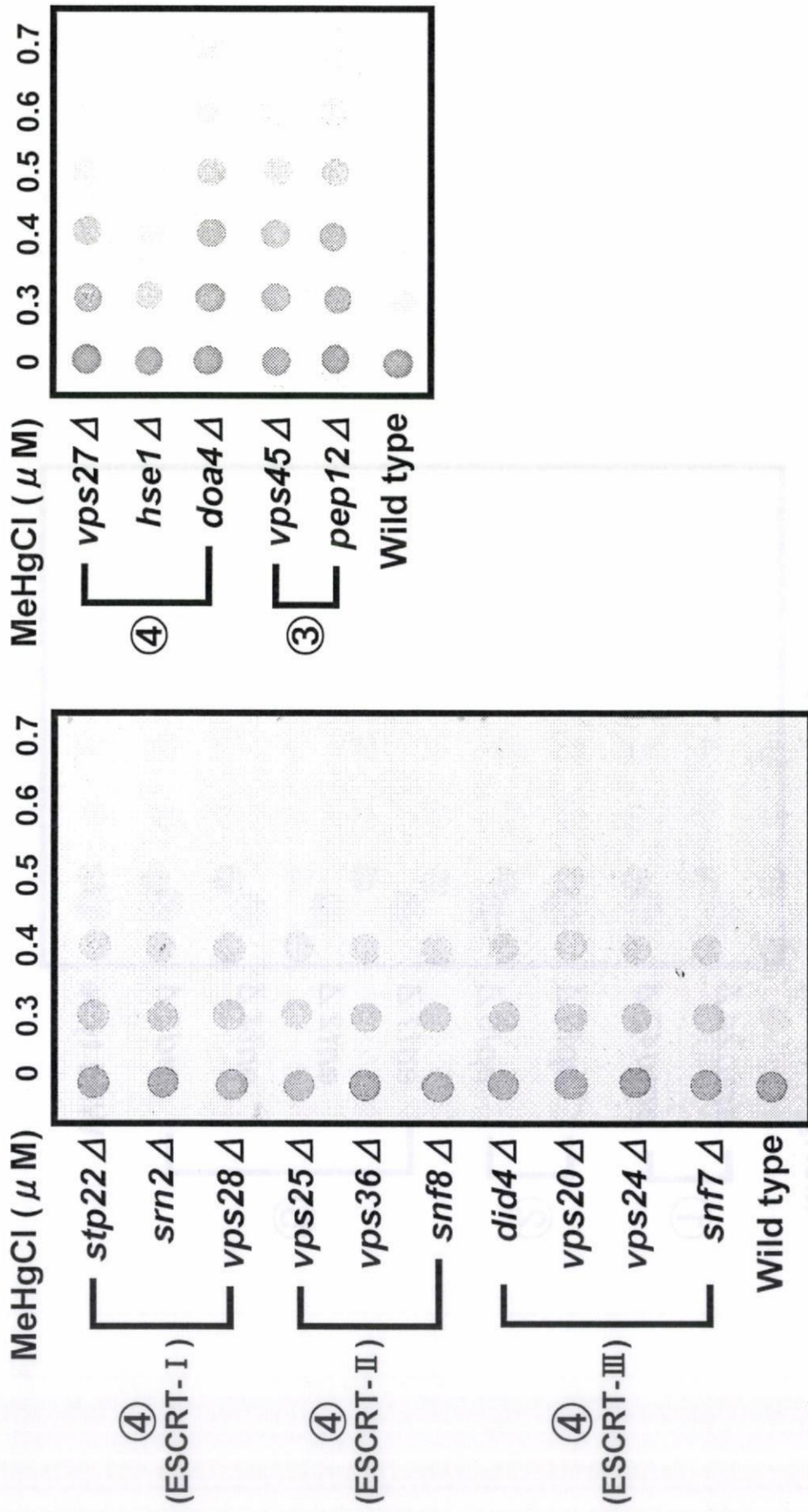
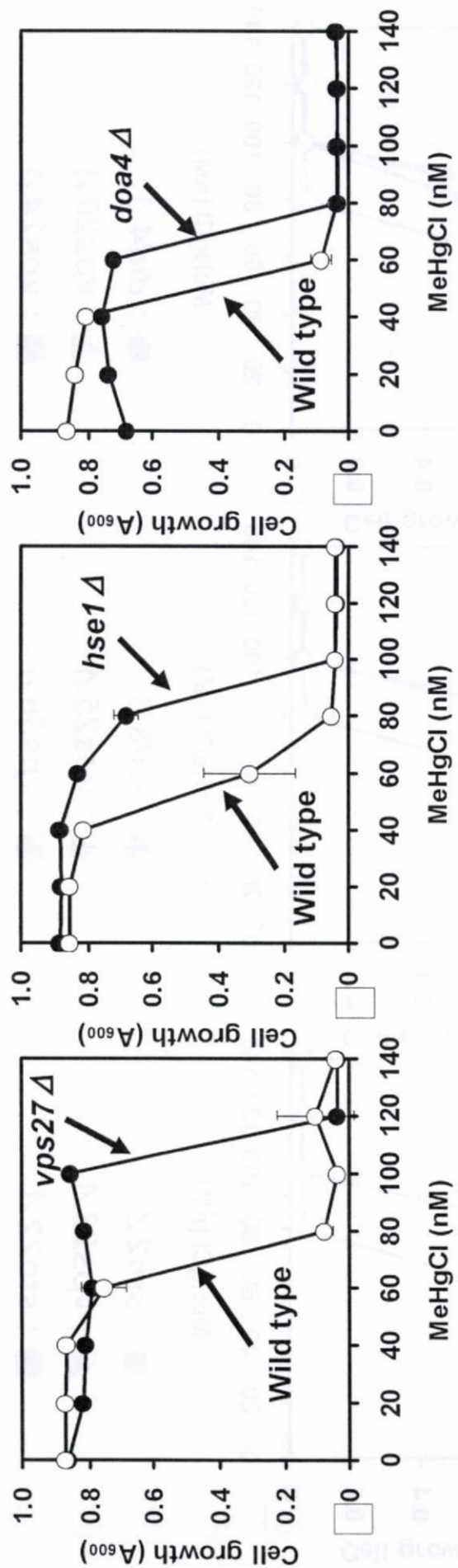


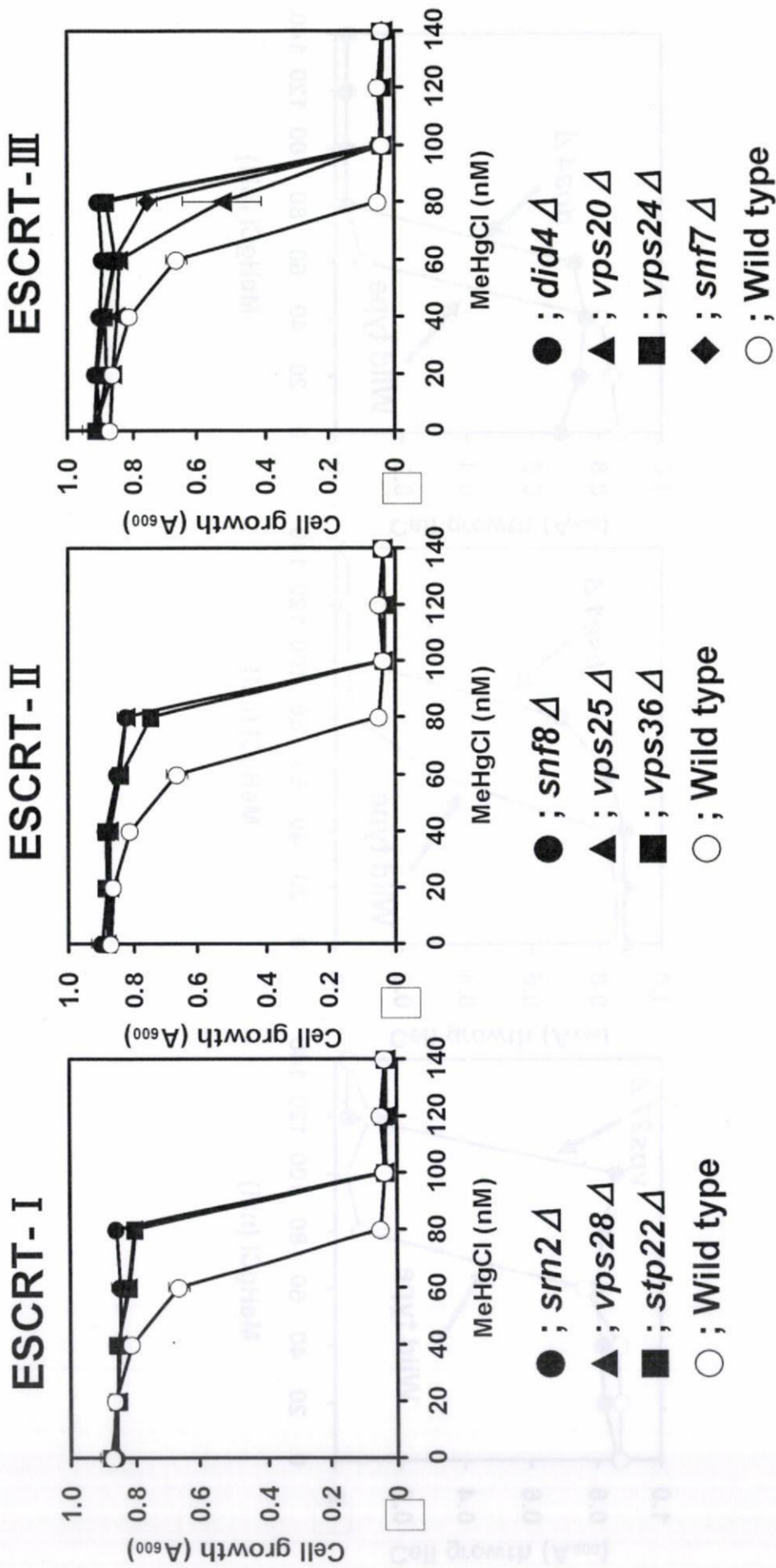
**Figure 2-1.** 液胞への蛋白質輸送経路に関わる因子の欠損がメチル水銀感受性に与える影響  
 $1 \times 10^6$  cells/mLの酵母に滅菌水またはfinal 0,0.3,0.4,0.5,0.6,0.7  $\mu\text{M}$  となるように塩化メチル水銀を加え、 $30^\circ\text{C}$ で3 hr  
 静置培養した後、 $5 \times 10^4$  cells/spot となるようにスポットインキュベーターで $30^\circ\text{C}$ で24hr培養後、観察した。丸で囲った数字は  
 Figure 1に示した経路を示す。



**Figure 2-2.** 液胞への蛋白質輸送経路に関わる因子の欠損がメチル水銀感受性に与える影響  
 $1 \times 10^6$  cells/mLの酵母に滅菌水またはfinal 0, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7  $\mu\text{M}$ となるように塩化メチル水銀を加え、 $30^\circ\text{C}$ で3 hr 静置培養した後、 $5 \times 10^4$  cells/spotとなるようにスポットインキュベーターで24hr培養後、観察した。丸で囲った数字は Figure 1に示した経路を示す。



**Figure 3-1.** エンドソーム内の蛋白質の取り込みに関与する因子の欠損がメチル水銀感受性に与える影響  
 $1 \times 10^4$  cells/wellの酵母にfinal 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140 nM となるように塩化メチル水銀を加え、液体培地中で30°Cで48 hr 培養後、濁度を測定 (A<sub>600</sub>) した。



**Figure 3-2.** エンドソーム内への蛋白質の取り込みに関与する因子の欠損がメチル水銀感受性に与える影響  
 エンドソーム膜上にリクルートされるESCRT-I 複合体 (*Sm2*, *Vps28*, *Stp22*)、ESCRT-II 複合体 (*Snf8*, *Vps25*, *Vps36*)、ESCRT-III 複合体 (*Did4*, *Vps20*, *Vps24*, *Snf7*) の構成因子を一つずつ欠損させた酵母について、Figure 3-1 と同様の方法で検討した。ESCRT については Figure 8 参照

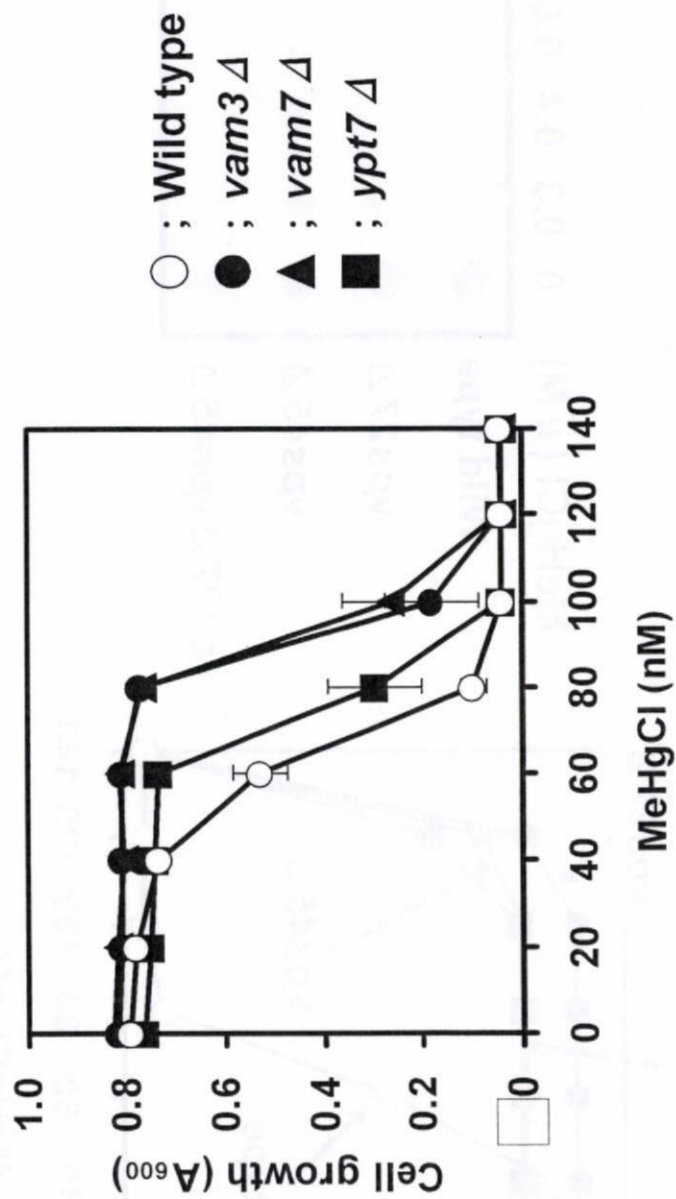
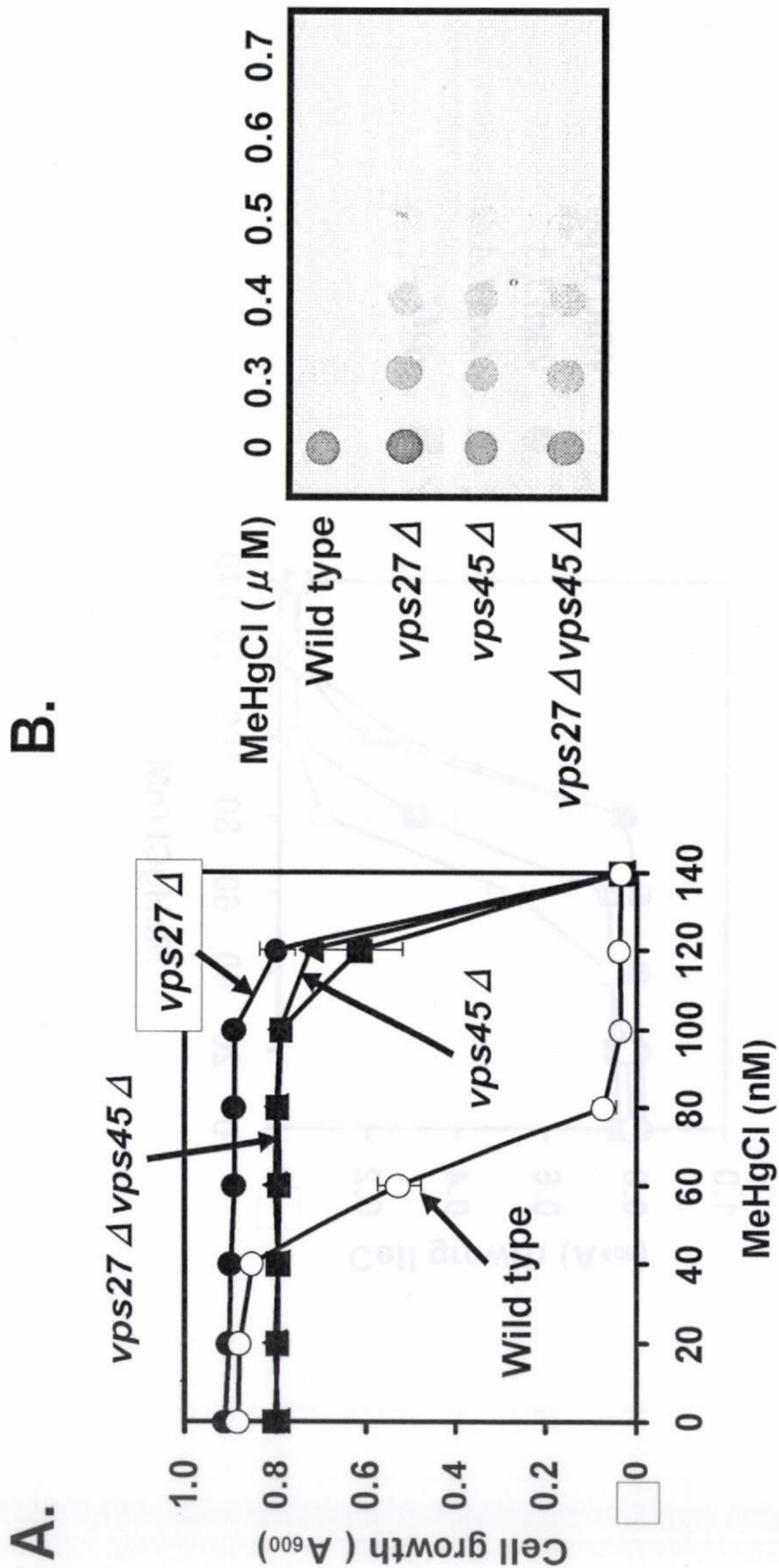
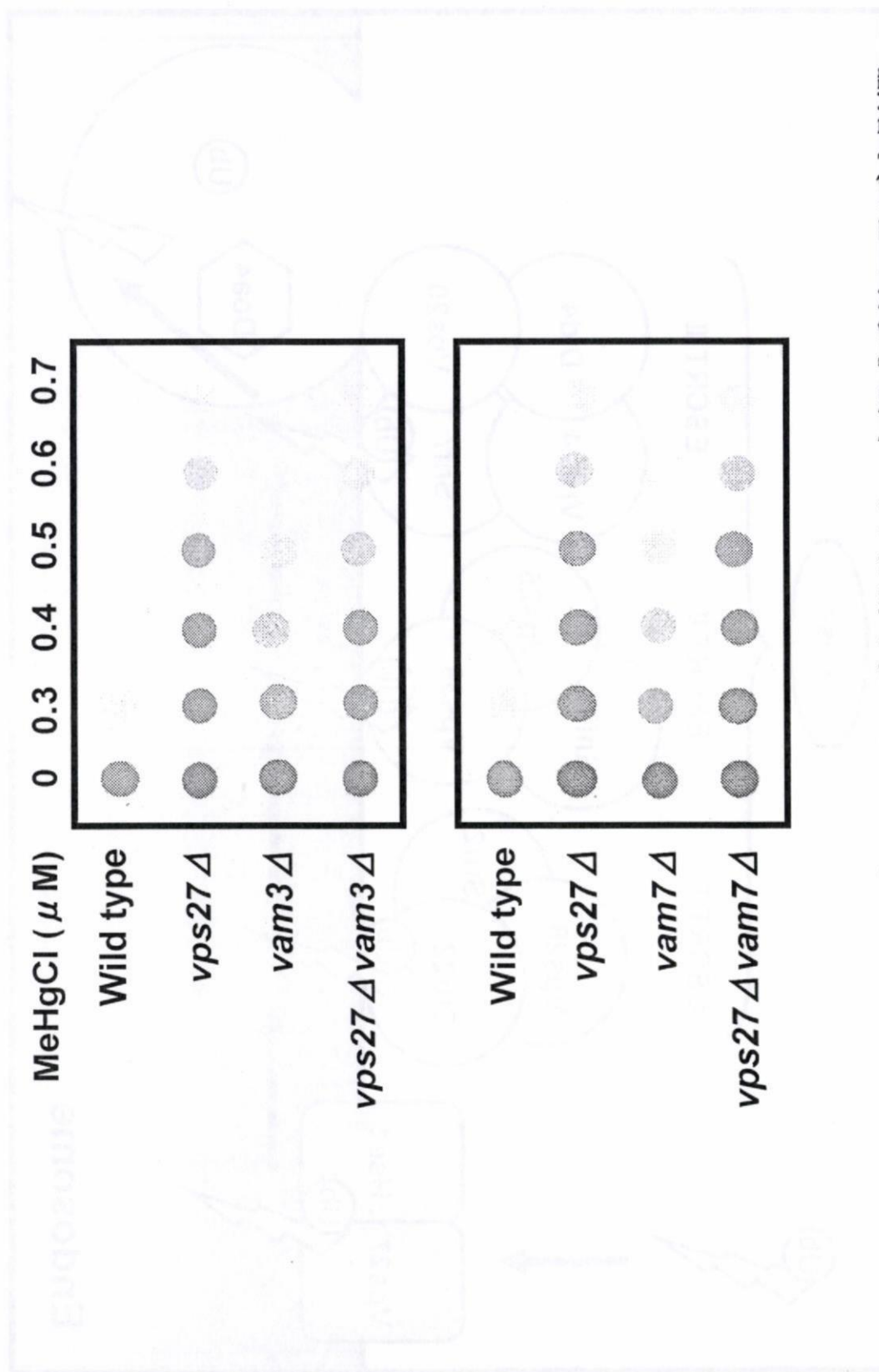


Figure 4. エンドソームと液胞の融合に関わる因子 (*Vam3*, *Vam7*, *Ypt7*) の欠損がメチル水銀感受性に与える影響

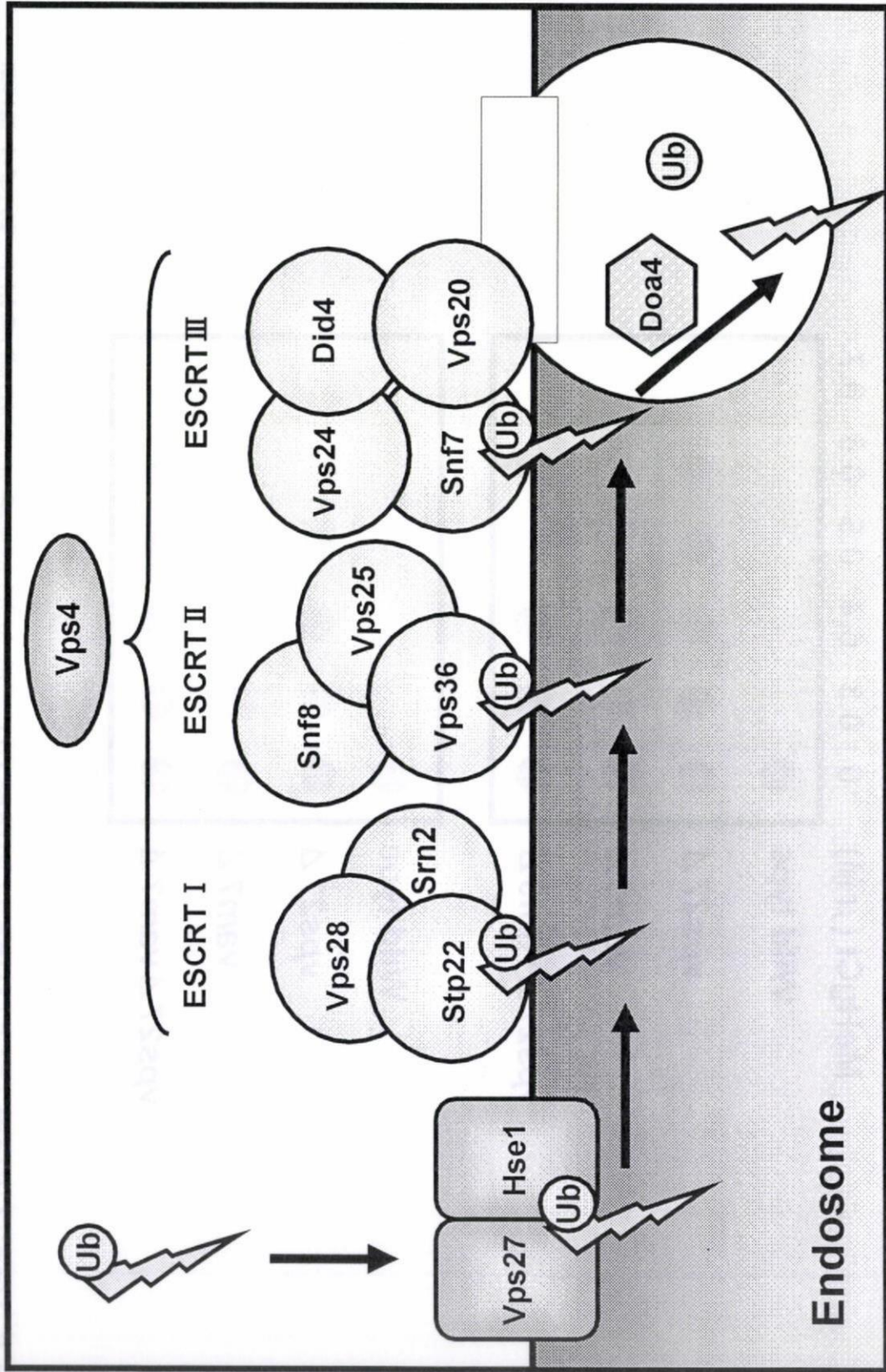
Figure 3-1と同様の方法でメチル水銀感受性を検討した。



**Figure 5. Vps27とVps45の二重欠損がメチル水銀感受性に及ぼす影響**  
 A. Figure 3-1と同様の方法でメチル水銀感受性を検討した。B. Figure 2と同様の方法でメチル水銀感受性を検討した。

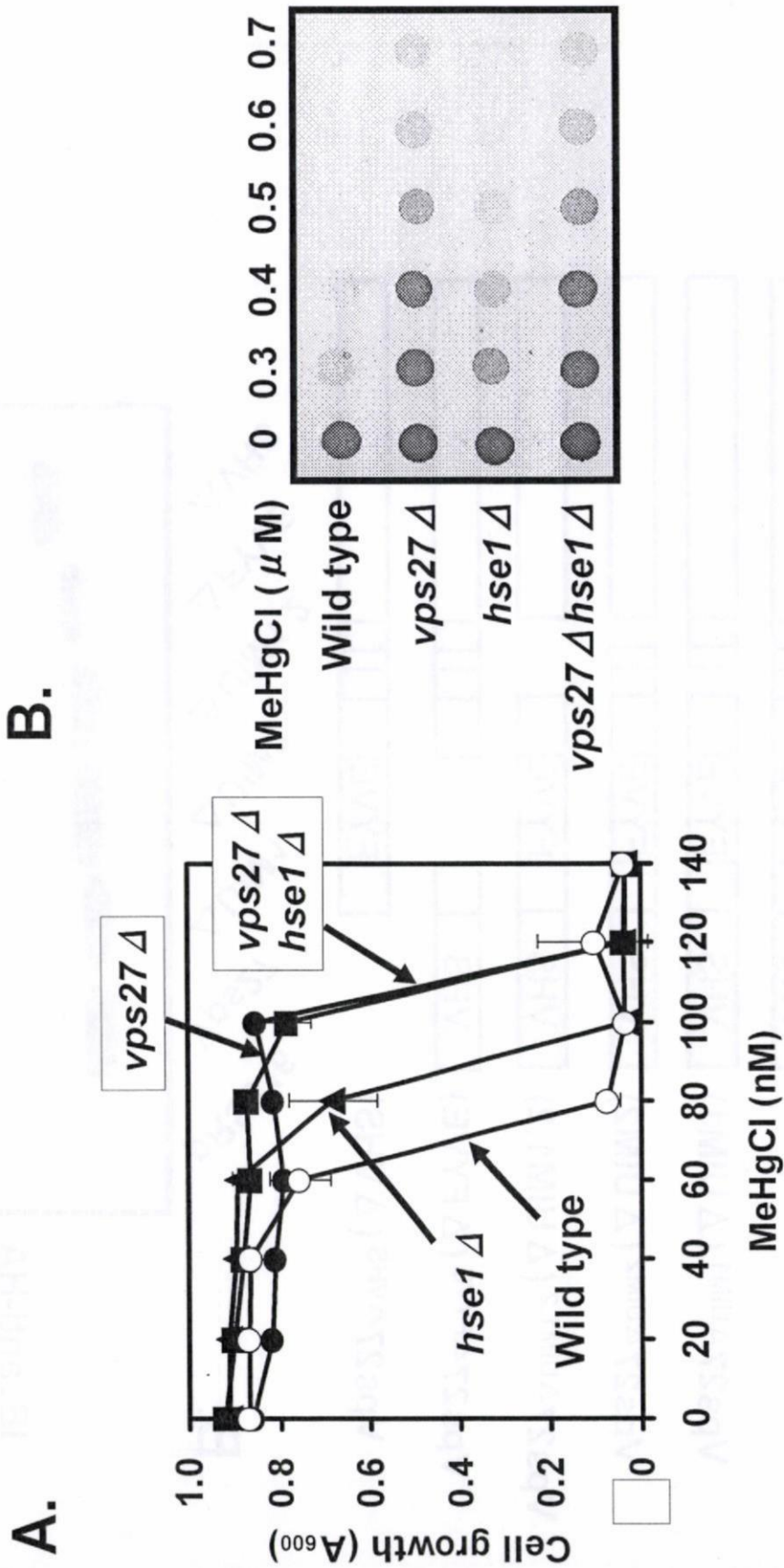


**Figure 6.** *Vps27*と*Vam3*および*Vps27*と*Vam7*の二重欠損がメチル水銀感受性に及ぼす影響  
Figure 2と同様の方法でメチル水銀感受性を検討した。

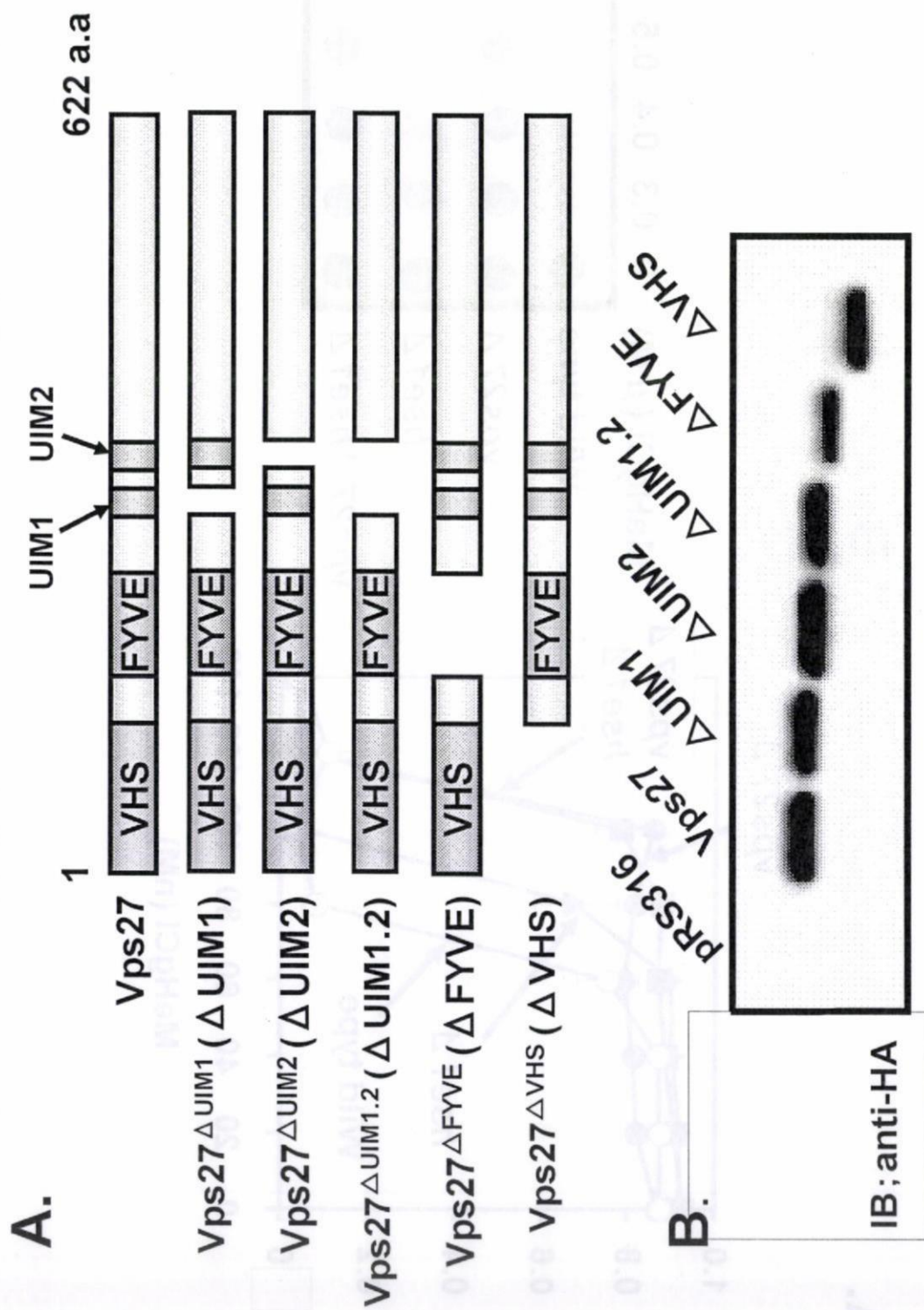


**Figure 7. エンドソーム膜上での蛋白質の取り込み経路 (MVB sorting pathway)**  
 エンドソーム内へ取り込まれる蛋白質はモノユビキチン化をシグナルとして、Vps27/Hse1複合体に認識され、その後 ESCRT複合体へと受け渡され、最終的に脱ユビキチン化酵素Doa4によりユビキチンが外され取り込まれる。





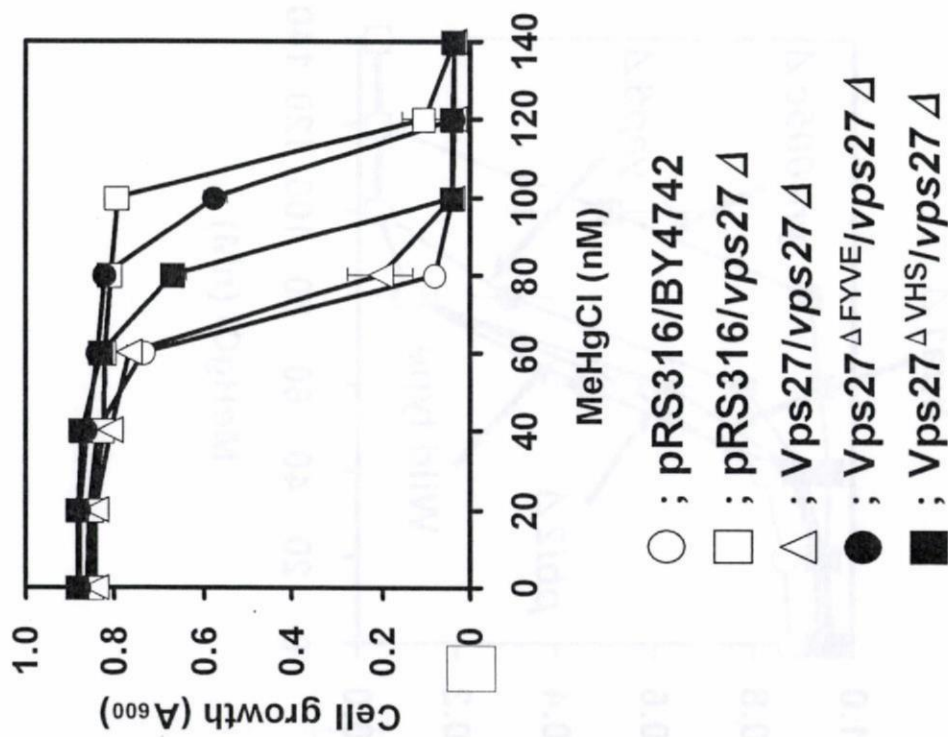
**Figure 8. Vps27とHse1の二重欠損がメチル水銀感受性に及ぼす影響**  
 A. Figure 3-1と同様の方法でメチル水銀感受性を検討した。B. Figure 4と同様の方法でメチル水銀感受性を検討した。



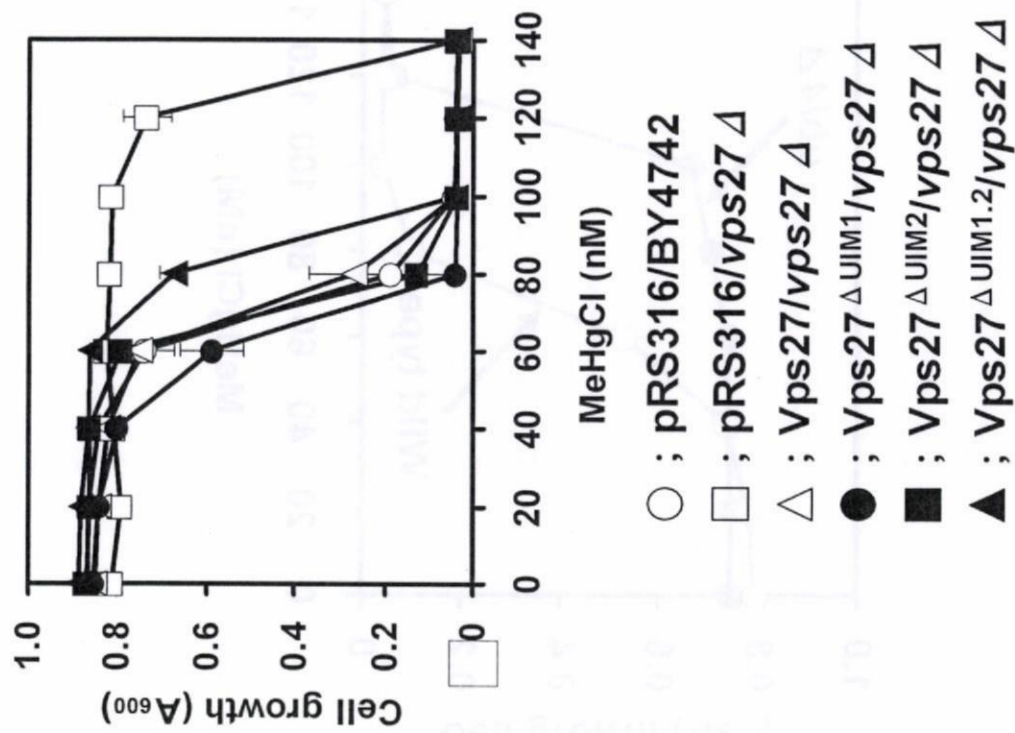
**Figure 9. Vps27のtruncation mutantの発現確認**

A. Vps27および様々なドメインを欠失させたVps27 truncation mutants. B. HA-tagを融合させた様々なVps27 truncation mutantを発現するplasmidを導入した酵母の蛋白抽出液について、抗HA抗体を用いたWestern blottingによりそれぞれの truncation mutants の発現を確認をした。

A.



B.



**Figure 10. Vps27 欠損酵母が示すメチル水銀耐性に及ぼすVps27 truncation mutants発現の影響**  
 様々なVps27 truncation mutant を発現するplasmid を導入したVps27 欠損酵母について、Figure 3-1と同様の方法でメチル水銀感受性を検討した。

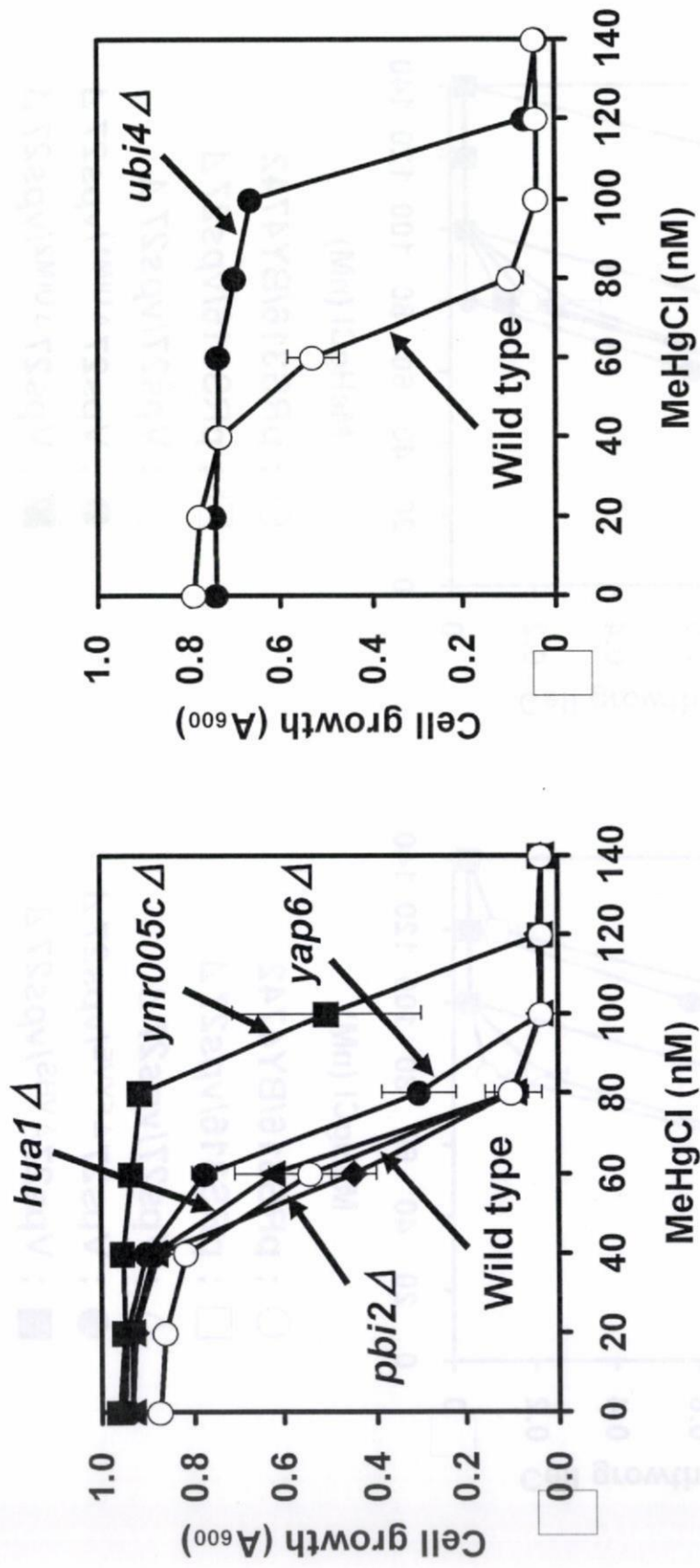
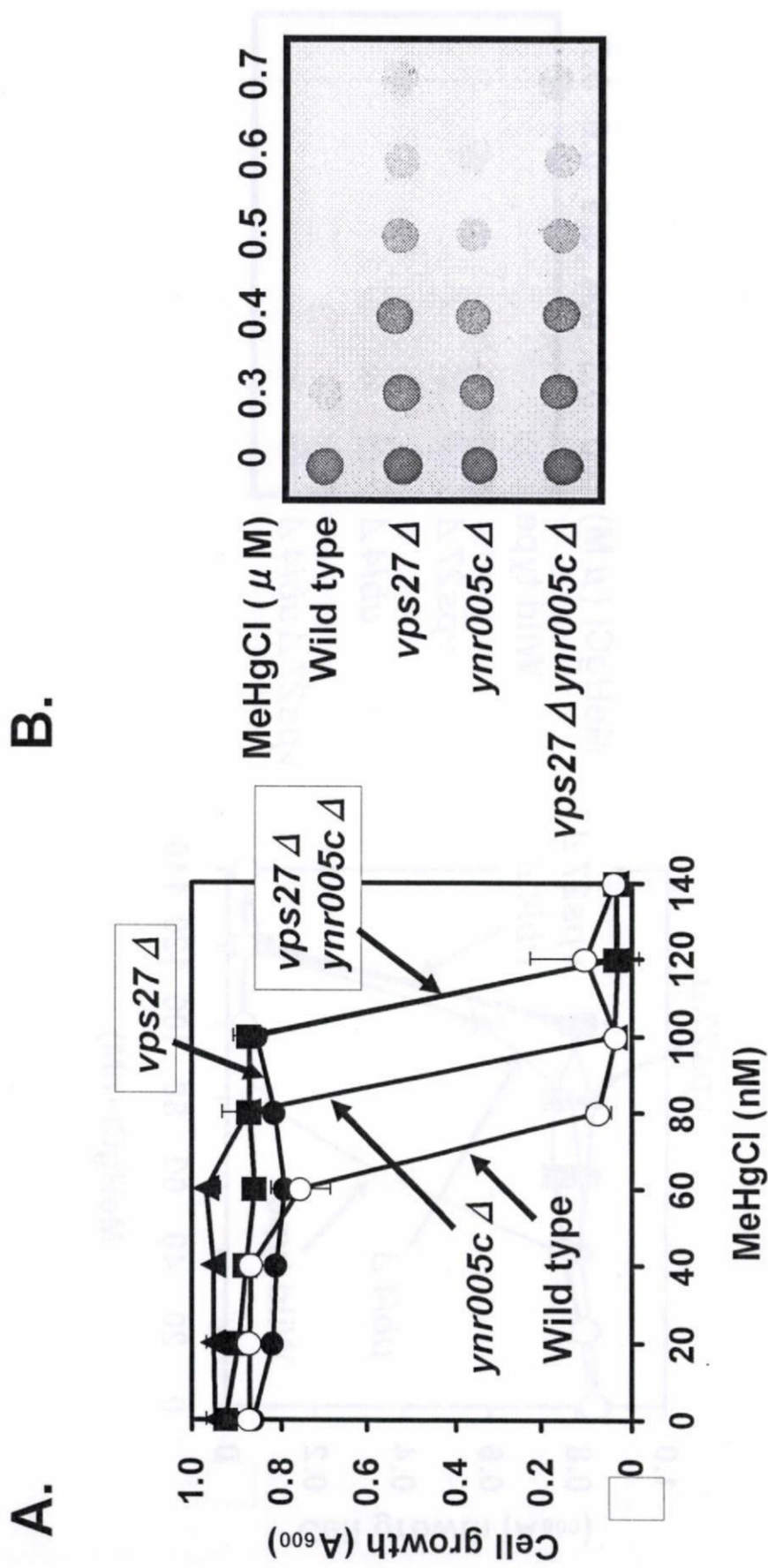
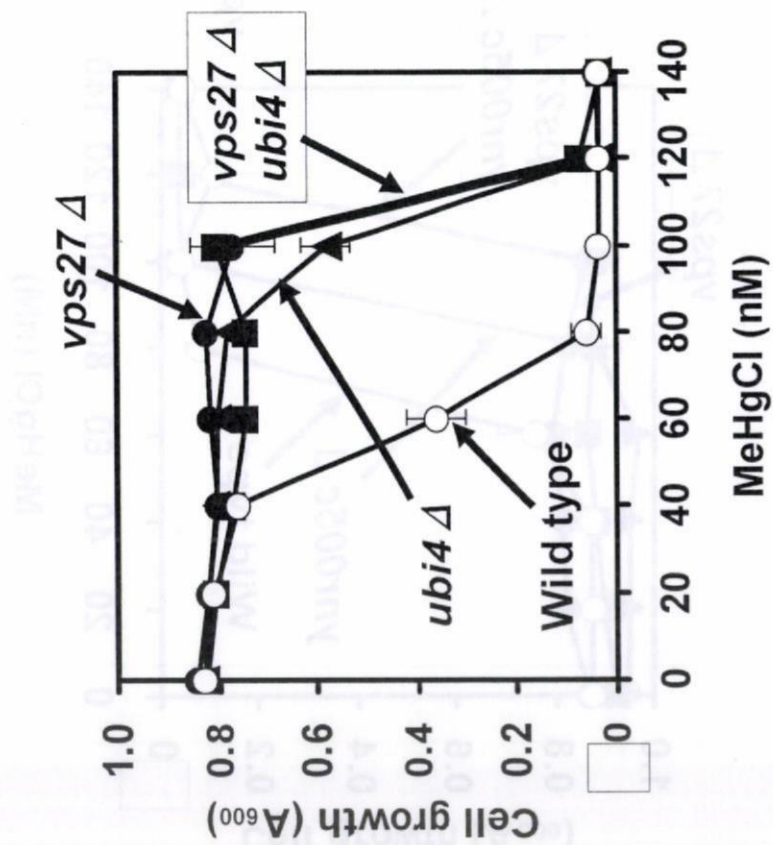


Figure 11. *Vps27*またはHse1と結合が報告されている蛋白質の欠損がメチル水銀感受性に与える影響  
Figure 3-1と同様の方法でメチル水銀感受性を検討した。



**Figure 12-1. Vps27·Ynr005c二重欠損がメチル水銀感受性に及ぼす影響**  
 A. Figure 3-1と同様の方法でメチル水銀感受性を検討した。B. Figure 2と同様の方法でメチル水銀感受性を検討した。

A.



B.

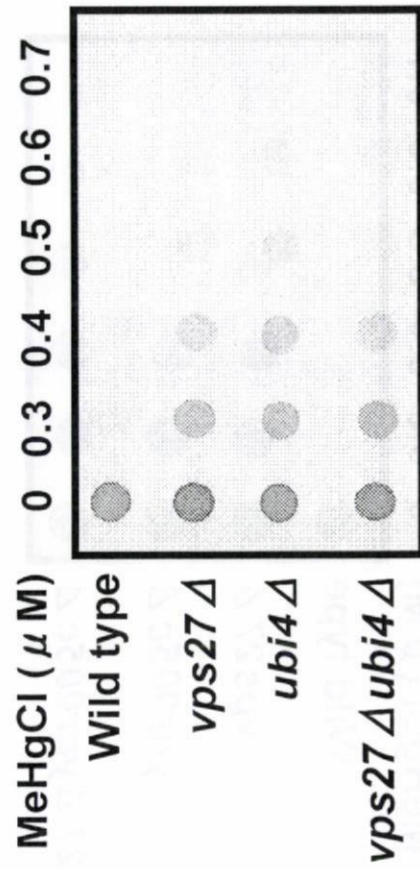
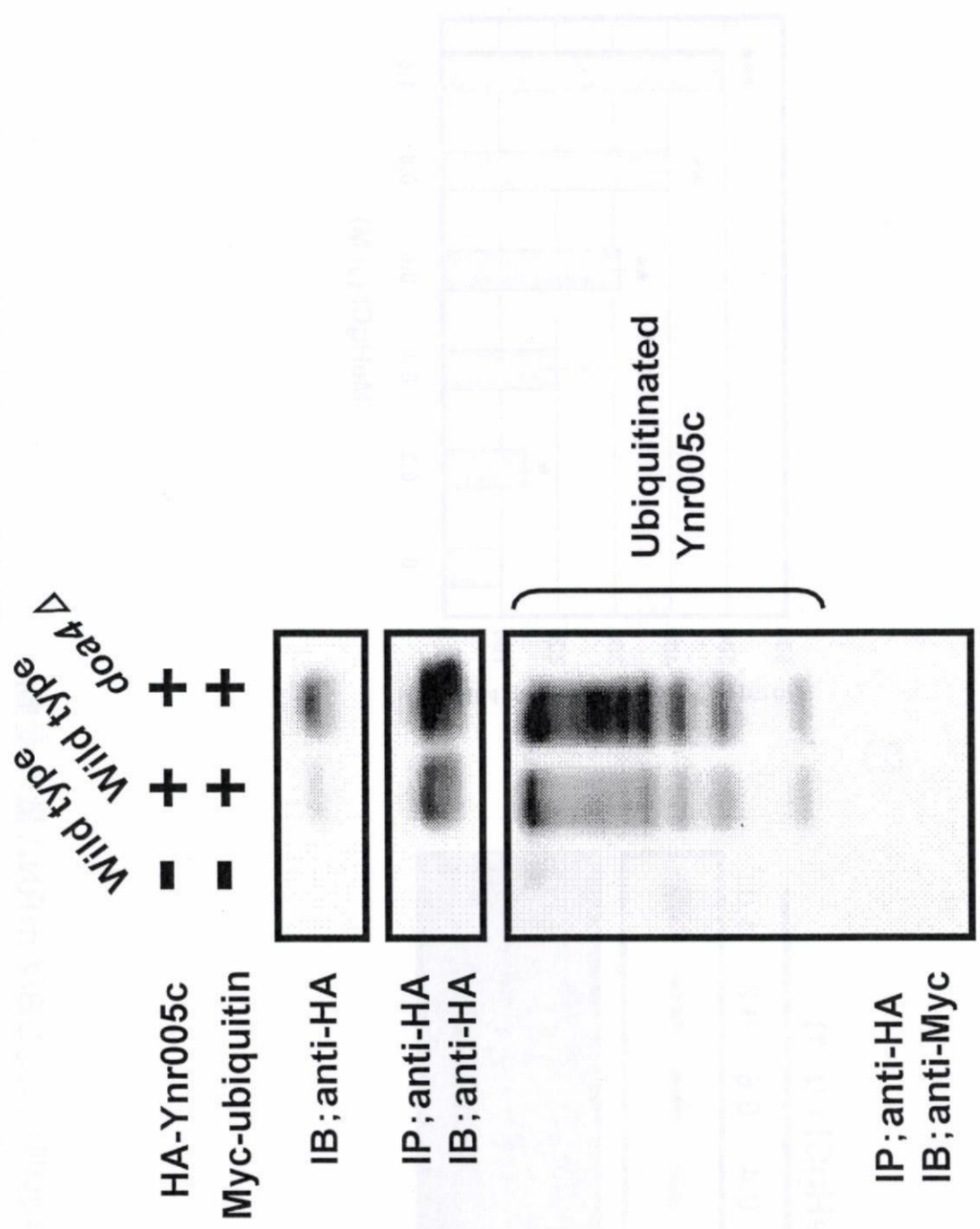
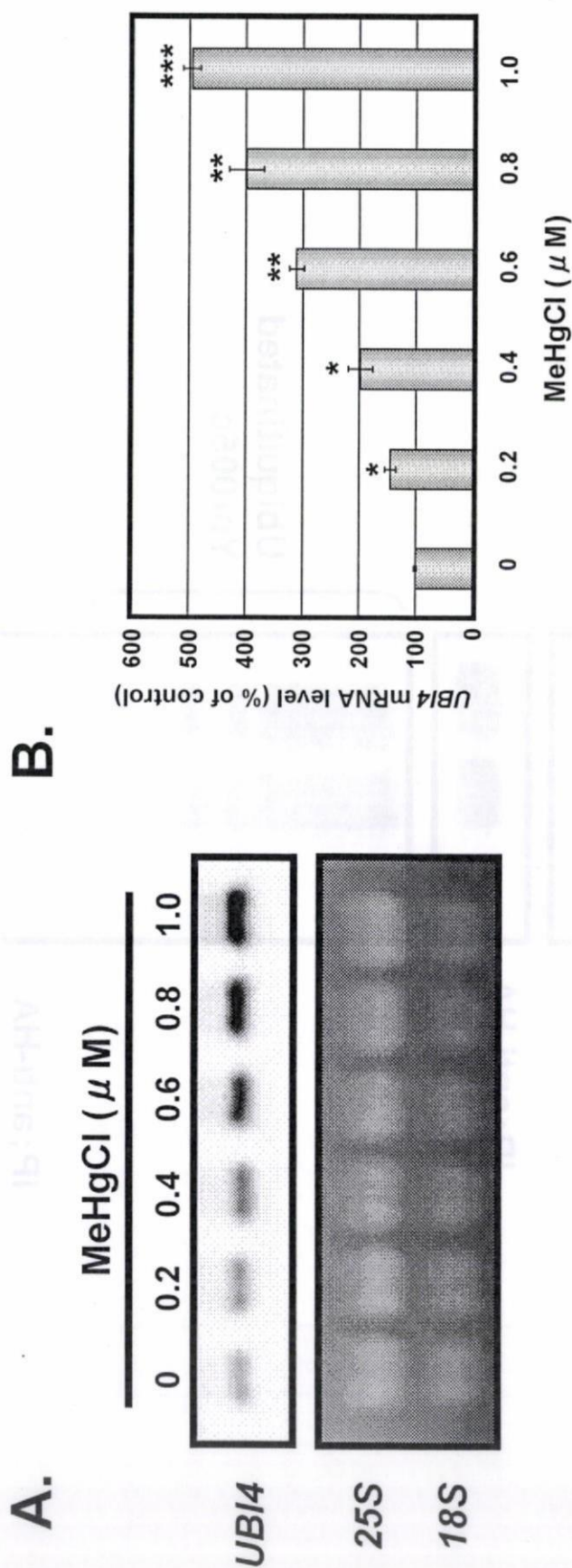


Figure 12-2. Vps27·Ubi4二重欠損がメチル水銀感受性に及ぼす影響

A. Figure 1と同様の方法でメチル水銀感受性を検討した。B. Figure 2と同様の方法でメチル水銀感受性を検討した。



**Figure 13. Ynr005cのユビキチン化**  
 Ynr005cにHA-tagを融合させた蛋白質とユビキチン融合させた蛋白質を高発現させた酵母の抽出液について抗HA抗体で免疫沈降を行った後に抗Myc抗体を用いたWerstern blottingによりYnr005cのユビキチン化を検出した。



**Figure 14.** メチル水銀処理によるUBI4 mRNA量の変動

A. 各濃度 (0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 μM) の塩化メチル水銀で90min 処理した酵母からRNAを抽出した後、Northern blottingによりUBI4 mRNAレベルを検討した。B. Aで得られたバンドを塩化メチル水銀未処理時を100%として定量化した。(\*; p<0.05, \*\*; p<0.01, \*\*\*; P<0.001)



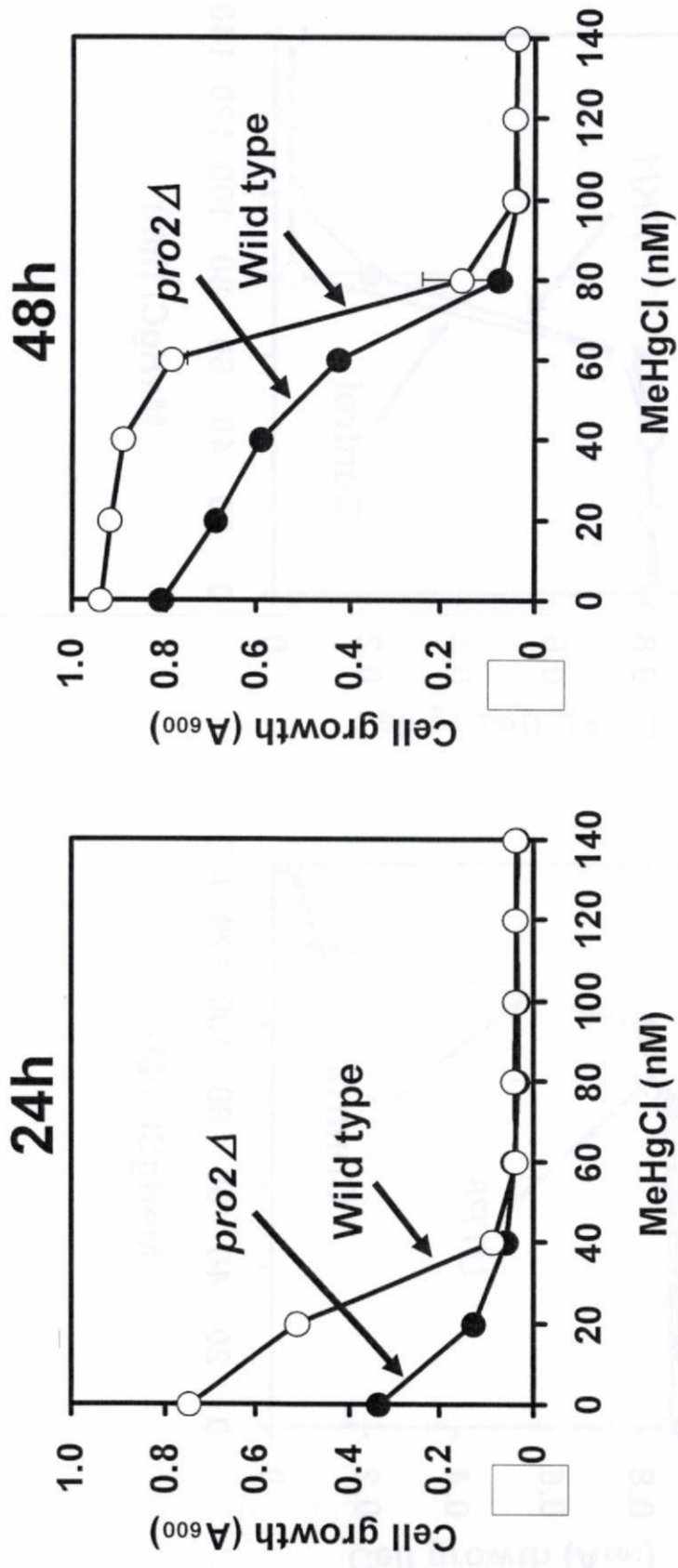


Figure 15. Pro2欠損がメチル水銀感受性に及ぼす影響

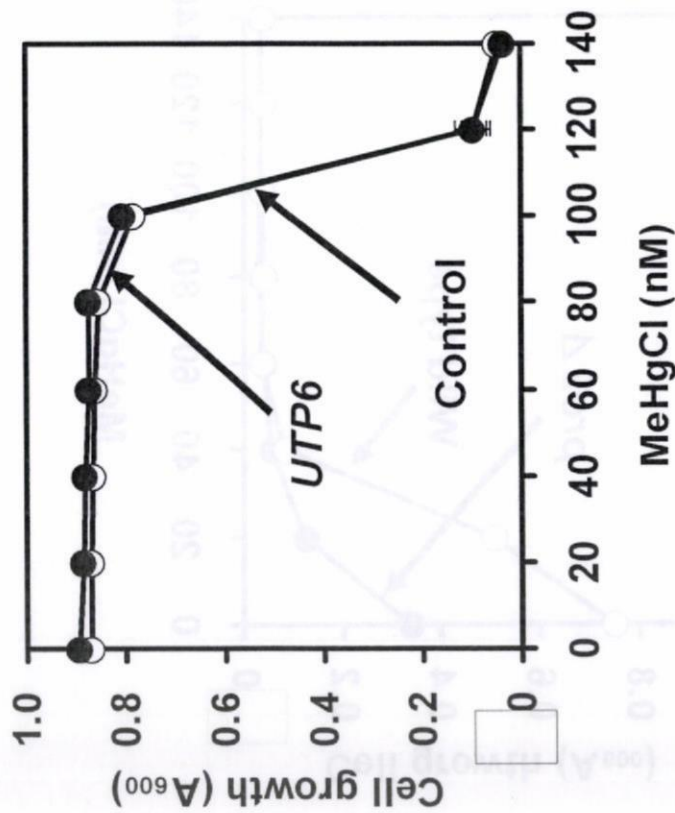
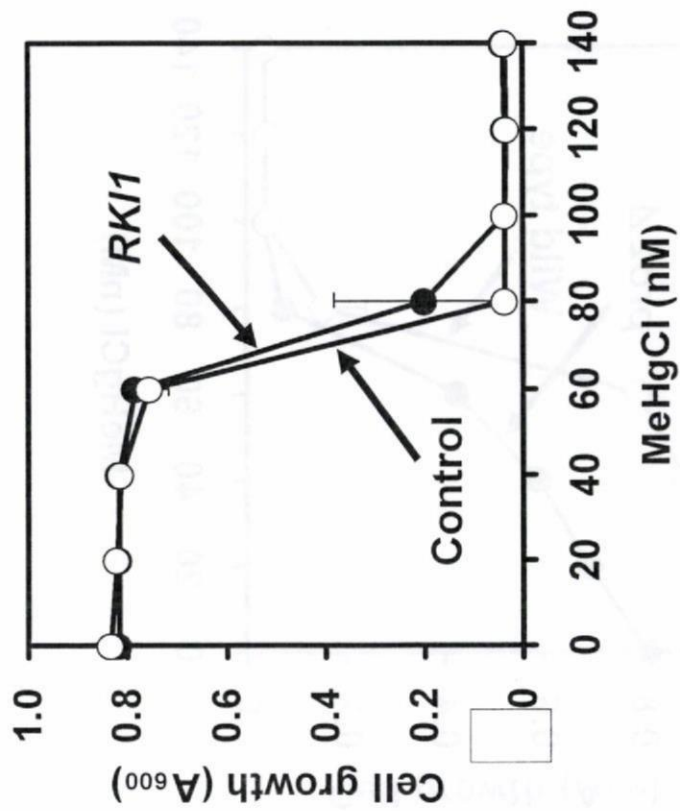
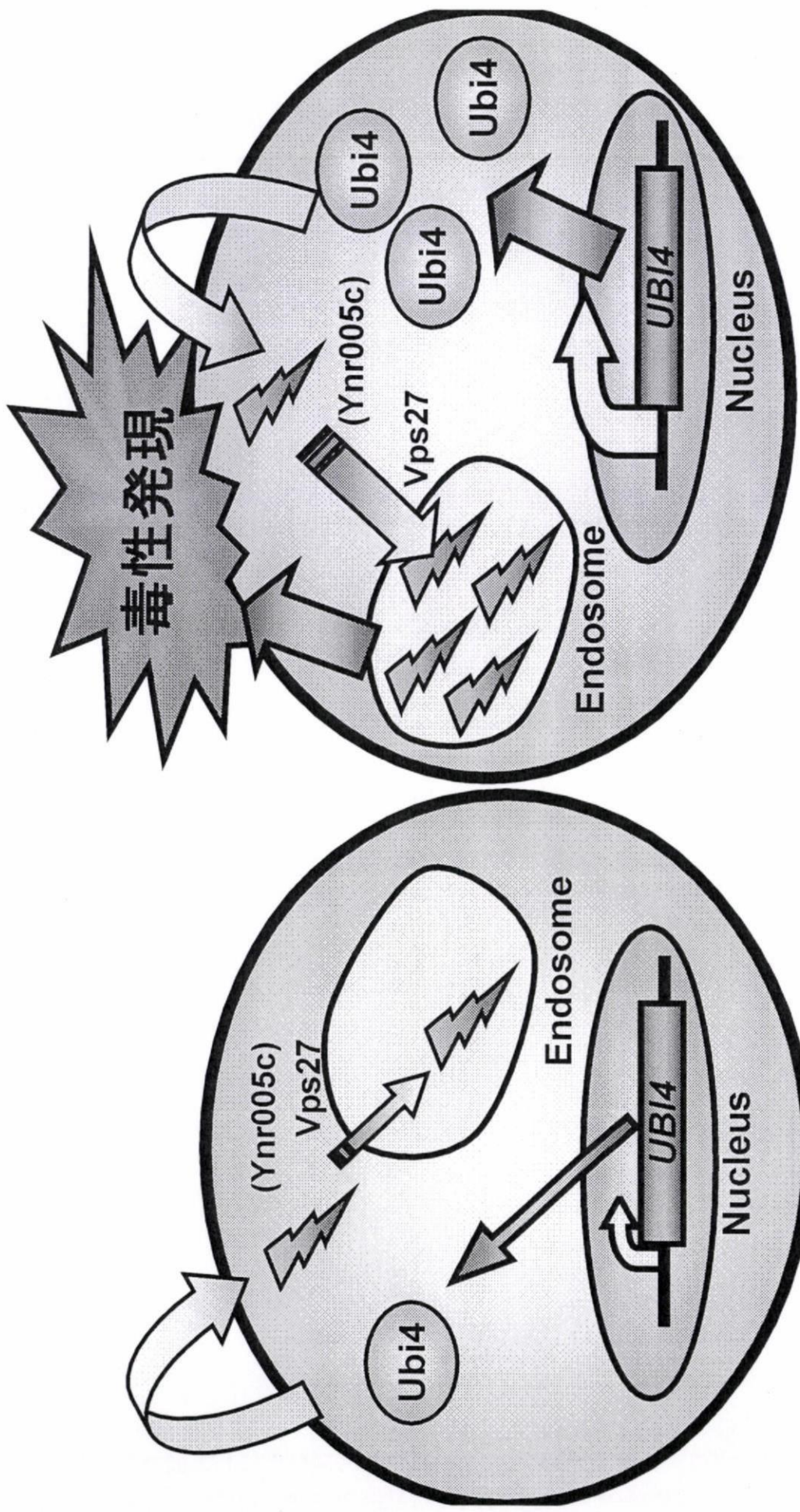


Figure 16. Utp6またはRki1高発現がメチル水銀感受性に及ぼす影響



メチル水銀存在下

メチル水銀非存在下

Figure 17. エンドソーム内への蛋白質取り込み促進によるメチル水銀毒性増強機構のモデル図

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

（分担）研究報告書

Protein phosphatase type 1 の機能低下による亜ヒ酸毒性増強機構

分担研究者 久下周佐 東北大学大学院薬学研究科准教授

（協力研究者 高橋 勉 東北大学大学院薬学研究科助教）

我々は欠損により出芽酵母の亜ヒ酸に対する感受性を増強させる細胞内因子として Reg1 を同定している。Reg1 はホスファターゼ活性を持つ Glc7 と protein phosphatase type 1 (PP1) complex を形成しており、Reg1 欠損により PP1 complex の活性が低下することが知られている。PP1 complex は出芽酵母の糖代謝を司る Ser/Thr キナーゼである Snf1 kinase complex の脱リン酸化を促進することによって、その kinase 活性を抑制する。本研究では、Reg1 欠損による亜ヒ酸毒性増強機構における Snf1 の役割について検討を行った。まず、Snf1 高発現が酵母の亜ヒ酸感受性に与える影響を検討したところ、Snf1 高発現によって酵母が亜ヒ酸に対して高い感受性を示すことが明らかになった。また、Reg1 欠損による亜ヒ酸毒性増強作用が Snf1 同時欠損により軽減された。これらの結果は Reg1 欠損による亜ヒ酸毒性増強に Snf1 kinase complex が深く関与していることを示唆している。Snf1 kinase complex が有するキナーゼ活性が亜ヒ酸毒性増強に必要なことも確認された。また、Reg1 欠損により Snf1 のリン酸化の亢進が認められたことか、Reg1 欠損による亜ヒ酸毒性増強は Snf1 kinase complex のキナーゼ活性の過剰な亢進による可能性が示唆された。Snf1 kinase complex の下流因子の中に亜ヒ酸毒性の増強に関わる蛋白質が存在していると考えられることから、これまでに報告されている Snf1 kinase complex の下流因子と亜ヒ酸毒性との関係を調べたところ、Mig1 の欠損が酵母の亜ヒ酸感受性を上昇させることが明らかとなった。Mig1 は、Snf1 kinase complex によるリン酸化によってその活性が抑制される転写因子である。Reg1 欠損酵母の Mig1 をさらに欠損させても、Reg1 欠損酵母の亜ヒ酸感受性はほとんど影響を受けなかったことから、Mig1 と Reg1 の欠損は同一の経路を介して亜ヒ酸の毒性を増強していると考えられる。また、Mig1 の高発現酵母は亜ヒ酸耐性を示したが、Reg1 欠損酵母に Mig1 を高発現させた場合には Mig1 高発現による亜ヒ酸耐性はほとんど認められな