

生後ラット三叉神経運動核における src ファミリー 蛋白発現の経時的観察

奈良県立医科大学口腔外科学教室

高山 賢一, 森本 佳成, 杉村 正仁

奈良県立医科大学第1病理学教室

山田 英二, 井上 和也

EXPRESSION OF SRC FAMILY THROSYNE KINASES IN THE TRIGEMINAL MOTOR NUCLEUS OF POSTNATAL RAT

KENICHI TAKAYAMA, YOSHINARI MORIMOTO and MASAHITO SUGIMURA

Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Nara Medical University

EIJI YAMADA and KAZUYA INOUE

First Department of Pathology, Nara Medical University

Received October 12, 2001

Abstract: Non-receptor-type tyrosine kinases of the Src family, such as Src, Fyn, and Yes, are broadly expressed in the brain and have been suggested to have an important function in the central nervous system. To clarify the role of Src family tyrosine kinases in the developmental process of neurons in the trigeminal motor nucleus that regulate movement of muscles of mastication, we investigated the expressions of c-Src, Fyn, and c-Yes in the trigeminal motor nucleus in rats during the period of transition from suckling to mastication using immunohistochemistry.

c-Src expression began to increase on day 14 after birth, on which weaning was started, and the expression reached its peak on day 18, then gradually decreased. Fyn expression was slightly positive in the nuclei in all groups, and there was no difference in the reaction intensity among the groups. c-Yes expression was strongly positive in the cytoplasm and axon in all groups, and there was no difference in reaction intensity among the groups.

The above findings suggest that Src family tyrosine kinases are closely involved in the development of motor neuron in the trigeminal motor nucleus and the development and maintenance of masticatory movement.

Key words: Src family tyrosine kinases, trigeminal motor nucleus, immunohistochemistry, rat

緒 言

ほとんどの哺乳動物は、吸綴から離乳期をへて咀嚼に移行する。生後すぐに行われる吸綴は主に口輪筋が担っており、これは顔面神経によって支配される。一方、咀

嚼は下顎骨の開閉を行う咀嚼筋(咬筋, 側頭筋, 内側翼突筋, 外側翼突筋, 顎二腹筋, 顎舌骨筋)によって行われ、これらは三叉神経運動核によって支配されており^{1, 2)}、吸綴から咀嚼へ移行するには咀嚼筋を支配する三叉神経運動核の神経細胞の発達が必要である。三叉神経運

動核の神経細胞の大きさは、離乳から咀嚼への移行期に大きく成長することが明らかとなっている。これらのように吸啜から咀嚼に移行する過程におけるこれら神経細胞の発育を形態学的に検討した報告はあるが、細胞内伝達因子など分子レベルでの研究報告はみられない。

Src ファミリーチロシンキナーゼは非受容体型チロシンキナーゼで、類似した構造をもつ10種類のメンバー(c-Src, Fyn, c-Yes, Yrk, c-Fgr, Hck, Lck, Lyn, Btk, Rak)が同定されている³⁾。その中でも特に1次構造が類似するc-Src, Fyn, c-Yesは、成熟ラット脳内で普遍的に存在しており^{4,7)}、これら3つの蛋白が神経系の発生、発達、維持に必要な不可欠なものと思われる。

Cartwright et al.⁸⁾は、ラット脳線条体では胎生15日から20日にc-Src蛋白の発現およびその活性が増大し、海馬では生後7日目からc-Srcの活性が増大することから、神経細胞および2型アストロサイトの発生にc-Srcが関与することを示唆している。また、成長円錐にc-Srcが豊富に存在することから、神経突起伸長にc-Srcが重要な働きをするものと考えられている⁹⁾。

Fynはマウス脳において胎生8.5日から発現し、その後神経稜の背根部に高い発現を認めることから、神経発生に対する関与が示唆されており¹⁰⁾、またミエリン形成にも関与している^{11, 12)}。c-Yesはマウス脳において胎生10日すぎから生後2週すぎまでその発現は増大し、その後その発現は高いレベルで維持され、シナプス機能に関与すると言われている⁶⁾。これらのことからFyn, c-Yesは神経細胞の生存、維持に働いていることが示唆される。

遺伝子ターゲティング法による研究では、c-Src欠損マウス由来の培養神経細胞で神経突起伸長が阻害されること¹³⁾が、Fyn欠損マウス小脳由来の初代培養神経細胞でも神経突起の伸長が阻害されること¹⁴⁾が報告されており、これらのことはc-SrcやFynが軸索伸長に関与していることを示している。

Klinghoffer et al.¹⁵⁾はマウスで、c-SrcとFynまたはc-Srcとc-Yesの2種類が欠損すると、呼吸および動作が弱く生後すぐに死亡することから、Srcファミリーが神経筋機能へ関与することを示唆している。さらに、Fynがニコチン性アセチルコリン受容体のリン酸化に関与するという報告¹⁶⁾や、Srcファミリーがシナプスの安定化に働いているという報告¹⁷⁾がある。これらのことより、Srcファミリーは神経の発生、分化に限らず成熟脳における神経の機能、特に支配する筋とのシナプス伝達の維持やその安定化に関与すると考えられる。

本研究では、咀嚼筋の運動を支配する三叉神経運動核の神経細胞の発育過程におけるSrcファミリーの役割を

明らかにする目的で、吸啜から咀嚼に移行する時期のラット三叉神経運動核におけるc-Src, Fyn, c-Yes蛋白の発現を免疫組織化学的に検索した。

材料と方法

1. 検体採取

ラットは生後2週から3週で離乳し咀嚼へ移行することから、実験にはウイスター系妊娠ラットを飼育し、出生したラットを生後14日目から飼料を与えて離乳を開始し、生後21日目に母ラットと離乳咀嚼を開始させた。生後6, 10, 14, 18, 22, 26, 30, 84日齢の雄性ラット各群4頭を4%パラフォルムアルデヒド/0.1Mリン酸緩衝液(PB)(PH7.4)で灌流固定し、それぞれから脳幹を摘出した。4℃にて6時間後固定した後、20%サッカロース/PBSに4℃で48時間浸漬した。液体窒素で凍結し、クリオスタットを用いて30 μ mの凍結切片を作製した。

2. 免疫組織化学染色

作製した切片をfree floating methodにて免疫組織化学染色を行った。まず0.1% H₂O₂/PBSに10分間浸漬し内因性ペルオキシダーゼ阻害を行い、10分×3回PBSで洗浄した後blockingを行った。次にc-src(1:2000, Santa Cruz Biotech. Inc., CA, USA), fyn(1:2000, Santa Cruz Biotech. Inc., CA, USA), c-yes(1:5000, Santa Cruz Biotech. Inc., CA, USA)を一次抗体とし、4℃にて二晩反応を行った。10分×3回PBSで洗浄後、2次抗体に18℃にて4時間浸漬後10分×3回PBSで洗浄し、18℃にて30分HRP標識を行った(DAKO LSAB 2 kit for use on Rat specimens, DAKO Corp. CA, USA)。その後10分×3回PBSで洗浄し18℃にて10分間3,3'-diaminobenzidineで発色を行った。

結 果

三叉神経運動核は脳幹下部に存在する(Fig.1)。本研究では得られた連続切片中、三叉神経運動核を横断するものを抽出して観察した(Fig.2)。

1. c-Src

吸啜期である生後6日目、10日目では、細胞膜にわずかな陽性反応を認めたものの明らかな陽性反応は認めなかった(Fig. 3A)。離乳を開始した生後14日目では核膜に強い陽性反応を認め(Fig. 3B)、離乳期である生後18日目では細胞質に強い陽性反応を認めた(Fig. 3C)。咀嚼期である生後22日目では細胞質に陽性反応を認めたが生後18日目よりも弱く、以後反応はしだいに弱くなっていった(Fig. 3D)。

2. Fyn

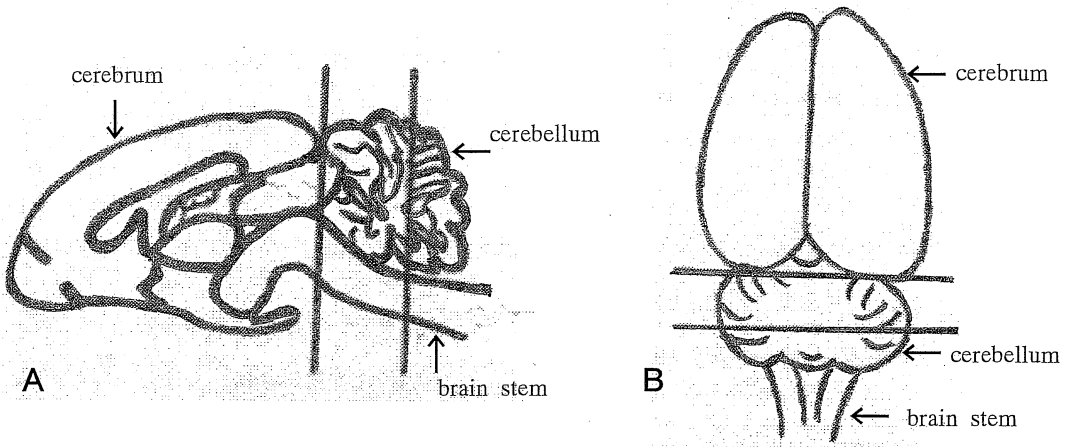


Fig. 1. Portation of trigeminal motor nucleus which exist between the bars
 A : sagittal section of rat brain B : dorsal view of rat brain

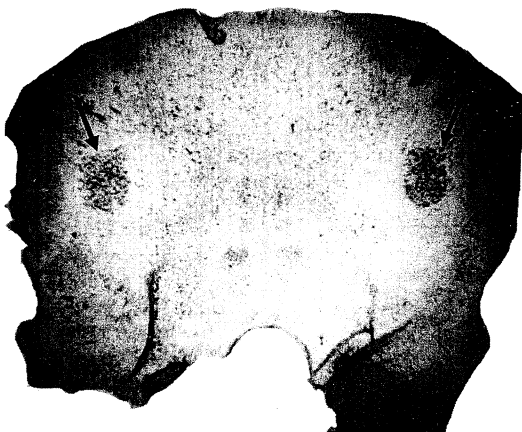


Fig. 2. Immunohistochemical stains for c-yes at the lower brain stem of rat at postnatal 6 days (×20)
 Arrows : trigeminal motor nucleus

各群において核内にわずかな反応を認めたものの、明らかな陽性反応は認めなかった(Fig. 4)。また吸啜期、咀嚼期を通じて反応強度に変化が認められなかった。

3. c-Yes

各群において細胞質および神経突起に強い陽性反応を認め(Fig. 5)、吸啜期、咀嚼期を通じて反応強度に変化が認められなかった。

これらの結果を Table 1 に示す。

考 察

Src ファミリーチロシンキナーゼは非受容体型チロシ

ンキナーゼで、おもに細胞質もしくは膜構造に局在している。今回、三叉神経運動核の神経細胞の核膜に c-Src (Fig. 3B) の発現を認め、また核内に Fyn (Fig. 4) の発現が認められた。これまでに、成熟ラットの顔面神経細胞の核に Fyn 蛋白の発現が認められた報告⁹⁾や、プルキンエ細胞、網膜神経細胞および海馬の pyramidal neurons の核に c-Yes 蛋白の発現が認められた報告¹⁰⁾があり、Src ファミリーは核においても働いていると考えられ、今回の結果は非特異反応ではないと考えている。

本研究ではラット三叉神経運動核において、離乳を開始した生後 14 日目から c-Src 蛋白の発現が強くなり、18 日目にはその発現が最も強く、その後その発現は弱くなることが示された(Fig. 3)。生後 18 日目は離乳期で咀嚼運動を開始する時期であり、顔面神経の支配する口輪筋を中心とした吸啜運動から三叉神経運動核によって支配される咀嚼筋の活動が活発化していく移行期である。この時期の三叉神経運動核に c-Src の発現が強くなったことは、吸啜から咀嚼へと移行するにしたがって、三叉神経系の発達を示すものである。ラット三叉神経運動核は、生後 5 日目から 21 日目の間に急激にその神経細胞が大きくなり、42 日目まで緩やかに大きくなりそれ以降は変化しないという報告¹⁰⁾がある。マウスにおいても、生後 22 日目まで神経細胞の大きさが大きくなりその後変化しないと報告¹⁰⁾されている。これらは、いずれも吸啜から離乳期に三叉神経の運動神経が大きく成長することを示している。本研究でもこの時期に c-Src の発現が強くなったことは、三叉神経運動核の神経細胞の成長、発達に c-Src が関与していることを示している。

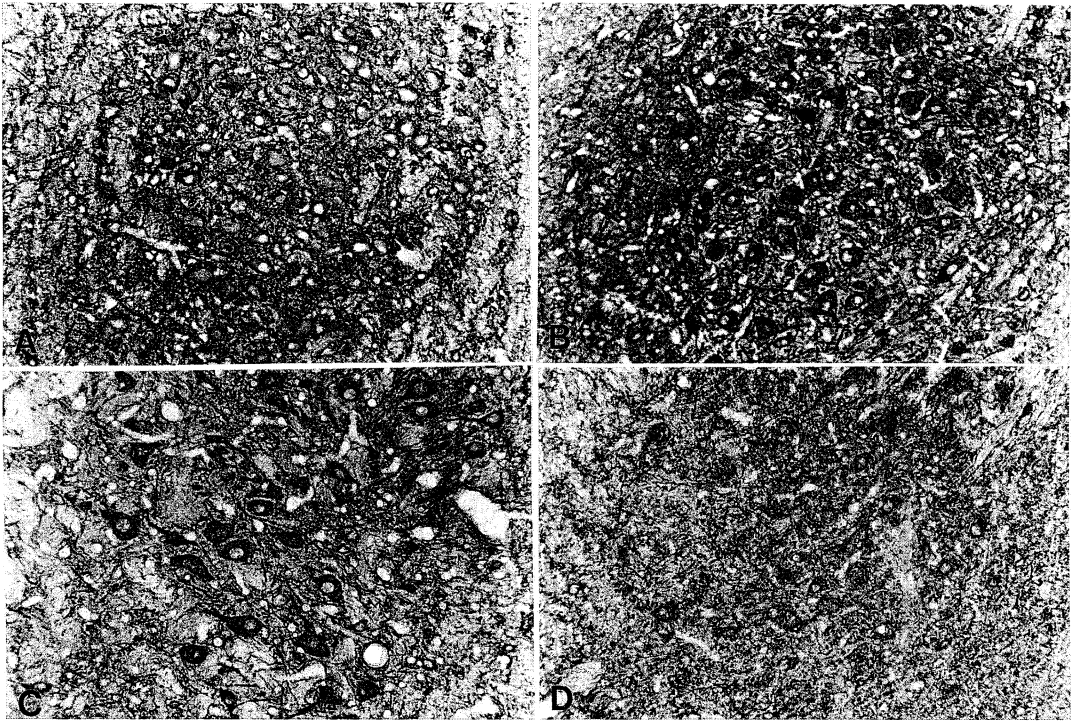


Fig. 3. Immunohistochemical stains for c-src at the trigeminal motor nucleus (×200)
 A : Postnatal 6 days B : Postnatal 14 days C : Postnatal 18 days D : Postnatal 26 days

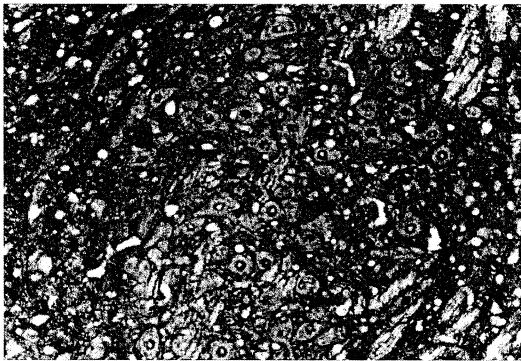


Fig. 4. Immunohistochemical stains for fyn at the trigeminal motor nucleus at postnatal 14 days (×200)

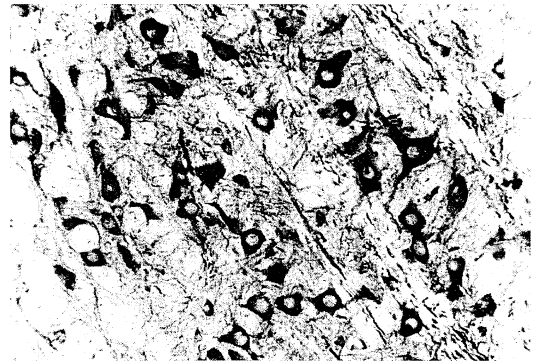


Fig. 5. Immunohistochemical stains for c-yes at the trigeminal motor nucleus at postnatal 84 days (×200)

Table 1. Results of immunohistochemistry in the trigeminal motor nucleus after birth

antibody	6	10	14	18	22	26	30	84	(postnatal days)
c-Src	±	±	+	++	+	±	±	-	
Fyn	±	±	±	±	±	±	±	±	
c-Yes	++	++	++	++	++	++	++	++	

- : absent ; ± : almost equivalent to the background ; + : weak reaction ; ++ : strong reaction

一方, c-Src は神経軸索の再生, 発達および神経突起伸長に強く関与している. Maness et al.⁹⁾は成長円錐に c-Src が豊富に存在することから, c-Src が神経突起伸長に関与することを示唆している. また, 成熟ラットの舌下神経を切断するとその神経核における c-Src の活性が増強され²⁰⁾, 傷害を受けた末梢神経で再生している軸索に c-Src 蛋白の発現量が増大することが報告²¹⁾されている. また c-Src 欠損マウス由来の培養神経細胞で神経突起伸長が阻害される¹⁹⁾. このように, c-Src は神経細胞の再生, 神経突起の伸長に強く関与し, 神経細胞の発達に重心的役割を果たしていると考えられる.

Fyn は各群において核内に陽性反応を認め, 各群における反応強度に変化は認められなかった (Fig. 4). Fyn はマウス脳において胎生 8.5 日から発現を認め神経の発生に関与¹⁰⁾し, 出生後から成熟脳においてもその発現は高いレベルを維持し, 中枢神経系の生理機能の維持に関与するといわれている²¹⁾. また, Fyn がアセチルコリン受容体に豊富に存在し, そのリン酸化に働いていることが示唆されている¹⁶⁾ことや, Fyn 欠損マウスでは生後の哺乳行動や呼吸運動に異常を認めることから^{15, 22)}, Fyn が神経筋機能に関与しており, 三叉神経の活動性の維持や, 咀嚼運動の維持に関与しているものと考えられた.

c-Yes も各群において細胞質および神経突起に強い陽性反応を認め, 吸啜期から咀嚼期まで強い陽性反応を維持した (Fig. 5). c-Yes 欠損マウスでは神経系にまったく異常は認められていないが, c-Src と Fyn 同時欠損マウスのアセチルコリン受容体では c-Yes の活性が増強することから, c-Yes は c-Src および Fyn に対し代償的に働いているものと考えられている¹⁷⁾. これらのことより, c-Yes は間接的に神経細胞の成長, 発達, 維持ひいては咀嚼運動の維持に関与しているものと考えられた.

c-Src や c-Yes 単独ノックアウトでは, in vivo で神経系の発達に明らかな異常は見だされていない. これは, 欠損酵素の役割を他の酵素が代償するためと考えられ, c-Src, Fyn, c-Yes は互いに相補的に働いていると考えられている^{17, 23)}. これらのことより, Src ファミリーが三叉神経運動核で複合的に機能し, 咀嚼運動の発達やその維持を調節しており, 吸啜から咀嚼への移行に大いに影響を与えるものと考えられた.

結 語

ラットの咀嚼運動の発達過程における Src ファミリーの役割を明らかにする目的で, 吸啜から咀嚼に移行する時期のラット三叉神経運動核における c-Src, Fyn, c-Yes の発現を免疫組織化学的に検索し以下の結果を得た.

1. c-Src は離乳を開始した生後 14 日目からその発現が強くなり, 18 日目にはその発現が最も強く, その後その発現は弱くなっていった.

2. Fyn は各群において核内にわずかな陽性反応を認め, 各群における反応強度に変化は認められなかった.

3. c-Yes は各群において細胞質および神経突起に強い陽性反応を認め, 各群における反応強度に変化は認められなかった.

以上の結果は, 三叉神経運動核における運動神経の発達に Src ファミリーチロシンキナーゼが強く関与していることを示しており, 咀嚼運動の発達や維持に深く関与することが示唆された.

謝 辞

稿を終えるにあたり, 論文の御校閲, 御助言を賜りました, 第一病理学教室市島國雄教授ならびに第二外科学教室神 壽右教授に深く感謝の意を表します. また, 御協力をいただきました第一病理学教室の諸姉妹に感謝いたします.

本研究の一部は, 文部省科学研究費補助金(奨励研究 A:10771142)の助成により行った. なお, この論文の要旨は第 13 回日本顎関節学会総会(2000 年 6 月福岡)において発表した.

文 献

- 窪田金次郎, 成田紀之, 大久保憲一, 河本 哲, 小田切紀子: 咀嚼システムの形成と適応. 風人社, 東京, p39-44, 1988.
- 森本佳成: 口腔領域における交感, 感覚および運動神経支配に関する研究 I. 顎関節, 咀嚼筋における神経支配. 奈医誌. 45: 684-698, 1994.
- Courtneidge, S. A. : in Protein kinases (ed. Woodgett, J. R.), Oxford University Press, Oxford, p212-242, 1994.
- Sugrue, M. M., Brugge, J. S., Marshak, D. R., Greengard, P. and Gustafson, E. L. : Immunocytochemical localization of the neuron-specific form of the c-src gene product, pp60c-src (+), in rat brain. J. Neurosci. 10 : 2513-2527, 1990.
- Bare, D. J., Lauder, J. M., Wilkie, M. B. and Maness, P. F. : p59fyn in rat brain is localized in developing axonal tracts and subpopulations of adult neurons and glia. Oncogene. 8 : 1429-1436, 1993.
- Walaas, S. I., Zhao, Y. H. and Sudol, M. : Neu-

- ronal localization of the tyrosine-specific protein kinase p62c-yes in rat basal ganglia. *Neurochem. Res.* **18** : 43-46, 1993.
- 7) **Zhao, Y. H., Baker, H., Walaas, S. I. and Sudol, M.** : Localization of p62c-yes protein in mammalian neural tissues. *Oncogene.* **6** : 1725-1733, 1991.
 - 8) **Cartwright, C. A., Simantov, R., Cowan, W. M., Hunter, T. and Eckhart, W.** : pp60c-src expression in the developing rat brain. *Proc Natl Acad. Sci. USA.* **85** : 3348-3352, 1988.
 - 9) **Maness, P. F., Aubry, M., Shores, C. G., Frame, L. and Pfenninger, K. H.** : c-src gene product in developing rat brain is enriched in nerve growth cone membranes. *Proc Natl. Acad. Sci. USA.* **85** : 5001-5005, 1988.
 - 10) **Yagi, T., Sigetani, Y., Furuta, Y., Nada, S., Okada, N., Ikawa, Y. and Aizawa, S.** : Fyn expression during early neurogenesis in mouse embryos. *Oncogene.* **9** : 2433-2440, 1994.
 - 11) **Umemori, H., Sato, S., Yagi, T., Aizawa, S. and Yamamoto, T.** : Initial events of myelination involve Fyn tyrosine kinase signaling. *Nature.* **367** : 572-576, 1994.
 - 12) **Sperber, B. R., Boyle-Walsh, E. A., Engleka, M. J., Gadue, P., Peterson, A. C., Stein, P. L., Scherer, S. S. and McMorris, F. A.** : Unique role for Fyn in CNS myelination. *J. Neurosci.* **21** : 2039-2047, 2001.
 - 13) **Ignelzi, M. A., Miller, D. R., Soriano, P. and Maness, P. F.** : Impaired neurite outgrowth of src-minus cerebellar neurons on the cell adhesion molecule L1. *Neuron.* **12** : 873-884, 1994.
 - 14) **Beggs, H. E., Soriano, P. and Maness, P. F.** : NCAM-dependent neurite outgrowth is inhibited in neurons from Fyn-minus mice. *J. Cell. Biol.* **127** : 825-833, 1994.
 - 15) **Klinghoffer, R. A., Sachsenmaier, C., Cooper, J. A. and Soriano, P.** : Src family kinases are required for integrin but not PDGFR signal transduction. *EMBO J.* **18** : 2459-2471, 1999.
 - 16) **Swope, S. L., Qu, Z. and Huganir, R. L.** : Phosphorylation of the nicotinic acetylcholine receptor by protein tyrosine kinases. *Ann. NY Acad. Sci.* **10** : 197-214, 1995.
 - 17) **Smith, C. L., Mittaud, P., Prescott, E. D., Fuhrer, C. and Burden, S. J.** : Src, Fyn, and Yes are not required for neuromuscular synapse formation but are necessary for stabilization of agrin-induced clusters of acetylcholine receptors. *J. Neurosci.* **21** : 3151-3160, 2001.
 - 18) **Miyata, H., Sugiura, T., Wada, N., Kawai, Y. and Sigenaga, Y.** : Morphological changes in the masseter muscle and its motoneurons during postnatal development. *Anat. Rec.* **244** : 520-528, 1996.
 - 19) **Kubota, K., Narita, N., Ohkubo, K., Shibana, S., Nagae, K., Kubota, M., Odagiri, N. and Kawano, T.** : Morphological studies of the neuromuscular mechanism shifting from sucking to biting of mice. *Acta. Anat.* **133** : 200-208, 1988.
 - 20) **Isozumi, T., Yamada, E., Hazama, F. and Handa, J.** : Altered expression of src tyrosine kinase after axotomy. *Acta. Neuropathol.* **93** : 438-442, 1997.
 - 21) **Le Beau, J. M., Tedeschi, B. and Walter, G.** : Increased expression of pp60c-src protein-tyrosine kinase during peripheral nerve regeneration. *J. Neurosci. Res.* **28** : 299-309, 1991.
 - 22) **Yagi, T., Aizawa, S., Tokunaga, T., Sigetani, Y., Takeda, N. and Ikawa, Y.** : A role for Fyn tyrosine kinase in the suckling behaviour of neonatal mice. *Nature.* **366** : 742-745, 1993.
 - 23) **Stein, P. L., Vogel, H. and Soriano, P.** : Combined deficiencies of Src, Fyn, and Yes tyrosine kinases in mutant mice. *Gene Dev.* **8** : 1999-2007, 1994.