

# LECTURES

## 教育講座

### 「神経伝達物質の放出機構」

東京医科大学細胞生理学講座

持田 澄子

#### 要 旨

神経シナプス前終末への活動電位到達によって開口した膜電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルから  $\text{Ca}^{2+}$  が流入すると、数十～数百  $\mu$  秒のうちにシナプス小胞からシナプス間隙に神経伝達物質が放出される。小胞膜と形質膜とが融合するこのシナプス小胞開口放出過程では、SNARE 蛋白質と  $\text{Ca}^{2+}$  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が、次々にシナプス前終末へ到達する活動電位で引き起こされる伝達物質放出に備えてシナプス小胞の動態は様々な蛋白質機能分子によって制御されている。

#### 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  $\text{A}\alpha$  線維では 10  $\mu$  秒の間に、C 線維であっても 1m 秒の間にほぼ 1m 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、中枢神経での伝達物質放出は数十～数百  $\mu$  秒のうちに起こる。そこで、シナプス前神経終末では、活動電位が到達して膜電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$  チャネル開口による  $\text{Ca}^{2+}$  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と考えられる。

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ヴ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、 $\text{Ca}^{2+}$  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] (図 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、アクティヴゾーンにおけるシナプス小胞の一連の動態は、SNARE 蛋白質複合体 (図 2) と高濃度  $\text{Ca}^{2+}$  を感知するシナプトタグミン (図 3) が鍵機能分子として働いていると考えられてきた [2, 3]。神経伝達物質放出のスピードと時空間的調節を考えた最近の所見では、SNARE 蛋白質複合体とシナプトタグミンに加えて、Munc13, Mun18, コンプレキシシン, トモシンなどの機能が注目されている [5]。さらに、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示唆され [6]、 $\text{Ca}^{2+}$  流入から伝達物質放出という数十～数百  $\mu$  秒の時間に様々な蛋白質が順次機能していると考え

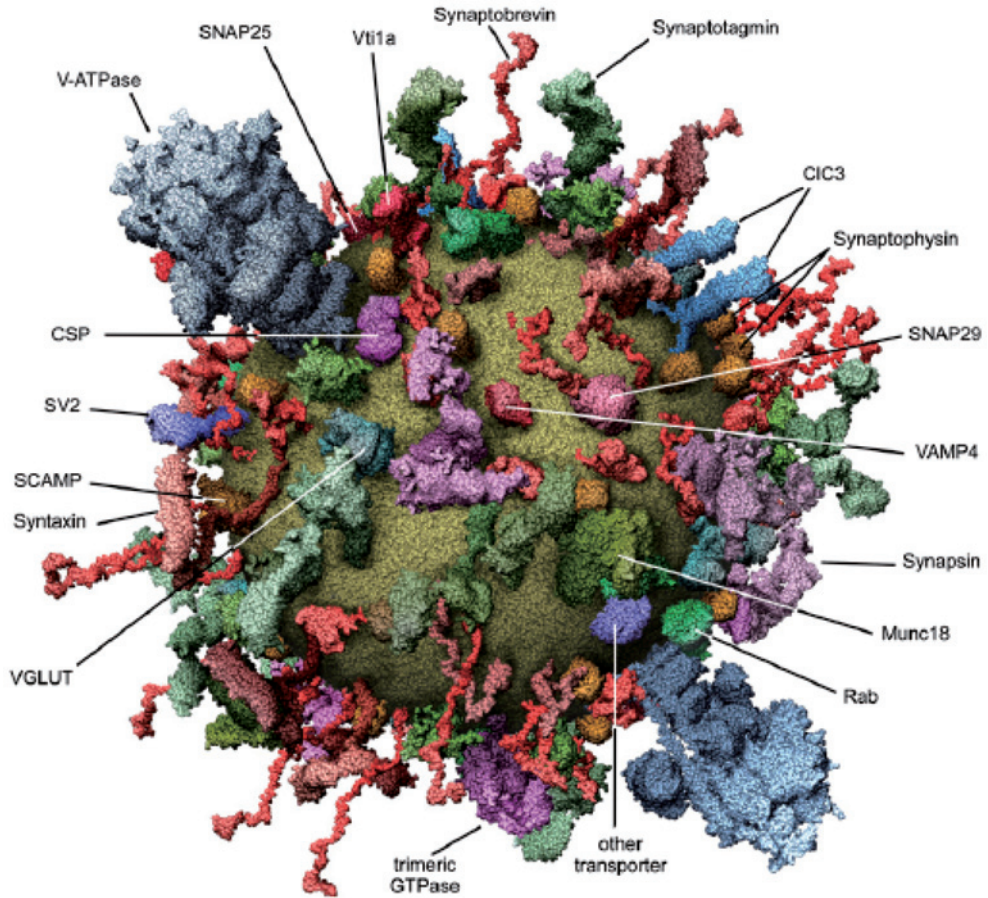


図1. シナプス小胞蛋白質 [1]

ひとつのシナプス小胞に存在する平均的な蛋白質分子 [1]. シナプトブレヴィンは最も多く~70分子が、シナプトタグミンは~15分子、rab3Aは~10分子が発現する。

られる。

## I. 神経伝達物質放出準備

### SNARE 蛋白質複合体

細胞内蛋白質輸送、およびエンドサイトーシスは、各オルガネラの構成膜及び形質膜からなる小胞を用いて行われている。SNARE 蛋白質複合体は、輸送される小胞とそれを受け取るオルガネラとの融合に必須な蛋白質複合体として、酵母のゴルジ器官蛋白質輸送に見出されていたが、シナプス小胞開口放出にも関わるとしてSNARE 仮説が提唱された [4]。SNARE [soluble NSF (N-

ethylmaleimide-sensitive factor) attachment protein receptor] core 複合体は、小胞蛋白質 (v-SNARE) と標的器官蛋白質 (t-SNARE) からなり、それぞれの isoform 特異的に、酵母から哺乳動物 [4]、また植物 [7] でも細胞内小胞輸送に関わる。これらの蛋白質の SNARE motif と名づけられた領域 (図2参照) の中央に位置するアミノ酸はほとんどの SNARE 蛋白質に共通しており、グルタミンの Q-SNARE、アルギニンの R-SNARE とに分類される [8]。小胞が標的器官に到達すると3本の Q-SNARE と1本の R-SNARE からなる4本の  $\alpha$ -ヘリックス複合体が形成され、小胞が標

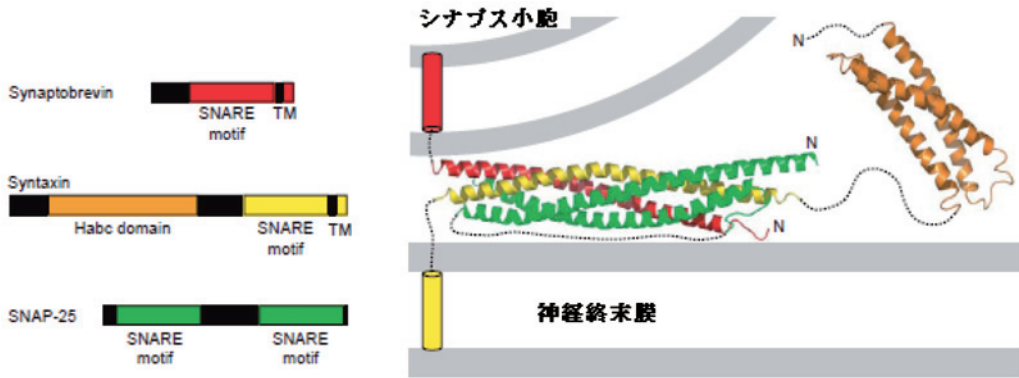


図2. 膜融合装置として機能する SNARE 蛋白質 [45]

シナプス小胞蛋白質のシナプトブレヴィン (赤) と、形質膜蛋白質のシntaxin 1 (黄) と SNAP-25 (緑) は、SNARE [soluble NSF (N-ethylmaleimide-sensitive factor) attachment protein receptor] 蛋白質と呼ばれ [1, 4], それぞれの SNARE motif を介して 4 本の  $\alpha$ -ヘリックス複合体が形成され [45] (右), シナプス小胞が神経終末膜に融合すると提唱されている。

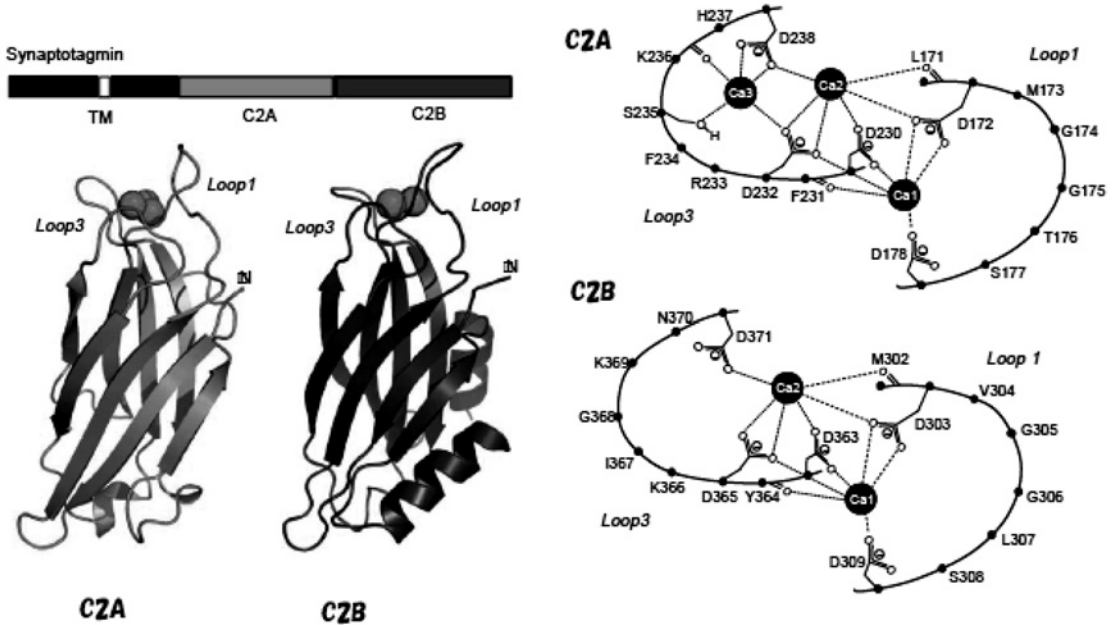


図3.  $\text{Ca}^{2+}$  センサーとして機能するシナプトタグミン 1 [46]

シナプス小胞蛋白質のシナプトタグミン 1 は活動電位によって引き起こされる同期性神経伝達物質に  $\text{Ca}^{2+}$  センサーとして機能する。  $\text{Ca}^{2+}$  は、 2 つの C2 領域の C2A と C2B の Loop1 と Loop3 に結合する [46]。

的器官の膜に融合すると推測されている。SNARE core 複合体は安定であり、ATP-ase である NSF (N-ethylmaleimide-sensitive factor) と  $\alpha$ -SNAP

(soluble NSF attachment protein) の結合により解離される。

シナプス小胞開口放出に関わる SNARE 蛋白質

は、小胞蛋白質シナプトブレヴィン(VAMP2)(図1)と形質膜蛋白質シタキシン1とSNAP-25(synaptosome associated protein 25kDa)である(図2)。シナプトブレヴィンは、1つのシナプス小胞に~70分子もの存在が確認されているが[1]、シタキシン1とSNAP-25のアクティヴゾーン密度はまだ報告されていない。シナプトブレヴィンやSNAP-25を欠いても自発的放出は起こる[5]。しかし、破傷風毒素やボツリヌス毒素で切断されると活動電位で誘引される神経伝達物質放出が阻害される[9,10]ことから、これら3つのSNARE蛋白質が同期性伝達物質放出に必須である。

### SNARE蛋白質複合体形成の機能因子

シナプス小胞がアクティヴゾーンに結合し(ドッキング)、SNARE core複合体(以下SNARE蛋白質複合体)がCa<sup>2+</sup>の流入に備えていつでも膜融合を引き起こせる状態になる(プライミング)という2つのシナプス小胞過程を考えて、Munc18[11]がドッキングに、Munc13[12]がプライミングに機能分子として働くと考えられていた。しかし、最近では、ドッキング、プライミングがSNARE蛋白質複合体形成の前後の過程に区別されるのではなく、SNARE蛋白質複合体の形成を制御する過程であると考えられている。

KOマウスを用いた解析ではMunc13[12]やMunc18[13]がアクティヴゾーンに存在しないと神経伝達物質は起こらないことから、これらの分子の重要性がわかる。Munc18はシタキシン1に高親和性を示し、アミノ末端側が閉じたシタキシン1に結合してSNARE複合体の形成を阻害する因子としてまず報告された[14]。しかし、遺伝子欠損動物を用いた実験結果[13]はMunc18が伝達物質放出を促す因子であることを示唆する。最近、SNAP-25とシタキシン1が結合している膜サンプルにシナプトブレヴィンを加えるとシタキシン1に結合したMunc18がシナプトブレヴィンと置き換わる[15]ことが示され、さらに、シタキシン1/SNAP-25とシナプトブレヴィン挿入りポゾームの融合がMunc18のプレインキュベーションで促進される[16]ことから、

Munc18はSNARE蛋白質複合体形成を促進する機能分子であると考えられている(図4A→B)。

Munc13の欠損によりreadily releasable pool(RRP, 活動電位に伴って流入するCa<sup>2+</sup>に反応して伝達物質放出が可能なシナプス小胞)が減少するが、アクティヴゾーンにドッキングしたシナプス小胞数には変化がないことから、Munc13はプライミング機能分子と考えられていた[17]。しかし、解析技術の向上によって、アクティヴゾーンのシナプス小胞数の減少が確認され[18]、シナプス小胞をドッキングとプライミングという過程に分類することが疑問視されてきている。Munc13の機能発現には、アミノ末端側が開いたシタキシン1と結合することが必要であると考えられている[19](図4B')。トモシンはカルボキシル末端のSNARE motifでシタキシン1とSNAP-25の複合体を形成するが[20]、シナプトブレヴィンはこの複合体に合体できないことから、トモシンがSNARE蛋白質複合体を介したシナプス小胞のアクティヴゾーンへの固定を阻害していると考えられる(図4A')。トモシン欠損シナプスでは過剰なドッキング小胞が観察され、トモシン/Munc13欠損シナプスではドッキング小胞がレスキューされることから、トモシンとMunc13のSNARE蛋白質との相互作用が小胞のドッキングからプライミングへの進展に関与し、これらがSNARE蛋白質複合体形成の制御機能分子であることが示唆される。

Munc13は、シナプス小胞蛋白質のrab3(Ras GTPase)とアクティヴゾーン蛋白質のRIM(rab3-interacting-molecule)とも複合体を作る[21](図4C')。RIM欠損あるいはRIM結合部位を欠くMunc13を発現させたシナプスでは伝達物質放出が阻害され[22]、これらの3分子複合体形成によってMunc13とシナプス小胞がアクティヴゾーンに、さらにRIMによってCa<sup>2+</sup>チャネルにリンクされる[23,24]と示唆されている。

### SNARE蛋白質複合体の形成

前述したように、シナプス小胞と形質膜の間に形成される非常に安定なtrans-SNARE蛋白質複合体は、膜融合装置であると考えられてきた。し

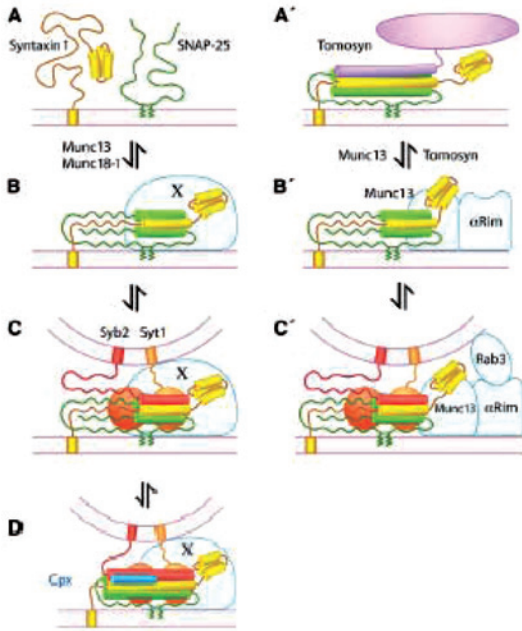


図4.  $\text{Ca}^{2+}$  流入に備えてのSNARE蛋白質複合体モデル [5]

形質膜蛋白質のシタキシン1 (黄) と SNAP-25 (緑) (A) の複合体は、トモシンが結合するとシナプス小胞蛋白質のシナプトプレヴィンとのSNARE蛋白質複合体は形成されないが (A'), Munc13とMunc18の結合でシナプス小胞を固定させる (ドッキングする) ための蛋白質複合体Xが形成されると (B), あるいは、トモシンがMunc13と置き換わるとMunc13と $\alpha$ RIMの結合を介してアクティヴゾーンに収まる (B'). 蛋白質複合体Xは、SNARE蛋白質複合体形成を促進して、シナプス小胞をアクティヴゾーンにドッキングさせる (C). この過程には、アクティヴゾーン蛋白質のMunc13と $\alpha$ RIMとシナプス小胞蛋白質Rab3が関わる可能性が高い (C'). その後、SNARE蛋白質複合体のジッパリングが完了し、コンプレキシンが結合して $\text{Ca}^{2+}$  流入に備える (D). 隣接するシナプトタグミンは、 $\text{Ca}^{2+}$  流入によってコンプレキシンと入れ替わり、SNARE蛋白質複合体を介する膜融合を起こす. Syb2: シナプトプレヴィン, Syt1: シナプトタグミン, Cpx: コンプレキシン.

しかし、*in vitro* でのシナプトプレヴィンを含むリン脂質二重膜小胞とシタキシン1とSNAP-25を含むリン脂質二重膜小胞の融合実験では、それぞれの小胞融合には数時間を要し[25]、生体内での数十～数百 $\mu$ 秒という反応速度を反映しない。こ

のようなSNARE蛋白質複合体の形成に要する時間の不一致を説明する *in vitro* での実験データが最近報告された。それは、「すでに形成されたt-SNAREのシタキシン1とSNAP-25との複合体に、シナプトプレヴィンのアミノ末端部位が結合して安定化している状態では(図4C), 1m秒のうちにアミノ末端からカルボキシル末端へ向けたジッパリング (Zippering; 4本の $\alpha$ ヘリックス複合体形成) が起こる」というものである。SNARE蛋白質複合体は $\text{Ca}^{2+}$ チャンネルにリンクされ[26]、 $\text{Ca}^{2+}$ の流入に備える [27].

#### $\text{Ca}^{2+}$ の流入に備えたSNARE蛋白質複合体の制御

アクティヴゾーンでの $\text{Ca}^{2+}$ の急増に応じて1m秒内に起こる生体内での神経伝達物質放出反応を考えると、SNARE蛋白質複合体の形成後に起こる膜融合を阻止している (クランプしている) 分子が機能している可能性が高い。シナプトタグミン1欠損ショウジョウバエの神経筋接合部では伝達物質の同期性放出が消失して自発性放出が増加することからシナプトタグミン1がクランプ分子である[28]と報告されたが、異論も多くあった。しかし、Chenら[29]の報告以来、コンプレキシンがSNARE蛋白質のジッパリング後の反応をクランプする (図4D) という報告が続出して [30, 31], 最近の話題となっている。Girarudoらは、完全に合体したSNARE蛋白質複合体とコンプレキシンが1:1の割合で結合して膜融合が起こらないように阻止しながら $\text{Ca}^{2+}$ の流入に備えていて、 $\text{Ca}^{2+}$ が流入するとコンプレキシンがシナプトタグミン1と置き換わり、膜融合反応に突入することを確認した。さらに、ショウジョウバエやマウスのコンプレキシンが小胞膜と神経終末膜が混合し始める膜半融合 (hemifusion) から膜融合 (fusion) に移行する過程を阻害していることがSchaubらによって示されている[31]。しかし、コンプレキシン欠損マウスでもシナプス小胞膜融合が増強されることはなく同期的伝達物質放出が減少するが、 $\text{Ca}^{2+}$ 増加やコンプレキシン再発現によって伝達物質放出減少の回復が見られた [32] との遺伝子解析実験結果は、コンプレキシンのクランプ機

能分子説を支持するものではない。Tangらは $\text{Ca}^{2+}$ がシナプトタグミン1に結合するとSNARE蛋白質複合体に結合したコンプレキシンを解離してシナプトタグミン1が結合することを報告している[33]。さらに、コンプレキシンがシナプトブレヴィンに結合していると、 $\text{Ca}^{2+}$ 依存性のシナプス小胞開口放出が阻害されることも見出ししており[33]、 $\text{Ca}^{2+}$ に反応して直ちに膜融合を起こしうる準安定なSNARE蛋白質複合体をコンプレキシンがクランプしていると提案している(図4D)。コンプレキシンは、活動電位に同期される速い神経伝達物質放出を制御する機能分子である可能性が高い。

## II. 神経伝達物質放出

### $\text{Ca}^{2+}$ チャネルとシナプス小胞の接合

Heuserらによって示されたシナプス終末膜内側断面像は、アクティヴゾーンのシナプス小胞が $\text{Ca}^{2+}$ チャネルに隣接して配置されていることを示唆した[34]。さらに、SNARE蛋白質やシナプス小胞蛋白質のCSPおよびシナプトタグミン1、アクティヴゾーン蛋白質のRIMが $\text{Ca}^{2+}$ チャネルと結合することが確認され[35]、神経伝達物質放出が短時間で起こるように空間的制御がなされていることがわかる。とくに、SNARE蛋白質[26]との結合が阻害されると伝達物質放出が活動電位に非同期して起こり、同期性伝達物質放出がシナプス小胞の位置に依存することが確認されている[27]。

### $\text{Ca}^{2+}$ 結合蛋白質シナプトタグミンの機能

多数のisoformの中で最も性質が明らかにされているシナプトタグミン1は、アミノ末端側でシナプス小胞膜を貫通し、カルボキシル末端のC2AとC2Bと呼ばれる領域で $\text{Ca}^{2+}$ をキャッチして(図3)、リン脂質と結合することから伝達物質放出のための $\text{Ca}^{2+}$ 感知蛋白質と考えられている[36]。シナプトタグミン1欠損シナプスでは、活動電位に同期して起こる $\text{Ca}^{2+}$ 依存性の伝達物質放出は阻害される[5]。さらに、シナプトタグミン1は $\text{Ca}^{2+}$ 依存性にSNARE蛋白質複合体とも結合する[33]ことが確認されている。

最近の機能解析では、シナプトタグミン1のC2Bが $\text{Ca}^{2+}$ 依存性の伝達物質放出に関わり[37]、マイナスに荷電しているリン脂質との結合を介して、2つのリン脂質膜を4nmほどに接近させることがAracらによって示された[38](図5)。1つのシナプス小胞には15分子のシナプトタグミン1が確認されている[1]。Aracらは、いくつかのC2Bがリング状にSNARE蛋白質複合体の中心に配置されて膜融合孔を形成するモデルを提唱している[38](図5)。また、Martensらは、リボゾームに挿入された複数のC2領域に $\text{Ca}^{2+}$ が結合すると、2つのループ(図3、Loop1とLoop3)がマイナスの脂質に引かれて膜に陥入して膜を湾曲させ、SNARE蛋白質を介する膜融合を起こすことを示した[39]。これらの現象は、シナプトタグミン1がSNARE蛋白質複合体の形成後に複合体と相互作用しながら、シナプス小胞膜と神経終末膜に作用して融合させることを示唆し、 $\text{Ca}^{2+}$ をキャッチしたシナプトタグミン1とSNARE蛋白質複合体とシナプス小胞の時間的・空間的变化が明らかとなってきた。

### シナプス小胞チャネルの機能

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[40,41]。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?このような疑問に対する小胞からの伝達物質放出制御が最近明らかにされた[6,42]。シブレエ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[43]。さらに、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、活動電位によってひとつのシナプス小胞から放出されるアセチルコリン量がTRPM7チャネルの発現量に依存することを筆者がKrapivinskyらと確認した[6]。プラスに荷電した伝達物質の積極的な放出制御モデルがKrapivinskyらによって提示さ

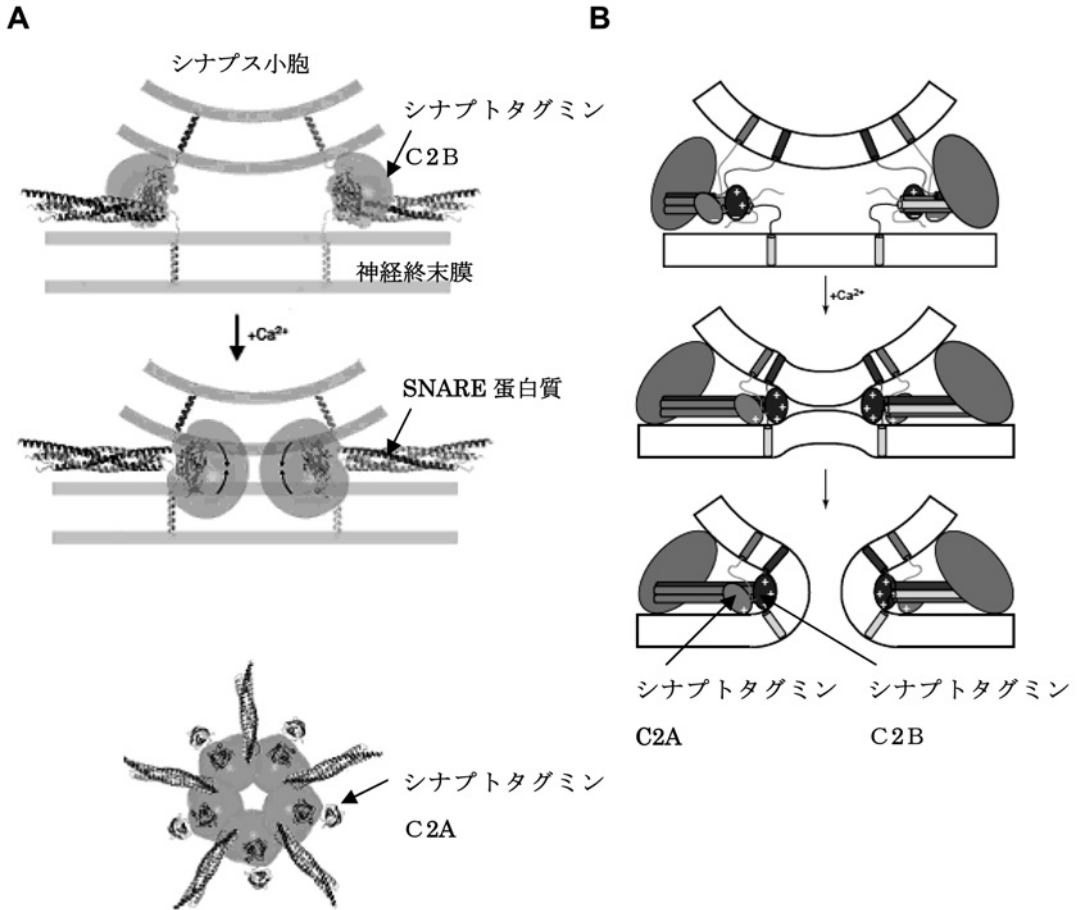


図5. シナプトタグミン1とSNARE蛋白質複合体のアレンジメントモデル [38, 46]  
 このモデルでは、 $\text{Ca}^{2+}$ 流入に備えてジッパーリングが不完全なSNARE蛋白質複合体とシナプトタグミンのC2B領域とが結合している(図4参照)。 $\text{Ca}^{2+}$ 流入によってSNARE蛋白質複合体ジッパーリングが完了し、プラスに荷電したシナプトタグミンC2B領域がSNARE蛋白質複合体から外れてシナプス小胞膜と神経終末膜のマイナスに荷電したリン脂質と結合して膜を接近させ(A中、矢印)、いくつかのC2Bがリング状にSNARE蛋白質複合体の中心に配置されて膜融合孔を形成する(A下)[38]。あるいは、シナプトタグミンC2AとC2B領域のループ(図3参照)がシナプス小胞膜と形質膜のマイナスの脂質に引かれて膜に陥入して膜を湾曲させ(B中)、SNARE蛋白質複合体を介する膜融合を起こす(B下)。

れた[44]が、グルタミン酸、グリシン、GABAなどの伝達物質の放出制御メカニズムはまだ明らかにされていない。

#### おわりに

神経伝達物質放出機序の解析は、Katzらによって1950年代から電気生理学的手法を用いて明らかにされた神経伝達物質放出機構( $\text{Ca}^{2+}$ 説、量子仮

説)、そして、RothmanやSüdhofをはじめとした多くの蛋白質機能解析によって1990年代に明らかにされた蛋白質による神経伝達物質放出機構(SNARE仮説、 $\text{Ca}^{2+}$ センサー説)と発展した。さらに現代、 $\text{Ca}^{2+}$ 流入からシナプス小胞開口放出の1m秒以内に起こるSNARE蛋白質、その調節機能分子とシナプス小胞の動態の時空間的変化が動画を見るように明らかにされてきている。本稿で

は取り上げられなかったが、シナプス小胞の kiss-and-run 等の開口様式 [40, 41] も可視化され、解析が進んでいる。

## 文 献

1. Takamori S, et al: Molecular anatomy of a trafficking organelle. *Cell* **127**: 831–846, 2006
2. Sudhof TC: The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein-protein interactions. *Nature* **375**: 645–653, 1995
3. Sudhof 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. Kargul J, Gansel X, Tyrrell M, Sticher L & Blatt MR: Protein-binding partners of the tobacco syntaxin NtSyr1. *FEBS Lett* **508**: 253–258, 2001
8. Fasshauer D, Sutton RB, Brunger AT & Jahn R: Conserved structural features of the synaptic fusion complex: SNARE proteins reclassified as Q- and R-SNAREs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 15781–15786, 1998
9. Montecucco C & Schiavo G: Tetanus and botulinum neurotoxins: a new group of zinc proteases. *Trends Biochem Sci* **18**: 324–327, 1993
10. Jahn R & Niemann H: Molecular mechanisms of clostridial neurotoxins. *Ann N Y Acad Sci* **733**: 245–255, 1994
11. Aalto MK, Keranen S & Ronne H: A family of proteins involved in intracellular transport. *Cell* **68**: 181–182, 1992
12. Brose N, Hofmann K, Hata Y & Sudhof TC: Mammalian homologues of *Caenorhabditis elegans* unc-13 gene define novel family of C2-domain proteins. *J Biol Chem* **270**: 25273–25280, 1995
13. Verhage M, et al: Synaptic assembly of the brain in the absence of neurotransmitter secretion. *Science* **287**: 864–869, 2000
14. Dulubova I, et al: A conformational switch in syntaxin during exocytosis: role of munc18. *Embo J* **18**: 4372–4382, 1999
15. Zilly FE, Sorensen JB, Jahn R & Lang T: Munc18-bound syntaxin readily forms SNARE complexes with synaptobrevin in native plasma membranes. *PLoS Biol* **4**: e330, 2006
16. Shen J, Tareste DC, Paumet F, Rothman JE & Melia TJ: Selective activation of cognate SNAREpins by Sec1/Munc18 proteins. *Cell* **128**: 183–195, 2007
17. Augustin I, Rosenmund C, Sudhof TC & Brose N: Munc13-1 is essential for fusion competence of glutamatergic synaptic vesicles. *Nature* **400**: 457–461, 1999
18. Weimer RM, et al: UNC-13 and UNC-10/rim localize synaptic vesicles to specific membrane domains. *J Neurosci* **26**: 8040–8047, 2006
19. Stevens DR, et al: Identification of the minimal protein domain required for priming activity of Munc13-1. *Curr Biol* **15**: 2243–2248, 2005
20. Pobbati AV, Razeto A, Boddener M, Becker S & Fasshauer D: Structural basis for the inhibitory role of tomosyn in exocytosis. *J Biol Chem* **279**: 47192–47200, 2004
21. Dulubova I, et al: A Munc13/RIM/Rab3 tripartite complex: from priming to plasticity? *Embo J* **24**: 2839–2850, 2005
22. Betz A, et al: Functional interaction of the active zone proteins Munc13-1 and RIM1 in synaptic vesicle priming. *Neuron* **30**: 183–196, 2001
23. Coppola T, et al: Direct interaction of the Rab3 effector RIM with Ca<sup>2+</sup> channels, SNAP-25, and synaptotagmin. *J Biol Chem* **276**: 32756–32762, 2001
24. Kiyonaka S, et al: RIM1 confers sustained activity and neurotransmitter vesicle anchoring to presynaptic Ca<sup>2+</sup> channels. *Nat Neurosci* **10**: 691–701, 2007
25. Weber T, et al: SNAREpins: minimal machinery for membrane fusion. *Cell* **92**: 759–772, 1998
26. Sheng ZH, Rettig J, Cook T & Catterall WA: Calcium-dependent interaction of N-type calcium channels with the synaptic core complex. *Nature* **379**: 451–454, 1996
27. Mochida S, Sheng ZH, Baker C, Kobayashi H & Catterall WA: Inhibition of neurotransmission by peptides containing the synaptic protein interaction site of N-type Ca<sup>2+</sup> channels. *Neuron* **17**: 781–788, 1996
28. Littleton JT, Stern M, Schulze K, Perin M & Bellen HJ: Mutational analysis of *Drosophila* synaptotagmin demonstrates its essential role in Ca<sup>2+</sup>-activated neurotransmitter release. *Cell* **74**: 1125–1134, 1993
29. Chen X, et al: Three-dimensional structure of the complexin/SNARE complex. *Neuron* **33**: 397–409, 2002
30. Giraudo CG, Eng WS, Melia TJ & Rothman JE: A clamping mechanism involved in SNARE-dependent exocytosis. *Science* **313**: 676–680, 2006
31. Schaub JR, Lu X, Doneske B, Shin YK & McNew JA: Hemifusion arrest by complexin is relieved by Ca<sup>2+</sup>-synaptotagmin I. *Nat Struct Mol Biol* **13**: 748–750, 2006

32. Reim K, et al: Complexins regulate a late step in  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent neurotransmitter release. *Cell* **104**: 71–81, 2001
33. Tang J, et al: A complexin/synaptotagmin 1 switch controls fast synaptic vesicle exocytosis. *Cell* **126**: 1175–1187, 2006
34. Heuser JE, et al: Synaptic vesicle exocytosis captured by quick freezing and correlated with quantal transmitter release. *J Cell Biol* **81**: 275–300, 1979
35. Evans RM & Zamponi GW: Presynaptic  $\text{Ca}^{2+}$  channels—integration centers for neuronal signaling pathways. *Trends Neurosci* **29**: 617–624, 2006
36. Brose N, Petrenko AG, Sudhof TC & Jahn R: Synaptotagmin: a calcium sensor on the synaptic vesicle surface. *Science* **256**: 1021–1025, 1992
37. Mackler JM, Drummond JA, Loewen CA, Robinson IM & Reist NE: The C2B  $\text{Ca}^{2+}$ -binding motif of synaptotagmin is required for synaptic transmission in vivo. *Nature* **418**: 340–344, 2002
38. Arac D, et al: Close membrane-membrane proximity induced by  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent multivalent binding of synaptotagmin-1 to phospholipids. *Nat Struct Mol Biol* **13**: 209–217, 2006
39. Martens S, Kozlov MM & McMahon HT: How synaptotagmin promotes membrane fusion. *Science* **316**: 1205–1208, 2007
40. Stevens CF & Williams JH: “Kiss and run” exocytosis at hippocampal synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 12828–12833, 2000
41. 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
42. Nanavati C & Fernandez JM: The secretory granule matrix: a fast-acting smart polymer. *Science* **259**: 963–965, 1993
43. Reigada D, et al: Control of neurotransmitter release by an internal gel matrix in synaptic vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 3485–3490, 2003
44. Montell C: An exciting release on TRPM7. *Neuron* **52**: 395–397, 2006
45. Sutton RB, Fasshauer D, Jahn R & Brunger AT: Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. *Nature* **395**: 347–353, 1998
46. Rizo J, Chen X & Arac D: Unraveling the mechanisms of synaptotagmin and SNARE function in neurotransmitter release. *Trends Cell Biol* **16**: 339–350, 2006