
原 著

迷走, 舌下神経核における JNK isoform の発現の差異

奈良県立医科大学第1病理学教室

栞井勝也, 山田英二, 下川原立雄,
榎本泰典, 市島國雄

DIFFERENT EXPRESSION OF C-JUN AMINO-TERMINAL KINASE ISOFORM IN THE DORSAL MOTOR NUCLEUS OF THE VAGUS NERVE AND THE HYPOGLOSSAL NUCLEUS

KATSUYA MASUI, EIJI YAMADA, TATSUO SHIMOKAWARA,
YASUNORI ENOMOTO and KUNIO ICHIJIMA

Department of Pathology, Nara Medical University

Received October 10, 2001

Abstract : Mitogen-activated protein kinases (MAPKs) are important mediators of signal transduction from the cell surface to the nucleus. c-Jun amino-terminal kinase (JNK) is a member of the MAP kinase group. The JNK family of kinases is comprised of at least 3 isoforms, JNK 1, JNK 2 and JNK 3, and all of these kinases phosphorylate the transcription factor c-Jun in response to various stimulations. c-Jun is one of the earliest and most consistent markers for neurons that respond to nerve-fiber transection. It is reported that the dorsal motor nucleus of vagus nerve shows degenerative changes after axotomy while the hypoglossal nucleus shows regenerative changes.

In order to elucidate c-Jun metabolism after axotomy, we investigated the expression of JNK 1, JNK 2 and JNK 3 mRNA and immunohistochemical expression of JNK 1, JNK 2 and JNK 3 protein following vagus and hypoglossal nerve transection. We found that JNK 1, JNK 2 and JNK 3 mRNA were positive in the cytoplasm of neuronal and microglial cells. JNK 1 and JNK 2 protein were distributed mainly in the cytoplasm of neurons and glial cells, while only the JNK 3 immunoreactivity was observed intensely in the nuclei of neuronal cells. These results indicate that the principal activity of JNKs in neurons is contributed largely by JNK 3 under both normal and axotomized conditions.

Key words : c-Jun amino-terminal kinase, in situ hybridization, immunohistochemistry, axotomy, neuron

緒 言

MAPK (Mitogen-activated protein kinase) は真核生物に普遍的に存在し, 細胞増殖, 細胞分化, ストレス応

答, 細胞周期制御など多彩な系で, 細胞外の刺激を細胞内に伝える“細胞内シグナル伝達”の中心的な役割を担う^{1,2)}. MAPK は 3 family からなっており, その一つが c-Jun amino-terminal kinase (JNK) (SAPKs : stress-

activated protein kinases とも呼ばれる)である³⁻⁶⁾. JNK は3つの isoform (JNK1, JNK2, JNK3)から成り, その全てが様々な刺激によってc-Junをリン酸化する^{3,5,7)}. Table 1にMAPKカスケードを示す.

JNKは熱ショック, 蛋白合成阻害薬, 紫外線, 浸透圧変化などの物理化学的ストレスや, 炎症性サイトカイン, 虚血などの生理的ストレスによっても活性化され, c-Junをリン酸化する^{3,5,7)}. c-Junは神経の切断によって例外なく発現が増加し, そしてその発現は神経細胞の変性や細胞死, 生存にも関連しているとされている^{3-6,8-11)}.

末梢神経の切断が刺激となり, c-Jun mRNAの発現を増加させるという報告があるが, 神経切断後のJNKの発現に関する論文は少ない¹¹⁾. 軸索を切断すると迷走神経は変性細胞死を示し, 舌下神経は再生を示すとされる¹²⁻¹⁹⁾. そこで今回我々は, 軸索切断後の神経細胞におけるJNKからc-Junへの代謝に関する詳細な情報を得ることを目的に, 迷走神経核と舌下神経核において, JNK1, JNK2, JNK3のmRNAの発現をin situ hybridization (ISH)法で, さらにJNK1, JNK2, JNK3の蛋白発現を免疫組織学法により検索した.

対象と方法

- ①雄成熟ラットを用いて麻酔下に頸部で左迷走神経, 右舌下神経を切断した.
- ②軸索切断後変性を示す迷走神経核と再生を示す舌下神経核において, ISH法では1, 3, 5, 7, 14, 28日に, 免疫組織学法では3, 7, 14日に経時的な切片を作成し, JNK1, JNK2, JNK3の発現を検討した. またコントロールとして正常ラットの切片も作成した.
- ③ISH法におけるプローブは, JNK1 cDNA fragmentはJNK1 cDNAの899-1190のnucleotideを用い, JNK2 cDNA fragmentはJNK2 cDNAの921-1251のnucleo-

tideを用い, JNK3 cDNA fragmentはJNK3 cDNAの782-1190のnucleotideを用いて作成した. それぞれのプローブはcross-hybridizationを避けるよう, computer-assisted homology searchを利用し注意深く作成した.

④免疫組織学法に関して, JNK1の抗体は, (Rabbit polyclonal, Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, USA) (1:400), JNK2の抗体は, (Rabbit polyclonal, Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, USA) (1:1000), JNK3の抗体は, (Rabbit polyclonal, StressGen Biotechnologies Corp) (1:2000)を使用した.

結 果

< ISH 法 >

JNK1, JNK2, JNK3ともコントロールの正常ラットでは迷走神経と舌下神経の両方の神経核で神経細胞とアストロサイトの胞体で陽性所見を示した(Fig. 1. a). JNK1のシグナルはJNK2, JNK3に比べて弱い傾向があった.

左迷走神経, 右舌下神経の切断後は神経細胞の周囲のミクログリアにそれぞれのJNKの発現が認められた(Fig. 1. b). 経時的な変化ではJNK1とJNK2は変化がなかったが, JNK3に関しては, 舌下神経核の切断側において, その発現が神経細胞とミクログリアとも経時的に低下する傾向を認めた(Fig. 2). 迷走神経核についてはその発現に明らかな変化は認めなかった.

Sense probeでは検索したいずれの日数においても, どちらの神経核でも発現を認めなかった(Fig. 3).

ISH法の結果をTable 2に示す. 神経細胞と軸索切断後増殖を示すミクログリアを中心にJNKの発現を示した.

< 免疫組織学法 >

JNK1, JNK2ともコントロールの正常ラットでは迷走神経と舌下神経の両方の神経核で神経細胞とアストロサイトの胞体で陽性所見を示した(Fig. 4). 軸索切断後, JNK1は神経細胞とミクログリアの胞体にその発現を認めたが, 切断側と対照側で変化を認めず経時的な変化もなかった. JNK2はJNK1とほぼ同様で, 神経細胞ではJNK1に比べてやや反応が強かった.

しかしJNK3の発現はコントロールの正常ラットで, 両神経核の神経細胞の核と胞体に認められ, 特に核に強い発現が認められた(Fig. 5a. b). 軸索切断後も神経細胞の核に強い発現が認められ, ミクログリアの胞体には弱い発現が見られた. 明かな経時的な変化は認めなかった.

MAPK カスケード

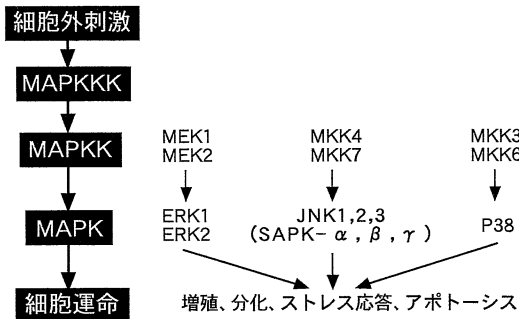


Table 1. Signal transduction : MKK4/7 ⇨ JNK ⇨ c-Jun

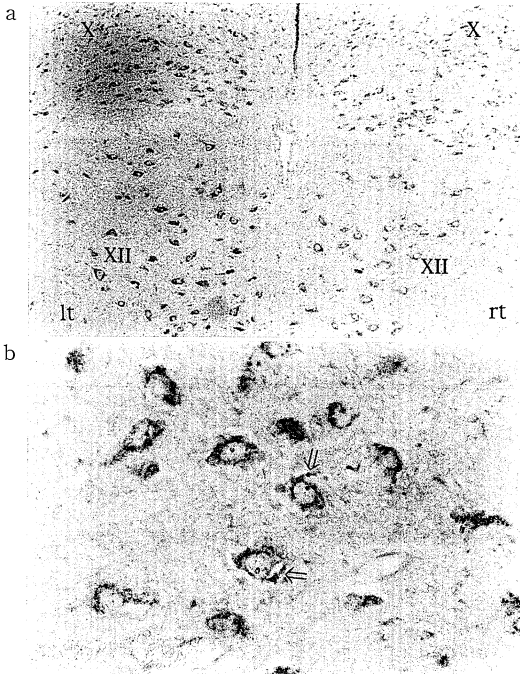


Fig. 1a. In situ hybridization of JNK 2 mRNA at 5 days after axotomy.

JNK 2 mRNAs were not changed in either vagal (X) and hypoglossal (XII) nuclei following their respective nerve injury. Counterstaining with methyl green. Original magnification $\times 100$.

Fig. 1b. In situ hybridization of JNK 2 mRNA in the hypoglossal nucleus at 5 days after axotomy.

Following vagal and hypoglossal nerve injury, hybridization signals for JNK 2 mRNA were expressed in cytoplasmic of neuronal and perineuronal microglial cells (arrows). Counterstaining with methyl green. Original magnification $\times 400$.

免疫組織学法の結果を Table 3 に示す。

考 察

今回の ISH 法により, JNK1, JNK2, JNK3 ともコントロールの正常ラットで神経細胞とアストロサイトの胞体に陽性所見を示し, JNK1 のシグナルは JNK2, JNK3 に比べて弱い傾向があったが, これは以前の報告と一致した所見である²⁰⁾。一方, JNK1, JNK2 の蛋白発現は主に胞体に存在するが, JNK3 蛋白は胞体に加え, 主に核に存在した。この結果は, これまでにマウスの脳に関して報告されている, 神経細胞における JNK 蛋白の発現分布の結果と一致している²¹⁾。

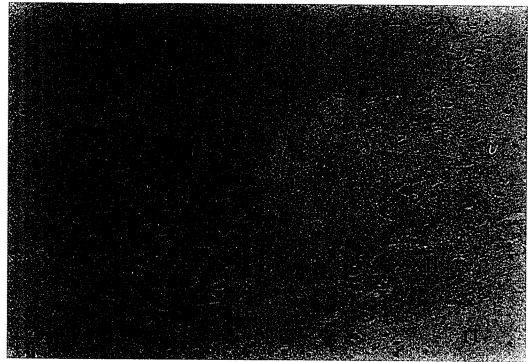


Fig. 2. In situ hybridization of JNK 3 mRNA at 5 days after axotomy.

JNK 3 mRNA tended to decrease in the severed side of the hypoglossal nucleus (XII). Counterstaining with methyl green. Original magnification $\times 100$.

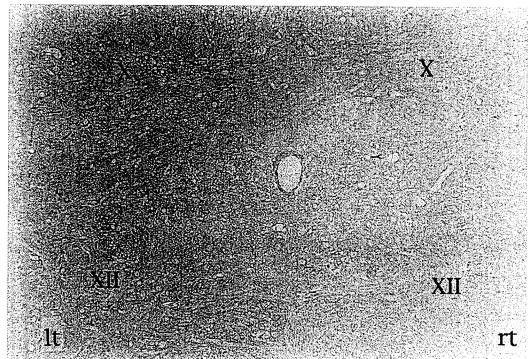


Fig. 3. Sense RNA probe for JNK 2 shows no signal.

Counterstaining with methyl green. Original magnification $\times 100$.

Table 2. Results of in situ hybridization for JNK 1, 2 and JNK 3 mRNA after axotomy

JNK 1 and JNK 2 mRNAs were not changed, while only JNK 3 mRNA tended to decrease in the hypoglossal nucleus after axotomy.

The number of + signs indicates the extent of JNK 1, JNK 2 and JNK 3 mRNA expression on ipsilateral nucleus after axotomy, compared to the background level. - sign shows an expression level almost equivalent to the background.

	Sham op.	1 day	3 days	5 days	7 days	14 days	28 days
neuron	+	+	+	+	+	+	+
microglia		+	+	+	+	+	+

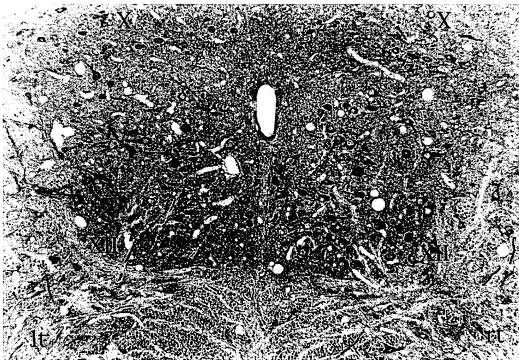


Fig. 4. Immunohistochemistry against JNK 2 antibodies at 7 days after axotomy. The immunoreactivities for JNK 2 showed no obvious change after axotomy. Original magnification $\times 100$.

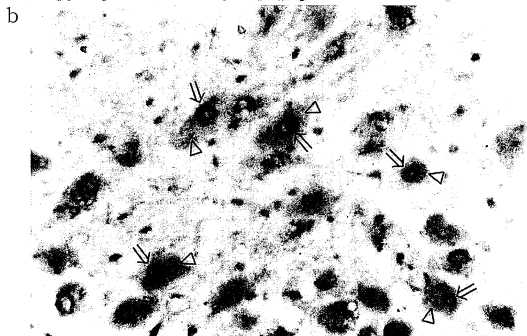
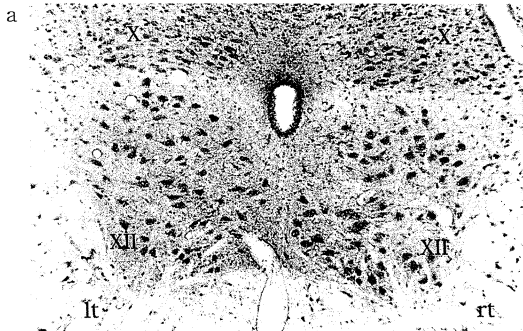


Fig. 5a. Immunohistochemistry against JNK 3 antibodies at 7 days after axotomy. JNK 3 immunoreactivity was mainly restricted to neurons of both nuclei. No obvious change of JNK 3 immunoreactivity was observed in both nuclei after axotomy. Original magnification $\times 100$.

Fig. 5b. Immunohistochemistry against JNK 3 antibodies in the hypoglossal nucleus at 7 days after axotomy. The immunoreactivity was observed intensely in the nuclei (arrows) and moderately in the cytoplasm (arrowheads) of neuronal cells. Original magnification $\times 400$.

Table 3. (a) JNK 1 and JNK 2 in both nuclei
The expression of JNK 2 was localized in the cytoplasm of neuronal and microglial cells. The immunoreactivities showed no obvious change after axotomy.

	Sham op.	3 days	7 days	14 days
nucleus of neuron	-	-	-	-
cytoplasm of neuron	+	+	+	+
microglia		+	+	+

(b) JNK 3 in both nuclei
The immunoreactivity was observed intensely in the nuclei and moderately in the cytoplasm of neuronal cells.

	Sham op.	3 days	7 days	14 days
nucleus of neuron	++	++	++	++
cytoplasm of neuron	+	+	+	+
microglia		\pm	\pm	\pm

一般的に JNK は平常状態では細胞の核にも胞体にも認められるが、活性化するとその発現は核に移行するとされている²⁹. JNK3 の発現が両神経核の神経細胞の核に強く認められたことは、神経細胞では JNK の活性には主に JNK3 が寄与していることを示している. また、JNK3 の局在がコントロールの正常ラットでも認められることから、JNK3 が神経機能の生理的な調節や可塑性に重要な役割を担っていると考えられた.

神経核においては、軸索の切断は c-Jun と活性化された c-Jun の発現増加を誘発すると報告されている^{3-6, 8}. JNK 3 の発現が神経細胞の特に細胞核に強く認められたことは、JNK3 が軸索切断により発現の上昇した c-Jun をリン酸化することを示している. これらのことから、神経細胞では平常状態でも軸索切断後の状態でも JNK3 が主に働いていると考えられる.

JNK3 は JNK の中で neuronal-specific isoform と言われており、海馬 CA1 領域の低酸素や虚血などのストレスにより JNK3 は活性化される⁷. また JNK3 knockout mouse では海馬神経細胞のアポトーシスが減少し、カイニン酸による痙攣が減少すると報告されている⁷. 今回の ISH 法の結果で、JNK1, JNK2 に関しては切断側と

非切断側で変化を認めなかったが, JNK3 は切断側の舌下神経核において, その発現が経時的に低下する傾向を認めた. このことから, 軸索切断後変性を示す迷走神経核と再生を示す舌下神経核における性質の違いに関して, JNK3 mRNA が何らかの影響を及ぼしている可能性が考えられた. 一方 JNK3 mRNA は軸索切断後に舌下神経核において, その発現が低下したが, 蛋白レベルでは JNK3 の明かな変化は捉えられなかった. このことは mRNA の変化が極僅かのため, その蛋白の変化を免疫染色では感知し得なかった為かもしれない. 今回の実験からは, c-Jun のリン酸化や JNK3 と神経細胞死や再生との直接的関連はまだ明らかにはなっておらず, 今後の研究が必要と考えられる.

今回の ISH 法により, JNK1, JNK2, JNK3 とも神経細胞とともにミクログリアの胞体にも陽性所見を示し, JNK1, JNK2 の蛋白発現もミクログリアの胞体に認められた. 軸索切断後の神経核においてはミクログリアの増殖や, アストロサイトの活性化が認められる¹²⁻¹⁹⁾. 今回の実験によりミクログリアにも JNK の発現が認められ, 特に JNK1, JNK2 の関与が示唆された.

結 論

神経細胞においては, 平常状態と軸索切断後の状態において, JNK 活性は主に JNK3 が寄与していると考えられた. ミクログリアにも JNK の発現が認められ, 特に JNK1, JNK2 の関与が示唆された.

文 献

- 1) Carboni, L. Tacconi, S. Carletti, R. Bettini, E. and Ferraguti, F. : Localization of the messenger RNA for the c-Jun NH2-terminal kinase kinase in the adult and developing rat brain : an in situ hybridization study. *Neuroscience* **80** : 147-160, 1997.
- 2) Nishida, E. and Gotoh, Y. : The MAP kinase cascade is essential for diverse signal transduction pathways. *TIBS* **18** : 128-131, 1993.
- 3) Carletti, R. Tacconi, S. Bettini, E. and Ferraguti, F. : Stress activated protein kinases, a novel family of mitogen-activated protein kinases, are heterogeneously expressed in the adult rat brain and differentially distributed from extracellular-signal-regulated protein kinases. *Neuroscience* **69** : 1103-1110, 1996.
- 4) Davis, R.J. : MAPKs : new JNK expands the group. *TIBS* **19** : 470-473, 1994.
- 5) Dérjard, B. Hibi, M. Wu, IH. Barrett, T. Su, B. Deng, T. Karin, M. and Davis, R.J. : JNK1 : a protein kinases stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell* **76** : 1025-1037, 1994.
- 6) Gupta, S. Barrett, T. Whitmarsh, A.J. Cavanagh, J. Sluss, H.K. Dérjard, B. and Davis, R.J. : Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors. *The EMBO Journal* **15** : 2760-2770, 1996.
- 7) Yang, DD. Kuan, CY. Whitmarsh, A.J. Rinc_n, M. Zheng, TS. Davis, R.J. Rakic, P. and Flavell, RA. : Absence of excitotoxicity-induced apoptosis in the hippocampus of mice lacking the Jnk 3 gene. *Nature* **389** : 865-870, 1997.
- 8) Beer, J. Mielke, K. Zipp, M. Zimmermann, M. and Herdegen, T. : Expression of c-jun, junB, c-fos, fra-1 and fra-2 mRNA in the rat brain following seizure activity and axotomy. *Brain Res.* **794** : 255-2662, 1998.
- 9) Herdegen, T. Brecht, S. Mayer, B. Leah, J. Kummer, W. Bravo, R. and Zimmermann, M. : Long-lasting expression of JUN and KROX transcription factors and nitric oxide synthase in intrinsic neurons of the rat brain following axotomy. *J. Neurosci.* **13** : 4130-4145, 1993.
- 10) Herdegen, T. Skene, P. and B_hr, M. : The c-Jun transcription factor bipotential mediator of neuronal death, survival and regeneration. *TINS* **20** : 227-231, 1997.
- 11) Herdegen, T. Claret, FX. Kallunki, T. Villalba, AM. Winter, C. Hunter, T. and Karin, M. : Lasting N-terminal phosphorylation of c-Jun and activation of c-Jun N-terminal kinases after Neuronal injury. *J. Neurosci.* **15** : 5124-5135, 1998.
- 12) Aldskogius, H. and Kozlova, EN. : Central neuron-glia and glial-glia interactions following axon injury. *Progress in Neurobiology* **55** : 1-26, 1998.
- 13) Barron, KD. Marciano, FF. Amundson, R. and Mankes, R. : Peripheral glial responses after axotomy of central and peripheral axons. A comparison. *Brain Res.* **523** : 219-229, 1990.

- 14) **Yamada, E. and Hazama, F.** : Retrograde neuronal degeneration of dorsal motor vagal nucleus after axotomy : ultrastructural investigation. *Neuropathology* **12** : 7-15, 1992.
- 15) **Yamada, E. and Hazama, F.** : Different stability of neurofilaments for trypsin treatment after axotomy in the dorsal motor nucleus of the vagal nerve and the hypoglossal nucleus. *Brain Res.* **612** : 210-215, 1993.
- 16) **Yamada, E. Kataoka, H. and Hazama, F.** : Specific expression of type II protein kinase c after axotomy in the dorsal motor nucleus of the vagus nerve and the hypoglossal nucleus. *Brain Res.* **639** : 341-346, 1994.
- 17) **Yamada, E. and Hazama, F.** : Decreased immunoreactivity of platelet derived growth factor B chain-like peptide after axotomy in the dorsal motor nucleus of the vagus nerve. *Brain Res.* **651** : 108-114, 1994.
- 18) **Yamada, E. Kataoka, H. Isozumi, T. and Hazama, F.** : Increased expression of phosphotyrosine after axotomy in the dorsal motor nucleus of the vagus nerve and the hypoglossal nucleus. *Acta Neuropathol.* **88** : 14-18, 1994.
- 19) **Zhang, P. Hogan, EL. and Bhat, NR.** : Activation of JNK/SAPK in primary glial cultures : II. Differential activation of kinase isoforms corresponds to their differential expression. *Neurochem. Res.* **23** : 219-225, 1998.
- 20) **Carboni, L. Carletti, R. Tacconi, S. Corti, C. and Ferraguti, F.** : Differential expression of SAPK isoforms in the rat brain. An in situ hybridisation study in the adult rat brain and during post-natal development. *Mol. Brain Res.* **60** : 57-68, 1998.
- 21) **Lee, JK. Park, J. Lee, YD. Lee, SH. and Han, PL.** : Distinct localization of SAPK isoforms in neurons of adult mouse brain implies multiple signaling modes of SAPK pathway. *Mol Brain Res.* **70** : 116-124, 1999.
- 22) **Kawasaki, H. Moriguchi, T. Matsuda, S. Li, HZ. Nakamura, S. Shimohara, S. Kimura, J. Gotoh, Y. and Nishida, E.** : Ras-dependent and Ras independent activation pathways for the stress-activated-protein kinase cascade. *Eur. J. Biochem.* **241** : 315-321, 1996.