らかに GFP を発現する細胞体が小さいことが確認された(図2)。従って発生時の鶏胚脊髄運動ニューロンにおいても、Q77 による何らかの細胞毒性により細胞体発達が障害されるこ

とが明らかになった。

## 3. Curare による神経筋活動の遮断

続いて同時期に curare を胚に連日投与し、初期の神経筋活動を遮断する系での運動ニューロンの細胞体発達を検討した。縫工筋に逆行性のトレーサーである DiI を注入し、脊髄を観察したところ、DiI で標識される脊髄前角は curare 投与群で対照に比して著しく広範囲であり、これは神経筋活動の遮断によって運動ニューロン死を免れた事実と一致した(図3)。GFP を発現するプラスミドを *in ovo* electroporation によって導入し運動ニューロンを標識すると、curare 投与群で GFP を発現する運動ニューロンは増加するものの、細胞体の形態には対照と比して違いは認められなかった(図3)。従って神経筋活動の遮断によって縫工筋を支配する運動ニューロンは細胞死を免れ、細胞数が増えるものの、細胞体の形態には大きな違いが認められないことが明らかになった。

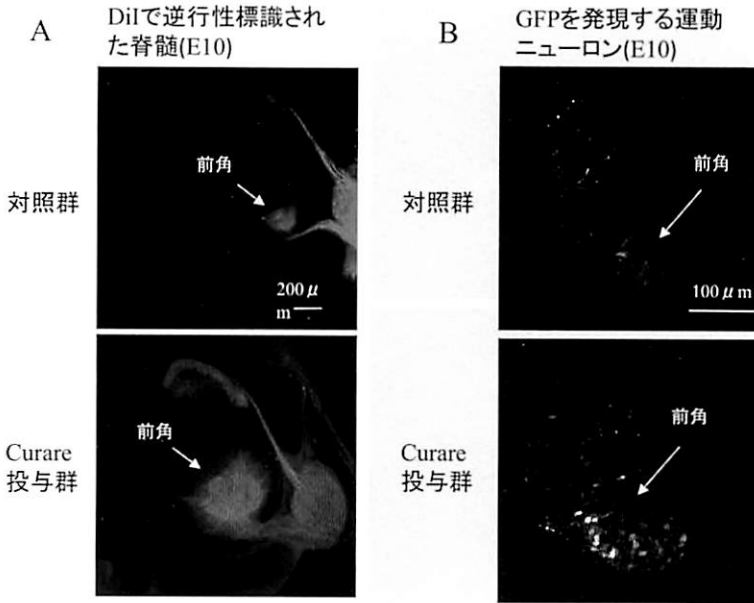


図3 神経筋活動の遮断による細胞死の抑制

- A Dilによる脊髄の逆行性標識
- B GFP発現運動ニューロンの分布

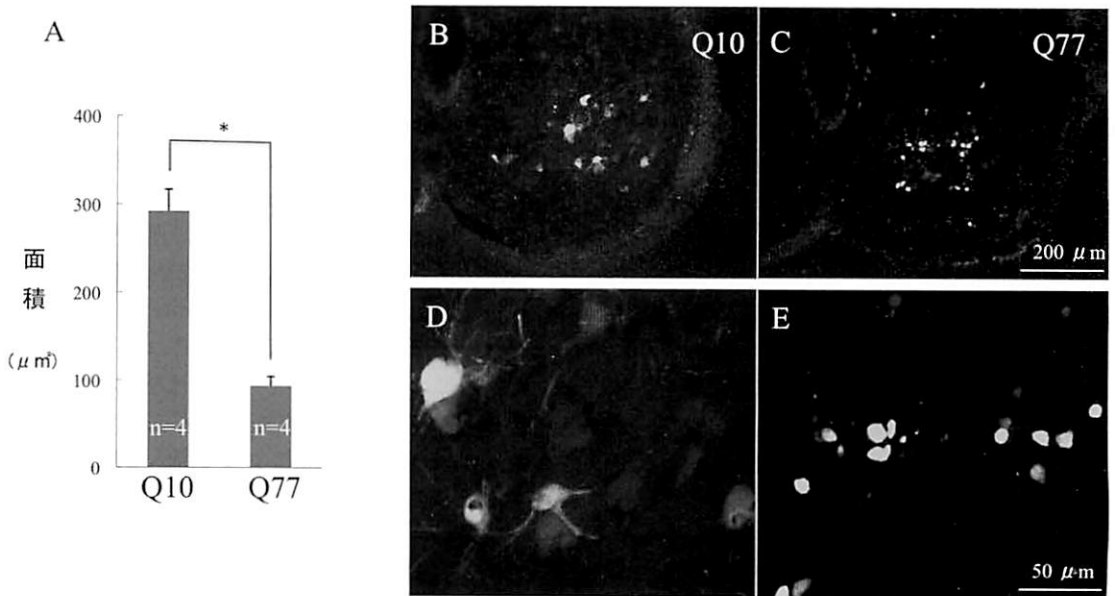


図4 神経筋活動遮断によるポリグルタミン毒性への影響

- A Curare投与下での運動ニューロンの面積の比較 (E10) \*P < 0.05
- B-E Curare投与下でのGFP発現細胞の形態, Q10(対照)導入での低倍率像(B)とその強拡大(D), Q77(ポリグルタミン)導入での低倍率像(C)とその強拡大(E)

#### 1. 神経筋活動遮断によるポリグルタミン毒性への影響

神経筋活動の遮断が運動ニューロン細胞体に対する毒性にどのような影響を与えるのかを検証するために、Q77断片あるいはQ10断片を導入した後、curareを連日投与した胚で運動ニューロンの細胞体発達を検討した。Q77断片が導入された胚は対照群であるQ10断片が導入された胚と同様に、curare投与群でGFPを発現する細胞が多く見られたが、小さく丸い細胞体のものが多く認められた(図4)。従って神経筋活動の遮断によってもポリグルタミン毒性は回避できないことが示唆された。

### 考 察

#### 1. 運動ニューロンの細胞体の発達

運動ニューロンとその筋支配の神経回路が形成される時期には、「プログラムされた細胞死」が起こり、約半数が細胞死により除かれ、残りの約半数が生存・成熟した運動ニューロンとして発達する<sup>1)</sup>。解剖学的にニューロンとその筋支配は極めて正確なものであるため、この形成を調べるには特定の骨格筋とその支配神経を解析するのが理想的である。私は過去に最も表層の大腿伸筋である縫工筋に着目し、縫工筋の形成、その支配運動ニューロンの軸索伸長、分岐、筋への進入について調査した(安戸、修士論文)。この中では細胞体の発達については報告が少なく、本研究においてGFPを運動ニューロンへ導入することで、個別の細胞体の大きさを検討することに成功し、脊髄運動ニューロンの細胞体はE8からE10にかけて良く発達することが明らかになった。運動ニューロン死はシナプス形成期の前半であるE7～E8にかけてピークであり<sup>8)9)</sup>、細胞体発達はそれと入れ替わるようにして細胞除去によってスペースのできた脊髄前角内に後半のE8～E10に顕著となること考えられる。

#### 2. 異常伸長 polyQ 断片の発育鶏胚における細胞毒性

ポリグルタミン病の原因遺伝子は様々であるが、いずれにおいてもCAG反復配列の異常伸長が原因遺伝子内に認められるため、コードする本来のタンパクにポリグルタミン鎖(35～40以上)が付加された産物の機能獲得性変異により神経毒性が惹起される<sup>11)12)</sup>。疾患においては慢性的な経過を取ることが多いが、反復配列が長いほど神経毒性が強いことも指摘されており、原因遺伝子を欠失させ長鎖のCAG反復配列のみにすると毒性が強まることが知られている<sup>17)</sup>。本研究では、Machado-Joseph病(SCA3)の原因遺伝子であるataxin-3遺伝子から異常伸長polyQ(77回繰り返し)部分のみを切り出した断片を導入し、発生時の若い運動ニューロへの影響を検討したが、このQ77断片はシナプス形成期の運動ニューロンの細胞体の発達を阻害した。Q77断片を導入した運動ニューロンでは、Q77断片が核内や細胞質内で凝集体を形成し、ユビキチンなどの共局在も認められたため、発育鶏胚の脊髄運動ニューロンにおいても他のモデル動物などと同様の挙動を取っていることが示唆された(投稿準備中)。

#### 3. Curareによる神経筋活動の遮断

Curareなどの薬剤や自発運動が欠落したモデル動物で神経筋活動の遮断によってシナプス形成期の運動ニューロン死が回避された結果、運動ニューロンは正常状態に比してほぼ2倍となる。ニッスル染色などではこれらの運動ニューロンに明らかな不均一性は認められない<sup>18)</sup>。そこでこれらの運動ニューロンの細胞体の形態に相違が認められるのか否かをさらに詳細に確かめるために、本研究ではGFPを発現させて個別のニューロンの面積や形態を解析することを試みた。In ovo electroporationによる発現プラスミド導入では、curare投与時などのように細胞死を免れることによりGFP発現細胞が増加した状態でも、個別のニューロンの細胞体を比較することが可能であった(図3)。従って将来GFPを細胞膜にターゲットさせるなどの工夫により、樹状突起の形態など

更に詳細な解析が可能となることが予想された。

#### 4. 神経筋活動遮断によるポリグルタミン毒性への影響

細胞死関連分子の遺伝子改変などにより細胞死を免れた場合、運動ニューロンは生きてはいるが非常に痩せ細った脆弱な形態を呈する。これに対して神経筋活動の遮断によって細胞死が回避された運動ニューロンは、通常のものと同じような大型でしっかりとした $\alpha$ 運動ニューロンの形態をとる<sup>8)18)</sup>。従って神経筋活動の遮断がこの時期の運動ニューロンに対しては何らかの神経保護作用を有することが考えられる。本研究で、Q77断片を導入し運動ニューロンに対するポリグルタミン毒性が回避・改善され得るか検討したが、ポリグルタミン毒性は回避できなかつた。ポリグルタミンによる毒性は一部でcaspaseなどの細胞死関連分子が作用することも指摘されており<sup>11)12)</sup>、今回の結果は少なくとも細胞死関連分子が作用するより上流においてポリグルタミンによる毒性と、「プログラムされた細胞死」の分子機序が異なっており、curareによる神経筋活動の遮断はその上流に作用していることを示唆していると考えられる。一方でQ77断片を発現する運動ニューロンは神経筋活動を遮断しない場合と比して前角に多く観察され、すなわち「プログラムされた細胞死」はポリグルタミン断片が導入されても回避されたと考えられる。この点からも両者の機序が異なっており、ポリグルタミンによる神経細胞に対する毒性は細胞死のそれとは異なることが示唆された。

#### 結 語

発育鶏胚の脊髄運動ニューロンにおいて、curare投与による神経筋活動遮断は「プログラムされた細胞死」の回避に作用するが、ポリグルタミンによる細胞毒性は回避されることが明らかになった。従って両者の細胞障害に至る機序は異なることが示唆された。

#### 謝 辞

ご指導いただきました新潟大学大学院医歯学総合研究科生体機能調節医学専攻機能再生医学講座、肉眼解剖学分野 佐藤 昇教授ならびに鹿児島大学大学院医歯学総合研究科先進治療科学専攻神経病学講座、神経解剖学分野 柴田昌宏教授に心より深謝申し上げます。また逆行性標識をご指導いただきました新潟大学大学院医歯学総合研究科生体機能調節医学専攻感覚統合医学講座、神経生物・解剖学分野 堀江正男助教に御礼申し上げます。また、日ごろから研究を支えていただきました肉眼解剖学分野 長島 寛准教授、千葉映奈助教、同技術職員 伊藤健二郎技官、相馬健一技官にも合わせて感謝申し上げます。

#### 文 献

- 1) Oppenheim RW: Cell death during development of the nervous system. *Annu Rev Neurosci* 14: 453 - 501, 1991.
- 2) Oppenheim RW: The neurotrophic theory and naturally occurring motoneuron death. *Trends Neurosci* 12: 252 - 255, 1989.
- 3) Sanes J R and Lichtman J W: Development of the vertebrate neuromuscular junction. *Annu. Rev. Neurosci* 22: 389 - 442, 1999.
- 4) Goda Y and Davis GW: Mechanisms of synapse assembly and disassembly. *Neuron* 40: 243 - 264, 2003.
- 5) Kummer TT, Misgeld T and Sanes JR: Assembly of the postsynaptic membrane at the neuromuscular junction: paradigm lost. *Curr Opin Neurobiol* 16: 74 - 82, 2006.
- 6) Landmesser L and Morris D G: The development of functional innervation in the hind limb of The chick embryo. *J Physiol* 249: 301 - 326, 1975.
- 7) Pittman RH and Oppenheim RW: Neuromuscular blockade increases motoneurone survival during normal cell death in the chick embryo. *Nature* 271: 364 - 366, 1978.
- 8) Oppenheim RW, Prevette D, D'Costa A, Wang S, Houenou IJ and McIntosh JM: Reduction of neuromuscular activity is required for the rescue of motoneurons from naturally occurring cell death by nicotinic - blocking agents. *J Neurosci* 20:



- 6117 - 6124, 2000.
- 9) Oppenheim RW, Calderó J, Cuitat D, Esquerda J, McArdle JJ, Olivera BM, Prevet D and Teichert RW: The rescue of developing avian motoneurons from programmed cell death by a selective inhibitor of the fetal muscle-specific nicotinic acetylcholine receptor. *Dev Neurobiol* 68: 972 - 980, 2008.
- 10) Kawaguchi Y, Okamoto T, Taniwaki M, Aizawa M, Inoue M, Katayama S, Kawakami H, Nakamura S, Nishimura M and Akiguchi I: CAG expansions in a novel gene for Machado - Joseph disease at chromosome 14q32.1. *Nat Genet* 8: 221 - 228, 1994.
- 11) Ross A: Polyglutamine pathogenesis: emergence of unifying mechanisms for Huntington's disease and related disorders. *Neuron* 35: 819 - 822, 2002.
- 12) Evert BO, Wüllner U and Klockgether T: Cell death in polyglutamine diseases. *Cell Tissue Res* 301: 189 - 204, 2000.
- 13) Ikeda H, Yamaguchi M, Sugai S, Aze Y, Narumiya S and Kakizuka A: Expanded polyglutamine in the Machado - Joseph disease protein induces cell death in vitro and in vivo. *Nat Genet* 13: 196 - 202, 1996.
- 14) Sato N, Matsuda K, Sakuma C, Foster DN, Oppenheim RW and Yaginuma H: Regulated gene expression in the chicken embryo by using replication-competent retroviral vectors. *J Virol* 76: 1980 - 1985, 2002.
- 15) Sato N, Sakuma C, Sato Y, Gould TW, Oppenheim RW and Yaginuma H: Distinct susceptibility of developing neurons to death following Bax overexpression in the chicken embryo. *Cell Death Differ* 13: 435 - 445, 2006.
- 16) Hamburger V and Hamilton HL: A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J Morph* 88: 49 - 92, 1951. (reprinted in *Dev Dyn* 195: 231 - 272, 1992.)
- 17) Yoshizawa T, Yamagishi Y, Koseki N, Goto J, Yoshida H, Shibasaki F, Shoji S and Kanazawa I: Cell cycle arrest enhances the in vitro cellular toxicity of the truncated Machado - Joseph disease gene product with an expanded polyglutamine stretch. *Hum Mol Genet* 9: 69 - 78, 2000.
- 18) Oppenheim RW, Prevet D, Houenou LJ, Pincon-Raymond M, Dimitriadou V, Donevan A, O'Donovan M, Wenner P, Mckemy DD and Allen PD: Neuromuscular development in the avian paralytic mutant crooked neck dwarf (cn/cn): further evidence for the role of neuromuscular activity in motoneuron survival. *J Comp Neurol* 381: 353 - 372, 1997.

(平成 27 年 1 月 16 日受付)