

## Characterization for calmodulin binding activity of IQ motifs on the IQGAP3

Deok-Jin Jang<sup>★</sup>

*Department of Applied Biology, College of Ecology and Environment, Kyungpook National University, 386,  
Gajang-dong, Sangju-si, Kyeongbuk 742-711, Korea.*

(Received August 17, 2012; Revised September 20, 2012; Accepted September 20, 2012)

### IQGAP3에 존재하는 IQ 부위의 칼모듈린 결합 특성

장 덕 진<sup>★</sup>

경북대학교 생태환경대학 생물응용전공.

(2012. 8. 17. 접수, 2012. 9. 20. 수정, 2012. 9. 20. 승인)

**Abstract:** IQ motif-containing GTPase-activating proteins (IQGAPs), which are well-known  $\text{Ca}^{2+}$ -independent calmodulin (CaM) binding proteins, are involved in various cellular functions such as cell proliferation, carcinogenesis and cell migration. The IQGAP3 similar to IQGAP1 has four repeated IQ motifs, which are crucial for CaM binding. It has been recently shown that all four IQ motifs of the IQGAP1 could bind to CaM, while not clear the binding of four IQ motifs of the IQGAP3. In this study, we examined the binding between CaM and each IQ motif of IQGAP3. As a result, we found that IQ2 and IQ3, but not IQ1 and IQ4, have a  $\text{Ca}^{2+}$ -independent CaM binding activity. We also found that IQ(3.5-4.4) on the IQGAP3 has  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent CaM binding activity as similar with that of IQGAP1. This finding indicates that IQ motifs of the IQGAP3 plays a dynamic role via different interaction of IQ motifs with  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM or apoCaM.

**요 약:** IQGAPs는 세포 내에서 암세포화, 세포이동, 세포분열과 같은 다양한 기능을 수행하고 있으며, 대표적인 calmodulin (CaM) 결합 단백질로, human의 경우 3 개의 isoform이 알려지고 있다. IQGAPs는 각각 네 개의 IQ 부위를 가지고 있으며, 이들이 CaM과의 결합에 관여한다고 보고되고 있으나, 현재까지 IQGAP1에 비해 IQGAP3에서는 각각의 IQ 부위가 가지는 CaM 결합 특성에 대해선 연구가 미비한 실정이다. 따라서, 본 연구에서는 IQGAP3 내의 IQ 부위들과 CaM과의 결합성을 연구하였다. 이러한 연구를 수행한 결과, 네 개의 IQ부위가 의미 없는 CaM 결합성을 가지는 IQGAP1과는 다르게, IQGAP3는 IQ2와 IQ3가  $\text{Ca}^{2+}$ -비의존성 CaM 결합을 보이고, IQ1과 IQ4는 결합성이 없음을 알 수 있었다. 또한, IQGAP1에서 새롭게 알려진  $\text{Ca}^{2+}$ -의존성 CaM 결합 부위인 IQ(3.5-4.4) 부위가, IQGAP3에서도 잘 보존되어 있음을 알 수 있었다. 본 연구를 통해 IQGAP3의 IQ부위는 IQGAP1와는 다른 CaM 결합성이 있음을 알게 되었다. 이러한 결과는 각각의 IQGAP isoform들이 각기 다른 CaM 결합성으로 세포 내에서 다른 생리작용을 수행할 가능성이 있음을 제시한다.

**Key words:** IQGAP3, IQ motif, calmodulin, 3xFLAG-hCaM co-immunoprecipitation

<sup>★</sup> Corresponding author

Phone : +82-(0)54-530-1213 Fax : +82-(0)54-530-1218

E-mail : [djangdj@knu.ac.kr](mailto:djangdj@knu.ac.kr)

## 1. 서 론

Scaffolding 단백질 중에 하나인 IQGAP1 (Ras GTPase-activating-like protein 1)는 세포 내에서 세포이동, 분열, 부착, 신호전달, 암세포화와 같은 다양한 기능을 수행하고 있다.<sup>1,2</sup> IQGAP는 human에 3 개의 isoform이 존재하며, IQGAPs 단백질의 domain 구조와 아미노산 서열을 보면, 이들 세 isoform사이에는 상당한 유사성을 보임을 알 수가 있다. 이들의 조직 내 발현 패턴을 보면 IQGAP1은 대부분의 조직에서 발현되며, IQGAP2는 간에서 주로 발현되고, IQGAP3는 뇌, 허파, 정소, 창자 등에서 발현된다고 보고 되었다.<sup>3</sup> 이중 가장 연구가 많이 진행된 IQGAP1의 생리적 기능들은 다양한 수많은 단백질들과의 상호작용을 통해서 이루어진다.<sup>3,4</sup> 그 중에서 특히 calmodulin (CaM)의 경우는 IQGAP1과 상호결합을 통해 IQGAP1과 다른 단백질과의 결합을 조절하는 중추적인 역할을 수행한다.<sup>5,8</sup>

IQGAP1은 1994년 클로닝된 이후로 가장 많이 연구가 되었고,<sup>9</sup> IQGAP3는 2007년에 처음 클로닝되어, 기능이 조금씩 연구 되어지고 있다.<sup>10</sup> IQGAP3를 처음 보고한 논문에서는 IQGAP3가 actin filament와 결합하고, Rac1과 Cdc42에 의한 neurite outgrowth에 관여함을 보여주었다.<sup>10</sup> 또한, IQGAP3는 상피세포에서 ERK (extracellular signal-regulated kinases) 신호 전달과 세포분열에 영향이 있음을 알 수 있었다.<sup>11</sup>

IQGAPs는 각각 네 개의 IQ부위가 모여서 이루어진 IQ domain을 가지고 있다. 이들 IQ domain내의 각각의 IQ 부위들은 서로 다른 CaM 결합성을 보인다. 가장 연구가 많이 이루어진 IQGAP1의 경우 CaM sepharose 4B (CaM 4B) pull-down을 이용한 실험을 통하여 네 개의 IQ 부위 모두는 Ca<sup>2+</sup>/CaM에 결합하고, IQ3와 IQ4는 Ca<sup>2+</sup>-free 형태인 apoCaM에 결합한다는 것을 제안하였다.<sup>12</sup> 반면, 다른 *in vitro* 실험에서는 IQ3만이 의미 있는 IQ 부위임을 알 수 있었고, 나머지는 CaM과의 결합성이 없음을 보고하였다.<sup>13,14</sup> 또한, 3xFLAG-human CaM (hCaM) co-immunoprecipitation (co-IP)를 이용해 실험을 수행한 결과, *in vitro* CaM 4B pull-down 실험결과와는 달리 모든 IQ 부위가 CaM 결합성이 없음을 확인하였다.<sup>13</sup> 그대신 IQ 부위 내에 IQ(2.7-3)과 IQ(3.5-4.4) 부위가 CaM 결합에 관여함을 새롭게 보고하였다.<sup>13,14</sup> IQGAP2와 IQGAP3의 IQ 부위와 CaM과의 결합에 대한 연구는 최근 한 연구를 통해 알려졌다.<sup>15</sup> 이 실험의 경우에 대장균에서 정제된 CaM과 각각의 IQ부위에 해당하는 합성된 peptide를 이용하였

다. 이를 통해 IQGAP2내 IQ2와 IQ3, IQGAP3내 4개의 IQ 부위 모두가 Ca<sup>2+</sup>이 있을 때 결합을 하고, Ca<sup>2+</sup>이 없을 때는 IQGAP2와 IQGAP3 모두 IQ1만이 일시적인 CaM 결합을 이룬다고 보고하였다. 그러나, 이 연구 결과는 *in vitro*에서 극히 제한된 조건에서 짧은 peptide를 이용해 실험을 수행해 많은 한계가 있었다. 따라서, 본 연구에서는 CaM 4B pull-down과 3xFLAG-hCaM co-IP법을 이용해 IQGAP3내의 IQ부위의 CaM 결합성을 연구하였다. 실험 결과, IQGAP3내 IQ2와 IQ3는 Ca<sup>2+</sup>-비의존적 CaM 결합성이 있음을 알게 되었다. 또한, IQGAP3내의 IQ(3.5-4.4) 부위도 IQGAP1과 마찬가지로 Ca<sup>2+</sup>-의존적 CaM 결합성이 있음을 알 수 있었다. 이러한 연구를 통해 IQGAP들 내의 IQ부위들이 약간의 서열차이로도 다른 CaM 결합성을 나타낼 수 있음을 확인할 수 있었다.

## 2. 실험

### 2.1. DNA 제작

Mouse brain cDNA에서 IQGAP3내에 IQ 부위를 포함하는 부분은 PCR을 이용하여 분리하고, *Hind* III/*Bam* HI로 절단 한 후에 IQ1, IQ2, IQ3, IQ4, IQ(1-2), IQ(2-3), IQ(3-4), IQ(3.5-4.4), IQ(1-2-3-4) 부위를 pEGFP-C3에 삽입하였다.

### 2.2. 세포 배양

HEK293T 세포는 DMEM 배양액(10% FBS+ Penicillin/streptomycin)에서 37 °C (5% CO<sub>2</sub>)에서 배양하였다.

### 2.3. CaM 4B pull-down 정량

HEK293T세포 lysate를 이용한 CaM 4B pull-down 실험의 경우, lipofectamine 2000 (Invitrogen)을 이용해 각각의 유전자들을 HEK293T 세포에 도입하여 단백질을 발현시켰다. Transfection후 24시간에 lysis 용액 [50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1% triton-X 100, protease inhibitor cocktails (Roche), 2 mM CaCl<sub>2</sub> (또는 5 mM EGTA)]에 넣고 세포를 분해 하였다. 세포질부위를 분리하여 BCA방법을 이용해 세포내 단백질을 정량 하였다. 단백질이 포함된 세포질용액에 30 μL의 CaM 4B bead를 넣고 4 °C에서 2시간 동안 결합 시켰다. 이후, bead를 같은 lysis 용액을 이용해 3번 세척하고 1X SDS sample buffer를 넣어 분리 하였다. 이후 상층액을 취해 SDS-PAGE 상에서 분리하고, GFP 항체를 이용한 Western blotting을 수행하였다.

2.4. 3xFLAG-hCaM co-IP

HEK293T 세포의 lysate를 이용한 3xFLAG-hCaM co-IP 실험의 경우, lipofectamine 2000 (Invitrogen)을 이용해 각각의 유전자들을 HEK293T 세포에 도입하여 단백질을 발현시켰다. Transfection 후 24시간이 지난 후에 lysis 용액 결합용액 [50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1% triton-X 100, protease inhibitor cocktails (Roche), 2 mM CaCl<sub>2</sub> (또는 5 mM EGTA)]에 넣고 세포를 분해 하였다. 세포질부위를 분리하여 BCA방법을 이용해 세포내 단백질을 정량 하였다. 단백질을 포함한 세포질용액에 30 µL의 M2-agarose를 넣고 4 °C에서 2시간 동안 결합 시켰다. 이후, bead를 같은 lysis 용액을 이용해 3번 세척하고, 30 µL의 추출용액(결합용액에 5 mg/mL 3xFLAG 펩타이드를 녹임)을 넣고 분리하였다. 이후 상층액을 취하고, 5X SDS sample buffer를 넣고, 단백질 전기영동을 하고, GFP 항체와 FLAG 항체를 이용해 Western blotting을 수행하였다.

2.5. Western blotting

Western blotting을 위해 단백질을 10-12% polyacrylamide gel에 전기 영동한 후 0.45 µm nitrocellulose membrane에 transfer했다. 그 후, membrane은 TBS [25 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, and 0.01% Tween 20]에 5% 탈지분유를 넣은 용액으로 blocking을 하였다. 이후 GFP 항체를 처리하고, 이차항체로는 horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG에 대한 항체를 이용하였고, Western blotting의 신호를 위해 ECL (Amersham)을 이용해 확인 하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. IQGAP1과 IQGAP3 내의 IQ 부위들의 아미노산 서열 분석

IQGAP3내에 존재하는 IQ 부위의 CaM 단백질에 대한 결합성을 연구하기 위해, mouse의 뇌 cDNA로부터 IQGAP3의 IQ 부위를 클로닝하였다. Mouse IQGAP3의 경우도 human IQGAP1과 마찬가지로 4개의 IQ 부위를 가지고 있다. 이들 사이의 아미노산 서열을 분석한 결과, 서로 간에 약 70%의 상동성을 가진다는 사실을 알 수 있었다(Fig. 1B). 각각 IQ 부위를 따로따로 분석해 보면 IQ4가 가장 유사하며, IQ3, IQ1, IQ2의 순임을 알 수가 있었다(Fig. 1). IQ 부위는 일반적으로 IQXXXRGXXXR이라는 consensus 서

A

|     | IQ1   | IQ2  | IQ3  | IQ4  |                                  |
|-----|---|--|--|--|----------------------------------|
| IQ1 | <b>GL</b> <u>ITR</u><br><b>GF</b> <u>VIQ</u><br>Consensus: <b>IQXXXRGXXXR</b>                         | <b>LQ</b> <u>AR</u> <b>CR</b> <u>GY</u> <b>LV</b> <u>RO</u> <b>E</b> <b>FR</b> <u>SR</u> <b>MN</b><br><b>LQ</b> <u>AR</u> <b>LR</b> <u>GF</u> <b>LV</b> <u>RQ</u> <b>KF</b> <u>AE</u> <b>HSH</b>   | <b>FL</b> <u>KK</u> <b>QI</b><br><b>FL</b> <u>RT</u> <b>WL</b>   | <b>FL</b> <u>KK</u> <b>QI</b><br><b>FL</b> <u>RT</u> <b>WL</b>   | <b>-IQGAP1</b><br><b>-IQGAP3</b> |
| IQ2 | <b>PA</b> <u>ITC</u><br><b>PA</b> <u>VIK</u><br>Consensus: <b>IQXXXRGXXXR</b>                         | <b>IQ</b> <u>S</u> <b>Q</b> <b>W</b> <b>R</b> <b>G</b> <b>Y</b> <b>K</b> <b>K</b> <b>A</b> <b>V</b> <b>Q</b> <b>D</b> <b>R</b> <b>L</b> <b>A</b><br><b>IQ</b> <u>A</u> <b>H</b> <b>W</b> <b>R</b> <b>G</b> <b>Y</b> <b>R</b> <b>Q</b> <b>K</b> <b>A</b> <b>V</b> <b>Q</b> <b>E</b> <b>R</b> <b>L</b> <b>Q</b>                            | <b>Y</b> <b>L</b> <b>R</b> <b>S</b> <b>H</b> <b>K</b><br><b>H</b> <b>F</b> <b>K</b> <b>A</b> <b>N</b> <b>L</b> | <b>Y</b> <b>L</b> <b>R</b> <b>S</b> <b>H</b> <b>K</b><br><b>H</b> <b>F</b> <b>K</b> <b>A</b> <b>N</b> <b>L</b> | <b>-IQGAP1</b><br><b>-IQGAP3</b> |
| IQ3 | <b>DE</b> <u>V<b>V</b><b>K</b><br/><b>DA</b><u>IIK</u><br/>Consensus: <b>IQXXXRGXXXR</b></u>          | <b>IQ</b> <u>S</u> <b>L</b> <b>A</b> <b>R</b> <b>M</b> <b>H</b> <b>Q</b> <b>A</b> <b>R</b> <b>K</b> <b>R</b> <b>Y</b> <b>R</b> <b>D</b> <b>R</b> <b>L</b> <b>Q</b><br><b>IQ</b> <u>A</u> <b>W</b> <b>A</b> <b>R</b> <b>M</b> <b>W</b> <b>A</b> <b>A</b> <b>R</b> <b>E</b> <b>R</b> <b>L</b> <b>R</b> <b>L</b> <b>R</b> <b>L</b> <b>R</b> | <b>Y</b> <b>F</b> <b>R</b> <b>D</b> <b>H</b> <b>I</b><br><b>Y</b> <b>F</b> <b>Q</b> <b>K</b> <b>N</b> <b>V</b> | <b>Y</b> <b>F</b> <b>R</b> <b>D</b> <b>H</b> <b>I</b><br><b>Y</b> <b>F</b> <b>Q</b> <b>K</b> <b>N</b> <b>V</b> | <b>-IQGAP1</b><br><b>-IQGAP3</b> |
| IQ4 | <b>ND</b> <u>I<b>L</b><b>K</b><br/><b>NS</b><u>I<b>V</b><b>K</b><br/>Consensus: <b>IQXXXR</b></u></u> | <b>IQ</b> <u>A</u> <b>F</b> <b>I</b> <b>R</b> <b>A</b> <b>N</b> <b>K</b> <b>A</b> <b>R</b> <b>D</b> <b>D</b> <b>Y</b> <b>K</b> <b>L</b> <b>I</b> <b>N</b><br><b>IQ</b> <u>A</u> <b>F</b> <b>F</b> <b>R</b> <b>A</b> <b>R</b> <b>K</b> <b>A</b> <b>Q</b> <b>D</b> <b>D</b> <b>V</b> <b>R</b> <b>I</b> <b>L</b> <b>V</b> <b>H</b>          | <b>A</b> <b>E</b> <b>D</b> <b>P</b> <b>P</b> <b>M</b><br><b>A</b> <b>P</b> <b>H</b> <b>P</b> <b>P</b> <b>L</b> | <b>A</b> <b>E</b> <b>D</b> <b>P</b> <b>P</b> <b>M</b><br><b>A</b> <b>P</b> <b>H</b> <b>P</b> <b>P</b> <b>L</b> | <b>-IQGAP1</b><br><b>-IQGAP3</b> |

B

| Motif        | IQ1  | IQ2  | IQ3  | IQ4  | IQ3.5-4.4 |
|--------------|------|------|------|------|-----------|
| Identity (%) | 46.7 | 43.3 | 50.0 | 60.0 | 57.1      |
| Positive (%) | 66.7 | 66.7 | 73.3 | 73.3 | 71.4      |

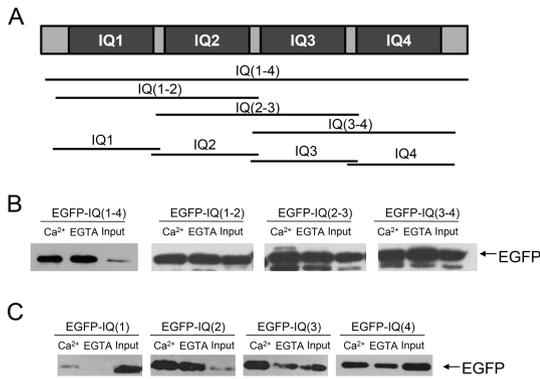
Fig. 1. Sequence comparison between IQGAP1's and IQGAP3's IQ domains. (A) Alignment of amino acid sequences of IQ motifs of human IQGAP1 and mouse IQGAP3. Identical sequences between IQGAP1 and IQGAP3 were bolded and positive sequences between IQGAP1 and IQGAP3 were underlined. (B) Quantification of sequence similarity of each IQ motif between human IQGAP1 and mouse IQGAP3.

열을 갖게 된다고 알려져 있다. 이와 같은 룰을 적용해 보면 IQGAP1이나 IQGAP3의 경우에는 이 consensus를 가지는 IQ 부위가 존재하지 않는다. 대신 이보다는 좀 더 포괄적인 IQ 부위의 consensus sequence인 [I, L, V] QXXXRXXX[R, K]를 적용해보면, IQGAP3의 경우는 IQ1와 IQ2와 IQ3가 이를 충족하고, IQGAP1의 경우는 네 개의 IQ 부위 모두 이를 충족함을 알 수가 있었다.

하지만 이러한 IQ 부위의 consensus sequence를 충족하는 것만으로는 CaM 결합성이 있음을 단정할 수는 없다. 본 연구자의 이전 연구를 통해 보면, 비록 IQGAP1의 네 개의 IQ 부위가 포괄적인 IQ 부위의 consensus sequence를 만족하지만 *in vitro* CaM pull-down 실험을 통해 보면, IQ3만이 의미있는 CaM 결합성을 보였다.<sup>14</sup> 다른 실험방법인 3xFLAG-hCaM co-IP를 이용한 실험에서는 의미있는 CaM 결합성을 가지는 IQ 부위는 없음을 알 수 있었다.<sup>13</sup> 즉 이 consensus sequence 이외에 다른 부위의 아미노산 서열도 CaM 결합성에 중요함을 알 수가 있었다.

3.2. CaM4B pull-down을 이용한 IQGAP3내의 IQ부위의 CaM 결합성 분석

IQGAP3에 존재하는 네 개의 IQ 부위의 CaM 결합성을 연구하기 위해, 우선 이 네 개의 IQ 부위를 모두 포함하는 부위를 EGFP에 fusion시킨 후 HEK293T 세



**Fig. 2.** Characterization of CaM binding of IQ motifs of IQGAP3 using CaM 4B pull-down assay in HEK293T cells. (A) A schematic representation of IQ motif of IQGAP3. (B and C) CaM binding of overexpressed IQ motifs of IQGAP1 fused to EGFP in HEK293T cells using CaM 4B pull-down assay. EGFP-IQ1 showed weak  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent CaM binding and other IQ motifs showed  $\text{Ca}^{2+}$ -independent CaM binding. Bound proteins were visualized by immunoblotting using anti-GFP antibody. The cell lysates were equally divided and incubated with CaM 4B at 4 °C for 1 hr.

포에 발현을 시켰다. 그 후, CaM 4B pull-down을 이용해 CaM과의 결합성을 연구하였다. Fig. 2에서 보듯이 IQGAP3의 IQ(1-4) 부위는  $\text{Ca}^{2+}$ 이 있든지 없든지 결합하는  $\text{Ca}^{2+}$ -비의존성 CaM 결합성이 있음을 알 수가 있었다(Fig. 2). 이 결과는 이전에 보고한 바 있는 IQGAP1의 IQ(1-4)의 결과와 유사하였다.<sup>13</sup> 이러한 사실을 통해 IQGAP3의 네 개의 IQ 부위는 CaM과 복합체를 형성할 수 있는 부위라는 사실을 알 수 있었다.

다음으로, IQGAP3내의 네 개의 IQ 부위를 각각 IQ(1-2), IQ(2-3), IQ(3-4)로 나누어 결합성을 조사해 보았다. IQGAP3의 결합성을 IQGAP1과 비교하기 위해, IQGAP1내의 네 개의 IQ 부위를 각각 IQ(1-2), IQ(2-3), IQ(3-4)로 나누고, 각각을 EGFP와 fusion하여 HEK293T세포에 발현시켜 CaM 결합성을 비교해 보았다. Fig. 2에서 보는 것처럼 IQGAP3의 경우는 IQ(1-2), IQ(2-3), IQ(3-4) 모두  $\text{Ca}^{2+}$ -비의존적으로 CaM과 결합하는 것을 확인하였다.

다음 실험으로, IQGAP3내 각각의 IQ 부위의 CaM 결합성을 조사하였다. 이를 위해 각각의 IQ 부위를 EGFP에 fusion해서 HEK293T세포에 발현시켰다. 실험을 수행한 결과 IQGAP3의 IQ1은 약하지만  $\text{Ca}^{2+}$ -의존적인 CaM 결합을 보이고, IQ2와 IQ3는  $\text{Ca}^{2+}$ -비의존적인 CaM 결합을 보임을 알 수 있었다(Fig. 2). 반

면에, IQ4의 경우는  $\text{Ca}^{2+}$ -비의존성 CaM 결합성이 있음을 알 수가 있었다. CaM 4B pull-down을 이용한 이전의 연구에서는 IQGAP1의 IQ1과 IQ2는  $\text{Ca}^{2+}$ -의존성, IQ3, IQ4는  $\text{Ca}^{2+}$ -비의존적 CaM 결합성이 있다고 보고하였다.<sup>12</sup>

이러한 사실을 통해 CaM 4B pull-down 실험을 통해서 IQGAP1과는 다르게 IQGAP3의 네 개의 IQ 부위 모두 HEK293T 세포에서 CaM과 복합체를 형성할 수 있음을 알게 되었다. 반면, 본 연구자에 의해 보고된 CaM 4B pull-down을 이용한 연구 결과에서는 IQ1은 약한  $\text{Ca}^{2+}$ -의존적 CaM 결합을 보이고, IQ2와 IQ3는  $\text{Ca}^{2+}$ -비의존적 CaM 결합을 보이고, IQ4는 결합하지 않음을 보고하였다.<sup>14</sup> 이러한 결과는 HEK293T 세포에서 IQ4를 제외한 나머지 IQ 부위는 CaM 복합체를 형성할 수 있음을 보여준다. 이러한 결합이 직접적인 것인지 알아보기 위해 각각의 IQ 부위를 GST 결합 단백질로 분리하여 CaM 4B pull-down을 이용해 결합을 조사한 결과, IQ1은 약하지만  $\text{Ca}^{2+}$ -의존적 CaM 결합성을 보이고, IQ2는 결합성이 없었다.<sup>14</sup> 유일하게 IQ3만이 CaM 결합성이 있음을 알 수 있었다. 즉 IQ2의 경우는 CaM과는 직접적으로 결합하지 않지만 HEK293T 세포에서 아닌 다른 단백질들이 매개하여 CaM 복합체를 형성할 가능성이 있음을 알게 되었다.

실험을 수행한 결과 IQGAP3의 IQ1, IQ2, IQ3의 경우는 IQGAP1과 유사하게, IQ1은 약하지만  $\text{Ca}^{2+}$ -의존적 CaM 결합을 보이고, IQ2와 IQ3는  $\text{Ca}^{2+}$ -비의존적인 CaM 결합을 보임을 알 수 있었다. 반면에, IQ4의 경우는 IQGAP1의 IQ4와는 다르게  $\text{Ca}^{2+}$ -비의존성 CaM 결합성이 있음을 알 수가 있었다. 이러한 사실을 통해 CaM pull-down 실험을 통해서 IQGAP1과는 다르게 IQGAP3의 네 개의 IQ 부위 모두 HEK293T 세포에서 CaM과 복합체를 형성할 수 있음을 알게 되었다.

이전의 연구에서는 정제된 CaM과 각각의 IQ부위에 해당하는 합성된 펩타이드를 사용하여 실험을 수행하였고, 결과로 네 개의 IQ 부위 모두  $\text{Ca}^{2+}$ 이 있을 때 결합을 하고,  $\text{Ca}^{2+}$ 이 없을 때는 아마도 IQ1만이 결합하는 것으로 보고했다.<sup>15</sup> CaM 4B pull-down을 이용한 우리의 결과를 보면 네 개의 IQ부위는  $\text{Ca}^{2+}$ 이 있을 때 결합을 하는 것은 이전 다른 연구자들의 결과와 일치한다. 반면에  $\text{Ca}^{2+}$ 이 없을 때는 IQ1은 결합성이 없고, IQ2, IQ3 및 IQ4는 결합성을 가진다. 왜 이들 연구결과는 현재의 연구결과와 차이를 보이는 것일까? 첫째로 실험 조건의 차이이다. 그들은 *in vitro*

에서 정제된 CaM과 합성된 펩타이드를 이용해 실험을 수행하였고, 우리는 HEK293T세포에 CaM 4B 각각의 IQ부위를 EGFP와 결합시켜 실험을 수행하였다. 둘째로, 그들이 CaM 결합에 사용한 사용한 IQ 부위가 약간 다르다. 그들이 사용한 IQ부위보다 우리가 실험에 이용한 부위는 그들이 이용한 부위보다 C-말단(terminal)쪽이 좀더 포함이 되어 있다. 아마도 이런 실험적인 차이가 약간의 차이를 만드는 것으로 생각되어진다.

**3.3. 3xFLAG-hCaM co-IP를 이용한 IQGAP3내의 IQ부위의 CaM 결합성 분석**

본 연구자가 수행한 이전 연구를 통해 3xFLAG-hCaM co-IP 방법이 CaM과의 결합성을 연구하는데 유용한 방법임을 알 수가 있었다.<sup>13</sup> 본 연구자가 3xFLAG-hCaM co-IP를 이용해 IQGAP1의 각각의 IQ 부위의 CaM 결합성을 HEK293T 세포에서 재조명한 결과, 네 개의 IQ 부위 모두 의미있는 CaM 결합성이 없음을 알 수가 있었다. 대신, IQ 부위 내에 새로운, 의미 있는 CaM 결합부위를 찾을 수 있었다.<sup>13</sup>

이번 연구에서도 같은 방법을 적용하여 IQGAP3내 각각의 IQ 부위의 CaM 결합성을 조사해보았다. 이를 위해 HEK293T 세포에 3xFLAG-hCaM을 각각의 IQ 부위와 발현시킨 후, FLAG co-IP를 수행하였다. 실험을 수행한 결과, Fig. 3에서 보여지듯이 IQ1과 IQ4의 경우는 CaM과의 결합성이 없음을 알 수 있었고, 반면 IQ2와 IQ3의 경우는 Ca<sup>2+</sup>-비의존적 CaM 결합성이 있음을 알 수가 있었다(Fig. 3). 즉, IQGAP3의 IQ2와

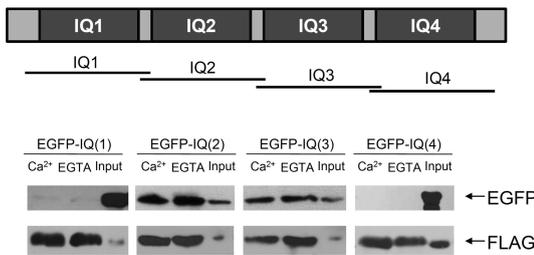


Fig. 3. Characterization of CaM binding of IQ motifs of IQGAP3 using 3xFLAG-hCaM co-IP. (A) A schematic representation of IQ motif of IQGAP1. (B) CaM binding of overexpressed IQ motifs of IQGAP1 fused to EGFP using 3xFLAG-hCaM co-IP in HEK293T cells. EGFP-IQ2 and IQ3 but not IQ1 and IQ4 showed Ca<sup>2+</sup>-independent CaM binding. Bound proteins were visualized by immunoblotting using anti-GFP antibody. The lysates were equally divided and incubated with M2-agarose at 4 °C for 1 hr.

IQ3의 경우는 IQGAP1와는 다르게 3xFLAG-hCaM co-IP를 이용해도 CaM과 복합체를 형성할 수 있음을 알 수 있었다. CaM 4B pull-down을 이용한 실험 결과와는 IQ2와 IQ3의 경우는 일치하고, IQ1과 IQ4는 차이가 있다. IQ2와 IQ4가 세포내에서 의미 있는 CaM 결합성을 가짐을 예상해 볼 수 있다.

**3.4. 3xFLAG-hCaM co-IP를 이용한 IQGAP3내의 IQ(3.5-4.4) 부위의 CaM 결합성 분석**

이전의 연구에서는 IQGAP1의 IQ 부위 내에 새로운 CaM 결합 부위인 IQ(2.7-3)과 IQ(3.5-4.4)를 보고 하였다. IQGAP1과는 다르게 IQGAP3의 경우 IQ3가 의미있는 CaM결합성을 보이므로, IQGAP3의 경우 IQ(2.7-3)의 경우는 연구를 수행하는 것이 의미가 없었다. 따라서, 본 연구에서는 IQGAP3의 IQ(3.5-4.4)에 대한 결합성을 조사하였다. 우선 IQGAP3에 IQ(3.5-4.4)에 해당하는 부위의 아미노산 서열을 IQGAP1과 비교해 보았다. Fig. 4에서 볼 수 있듯이 IQGAP1에 Ca<sup>2+</sup>-의존적 CaM 결합에 중요하다고 알려진 consensus sequence인 1-8-14 부위((FILVW)xxxxxx(FAILVW)xxxxx(FILVW))가 있는데<sup>16</sup>, IQGAP3의 경우도 이 부위가 보존되어 있음을 알 수 있었다(Fig. 4). 이전의 연구에서 결합성이 중요하다고 알려진 RKR서열도 RRR서열로 보존되어 있음을 알 수 있었다.<sup>13</sup> 다음으로 이 부위를 EGFP와 결합시켜 HEK293T 세포에 발현시켜 3xFLAG-hCaM co-IP를 이용해 CaM과의 결합을 조사하였다. Fig. 4에서 보여지듯이 이 부위도 Ca<sup>2+</sup>-의존적 CaM 결합성이 있음을 알 수 있었다. 따라서, IQGAP1에서처럼 IQGAP3에서도 IQ(3.5-4.4) 부위가 Ca<sup>2+</sup>-의존적 CaM 결합 부위로 작용할 수 있음을 알 수 있었다.

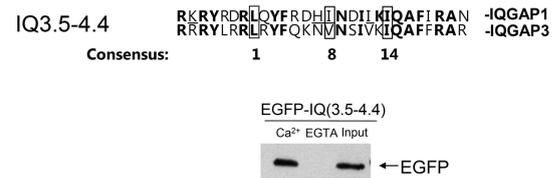


Fig. 4. CaM binding of IQ(3.5-4.4) of IQGAP3 in HEK293T cells. Alignment of amino acid sequences of IQ(3.5-4.4) motif of human IQGAP1 and mouse IQGAP3 (upper) and CaM binding of overexpressed IQ(3.5-4.4) of IQGAP3 using 3xFLAG-hCaM co-IP (lower). EGFP-IQ (3.5-4.4) showed Ca<sup>2+</sup>-dependent CaM binding. Bound proteins were visualized by immunoblotting using an anti-GFP antibody.

요약해 보면 IQGAP1과는 다르게, IQGAP3에서는 IQ2와 IQ3가  $Ca^{2+}$ -비의존적 CaM 결합 부위를 형성하고, IQ(3.5-4.4)가  $Ca^{2+}$ -의존적 CaM 결합 부위를 형성함을 알 수 있었다. 이처럼 IQGAP1과 IQGAP3의 IQ domain 사이에 아미노산 서열의 높은 상동성을 보이지만, 각각의 IQ부위의 CaM 결합성은 다름을 알 수가 있다. 이러한 사실은 비슷한 domain과 서열의 상동성을 보이는 IQGAP isoform 사이에 발견되는 조직의 차이뿐만 아니라 생리적 기능에 있어서도 차이가 있을 수 있음을 말해준다.

#### 4. 결 론

최근에 클로닝된 IQGAP3는 IQGAP1에 비해 많은 연구가 진행되어 있지 않았다. IQGAP3도 IQGAP1과 유사하게 네 개의 IQ 부위를 가지고 있으나, IQ 부위의 CaM 단백질과의 결합성은 잘 알려져 있지 않았다. 최근에 본 연구자가 3xFLAG-hCaM co-IP를 이용해 연구를 수행한 결과, IQGAP1의 경우는 네 개의 IQ부위는 CaM과 결합하지 않고 IQ(2.7-3)과 IQ(3.5-4.4)가 각각  $Ca^{2+}$ -비의존적이거나  $Ca^{2+}$ -의존적 CaM 결합성이 있음을 알게 되었다. 동일한 방법으로 IQGAP3에 적용해본 결과, IQGAP3의 경우는 IQ2와 IQ3가  $Ca^{2+}$ -비의존적 CaM 결합성이 있음을 알게 되었고, IQ(3.5-4.4)의 경우는  $Ca^{2+}$ -의존적 CaM 결합성이 있음을 알게 되었다. 본 연구를 통해 각각의 IQGAP isoform들이 각기 다른 CaM 결합성으로 세포내에서 다른 생리작용을 수행할 가능성이 있음을 제시하며, 이후 IQGAP3의 추가적인 기능을 연구할 수 있는 토대를 마련하였다.

#### 감사의 글

이 논문은 2010학년도 경북대학교 신입교수정착연구비에 의해 연구되었음.

#### 참고문헌

1. J. Noritake, T. Watanabe, K. Sato, S. Wang, S. and K. Kaibuchi, *J. Cell Sci.*, **118**(Pt 10), 2085-2092 (2005).
2. C. D. White, M. D. Brown and D. B. Sacks, *FEBS Lett.*, **583**(12), 1817-1824 (2009).
3. C. D. White, H. H. Erdemir and D. B. Sacks, *Cell Signal*, **24**, 826-34 (2012).
4. M. W. Briggs and D. B. Sacks, *FEBS Lett.*, **542**(1-3), 7-11 (2003).
5. Y. D. Ho, J. L. Joyal, Z. Li and D.B. Sacks, *J. Biol. Chem.*, **274**(1), 464-470 (1999).
6. Z. Li, S. H. Kim, J. M. Higgins, M. B. Brenner and D. B. Sacks, *J. Biol. Chem.*, **274**(53), 37885-37892 (1999).
7. M. W. Briggs, Z. Li and D. B. Sacks, *J. Biol. Chem.*, **277**(9), 7453-7465 (2002).
8. S. C. Mateer, A. E. McDaniel, V. Nicolas, G. M. Habermacher, M. J. Lin, D. A. Cromer, M. E. King and G. S. Bloom, *J. Biol. Chem.*, **277**(14), 12324-12333 (2002).
9. L. Weissbach, J. Settleman, M. F. Kalady, A. J. Snijders, A. E. Murthy, Y. X. Yan and A. Bernards, *J. Biol. Chem.*, **269**, 20517-21 (1994).
10. S. Wang, et al., *J. Cell. Sci.* **120**, 567-77 (2007).
11. H. Nojima, M. Adachi, T. Matsui, K. Okawa and S. Tsukita, *Nat. Cell Biol.*, **10**, 971-8 (2008).
12. Z. Li and D. B. Sacks, *J. Biol. Chem.*, **278**(6), 4347-4352 (2003).
13. D. J. Jang, B. Ban and J. A. Lee, *Mols. Cells*, **32**, 511-8 (2011).
14. D. J. Jang, *Analytical Science & Technology*, **120**, 567-77 (2011).
15. E. Atcheson, E. Hamilton, S. Pathmanathan, B. Greer, P. Harriott and D. J. Timson, *Biosci Rep*, **31**(Pt5), 371-379 (2011).
16. M. Bahler and A. Rhoads, *FEBS Lett.*, **513**(1), 107-113 (2002).