

中野生体膜研究室

Molecular Membrane Biology Laboratory

主任研究員 中野明彦

NAKANO, Akihiko

真核生物の細胞内は緻密に分化した膜系（オルガネラ）で満たされ、その多くがダイナミックな膜の流れ（メンブレントラフィック）によって結ばれている。そのメンブレントラフィックを担うのが小胞輸送である。当研究室では、メンブレントラフィックの中でも特に、輸送小胞の形成と融合のメカニズム、またその過程におけるタンパク質の分子認識と選別のメカニズムを遺伝子レベル、分子レベルで解明することを目標にして、おもに出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* と高等植物シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) を用いた研究を行っている。さらに、小胞輸送の過程が細胞の極性や分裂方向を決定する上で重要な役割を果たしていることに注目し、多細胞生物の組織・器官形成、環境応答などの高次機能におけるメンブレントラフィックの意義を明らかにしていくことを目指す。

1. メンブレントラフィック経路における小胞形成・融合の分子機構の研究（東尾^{*1}、矢原^{*2}、二瓶^{*1}、中野）

小胞体からゴルジ体に移行する COPII 小胞の形成に関与する新奇因子の同定を目的とした遺伝学的探索を、酵母 COPII 小胞構成因子 *SEC24* の温度感受性変異株を用いて行い、強い遺伝学的相互作用を示す酵母遺伝子 *SMY2* を得た。これまでに、(1) Smy2p は小胞体膜上で COPII 小胞関連因子と共局在するが COPII 小胞には存在しないこと、(2) Smy2p には COPII 小胞構成因子との生化学的相互作用があること、などを示してきた。本年度は Smy2p と COPII 小胞構成因子との生化学的相互作用について詳細な解析を行い、この相互作用が *SMY2* の過剰発現による *sec24* 温度感受性変異抑制の必要条件であることを明らかにした。これらの結果より、Smy2p は小胞体膜上で COPII 小胞形成を直接補助する因子であると考えられる。

酵母 *arf1* 温度感受性変異アレル *arf1-16* の多コピーサプレッサーとして、ArfGAP (GTPase 活性化因子) をコードする *GLO3* を得た。*arf1-16* に対する抑制効果は、酵母内に複数存在する ArfGAP の中でも *GLO3* 特異的であり、その特異性には Glo3p の C 末部分が重要な役割を示すことが分かった。Glo3p の C 末には、ヒトから植物に至るさまざまな真核生物において保存されている特徴的な配列があり、その配列が *in vivo* における Glo3p の機能に重要であることが明らかとなった。

小胞体-ゴルジ体間における小胞輸送の分子機構を構造の観点から明らかにするために、その選別輸送に関与する酵母の分子装置の精製と結晶化、X 線解析を進めている。本年度は Sec12p, Emp46p および Emp47p の結晶構造を明らかにした。また、I 型膜タンパク質 p24 ファミリーの酵母新奇遺伝子とその産物について生化学的および分子遺伝学的な機能解析を行った。新奇 p24 タンパク質は、他の p24 ファミリータンパク質、COPI および COPII 因子と相互作用することを明らかにした。本研究は一部、KEK 物質構造科学研究所 若槻壮市教授らとの共同研究によるものである。

2. メンブレントラフィックにおけるタンパク質の選別機構の研究（佐藤⁽¹²⁾、平田、武田^{*3}、川崎（関谷）^{*3}、竹内^{*1}、松浦^{*1}、市原^{*2}、砂田^{*4}、中野）

小胞体から輸送される積荷タンパク質の選別は、輸送小胞を被覆する COPII コートと呼ばれるタンパク質複合体が、積荷が持つ輸送シグナルに直接結合することによりなされている。この結合を制御する低分子量 GTPase Sar1p の機能を解明するため、酵母因子の完全再構成系と FRET (蛍光共鳴エネルギー移動) を組み合わせた実験系を構築して解析を行った。その結果、Sar1p は、GTP 加水分解のエネルギーを利用して、積荷選別過程における校正能を発揮していることを明らかにした。

脂質の選別輸送の役割を検討するための酵母無細胞系の実験で、酵母小胞体膜から Dpm1p (ドリコールリン酸マンノース合成酵素) を輸送する新奇の小胞が形成することを発見した。本年度は、(1) Dpm1p は小胞体膜だけでなく脂質顆粒にも局在すること、(2) この小胞は密度が小さく、200,000 xg でも沈降しないこと、(3) トリグリセリドの合成基質の添加により小胞の形成効率が上昇することを明らかにした。この新奇小胞は、脂質顆粒の前駆体ではないかと考えられる。

低分子量 GTPase, Rab ファミリーは小胞輸送のさまざまな段階を制御する分子スイッチである。ゴルジ体からの小胞形成と積荷選別機構の理解を目指し、酵母の後期ゴルジ体に局在する Rab-GTPases, Ypt31p/32p を中心に研究を展開した。生化学的には Ypt31p/Ypt32p, Rab-GDI を含むタンパク質複合体の単離・解析を行った。一方、ゴルジ体膜系の動態を解明すべく、Ypt31p/Ypt32p, SNARE, 積荷タンパク質の GFP 融合タンパク質を作成し、リアルタイムでの顕微鏡観察を行った。

液胞型 H⁺-ATPase は小胞輸送経路上に位置するさまざまな細胞内小器官の内腔酸性化に機能する。酵母の液胞型 ATPase の欠失株変異株 (*vma1Δ*) は、一部の細胞膜タンパク質を液胞に蓄積する。誤輸送を受ける積荷の 1 つである細胞膜 H⁺-ATPase, Pma1p には異常なユビキチン化が認められるが、この修飾に Bul1p/Bul2p が機能することを

明らかにした。*vma1*Δ株ではトリプトファン輸送体 Tat2p の細胞膜への発現も阻害され、結果としてトリプトファン要求性が亢進するが、この表現型は *bul1*Δ *bul2*Δ 二重欠失変異で相補される。ところが、Pma1p の誤輸送は *bul1*Δ *bul2*Δ では回復しない。以上の結果から、Pma1p の誤輸送にはユビキチン化以外にも原因がある可能性が示唆された。

細胞膜タンパク質の局在決定のメカニズムを探る目的の1つとして、酵母のゲノム解析で明らかにされた機能未同定な読み枠のうち、哺乳動物のクローデインと弱い相同性を示す膜タンパク質3つ (Ylr413p, Ylr414p, Ykl187p) を選んで解析した。これらのタンパク質は一次構造上に25~50%の相同性を持つ。GFPあるいはHAタグを付加した融合タンパク質の挙動から、いずれも主に細胞膜に存在する糖タンパク質であり、ユビキチン修飾を受けることが示唆された。本研究は、京都大学大学院 医学研究科 月田承一郎教授との共同研究によるものである。

ゴルジ体の層板形成-ゴルジ槽 (Golgi cisterna) 間のタンパク質輸送の機構を明らかにするために、ライブイメージングのアプローチを進めた。酵母生細胞でゴルジ体のシス、トランス各槽を GFP と mRFP を用いて可視化し、その動態を、新たに開発したニポウディスク方式共焦点顕微鏡と高感度・高速のカメラシステムによりリアルタイム 3D 観察した。その結果、シス槽がトランス槽の膜成分を受け取り変化して行く過程を観察することができた。本研究は、横河電機、NHK エンジニアリングサービス、NHK 技術研究所、日立国際電気との共同研究開発によるものである。

3. 多細胞生物の形態形成・高次機能におけるメンブレントラフィックの役割の研究

(1) 高等植物のメンブレントラフィックに関する研究 (安部, 上田 *2, 井藤 *3, 内田 *3, 二瓶 *1, 竹内 *1, 郷 *5, 庄田 *6, 中野; 戎井, 二木, 御子柴 (BSI 発生神経生物研究チーム))

Rab5 グループをはじめとするエンドサイトーシスに関与する遺伝子に変異を持つシロイヌナズナ変異体を収集し、その解析を行った結果、Rab と SNARE 間の遺伝学的相互作用を見いだした。また、植物細胞中におけるエンドソーム動態のさらなる解析を行い、kiss and run 様のエンドソーム融合の観察に成功した。

Rab5 GDP/GTP 交換因子 (GEF) によく保存されている Vps9 ドメインを有する遺伝子をシロイヌナズナから単離し、その機能解析を行った。このタンパク質は、*in vitro* で植物の Rab5 と特異的に結合し、それらに対する GEF 活性を有することを明らかにした。また、この遺伝子のノックアウト変異体は胚致死であったことから、胚発生に必須な遺伝子であると結論した。

植物のエンドサイトーシスの分子機構を構造の観点から明らかにするために、その過程に関与すると考えられる分子装置の精製と結晶化、X 線解析を進めている。本年度は GDP 結合型 Ara7 GTPase の結晶構造を明らかにした。本研究は、KEK 物質構造科学研究所 若槻壮市教授らとの共同研究によるものである。

Arf GTPase の制御因子である GNOM の機能に損傷を持つシロイヌナズナ変異体細胞中では、肥大した異常なエンドソームが観察される。このことから、エンドソームの

形態の異常から機能の異常を推定できると考えた。そこで、エンドソームの形態の異常を指標にスクリーニングを行い、その変異体の表現型を細胞レベル、個体レベルで観察することによって高等植物におけるエンドサイトーシスの役割を明らかにしようと試みている。

植物のゴルジ体は、動物や酵母とは異なる特徴的な構造や運動様式を備えている。その形成や維持の分子機構を探るため、ゴルジ体を可視化したシロイヌナズナを変異原処理し、ゴルジ体形態異常変異体の探索を行った。現在、得られた変異体の遺伝学的解析を進めるとともに、ゴルジ体各層板の極性維持機構とその機能をより詳細に解析するため、槽特異的マーカータンパク質 (シス, メディアル, トランス, TGN) を発現する形質転換植物の作製も進めている。

高等植物の液胞形成は個体の形態形成や成長にとって重要な役割をしていると考えられる。液胞形成の分子機構を明らかにするために、酵母の液胞形成に関連するクラス C VPS 遺伝子のシロイヌナズナホモログの解析を行った。AtVAM6 は低分子量 GTPase の AtRab75 に対するグアニンヌクレオチド交換因子活性を持つことを明らかにし、液胞形成の重要な調節因子の1つであることを示唆した。

維管束の構成要素である道管要素の形成過程では、液胞の崩壊を引き金としてプログラム細胞死が起こる。この液胞崩壊機構を解明するため、GFP-AtRab75 を導入した形質転換シロイヌナズナ培養細胞を作出し、分化に伴う液胞膜の動態の可視化を試みている。また、分化に伴う液胞膜のダイナミクスの分子機構の解明に向けて、Rab GTPase に着目し、少なくとも2種類の Rab GTPase 遺伝子が維管束に発現していることを見いだした。

高等植物において、タペート細胞は花粉の発達に重要である。タペート細胞は、花粉壁の成分を供給し、細胞内構造をダイナミックに変化させて細胞死する。シロイヌナズナの生タペート細胞のオルガネラの挙動をマーカータンパク質で可視化することを目指した。タペート細胞での発現を誘導すると考えられる数種類の配列をプロモーターとし、GFP を融合させて植物に形質転換して、共焦点顕微鏡で観察したところ、プロモーターごとに発達段階の異なる時期に発現していた。ムービー画像の解析から、それぞれの発達段階の生タペート細胞の動きを観察する。

高等植物におけるイノシトール 1,4,5-三リン酸 (IP₃) の生理機能を調べるために、哺乳動物の IP₃ 受容体の IP₃ 結合部位を過剰発現する形質転換シロイヌナズナを作製した。形質転換体は根、茎、葉の器官分化はするものの著しい生育阻害を示し、植物細胞の増殖・成長の制御に IP₃ が関与することが示唆された。

(2) 線虫のエンドサイトーシスに関する研究 (佐藤 (10), 中野)

C. elegans を用いたエンドサイトーシスの分子メカニズムの解析を行った。卵母細胞による卵黄タンパク質の取込みに異常を示す *rme-3* 変異株の解析を行ったところ、*rme-3* は卵黄タンパク質の取込みに温度感受性を示し、高温では胚性致死を示すことが明らかとなった。クローニングの結果、*rme-3* はクラスリン H 鎖遺伝子上に変異を持つ高等真核生物においては初めての温度感受性変異株であることが判明した。高温において運動させると麻痺を起こすことから、神経・筋肉系にも異常を示すことが明らかとなった。一

方, *rme-6* 変異株についても解析を行った結果, N 末端側に RasGAP 様領域, C 末端側に RAB-5 の GTP/GDP 交換因子様領域を持つ高等真核生物において高度に保存される新奇遺伝子に異常を持つことが判明した。RME-6 タンパク質に GFP を結合したタンパク質はクラスリンと共局在を示すことから, クラスリン被覆ピット上に局在化する RAB-5 の新たな制御因子であることが示唆された。本研究は, 米国 Rutgers 大学 Barth Grant 教授, 佐藤美由紀博士との共同研究である。

*¹ 協力研究員, *² 客員研究員, *³ 基礎科学特別研究員, *⁴ 研修生, *⁵ ジュニア・リサーチ・アソシエイト, *⁶ 派遣研究員

1. Molecular mechanisms of vesicle formation and fusion in the secretory pathway

To identify novel factors that participate in or facilitate COPII vesicle formation, we isolated high-copy suppressors of the *sec24^{ts}* mutant defective in COPII vesicle formation at the restrictive temperature. One of them was identified as *SMY2*, which encodes a protein of unknown function and exhibits a strong genetic interaction with *SEC24*. Biochemical analyses revealed that Smy2p is tightly associated with the cytosolic face of the ER and co-localized with COPII components, but is not incorporated into COPII vesicles. Moreover, specific co-immunoprecipitation between Smy2p and COPII components was observed in the *sec24^{ts}* background, this interaction was found to be a requisite for the suppression of the *sec24^{ts}* phenotypes by overexpression of *SMY2*. These results suggest that Smy2p facilitates COPII vesicle formation through direct interaction with COPII components.

To isolate components that regulate the pleiotropic roles of Arf1p, we screened multicopy suppressors of these *arf1* mutants. We obtained *GLO3*, encoding an Arf GTPase-activating protein (Arf GAP), as a multicopy suppressor of the *arf1-16* allele. Other Arf GAPs did not suppress the *ts* phenotype of *arf1-16*. We identified a C-terminal region of Glo3p that is important for the specificity of its suppression activity and is conserved among Glo3p-like Arf GAPs of eukaryotes.

To understand the molecular mechanism of vesicular transport between ER and Golgi apparatus from the viewpoint of structures, a variety of molecular components of yeast traffic machinery have been purified and some are now under X-ray crystallographic analysis. This year, we determined the crystal structures of Sec12p, Emp46p and Emp47p. We are also characterizing the function of a novel member of the yeast p24 family, biochemically and genetically. This protein appears to be associated with other members of the p24 family, as well as COPI and COPII components. This work is in part in collaboration with Professor Soichi Wakatsuki and his colleagues (High Energy Accelerator Research Organization, Institute of Materials Structure Science).

2. Mechanisms of protein sorting during membrane trafficking

Secretory proteins are transported from the ER in vesicles coated with COPII. We used a fluorescence resonance energy transfer (FRET)-based method for monitoring the kinetics of COPII coat complex assembly and disassembly in reconstituted proteoliposomes. Our data indicate

that the Sar1p GTPase cycle regulates cargo sorting into transport vesicles.

In an attempt to understand the sorting mechanism of membrane lipids in yeast, we found that novel types of vesicles conveying Dpm1p (dolichol-phosphate mannose synthase) are formed from the ER membrane in an established cell-free assay. We further showed that (1) Dpm1p localizes in lipid particles as well as the ER membrane, (2) these novel vesicles are of low density and not sedimented even at 200,000 xg, (3) the budding efficiency of the vesicles is enhanced by the addition of substrates for triglyceride synthesis. We suggest that these vesicles are the precursor of lipid particles.

Rab GTPases are crucial regulators in various stages of vesicular traffic. To understand the traffic mechanisms from the Golgi apparatus, we focused on Ypt31p/Ypt32p, the yeast GTPases that locate and probably function at the late Golgi. First, we biochemically isolated complexes containing Ypt31p/Ypt32p and RabGDI. Second, we carried out real-time analysis of the Golgi dynamics by observing GFP-fusion proteins of Ypt31p/Ypt32p, SNAREs, and cargo proteins.

Yeast V-ATPase mutant (*vma1Δ*) missorts several plasma membrane proteins to the vacuole, and one such protein, the plasma membrane ATPase (Pma1p), is abnormally ubiquitinated in the mutant cells. We found that the *bul1Δ bul2Δ* mutation inhibits the ubiquitination of Pma1p. We also found that the *bul1Δ bul2Δ* restores tryptophan auxotrophy of *vma1Δ* cells, which is caused by inefficient cell surface expression of the tryptophan permease Tat2p, however, the mutation did not correct the targeting of Pma1p. These results suggest that an additional molecular mechanism is involved in mistargeting of the protein.

As an approach to understand the mechanisms of plasma membrane protein localization, we characterized three predicted membrane proteins (Ylr413p, Ylr414p and Ykl87p), which show weak similarity to mammalian claudin and 25–50% amino-acid sequence identities with each other. We found that GFP-tagged proteins are localized mainly to the plasma membrane, and that HA-tagged proteins receive N-glycosylation and ubiquitination. This work is done in collaboration with Professor Shoichiro Tsukita (Kyoto University).

To elucidate the mechanism of Golgi cisternal formation, we are pursuing a live imaging approach. We tagged *cis* and *trans* cisternae with GFP and mRFP and observed their dynamics in living yeast cells under the newly developed Nipkow-disk confocal laser scanning microscopes with high-sensitivity and high-speed camera systems. By 3D analysis, we could observe a dynamic “cisternal take-over” process, in which a *cis* cisterna changes its nature to *trans* by acquiring *trans* membranes and discharging *cis* membranes. This work is in collaboration with Yokogawa Electric Corporation, NHK Engineering Service, NHK Science and Technical Research Laboratories, and Hitachi Kokusai Electric.

3. Roles of membrane traffic in the morphogenesis of multicellular organisms

(1) Studies on plant membrane traffic

We carried out genetic analyses of *Arabidopsis* mutants defective in the endocytic pathway and found genetic interactions between members of the Rab5 family and SNAREs. Live imaging of endosome dynamics enabled us to observe “kiss-and-run”-type endosomal fusion.

We isolated and characterized an *Arabidopsis* gene harboring the Vps9 domain, which is conserved among

guanine-nucleotide exchange factors (GEF) for Rab5. The gene product binds Rab5 specifically and enhances the GDP-GTP exchange reaction on Rab5 *in vitro*. A T-DNA insertion mutant of this gene showed an embryonic lethal phenotype, indicating that it is essential for embryo development.

To understand the molecular mechanism of plant endocytosis from the viewpoint of structures, a variety of molecular components of plant traffic machinery have been purified and some are now under X-ray crystallographic analysis. This year, we determined the crystal structure of Ara7 GTPase (GDP form). This work is in collaboration with Professor Soichi Wakatsuki and his colleagues (High Energy Accelerator Research Organization, Institute of Materials Structure Science).

We expect that abnormal structures of endosomes are a good indication of their malfunction, as is the case of *gnom* mutant cells. We are now screening for *Arabidopsis* mutants that show abnormal endosome structures, hoping to elucidate the roles of endocytosis in plants.

The Golgi apparatus in plant cells has many unique features in its structure, localization pattern, and function. To investigate its function and the mechanism of biogenesis, we screened for *Arabidopsis* mutants that showed abnormal Golgi morphology. We succeeded in isolating several putative mutants, and their genetic analysis is now underway. We are also constructing transgenic *Arabidopsis* expressing cisterna-specific markers (*cis*, *medial*, *trans*, and *trans*-Golgi network) to characterize cisterna-specific events.

It has been suggested that vacuolar biogenesis of higher plants is important for their growth and morphogenesis. To investigate molecular mechanisms of vacuolar biogenesis, we analyzed *Arabidopsis* homologues of yeast class C-*VPS* genes, which play roles in yeast vacuolar morphogenesis. We revealed that AtVAM6 possesses a guanine-nucleotide exchange activity to the AtRab75 GTPase, and suggest that it is an important factor regulating vacuolar biogenesis.

During formation of a mature tracheary element (TE), a component of the plant vascular system, vacuole rupture triggers the execution of programmed cell death. To clarify the mechanism of vacuole rupture in TEs, we have analyzed vacuolar membrane dynamics using an *Arabidopsis* cultured cell line expressing GFP-AtRab75 and its molecular mechanism with a focus on the function of Rab GTPases during cell death. An expression profile of Rab GTPases showed that at least 2 Rab GTPase genes are expressed in the vascular system.

In higher plants, tapetum cells play an important role in pollen development. They provide pollen wall constituents and shift their intercellular structures dynamically, resulting in cell death. To observe each organelle behavior in a living tapetum cell of *Arabidopsis thaliana*, we used several sequences that are expected to drive gene expression in tapetum cells as promoters. The promoter-conjugated GFP clones were stably transformed into plants. Confocal laser scanning microscopy demonstrates that each promoter sequence drives GFP expression at a particular stage of development.

In order to reveal physiological functions of inositol 1,4,5-trisphosphate (IP₃) in higher plants, we generated transgenic *Arabidopsis* that express the IP₃ binding region of the mammalian IP₃ receptor. Although transgenic plants developed roots, stem and leaves, they showed a remarkable growth defect. This suggests that IP₃ is involved in the regulation of plant cell division and/or growth.

(2) Studies on endocytosis in *C. elegans*

We have studied the molecular mechanisms of receptor-mediated endocytosis in *C. elegans*. Among the *rme* mutants that show a defect in yolk uptake by oocytes, we first studied the *rme-3* mutant. The *rme-3* (*b1025*) mutant showed a temperature sensitive defect in yolk uptake by oocytes and ts embryonic lethality. Cloning revealed that *rme-3* (*b1025*) is a temperature sensitive allele of the clathrin heavy chain (CHC), the first temperature sensitive CHC mutant in a higher eukaryote. Interestingly, *rme-3* (*b1025*) also shows severe defects in neuro-muscular function. We also studied the *rme-6* mutant. RME-6 has a predicted Vps9 domain at its C-terminus and a RasGAP-like domain at its N-terminus. The Vps9 domain is a known motif conserved among guanine-nucleotide exchange factors (GEFs) of the small GTPase Rab5. GFP::RME-6 shows a significant spatial overlap with clathrin and α -adaptin, suggesting that RME-6 is a new regulator of Rab5 on clathrin coated pits. This work is in collaboration with Professor Barth Grant and Dr. Miyuki Sato of Rutgers University (New Jersey, USA).

Staff

Head

Dr. Akihiko NAKANO

Members

Dr. Hiroshi ABE

Dr. Ryogo HIRATA

Dr. Ken SATO (10)

Dr. Ken SATO (12)

Dr. Chieko SAITO

Dr. Jun ITO^{*1}

Dr. Mariko SEKIYA-KAWASAKI^{*1}

Dr. Yuichi TAKEDA^{*1}

Dr. Wakana UCHIDA^{*1}

Dr. Hironori HIGASHIO^{*2}

Dr. Kumi MATSUURA^{*2}

Dr. Coh-ichi NIHEI^{*2}

Dr. Masaki TAKEUCHI^{*2}

^{*1} Special Postdoctoral Researcher

^{*2} Contract Researcher

in collaboration with

Dr. Akiko MURAKAMI (Lab. Alzheimer's Dis., BSI)

Dr. Katsuhiko MIKOSHIBA (Lab. Dev. Neurobiol., BSI)

Dr. Akira FUTATSUGI (Lab. Dev. Neurobiol., BSI)

Ms. Etsuko EBISUI (Lab. Dev. Neurobiol., BSI)

Visiting Members

Mr. Tatsuaki GO (Grad. Sch. Sci., Univ. Tokyo)

Mr. Akira ICHIHARA (Yokogawa Electr. Corp.)

Ms. Keiko SHODA (Science Service, Inc.)

Dr. Takashi UEDA (Grad. Sch. Sci., Univ. Tokyo)
Dr. Natsuko YAHARA (Univ. Geneva, Switzerland)

Trainees

Ms. Mariko SUNADA (Fac. Sci., Japan Women's Univ.)

誌上発表 Publications

[雑誌]

(原著論文) *印は査読制度がある論文

- Suzuki T., Hashimoto T., Yabu Y., Kido Y., Sakamoto K., Nihei C., Hato M., Suzuki S., Amano Y., Nagai K., Hosokawa T., Minagawa N., Ohta N., and Kita K.: "Direct evidence for cyanide-insensitive quinol oxidase (alternative oxidase) in apicomplexan parasite *Cryptosporidium parvum*: phylogenetic and therapeutic implications", *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **313**, 1044–1052 (2004). *
- Uemura T., Ueda T., Ohniwa R., Nakano A., Takeyasu K., and Sato M. H.: "Systematic analysis of SNARE molecules in *Arabidopsis*: Dissection of the post-Golgi network in plant cells", *Cell Struct. Funct.* **29**, 49–65 (2004). *
- Sato K.: "COPII coat assembly and selective export from the endoplasmic reticulum", *J. Biochem.* **136**, 755–760 (2004). *
- Matsuura K., Lefebvre P. A., Kamiya R., and Hirono M.: "Bld10p, a novel protein essential for basal body assembly in *Chlamydomonas*: localization to the cartwheel, the first ninefold symmetrical structure appearing during assembly", *J. Cell Biol.* **165**, 663–671 (2004). *
- Sato M., Sato K., and Nakano A.: "Endoplasmic reticulum quality control of unassembled iron transporter depends on Rer1p-mediated retrieval from the Golgi", *Mol. Biol. Cell* **15**, 1417–1424 (2004). *
- Suzuki T., Nihei C., Yabu Y., Hashimoto T., Suzuki M., Yoshida A., Nagai K., Hosokawa T., Minagawa N., Suzuki S., Kita K., and Ohta N.: "Molecular cloning and characterization of *Trypanosoma vivax* alternative oxidase (AOX) gene, a target of the trypanocide ascofuranone", *Parasitol. Int.* **53**, 235–245 (2004). *
- Ueda T., Uemura T., Sato M. H., and Nakano A.: "Functional differentiation of endosomes in *Arabidopsis* cells", *Plant J.* **40**, 783–789 (2004). *
- Matsunaga S., Uchida W., Eduard K., Isono E., Francoise M., Boris V., and Kawano S.: "Characterization of two SEPALLATA MADS-box genes from the dioecious plant *Silene latifolia*", *Sexual Plant Reproduction* **17**, 189–193 (2004). *
- Sato K. and Nakano A.: "Dissection of COPII subunit-cargo assembly and disassembly kinetics during Sar1p-GTP hydrolysis", *Nat. Struct. Mol. Biol.* **12**, 167–174 (2005). *
- (総説)
佐藤健, 中野明彦: "小胞体からの COPII 小胞形成と蛋白質

選別輸送の分子メカニズム", *蛋白質 核酸 酵素* **49**, 910–913 (2004).

口頭発表 Oral Presentations

(国際会議等)

- Matsuura K., Takeuchi M., Ichihara A., Mikuriya K., and Nakano A.: "Dynamics of the Golgi apparatus in *Saccharomyces cerevisiae*", 57th Ann. Meet. of the Japan Soc. for Cell Biology, Toyonaka, May (2004).
- Sato K. and Nakano A.: "Fluorescence resonance energy transfer detection of COPII and SNARE interactions during vesicle budding", 57th Ann. Meet. of the Japan Soc. for Cell Biology, Toyonaka, May (2004).
- Hirata R., Takatsuki A., and Nakano A.: "Loss of V-ATPase activity induces mislocalization of plasma membrane proteins to the vacuole", 57th Ann. Meet. of the Japan Soc. for Cell Biology, Toyonaka, May (2004).
- Murakami A., Sato K., Sato K., Nakano A., and Takashima A.: "Pmt4p dependent O-mannosylation of heterologous expressed human β -amyloid precursor protein (APP) in *Saccharomyces cerevisiae*", 57th Ann. Meet. of the Japan Soc. for Cell Biology, Toyonaka, May (2004).
- Higashio H. and Nakano A.: "Analysis of *SMY2*, a high-copy suppressor of the temperature-sensitive *sec24* mutant", 57th Ann. Meet. of the Japan Soc. for Cell Biology, Toyonaka, May (2004).
- Nakano A.: "Mechanisms and dynamics of membrane protein traffic-into and through the Golgi", 57th Ann. Meet. of the Japan Soc. for Cell Biology, Toyonaka, May (2004).
- Uemura T., Ueda T., Nakano A., Takeyasu K., and Sato M. H.: "SNARE molecules in *Arabidopsis*: systematic analysis of their localization", 57th Ann. Meet. of the Japan Soc. for Cell Biology, Toyonaka, May (2004).
- Sato K., Chen C., Sato M., and Grant B. D.: "*C.elegans rme-3* encodes a clathrin heavy chain required for embryogenesis and neuro-muscular function", East Coast Worm Meet., (Yale University), New Haven, USA, June (2004).
- Uejima T., Ihara K., Kato R., Hirano S., Igarashi N., Kamikubo H., Kataoka M., Nihei C., Ueda T., Nakano A., and Wakatsuki S.: "An abnormal intertwined dimer of Ara7 regulates its GDP/GTP cycle", 8th Int. Conf. on Biology and Synchrotron Radiation (BSR2004), (Himeji City, RIKEN, and others), Himeji, Sept. (2004).
- (国内会議)
石川貴章, 町田千代子, 上田貴志, 中野明彦, 町田泰則: "ERからゴルジ体へのタンパク質の輸送に異常が見られるシロイヌナズナ embryo yellow 変異体の解析", 日本植物生理学会 2004 年度年会および第 44 回シンポジウム, 八王子, 3 月 (2004).
- 上田貴志, 植村知博, 佐藤雅彦, 中野明彦: "シロイヌナズナ細胞におけるエンドソームの機能的分化", 日本植物生理学会 2004 年度年会および第 44 回シンポジウム, 八王子, 3 月 (2004).

- 植村知博, 上田貴志, 中野明彦, 竹安邦夫, 佐藤雅彦: “ポストゴルジ・ネットワークに局在するシロイヌナズナ SNARE 分子の解析”, 日本植物生理学会 2004 年度年会および第 44 回シンポジウム, 八王子, 3 月 (2004).
- 齋藤奈央子, 井藤純, 福田裕穂: “プログラム細胞死に関わるシロイヌナズナ S1 型ヌクレアーゼの解析”, 日本植物学会第 68 回大会, 藤沢, 9 月 (2004).
- 朽名夏磨, 竹内雅宜, 上田貴志, 中野明彦, 馳澤盛一郎: “タバコ BY-2 細胞の細胞質分裂における小胞輸送系と液胞膜系の動態”, 日本植物学会第 68 回大会, 藤沢, 9 月 (2004).
- 稲継理恵, 坂本幸生, 黒岩常祥, 中野明彦, 東山哲也: “花粉管ガイダンスにおける花粉管活性化因子の解析”, 日本植物学会第 68 回大会, 藤沢, 9 月 (2004).
- 中野明彦, 佐藤健, 松浦公美, 竹内雅宜: “Mechanisms and dynamics of membrane protein traffic: From the ER and through the Golgi”, 第 77 回日本生化学会大会, 横浜, 10 月 (2004).
- 上島珠美, 伊原健太郎, 加藤龍一, 平野聡, 五十嵐教之, 上久保裕生, 片岡幹雄, 二瓶浩一, 上田貴志, 中野明彦, 若槻壮市: “Structural analyses of small GTPase Ara7”, 第 77 回日本生化学会大会, 横浜, 10 月 (2004).
- 平田龍吾, 高月昭, 中野明彦: “V-ATPase activity is required for efficient protein trafficking to the cell surface”, 第 77 回日本生化学会大会, 横浜, 10 月 (2004).
- 松浦公美: “酵母ゴルジ体ダイナミクスの観察”, シロイヌナズナワークショップ 2004, 東京, 11 月 (2004).
- 中野明彦, 上田貴志: “Roles of membrane traffic in plant morphogenesis”, 第 27 回日本分子生物学会年会, 神戸, 12 月 (2004).
- 上島珠美, 五十嵐教之, 佐藤健, 佐藤美由紀, 矢原夏子, Stephanie M., Laurence D., 富崎孝司, 須藤恭子, 中野明彦, 若槻壮市: “Cation effect on the Sec12p-Sar1p interaction in the initial step of vesicle formation”, 第 27 回日本分子生物学会年会, 神戸, 12 月 (2004).
- 二瓶浩一, 中野明彦: “酵母 p24 ファミリー新奇因子の解析”, 第 27 回日本分子生物学会年会, 神戸ポートアイランド, 12 月 (2004).
- 佐藤健: “小胞体における輸送小胞形成機構: FRET を用いた解析”, 第 42 回日本生物物理学会年会, 京都, 12 月 (2004).
- 中野明彦: “小胞輸送: 分子機構とダイナミクス”, 第 42 回日本生物物理学会年会, 京都, 12 月 (2004).
- 中野明彦: “細胞内膜系のダイナミクスと選別輸送の分子メカニズム”, 分子科学研究所研究会「物理化学から生命科学を展望する: 分子組織体から細胞へ」, 岡崎, 12 月 (2004).
- 井藤純, 上田貴志, 本瀬 (宇田川) 真樹子, 久保稔, 出村拓, 福田裕穂, 中野明彦: “道管要素形成に関与する Rab GTPase の探索”, 第 46 回日本植物生理学会年会, 新潟, 3 月 (2005).