

## 講演録

### 大脳シナプスと分泌現象の2光子顕微鏡を用いた研究

東京大学大学院医学系研究科 教授

河西春郎 (かさいはるお)

#### 1. はじめに

少し自己紹介しながら研究内容を説明いたします。私は医学部を卒業してからすぐ基礎医学教室(生理学)に進みました。学生時代よりお世話になっていました外山敬介先生(当時東大医学部助教授)の行っていた猫の高次視覚野の研究を初めお手伝いしました。神経細胞の発火(活動電位)の観察から、脳の高度な情報処理の様子がわかることを目の当たりにしました。それは素晴らしい体験だったのですが、一方で神経発火を追いかけていったとして我々の心の実態に迫れるのだろうかという疑問に取り付かれます。そして、何とか機能する脳を直接観察することができないかと方法を探したものです。しかし、1981年の時点ではそれは不可能でした。やむなく、神経細胞に直接さわることができる新しい電極法であるパッチクランプ法を用いて、色々なイオンチャネルの単一チャネル電流を記録し学位を取得しました<sup>2,4)</sup>。この研究においても、イオンチャネルという分子やそれによって起きる膜電位変化は、熱力学の古典的な枠組みで理解可能な現象であることがわかり、大変物足りなく感じました。

大学院の指導教官は伊藤正男先生(理化学研究所脳科学総合センター顧問)で、小脳のシナプス長期抑圧という可塑性を発見して間もない時でした。そこで、卒業後(1985年)シナプス可塑性を単一シナプスで調べたいと手製の電気計測器で取り組んだのですが、当時の手法ではグルタミン酸をシナプスに安定に投与することができず苦杯を舐めました。しかし、この雪辱を約15年後に果たすこととなります(下記)。

そうこうするうちに生理学研究所で入沢宏先生(1986年上原賞)や大先輩である亀山正樹先生(現鹿児島大学教授)や倉智嘉久先生(現大阪大学教授)の指導も受けるようになり、その紹介で1988年になってパッチクランプ法の生みの親 Erwin Neher 博士(マックスプランク生物物理化学研究所、1993年ノーベル賞)の所に留学することになりました。その頃の Neher 研は、後に世界中で活躍することになる沢山の若手研究者がひしめいており新しい研究が模索されていました。Neher 博士自身は単一細胞の分泌現象や  $Ca^{2+}$  シグナルの生成基盤をカルシウム測定やケイジド試薬を用いて調べており、たとえば、現在では

花盛りの研究分野となっているカルシウム流入路SOC (Store Operated Ca<sup>2+</sup> Entry)機構においても先駆的仕事を進めていました<sup>5)</sup>。また、米国から来ていた George J. Augustine 博士は当時まだ新しかったカルシウム画像処理装置を持ち込んでいました。この様な、環境の中で、私はSOC研究の目的で使っていた外分泌腺標本で見出した不可解な現象の解明のために、Augustine と Ca<sup>2+</sup>イメージングの実験を行い、アゴニスト刺激をすると狭い腺腔側で選択的に Ca<sup>2+</sup>上昇が起き、刺激が強い場合には基底側に Ca<sup>2+</sup>波動が広がることを見出しました<sup>6)</sup>。細胞の刺激部位とは反対側の、機能的に重要な部位に真っ先に Ca<sup>2+</sup>上昇が起きるといふ奇抜にして合目的な現象を発見してからは、イメージング研究に取り付かれていきます。

帰国後は共焦点レーザー顕微鏡による Ca<sup>2+</sup>イメージング、ケイジド試薬による光刺激法などを用いて主としてシナプスや分泌現象を調べていました<sup>7,8)</sup>。シナプス・分泌にこだわったのは、そこには未知の度合いの強い生命現象があると思ったからです。そして、多くの限界をかかえたイメージング手法やケイジド刺激手法をなんとか改善できないかと考えていました。そこで、登場したのが2光子顕微鏡です。

## 2. 2光子顕微鏡

2光子励起顕微鏡は近赤外光の超短パルスレーザー（パルス幅が100 fs）という特殊な光源を用いる1990年頃開発された顕微鏡です<sup>9)</sup>。超短パルスレーザーはパルス期間中の光がとても強く、更にそれをレンズで集光するので焦点では異常に高い光の強度が実現し、この強い光の集まる焦点に局限して2つの光子が1つの蛍光分子を同時に励起する2光子励起現象が起きます（図1）。焦点に局限した励起が起きることから自然に断層的蛍光顕微鏡となります。また、2光子励起はその原理から通常の光の倍の波長の光、即ち、近赤外光を光源に用いますが、波長が長いため、組織の散乱が減り組織の深部を観察することができるようになります。

しかし、レーザーのパワーが1光子励起の時の10倍以上強くなければならぬので、その用途は限られていると当初は思われていました。この考えに大きく修正を迫ったのが1995年のDenkの内耳有毛細胞の実験でした<sup>10)</sup>。この実験では、細い繊毛において退色のない美しいCa<sup>2+</sup>イメージングが達成されていました。何故、退色がないかという2光子励起の断層性の為、観察している繊毛の一断面に色素の退色が起きても、繊毛の他

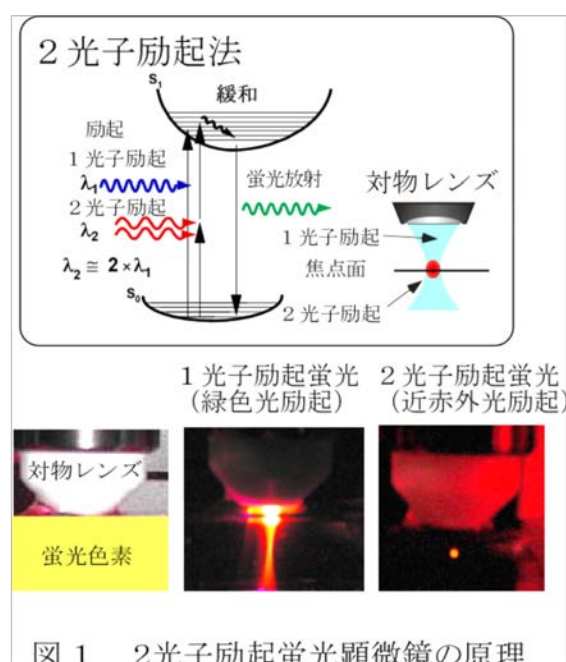


図1 2光子励起蛍光顕微鏡の原理

の部位から新しい蛍光色素が供給されるからです。また、近赤外光自身の細胞への吸収は少なく、ほとんど細胞損傷を与えないこともわかってきました。この様な研究から、2光子顕微鏡は組織内部の細胞レベルの観察に格好であることが、開発後10年以上かけて次第にわかって来るのです。

一方、2光子顕微鏡の最大の特徴と当初から考えられたのは焦点に局限した2光子励起により、光化学反応を空間の一点で起こすことが可能となることでした(図2)。しかし、2光子吸収が十分な光化学物質がなかったため、実際にこれを実現した人はいませんでした。私は、脳組織内で単一のシナプスを刺激するには、光照射でグルタミン酸を放出するケイジドグルタミン酸に2光子励起を応用するしかないと考えました。時は1995年、第一期科学技術基本法ができ、東大医学部薬理の飯野正光先生(2008年上原賞)がJSTのCRESTと一緒にやらないかと声を掛けてくれました。こうして、2光子励起顕微鏡機器の準備を万端整え1997年から2光子励起可能なケイジドグルタミン酸の開発に入りました。ケイジド試薬の有機合成の専門家のG.C.R.Ellis-Davies(Philadelphia)と組み、また、当時は助手の根本知己(現北海道大学教授)や大学院生の松崎政紀(現基礎生物学研究所教授)らの優れた共同研究者を得て、幸運にも着手してから3年で2光子励起可能な初めてのケイジドグルタミン酸を手にし、2001年に報告することができました<sup>11)</sup>。この化学生物学的手法は、この分野の研究者に広く使われるに至っています。

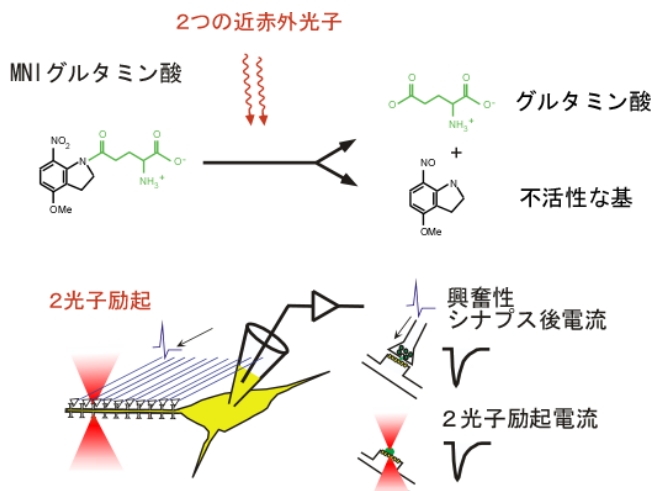


図2 2光子グルタミン酸アンケイジング法

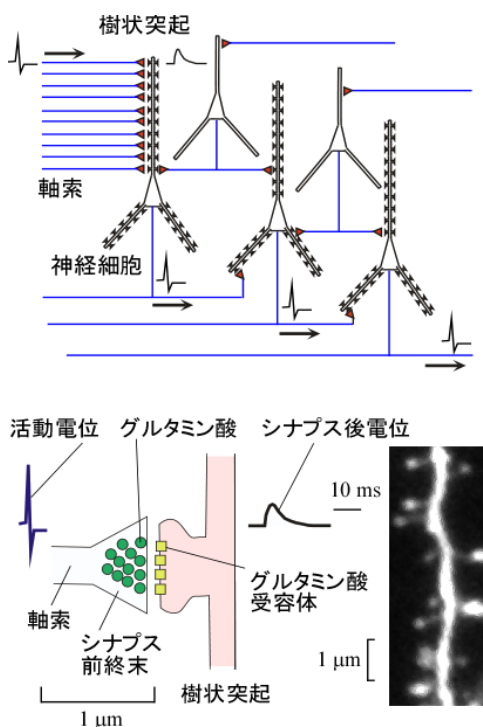


図3 大脳皮質興奮性細胞の作る神経回路とスパイン

### 3. 大脳興奮性シナプスの性質：運動性

さて、認知現象の主座と考えられている大脳皮質の代表的神経細胞である錐体細胞にて

きるシナプスは特殊な形態をしていることが 19 世紀末から知られています<sup>12)</sup>。即ち、この細胞に入力するグルタミン酸を伝達物質とするシナプスは、樹状突起棘（スパイン）と呼ばれる棘構造に入力します（図 3）。このグルタミン酸を伝達物質とする興奮性のシナプスは大脳皮質のシナプスの 7 割を占めます。スパインは、1 ミクロン以下の構造で、頭部と首構造からなり、それらは著しく多形で、スパインの頭部の大きさは百倍、首の太さは千倍近くスパインにより異なります<sup>13)</sup>。この多形性の意義は何でしょう。また、スパインはアクチンという細胞骨格タンパク質が繊維を作って濃縮していますが、アクチン繊維は動く細胞構造にあることが多いので、スパインは動く構造であることが予想されます。また多くの精神神経疾患でスパインはその形態異常が起きることが知られています。認知症の様な神経脱落疾患でシナプスの密度が下がるのは当然ですが、精神遅滞、精神疾患で神経細胞の脱落が無い場合でも密度や形態に異常が来る。特に、知能障害が重度である場合には、スパインが比較的小さいこと知られています。

我々は、大脳海馬のスライス標本のスパインに対して 2 光子グルタミン酸法を用いることにより、スパインのグルタミン酸感受性を系統的に調べました<sup>11)</sup>。その結果は図 4 に疑似色コードで示した様で、スパインの頭部が大きいほど、暖色系となり、グルタミン酸感受性が高いことを示します。グルタミン酸感受性はスパイン表面に一様にあるのではなく、その一点に偏って分布しているところが鍵です。これは、シナプス後部でシナプス結合に関係しているグルタミン酸受容体は集積していることを機能的に解像したもので、シナプス後部の受容体量、即ちシナプ

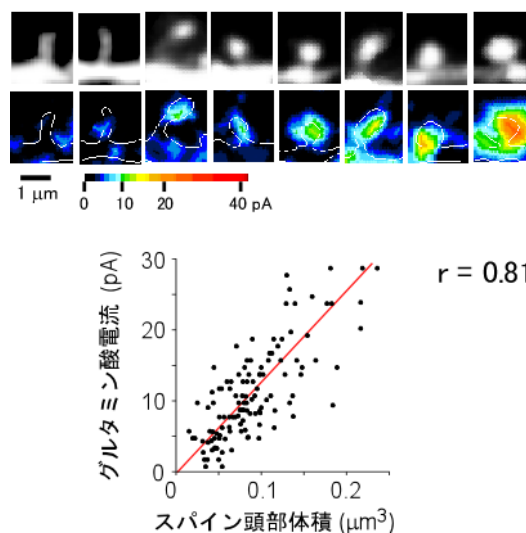


図 4 スパインの形態機能連関

ス結合強度を現していることになります。このスパイン形態と機能の関係はその後多くの研究室で確認されました。これは、スパインの結合強度はその履歴によらずにその大きさだけで決まることを示します。一見、何の関係もないスパインの形態とグルタミン酸感受性が相関するのは、その両方をスパインのアクチン繊維が決めているからと考えられますが、その分子的な詳細はまだわかっていません。

次に、学習・記憶の細胞レベルの過程と考えられている反復刺激後に起きるシナプス結合強度の機能的増強、長期増強、を 2 光子グルタミン酸法を用いて単一スパインで誘発することを試みました<sup>14)</sup>。すると、反復刺激に対してスパイン頭部が大きくなることを見出しました。この頭部増大現象にはグルタミン酸感受性、即ちシナプス結合の増大を伴うことがわかり、こうして長期増強には細胞運動が伴うことがわかりました（図 5）。更に、この頭部増大は刺激したスパインで特異的に起き、このことからスパインは独立可変性が

あり、「記憶素子」と考えられることを明らかにしました。この実験は松崎政紀博士が行いましたが、その後 6 年間の間に多くの研究室で追試され確認されています。また、田中淳一博士は、この増大が神経細胞の同期発火刺激でも誘発されること、蛋白質合成に依存すること、など更

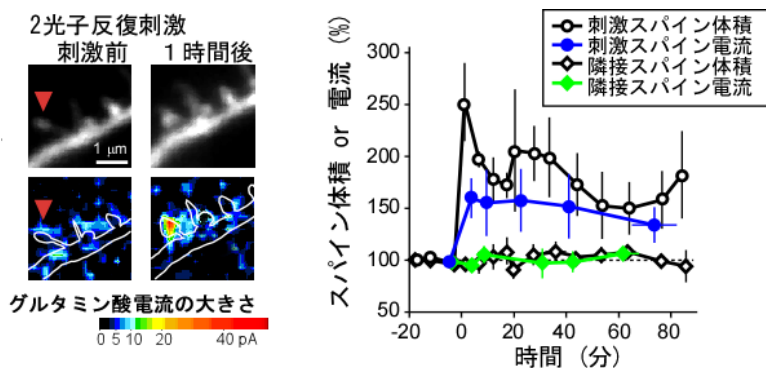


図 5 スパイン頭部増大と長期増強

に記憶の属性を満たすことを示しました<sup>15)</sup>。形態変化を伴わない長期増強というのも報告されていますが、おそらくは、形態変化を伴うものに比べると持続が短いと考えられます。形態変化を伴う場合には、後述するシナプスの揺らぎを考えても、年余の記憶を説明することができます。

単一スパインは「記憶素子」であるので、記憶全体の意味を持つことはできません。スパインの記憶全体における意味は回路を動かしてみないとわからないのです。しかし、その回路の性質の重要な部分を記憶素子が決めているといえます。スパインの独立可変性から1スパインは最低1ビットを持つことができることとなります。スパインの存在密度(概略1スパイン/ $1\mu\text{m}^3$ )を考えると、人工の3次元記憶媒体の性能を凌駕しており、大脳皮質の容積を考えると全体で最低10テラバイトの物理容量を与えます。スパインの存在理由は、本幹から隔離した形態により独立可変性を可能にすることにあると考えられます。この結果、スパインを構成する分子は単一スパインに長く留まることがなくても、スパイン形態が長く保存されるようになると考えられます。この個別可変性によって、脳機能が高度に集積し、小さな体積で真の高次機能を営むことが可能となります。スパイン以外に脳の高集積性を説明できる脳の構造は今のところありません。

頭部増大の原因を調べるためにその主たる細胞骨格であるアクチン繊維を光りで標識して動態を解析しますと(図6)、頭部増大の最中に新しい安定なアクチン繊維が生成され、それがスパインを押し広げている様子がわかりました<sup>16)</sup>。このアクチン繊維はゲル化しているらしく、時々、固まりとなってスパインの外に流れ出てしまいます(図6下、矢印)。そ

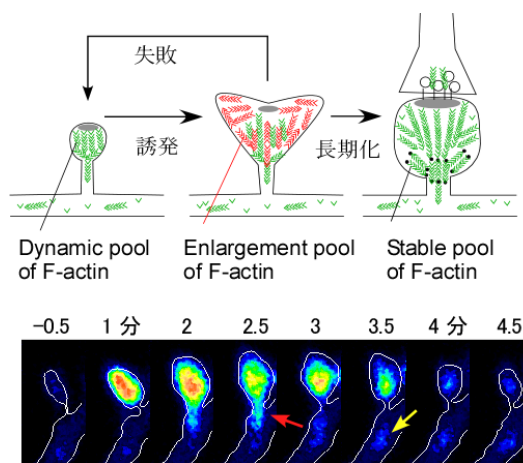


図 6 スパイン頭部増大とアクチン動態

うすると、頭部の大きさは元に戻り、二度と大きくなることはありません。それに対して、このゲルが頭部に留まった場合には頭部増大が長く続きます。おそらく、このゲルの成分が記憶を保持しており、この成分が徐々に頭部増大をより安定な形に変えていくと考えられます。即ち、ゲルの生成による増大運動、その固さによる流れだしの決定、そして定着過程と、常にスパインは力学的な相互作用を周囲の組織としています。大脳のシナプスは電気化学的であるだけでなく、力学的であると言えます。大学院生だった本蔵直樹博士の研究です。この力学過程は多様でスパインごとに異なり、また、個体差があると考えられます。シナプスの結合強度の変化（学習）が単純な化学反応に従わず、とても個性的に決まる基盤がこの力学性にあるように思われます。このシナプスの運動性は生命としての統一性、個性、いい加減さのすべてを満たし、シナプス或いはその集合の行動が、個体の行動の基盤にあるように思えるのです。

#### 4. シナプスの運動性と学習記憶

2 光子顕微鏡を用いると生きた個体動物において大脳皮質のシナプスの観察を、間欠的に、1月或いは2年に涉って観察することが可能になります。この WenBiao Gan や Karel Svoboda のグループの行った研究では、大脳の少数の錐体細胞に蛍光蛋白を導入した遺伝子改変動物が用いられ<sup>17,18)</sup>、その要点は以下の3点に纏められます<sup>19)</sup>。

1) 脳の多くの領野間で神経回路が形成されるように軸索や樹状突起が発生し、

その後それらの神経突起の走行は、ほとんど変わらない(図7)。発達や学習によって変わり得るものは、スパインシナプスの生成消滅やその形態の変化が中心となる。

2) 実際、スパインシナプスは活発に生成消滅する。成熟したネズミで全シナプスの概略1%に当たる数のシナプスが一日当たり生成し、ほぼ同数のシナプスが消滅していく。全シナプスの母集団が大きいので、1%と言っても大変な数になり、人間では100ギガバイトの物理容量に相当します。このシナプスの生成や消滅が動物の置かれた環境や経験によって2倍位まで増大することが観察されており、これが記憶と関係している可能性が指摘されています。

3) 多くのスパインの寿命は長く、ネズミでは、その一生に当たる2年間持続可能であるスパインが7割を占める。全体の3割のスパインが生成消滅を比較的活発に行い、生成したスパインの一部が長期的に維持されるらしい。

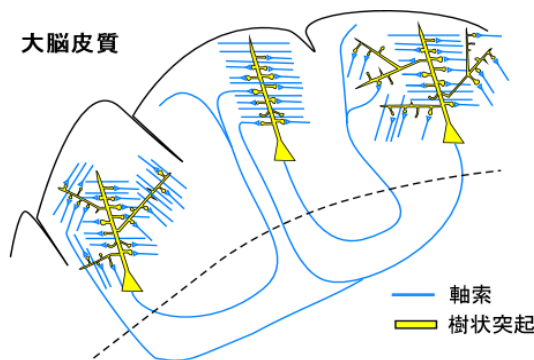


図7 大脳皮質の回路とシナプス生成消滅

それでは、この様なシナプスの生成消滅と学習はどう対応するのでしょうか。スパインは学習刺激で体積変化しますが、この体積変化とスパインの生成消滅は対応するのでしょうか。個体動物では測定技術の問題からスパインの体積変化を扱うことが難しく、我々の研究室では、培養スライス標本を用いて、これらの現象の定量的基盤の解明を進めました<sup>20)</sup>。大学院生だった安松信明博士の研究の結果、何日にも渉る観察では(図8)スパインの学習刺激による変化(図8中央、青矢印)

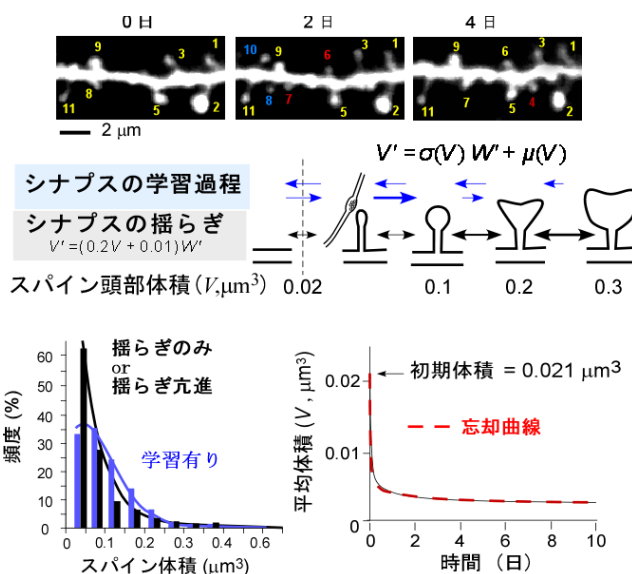


図8 シナプスの学習/揺らぎと体積分布/持続

に加えて、自然の揺らぎ(黒矢印)が寿命を理解する際の鍵であることがわかってきました。この揺らぎは学習に比べて常時起きているので、シナプスの寿命を決めるだけでなく、スパインの体積の統計的分布をも説明することが明らかになりました(図8下)。この揺らぎは生きた組織内で小さな運動する構造が有るために不可避免的に成ずるものであり、この形態維持が遺伝的或いはその他の事情で損なわれると、精神遅滞となるらしく(下記参照)、また、この揺らぎでシナプスの自然消滅がかなり高率に起きるので、これを埋め合わせるように、自然のシナプス新生も活発に起きている様です。こうして生成された新生スパインは必ず小さく、小さいスパインは学習刺激の作用を受けやすい。こうして、ある程度ランダムに生成したシナプス結合を選別するのがシナプスの学習であると考えられます。

この考え方は、脳の発達にも適用されます。スパインは生後間もなく、成熟動物の密度にまで達しますが、これらのスパインは学習とは必ずしも関係なく自発的に作られ、有効な神経回路を構成しているとは限りません。発達とは、思春期までの活発な学習能により、動物の行動、即ち神経回路の動作の助けになる好ましいシナプスのセットを試行錯誤で選んでいくことと考えられます。

ここで、図8に示したスパインという記憶素子のスキームを見て頂きます。矢印で書かれた推移はゆっくりと1日の単位でしか起きません。そこで、次の様なことが一般的に言えます。大きなスパインは生成に時間がかかるが長持ちする。また、古いスパインほど大きく、長続きしやすい。この様に、スパインという記憶素子は計算機の1ビットの記憶素子と異なり、沢山の状態を持ち、古いほど大きく長持ちするという履歴効果を示します。大きなスパインは揺らぎがあっても長く持つのです。この様な、履歴を持った記憶素子を使っていることが、どういう効果を記憶にもたらすのでしょうか。古く、19世紀の心理学者 Hermann Ebbinghaus は記憶の忘却について定量的な実験を行い、無意味文を覚えた後の

自然の忘却が指数的でなく、対数的で（忘却曲線）、長持ちした古い記憶ほど長続きする履歴効果を報告している。この忘却曲線はスパインの体積の自然な減衰によく一致しました（図8下右）。即ち、古い記憶ほど長持ちするというよく体験される記憶の性質は、記憶素子スパインの性質から簡単に説明することができます。

更に、図8をもう一度見て頂きますと、学習によるスパインの変化（青矢印）は小さいスパインで起きやすく、中位のスパインを大きくすること難しいことがわかります。これは、一見、スパインが記憶素子であることに不都合の様に思える。しかし、よく考えてみると、もし、大きなスパインが容易にできたり、それがすぐ小さくなると、我々の頭はその日の記憶で埋まり、以前の記憶をかき消し、長期的な記憶の保持が困難になる。不必要な記憶に悩まされることにもなる。後々まで保存される記憶は大事な情報のみであってほしく、その様な記憶は反復的に学習が起きた場合に形成しやすくするのが一つの戦略である。図8を見て頂くと、小さなスパインの学習はすぐ頭打ちとなり、それを超えて大きなスパインができるためには、反復的な学習により、中位のスパインの形成を促し、揺らぎによる大きなスパインの形成を待つしかないことがわかる。即ち、図8のスキームは記憶形成における反復学習の必要性や古い記憶の保持とよく対応します。

## 5. シナプスの運動性と精神疾患

現在では、精神遅滞、自閉症、統合失調症などの精神疾患はシナプスの異常が脳機能障害の直接の原因と考えられるようになってきています。一つには、精神神経疾患ではスパインの形態異常があることが知られていることがあり、もう一つには、関連遺伝子の多くがシナプス、特に、スパインに発現していることがわかってきたことがあります<sup>19)</sup>。それでは、シナプスの異常と多様な脳の機能異常はどう具体的に対応し得るのでしょうか。

スパインの形態異常の中でも最も顕著な障害は、精神遅滞者やそのモデル動物で頻繁に報告されるスパインの小型化です。精神遅滞では知能指数の低下で計られる広範な知能の障害が起きます。原因遺伝子は多岐に及びますが、シナプスの接着構造に関わるものが含まれ、シナプスの安定な保持の障害でないかと考えられます。実際、シナプスの揺らぎ成分が大きくなると、学習効果を打ち消し、スパインが小さくなることが説明されます（図8左）。大きなスパインができにくいと、原因によらず長期的な記憶の蓄積が発達過程で障害され、正常な知能の形成を障害すると考えられる。精神遅滞、自閉症では稀に短期的な記憶力はむしろ亢進し、特定の機能が正常以上となることがあるが、これが小さなスパインの学習能の高さと関係するとする説があります。逆に、老化動物では小さなスパインが減少していることが、学習能の低下と関係するという研究がでています。

統合失調症は、妄想幻覚などの陽性症状を持って思春期に発病し、全人口の1%を侵す慢性疾患です。統合失調症には陽性症状に加えて、自閉、固執、感情鈍麻などの陰性症状があり、更に、作業記憶障害、注意障害、実行機能などの認知障害が基盤にあることが明ら



かになってきています。陰性症状、認知障害は治療に抵抗性で、社会復帰の妨げとなります。機能障害の理由として、シナプスの学習に関わるグルタミン酸受容体の機能低下やドーパミン受容体の機能障害説があります。更に、遺伝学的研究では関連遺伝子はシナプスにあることが多いことがわかっており、シナプスの学習異常が機能障害の理由ではないかと推察されはじめています。シナプスの学習障害がなぜ感情鈍麻などの陰性症状や認知障害につながるかは今後の課題です。遺伝基盤の解析に加えて、中間表現型としてシナプスの運動異常を可視化していく作業が必要だと考えられます。

## 6. 分泌現象

シナプスは、樹状突起の一部で伝達物質の受容を行うシナプス後部だけでなく軸索の一部であり分泌を行うシナプス前部とからなります(図3)。従って、神経回路を理解する為にはシナプス前部機能もわかるようにする必要があります。この為に、我々は2光子顕微鏡を用いて組織内の分泌現象を測定する技術を開発し、また、分子機構を可視化する試みを行ってきました。この際、シナプス小胞の直径は50nmと極端に小さいので、技術開発のために大きな(直径100-1000nm)分泌小胞を持つ神経内分泌組織を使う戦略をこれまで取ってきました。内分泌細胞の中には膵臓ランゲルハンス島のβ細胞のように、その分泌能が糖尿病という重大疾患の成因と深く関わるものもあり、それ自身やり甲斐のあるものです。この研究には、根本知己博士、当時大学院生の岸本拓哉博士(現ソニー基盤研究所)や高橋倫子博士(現東京大学医学部講師)が当初より活躍してくれました。

こうしてβ細胞を含む幾つかの分泌細胞の組織内における開口放出を初めて可視化することに成功し、組織内の分泌はそれぞれ予想外の面白い特徴を持つことを明らかにしました<sup>21-30</sup>。そうして、最近、分泌に中核的な役割を果たすSNARE分子の準備状態をモニターする蛍光プローブ(SLIM)を作成することに初めて成功しました<sup>31</sup>。現在、これを改良し神経のシナプス前終末の機能状態を可視化する作業を進めています。

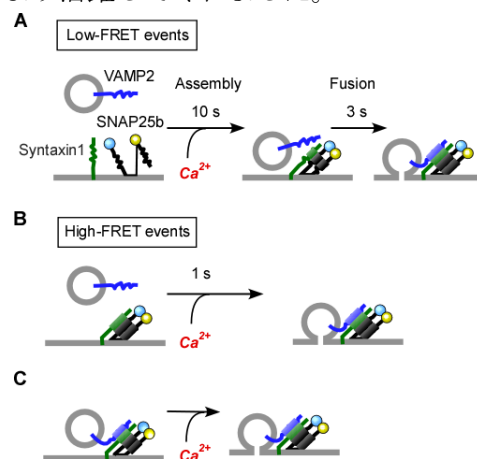


図9 FRET Probe SLIMによる分泌準備段階の検出

## 7. おわりに

現代の生命科学はゲノム情報の爆発的拡大に伴い、様々なイメージング手法の発展によって特徴づけられています。広い意味でのイメージング手法には光などで個体機能を刺

激・制御する手法も含まれています。我々の2光子励起ケイジドグルタミン酸法はこうした光刺激法の最初の成功例と言えるかも知れません。現在では遺伝子導入可能な様々の光刺激手法の開発が目白押しで進んでおり、我々も更なる手法の確立を目指しています。こうして光で神経回路を人為的に変えて、その効果を脳を顕微観察することで明らかにする様な新しい生命科学が急速に立ち上がろうとしています。記憶とシナプスの関係も、こうした手法により、より直接的に検証可能となるでしょう。遺伝学、分子生物学の発展にも助けられながら、今後の生命科学・神経科学の進展は急速なものになると期待されます。

ここに述べた研究は、大学院生、研究員、スタッフ、研究補助などの共同研究者のお陰であり、心より感謝致します。

## 文献

- 1) Toyama, K., Komatsu, Y., Kasai, H., Fujii, K. & Umetani, K. : Responsiveness of Clare-Bishop neurons to visual cues associated with motion of a visual stimulus in three-dimensional space. *Vision Res.*, **25** : 407-414, 1985.
- 2) Kasai, H., Kameyama, M., Yamaguchi, K. & Fukuda, J. : Single transient K channels in mammalian sensory neurons. *Biophys J.*, **49** : 1243-1247, 1986.
- 3) Kasai, H., Aosaki, T. & Fukuda, J. : Presynaptic Ca-antagonist omega-conotoxin irreversibly blocks N-type Ca-channels in chick sensory neurons. *Neurosci. Res.*, **4** : 228-235, 1987.
- 4) Aosaki, T. & Kasai, H. : Characterization of two kinds of high-voltage-activated Ca-channel currents in chick sensory neurons. Differential sensitivity to dihydropyridines and omega-conotoxin GVIA. *Pflugers Arch.*, **414** : 150-156, 1989.
- 5) Penner, R., Matthews, G. & Neher, E. : Regulation of calcium influx by second messengers in rat mast cells. *Nature*, **334** : 499-504, 1988.
- 6) Kasai, H. & Augustine, G. J. : Cytosolic Ca<sup>2+</sup> gradients triggering unidirectional fluid secretion from exocrine pancreas. *Nature*, **348** : 735-738, 1990.
- 7) Kasai, H., Li, Y. & Miyashita, Y. Subcellular distribution of Ca<sup>2+</sup> release channels underlying Ca<sup>2+</sup> waves and oscillations in exocrine pancreas. *Cell*, **74** : 669-677, 1993.
- 8) Ninomiya, Y., Kishimoto, T., Yamazawa, T., Ikeda, H., Miyashita, Y. & Kasai, H. : Kinetic diversity in the fusion of exocytotic vesicles. *EMBO J.*, **16** : 929-934, 1997.
- 9) Denk, W., Strickler, J. H. & Webb, W. W. : Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science*, **248** : 73-76, 1990.
- 10) Denk, W., Holt, J. R., Shepherd, G. M. & Corey, D. P. : Calcium imaging of single

- stereocilia in hair cells: localization of transduction channels at both ends of tip links. *Neuron*, **15** : 1311-1321, 1995.
- 11) Matsuzaki, M., Ellis-Davies, G.C.R., Nemoto, T., Miyashita, Y., Iino, M. & Kasai, H. : Dendritic spine geometry is critical for AMPA receptor expression in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Nat Neurosci.*, **4** : 1086-1092, 2001.
  - 12) Kasai, H., Matsuzaki, M., Noguchi, J., Yasumatsu, N. & Nakahara, H. : Structure-stability-function relationships of dendritic spines. *Trends Neurosci.*, **26** : 360-368, 2003.
  - 13) Noguchi, J., Matsuzaki, M., Ellis-Davies, G. & Kasai, H. : Spine-neck geometry determines NMDA receptor-dependent Ca<sup>2+</sup> signaling in dendrites. *Neuron*, **46** : 609-622, 2005.
  - 14) Matsuzaki, M., Honkura, N., Ellis-Davies, G. & Kasai, H. : Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines. *Nature*, **429** : 761-766, 2004.
  - 15) Tanaka, J., Horiike, Y., Matsuzaki, M., Miyazaki, T., Ellis-Davies, G.C.R. & Kasai, H. : Protein synthesis and neurotrophin-dependent structural plasticity of single dendritic spines. *Science*, **319** : 1683-1687, 2008.
  - 16) Honkura, N., Matsuzaki, M., Noguchi, J., Ellis-Davies, G. & Kasai, H. : The subspine organization of actin fibers regulates the structure and plasticity of dendritic spines. *Neuron*, **57** : 719-729, 2008.
  - 17) Grutzendler, J., Kasthuri, N. & Gan, W. B. Long-term dendritic spine stability in the adult cortex. *Nature*, **420** : 812-816, 2002.
  - 18) Trachtenberg, J. T. *et al.* Long-term in vivo imaging of experience-dependent synaptic plasticity in adult cortex. *Nature*, **420** : 788-794, 2002.
  - 19) Kasai, H., Fukuda, M., Watanabe, S., Hayashi-Takagi, A. & Noguchi, J. Structural dynamics of dendritic spines in memory and cognition. *Trends Neurosci.*, **33** : 121-129, 2010.
  - 20) Yasumatsu, N., Matsuzaki, M., Miyazaki, T., Noguchi, J. & Kasai, H. : Principles of long-term dynamics of dendritic spines. *J. Neurosci.*, **28** : 13592-13608, 2008.
  - 21) Nemoto, T., Kimura, R., Ito, K., Tachikawa, A., Miyashita, Y., Iino, M. & Kasai, H. : Sequential-replenishment mechanism of exocytosis in pancreatic acini. *Nature Cell Biol.*, **3** : 253-258, 2001.
  - 22) Takahashi, N., Kishimoto, T., Nemoto, T., Kadowaki, T. & Kasai, H. : Fusion pore dynamics and insulin granule exocytosis in the pancreatic islet. *Science*, **297** : 1349-1352, 2002.
  - 23) Nemoto, T., Kojima, T., Oshima, A., Bito, H. & Kasai, H. : Stabilization of exocytosis by dynamic F-actin coating of zymogen granules in pancreatic acini. *J. Biol.Chem.*, **279** :

- 37544-37550, 2004.
- 24) Takahashi, N., Hatakeyama, H., Okado, H., Miwa, A., Kojima, T., Abe, T. & Kasai, H. : Sequential exocytosis of insulin granules is associated with redistribution of SNAP25. *J. Cell Biol.*, **165** : 255-262, 2004.
  - 25) Kishimoto, T. Liu, T.-T., Hatakeyama, H., Nemoto, T., Takahashi, N. & Kasai, H. : Sequential compound exocytosis of large dense-core vesicles in PC12 cells studied with TEPIQ analysis. *J. Physiol.*, **568** : 905-915, 2005.
  - 26) Liu, T. T., Kishimoto, T., Hatakeyama, H., Nemoto, T., Takahashi, N. & Kasai, H. : Exocytosis and endocytosis of small vesicles in PC12 cells studied with TEPIQ analysis. *J. Physiol.*, **568** : 917-929, 2005.
  - 27) Oshima, A., Kojima, T., Dejima, K., Hisa, I., Kasai, H. & Nemoto, T. : Two-photon microscopic analysis of acetylcholine-induced mucus secretion in guinea pig nasal glands *Cell Calcium*, **37** : 349-357, 2005.
  - 28) Kishimoto, T., Kimura, R., Liu, T.-T., Nemoto, T., Takahashi, N. & Kasai, H. : Vacuolar sequential exocytosis of large dense-core vesicles in adrenal medulla. *EMBO J.*, **25** : 673-682, 2006.
  - 29) Hatakeyama, H., Kishimoto, T., Nemoto, T., Kasai, H. & Takahashi, N. : Rapid glucose sensing by protein kinase A for insulin exocytosis in mouse pancreatic islets. *J. Physiol.*, **570** : 271-282, 2006.
  - 30) Hatakeyama, H., Takahashi, N., Kishimoto, T., Nemoto, T. & Kasai, H. Two : cAMP-dependent pathways differentially regulate exocytosis of large dense-core and small vesicles in mouse beta-cells. *J. Physiol.*, **582** : 1087-1098, 2007.
  - 31) Takahashi, N., Hatakeyama, H., Okado, H., Noguchi, J. Ohno, M. & Kasai, H. : SNARE conformational changes that prepare vesicles for exocytosis. *Cell Metab.*, **12** : 19-29, 2010.