

神経細胞機能の可視化技術

Visualization Technologies of Neuronal Functions

岡 部 繁 男

Shigeo Okabe

東京大学大学院医学系研究科神経細胞生物学分野

要 旨 神経細胞は膨大な数のシナプス結合を脳内で形成し、認知・学習・行動などの脳機能を実現している。シナプスは特殊な細胞間接着装置であり、蛋白質分子が集積することで構造を分化させ、神経伝達物質の放出と受容体への結合による活性化を通して神経細胞間の情報伝達の基盤となる。シナプスに集積する分子には受容体、足場蛋白質、細胞内情報伝達分子など多種類が知られており、これらの分子のシナプス輸送、局所での構造への組み込み、更に安定化のメカニズムについての情報が機能の理解には必須である。光学顕微鏡を用いたシナプス分子の動態解析により、シナプスが形成される過程とその維持のメカニズム、さらにシナプス活動による分子の局在や機能の変化についての情報が蓄積されてきた。本論文では GFP との融合シナプス分子の生きた神経細胞内での可視化技術を利用して得られたシナプスの形成・リモデリングに関する知見を紹介する。

キーワード：蛍光蛋白質、二光子顕微鏡、シナプス、一分子イメージング

1. はじめに

神経細胞の主要な機能は情報の一方向性の伝達であり、この目的のために神経細胞間にはシナプスと呼ばれる特殊な細胞間接着装置が発達する。哺乳類の大脳皮質においてはシナプスの密度は生後早期に急激に増加し、げっ歯類では生後1か月でその密度が最大となり、以降は漸減する¹⁾。ヒトの大脳皮質ではシナプス密度は10歳頃まで増加し続け、その後安定期を経てから漸減すると考えられている²⁾。時間のスケールは異なるが、動物種を超えてシナプス密度は生後早期に急激に増加し、成熟後には一転して長期に亘って漸減する時期に入ると考えられる。シナプス密度の急激な増加が終了する時期は、いわゆる「臨界期」と呼ばれる脳の可塑性が終了する時期とも近接しているが、両者に共通する回路レベルでの性質の変化については未だ不明である。さらに自閉症を初めとする発達障害や、統合失調症などの精神疾患が発症する時期も、シナプス密度の増加・安定化・漸減のパターンの移行期に対応しているため、シナプスの動的な変化と精神疾患の間にも何らかの関係性がある可能性も存在し、現在多くの研究者が注目している^{3,4)}。

10年ほど前までは、顕微鏡を用いてシナプス形成過程を可視化し、更にシナプス内部の分子動態を顕微鏡により定量解析することは技術的な制約により不可能であった。近年の蛍光プローブの進歩と光学顕微鏡技術の進展により、従来で

は観察および解析が不可能とされていたサブミクロン・オーダーでの形態解析・分子動態解析が生きた神経細胞、更には個体組織内で可能となり、多くの知見が急速に得られつつある⁵⁾。本総説では筆者のこれまでの研究内容の紹介を中心として、過去10年のシナプス可視化技術の進展とそれによって明らかにされつつある新しい神経回路の形成とリモデリングの原理について概説する。

2. シナプス足場蛋白質を利用したシナプス形成過程のライブ・イメージング

シナプス形成の可視化には、シナプスを構成する分子を探索し、その分子機能についての情報を得ることが前提となる。中枢神経シナプスを構成する蛋白質分子については、古典的な生化学的精製が1970年代から進められてきたが、効率が悪く分子構築の全体像を理解することはこの方法のみでは不可能であった。1980年代に入り、酵母を用いた yeast two-hybrid 法がシナプス蛋白質のスクリーニングに応用され、シナプス分子、特にシナプス後部の主要な構造物であるシナプス後肥厚部 (PSD) に存在する分子群の理解が飛躍的に進んだ⁶⁾。特に yeast two-hybrid 法は蛋白質間相互作用を基盤としたスクリーニング手法であるため、PSD 内部での分子間のつながりについても、データに基づいたモデルを同時に構築できるようになった点は大きな進展であった。これらの PSD 分子の中で、足場蛋白質 (scaffolding proteins) と呼ばれる一群の分子に筆者は注目した⁷⁾。シナプス後部の主要な機能はシナプス前部から開口放出される神経伝達物質 (中枢の興奮性シナプスではグルタミン酸) をシナプス後部膜に存在する伝達物質受容体で感知し、その情報を細胞質に伝達す

〒113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1
TEL: 03-5841-1928; FAX: 03-5841-1930
E-mail: okabe@m.u-tokyo.ac.jp
2010年12月4日受付

ることにある。その意味ではシナプス後部に存在する最も重要な分子は中枢の興奮性シナプスではグルタミン酸受容体ということになる。一方でこれらの膜受容体は決して単独ではシナプス後部膜に集積することは出来ず、シナプス後部の膜を裏打ちする足場蛋白質がこれらの受容体と結合することが必要である。従って足場蛋白質はシナプス構造の基本骨格を形成し、かつ受容体の局所への集積を実現するという点でシナプス後部構造の中心となる分子である。特に足場蛋白質の中でも、PSD-95 と呼ばれる分子は主要な二種類のグルタミン酸受容体である AMPA 受容体および NMDA 受容体と (NMDA 受容体とは直接に、また AMPA 受容体とは TARP と呼ばれる受容体の補助サブユニットを介して間接的に) 結合し、さらに他の足場蛋白質とも結合する能力を持つ点で、特に機能的に重要と考えられた⁸⁾。筆者は PSD-95 分子の局在を生きた神経細胞において直接可視化することにより、神経回路の形成に伴うシナプスリモデリングの過程がどのような原理により進行するのか、という疑問に直接的な答えを得ることを目的として実験を行った。

我々がシナプス可視化の実験を開始した時期は、下村修先生により発見されたオワンクラゲ由来の蛍光蛋白質 GFP⁹⁾ がようやくライブイメージングに応用され始めた時期であった¹⁰⁾。それまで、神経細胞内で起こる現象を蛍光顕微鏡で検出するには、脳蛋白質を精製して化学的方法により蛍光色素を標識し、更に標識蛋白質を細胞内にマイクロインジェクションするという非常に労力がかかり効率の悪い方法を用いる以外には道がなかったが¹¹⁾、GFP を直接目的蛋白質にラベルし、神経細胞に発現させることで、樹状突起上に存在する PSD 一個一個を鮮明に画像化することが可能となった。更にこのような可視化技術と生細胞を顕微鏡ステージ上で長時間培養する技術を組み合わせることで、神経細胞の突起上

で新たに形成されるシナプスについて、その形成速度、寿命、消失速度、などのパラメーターを単一シナプスのレベルで取得し、解析することが出来た (図 1)¹²⁾。

筆者らによるライブセル・イメージングの実験以前は、固定標本のシナプス蛋白質の免疫染色のデータから、神経細胞の成熟に伴って、シナプスはゆっくりと形成され成熟する、というモデルが教科書にも掲載されていた。実際に培養神経細胞において突起上のシナプス密度を計測し、プロットすると、一週間での密度の上昇はせいぜい二倍程度であり、個々のシナプスがゆっくりと形成され、シナプスは形成されてしまうと安定で、壊れることはない、というモデルによく一致するように見える¹³⁾。我々もこの定説に従い、おそらく一旦形成されたシナプスは安定と考えられるので、まず二週間程度培養して神経細胞がかなり成熟した状態でのタイムラプス観察を対照実験のつもりで行った。ところが実際の画像を観察すると、全体としてのシナプス密度の増加はそれほど大きくなくても、同じ細胞を 24 時間間隔で観察するとおよそ 2 割程度のシナプス・PSD が消失し、ほぼそれと同数のシナプス・PSD が新たに形成されていることが明らかになった¹⁴⁾。この結果を素直に解釈すれば、シナプス総数の増加としてはわずかであっても、その間に新たに付け加わり、また消失するシナプスの数ははるかに多い、という事になる。シナプス密度がゆっくりと増加する理由は、形成・消失の速度がほぼ拮抗している事に由来していたのであった。

このような PSD-95 を蛍光プローブとして得られた結果は、他の足場蛋白質を利用した実験においても確認され^{15,16)}、更に興奮性シナプスの形態学的なマーカーであるスパイン (神経細胞の突起の一種である樹状突起の表面に伸び出す棘状の構造) を指標とした場合にも PSD-95 の集積が開始するのとほぼ同じ時間経過でスパイン形成が引き起こされ

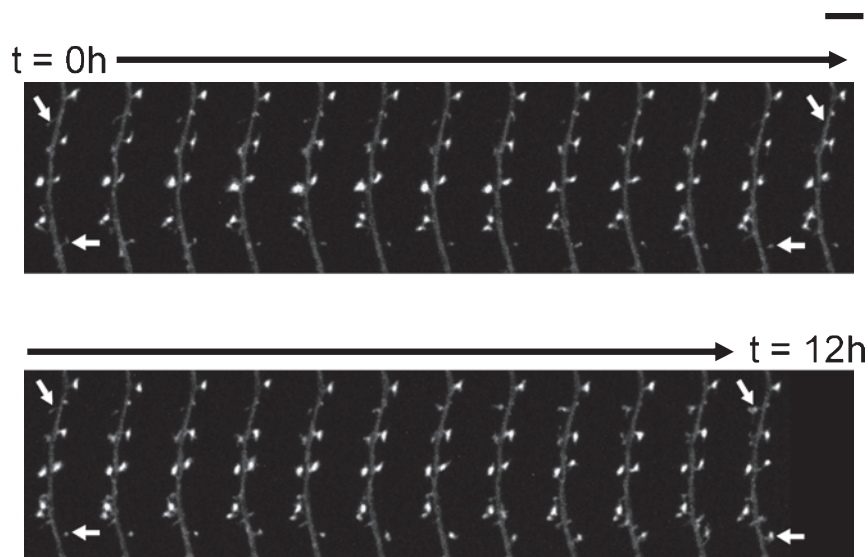


図 1 PSD 形成過程のタイムラプスイメージング

Homer1c-GFP を発現する培養海馬神経細胞の 12 時間のタイムラプスイメージング画像を示す。矢印は新しく形成された PSD 構造。Bar = 5 μ m

ることがわかった¹⁷⁾。更にシナプス後部だけではなく、伝達物質を放出する構造であるシナプス前部の形成過程をシナプス小胞蛋白質である synaptophysin に蛍光蛋白質を融合した分子を利用して観察した場合にも、PSD-95 のシナプス後部への集積と synaptophysin のシナプス前部への集積がほぼ同時進行で引き起こされることを確認した¹⁷⁾。以上の実験は、PSD、スパイン、シナプス前部、という三つの主要なシナプスの構成要素が数時間という短い時間幅において一気に出来る事を示しており、前述した 24 時間で形成される多くの新しいシナプス構造はこのような急激な形成過程を経て出来る上がっていることが明らかとなった。

それではシナプスは何故このように無駄に多く形成され、その中の少数のシナプスだけが選択的に安定化されて生き残るのであろうか。この疑問に対して直接的に答える研究は少ないが、シナプスの形成が基本的に確率的な現象であり、形成直後のシナプスはその形態が小さく、より消失しやすく、時間が経過するに従って自発的にその形態および分子集積が成長し、安定化されていく、とするモデルが最近提唱され¹⁸⁾、我々の実験結果にもよく一致すると考えられる。シナプスの形成は数時間で終結する速い現象であるが、一旦形成された構造が成長し安定化するには長い時間がかかる、という考え方は、記憶は経験後、短時間は維持されるが、その大部分は失われ、一部の情動を伴う経験や繰り返し想起された経験が長期的には安定化される、という心理学な知見にも対応する。両者の関連性についてより厳密な実験を行うことが今後の課題であらう。

3. 単一シナプス内に存在する PSD 蛋白質の絶対数の推定

細胞内の多くの構造は蛋白質複合体からなる分子機械とも捉えることが出来る。単一蛋白質の繰り返し構造を持つ、細胞骨格系のようなシステムでは分子数と構造を対応付けることは比較的容易であるが、PSD のような 200 種類以上の分子が複雑なネットワークを形成する構造について、1 個の PSD 内に何個の分子が存在するのかを推定することは難しい。一方でこのような定量的なデータを持たずに、PSD の基本構造を議論することは不可能であり、例えば PSD 構造 1 個あたり平均 5 個しか存在しない分子に構造的な機能を推定することは無謀であらう。蛍光蛋白質は分子数の推定を行う上でもきわめて有用な道具である。1 個の GFP 分子に由来する蛍光量（厳密には単位時間あたりの放出光子数）をものさしとして、PSD 構造内部に何個の GFP 融合分子が存在するのかを推定することが可能であり、この推定量を元にして、内在性の PSD 足場蛋白質の絶対数も推定できる。この手法を実現するために、全反射顕微鏡を用いて精製した GFP 分子 1 個に由来する蛍光量を定量し、蛍光ビーズの出す蛍光との比較を行った。その結果直径 100 nm の蛍光ビーズは平均およそ GFP 3700 個に対応する蛍光量を持つことがわかった。次に PSD-95-GFP を発現する神経細胞が存在する基質上にキャリブレーションした蛍光ビーズを適当な密度で撒き、

PSD とビーズの両者を同時にイメージングし、蛍光量の比率を測定した（図 2）。この比率から、「シナプス内に存在する蛍光を発する GFP 分子の絶対数」を計算することができる。更に「発現している GFP の中で、蛍光を出さず分子と変性して蛍光を出さない分子の比率」、「遺伝子導入によって外から加えられた GFP 融合 PSD-95 分子と内在性の PSD-95 分子の比率」という二つのパラメーターを測定・計算することで、最終的には内在性の PSD-95 分子がシナプス一個あたり何個存在するのか、という基本的な量を決定することが出来た。得られた結果は、シナプスに存在し、基本骨格を形成すると考えられる 4 種類の足場蛋白質（PSD-95, GKAP, Shank, Homer）に関して、およそ 100-500 個の分子が絶対数として PSD1 個あたり存在することを示していた¹⁹⁾。これら 4 種類の足場蛋白質が相互に 1 対 1 のモル比で結合することが試験管内での再構成実験で確認されていることと組み合わせると、生体内においても足場蛋白質が 1 対 1 のモル比で結合して足場となる基本骨格を形成していることを強く示唆する。

PSD に存在する分子の絶対数の情報は、更に PSD 全体の蛋白質構成と関連付けて議論する必要がある。1 個の PSD は平均的なサイズとして直径 400 nm、厚さ 60 nm の円板として近似できるので、その体積を計算すると、 $7.5 \times 10^{-12} \text{ mm}^3$ となる。細胞内の蛋白質濃度はおよそ 100 mg/ml と推定されており、PSD 構造内の蛋白質濃度は一般の細胞質よりも高いと考えられるが、とりあえず同じであると仮定して総蛋白

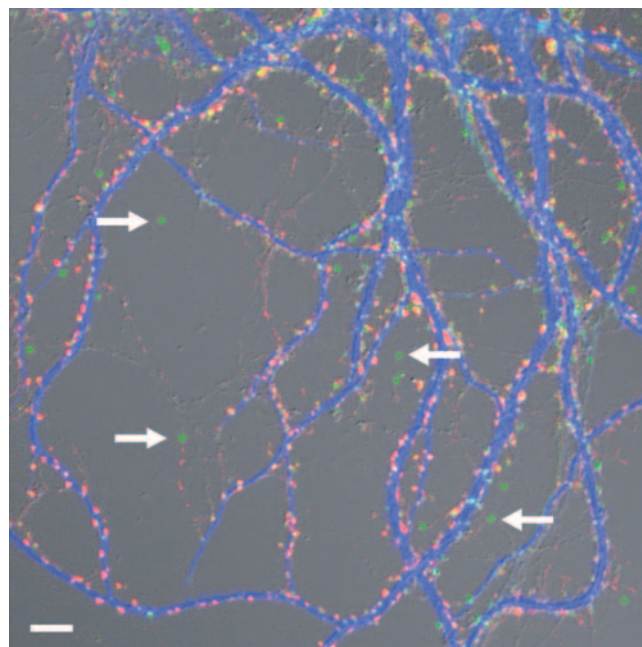


図 2 PSD 分子数の定量に用いた多重染色標本
培養海馬神経細胞に PSD-95-GFP（緑）を発現させ、抗 MAP2 抗体（青）、抗シナプシン I 抗体（赤）で染色後、蛍光量をキャリブレーションした蛍光ビーズ（矢印）を基質上に撒いた。蛍光ビーズの蛍光量と単一シナプス由来の GFP の蛍光量を比較して、シナプスに存在する PSD-95-GFP 分子の数を推定する。
Bar = 5 μm

質量を計算すると、 7.5×10^{-13} mg (450 MDa) となる。従って PSD1 個に対応する総蛋白質量の低めの推定値は 450 MDa である。更に具体的な実験として、STEM (Scanning Transmission Electron Microscopy) を利用して既に質量の知られているタバコモザイクウィルスの粒子と PSD の質量を比較する実験が行われ、単一の PSD の質量が 1100 MDa と推定された²⁰⁾。この値は体積からの推定値のおよそ二倍の値であり、理論的に考えても妥当なものである。この 1100 MDa という数値を、前述の 4 種類の足場蛋白質の絶対数と比較して考えてみると、足場蛋白質 4 種類の質量の合計が 120 MDa となり、このことから PSD 質量の 10% を 4 種類の足場蛋白質のみで占めていることがわかる。これまでに知られている PSD 構成分子の数はおよそ 400-500 種類と報告されており、非常に多種類の構成蛋白質の中でたった 4 種類の足場分子が総質量の 10% を占めている、という結果はこれらの分子の構造蛋白質としての重要性を明確に示している²¹⁾。

4. 個体レベルでのシナプス動態の観察

培養細胞系でのシナプス動態観察の結果から、幼弱なシナプスの形成は急速におこり、かつ過剰に形成されたシナプスはその後に大部分が除去され、一部のシナプスのみが選択的に安定化され、生き残るというモデルを提唱した。このような過剰形成されたシナプスが選択的な安定化を受けて少数が生き残る、という変化は、一般的にはシナプスの刈り込みと呼ばれ、特に神経筋接合部や小脳の登上線維・プルキンエ細胞間のシナプスにおいて典型的に観察される。大脳皮質の興奮性シナプスを形成する主要な細胞である錐体細胞の樹状突起スパインに関して、このような「過剰形成から刈り込み」という原則が成立するのか、また大脳皮質の発達、成熟、老化に伴ってシナプス動態がどのように変化していくのか、という点についてはこれまでは解析の手法がなく、研究の進展が見られなかった。近年、二光子励起顕微鏡を利用することによって、個体レベルでのシナプス動態の解析が可能となり、様々な行動実験や疾患モデルとの組み合わせにより、有用な情報が得られるようになった²²⁾。二光子励起は二つの光子が蛍光分子に同時に吸収されることにより、エネルギーの低い長波長の光（実際には 700-1000 nm の近赤外光）によって、青から赤の波長領域の（エネルギーの高い）光子を蛍光分子から叩き出せる、という発見をその基礎としており、生物顕微鏡への応用は、フェムト秒レーザーが高出力で安定して発振するようになった、という技術的な進歩に依存している。レーザー出力をパルス化する技術によって、非常に短い時間（およそ 100 フェムト秒 = 10^{-13} 秒）に集中して、高い光子密度で試料に光を照射することが可能となり、本来確率的には非常に起こりにくい現象である二光子励起現象を効率良く起こさせることが可能となった。二光子励起現象を基盤とした顕微鏡には二つの利点がある。まず二光子励起の確率が光密度の二乗に比例する非線形現象であるため、光密度が高くなる対物レンズの焦点近傍においてのみ、蛍光分子が励起され

る。従ってレンズの点像分布関数 (Point Spread Function; PSF) に対応した、非常に限局した体積の内部で蛍光分子の励起を起し、局所からのシグナルを効率よく検出することが可能である。共焦点顕微鏡で断層像を得るために必要とされる検出器の前に置かれるピンホールは必要ではない。組織内で屈折・散乱する光子を効率よく検出する目的において、ピンホールが必要ないという事はシグナル強度を向上させる大きな要素となる。二番目に、蛍光分子を励起する波長が組織内での散乱が少ない近赤外光であるため、可視光を利用する場合に比較して、より組織深部に存在する蛍光分子の励起効率が上昇する。この二つの特徴が相乗的な効果を生んで、個体レベルでの組織深部からの蛍光シグナルの取得には、二光子励起顕微鏡を利用した画像取得が従来手法に比較して圧倒的に有利であることが明らかとなった²³⁾。

このような顕微鏡のハードウェアの開発に加えて、動物側の実験条件の最適化も重要な課題である。脳内のシナプス構造を解析するには、頭蓋骨の手術により光が透過する窓を形成し、この窓を介して二光子励起像を取得することになる。これまでの研究により、光を透過する窓の形成には、骨を除去してしまう open skull 法と²⁴⁾、骨を削って 40 ミクロン程度の厚さにし、この骨の層を介して二光子励起像を取得する thinned skull 法²⁵⁾ の二種類の方法が考案されている。この二つの手法にはそれぞれメリットとデメリットが存在するため、その特長と問題点を認識した上で、実験の目的に応じて適切な手法を選択する、というのが現実的な対応であろう。我々の研究室でも二光子顕微鏡によるシナプス構造の解析を、まずスライス培養系に適用することから開始し、シナプス前部と後部の形態変化の間に相関が存在すること²⁵⁾、また樹状突起スパインの安定化と成熟において、アストログリアの突起の直接接触が重要な促進因子として働くこと²⁶⁾、活動依存的なカルシウム・カルモデュリン依存性キナーゼの動態がリン酸化活性とは独立に制御されること²⁷⁾ を示した。更に二光子励起顕微鏡法を個体レベルでのシナプス動態解析に適用するためには、

1. 二光子励起顕微鏡システムの改善
2. マウスの頭蓋骨への手術法の改善
3. 個体レベルでの蛍光プローブ発現方法の改善

という 3 項目についての検討が必要であると考え、実験条件の最適化を行った。顕微鏡システムとして対物レンズの射出口で 150 mW 程度の高い出力を維持するために励起光学系を単純なものとし、かつ検出器としての光電子増倍管 (PMT) を対物レンズの近傍に置くことで、光子検出の確率をなるべく高くすることに配慮している。この顕微鏡システムを利用すると、頭蓋骨を除去した場合には大脳皮質の表面からおよそ 500 ミクロンの深さまで樹状突起スパイン形態の描出が可能であり、細胞体レベルの蛍光シグナルであれば、800 ミクロンまでシグナルの取得が可能であることがわかった。現状の深部到達度では、解析可能な構造は依然として大脳皮質の内部に留まり、皮質下の構造である海馬や線条体に関しては

その形態解析を行うことは不可能である。頭蓋骨の手術に関しては、生後2週間までは open skull 法を利用し、生後3週間以降は主に thinned skull 法を利用している。グリア細胞の活性化を抑制するためには、thinned skull 法を利用することが望ましい²⁸⁾が、生後2週間までは頭蓋骨の骨化がまだ完成しておらず、骨を薄くする手技の適用が困難であるため、open skull 法を利用している。また thinned skull 法では骨を介して光が透過する際の波面の乱れによって、脳深部での適切な PSF の維持が出来ず、解像度の高い画像の取得が可能なのは脳表面から 100 ミクロン程度と限られている。蛍光分子の濃度が低い場合、蛍光分子の明るさが不足する場合には、thinned skull 法ではなく、open skull 法を利用して観察を行うのが現実的である。ただしこの場合にはグリア細胞の活性化が起こり、シナプス動態がそのためにベースラインとして既上昇している可能性がある。結果の妥当性の判断には、thinned skull 法の結果と比較検討する必要がある。最後の蛍光プローブの発現に関しては、大別してトランスジェニックマウスを用いる方法と、子宮内電気穿孔法を利用して遺伝子を導入する方法の二つが存在する。大脳皮質の錐体細胞の少数のサブセットに GFP などの蛍光蛋白質を発現するマウスラインが既に樹立されているので、これらのマウスシステムを導入することでスパインの形態を同定、追跡することが可能である(図3)。一方でスパイン形態のみをシナプスのマーカーとして利用することは、特にシナプス発達の段階では危険であり、PSD 構造が樹状突起のシャフト部分に形成されることや、逆にスパイン様の突起が形成されてもその中に PSD 構成蛋白質の集積が見られない場合も存在する。前述した PSD 足場蛋白質を形態マーカーとなる蛍光分子と同時に神経細胞に発現させ、両者を同時観察することでシナプス発達の過程を評価することが必要である。筆者の研究室では子宮

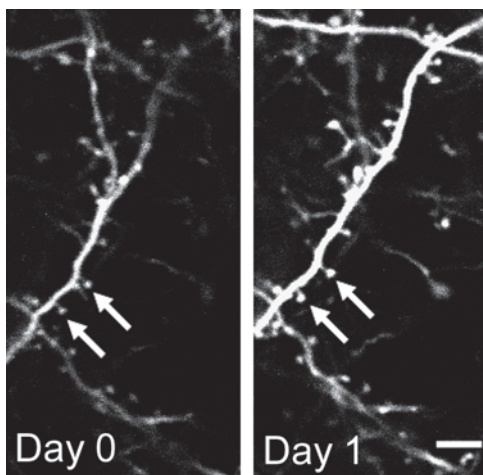


図3 In vivo イメージング画像

マウス大脳皮質の錐体細胞に EGFP を発現するトランスジェニックマウスを標本とし、錐体細胞の樹状突起を二光子励起レーザー顕微鏡で画像化した。観察は二日続けて行い、同一の樹状突起上に存在するスパイン(矢印)を同定した。Bar = 5 μm

内電気穿孔法を利用することで、複数の蛍光蛋白質を長期間安定に大脳皮質の錐体細胞に発現させることに成功しており、この手法は神経回路の発達過程でのシナプスの形成・除去、シナプス構成分子の集積と分散を単一シナプスレベルで直接解析する上できわめて有効に利用されている。

個体レベルでの二光子イメージングを用いた研究により、成熟後のマウス大脳皮質ではスパインのターンオーバーが低く抑えられており、1か月間に生成・除去されるスパインの頻度はどちらも5%程度であることが報告されている²⁹⁾。一方で生後早期のスパイン密度が増加する時期での、個々のスパインの形成・除去の速度と全体としてのスパイン密度の増加の間の関係性については現在まで報告がなく、今後明らかにする必要がある。一方で成熟脳においてスパインが安定に存在するメカニズムを理解するには、シナプスを安定化した状態から不安定な状態に変化させるシグナル・細胞・システムを抽出することも重要である。筆者らは末梢免疫系の活性化がスパイン不安定化を引き起こす可能性を検討するため、リポポリサッカライド(LPS)を腹腔内に投与した後に、スパイン動態を解析した。興味深いことに、LPS投与後一ヶ月経ってからシナプスの形成・除去速度を見ると、LPS投与群ではシナプスの除去が亢進しており、一ヶ月前に存在していたスパインの内、その5分の1が除去されてしまうことが明らかになった。またLPSにより脳内のミクログリアが活性化されることから、脳内のグリア細胞とスパイン安定化の間の関連が示唆される(未発表データ)。このような大幅なスパインの除去が、一回の末梢へのLPSの投与により惹起されることは驚きである。一見安定化されたスパインであっても、その動態をグリア系のシグナルを利用して制御することが出来る、という事実も興味深い。個体レベルでシナプス・スパインとグリア細胞の関係性を更に調べていくことが必要とされる。

5. おわりに

新しい顕微鏡画像法、蛍光蛋白質を初めとする様々なプローブの開発、観察対象である神経細胞のサンプル作成法、などが急速に進歩することで、数年前には想像できなかったような多種類の情報を高い時間・空間解像度で取得することが現在可能となりつつある。特に二光子励起顕微鏡を利用した個体レベルのイメージングは、脳内でリアルタイムに進行する現象を捉える方法として、今後の発展が期待できる技術である。二光子励起を脳より深部で引き起こすための新しい要素技術の開発も急速に進んでおり、将来的には数ミリメートルを超える深部からの形態情報の取得も可能になるであろう。

文 献

- 1) Markus, E.J. and Petit, T.L.: *Exp. Neurol.*, **96**, 262-278 (1987)
- 2) Huttenlocher, P.R.: *Neuropsychologia*, **28**, 517-527 (1990)
- 3) Ross, C.A., Margolis, R.L., Reading, S.A., Pletnikov, M. and Coyle,

- J.T.: *Neuron*, **52**, 139–153 (2006)
- 4) Walsh, C.A., Morrow, E.M. and Rubenstein, J.L.: *Cell*, **135**, 396–400 (2008)
 - 5) Goda, Y. and Davis, G.W.: *Neuron*, **40**, 243–264 (2003)
 - 6) Kennedy, M.B.: *Science*, **290**, 750–754 (2000)
 - 7) Kim, E. and Sheng, M.: *Nat. Rev. Neurosci.*, **5**, 771–781 (2004)
 - 8) Kornau, H.C., Schenker, L.T., Kennedy, M.B. and Seeburg, P.H.: *Science*, **269**, 1737–1740 (1995)
 - 9) Shimomura, O., Johnson, F.H. and Saiga, Y.: *J. Cell Comp. Physiol.*, **59**, 223–239 (1962)
 - 10) Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W.W. and Prasher, D.C.: *Science*, **263**, 802–805 (1994)
 - 11) Okabe, S. and Hirokawa, N.: *Nature*, **343**, 479–482 (1990)
 - 12) Inoue, A. and Okabe, S.: *Curr. Opin. Neurobiol.*, **13**, 332–340 (2003)
 - 13) Hua, J.Y. and Smith, S.J.: *Nat. Neurosci.*, **7**, 327–332 (2004)
 - 14) Okabe, S., Kim, H.D., Miwa, A., Kuriu, T. and Okado, H.: *Nat. Neurosci.*, **2**, 804–811 (1999)
 - 15) Ebihara, T., Kawabata, I., Usui, S., Sobue, K. and Okabe, S.: *J. Neurosci.*, **23**, 2170–2181 (2003)
 - 16) Kuriu, T., Inoue, A., Bito, H., Sobue, K. and Okabe, S.: *J. Neurosci.*, **26**, 7693–7706 (2006)
 - 17) Okabe, S., Miwa, A. and Okado, H.: *J. Neurosci.*, **21**, 6105–6114 (2001)
 - 18) Yasumatsu, N., Matsuzaki, M., Miyazaki, T., Noguchi, J. and Kasai, H.: *J. Neurosci.*, **28**, 13592–13608 (2008)
 - 19) Sugiyama, Y., Kawabata, I., Sobue, K. and Okabe, S.: *Nat. Methods.*, **2**, 677–684 (2005)
 - 20) Chen, X., Vinade, L., Leapman, R.D., Petersen, J.D., Nakagawa, T., Phillips, T.M., Sheng, M. and Reese, T.S.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 11551–11556 (2005)
 - 21) Okabe, S.: *Mol. Cell Neurosci.*, **34**, 503–518 (2007)
 - 22) Denk, W. and Svoboda, K.: *Neuron*, **18**, 351–357 (1997)
 - 23) Svoboda, K., Tank, D.W. and Denk, W.: *Science*, **272**, 716–719 (1996)
 - 24) Trachtenberg, J.T., Chen, B.E., Knott, G.W., Feng, G., Sanes, J.R., Welker, E. and Svoboda, K.: *Nature*, **420**, 788–794 (2002)
 - 25) Grutzendler, J., Kasthuri, N. and Gan, W.B.: *Nature*, **420**, 812–816 (2002)
 - 26) Nishida, H. and Okabe, S.: *J. Neurosci.*, **27**, 331–340 (2007)
 - 27) Yamagata, Y., Kobayashi, S., Umeda, T., Inoue, A., Sakagami, H., Fukaya, M., Watanabe, M., Hatanaka, N., Totsuka, M., Yagi, T., Obata, K., Imoto, K., Yanagawa, Y., Manabe, T. and Okabe, S.: *J. Neurosci.*, **29**, 7607–7618 (2009)
 - 28) Xu, H.T., Pan, F., Yang, G. and Gan, W.B.: *Nat. Neurosci.*, **10**, 549–551 (2007)
 - 29) Zuo, Y., Lin, A., Chang, P. and Gan, W.B.: *Neuron*, **46**, 181–189 (2005)