

総 説

神経伝達物質の放出を制御するシナプス小胞 TRPM7 チャンネル The TRPM7 ion channel functions in cholinergic synaptic vesicles

持 田 澄 子

Sumiko MOCHIDA

東京医科大学細胞生理学講座
Department of Physiology, Tokyo Medical University

【要旨】 神経シナプス前終末への活動電位到達によって Ca^{2+} チャンネルから Ca^{2+} が流入すると、数十～数百 μ 秒のうちにシナプス小胞からシナプス間隙に伝達物質が放出される。迅速なシナプス小胞開口放出過程には、 Ca^{2+} チャンネルに結合する SNARE 蛋白質複合体と Ca^{2+} 結合蛋白質が機能分子として主要な働きをしていると考えられている。さらに、アセチルコリンを含有するシナプス小胞に発現している TRPM7 イオンチャンネルの機能解析結果は、同チャンネルを通してシナプス小胞に流入する陽イオンが小胞からの伝達物質放出に積極的にかかわっていることを示唆する。

はじめに

神経伝達物質の放出は、感覚受容器が神経に、神経が神経に、そして神経が効果器に情報を伝達する化学信号として、中枢から末梢神経までほぼ共通した手段として用いられている。神経軸索を伝わる電気信号である活動電位は、ミエリン髄鞘のある A α 線維では 10 μ 秒の間に、C 線維であっても 1 m 秒の間にほぼ 1 m メートルも伝導する。このような速いスピードで神経終末に到達する電気信号に対応して、伝達物質放出は数十～数百 μ 秒のうちに起こる。この事実、シナプス前神経終末では、膜電位依存性 Ca^{2+} チャンネルの開口による Ca^{2+} 流入からシナプス小胞内神経伝達物質のシナプス間隙への放出が迅速に行われるように、空間的・時間的に緻密な調節がなされていることを示唆する。

電気信号の到着後に素早く神経伝達物質を放出するには、信号の到達に備えてアクティブゾーンにシナプス小胞を適切に配置し、水風船に孔が開いたら中の水がザーとこぼれ出すように、 Ca^{2+} が流入したらシナプス小胞膜と神経膜が融合開孔して速やかにシナプス間隙に向かって神経伝達物質が放出されるように調節する蛋白分子群が機能していると考えられている。ひとつのシナプス小胞にはシナプトブレヴィンを含め 100 分子以上の蛋白質が¹⁾、そして、細胞質と形質膜にも多数の蛋白質が見出されている²⁾³⁾。SNARE 仮説⁴⁾が提唱されて以降、アクティブゾーンにおけるシナプス小胞の一連の動態は、SNARE 蛋白質 (シナプトブレヴィン、シンタキシン 1、SNAP-25) 複合体と高濃度 Ca^{2+} を感知するシナプトタグミン 1 が鍵機能分子として働いていると考えられてきた²⁾³⁾。また、神経伝達物質放出のスピードと時空間的調節を考えた

平成 21 年 4 月 30 日受付、平成 21 年 5 月 21 日受理

キーワード: シナプス小胞、開口放出、TRPM7 チャンネル、アセチルコリン

(別冊請求先: 〒160-8402 東京都新宿区新宿 6-1-1 東京医科大学細胞生理学講座 持田 澄子)

TEL: 03-3351-6141 (内線 247) FAX: 03-5379-0658

最近の研究では、SNARE 蛋白質複合体とシナプトタグミン 1 に加えて、Munc 13、Munc 18、コンプレキシン、トモシンなどの機能が注目されている⁵⁾。執筆者らは、シナプス小胞チャネルも神経伝達物質放出のスピードを速める働きをしている可能性があることも確認している⁶⁾。以上をまとめると、活動電位発生から伝達物質放出までの数十～数百 μ 秒の時間に様々な蛋白質が順次機能していると考えられる。本稿では、神経伝達物質放出量を時間的に調節する機能分子として、アセチルコリンを含有するシナプス小胞に特異的に発現している TRPM7 イオンチャネルの機能について述べる。

シナプス小胞からの神経伝達物質放出

シナプス小胞膜と神経終末膜が融合してシナプス小胞が開口するとき、kiss-and-run 等の現象から、シナプス小胞内の伝達物質がすべて放出されるとは限らないことがわかってきた⁷⁻⁹⁾。シナプス小胞から伝達物質は拡散するのか？ あるいは、積極的に放出されるのか？ 放出量は制御されるのか？ このような疑問にヒントを与えるような小胞からの伝達物質放出制御様式が、プラスに荷電した伝達物質を含むシナプス小胞で示唆されている⁶⁾¹⁰⁾¹¹⁾。たとえば、シビレイのアセチルコリン含有シナプス小胞では、神経伝達物質はイオン交換体マトリックスによってシナプス小胞内に繋ぎとめられていて、イオン交換量によって放出量が制御されると報告されている¹²⁾。執筆者ら

は、陽イオンを通す TRPM7 チャネルがアセチルコリン含有シナプス小胞に特異的に発現していて、シナプス小胞から放出されるアセチルコリン量が TRPM7 イオンチャネルの発現量に依存して変化することを発見した⁶⁾。この結果をもとに、プラスに荷電した伝達物質の積極的な放出制御モデルを提示した¹³⁾。一方、グルタミン酸、グリシン、GABA などの伝達物質放出にシナプス小胞イオンチャネルが機能分子として働いているかどうかはまだ明らかにされていない。

TRP イオンチャネル

TRP イオンチャネルは、温度、触感、痛み、浸透圧、フェロモン、味などの刺激に反応する感覚感知チャネルとして働くことが知られているが、細胞内小胞にもその存在が確認されていることから、個々の細胞にとっても知覚装置として TRP イオンチャネルが機能し、細胞内外双方からの多様な種類の刺激に対して反応するように適応していると考えられている¹⁴⁾。多くのアイソフォームを有する TRP イオンチャネルは、C, M, P, V に分類されている。脳では、C, M, P, V すべての TRP イオンチャネルが発現しているが、細胞増殖や細胞死に関わるとの報告があるものの、それらの機能はまだほとんど解析されていない¹⁴⁾。

TRPM7 チャネルのシナプス小胞への局在

TRP チャネル研究の第一人者である Clapham 博士の研究グループの Krapivinsky 博士らとの共同研究

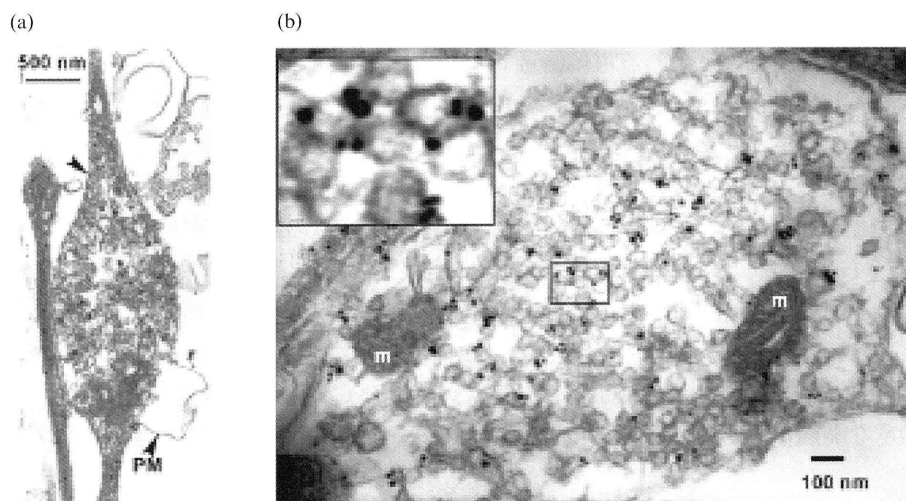


図 1 培養上頸交感神経節細胞での TRPM7 チャネルの局在
TRPM7 抗体を用いて金コロイド標識した培養上頸交感神経節細胞ヴァリコシティの電子顕微鏡像。(a) 培養上頸交感神経節細胞の突起は特異的な玉葱様ヴァリコシティ (矢頭) を形成し、シナプス小胞を含有する。PM, 形質膜。(b) ヴァリコシティ内の拡大像 (挿入図) は、無芯シナプス小胞膜に TRPM7 チャネルが局在することを示す。m, ミトコンドリア。

で、執筆者は TRPM7 チャンネルがアセチルコリン含有シナプス小胞に局在することを明らかにした⁶⁾。まず、TRPM7 が相互作用する蛋白質をスクリーニングして、シナプス小胞蛋白質のひとつであるスナッピンと結合することを確認したので、ラット脳を用いてウエスタンブロットング法で TRPM7 チャンネルの局在を調べたところ、シナプス小胞分画に限局して発現していた。さらに、TRPM7 チャンネルの抗体を用いた免疫沈降実験から、TRPM7 チャンネルがシナプス小胞蛋白質のシナプトタグミン 1 とシナプシン 1 とともに複合体を形成するが、 v -あるいは t-SNARE や、SNARE 複合体とは結合しないことを見出した。

免疫組織化学的方法を用いて TRPM7 チャンネルをシナプス小胞に発現しているシナプスを同定しようと試みた。その結果、ラット海馬ニューロンでは TRPM7 チャンネルを確認できなかったが、TRPM7 チャンネルとシナプス小胞マーカー蛋白質であるシナプトフィジンとの共存が神経筋接合部で確認された。これらの結果は、TRPM7 チャンネルはアセチルコリン

を伝達物質とする運動神経終末に局在することを示唆し、さらにアセチルコリンを伝達物質とするシナプスでは、TRPM7 チャンネルが発現している可能性を示唆した。そこで、無芯小胞を含有する fast シナプスのモデルとして執筆者が生理学的機能解析研究に用いている培養ラット上頸交感神経節細胞で検討したところ、TRPM7 チャンネルの免疫組織化学的染色像は、シナプス小胞蛋白質のひとつであるシナプトフィジンと共存していた。さらに、電子顕微鏡を用いた金コロイド免疫抗体染色像は、培養上頸交感神経節細胞ヴァリコシティに含有される無芯シナプス小胞膜に TRPM7 チャンネルが局在していることを示した (図 1)。

TRPM7 チャンネルとアセチルコリンの放出

アセチルコリン含有シナプス小胞膜に局在してスナッピンやシナプトタグミン 1 と相互作用する TRPM7 チャンネルは、活動電位で引き起こされるアセチルコリンの放出にどのように関わっているのだら

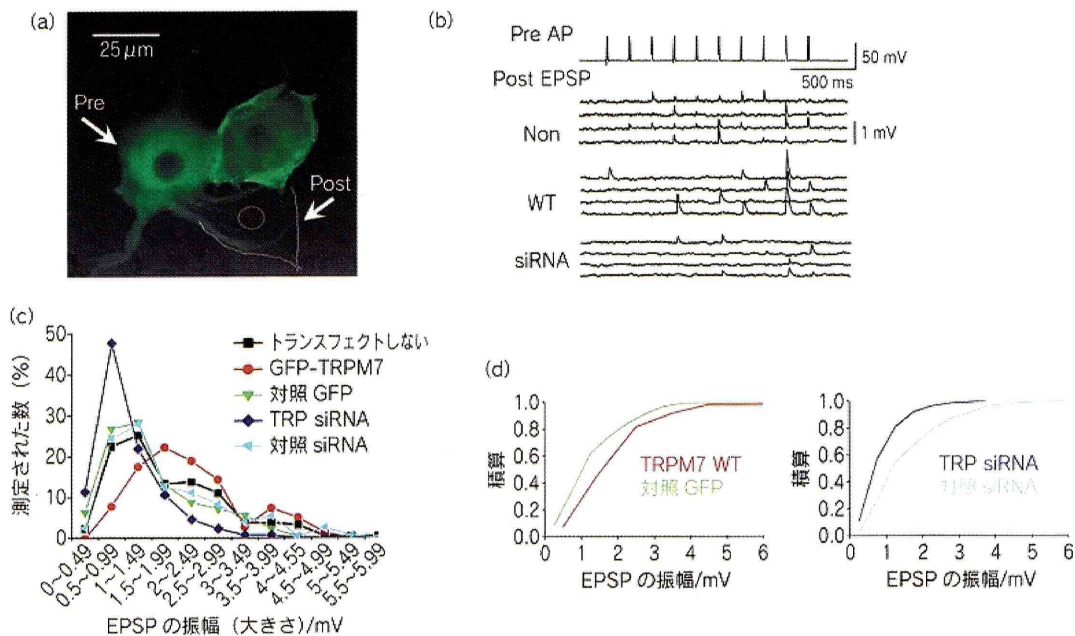


図2 シナプス前細胞の TRPM7 チャンネル発現レベルに依存したアセチルコリン放出

(a) GFP-TRPM7 トランスフェクションした上頸交感神経節細胞 (緑) とトランスフェクションしていない細胞 (輪郭と核を白線で示している)。シナプス前細胞 (Pre、蛍光を発する細胞) に活動電位を発生させて、シナプス後細胞 (Post、蛍光を発しない細胞) からシナプス応答を記録して、シナプス小胞からのアセチルコリン放出を解析する。(b) 低 Ca^{2+} (0.2 mM)/高 Mg^{2+} (5 mM) 溶液中で記録される興奮性シナプス後応答。各トレースは、シナプス前細胞に活動電位を 5 Hz で 10 回発生させたとき (Pre APs) のシナプス応答記録 (Post EPSPs) を示している。Non: トランスフェクションしていない細胞をシナプス前細胞とするシナプス応答。WT: TRPM7 チャンネルを過剰発現させた細胞をシナプス前細胞とするシナプス応答。siRNA: TRPM7 チャンネルを siRNA でノックダウンした細胞をシナプス前細胞とするシナプス応答。(c) EPSPs 振幅ヒストグラム。各実験群に活動電位を 910 回発生させて記録された EPSPs の振幅を 0.5 mV ごとに区分して測定された数 (%)。 (d) (c) に示した積算 EPSPs 振幅ヒストグラム (9-10 シナプスでの記録)。TRPM7 過剰発現 (赤) とコントロール (緑)、TRPM7 siRNA ノックダウン (青) とコントロール siRNA (水色) の差は、統計的に有意である。

うか。この疑問を解くために、1) シナプス小胞膜の TRPM7 チャンネルを過剰発現させる、2) シナプス小胞膜の TRPM7 チャンネルをノックダウンすることによる伝達物質放出変化の解析を試みた。1) は TRPM7 チャンネルの cDNA を、2) は TRPM7 チャンネルの siRNA を培養上頸交感神経節細胞に GFP をマーカーとしてトランスフェクションし¹⁵⁾、2 日後に GFP を発現している神経細胞をシナプス前細胞とするシナプス応答 (興奮性シナプス後電位、EPSP) を記録した (図 2A, B)。

低濃度 Ca^{2+} (0.2 mM) 溶液中で活動電位を発生させて、ゼロ~数個のシナプス小胞から放出される伝達物質で引き起こされるシナプス応答を記録すると、

TRPM7 チャンネルの発現量に依存してシナプス応答の振幅や時間経過が変化していた。TRPM7 チャンネル過剰発現では平均的振幅と時定数 (decay) が 1.3 倍に増大し、TRPM7 チャンネルノックダウンでは平均的振幅が 2/3 (64%) に、時定数 (decay) が 4/5 に減少していた。振幅値 (amplitude) の分散から素量分析して、個々のシナプス小胞からの伝達物質放出量 (素量) の変化を算出すると、TRPM7 チャンネル過剰発現では 1.5 倍に、TRPM7 チャンネルノックダウンでは 2/3 (64%) に減少していた。繰り返し活動電位を発生させて記録したシナプス応答の振幅ヒストグラムのピークは、コントロールに比べて TRPM7 チャンネル過剰発現では 0.5 mV 大きく、ノックダウンでは 0.5 mV 小さかった

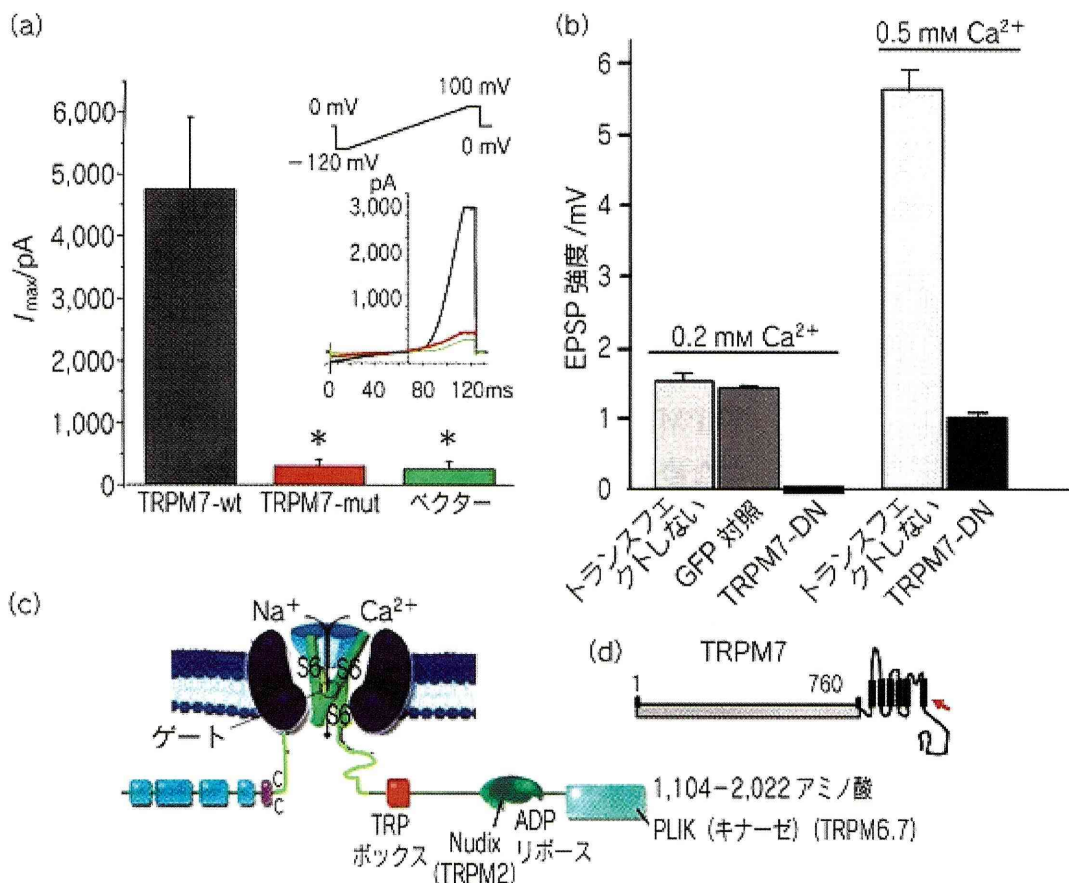


図 3 TRPM7 イオンチャネル機能

(a) TRPM7 の 1090-1092 アミノ酸 NLL を FAP に置換した TRPM7 イオンチャネルを CHO 細胞にトランスフェクションすると、イオン電流がほとんど記録されない (それぞれの実験群 6-8 例の平均値 ± 標準誤差)。(b) TRPM7 の 1090-1092 アミノ酸 (NLL) を FAP に置換したドミナートネガティブ TRPM7 イオンチャネルを培養上頸交感神経節細胞にトランスフェクションして、5 日後にシナプス応答を記録すると、0.2 mM Ca^{2+} 溶液中では EPSP は記録されないが、0.5 mM Ca^{2+} 溶液中では小さな EPSPs が記録され (それぞれの実験群 4-8 例の平均値 ± 標準誤差)、TRPM7 チャンネルイオン流入が EPSP の発生に必須であることを示唆する。(c) TRPM7 イオンチャネル模式図。細胞膜に発現する TRPM7 イオンチャネルは、4 つのサブユニットから形成される。細胞膜を 6 回貫通する部位でイオンチャネルが形成され、6 番目の S6 が孔中心部にフィルターを形成して Na^+ と Ca^{2+} を選択的に通過させる。アミノ末端は蛋白質と相互作用してチャネルを膜に固定する。カルボキシル末端には細胞内分子の結合部位があり、チャネル活性が調節される。(d) TRPM7 チャンネルのミューテーション (1090-1092 アミノ酸 NLL/FAP) は、赤矢印で示すように S6 セグメント端に施した。

(図 2C, D)。このような実験結果は、TRPM7 チャンネルが個々のシナプス小胞からの伝達物質放出を制御することを示唆する。

TRPM7 イオンチャンネル機能とアセチルコリンの放出

シナプス小胞からの伝達物質放出を制御するには、TRPM7 チャンネルをイオンが通過することが必要なのか、それとも、TRPM7 チャンネル蛋白質とシナプス小胞蛋白質との相互作用が機能するのか？ この疑問を解くためには、TRPM7 チャンネルのイオンチャンネル活性を消失させ、その結果引き起こされる伝達物質放出の変化を解析した。チャンネル形成部位に位置する 1090-1092 アミノ酸を NLL から FAP に置換したドミナントネガティブ (1090-1092 NLL→FAP) TRPM7 イオンチャンネルをコードする DNA をトランスフェクションした CHO 細胞では、膜電位依存性電流が消失した (図 3A)。また、培養上頸交感神経節シナプス前細胞へのドミナントネガティブ遺伝子トランスフェクション 5 日後 (注：図 2 に示した siRNA トランスフェクション 2 日後の TRPM7 チャンネルのノックダウンによる EPSP の減少は約 2/3 であったので、ドミナントネガティブ遺伝子操作は 5 日行うことにした) にシナプス応答を記録すると、0.2 mM Ca²⁺ 溶液中では観察されなかった。また、0.5 mM Ca²⁺ 溶液中ではシナプス応答は 21% に減少した (図 3B)。さらに、活動電位に反応して引き起こされる伝達物質放出の回数は、ほぼ 1/2 に減少した。以上の実験結果は、TRPM7 チャンネルをイオンが通過することがシナプス小胞からの伝達物質放出に必須であることを示唆する。

TRPM7 イオンチャンネルとスナッピンの相互作用

TRPM7 イオンチャンネルは、上述のように、シナプス小胞蛋白質のスナッピンと直接結合して、シナプス小胞蛋白質のシナプトタグミン 1、シナプシン 1 と複合体を形成するが、この複合体に v-SNARE のシナプトプレヴィンは含まれない。すなわち、TRPM7 チャンネルはシナプス小胞膜と神経終末膜の融合反応には関わらないと考えられる。では、スナッピンと TRPM7 チャンネルの相互作用は、伝達物質放出にどのように機能しているのだろうか？ この疑問を解くためには、スナッピンと TRPM7 チャンネルの結合を阻害したときに認められるアセチルコリンの放出変化を解析し

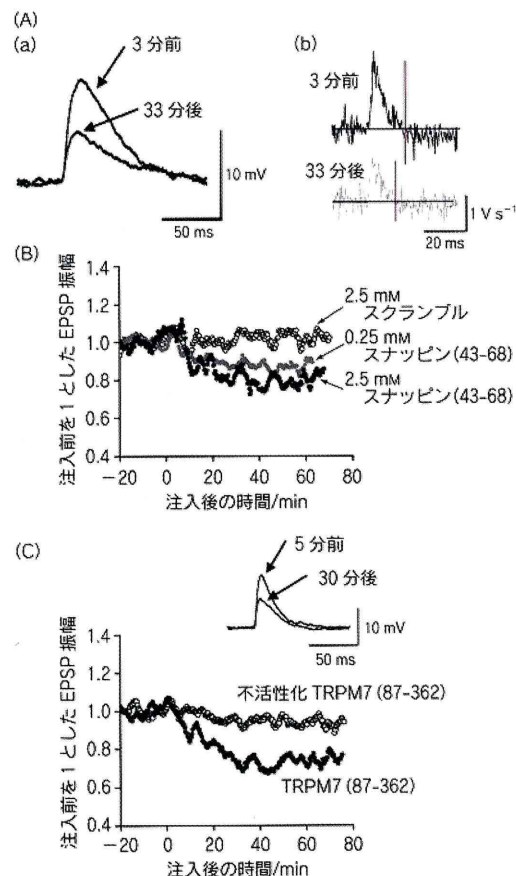


図 4 TRPM7 チャンネルとスナッピンの結合阻害とシナプス伝達

(A) スナッピン 43-68 アミノ酸フラグメントの培養交感神経節細胞シナプス前細胞導入 3 分前と 33 分後の EPSPs 記録 (a) とその一次微分波形 (b)。青線：基線、ピンク線：EPSP ピークまでの時間。(B) (C) スナッピン 43-68 アミノ酸フラグメント (B) と TRPM7 チャンネル 87-326 アミノ酸フラグメント (C) のシナプス前細胞導入による EPSPs 振幅変化 (それぞれの実験群 5-6 例の平均値)。20 秒ごとにシナプス前細胞に活動電位を発生させて EPSP を記録。20 分間の安定な記録の後に、スナッピン 43-68 アミノ酸フラグメント (細胞内導入用ガラス管中の濃度 0.25 あるいは 2.5 mM)、あるいは TRPM7 チャンネル 87-326 アミノ酸フラグメント (細胞内導入用ガラス管中の濃度 0.1 mM) を導入 (t=0)。(C) の挿入図は TRPM7 チャンネル 87-326 アミノ酸フラグメントのシナプス前細胞導入 5 分前と 30 分後の EPSPs 記録。

た。TRPM7 チャンネルとスナッピンの各フラグメントを用いた binding assay により TRPM7 チャンネルの 87-326 アミノ酸配列部位がスナッピンの 43-68 アミノ酸配列部位と結合すること、そして、これらの合成フラグメントをラット脳シナプス分画に加えると TRPM7 チャンネルとスナッピンとの結合を解離することを確認できたので、TRPM7 チャンネル 87-326 アミノ酸フラグメントとスナッピン 43-68 アミノ酸フラグメントをそれぞれ培養上頸交感神経節細胞に導入し

てシナプス応答変化を観察した。その結果、それぞれのフラグメントのシナプス前終末細胞への導入後に、シナプス応答のピークまでの時間の短縮 (図 4A) と、25-30% の振幅減少が認められた (図 4B, C)。スナッピン 43-68 アミノ酸配列を入れ換えたスクランブルペプチドや過熱処理して不活性化した TRPM7 チャンネル 87-326 アミノ酸フラグメントの注入では、このようなシナプス応答効果は観察されなかった (図 4B, C) ので、TRPM7 チャンネル 87-326 アミノ酸フラグメントとスナッピン 43-68 アミノ酸フラグメント導入による神経伝達物質放出減少効果は、シナプス小胞の TRPM7 チャンネルとスナッピンとの結合を特異的に阻害したために起こった現象であると考えられる。

シナプス小胞 TRPM7 イオンチャンネルモデル

TRPM7 イオンチャンネルは、シナプス小胞蛋白質スナッピンを介して、シナプス小胞開口放出を引き起こす機能を担う Ca^{2+} センサー蛋白質シナプトタグミン 1 やシナプス小胞をアクチンフィラメントに繋ぎとめるシナプス小胞蛋白質シナプシン 1 と複合体を形成することをすでに述べた。しかし、TRPM7 イオンチャンネルとシナプス小胞蛋白質との複合体形成における分子相互作用機序および生理機能はまだ不明で、今後の研究にその解明が期待される。これまでの我々の研究は、TRPM7 イオンチャンネルはアセチルコリンを含有するシナプス小胞に特異的に発現して、イオンコンダクタンス依存性に活動電位によって引き起こされるアセチルコリン放出を制御することを示した。この

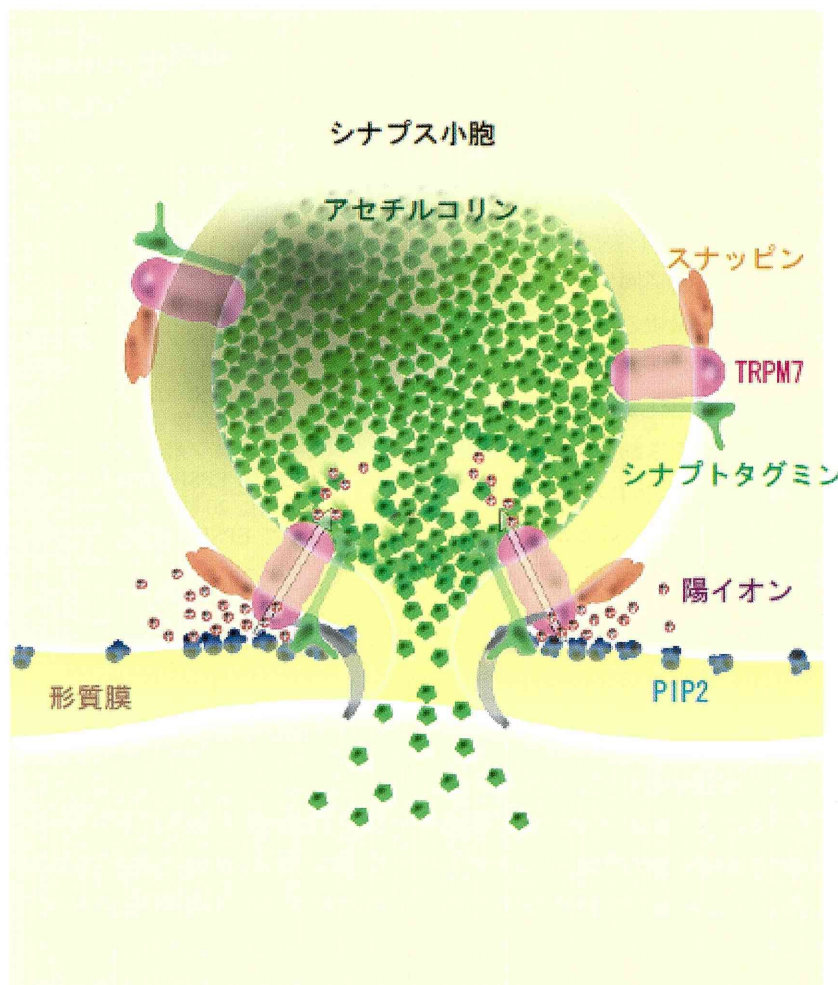


図 5 アセチルコリン含有シナプス小胞の伝達物質放出モデル
プラスに荷電したアセチルコリンはマイナス荷電を帯びた小胞内マトリックスに繋ぎ止められている。低 pH で、PIP2 によってシナプス小胞の TRPM7 チャンネルが活性化されると、陽イオン (Ca^{2+}) が小胞内に流入してプラスに荷電したアセチルコリンを押し出す。スナッピンと TRPM7 チャンネルの相互作用がシナプス小胞からアセチルコリンの放出に不可欠であるが、どんな機能を担っているかは未解析。シナプトタグミンは、シナプス前終末に流入した Ca^{2+} を感知してシナプス前終末膜とシナプス小胞膜の融合を駆動する。

結果を踏まえて、「活動電位による脱分極に伴って TRPM7 チャンネルが開口して流入した陽イオン (おもに Ca^{2+}) がシナプス小胞内のマイナスに荷電したイオン交換マトリックスに結合しているアセチルコリンと置き換わって、アセチルコリンが稼動可能になる」という TRPM7 チャンネルモデル (図 5)¹⁰⁾¹³⁾ が提示された。この仮説は、シナプス小胞からシナプス間隙への伝達物質放出が拡散ではなくてイオンの流入によって駆動されるという、新しい伝達物質放出メカニズムを提示している。また、TRPM7 チャンネルの開口には PIP2 が必要であるが、シナプス小胞に PIP2 は存在しないことから、シナプス小胞膜が形質膜に接すると形質膜にある PIP2 によってシナプス小胞の TRPM7 チャンネルが開口すると考えられる。さらに、シナプス小胞内の pH (5.5) は TRPM7 チャンネルを活性化しやすいが、シナプス小胞開口によって pH は上昇し (7.4)、TRPM7 チャンネルは不活性化されると考えられる。

共同研究者の Clapham 博士と Krapivinsky 博士らは、アセチルコリンを含有する PC12 細胞のシナプス小胞に pH 感受性 GFP を付けたアセチルコリン輸送体と TRPM7 イオンチャンネルを発現させて TIRF (total internal reflection fluorescence) で個々のシナプス小胞の開口をモニターして、TRPM7 チャンネルを過剰発現した PC12 細胞では脱分極による小胞開口頻度が増加、TRPM7 チャンネルのノックダウンあるいはチャンネル機能の損失では小胞開口頻度が減少することを確認した¹⁶⁾。上頸交感神経節細胞シナプスでも、活動電位に反応して引き起こされる伝達物質放出の回数は、TRPM7 チャンネルのノックダウンあるいはチャンネル機能の損失で減少した⁹⁾。これらの結果は、シナプス小胞と形質膜への融合に TRPM7 チャンネルからの陽イオン流入が必要であることも示唆する。

おわりに

神経伝達物質放出機序に関する仮説は、Katz らによって 1950 年代から電気生理学的手法を用いた実験により提示された Ca^{2+} 説 (活動電位に伴う脱分極によって開口する Ca^{2+} チャンネルから流入する Ca^{2+} が伝達物質放出を引き起こす)、量子 (小胞) 仮説 [運動神経終末では、微小終板電位を発生させるアセチルコリン量を 1 単位 (1 小胞) としてその単位のいくつかが同期して放出される] から、Rothman や Südhof を代表とする多くの蛋白質機能解析研究者によって

1990 年代に提示された蛋白質によって制御される SNARE 仮説 (小胞 SNARE 蛋白と標的器官 SNARE 蛋白との複合体が小胞膜と標的膜の融合装置として働く)、 Ca^{2+} センサー説 (シナプス小胞のシナプトタグミンへの Ca^{2+} の結合がシナプス小胞の開口をトリガーする) へと発展した。さらに最近、 Ca^{2+} 流入からシナプス小胞開口放出の 1 m 秒以内に起こる SNARE 蛋白質とその調節機能分子とシナプス小胞の動態の時空間的变化が明らかにされてきている¹⁷⁾。また、kiss-and-run 等のシナプス小胞からの伝達物質放出量の異なる開口様式も可視化され⁷⁾⁸⁾¹⁸⁾¹⁹⁾、解析が行われている。本稿で紹介した TRPM7 イオンチャンネルは、プラスに荷電した伝達物質放出量を時間的に制御する (短時間に放出する) 機能分子として働いていると考えられるが、今後マイナスに荷電した伝達物質放出のための機能分子の解析が待望される。

引用文献

- 1) Takamori S, Holt M, Stenius K, Lemke EA, Grønborg M, Riedel D, Urlaub H, Schenck S, Brügger B, Ringler P, Müller SA, Rammner B, Gräter F, Hub JS, De Groot BL, Mieskes G, Moriyama Y, Klingauf J, Grubmüller H, Heuser J, Wieland F, Jahn R: Molecular anatomy of a trafficking organelle. *Cell* **127**: 831-846, 2006
- 2) Südhof TC: The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein-protein interactions. *Nature* **375**: 645-653, 1995
- 3) Südhof TC: The synaptic vesicle cycle. *Annu Rev Neurosci* **27**: 509-547, 2004
- 4) Rothman JE, Warren G: Implications of the SNARE hypothesis for intracellular membrane topology and dynamics. *Curr Biol* **4**: 220-233, 1994
- 5) Wojcik SM, Brose N: Regulation of membrane fusion in synaptic excitation-secretion coupling: speed and accuracy matter. *Neuron* **55**: 11-24, 2007
- 6) Krapivinsky G, Mochida S, Krapivinsky L, Cibulsky SM, Clapham DE: The TRPM7 ion channel functions in cholinergic synaptic vesicles and affects transmitter release. *Neuron* **52**: 485-496, 2006
- 7) Stevens CF, Williams JH: "Kiss and run" exocytosis at hippocampal synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 12828-12833, 2000
- 8) Harata NC, Aravanis AM, Tsien RW: Kiss-and-run and full-collapse fusion as modes of exo-endocytosis in neurosecretion. *J Neurochem* **97**: 1546-1570, 2006
- 9) Aravanis AM, Pyle JL, Tsien RW: Single synaptic

- vesicles fusing transiently and successively without loss of identity. *Nature* **423**: 643-647, 2003
- 10) Rahamimoff R, Fernandez JM: Pre- and post-fusion regulation of transmitter release. *Neuron* **18**: 17-27, 1997
 - 11) Nanavati C, Fernandez JM: The secretory granule matrix: a fast-acting smart polymer. *Science* **259**: 963-965, 1993
 - 12) Reigada D, Díez-Pérez I, Gorostiza P, Verdaguer A, Gómez de Aranda I, Pineda O, Vilarrasa J, Marsal J, Blasi J, Aleu J, Solsona C: Control of neurotransmitter release by an internal gel matrix in synaptic vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 3485-3490, 2003
 - 13) Montell C: An exciting release on TRPM7. *Neuron* **52**: 395-397, 2006
 - 14) Clapham DE: TRP channels as cellular sensors. *Nature* **426**: 517-524, 2003
 - 15) Ma H, Mochida S: A cholinergic model synapse to elucidate protein function at presynaptic terminals. *Neurosci Res* **57**: 491-498, 2007
 - 16) Braucgi S, Krapivinsky G, Krapivinsky L, Clapham DE: TRPM7 facilitates cholinergic vesicle fusion with the plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 8304-8308
 - 17) 持田澄子: 神経伝達物質の放出機構、生理学雑誌 **70**: 78-86, 2008
 - 18) Harata NC, Choi S, Pyle JL, Aravanis AM, Tsien RW: Frequency-dependent kinetics and prevalence of kiss-and-run and reuse at hippocampal synapses studied with novel quenching methods. *Neuron* **49**: 243-256, 2006
 - 19) Gandhi SP, Stevens CF: Three modes of synaptic vesicular recycling revealed by single-vesicle imaging. *Nature* **423**: 607-613, 2003