

実験をおこなった。シナプス形成に伴う神経細胞の形態変化やシナプス機能マーカータンパク質発現と局在に関する科学的知見は、すでにげっ歯類の脳の初代培養神経細胞において明らかになっていることから、げっ歯類の初代培養神経細胞を対照実験としている。対照実験については、協力研究者である群馬大学神経薬理学教室の協力を得て、シナプス機能マーカー発現の観察に関する標準プロトコル作成を開始した。本年度は、シナプス機能マーカータンパク質の免疫組織化学染色と、グルタミン酸受容体とATP受容体刺激により上昇する細胞内カルシウム濃度を測定することにより、iPS細胞由来神経細胞標本のシナプス機能の成熟度を比較検討した。iPS細胞株や、細胞の培養密度や、接着因子を変えることにより培養条件を整えた。実験データの再現性については、同じiPS細胞株から分化した神経細胞においては確認することができた。

ATPとグルタミン酸 (L-Glu) を投与した際の細胞内 Ca^{2+} 濃度変化をイメージング解析して、P2受容体、グルタミン酸受容体のシナプス後部における機能的な発現を比較検討した。

201B7由来神経細胞は分化誘導30日目にATPにのみ反応する細胞が現れ、40日目でATPに加え、L-GluおよびHighK⁺に反応する細胞が現れた (Fig.2)。しかし、40日目までNMDAやpicrotoxinに反応を示す細胞はあらわれなかった。また、40日間の実験中、個々の細胞の個々のリガンドに対する反応強度は非常に多様であった。253G1由来神経細胞は分化誘導10日目でL-GluおよびhighK⁺にのみ反応し、40日目までその他のリガンド

(ATP, NMDA, Picrotoxin) に反応する細胞は現れなかった。(Fig.3:30日目の典型的反応トレースを示す)。253G1由来神経細胞の反応強度はほぼ全ての細胞が非常に類似しており、201B7とは対照的であった。以上のようにシナプス後部の機能的な受容体発現において両株は全く異なる特性を持つことが明らかとなった。

40日目の免疫組織化学的検討では、ポストシナプスマーカーであるPSD95の発現パターンを比較検討した。201B7由来神経細胞では発現が樹状突起のシャフト部分に分散し、シグナル強度も非常に弱かった。一方253G1由来神経細胞ではPSD95がクラスター状に集積し、樹状突起上にクラスターが突出する、樹状突起スパインと思われるタンパク局在を示した (Fig.4)。そこで、253G1由来神経細胞についてsynapsin 1とPSD95の二重染色を行ったところ、synapsin 1のシグナルがPSD95のクラスター上に分布している様子が観察された (Fig.5)。このようにシナプス成熟マーカーの発現パターンにおいても201B7由来神経細胞と253G1由来神経細胞とは大きく異なることが明らかとなった。

3-2. ヒトiPS細胞由来心筋細胞の品質評価に関する研究

ヒトiPS細胞由来心筋細胞を用いて医薬品の催不整脈作用を高感度で検出する実験法を提案した。本年我々は、技術的に平易である多点電極による細胞外電位記録法を選択した。また、電極への標本の接着性が高く、細胞間に形成されるギャップ結合により電気活動が均質化し、薬剤の浸透性が均一である、という理由で、細胞シ

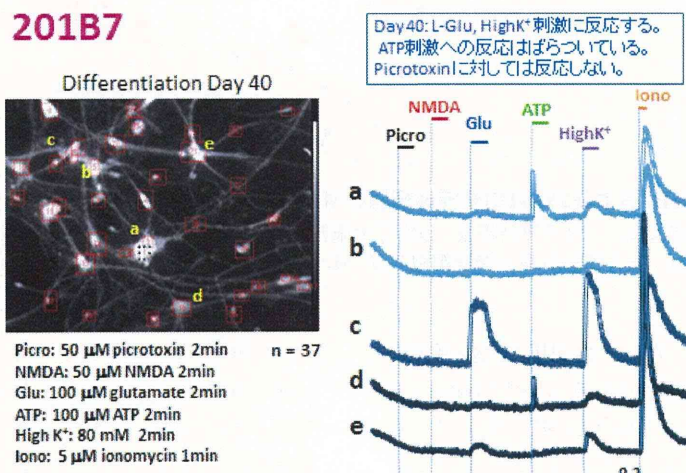


Fig.2. 分化誘導40日目の201B7由来神経細胞のCa²⁺応答

201B7由来神経細胞の薬物 (ATPならびにグルタミン酸; L-Glu) に対するカルシウムの細胞内増加は、分化誘導30日以降に観察された。左はfura-2 AMをとりこんだ201B7由来神経細胞の典型的蛍光染色像である。右は典型的な細胞内Ca²⁺応答トレースを示す。分化誘導40日後にはATPに加え、L-GluおよびHighK⁺に反応する細胞が現れた。NMDAやpicrotoxinに反応を示す細胞はあらわれなかった。

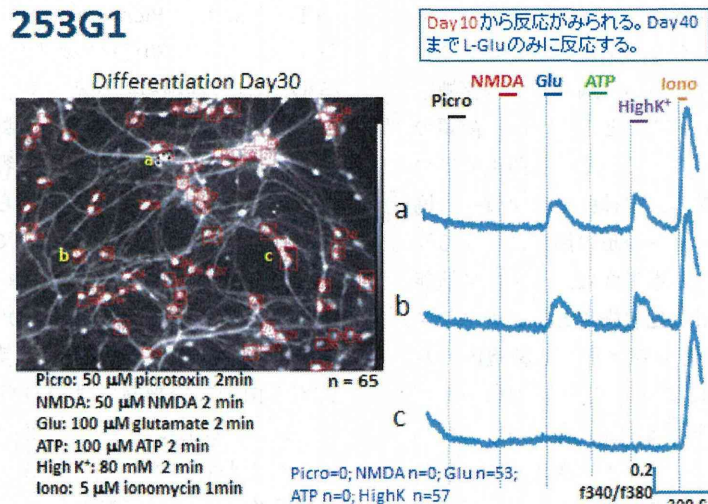


Fig.3. 分化誘導30日目の253G1由来神経細胞のCa²⁺応答

左はfura-2 AMをとりこんだ253G1由来神経細胞の典型的な蛍光染色像。右は典型的な細胞内Ca²⁺応答のトレースを示す。L-GluおよびHighK⁺にのみ反応を示し、ATPに対する応答は観察されなかった。この反応は分化誘導10日目からあらわれ、40日目まで変化がなかった。ATP、NMDAやpicrotoxinに反応を示す細胞はあらわれなかった。

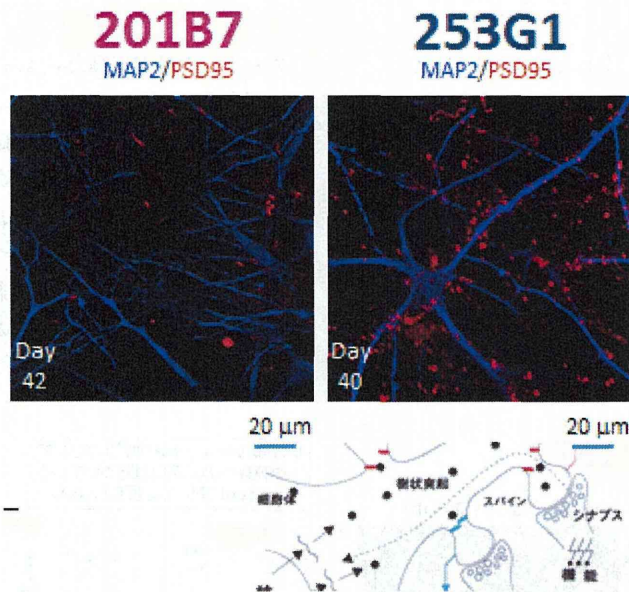


Fig.4. 分化誘導40日目の201B7および253G1由来神経細胞のMAP2, PSD95二重染色像

左は201B7由来神経細胞、右は253G1由来神経細胞。201B7由来神経細胞ではPSD95の発現が樹状突起のシャフト部分に分散し、シグナルも非常に弱かった。一方253G1由来神経細胞ではPSD95がクラスター状に集積していた。

ートを実験標本として採用した。今回使用した多点電極システムをFig.6に示す。細胞外電位 (Field potential; FP) は細胞内で記録される活動電位の微分波形に一致し、心電図によって得られる信号と同様の変化を記録することができる⁴⁾。従って、Fig.6に示すように、ナトリウムによるピークから活動電位再分極時に観察されるカリウムのピークまでの時間であるFPDは、心電図におけるQT間隔に相当する。このシステムを用いて、FPD

および拍動数の評価を行った。

製薬関連企業の中でもっとも多くの研究発表があり先行的に研究を行っているエーザイ (グローバルCV評価研究部) で採用している実験プロトコルを参考に標準プロトコルを作成した。

現在市販されているヒトiPS / ES細胞由来心筋細胞には、4種類ある (Table 2)。大量に入手可能な心筋細胞としては2種類の市販品があるが、同一iPS細胞株か

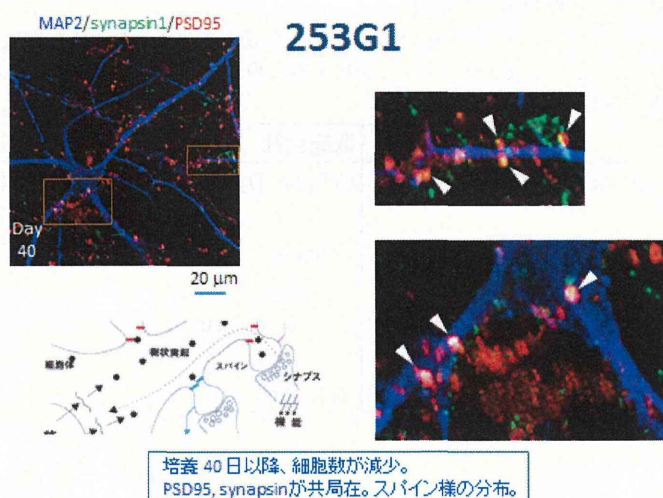


Fig.5. 分化誘導40日目の253G1由来神経細胞のMAP2, synapsin1, PSD95, 三重染色像

左はx40蛍光顕微鏡像である。右はそのインセットの拡大図である。synapsin1のシグナルがPSD95のクラスター上に分布している様子が観察された。シナプス前部とシナプス後部が会合していることが示唆された。

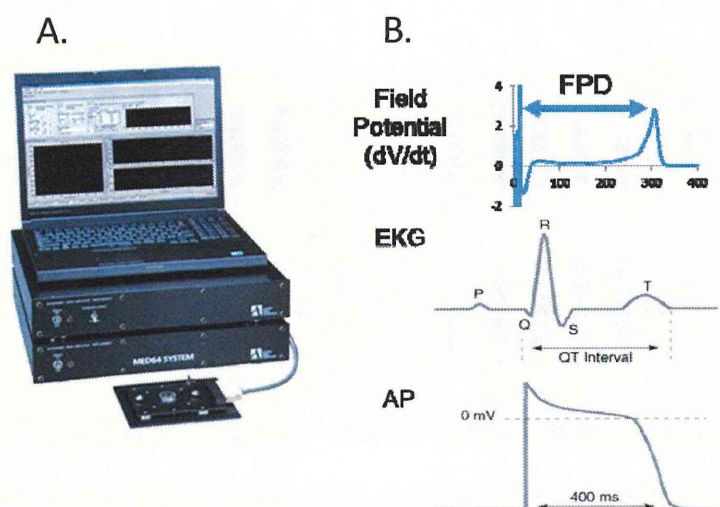


Fig.6. 多点電極システムによるFPDの測定

- (A) 今回、多点電極システムとして、MED64 システム（アルファメッドサイエンティフィック株式会社）を用いた。
 (B) 多点電極システムにおけるField Potential の長さ (FPD) はQT間隔に相当する。

ら同一分化条件で誘導され組織マーカータンパク質発現により規格化された分化細胞で、かつ細胞シートの作成に適している細胞 (iCELL, CDI社) を用いて実験プロトコルの最適化を行った。その結果、データの再現性を得るためには、計測温度や分化心筋細胞の播種密度が非常に重要な条件であることがわかった。さらに、予備的薬理実験で使用したiCELLでは、陽性対照物質としてIKr阻害剤E-4031やIKs阻害剤クロマノールがともにQT延長を誘発することがわかった (Fig.7)。東邦大学、エーザイ、国衛研で心筋に関するサブ研究グループを作成し、プロトコル最適化のための擦り合わせ作業を行った

ところ、iCELLの薬理的性状はどの研究施設でも観察された。実験プロトコルは技術的に平易であり、今後複数の研究施設間で分化心筋細胞の薬理特性を比較する上で有用であると判断された。NEDO研究に参加している三菱化学メディエンスも我々が提案する標準プロトコルを導入する方針を固めた。また、安全性薬理研究会を通じて研究協力施設を募ったところ、東邦大学を中心として、医薬品開発業務受託機関にも標準プロトコルを導入して行くこととなった。また、製薬協への情報提供を行った結果、製薬協でタスクフォースがたちあがった。

3-3. ヒト幹細胞由来肝実質細胞を用いた試験法の確

Table2. 市販されているヒトiPS/ES細胞由来心筋細胞

現在市販されていて薬理実験に利用可能な主なヒトiPS/ES細胞由来心筋細胞を示す。このうち細胞シートを形成することができる形状で冷凍保存可能なCDI社のiCellを、実験プロトコルを整備するために利用した。実験プロトコルが整備された後に、京都大学で作製された分化心筋細胞について検討する予定である。

分化心筋細胞	販売会社
iPS cell-derived cardiomyocytes, iCell Cardiomyote	Cellular Dynamics International (CDI)
Stem cell derived cardiomyocyte product, hES-CMC	Collectis
Human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes	GE Healthcare
ReproCardio	Reprocell

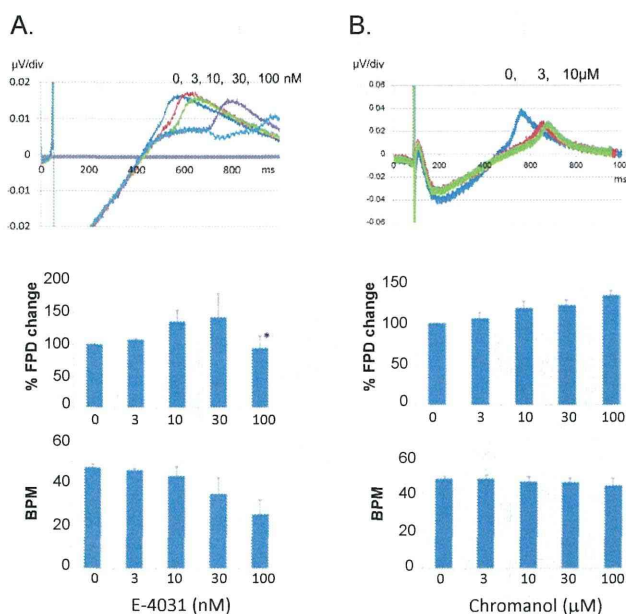


Fig.7. iCellシートのfield potential duration (FPD) と心拍数 (Beat per minute: BPM) に対するE-4031とクロマノールの影響

(A) E-4031各濃度に対するFPD延長の典型例 (上段), E-4031によるFPDの延長とBPM減少 (n=4, *n=3) (下段)

(B) クロマノール各濃度に対するFPD延長の典型例 (上段), E-4031によるFPDの延長とBPM減少 (n=3)

立

iPS細胞由来肝細胞を利用して医薬品の有害反応を評価する際の項目として、細胞毒性、ミトコンドリア膜電位、細胞膜透過性、活性酸素、酸化ストレスを採択した。現在入手可能なヒトiPS細胞由来肝実質細胞 (1種類3ロット) を用いて、発現が期待される酵素活性を測定した。ヒト幹細胞由来肝実質細胞では酵素活性が不十分な標本が多く見受けられた。

4. 考察

4-1. ヒトiPS細胞由来分化細胞を用いた薬理試験法開発 (総括班)

4-1-1. 薬理作用の評価指標の選定について

ヒトiPS細胞から種々の臓器細胞を分化する実験技術はめまぐるしい進歩をみせており、神経細胞、心筋細胞、肝実質細胞への分化方法の改良がおこなわれている。どのような細胞が実用に最適であるかを知るためには、同一プロトコルと同一の薬物を用いて薬理実験を行い、分化細胞がどのぐらい目的とする細胞の特性を有しているか比較検討する必要がある。しかし、現時点ではそのような標準的な実験プロトコルは確立しておらず、使用する薬物も様々であり、現状のままでは分化細胞が

利用可能であるかを確認する方法がなかった。我々の研究は、標準的プロトコルで同一薬物を用いたデータを集積することを最終ゴールとするために計画されている。

ヒトiPS細胞分化細胞を用いて非臨床試験法を開発するためには、何を調べたいのかを明かにして、それを調べるだけの機能が発現しているか確認する必要がある。そのためには、まずヒト有害反応の検出を可能とする評価指標を明確にする必要がある。

神経細胞の場合にはシナプス形成とその機能成熟、心筋細胞の場合には集合活動電位記録とQT間隔、肝実質細胞の場合には薬物代謝酵素活性などを評価指標とすることとして、実験プロトコルの開発に着手した。

我々は、分化神経細胞、分化心筋細胞、分化肝実質細胞を予備的薬理実験に用いるために十分な量を入手するルートを平成24年度に確立していたことから、本年度の研究開始日には、すぐに予備的薬理実験に着手した。どの分化細胞にしても、製造ロットの違いにより、細胞の状態が異なることが確認できたが、どのぐらいの幅で変動しているのかを今後確認していく必要がある。

現時点においては、同一iPS細胞株から同一分化条件で誘導され、組織マーカータンパク質発現により規格化された分化細胞であれば、細胞密度などの培養条件を整えることで薬理実験の結果に再現性があることが確認された。

4-1-2. 実験プロトコルの標準化について

評価指標を決定したあとは、その指標を評価するための実験プロトコルを標準化する。同じ方法で多施設での実験結果を比較することにより、実験結果の再現性に関わるさまざまな要因が明らかとなった。

4-2. ヒトiPS細胞由来神経細胞を用いた試験法の確立

神経細胞の場合には、ATP、グルタミン酸、高カリウム液、ピクロトキシンを投与し、これらの刺激による細胞内カルシウム濃度変化を指標として、分化誘導後の培養日数と応答性の変化を調べ、シナプス後部の受容体機能の発現をしらべる実験をおこなった。シナプス後部の機能的な受容体発現において両株は全く異なる特性を持つことが明らかとなった。また、免疫組織化学を行い、シナプス後部マーカータンパク質である、PSD95と、シナプス前部のマーカータンパク質であるsynapsin Iの局在を解析した。これも、細胞株により分布が異なることが明らかとなった。

iPS株間での違いはあるものの、同一株であれば、再現性は得られるのであれば、試験法としての確立が可能である。ただし、今回の株間での相違が大元のiPS細胞

株間の違いに由来するものか、Neurosphere間の違いに由来するものかの判定はできておらず、現段階では、長期培養を擁することや安定した薬理学的特性が得られにくいいため、Neurosphere から各研究施設で神経細胞を分化誘導する試験系を確立することは困難であると判断された。

4-3. ヒトiPS細胞由来心筋細胞を用いた試験法の確立

複数のES/iPS細胞株における心筋分化能の評価を行い、細胞株における分化指向性の違いがあることが明らかになった。iPS細胞からの安定した高効率な大量培養系の開発が必須である。今後さらに心臓組織により近い遺伝子発現プロファイルを示す心筋細胞の作製を目指すことが重要であると考えられた。

プロトコルの標準化のたたき台となる実験方法として、標本は細胞シートを用いること、測定系には多点電極システムによる細胞外電位記録を採用した。プロトコルの標準化には、技術的な容易さも重要なファクターである。細胞内電位記録は技術習得が難しいことから、細胞外電位記録を採用した。また、個々の細胞の電気特性をそろえるためにある密度で心筋細胞培養するとギャップジャンクションを形成して、電気的特性が平均化されることから、細胞シートからの細胞外電位記録を行うこととした。そのためには、品質がそろった心筋細胞が大量に必要であるため、我々はまず市販のヒトiPS細胞あるいはES細胞由来の分化心筋細胞の調査を行った。iCell心筋が国内外でもっとも流通しており、これらを用いた薬理実験が多く行われていたので、この細胞を用いてプロトコルの整備を行った。その結果、陽性対照物質によるQT延長を確認でき、多施設間でデータを比較できる標準的試験プロトコルを開発することに成功した。

4-4. ヒトiPS細胞由来肝実質細胞を用いた試験法の確立

分化肝実質細胞を実用化するためには、薬物代謝酵素の活性が十分に得られていることが必須となる。現時点で我々が入手して予備的な計測実験を行ったところ、安定した酵素活性を確認することができなかった。実験毎に分化誘導しているため、再現性の確認が難しい。まず分化細胞の供給の問題を克服しない限り試験法としてプロトコルを整備することが難しい。

4-5. 成果の今後の活用

本研究で得られた成果は、主催したシンポジウムや、日本毒性学会、米国Health and Environmental Science Instituteでのワークショップ、また各分野の国内学会・

国際学会での研究発表により、関連業界の研究者に情報提供した。特に日本安全性薬理研究会では、研究会幹事を通じて関連企業に対して試験技術導入に関する希望を募った。標準化された試験プロトコルの公定化には、多施設が参加するバリデーション研究が必須であるので、同一プロトコルで薬理試験を行うことのできる研究施設を増やす必要がある。現在、複数の関連企業から技術導入の希望があり、研修などによる技術移植を予定している。また、平成25年度から開始される日本製薬工業協会医薬品評価委員会 基礎研究部会タスクフォース5 (TF-5)『ヒトiPS細胞応用安全性評価』の研究アドバイスを進めていく予定である。また、当該タスクフォースでは、心筋、神経、肝臓を対象とした医薬品の安全性評価にヒトiPS細胞由来分化細胞が利用出来るかどうかを検討する目的で平成25年度秋にコンソーシアムを立ち上げる計画である。このコンソーシアムに関しても研究アドバイスを進める。さらに、新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO) の「ヒト幹細胞産業応用促進基盤技術開発/ヒトiPS細胞等幹細胞を用いた創薬スクリーニングシステムの開発プロジェクト」に対して、我々が標準化した分化心筋用の実験プロトコルを提供するなど協力的な体制を構築する。今後行われる複数の被験物質の選択などに関するアドバイスを進める。

5. 結論

ヒトiPS細胞分化細胞を用いた非臨床試験法を開発するためには、まずヒト有害反応の検出を可能とする評価指標を明確にする必要がある。分担研究において、現在入手可能な数種類のヒトiPS細胞由来心筋細胞、神経細胞、肝臓細胞を用いて予備的な薬理実験を行い、各分化細胞が獲得している細胞機能を評価した。神経細胞の場合にはシナプス形成とその機能成熟、心筋細胞の場合には集合活動電位記録とQT間隔、肝実質細胞の場合には薬物代謝酵素活性などを評価指標とすることとして実験プロトコルの整備にとりかかった。

ヒトiPS細胞由来神経細胞標本のシナプス機能成熟はもととなるiPS細胞株やNeurosphere株によって特徴が異なることが示唆された。また、ヒトES/iPS細胞株により組織細胞への分化指向性が異なることが心筋細胞への分化指向性を比較する研究から明らかとなった。iPS細胞株間の分化指向性の違いが、分化細胞の薬理学的特質の株間の差につながるかどうかは不明であるが、ヒトiPS細胞由来の分化細胞を用いた薬理試験法開発においては、少なくとも元となるiPS細胞株の違いに十分に留意する必要がある。

同一ヒトiPS細胞から同一条件で分化誘導されて同一の組織マーカータンパク質の発現などで規格化された心

筋細胞を用いた実験結果と、同一の神経細胞塊から分化誘導した神経細胞を用いた実験結果からは、分化細胞をなんらかの条件により規格化すれば、薬理学的特性はある程度の変動内に収まり、再現性の高い薬理試験結果が得られる可能性が示唆された。

肝細胞については、医薬品の有害反応を評価する際の項目として、細胞毒性、ミトコンドリア膜電位、細胞膜透過性、活性酸素、酸化ストレスは、acetaminophenの濃度依存的な変化をしめすことから、評価指標として有用である。入手可能なiPS細胞由来肝細胞をモデルとして、細胞機能の評価に着手した結果、現時点で提供されるiPS細胞由来肝細胞では十分に酵素活性が得られない場合が多く観察された。現時点では、肝細胞は実験毎に分化誘導して供給している状態であるため、実験結果の再現性にしての同一施設内または多施設間比較を可能にする分化細胞の供給の問題を解決する必要がある。

本研究では、ヒトiPS細胞由来神経細胞標本を用いてシナプス機能への有害反応評価を実現するため、標本が満たすべき基準およびそれを確認するための標準プロトコルを定め、実験の再現性を確認した。今後は、同一のプロトコルを多施設間で実施して同一の薬物への反応性の比較を行う必要がある。現在入手可能な複数の分化細胞以外にも利用可能な細胞が今後開発されることが予想され、標準プロトコルで複数の化合物に対するデータを収集して比較する作業が必須となる。そして、実験結果を収集し比較するための、研究プラットフォームを確立する必要がある。

引用文献

- 1) Nori, S. Okada, Y., Yasuda, A., Tsuji, O., Takahashi, Y., Kobayashi, Y., Fujiyoshi, K., Koike, M., Uchiyama, Y., Ikeda, E., Toyama, Y., Yamanaka, S., Nakamura, M. and Okano, H. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 4, 16825-30 (2011)
- 2) Shigemoto-Mogami, Y., Koizumi, S., Tsuda, M., Oh-sawa, K., Kohsaka, S. and Inoue, K. *J Neurochem.*, 78, 1339-49 (2001)
- 3) http://www.cellulardynamics.com/products/lit/CDI_iCell_Cardiomyocytes_DS-CM130102.pdf
- 4) Kamp, T.J. and January, C.T. *Drug Discovery Today: Disease Mechanism* 1,45-51 (2004)

Myosin II ATPase Activity Mediates the Long-Term Potentiation-Induced Exodus of Stable F-Actin Bound by Drebrin A from Dendritic Spines

Toshiyuki Mizui^{1,3}, Yuko Sekino^{1,2*}, Hiroyuki Yamazaki¹, Yuta Ishizuka¹, Hideto Takahashi^{1,†b}, Nobuhiko Kojima¹, Masami Kojima^{2,3}, Tomoaki Shirao^{1*}

1 Department of Neurobiology and Behavior, Gunma University Graduate School of Medicine, Maebashi, Gunma, Japan, **2** Core Research for Evolution Science and Technology, Japan Science and Technology Corporation, Kawaguchi, Saitama, Japan, **3** Bio-interface Research Group, Health Research Institute, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Ikeda, Osaka, Japan

Abstract

The neuronal actin-binding protein drebrin A forms a stable structure with F-actin in dendritic spines. NMDA receptor activation causes an exodus of F-actin bound by drebrin A (DA-actin) from dendritic spines, suggesting a pivotal role for DA-actin exodus in synaptic plasticity. We quantitatively assessed the extent of DA-actin localization to spines using the spine-dendrite ratio of drebrin A in cultured hippocampal neurons, and found that (1) chemical long-term potentiation (LTP) stimulation induces rapid DA-actin exodus and subsequent DA-actin re-entry in dendritic spines, (2) Ca^{2+} influx through NMDA receptors regulates the exodus and the basal accumulation of DA-actin, and (3) the DA-actin exodus is blocked by myosin II ATPase inhibitor, but is not blocked by myosin light chain kinase (MLCK) or Rho-associated kinase (ROCK) inhibitors. These results indicate that myosin II mediates the interaction between NMDA receptor activation and DA-actin exodus in LTP induction. Furthermore, myosin II seems to be activated by a rapid actin-linked mechanism rather than slow MLC phosphorylation. Thus the myosin-II mediated DA-actin exodus might be an initial event in LTP induction, triggering actin polymerization and spine enlargement.

Citation: Mizui T, Sekino Y, Yamazaki H, Ishizuka Y, Takahashi H, et al. (2014) Myosin II ATPase Activity Mediates the Long-Term Potentiation-Induced Exodus of Stable F-Actin Bound by Drebrin A from Dendritic Spines. PLoS ONE 9(1): e85367. doi:10.1371/journal.pone.0085367

Editor: Makoto Sato, Osaka University Graduate School of Medicine, Japan

Received: September 30, 2013; **Accepted:** November 25, 2013; **Published:** January 22, 2014

Copyright: © 2014 Mizui et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by Grants-in-Aid for Scientific Research (16300117, 19200029) and on Priority Areas - Elucidation of neural network function in the brain - from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan (20021002). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: yukos@nihs.go.jp (YS); tshirao@gunma-u.ac.jp (TS)

†a Current address: Division of Pharmacology, National Institute of Health Sciences, Setagaya-ku, Tokyo, Japan

†b Current address: Institut de recherches cliniques de Montréal (IRCM), Université de Montréal (UdeM), Québec, Canada

Introduction

Drebrin A is a neuron-specific actin-binding protein that is located at the base of dendritic spine heads [1–3]. Drebrin A binding modifies the pitch of actin filaments [4–5] and forms stable F-actin that is resistant to depolymerization by cytochalasin D [6–7]. Mikati *et al.* [8] have recently shown that F-actin that is bound by drebrin A (DA-actin) is stable, and the depolymerization of DA-actin is suppressed at both ends of the filaments. In developing neurons, DA-actin is not observed in dynamic dendritic filopodia, but is observed in more stable dendritic spines [9]. Furthermore, DA-actin is suitable for the formation of a stable higher-order F-actin structure (DA-actin complex), because drebrin A has two F-actin-binding domains that can act cooperatively to enable interfilament interactions [10]. Together, it is suggested that DA-actin forms stable structures of F-actin at the base of dendritic spine heads.

Dendritic spines at rest contain a dynamic F-actin pool that shows quick treadmilling, and a stable pool that shows slow treadmilling. The dynamic pool is observed at the tip of the spine head, whereas the stable pool is located at the base of the spine head [11]. The aforementioned stability and localization of DA-

actin suggest that DA-actin is a major component of the stable F-actin pool in dendritic spines, whereas F-actin that is not bound by drebrin A (non-DA-actin) is a major component of the dynamic F-actin pool (for review, see Shirao and Gonzalez-Billault [12]).

We have previously shown that NMDA receptor activation induces the loss of drebrin A from dendritic spines [13]. Because our previous biochemical analyses revealed that most drebrin A in neurons is bound to F-actin (for a review, see Sekino *et al.* [14]), we can extrapolate DA-actin localization from drebrin immunostaining images. Furthermore, fluorescence recovery after photobleaching analysis has demonstrated that drebrin A dynamics in spines are far slower than those of monomeric proteins such as monomeric actin [15] and cortactin [16], indicating that drebrin A remains bound to F-actin even when drebrin A dynamically changes its localization [17]. Together, it is suggested that NMDA receptor activation induces the DA-actin exodus from dendritic spines. However, the mechanism by which NMDA receptor activation links to the DA-actin exodus remains to be elucidated.

It has recently been reported that myosin II ATPase activity is necessary for actin reorganization during long-term potentiation (LTP) induction [18]. We have previously shown that myosin II is

contained in the DA-actin complex [19], but the interaction between myosin II and DA-actin is suppressed in the DA-actin complex [20]. The release of the actomyosin interaction leads to the activation of myosin II ATPase, resulting in reorganization of the actin cytoskeleton through severing of F-actin [21]. Therefore, LTP stimulation might disinhibit the suppressed actomyosin interaction, resulting in the activation of myosin II ATPase.

In this study, we quantitatively assessed the extent to which DA-actin localizes to dendritic spines, clarified DA-actin migration in the context of synaptic plasticity and examined whether myosin II mediates the interaction between NMDA receptor activation and DA-actin exodus.

Materials and Methods

All animal experiments were performed with the permission of the Animal Care and Experimentation Committee, Gunma University, Showa Campus (Maebashi, Japan). All efforts were made to minimize animal suffering and reduce the number of animals used in this study.

Reagents

4-aminopyridine (4-AP) and pyruvate were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). Hexahydro-1-[5-iodo-1-naphthalenyl] sulfonyl-1*H*-1,4-diazepine hydrochloride (ML-7) and (S)-(+)-2-Methyl-1-[4-methyl-5-isoquinolyl]sulfonyl-hexahydro-1*H*-1,4-diazepine dihydrochloride (H-1152) were purchased from Calbiochem (San Diego, CA, USA). Ethyleneglycol-*bis* [β -aminoethyl]-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid (EGTA) was purchased from Dojin (Kumamoto, Japan). Tetrodotoxin (TTX) was purchased from Wako (Osaka, Japan). D-(−)-2-amino-5-phosphopentanoic acid (APV), bicuculline, (S)-(-)-blebbistatin, (R)-(+)-blebbistatin, thapsigargin and nifedipine were purchased from Tocris (Ellisville, MO, USA).

Hippocampal neuron cultures

Timed pregnant Wistar rats (Charles River Laboratories Inc., Yokohama, Japan) were deeply anesthetized with diethyl ether and sacrificed by decapitation. Hippocampi were dissected from the fetuses at embryonic day 18. The hippocampal cells were prepared by trypsinization and mechanical dissociation according to previously described methods [9]. Briefly, the cell suspensions were plated at a density of 5000 cells/cm² on coverslips coated with poly-L-lysine (Sigma). Cells were incubated in Minimum Essential Medium (MEM; Invitrogen, San Diego, CA, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (Invitrogen), 0.6% glucose (Wako), and 1 mM pyruvate (Sigma). After the cells achieved attachment, the coverslips were transferred to a culture dish containing a glial monolayer and maintained in normal medium consisting of serum-free MEM, 2% B27 supplement (Invitrogen), 0.6% glucose, and 1 mM sodium pyruvate at 35.8°C in a humidified incubator with 5% CO₂ for 21 days *in vitro* (DIV). Cytosine β -D-arabino-furanoside (10 μ M; Sigma) was added to the cultures at 4 DIV to inhibit glial proliferation.

Pharmacological treatments

The chemical LTP (cLTP) stimulation solution used in this study was Mg²⁺-free Tyrode's solution supplemented with 200 μ M glycine, 20 μ M bicuculline, 1 μ M strychnine and 0.5 μ M TTX [22]. For cLTP induction, the neurons were preincubated in cLTP stimulation solution without 200 μ M glycine for 20 min, and then stimulated with glycine for the indicated amount of time.

For blocker experiments, the neurons were preincubated in medium supplemented with blocker for 30 min and then

stimulated with cLTP stimulation solution or 100 μ M glutamate in the presence of each blocker for the indicated amount of time. For the stimulation studies with 90 mM potassium chloride, the neurons were preincubated in Tyrode's solution (119 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 2 mM MgSO₄, 25 mM HEPES [pH 7.4], and 30 mM glucose).

Immunocytochemistry

After three weeks *in vitro*, cells were fixed in 4% paraformaldehyde with 0.1% glutaraldehyde in phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.4) at 4°C for 10 min. The fixed cells were permeabilized with 0.1% Triton X-100 in PBS for 3 min and then incubated in blocking solution (3% bovine serum albumin in PBS) for 1 h, followed by an overnight incubation with primary antibodies at 4°C. A monoclonal antibody against drebrin (clone M2F6, hybridoma supernatant [23]) was used at a 1:1 dilution. F-actin was detected with rhodamine-conjugated phalloidin (Molecular Probes, Eugene, OR, USA). After being washed with PBS for 30 min, the cells were incubated for 1 h at room temperature with secondary antibodies. Anti-mouse IgG antibodies conjugated to fluorescein (Cappel, West Chester, PA, USA) were used to detect the monoclonal antibodies against drebrin. After being washed with PBS, the cells were mounted on glass slides with Perma Fluor mounting medium (Thermo Shandon, Pittsburgh, PA, USA).

Labeling of surface GluR1 was performed according to previous reports [22,24] with minor modifications. Briefly, after the cLTP stimulation, surface GluR1 was labeled in live neurons by 30 min incubation with a rabbit polyclonal antibody against the N-terminus of the GluR1 subunit (PC246, 1:15 dilution in glial conditioned media; Calbiochem). After washout of the antibody with Hank's balanced salt solution, the neurons were fixed in 2% PFA for 20 min at 4°C without permeabilization. The surface receptors were visualized using a fluorescein-conjugated goat anti-rabbit secondary antibody (Cappel).

Fluorescence microscopy

All fluorescence images were obtained on a Zeiss Axioplan 2 microscope (Zeiss, Jena, Germany) equipped with a Cool Snap fx CCD camera (Photometrics, Tucson, AZ, USA), a 63 \times , 1.4 numerical aperture objective lens (Zeiss), and MetaMorph software (Universal Imaging, West Chester, PA, USA). A filter set (86000 Sedat Quad; Chroma, Brattleboro, VT, USA) was mounted in the excitation and emission filter wheels (Ludl Electronic Products, Hawthorne, NY, USA) of the microscope. All data were collected at 1300 \times 1030 resolution at 12 bits/pixel. A single pixel in the image corresponded to a 106 nm² area in the specimen plane. The images used for comparison in this study were collected under identical conditions. The captured fluorescence images were analyzed using the MetaMorph program. The GFP, rhodamine, and Cy5 signals were obtained through filters for FITC, Cy3, and Cy5, respectively. We found no fluorescence leakage of these signals through the other filters. The images presented in this study were prepared using Adobe Photoshop software (Adobe Systems, San Jose, CA, USA).

Plasmids and Transfection

Construction of the green fluorescent protein-tagged drebrin A (GFP-DA) has been described previously [25]. At 7 DIV, the hippocampal neurons were transfected with plasmids using a calcium phosphate coprecipitation protocol [26]. Two weeks after transfection, the transfected neurons were analyzed using time-lapse imaging.

Time-lapse imaging

Live time-lapse imaging was performed at 35.8°C on a Zeiss inverted microscope stage using a temperature-controlled chamber with continuous perfusion, as described previously [7]. Briefly, the cell cultures were mounted in a chamber containing Mg²⁺-free Tyrode's solution supplemented with 20 μM bicuculline, 1 μM strychnine and 0.5 μM TTX. The chamber was maintained and perfused with the same solution. The perfusing solution (1 ml/min) was switched between the control and cLTP stimulation medium using a hydraulic two-way valve switch with a dead space of 3.5 ml between the switch and the bath. Thus, the test medium would reach the chamber 210 sec after flipping the switch (data not shown). The time-lapse images were acquired at 10 sec intervals for 20 min using MetaMorph software.

Image analysis and quantification

All quantifications were performed by an observer who was blind to the experimental conditions, and the morphological analysis was performed using the MetaMorph software. Each experiment was repeated at least three times with independent neuronal preparations.

For quantification, spiny neurons with pyramidal morphology were selected from at least three separate cultures. In our hippocampal cultures, we have previously shown that pyramidal neurons are multipolar cells with a large soma and multiple thick dendritic processes [27]. Therefore, we considered that these multipolar cells were hippocampal pyramidal neurons. Although the hippocampal culture also contains a variety of interneurons, they are comparatively few in number and most are morphologically distinguishable in culture [28].

To measure the surface cluster density of GluR1, the number of GluR1 clusters was measured according to previously described methods [24,29] with minor modifications. Briefly, the surface GluR1 signals were thresholded with intensity at two-fold the dendritic background to mark surface clusters of GluR1 using MetaMorph software. The surface clusters were selected using the 'regions' tool and analyzed using the 'integrated morphometry' feature. Next, the length of the analyzed region on a dendrite was measured. The density of surface GluR1 clusters were obtained by dividing the number of surface GluR1 clusters within a selected dendritic region by the length of the dendrite (50–100 μm total dendritic length per neuron).

Calculation of the spine-dendrite ratio

The spine-dendrite ratio (SDR) used in this study was the average fluorescence signal of the molecule of interest in a dendritic spine head divided by the average fluorescence signal of that molecule in the dendritic shaft at the foot of the spine. To measure the SDR, a single dendrite located between the cell soma and the second branch point (30–80 μm total dendritic length per neuron) was selected from each neuron. The dendritic spines and the shaft in the selected region were outlined on the F-actin fluorescence images, and circles (0.26 μm²) were drawn at dendritic spine heads and at the foot of the spine in a dendritic shaft, using the 'ellipse region' tool of the MetaMorph software (Fig. 1A). Next, the average fluorescence intensity in each circle (calculated from the fluorescence signal intensity values) was measured using the 'region measurements' tool in the MetaMorph software. The number of spines measured were between 25 and 80 per neuron. The average SDR of spines per neuron was then calculated. The drebrin immunostaining and rhodamine-phalloidin signal intensity values were used to calculate the drebrin and F-actin SDRs, respectively.

Statistical analysis

The statistical analysis included a one-way ANOVA followed by a post hoc Scheffe's test. A Student's *t* test was performed for comparisons between control and drug-treated neurons. All data were presented as mean ± s.e.m. A *p* value of <0.01 was considered significant. The statistical analysis was performed using Microsoft Excel (Redmond, WA, USA).

Results

Quantitative assessment of DA-actin in dendritic spines

We used the spine-dendrite ratio (SDR) of drebrin immunostaining intensity to monitor the amounts of DA-actin in dendritic spines. We used the SDR of rhodamine-phalloidin staining intensity to assess the amount of total F-actin. The SDR used in this study is the average fluorescence signal of the molecule of interest in a dendritic spine head divided by the average fluorescence signal of that molecule in the dendritic shaft at the foot of the spine (Fig. 1A). The drebrin SDR of control cultured hippocampal neurons at 21 days *in vivo* (DIV) was 1.65 ± 0.03 (*n* = 170 cells), whereas the actin SDR was 1.67 ± 0.02 (*n* = 170 cells; Fig. 1B), demonstrating that both DA-actin and total F-actin accumulate more in the dendritic spines than the parent dendrites.

Chemical LTP stimulation induces a transient DA-actin exodus

Stimulation with chemical LTP (cLTP) solution for 3 min induced a significant increase in the glutamate receptor subunit 1 (GluR1) cluster density 30 min after treatment (Fig. 2). This increase was inhibited with 50 μM 2-amino-5-phosphonopentanoate (APV), an NMDA receptor blocker (Fig. 2). These data are consistent with an earlier study showing facilitated insertion of α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptors during cLTP [22].

We examined whether cLTP stimulation would induce DA-actin to exit dendritic spines. At 5 min after cLTP stimulation, the intensity of drebrin immunostaining in dendritic spines was weak, but after 30 min the intensity was similar to that in untreated cells (Fig. 3A). Quantitative analysis showed that both drebrin and actin SDRs were significantly lower at 5 min but recovered after 30 min (Fig. 3B).

To analyze the time course of the DA-actin migration, we transfected a GFP-drebrin A-expressing vector into cultured hippocampal neurons and performed time-lapse imaging. The GFP-drebrin A SDR was transiently decreased following cLTP stimulation, similar to that of the native drebrin A (Fig. 3C). The GFP-drebrin A SDR began to decrease immediately after the neurons were exposed to cLTP solution (arrow in Fig. 3D) and then further declined throughout the period of stimulation. When the stimulation medium was switched back to control medium, the SDR began to rise and returned to the control level in 11 min after the completion of cLTP stimulation (Fig. 3D).

cLTP-induced DA-actin exodus is dependent on myosin II activity

Neurons were pretreated with 100 μM (S)-(-)-blebbistatin (ABL, the active form of blebbistatin), a myosin II ATPase blocker, for 30 min [30]. In the presence of ABL, cLTP stimulation did not affect the localization of either drebrin or actin in dendritic spines (photomicrographs in Fig. 4), and failed to decrease the drebrin and actin SDRs (*n* = 30 cells; *p* = 0.97 for drebrin SDR at 5 min, *p* = 0.34 for actin SDR; Student's *t* test; graphs in Fig. 4). This result indicates that myosin II activity is involved in the DA-actin

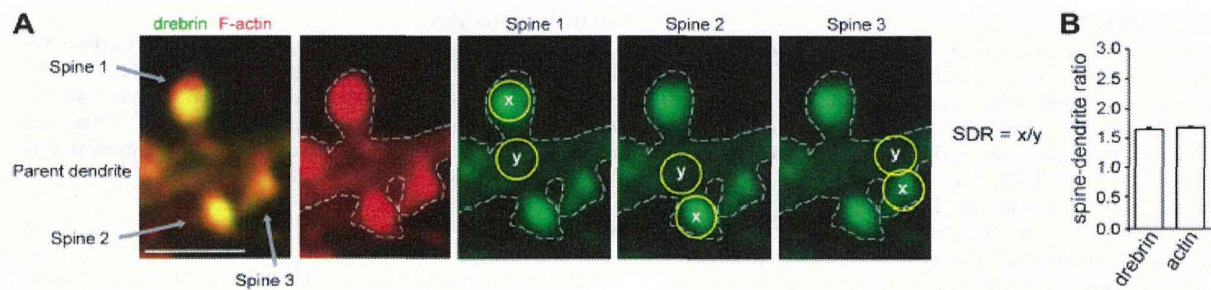


Figure 1. Spine-dendrite ratios of drebrin and actin. (A) Fluorescence images of drebrin (green) and F-actin (red) in control hippocampal neurons. The dendritic spines and the parent dendrite in the selected region were outlined on the F-actin fluorescence images (white dotted lines). Scale bar, 2 μm . Circles ($0.26 \mu\text{m}^2$, yellow) were drawn at the spine head and at the parent dendrite, and the average fluorescence intensities within the circles were measured. The SDR of each spine was obtained by dividing the average intensity of the dendritic spine by that of the parent dendrite. (B) The SDR per neuron was obtained as the average SDR of the spines. Bar graph shows the drebrin and actin SDRs of 21-DIV hippocampal neurons ($n = 170$ cells). Error bars represent s.e.m. doi:10.1371/journal.pone.0085367.g001

exodus. The inactive form of blebbistatin (iBL), a control. In the presence of iBL, cLTP stimulation significantly decreased the drebrin and actin SDRs.

Various kinds of stimulation induce DA-actin exodus

We stimulated cultured hippocampal neurons with $100 \mu\text{M}$ glutamate for 10 min, and fixed them immediately after the stimulation. This treatment induced the loss of drebrin and F-actin from dendritic spines (photomicrographs in Fig. 5A). On the other hand, it did not affect the density of spines or presynaptic terminals (Fig. S1). Quantitative analyses showed significant reductions in both the drebrin and actin SDRs (graphs in Fig. 5A).

We then examined whether other kinds of excitatory stimulation affect DA-actin localization. Increased spontaneous firing rates resulting from a 30-minute application of $50 \mu\text{M}$ bicuculline, a GABA_A receptor blocker, combined with $500 \mu\text{M}$ 4-aminopyr-

idine, a potassium channel blocker [31], induced a loss of drebrin and F-actin from dendritic spines (photomicrographs in Fig. 5B). A similar decrease was induced by membrane depolarization resulting from a 5-minute application of 90mM KCl (photomicrographs in Fig. 5C). Quantitative analyses showed that both treatments significantly decreased the drebrin and actin SDRs (graphs in Fig. 5B, C). These data indicate that in addition to cLTP stimulation, various kinds of excitatory stimulation induce a DA-actin exodus.

Localization of DA-actin and non-DA-actin is differentially regulated by glutamate receptor subtypes

We examined the effect of APV on DA-actin and total F-actin levels in dendritic spines. In the presence of $50 \mu\text{M}$ APV, drebrin and F-actin were localized at dendritic spines, and this localization was not changed by glutamate stimulation (photomicrographs in Fig. 6A).

However, quantitative analysis showed that the treatment of neurons with APV for 30 min resulted in significant increases in both drebrin and actin SDRs relative to controls. Interestingly, the increase in actin SDR (ca. 130% of control) is smaller than that of the drebrin SDR (ca. 180% of control; Fig. 6A). This indicates that NMDA receptor activity affects the basal accumulation level of DA-actin in dendritic spines more strongly than that of non-DA-actin. If non-DA-actin is not at all affected by APV, the above data suggest that about 40% of total F-actin is DA-actin. Furthermore, in the presence of APV, glutamate stimulation failed to decrease the drebrin SDR but did decrease the actin SDR (Fig. 6A). The disparity between drebrin and actin SDRs indicates that glutamate stimulation decreases the non-DA-actin even in the presence of APV.

Together, it is suggested that the NMDA receptor mediates both the glutamate-induced DA-actin exodus and the basal accumulation of DA-actin in dendritic spines, whereas glutamate receptor subtypes other than the NMDA receptor, such as AMPA or metabotropic glutamate receptors, mediate the non-DA-actin exodus.

The DA-actin exodus is not regulated by voltage-dependent Ca^{2+} channels or intracellular Ca^{2+} stores

Because NMDA receptor activation leads to Ca^{2+} influx, we examined whether Ca^{2+} regulates the DA-actin distribution. When extracellular Ca^{2+} was chelated by 20mM ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA), the localization pattern of drebrin and F-

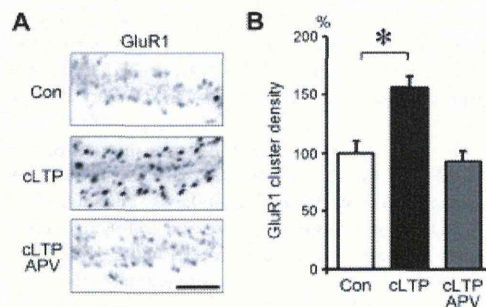


Figure 2. Increase in surface GluR1 immunostaining after chemical LTP (cLTP) stimulation. Neurons (21 DIV) were stimulated with buffer containing $0 \mu\text{M}$ Mg^{2+} , $200 \mu\text{M}$ glycine, $20 \mu\text{M}$ bicuculline, $1 \mu\text{M}$ strychnine and $0.5 \mu\text{M}$ TTX (cLTP stimulation) for 3 min. (A) Surface GluR1 was labeled before the stimulation (top panel; Con) or 30 min after the stimulation (middle panel; cLTP). Note that cLTP stimulation remarkably increased surface GluR1 immunostaining. The increase was completely blocked by APV (bottom panel; cLTP APV). Scale bar, $7 \mu\text{m}$. (B) Quantitative analysis of surface GluR1 cluster density along dendrites. Data are expressed as percentages relative to the average of control neurons. In the absence of APV, cLTP stimulation significantly increased the density of surface GluR1 clusters ($n = 21$ cells; $p < 0.01$, Scheffe's test). In contrast, in the presence of APV, no increase in surface GluR1 cluster density was observed following cLTP stimulation (cLTP APV). Error bars represent s.e.m. doi:10.1371/journal.pone.0085367.g002