

2008년 2월
석사학위논문

Role of Jab1/CSN5 in targeting immature BCRP for
endoplasmic reticulum-associated degradation

조선대학교 대학원
바이오신약개발학과
이 지 윤

Role of Jab1/CSN5 in targeting immature BCRP for
endoplasmic reticulum-associated degradation

2008年 2月 日

조선대학교 대학원
바이오신약개발학과
이 지 윤

Role of Jab1/CSN5 in targeting immature BCRP for
endoplasmic reticulum-associated degradation

지도교수 윤 지 수

이 논문을 이학석사학위 청구논문으로 제출함

2007年 10月 日

조선대학교 대학원
바이오신약개발학과
이 지 윤

이지윤의 석사학위 논문을 인준함

위원장 최 철 희 교수 인

위 원 한 송 이 교수 인

위 원 윤 지 수 교수 인

2007年 11月 日

조선대학교 대학원

TABLE OF CONTENTS

TABLE OF CONTENTS	I
LIST of FIGURES.....	III
ABSTRACT.....	IV
I. 서론.....	1
II. 재료 및 방법.....	8
1. 세포 배양.....	8
2. Western Blot 분석.....	8
3. Transfection.....	9
4. Immunoprecipitation.....	9
5. 핵, 세포질 및 세포막의 분리	9
III. 결과.....	11
1. Proteasome에 의한 BCRP의 분해.....	11
2. Immature BCRP deletion mutant의 세포질에서의 분해.....	11
3. Immature BCRP와 CSN5의 결합.....	11
4. CSN5와 deletion mutant의 직접적인 결합.....	12
5. CSN5와 BCRP의 N-terminal 및 C-terminal과의 결합.....	13
6. Immature BCRP의 세포질에서의 분해.....	13
7. Immature BCRP와 KPC1과의 결합.....	14
IV. 고찰.....	26
V. 요약 및 결론.....	30

VI. 감사의 글.....31

VII. 참고문헌.....32

LIST OF FIGURES

Fig. 1. N-glycosylation consensus sequences in human BCRP.....	4
Fig. 2. ERAD.....	5
Fig. 3. Model for p27KIP1 ubiquitination by two distinct ubiquitin ligase..	6
Fig. 4. Model for KPC-regulated degradation of p27.....	7
Fig. 5. Prevention of immature BCRP degradation by proteasome inhibitor in SK-MES-1.....	15
Fig. 6. Immature BCRP deletion mutants were degraded in the cytoplasm.....	16
Fig. 7. CSN5 associates specifically with immature BCRP.....	18
Fig. 8. Immature BCRP binds directly with CSN5.....	20
Fig. 9. CSN5 participates in multi or polyubiquitination to transmembrane (TM) domain of BCRP.....	22
Fig. 10. Subcellular localization of mature and immature BCRP and CSN5	23
Fig. 11. Immature BCRP binds to KPC1.....	24

ABSTRACT

Role of Jab1/CSN5 in targeting immature BCRP for endoplasmic reticulum-associated degradation

Lee, Ji-Yoon

Advisor: Prof. Yun Jisoo

Department of Bio new drug development

Graduate School of Chosun University

Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) is an ABC half-transporter, glycoprotein that confers resistance to anticancer drugs such as mitoxantrone, topotecan, and SN-38. BCRP is degraded in human cancer cells treated with glycosylation inhibitor, tunicamycin. In this study, I have attempted to elucidate the degradation mechanism of immature BCRP. The cellular interaction with Jab1/CSN5 was identified using the wild type, mutant (N596Q) of BCRP and Jab1/CSN5 after cotransfection of their expression plasmids to HEK293T cells. The cells were treated with the various inhibitors. In vitro binding assay, immunoprecipitation and Western blot analyses were performed to characterize the expression status of BCRP and interaction with Jab1/CSN5. I found that degradation of BCRP induced by tunicamycin is inhibited by proteasome inhibitor, MG132 and identified that Jab1/CSN5 acts as a binding partner of immature BCRP. In cotransfected HEK293T cells, mutant BCRP (N596Q) binds to Jab1/CSN5 under both the presence and the absence of proteasome inhibitors.

These results demonstrate that Jab1/CSN5 especially binds to immature

BCRP. In fact, endogenous Jab1/CSN5 interacts with immature BCRP induced by tunicamycin and MG132 in SK-MES-1 and MCF-7 cells. Deglycosylated immature BCRP is targeted to a proteasome-dependent degradation pathway. Jab1/CSN5 acts as mediator targeting immature BCRP to endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) pathway and prompts subsequent degradation of immature BCRP by proteasome.

I. 서 론

ATP-binding cassette (ABC) transporter들은 세포막에 있는 펌프로서 세포막을 통해 다양한 물질들을 배출한다(1). 이 단백질은 거의 모든 종에서 발견되고, 공통적으로 친수성의 nucleotide binding domains (NBDs)과 소수성의 transmembrane domains (TMDs)을 가지고 있다. TMD는 리간드와 결합하는 위치를 형성하고, NBD는 결합된 리간드의 이동을 돕기 위해 ATP와 결합해서 가수분해 시킨다(2). 인간 ABC transporter의 보편적인 기능은 세포로부터 세포 독성 물질을 분비하는 것이다. 이 transporter의 종류에는 P-glycoprotein (P-gp, ABCB1), multidrug resistance-associated protein (MRP, ABCC1-6과 ABCC10-12) 및 breast cancer resistance protein (BCRP, ABCG2)이 있고, 장, 간, 신장에 매우 높게 발현되어 있다. 특히 P-gp와 BCRP는 뇌와 태반 조직의 상피와 줄기 세포에서도 발현된다(3-5).

Breast cancer resistance protein (BCRP)은 mitoxantrone, irinotecan 및 doxorubicin과 같은 항암제를 뱉어내는 ABC transporter이다. 완전한 ABC transporter들은 2개의 NBD와 2개의 TMD로 구성되어 있지만 BCRP는 하나의 NBD와 하나의 TMD로 구성된 half-transporter이다. 그러므로 transporter로서의 기능을 하기 위해서 세포막에서 homodimer로 존재한다(5-7). BCRP는 655개의 아미노산을 가진 glycoprotein이고, glycosylation이 일어나는 부위는 아미노산 418, 557, 596라고 추정되지만(Fig. 1), 이 중에서 596 번째 asparagine에서 N-glycosylation이 일어난다(8). N-glycosylation은 소포체의 내강에서 발생하는 진핵 세포 단백질의 공통적인 전사 후 변형 중 하나이다. 소포체에서 정상적으로 glycosylation이 일어나면 단백질은 Golgi로 이동하지만, misfolded glycoprotein이 생기면 endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) system에 의해 분해된다(9-11).

ERAD과정이란 소포체에서 misfolded protein이 인식되면 그 단백질은 소포체에서 세포질로 분비되어 ubiquitination이 되고 최종적으로 26S proteasome에 의해 인식되어 분해되는 과정이다(Fig. 2). Proteasome에

의해 분해되는 단백질은 2가지 단계를 거쳐 ubiquitin proteasome system (UPS)에 의해 분해된다. 첫 번째 단계는 E1 (ubiquitin-activating enzyme)에 의해 활성화된 ubiquitin이 E2 (ubiquitin-conjugating enzyme)의 결합을 통해 E3에 접합되면 기질 특이성을 갖는 E3 (ubiquitin ligase)에 의해서 표적 단백질은 poly혹은 multiubiquitination된다. 두 번째 단계에서는 ubiquitination된 단백질이 26S proteasome에 의해 분해된다. 그리고 ubiquitin은 다시 활용할 수 있도록 방출시킨다(12).

최근 보고에 의하면 UPS에 의한 단백질의 분해를 유도 혹은 촉진시키는 단백질이 보고되고 있다. COP9 signalosome complex는 *Arabidopsis*에서 발견되었고, 포유동물에서 8개의 subunit (CSN1, 2, 3, 4, 5, 6, 7a, 7b 및 8)으로 구성되어 있다(13). 그리고 이 subunit은 26S proteasome의 19S lid와 translation initiation complex eIF3와 높은 상동성을 가지고 있다. 그리고 최근에는 단백질 분해에 중요한 역할을 하는 것으로 추정된다(14). Jun-activation domain-binding protein 1 (Jab1)은 처음에는 activator protein-1 (AP-1)의 전사 활성을 증가시키는 단백질로 보고되었다(15). Jab1은 COP9 signalosome complex의 5번째 subunit로서 CSN5라고도 불리운다. 최근 연구에서는 Jab1이 p53, p27, West Nile virus capsid 및 Smad4/7 단백질의 세포질 분해의 매개체로서 그리고 핵의 방출자로서 기능을 한다고 알려졌다(16-19). Jab1은 p27이 세포질에서 분해 될 때 p27을 핵에서 세포질로 이동시키는 매개체 역할을 한다. 그림 3에서 보는 것과 같이 p27은 cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitor이고, S-G2 시기에 핵 속에서 SKP1-CUL1-F-box protein (SCF)에 의해 ubiquitination 되어서 핵에 존재하는 proteasome에 의해 분해된다. 그러나 G0-G1 시기가 되면 p27은 Jab1에 의해 핵 속에서 세포질로 이동되고, Kip1 ubiquitylation-promoting complex (KPC)에 의해 ubiquitination되어 세포질에 있는 proteasome에 의해 분해된다(16, 20-22). KPC는 KPC1과 KPC2로 구성되고, G1시기에 p27의 E3 ubiquitin ligase의 역할을 한다. KPC1의 C-terminal에 있는 Ring-finger domain은 E2와 결합하여 표적 단백질에 ubiquitin을 접합시

키는 역할을 하고, N-terminal에 있는 SPRY domain은 아직 정확한 역할이 밝혀지지 않았지만, 표적 단백질과의 결합에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. KPC2는 N-terminal에 ubiquitin like domain (UBL)과 2개의 ubiquitin-associated domain (UBA)이 있고, C-terminal에 STI1 (heat shock chaperonin-binding) domain이 있다. UBL domain은 KPC1과 26S proteasome의 19S lid와 상호 작용하는데 필요하고, UBA domain은 polyubiquitination된 단백질을 인식하는데 중요하다(23-27). STI1 domain은 잘 알려지지 않았지만, KPC1의 안정성과 p27의 polyubiquitination에 요구된다(Fig. 4).

위와 같은 사실들을 통해서 glycosylation이 되지 않은 BCRP 즉, immature BCRP는 ERAD에 의해서 분해 될 것이라고 생각되어진다. 그리고 그 과정에서 CSN5가 매개체 역할을 하고, immature BCRP가 ubiquitination되는 때에는 KPC가 E3 ubiquitin ligase로 작용할 것이라고 생각된다. 그러므로 본 연구에서는 immature BCRP가 분해되는 메카니즘과 분해에 관여하는 단백질을 동정하여 immature BCRP 분해를 분자 수준에서 새롭게 규명하였다. 따라서 본 연구에서는 소포체에 있는 immature BCRP가 세포질로 빠져나와 proteasome에 의해 분해된다는 사실을 밝혀냈다. 또한 immature BCRP는 CSN5와 특이적으로 결합한다는 사실과 E3 ubiquitin ligase 역할을 하는 KPC1과도 결합한다는 사실을 알게 되었다.

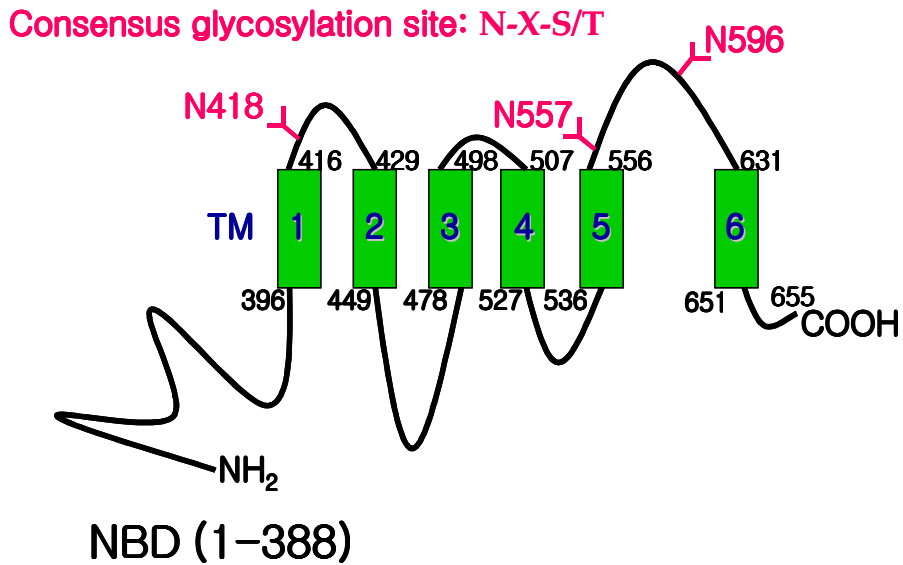
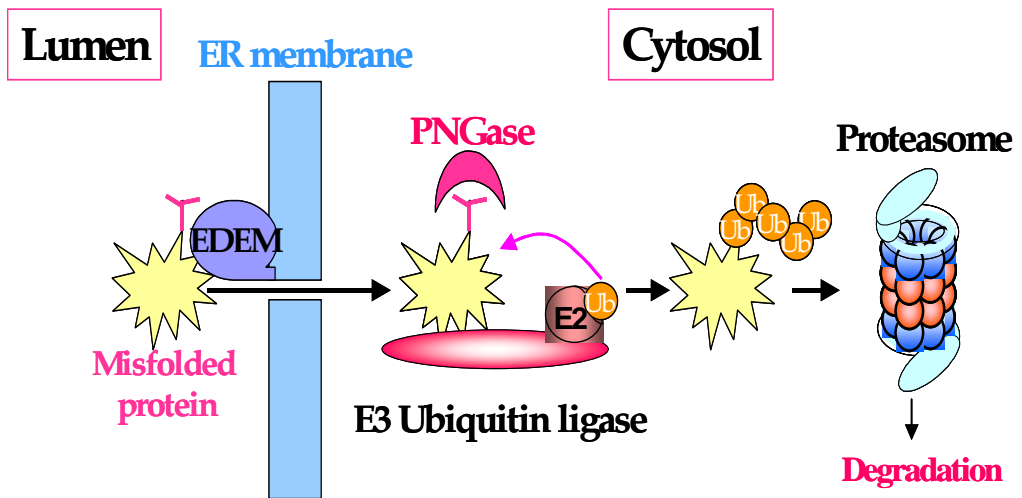


Fig. 1. N-glycosylation consensus sequences in human BCRP.

Two-dimensional hypothetical model of human BCRP. The BCRP consists of six transmembrane domains (amino acids 396-416, 429-449, 478-498, 507-527, 536-556, and 631-651), one nucleotide binding domain (NBD) located at the N-terminus (amino acids 1-388), and three potential N-linked glycosylation sites.



EDEM: ER-degradation enhancing alpha-mannosidase like protein

Fig. 2. ERAD (endoplasmic reticulum-associated degradation).

Hypothetical ERAD model for degradation of a misfolded glycoprotein. A glycoprotein that fails to acquire the correct structure is extracted from the ER using the novel channel. In the cytosol, it is recognized by a glycoprotein-specific E3 ubiquitin ligase complex, and ubiquitinated. PNGase then removes the N-linked glycan, and the polyubiquitinated protein was degraded by proteasome.

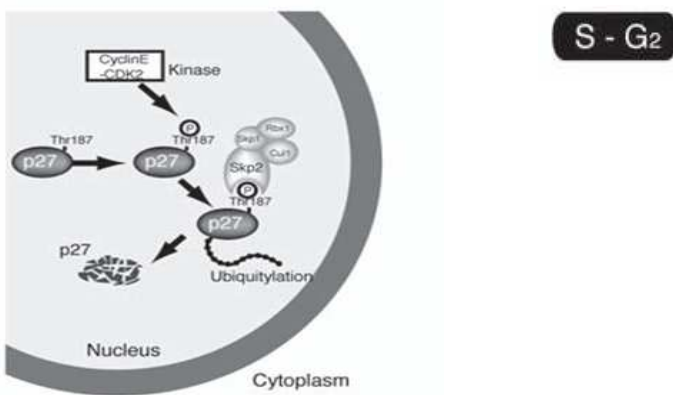
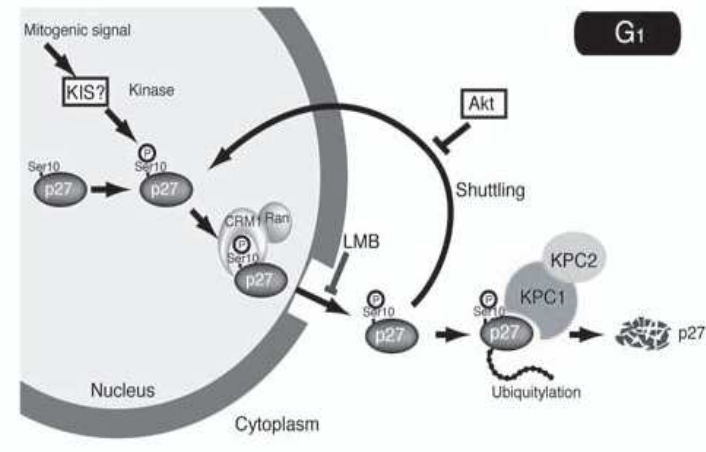


Fig. 3. Model for p27^{Kip1} ubiquitination by two distinct ubiquitin ligase. (Upper panel) At G1 phase, p27^{Kip1} is phosphorylated on Ser¹⁰ and exported from the nucleus in response to a mitogenic signal. It is then ubiquitinated by KPC1-KPC2 in the cytoplasm and degraded by the proteasome. LMB, leptomycin B. **(Lower panel)** During S and G2 phases, p27^{Kip1} is phosphorylated on Thr¹⁸⁷ by cyclin E-CDK2, ubiquitinated by SCF^{Skp2} in the nucleus, and degraded by the proteasome(22).

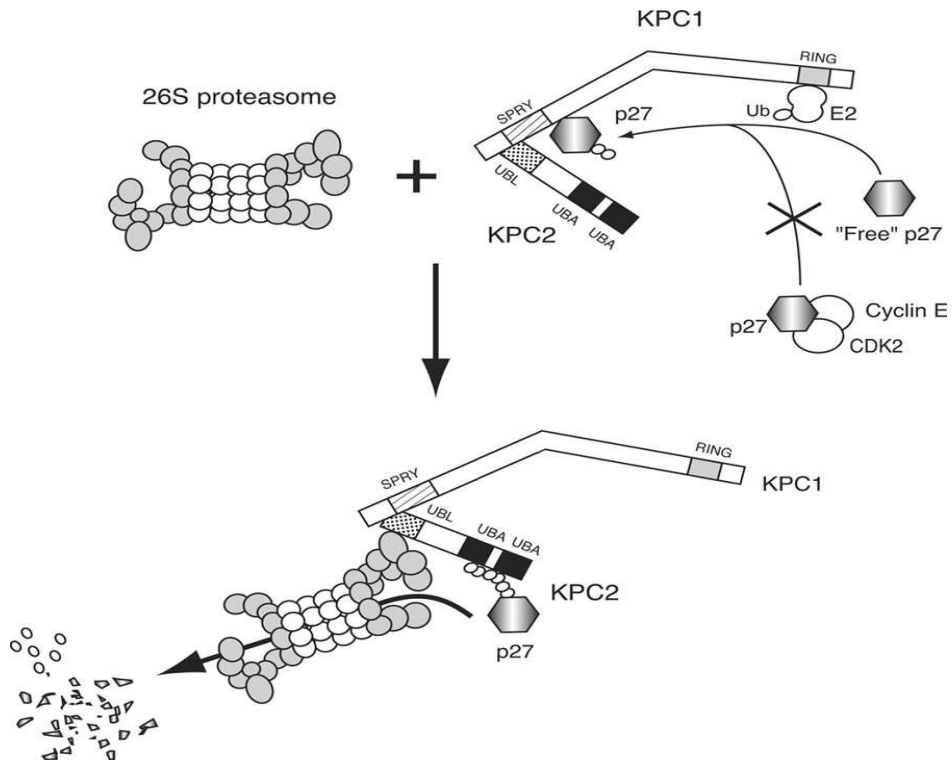


Fig. 4. Model for KPC-regulated degradation of p27.

The NH₂-terminal region of KPC1, which is associated with KPC2, recognizes free p27, which is then ubiquitylated by the COOH-terminal RING-finger domain of KPC1. The UBL-UBA-UBA protein KPC2 may serve as an adapter that participates in the delivery of polyubiquitylated p27 to the 26S proteasome(28).

II. 재료 및 방법

1. 세포 배양

인간 신장 세포(HEK 293T), 폐암 세포(SK-MES-1), 및 유방암 세포(MCF-7)를 37°C, 5% CO₂와 습윤화된 배양기(Sanyo, Osaka, Japan)내에서 배양하였다. 배양액은 HEK 293T와 SK-MES-1 세포에는 56°C에서 30분간 열처리된 fetal bovine serum (FBS, GibcoBRL, Gland Island, NY, USA) 10%와 항생제(antibiotic-antimycotic, GibcoBRL) 5%를 함유한 DMEM (dulbecco's modified eagle medium, GibcoBRL)을 사용하였고, MCF-7 세포에는 RPMI-1640 (GibcoBRL) 배지를 사용하였다.

2. Western blot 분석

세포를 lysis buffer (Tris-HCl (pH 6.8), 200 mM phenyl-methylsulfonyl fluoride (PMSF))로 용해시켰다. 여기에 2X SDS buffer (125 mM Tris-HCl (pH 6.8), 4% SDS, 8% 2-mercaptoethanol, 20% glycerol)를 첨가하고, 100°C에서 5분 동안 가열했다. 단백질의 정량은 bovine serum albumin (BSA)을 표준으로 이용해서 protein assay kit (Bio-rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 측정했다. 정량된 단백질은 SDS sample buffer를 넣어서 100°C에서 5분 동안 가열했다. 단백질은 SDS-PAGE에 의해 분리되었고, polyvinylidene fluoride (PVDF) transfer membrane으로 옮겼다. 그리고 blocking buffer 안에 PVDF transfer membrane을 넣고, 실온에서 1 시간 동안 blocking시켰다. Blocking이 끝나면 PVDF transfer membrane을 1차 항체 monoclonal anti-BCRP antibody BXP-21 (1:1000, Kamiya, Seattle, WA, USA), FLAG (1:1000, Sigma, ST. Louis, MO, USA) 또는 HA (1:1000, Santa Cruz, Delaware, CA, USA)가 들어있는 blocking buffer 안에 넣고, 실온에서 반응시킨 후 TBST 용액으로 세척했다. 그 후 PVDF transfer membrane을 2차 항체 goat anti-rabbit IgG 와 goat anti-mouse IgG (1:2000, Amersham, Piscataway, NJ, USA)가 들어있는 blocking buffer 안에 넣고, 실온에서

반응시켰다. 다시 TBST용액으로 세척한 후, enhanced chemiluminescence (ECL) kit (Amersham)를 이용해서 PVDF transfer membrane을 현상했다.

3. Transfection

Transfection하기 전날 HEK 293T 세포를 6cm dish 안에 세포수가 1×10^6 이 되도록 깔아서 다음날 세포가 70-80% 포화 상태에 도달하게 하였다. 그리고 LipofectamineTM Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)과 PLUSTM Reagent (Invitrogen)를 이용하여 plasmid를 세포에 transfection 시켰다. 6시간 후에 serum-free media는 complete culture media로 대체되었다. Transfection된 세포는 37°C, 5% CO₂에서 24시간 동안 배양되었다.

4. Immunoprecipitation (IP)

Transfection된 세포를 차가운 PBS를 이용하여 2회 세척하였고, 1시간 동안 4°C에서 protease inhibitors (1 mM PMSF, 1 mM DTT, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ leupeptin, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pepstatin A 및 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aprotinin)를 함유한 lysis buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10% glycerol 및 1% Triton X-100)를 이용하여 용해시켰다. 1시간 후에 cell lysate를 14,000rpm에서 15분 동안 원심 분리하였다. 원심 분리가 끝나면 세포 상층액을 50 μl 채취하여 2X SDS sample buffer 50 μl 에 넣어 total cell lysate를 만들었다. 그리고 남은 상층액은 1차 항체가 함유된 anti-FLAG M2 agarose (Sigma) 30 μl 에 넣어 4°C에서 overnight 시켰다. 그 다음날 lysis buffer를 이용하여 beads를 4회 세척한 후, beads에 SDS sample buffer를 넣고 100°C에서 5분 동안 끓였다.

5. 핵, 세포질 및 세포막의 분리

세포의 핵, 세포질 및 세포막의 분리는 subcellular proteome extraction kit (Calbiochem, La Jolla, CA, USA)를 이용하여 분리하였다.

세포를 PBS로 2회 세척한 후 이 세포에 protease inhibitor cocktail 1 μl 가 들어있는 extraction buffer I를 200 μl 넣은 후 4°C에서 10 분간 반응시켰다. 이 sample을 1,000 g로 10분 동안 원심분리 한 후, 세포질이 들어있는 상층액을 분리하였다. protease inhibitor cocktail 1 μl 가 들어있는 extraction buffer I를 100 μl 넣어 세척했다. 세척이 끝난 pellet에 protease inhibitor cocktail 1 μl 가 들어있는 extraction buffer II를 200 μl 넣은 후 4°C에서 30 분간 반응시켰다. 이 sample을 6,000 g로 10분 동안 원심 분리 한 후, 세포막이 들어있는 상층액을 분리하였다. protease inhibitor cocktail 1 μl 가 들어있는 extraction buffer II를 100 μl 넣어 세척했다. 세척이 끝난 pellet에 protease inhibitor cocktail 1 μl 와 benzonase 0.3 μl 가 들어가 있는 extraction buffer III를 100 μl 넣은 후 4°C에서 10 분간 반응시켰다. 이 sample을 6,800 g로 10분 동안 원심 분리 한 후, 핵이 들어있는 상층액을 분리하였다.

III. 결 과

1. Proteasome에 의한 BCRP의 분해

BCRP가 미성숙한 상태로 되었을 때 분해되는지 알아보기 위해 SK-MES-1 세포의 endogenous BCRP를 proteasome inhibitor인 MG132와 glycosylation inhibitor인 tunicamycin을 처리하여 immature BCRP로 만든 후 BCRP로 immunoprecipitation (IP)하여 immunoblot (IB) 하였다. 그 결과 약물처리를 하지 않은 세포는 mature BCRP를 가지고 있어 분해가 되지 않은 반면에 MG132를 처리한 세포와 tunicamycin을 처리한 세포는 약물처리를 하지 않은 세포에 비교해서 분해가 되는 양상을 보였다. 그리고 MG132와 tunicamycin을 함께 처리한 세포는 tunicamycin을 처리하였을 때 보다 분해가 덜 되었다. 이는 MG132가 proteasome의 기능을 억제함으로써 BCRP의 분해가 저해된 것으로 보인다. 따라서 이 실험 결과로 볼 때 immature BCRP는 proteasome에 의해 분해가 되는 사실을 알 수 있었다 (Fig. 5).

2. Immature BCRP deletion mutant의 세포질에서의 분해

앞의 데이터에서 보면 glycosylation이 일어나지 않는 BCRP는 proteasome에 의해서 분해된다는 것을 알 수 있었다. 분해에 관여할 BCRP내의 부위를 밝히기 위해 BCRP의 glycosylation에 관여하는 596번째 아미노산인 asparagine을 mutation 시킨 여러 가지 BCRP deletion mutant를 제작하였다(Fig. 6A). 그리고 이 mutant들을 HEK293T에 transfection하고 MG132를 처리한 후 세포질만을 fractionation하여 BCRP의 발현량을 Western blot으로 확인하였다. 그 결과 모든 deletion mutant들이 proteasome에 의해 분해됨을 알 수 있었다. 이는 BCRP를 분해시키는 메커니즘이 두 개 이상 존재한다고 추측된다(Fig. 6B).

3. Immature BCRP와 CSN5의 결합

Immature BCRP가 proteasome에 의해 분해 될 때 이를 매개하는 단백질이 있을 것이라 가정하고 CSN5라는 단백질을 찾아내었다. CSN5는 p53, p27, capsid of West Nile Virus 등의 단백질이 세포질에서 분해 될 때 유도체 역할을 한다. 그래서 HEK293T 세포에 BCRP wild type (BCRP/WT) 과 CSN5를 co-transfection 시키고, 여러 가지 약물을 처리하여 BCRP와 CSN5와의 binding 여부를 살펴보았다. MG132 (1 μ M), tunicamycin (1 μ g/ml) 및 monensin (0.5 μ M)을 세포 회수하기 전 20 시간 동안 처리하여 FLAG로 IP를 하여 HA와 FLAG로 IB를 하였다. 그 결과 MG132를 처리했을 때 immature BCRP가 되어서 CSN5와 결합을 한다. 하지만 MG132가 proteasome의 작용을 억제하기 때문에 BCRP는 분해되지 않았다. 그러나 tunicamycin을 처리하면 BCRP가 non-glycosylation이 되고, lysosome inhibitor인 monensin 을 처리했을 때에는 BCRP는 core glycosylation이 되어서 CSN5와 결합은 하지만, BCRP가 분해되어 MG132에 비해 약한 결합을 보였다(Fig. 7A).

BCRP를 미성숙한 상태로 만들기 위해 BCRP의 glycosylation에 중요하다고 알려진 BCRP의 596번째 아미노산인 asparagin을 glutamin으로 mutation시켜서 glycosylation이 되지 않은 BCRP/N596Q를 만들었다. 그리고 이 plasmid를 CSN5와 함께 HEK293T 세포에 co-transfection 시킨 후 MG132를 처리했을 때와 처리하지 않았을 때를 비교하여 보았다. 그 결과 BCRP wild type은 CSN5와 MG132를 처리했을 때만 강하게 결합을 하였고, BCRP/N596Q는 MG132 처리 유무에 관계없이 CSN5와 모두 결합하였으나 MG132를 처리하지 않았을 때는 MG132를 처리 했을 때 보다 분해되어서 약한 결합을 보였다(Fig. 7B).

4. CSN5와 deletion mutant의 직접적인 결합

CSN5가 immature BCRP와 결합한다는 것을 IP를 통해서 알아내었다. 그래서 CSN5의 어느 부위가 immature BCRP와 결합을 하는지 알아보기 위해서 CSN5의 deletion mutant를 만들었다(Fig. 8A). 그리고 deletion mutant들과 CSN5를 BCRP/WT과 함께 세포에 transfection 한 후 MG132

처리하여 IP를 하였다. 그 결과 CSN5의 MPN domain을 deletion한 것(Δ 54-191)과 C-terminal을 deletion한 것(Δ 191-334)이 모두 immature BCRP와 결합을 하였다. 따라서 CSN5가 immature BCRP와 결합하는 위치는 CSN5의 deletion mutant들이 공통적으로 가지고 있는 CSN5의 N-terminal 1-53 부분이라고 생각된다(Fig. 8C). 또한 CSN5와 BCRP의 결합이 직접적인지 아닌지를 알아보기 위해서 *in vitro* assay를 하였다. 세포 내에서의 결합의 유무를 보는 것이 아니라 세포 밖에서 단백질을 만들어 결합을 보는 것이기 때문에 직접적인 결합이라면 IP를 했을 때 결합을 할 것이다. CSN5는 *in vitro*에서 잘 만들어졌으나, BCRP/N596Q는 만들어지지 않아서 세포 내에 transfection해서 MG132를 처리한 후 IP를 하여 세포 밖에서 만들어진 CSN5와 반응시켰다. 그 결과 *in vitro*에서 BCRP/N596Q와 CSN5가 결합을 하였다. 이로써 immature BCRP는 CSN5와 직접적으로 결합한다는 것을 증명되었다(Fig. 8B).

5. CSN5와 BCRP의 N-terminal 및 C-terminal과의 결합

BCRP의 어느 부분이 CSN5와 결합하는지 알아보기 위해 BCRP를 nucleotide binding domain이 있는 N-terminal (BCRP/NT)과 transmembrane domain이 있는 C-terminal (BCRP/CT)로 나누었다. 그리고 BCRP/NT, BCRP/CT 및 BCRP/WT을 CSN5와 함께 HEK293T 세포에 transfection 시켜서 20시간 동안 MG132 (1 μ M)를 처리하고, FLAG로 IP를 해서 HA와 FLAG로 IB를 하였다. CSN5는 MG132를 처리 하였을 때 BCRP의 NT와 CT 두 부분에 모두 결합하였다. 그러나 MG132를 처리하지 않았을 때는 CT 부분에 더 강한 결합을 하였다. 그리고 FLAG로 IB를 했을 때 BCRP/NT와 BCRP/CT가 아래쪽으로 끌리는 것이 관찰되었다. 이것은 아마도 BCRP/NT와 BCRP/CT 부분에 ubiquitination이 일어났을 것이라고 추측된다. 따라서 BCRP를 ubiquitination시키는 E3 ubiquitin ligase가 있을 것이라 예상된다(Fig. 9).

6. Immature BCRP의 세포질에서의 분해

Immature BCRP가 세포질에서 분해되는지 확실히 알기 위해서 BCRP/WT과 BCRP/N596Q를 CSN5와 함께 HEK293T에 transfection시켜서 MG132를 처리하였을 때와 처리하지 않았을 때로 나누어 fractionation을 하였다. 그 결과 세포질 fractionation에서 BCRP/N596Q에 MG132를 처리하지 않았을 때가 MG132를 처리하였을 때에 비해 BCRP가 현저히 줄어든 것을 확인할 수 있었다. 따라서 immature BCRP는 세포질에서 분해된다는 사실을 확인하였다 (Fig. 10).

7. Immature BCRP와 KPC1과의 결합

Immature BCRP가 proteasome에 의해 분해되는 데에는 세포질에서 ubiquitination이 일어나야 한다. Ubiquitination은 E1, E2와 E3 enzyme의 작용에 의해서 일어난다. 그리고 이 3개의 enzyme 중에서 분해되는 단백질의 특이성을 결정하는 것은 E3 ubiquitin ligase이다. Immature BCRP를 분해시키는데 관계할 것이라고 예상되는 E3 ubiquitin ligase중 하나는 KPC (Kip ubiquitylation-promoting complex)이다. KPC는 세포질에 존재하는 단백질로서 p27을 분해시키는 E3 ubiquitin ligase로 작용한다. 그리고 KPC는 KPC1과 KPC2로 구성되어 있고, KPC1에 Ring-finger domain이 있어서 그것이 E3 ubiquitin ligase의 역할을 한다. 첫 번째 실험에서는 KPC1/WT과 BCRP/WT을 HEK293T 세포에 co-transfection 시키고 MG132 (1 μ M)를 20시간 동안 처리한 후 FLAG로 IP를 하였다. 그 결과 BCRP/WT과 KPC1/WT은 MG132를 처리하지 않았을 때는 결합을 보이지 않았지만, MG132를 처리했을 때는 immature BCRP가 되어서 KPC1과의 결합을 보였다(Fig. 11A). 두 번째 실험에서는 KPC1/NT766과 KPC1/WT을 BCRP/N596Q와 함께 HEK293T 세포에 transfection 시켜서 FLAG로 IP를 하였다. 그 결과 KPC1/NT766은 Ring-finger domain이 없는 발현 단백질이므로 BCRP/N596Q와 결합만 할 뿐 분해시키지 못했지만, KPC1/WT은 BCRP/N596Q를 분해시켰다. 따라서 KPC1이 immature BCRP의 E3 ubiquitin ligase로서 작용한다는 것을 알 수 있었다(Fig. 11B).

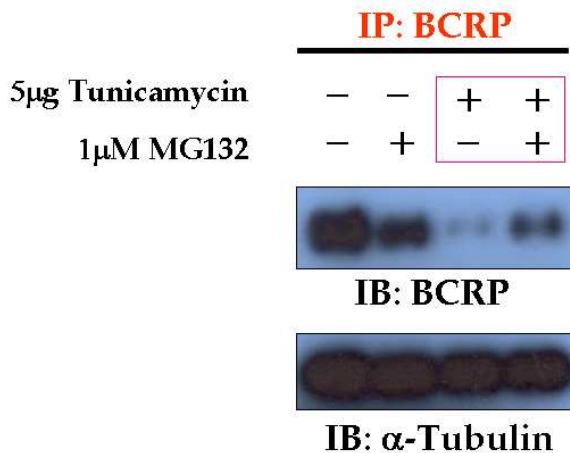
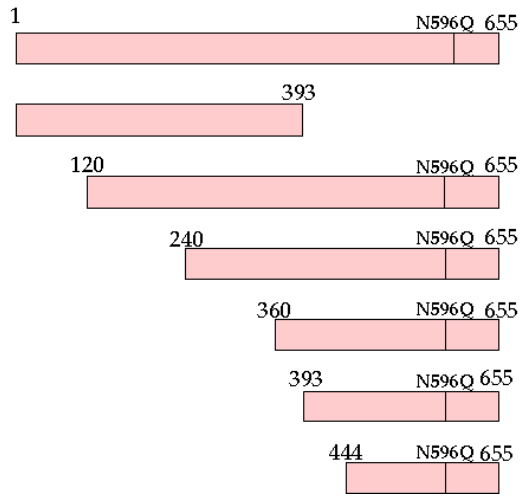


Fig. 5. Prevention of immature BCRP degradation by proteasome inhibitor in SK-MES-1. SK-MES-1 cells were cultured in DMEM-medium in the presence or absence of the indicated concentrations of tunicamycin for 24 hours and MG132 for 20 hours before harvesting. Total cell lysates from SK-MES-1 cells were immunoprecipitated (IP) with the monoclonal anti-BCRP antibody BXP-21. Immunoblots were probed with the monoclonal anti-BCRP antibody BXP-21 and anti- α -tubulin antibody. Endogenous BCRP was detected as an approximately 72 kDa band and α -tubulin expression was analyzed as a loading control.

A



B

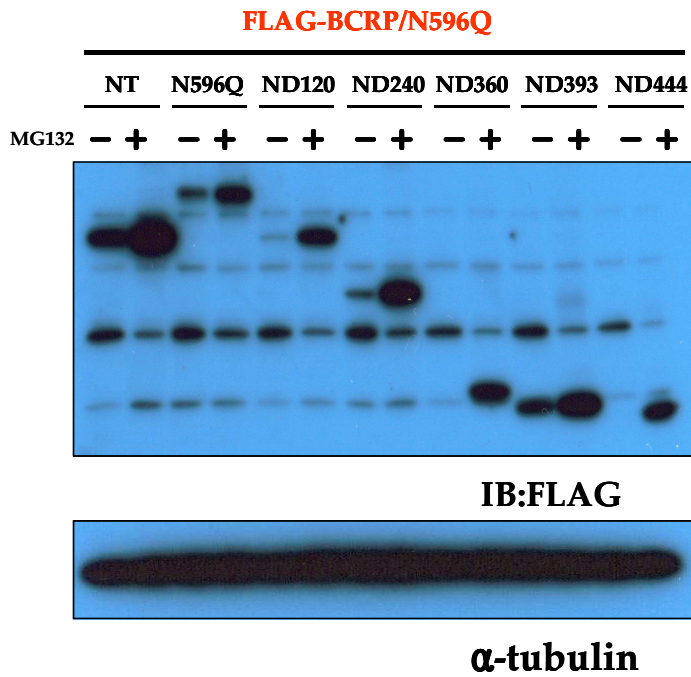
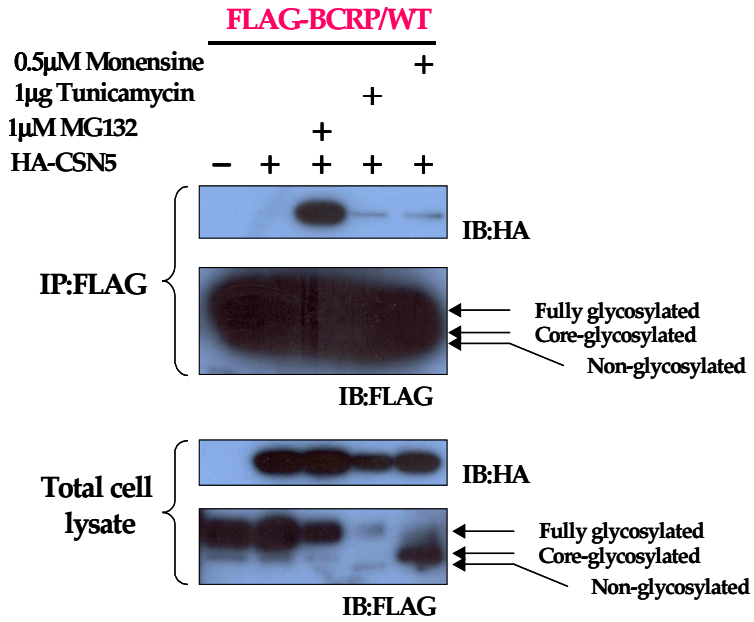


Fig. 6. Immature BCRP deletion mutants were degraded in the cytoplasm. A. Schematic representation of the structures of BCRP/NT, BCRP/N596Q and its deletion mutants. B. HEK293T cells were cotransfected with the FLAG-BCRP/NT, FLAG-BCRP/N596Q and its deletion mutants. Transfected HEK293T cells were treated with 1 μ M MG132 for 20 hours before harvesting. After 24 hours, cytoplasmic fraction was prepared and separated by SDS-PAGE, and then probed with anti-FLAG antibody. α -tubulin was used as the loading control.

A



B

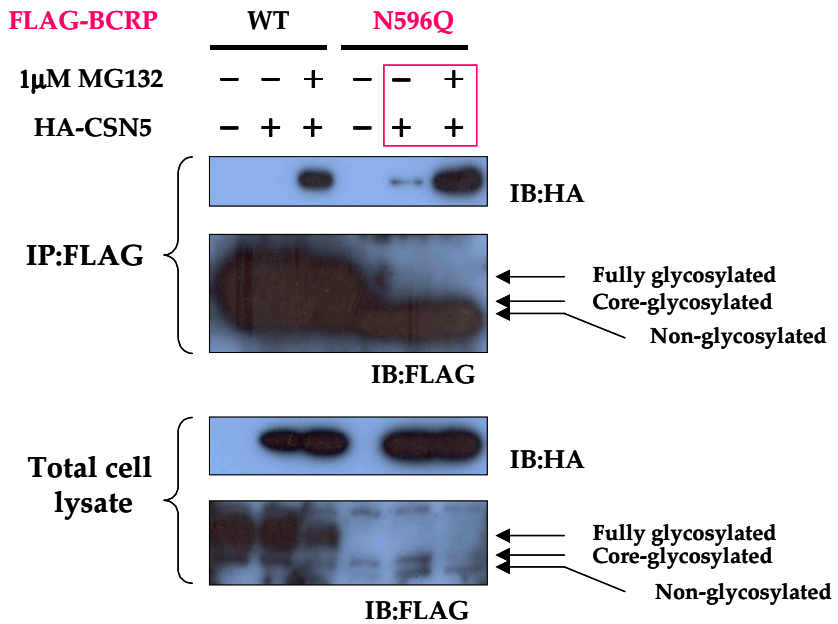
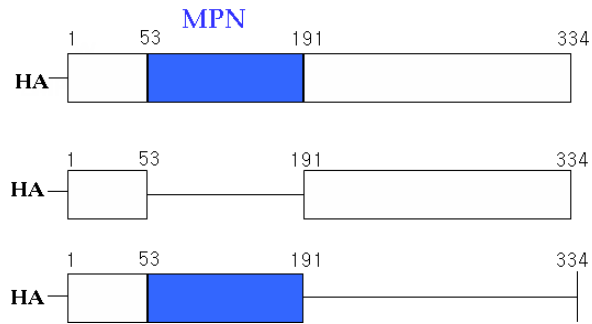


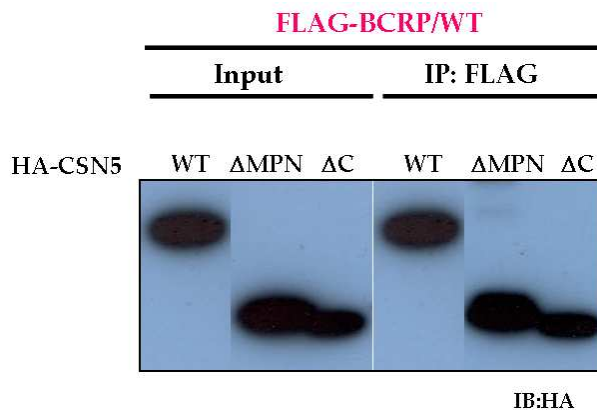
Fig. 7. CSN5 associates specifically with immature BCRP.

A. HEK293T cells were cotransfected with the FLAG-BCRP/WT and HA-CSN5. Transfected HEK293T cells were treated with 1 μ M MG132, 1 μ g/ml tunicamycin and 0.5 μ M monensin for 20 hours before harvesting. Total cell lysates from transfected HEK293T cells were immunoprecipitated (IP) with anti-FLAG M2 agarose and analysed by immunoblotting (IB) with anti-HA and anti-FLAG antibodies. B. HEK293T cells were cotransfected with the FLAG-BCRP/WT, FLAG-BCRP/N596Q, FLAG-Mock and HA-CSN5/WT. Transfected HEK293T cells were treated with or without 1 μ M MG132 for 20 hours before harvesting. Total cell lysates from transfected HEK293T cells were immunoprecipitated (IP) with anti-FLAG M2 agarose and analysed by immunoblotting (IB) with anti-HA and anti-FLAG antibodies.

A



B



C

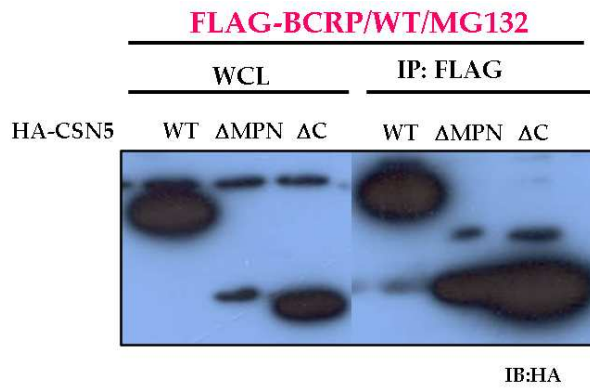


Fig. 8. Immature BCRP binds directly with CSN5.

A. Schematic representation of the structures of the wild-type CSN5 and its deletion mutants. B. WT, Δ MPN, and Δ C CSN5 were expressed by TNT T7 coupled transcription/translation reaction, and pulled-down by immunopurified FLAG-BCRP immobilized on FLAG-M2 beads. Bound CSN5 proteins were detected by immunoblot analysis using anti-HA antibody. The input lanes were loaded with one twentyfifth the amount of HA-tagged CSN5 protein used in the binding reaction. C. HEK293T cells were cotransfected with FLAG-BCRP/WT, HA-CSN5/WT, HA-CSN5/ Δ MPNd-1 (Δ 54-191) and HA-CSN5/ Δ C-1 (Δ 191-334). Transfected HEK293T cells were treated with 1 μ M MG132 for 20 hours before harvesting. Total cell lysates from transfected HEK293T cells were immunoprecipitated (IP) with anti-FLAG M2 agarose and analysed by immunoblotting (IB) with anti-HA and anti-FLAG antibodies.

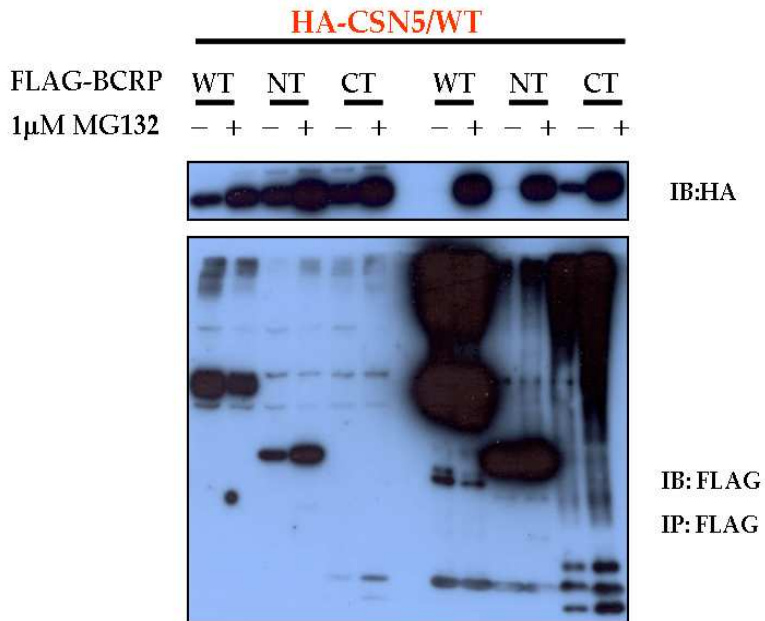


Fig. 9. CSN5 participates in multi or polyubiquitination to transmembrane (TM) domain of BCRP. HEK293T cells were cotransfected with FLAG-BCRP/WT, FLAG-BCRP/NT, FLAG-BCRP/CT and HA-CSN5/WT. Transfected HEK293T cells were treated with or without 1 μ M MG132 for 20 hours before harvesting. Total cell lysates from transfected HEK293T cells were immunoprecipitated (IP) with anti-FLAG M2 agarose and analysed by immunoblotting (IB) with anti-HA and anti-FLAG antibodies.

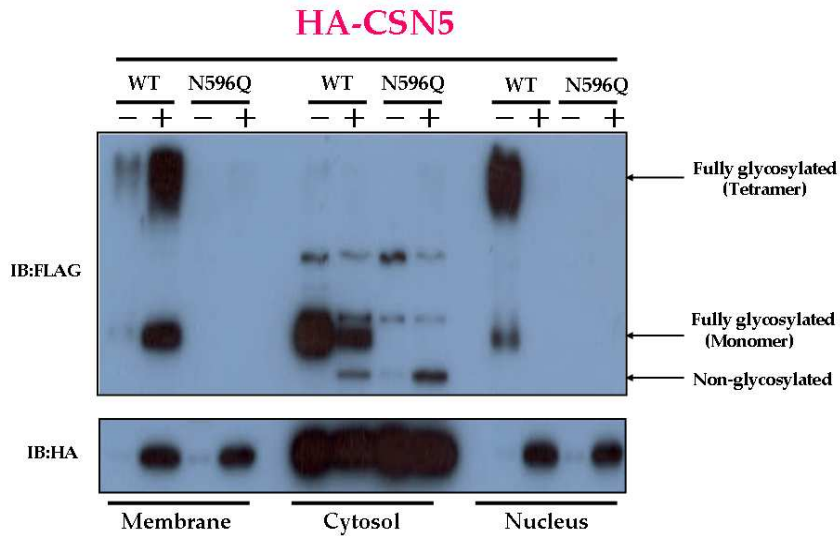
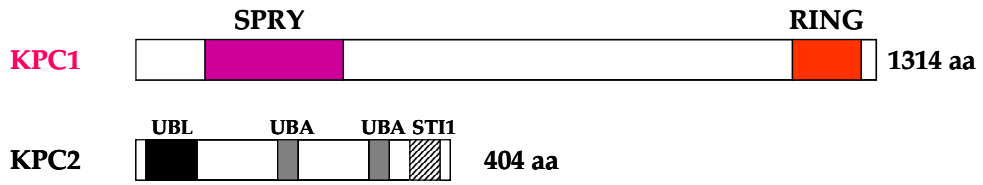


Fig. 10. Subcellular localization of mature and immature BCRP and CSN5. HEK293T cells were cotransfected with FLAG-BCRP/WT, FLAG-BCRP/N596Q and HA-CSN5/WT. Transfected HEK293T cells were treated with or without 1 μ M MG132 for 20 hours before harvesting. After 24 hours, membrane, cytoplasmic and nuclear fractions were prepared and separated by SDS-PAGE, and then probed with anti-HA and anti-FLAG antibodies.

A



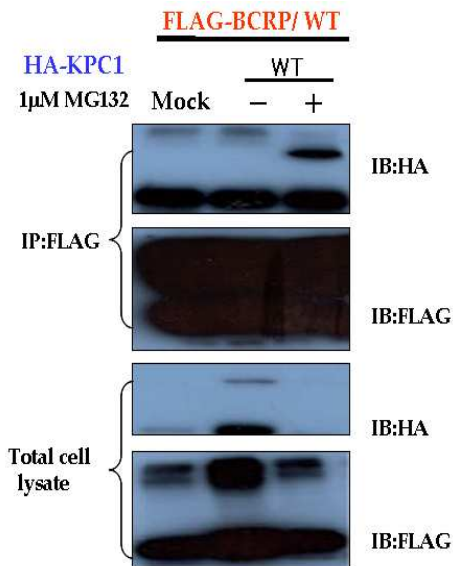
SPRY : Domain in SPlA and the Ryanodine Receptor

UBL : Ubiquitin-like

UBA : Ubiquitin-associated

STI1 : Heat shock chaperonin-binding motif

B



C

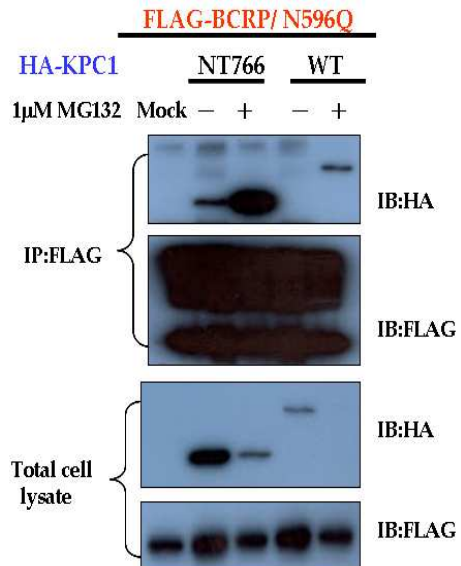


Fig. 11. Immature BCRP binds to KPC1.

A. Schematic representation of the structures of KPC1 and KPC2

B. HEK293T cells were cotransfected with FLAG-BCRP/WT and HA-KPC1/WT. Transfected HEK293T cells were treated with or without 1 μ M MG132 for 20 hours before harvesting. Total cell lysates from transfected HEK293T cells were immunoprecipitated (IP) with anti-FLAG M2 agarose and analysed by immunoblotting (IB) with anti-HA antibody and anti-FLAG antibody. C. HEK293T cells were cotransfected with FLAG-BCRP/N596Q, HA-KPC1/NT766 and HA-KPC1/WT. Transfected HEK293T cells were treated with or without 1 μ M MG132 for 20 hours before harvesting. Total cell lysates from transfected HEK293T cells were immunoprecipitated (IP) with anti-FLAG M2 agarose and analysed by immunoblotting (IB) with anti-HA and anti-FLAG antibodies.

IV. 고찰

본 연구에서는 ABC transporter 중에 하나인 BCRP가 immature BCRP로 되었을 때 분해 되는 메카니즘과 분해에 관여하는 분자들에 대해 기술하였다. BCRP가 분해 되는 메카니즘에 대해서 밝힌 것은 BCRP가 dimer 형태를 이룰 때에 중요한 Cys592와 Cys608을 mutation 시키면 ERAD에 과정에 의해 분해 된다는 논문이 유일하다(29). 그러나 분해에 관여하는 분자에 관해서는 아직까지 밝혀지지 않았다. 이 논문에서는 immature BCRP가 분해 되는데 CSN5가 매개체로 작용할 것이라는 것과 KPC가 BCRP의 E3 ubiquitin ligase로 작용한다는 것을 밝히고자 하였다.

BCRP가 내재된 인간 폐암세포 SK-MES-1 그리고 유방암 세포 MCF-7에 glycosylation 저해제인 tunicamycin을 처리하면 BCRP의 down-regulation이 일어났고, proteasome 저해제인 MG132를 같이 처리하면 down-regulation이 억제되었다. 이는 glycosylation이 일어나지 않은 immature BCRP가 proteasome에 의해서 특이적으로 분해됨을 의미한다(Fig. 5). BCRP에는 glycosylation이 일어나는 3가지 부위가 있다. 그 부위는 418, 557 및 596번째 asparagine인데 그 중에서 596번째 asparagine이 glycosylation에 가장 중요한 아미노산이라고 알려져 있다(8). 그러므로 본 연구에서는 immature BCRP가 분해되는지 알아보기 위해 주요 glycosylation 부위라고 알려진 596번째 아미노산인 asparagine을 glutamine으로 mutation 시킨 BCRP/N596Q를 제작하여 사용하였다. BCRP/WT을 HEK293T세포에 transfection 시킨 후 glycosylation의 저해제로 알려진 tunicamycin, MG132 및 monensin등을 세포에 처리하면 BCRP의 glycosylation은 3가지 형태 즉, glycosylation, core glycosylation 및 non-glycosylation 형태로 분리되어 나타난다. 여기서 glycosylation을 제외한 2가지 형태는 immature BCRP로 간주된다(Fig. 7A). BCRP/N596Q를 HEK293T 세포에 transfection 시킨 후 western blot으로 확인한 결과 BCRP/N596Q는 72kDa 이하인 non-glycosylation 형태만 보였다. 그러나 BCRP/N596Q는 BCRP/WT과 마찬가지로 세포막으로 이동하고, ATP를 가수분해 시키

는 능력이나 rhodamine123를 배출하는 능력은 갖는다. 그러므로 BCRP의 596번째 asparagine은 막의 위치나 transporter의 활성뿐만 아니라 BCRP의 dimer나 oligomer의 형성에는 관여하지 않는다. BCRP의 homodimerization에 중요한 553번째 glycine을 leucine으로 mutation (G553L) 시킨 후 사람 세포에 transfection 시키면 BCRP/G553L는 dimer를 형성하지 못하고, glycosylation도 일어나지 못하고 소포체에 존재한다(30). 또한 ABC transporter에서 ATP와 결합하여 가수 분해시키는 데에 중요한 NBD의 Walker A motif내의 86번째 lysine을 mutation 시킨 BCRP/K86M 역시 소포체에서 발견된다(31). 그러나 BCRP/G553L이나 BCRP/K86M은 소포체에서 회복되지 못했을 때 그 후의 과정에 대해서는 아직까지 알려지지 않았다. 그러나 Fig. 2와 6에서 보듯이 BCRP/N596Q와 여러가지 BCRP의 deletion mutant들을 HEK293T세포에 transfection 시킨 후 fractionation 하였을 때 immature BCRP형태인 BCRP/N596Q는 세포질에서 분해되었다. 이는 BCRP/K86M과 BCRP/G553L과는 다르게 이 결과는 596번째 asparagine에 glycosylation이 되어있지 않은 BCRP는 소포체에서 세포질로 분비된다는 것을 의미한다.

Glycosylation이 일어나지 않은 당 단백질들의 경우 ERAD에 의해 분해 된다. ERAD를 통해 분해가 일어나는 단백질들은 소포체로부터 세포질로 분비된다. 본 연구에서 immature BCRP와 특이적으로 결합하는 CSN5을 처음으로 동정하였다. BCRP/WT, BCRP/N596Q와 CSN5를 HEK293T 세포에 cotransfection 시킨 후 BCRP로 IP를 한 결과 CSN5는 BCRP/N596Q와 특이적으로 결합하였으며, MG132를 처리 하였을 때 더욱 강한 결합을 보였다. CSN5의 deletion mutant를 제작하여 *in vitro* binding assay와 HEK293T 세포내에 BCRP/N596Q와 cotransfection 시킨 후 IP를 한 결과, CSN5는 N-terminal의 1번에서 53번째 부위를 통해 BCRP/N596Q와 직접 결합한다는 것을 알았다. 이것은 CSN5가 immature BCRP와 N-terminal을 통해 특이적으로 결합하여 proteasome에 의한 immature BCRP의 분해를 매개한다는 것을 의미한

다. 또한 BCRP내의 CSN5와의 결합부위를 조사하기 위해 NBD를 가지고 있는 N-terminal (BCRP/NT)와 TMD를 가지고 있는 C-terminal (BCRP/CT)을 각각 제작하여 CSN5와 함께 세포에 cotransfection한 후 IP 실험을 했을 때 MG132 처리시 BCRP/NT와 CT 모두 CSN5와 결합을 보였고 BCRP/CT의 경우 MG132를 처리하진 않았을 때도 결합을 보였다. 이 결과는 BCRP내의 CSN5의 결합부위가 두 군데 존재하며 우선적인 결합부위는 C-terminal이라는 것을 의미한다.

CSN5는 p27과 p53을 핵에서 방출시키고, 세포질에서 분해되도록 매개한다(32, 34). 따라서 CSN5가 단백질의 세포질 분해 매개체로서 작용한다는 사실에 비추어 볼 때 immature BCRP가 소포체에서 분비되어 세포질에서 26S proteasome에 의해 분해될 때 CSN5가 이를 매개해 주는 역할을 한다고 생각되어진다. 그러나 CSN5는 자체 내에 nuclear export signal (NES)을 가지고 있어서 p27이나 p53과 결합하여 핵 밖으로 나오도록 유도한다(16, 32, 33). Immature BCRP 또한 소포체에서 나와 세포질에서 분해되는데 CSN5가 매개체로 작용할 것이라고 생각되지만, immature BCRP가 CSN5와 결합하는 것 외에는 immature BCRP가 CSN5와의 결합을 통해 소포체에서 세포질로 분비된다는 확실한 실험적인 근거는 찾지 못했다.

p27은 G0-G1시기에 핵 밖으로 나와서 세포질에서 분해될 때 p27을 ubiquitination 시키는 KPC라는 E3 ubiquitin ligase가 존재한다(22). KPC는 KPC1과 KPC2로 이루어진 세포질 단백질이다. BCRP 또한 세포질에서 분해되는 것으로 봐서 BCRP와 KPC1의 IP실험을 해 보았더니 KPC1이 BCRP와 결합하는 결과를 보였다(Fig. 11). 따라서 KPC가 BCRP의 E3 ubiquitin ligase로 작용한다는 것을 확인할 수 있었다.

지금까지 이 연구에서는 ERAD에 의해 분해되는 immature BCRP의 분해 메카니즘과 분해에 관여하는 단백질에 대해 설명하였다. 그러나 아직까지도 해결해야 할 문제가 많이 있다. CSN5의 siRNA 실험을 통해 CSN5가 BCRP 분해에 직접적으로 관여한다는 확실한 증거를 찾아야 하며, KPC가 BCRP와 결합하는 위치 그리고 KPC가 BCRP를 ubiquitination 시키는 메카

니즘, KPC와 CSN5와의 관계 등에 관한 연구가 앞으로 많이 이루어져야 할 것이다.

V. 요약 및 결론

Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2)은 mitoxantrone, topotecan, 및 SN-38같은 항암제에 내성을 부여하는 ABC half-transporter 이고 glycoprotein이다. Endogenous BCRP를 가진 MCF-7이나 SK-MES-1 세포에 glycosylation inhibitor 인 tunicamycin을 처리하면 immature BCRP가 분해가 되는 것을 확인하였다. 따라서 저자는 immature BCRP의 분해 메커니즘을 밝혀내고자 하였다. Jab1/CSN5의 세포내 상호작용은 HEK293T 세포에 BCRP/WT, BCRP/N596Q 및 CSN5를 cotransfection하고 약물을 처리한 후 알게 되었다. 그리고 BCRP와 Jab1/CSN5의 상호작용을 규명하기 위해서 *In vitro* binding assay, IP 및 Western blot 분석을 하였다. 저자는 tunicamycin에 의한 BCRP의 분해가 proteasome inhibitor인 MG132에 의해 저해되고, Jab1/CSN5가 BCRP의 결합 파트너로서 작용한다는 것을 알아냈다. 따라서 Jab1/CSN5는 immature BCRP가 ERAD에 경로에 의해 표적이 되고, proteasome에 의한 immature BCRP의 분해를 촉진하는데 매개자로서 역할을 한다. 그리고 KPC가 immature BCRP와 결합하고 MG132를 처리하지 않았을 때 분해가 되는 사실로 볼 때 KPC는 세포질에서 E3 ubiquitin ligase으로 작용하여 immature BCRP를 poly 혹은 multiubiquitination시켜 최종적으로 26S proteasome에 의해 분해되도록 한다는 결론을 얻을 수 있었다.

감사의 글

막상 내 논문의 마지막 페이지를 쓰려고 하니 2년간의 시간들이 머리에 주마등처럼 스쳐 지나간다. 최철희 교수님이 나에게 다시 공부하라고 제안했을 때 많이 망설였었다. 주변의 여건이 좋지 않은 상황에서 공부를 시작한다는 것은 쉬운 결정은 아니었기 때문이다. 하지만 내가 이 길로 잘 갈 수 있도록 지도해 주시고 격려해 주신 교수님께 감사드린다. 처음 들어와 아무것도 모르는 나를 지도하시느라 고생하신 윤지수 교수님 처음엔 내 지도 교수님이 될 것이라고는 생각도 못했었는데 엄하게 가르치시지만 지금의 내가 있기까지 믿고 기다려 주신 교수님께 감사드린다. 그리고 논문 심사하시느라 고생하신 한송이 교수님 많이 걱정해 주시고 격려해 주신데에 대해 교수님께 감사드리고, 논문 늦게 가져다 드리고 심사해 달라고 해서 죄송합니다.

내가 실험실에 처음 왔을 때 따뜻하게 맞아준 미선이, 자기보다 나이 많은 언니를 가르치느라 고생한 주미씨와 현이씨, 가끔 속 썩이지만 힘들 때 많이 도와주는 애교 많은 용일이, 지금은 실험실에 없지만 다른 곳에서 열심히 공부하고 있는 향숙씨 모두 내가 실험실에서 잘 적응할 수 있도록 도와준 사람들이다. 그리고 나에게 아낌없는 충고와 많은 조언을 해 주시고 웃음을 주시는 실장님, 힘들 때 나의 쉼터가 되어주는 정은이, 그리고 논문 쓸 때 같이 고생하고, 감사의 글 쓸 때 자기도 꼭 이름 넣어 달라고 한 형선이 등 나를 도와준 모든 사람들에게 감사드린다. 마지막으로 나의 힘든 실험실 생활을 묵묵히 지켜봐 주시며 항상 나의 든든한 버팀목이 되어 주시는 부모님께 감사드린다.

산 위에 오를 때는 눈 아래 돌과 자갈과 잡목만이 전부인줄 알았는데 정상에 올라 땀방울을 닦으며 주위를 내려다보니 삼라만상이 비로소 눈안에 들어온다. 모든 사람이 이 장관을 경험하러 산에 오르나 보다. 힘들고 어려웠던 지난 2년의 산행, 그 땀방울 하나하나가 나의 꿈과 희망 그리고 밝은 미래가 될 것이다.

VII. 참고 문헌

1. Higgins, C. F. (1992) ABC transporters: from microorganisms to man, *Annu. Rev. Cell Biol.* 8, 67-113.
2. Saurin, W., Hofnung, M., and Dassa, E. (1999) Getting in or out: early segregation between importers and exporters in the evolution of ATP-binding cassette (ABC) transporters, *J. Mol. Evol.* 48, 22-41.
3. Jonker, J. W., Smit, J. W., Brinkhuis, R. F., Maliepaard, M., Beijnen J. H., Schellens J. H., and Schinkel A. H. (2000) Role of breast cancer resistance protein in the bioavailability and fetal penetration of topotecan, *J. Natl. cancer Inst.* 92, 1651-1656.
4. Schinkel A. H., Mol C. A., Wagenaar E., van Deemter L., Smit J. J., and Borst, P. (1995) Multidrug resistance and the role of P-glycoprotein knockout mice, *Eur. J. Cancer* 31A, 1295-1298.
5. Zhou, S., Schuetz, J. D., Bunting, K. D., Colapietro, A. M., Sampath, J., Morris, J. J., Lagutina, I., Grosveld, G. C., Osawa, M., Nakauchi, H., and Sorrentino, B. P. (2001) The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype, *Nat. Med.* 7, 1028-1034.
6. Allen, J. D., Jackson, S. C., and Schinkel, A. H. (2002) A mutation hot spot in the bcrp1 (abcg2) multidrug transporter in mouse cell lines selected for Doxorubicin resistance, *Cancer Res.* 62,

2294-2299.

7. Kage, K., Tsukahara, S., Sugiyama, T., Asada, S., Ishikawa, E., Tsuruo, T., and Sugimoto, Y. (2002) Dominant-negative inhibition of breast cancer resistance protein as drug efflux pump through the inhibition of S-S dependent homodimerization, *Int. J. Cancer* 97, 626-97630

8. Diop, N. K., and Hrycyna, C. A. (2005) N-Linked glycosylation of the human ABC transporter ABCG2 on asparagine 596 is not essential for expression, transport activity, or trafficking to the plasma membrane, *Biochemistry* 44, 5420-5429.

9. Hirsh, C., Jarosch, E., Sommer, T., and Wolf, D. H. (2004) Endoplasmic reticulum-associated protein degradation-one model fits all?, *Biochim. Biophys. Acta.* 1695, 215-223.

10. Schmitz, A., and Herzog, V. (2004) Endoplasmic reticulum-associated protein degradation: Exceptions to the rule, *Eur. J. Cell Biol.* 83, 501-509.

11. Ahner, A., and Brodsky, J. L. (2004) Excuse me, which way to the proteasome?, *Trends Cell Biol.* 14, 474-478.

12. Gilckman, M. H., and Ciechanover, A. (2002) The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction, *Physiol. Rev.* 82, 373-428.

13. Wei, N., and Deng, X. W. (2003) The COP9 signalosome,

Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 19, 261-286.

14. Glickman, M. H., Rubin, D. M., Coux, O., Wefes, I., Pfeifer, G., Cjeka, Z., Baumeister, W., Fried, V. A., and Finley, D. (1998) A subcomplex of the proteasome regulatory particle required for ubiquitin-conjugate degradation and related to the COP9-signalosome and eIF3, *Cell* 94, 615-623.

15. Claret, F. X., Hibi, M., Dhut, S., Toda, T., and Karin, M. (1996) A new group of conserved coactivators that increase the specificity of AP-1 transcription factors, *Nature* 383, 453-457.

16. Tomoda, K., Kubota, Y., and Kato, J. (1999) Degradation of the cyclin-dependent-kinase inhibitor p27 Kip1 is instigated by Jab1, *Nature* 398, 160-165.

17. Bech-Otschir, D., Kraft, R., Huang, X., Henklein, P., Kapelari, B., Pollmann, C., and Dubiel, W. (2001) COP9 signalosome-specific phosphorylation targets p53 to degradation by the ubiquitin system, *EMBO J.* 20, 1630-1639.

18. Oh, W., Yang, M. R., Lee, E. W., Park, K. M., Pyo, S., Yang, J. S., Lee, H. W., and Song J. (2006) Jab1 mediates cytoplasmic localization and degradation of West Nile virus capsid protein, *J. Biol. Chem.* 281, 30166-30174.

19. Wan, M., Cao, X., Wu, Y., Bai, S., Wu, L., Shi, X., Wang, N., and Cao, X. (2002) Jab1 antagonizes TGF-beta signaling by inducing Smad4 degradation, *EMBO Rep.* 3, 171-176

20. Ishida, N., Hara, T., Kamura, T., Yoshida, M., Nakayama, K., and Nakayama, K. I. (2002) Phosphorylation of p27 Kip1 on serine 10 is required for its binding to CRM1 and nuclear export, *J. Biol. Chem.* 277, 14355–14358.
21. Rodier, G., Montagnoli, A. Di., Marcotullio, L., Coulombe, P., Draetta, G. F., Pagano, M., and Meloche, S. (2001) p27 cytoplasmic localization is regulated by phosphorylation on Ser10 and is not a prerequisite for its proteolysis, *EMBO J.* 20, 6672–6682.
22. Kamura, T., Hara, T., Matsumoto, M., Ishida, N., Okumura, F., Hatakeyama, S., Yoshida, M., Nakayama, K., and Nakayama, K. I. (2004) Cytoplasmic ubiquitin ligase KPC regulates proteolysis of p27(Kip1) at G1 phase, *Nat. Cell Biol.* 6, 1229–1235.
23. Goto, A., Niki, T., and Moriyama, S. (2004) Immunohistochemical study of Skp2 and Jab1, two key molecules in the degradation of P27, in lung adenocarcinoma, *Pathol. Int.* 54, 675–681.
24. Elsasser, S., Gali, R. R., Schwickart, M., Larsen, CN., Leggett, D. S., Müller, B., Feng, M. T., Tübing, F., Dittmar, G. A., and Finley, D. (2002) Proteasome subunit Rpn1 binds ubiquitin-like protein domains, *Nat. Cell. Biol.* 4, 725–730.
25. Richly, H., Rape, M., Braun, S., Rumpf, S., Hoege, C., and Jentsch, S. (2005) A series of ubiquitin binding factors connects CDC48/p97 to substrate multiubiquitylation and proteasomal targeting, *Cell.* 120, 73–84.

26. Saeki, Y., Sone, T., Toh-e, A., and Yokosawa, H. (2002) Identification of ubiquitin-like protein-binding subunits of the 26S proteasome, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 296, 813-819.
27. Schaubert, C., Chen, L., Tongaonkar, P., Vega, I., Lambertson, D., Potts, W., and Madura, K. (1998) Rad23 links DNA repair to the ubiquitin/proteasome pathway, *Nature* 391, 715-718.
28. Kotoshiba, S., Kamura, T., Hara, T., Ishida, N., and Nakayama, K. I. (2005) Molecular dissection of the interaction between p27 and Kip1 ubiquitylation-promoting complex, the ubiquitin ligase that regulates proteolysis of p27 in G1 phase, *J. Biol. Chem.* 280, 17694-17700.
29. Wakabayashi, K., Nakagawa, H., Tamura, A., Koshiba, S., Hoshijima, K., Komada, M., and Ishikawa, T. (2007) Intramolecular disulfide bond is a critical check point determining degradative fates of ATP-binding cassette (ABC) transporter ABCG2 protein, *J. Biol. Chem.* 282, 27841-27846.
30. Polgar, O., Ozvegy-Laczka, C., Robert R. W., Morisaki, K., Okada, M., Tamaki, A., Koblos, G., Elkind, N. B., Ward, Y., Dean, M., Sarkadi B., and Bates, S. E. (2006) Mutational studies of 553 in TM5 of ABCG2: a residue potentially involved in dimerization, *Biochemistry* 45, 5251-5260.
31. Henriksen, U., Gether, U., and Litman, T. (2005) Effect of Walker A mutation (K86M) on oligomerization and surface targeting of the multidrug resistance transporter ABCG2, *J. Cell Sci.* 118,

1417-1426.

32. Tomoda, K., Kubota, Y., Arata, Y., Mori, S., Maeda, M., Tanaka, T., Yoshida, M., Yoneda-Kato, N., and Kato, J. Y. (2002) The cytoplasmic shuttling and subsequent degradation of p27Kip1 mediated by Jab1/CSN5 and the COP9 signalosome complex, *J. Biol. Chem.* 277, 2302-2310.

33. Rodríguez, J. A., and Henderson, B. R. (2000) Identification of a functional nuclear export sequence in BRCA1, *J. Biol. Chem.* 275, 38589-38596

34. Oh, W., Lee, E. W., Sung, Y. H., Yang, M. R., Ghim, J., Lee, H. W., and Song, J. (2006) Jab1 induces the cytoplasmic localization and degradation of p53 in coordination with Hdm2, *J. Biol. Chem.* 281, 17457-17465.

