Printed in the Republic of Korea
ANALYTICAL SCIENCE & TECHNOLOGY
Vol. 24, No. 6, 527-532, 2011
http://dx.doi.org/10.5806/AST.2011.24.6.527

IQGAP1내에 존재하는 IQ 부위들의 CaM 결합 특성 분석

장 덕 진★
경북대학교 생태환경대학 생물응용전공
(2011. 11. 2. 접수, 2011. 11. 5. 수정, 2011. 11. 5. 승인)

Analysis of calmodulin binding property of IQ motifs of IQGAP1

Deok-Jin Jang★
Department of Applied Biology, College of Ecology and Environment, Kyungpook National University, 386, Gajang-dong, Sangju-si, Kyeongbuk 742-711, Korea
(Received November 2, 2011; Revised November 5, 2011; Accepted November 5, 2011)

요 약: IQGAP1은 세포 내에서 암세포화, 세포이동과 같은 다양한 기능을 수행하고 있으며, Ca^{2+}-비의존성 calmodulin (CaM) 결합 단백질로 잘 알려져 있다. IQGAP1내에는 IQ부위가 4 번 반복해서 나타나는데, 이 부위가 IQGAP1의 CaM 결합에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. 이전의 연구를 통해 4개의 IQ 부위 모두 Ca^{2+}/CaM과의 결합에 관여하고, IQ3와 IQ4는 Ca^{2+}이 결합되지 않는 상태의 CaM인 proCaM 결합에 관여 한다고 알려져 있다. 그러나, 이러한 각각의 IQ 부위와의 결합성이 CaM과 직접적인 결합인지, 아니면 다른 단백질이 매개하는 간접적인 결합인지 알려져 있지 않았다. 따라서, 본 연구에서는 IQGAP1의 각각의 IQ 부위와 CaM의 결합성을 직접적으로 알아보기 의해 *in vitro*에서 조사해 보았다. 그 결과, 흥미롭게도 이전의 결과와는 다르게 4개의 IQ 부위 중에서 IQ3는 의미있는 Ca^{2+}-비의존성 CaM결합성이 있음을 알게 되었고, IQ1는 약한 Ca^{2+}-의존성 CaM 결합성이 있음을 알게 되었다. 반면에, 다른 IQ 부위들은 CaM과의 결합력이 약하거나 없음을 확인하였다. 또한, 기존의 IQ 부위 이외에 IQ(2.7-3)과 IQ(3.5-4.4) 부위가 의미있는 CaM 결합성이 있음을 확인하게 되었다. 따라서, 본 연구 결과 CaM이 IQGAP1을 기존의 보고와는 다른 방식으로 조절할 수 있을 가능성이 있음을 알게 되었고, 새로운 결합 부위 동정을 통해 IQGAP1과 CaM의 결합이 미치는 생리학적인 의미를 연구할 수 있는 토대를 마련하였다.

Abstract: IQ motif-containing GTPase-activating protein 1 (IQGAP1), which is a well-known Ca^{2+}-independent calmodulin (CaM) binding protein, is involved in various cellular functions such as cell proliferation and cell migration. IQGAP1 has four repeated IQ motifs, which are crucial for CaM binding. It has been shown that all four IQ motifs of IQGAP1 can bind to Ca^{2+}/CaM, while the third and fourth IQ motifs of IQGAP1 can bind to apoCaM. However, it has not been clear whether the CaM binding of IQ motifs of IQGAP1 was mediated directly or indirectly. In this study, we examined whether the binding between CaM and each IQ motif of IQGAP1 was direct *in vitro*. As a result, we found that IQ1 motif has a weak Ca^{2+}-dependent CaM binding. In contrast, IQ3 has a Ca^{2+}-dependent CaM binding. All other motifs have no significant CaM binding. We also found that IQ(2.7-3) and IQ(3.5-4.4) have CaM binding capacity. This finding indicates that IQ motifs of IQGAP1 plays a dynamic role via different motif interactions with Ca^{2+}/CaM or proCaM.

Key words : IQGAP1, IQ motif, calmodulin

★ Corresponding author
Phone : +82-(0)54-530-1213 Fax : +82-(0)54-530-1218
E-mail : jangdj@knu.ac.kr

www.kci.go.kr

1. 서 론

세포내 연결 및 지지를 담당하는 scaffolding 단백질 중에 하나인 IQGAP1은 세포내에서 세포분열, 암세포화, 세포의 부착, 세포이동과 같은 다양한 기능을 수행하고 있다.[1,2] 이러한 IQGAP1의 생리적 기능들은 CDC42, F-actin, E-cadherin, calmodulin (CaM)과 같은 다양한 단백질과의 상호작용을 통해서 이루어진다.[3] 그 중에서 특히 CaM의 경우는 IQGAP1과 상호결합을 통해 IQGAP1과 다른 단백질과의 결합을 조절하는 중추적인 역할을 수행한다.[4-7]

CaM은 세포내의 대표적인 Ca^{2+} 결합 단백질로, Ca^{2+}이 결합된 형태인 Ca^{2+}/CaM이나 Ca^{2+}이 결합되지 않은 형태인 proCaM의 형태로 존재하게 된다. 이 두 가지 형태의 CaM은 각각이 서로 다른 단백질들과 결합해서 기능을 수행하게 된다. IQGAP1은 Ca^{2+}에 관계없이 CaM에 결합한다고 알려진 대표적인 단백질이다. IQGAP1에는 Ca^{2+}에 상관없이 CaM에 결합한다고 알려진 IQ 부위가 4 개가 존재한다.[8,9] Ca^{2+}이 결합되지 않은 상태의 CaM인 proCaM은 IQGAP1의 일정 부위에 에 결합하고 있다가 Ca^{2+}이 세포내로 들어오면 proCaM이 Ca^{2+}과 결합해서 Ca^{2+}/CaM으로 전환되고, IQGAP1내의 다른 결합부위와 결합함으로써 IQGAP1의 구조를 변화시켜, 다른 IQGAP1 결합 단백질과의 결합을 조절한다. 이를 통해 세포내 다양한 생리적인 현상을 유도한다. 예를 들면 Ca^{2+}의 세포내 증가는 IQGAP1과 CaM의 결합을 증가시키고, 이러한 증가가 GTP가 결합된 CDC42와 IQGAP1의 결합력을 감소시킨다.[4]

IQGAP1내의 IQ 부위들은 서로 다른 CaM 결합성을 보인다. 네 개의 IQ 부위 모두는 Ca^{2+}/CaM에 결합하고, IQ3, IQ4는 proCaM에 결합한다고 알려져 왔다.[10] 그러나, 이 논문에서는 COS 세포에 IQGAP1을 발현시킨 후 세포 단백질을 추출하여 CaM sepharose 4B (CaM 4B) pull-down을 수행했기 때문에 IQGAP1과 CaM과의 결합이 직접적인지 아니면 간접적으로 다른 단백질들의 매개에 의한 간접적 결합인지 알 수 없는 한계가 있다. 실제로 IQGAP1의 IQ 부위는 S100B, S100p, Mlclsa 와 Rap1등의 다양한 단백질과 결합 수 있다고 알려져 있다.[11-13] 따라서, IQGAP1내의 IQ 부위의 CaM과의 결합의 특성을 다시 분석해 볼 필요성이 있다.

본 연구에서는 이전 연구의 한계를 극복하기 위해 각각의 IQ 부위를 대장균에서 발현시켜 이들을 정제한 후 CaM 4B bead를 이용해 *in vitro*에서 결합 실험을 수행하였다. 이러한 결과, IQ3는 의미있는 Ca^{2+}-비의존성 CaM 결합성이 있음을 확인하였고, IQ1의 경우는 약한 Ca^{2+}-의존성 CaM 결합성이 있음을 알게 되었다. 반면, 나머지 3개의 IQ 부위는 CaM과의 결합성이 없음을 알게 되었다. 또한, 기존의 IQ부위 이외에 IQ (2.7-3)과 IQ (3.5-4.4) 부위가 CaM 결합성이 있음을 CaM 4B pull-down을 이용하여 확인하였다. 이러한 결합 특성 분석 사실을 통해 IQGAP1내의 IQ부위와 CaM이 기존에 보고된 방식과는 다른 방식으로 결합하여, 세포내에서 다양한 생리적인 작용을 할 수 있음을 알 수 있었다.

2. 실 험

2.1. DNA 제작

pGEX4T-1에 각각의 IQ 부위를 제한효소 처리를 통해 얻은 후, 단백질을 발현할 수 있는 벡터로 서브클로닝을 통해 GST-IQ1, IQ2, IQ3, IQ4를 제작하였다. 논문에서 사용된 다른 DNA들에 대한 정보는 이전 논문에 언급되어 있다.[14]

2.2. 세포 배양

HEK293T 세포는 10% FBS+Penicillin/streptomycin + DMEM 배양액에서 37 °C(w/ 5% CO_2) 세포 배양기를 이용해 배양하였다.

2.3. CaM 4B pull-down 에세이

*In vitro*에서 CaM 4B pull-down 실험을 위해서 IQGAP1의 각각의 IQ 부위에 해당하는 부위를 GST 벡터에 옮긴 후, *E. coli*에 발현시킨 후 일반적인 방법을 이용해 정제하여 얻었다. 이렇게 분리한 각각의 IQ 부위 단백질을 1X 결합용액(50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1% BSA, 1% Triton-X 100, protease inhibitor cocktails (Roche), 2 mM $CaCl_2$ (또는 5 mM EGTA))에 30 μL CaM 4B bead와 섞어서 4 °C에서 2시간을 결합을 시켰다. 이후, bead를 같은 1X 결합용액을 이용해 3번 washing을 하고 1X SDS sample buffer를 넣고 원심분리(14000 rpm, 상온, 1분)로 bead를 침전시켜 상층액을 얻는다. 이후 상층액을 취해 단백질 전기영동을 하고, coomassie blue 염색법으로 단백질을 확인 하였다.

HEK293T lysate를 이용한 CaM 4B pull-down 실험의 경우, lipofectamine 2000 (Invitrogen)을 이용해 각

www.kci.go.kr

각의 유전자들을 HEK293T 세포에 도입하여 단백질을 발현시켰다. Transfection후 24시간 후에 1X 결합용액(50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1% BSA, 1% triton-X 100, protease inhibitor cocktails (Roche), 2 mM $CaCl_2$ (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 1X 결합용액을 이용해 3번 washing하여 1X SDS sample buffer를 넣고 elution하였다. 이후 상층액을 취해 단백질 전기영동을 하고, GFP 항체를 이용해 western blotting을 수행하였다.

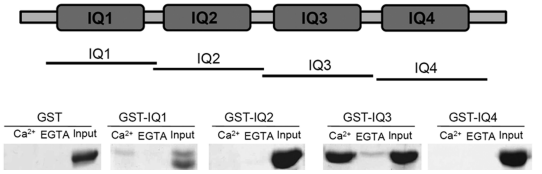

Fig. 1. Characterization of CaM binding of each single IQ motif of IQGAP1 using CaM 4B pull-down *in vitro*. (Upper) A schematic representation of IQ motif of IQGAP1. Each line represents the coverage of the construct. (Lower) *In vitro* CaM binding of purified single IQ motif of IQGAP1 fused to GST from *E. coli* using CaM 4B pull-down. GST-IQ1 and GST-IQ3, but not GST-IQ2 and GST-IQ4 showed CaM binding. Bound proteins levels were visualized using coomassie blue staining.

2.4. Western blotting

Western blotting을 위해 단백질들을 10-12% polyacrylamide gel에 전기 영동한 후 0.45 μm nitrocellulose membrane에 transfer했다. 그 후, membrane을 TBS (25 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, and 0.01% Tween 20)에 5% 탈지분유를 넣은 용액으로 blocking을 하였다. 이후 1차 항체로는 anti-GFP Ab를 처리하고, 이차항체는 goat anti-mouse IgG-horseradish peroxidase conjugate를 이용하였고, 단백질 확인을 위해 ECL (Amersham)을 이용하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. *In vitro*에서 IQGAP1내의 각각의 IQ 부위들의 CaM 결합성 분석

이전 연구에서 보고된 바에 의하면 IQGAP1 내에 존재하는 4개의 IQ 부위는 모두 Ca^{2+}/CaM에 결합을 하고, 그 중 3번째, 4번째 IQ 부위는 Ca^{2+}이 결합되지 않은 형태인 proCaM과 결합한다고 알려져 있다.[10] 그러나, 이러한 연구는 COS 세포에 full-length의 IQGAP1을 발현시킨 후 세포내의 extract를 이용하여 연구를 수행했기 때문에, IQ 부위들이 직접 CaM에 결합하는지, 아니면 COS 세포내 다른 단백질들이 결합을 매개해서, CaM과 결합하는지에 대해서 확인하고 검증하는데 문제점이 있다. 따라서, 본 연구에서는 이들간의 결합을 직접적으로 확인하기 위해 *in vitro*에서 CaM 결합을 확인하였다.

이를 위해, 첫째 GST fusion 시스템을 이용해 대장균에서 각각의 IQ부위들의 단백질을 발현하여 정제하였다. 정제된 GST fusion 단백질들을 각각 CaM 4B를 이용해 *in vitro*에서 CaM과의 결합성을 조사하였다. 그 결과, GST-IQ2와 GST-IQ4는 *in vitro*에서 CaM 4B와는 결합하지 않는 것으로 확인되었다(*Fig.* 1). 반면, GST-IQ1은 아주 약하게 Ca^{2+}/CaM에만 결합을 하였다. GST-IQ3는 Ca^{2+}-비의존성 CaM 결합을 보였다. 단백질 결합 분석에 의하면, proCaM보다 Ca^{2+}/CaM에 보다 잘 결합하는 경향을 보였다(*Fig.* 1).

본 연구 결과는 IQGAP1의 모든 IQ 부위는 Ca^{2+}-의존성 결합성을 보이고, IQ3와 IQ4는 proCaM 결합을 한다는 이전의 연구 결과와는 다르다.[10] 그렇다면 어떻게 실험결과의 차이를 설명할 수 있을까? 생각해 볼 수 있는 가능성으로 실험을 수행한 조건의 차이 때문으로 생각된다. 단백질 결합성을 확인하기 위해서 정제된 각각의 IQ 부위를 사용한 본 연구 방법과는 달리 이전 연구에서는 total COS cell lysate로부터 얻은 full-length IQGAP1을 이용하였다.[10] COS 세포에서 실험을 수행한 경우에는 다른 많은 CaM 결합단백질들이 존재하기 때문에, 이러한 단백질들이 중간에 결합을 매개 한다면, IQ 부위와 CaM과의 간접적인 결합에 의해 결합성을 보일 수 있다.

3.2. HEK293T 세포에서 IQ 부위들의 CaM 결합성 분석

IQ 부위와 CaM과의 간접적인 결합 가능성을 검증하기 위해서 본 연구에서 total cell lysate를 이용하여 세포내 결합성을 분석하는 실험을 수행하였다. HEK293T 세포에 EGFP fusion-IQ 부위를 발현시켜 CaM 4B를 이용해 단백질 결합 검증을 위한 pull-down 실험을 수행하였다. 먼저 대조군 실험으로 EGFP 자체가 CaM과 결합할 수 없음을 확인하였다

www.kci.go.kr

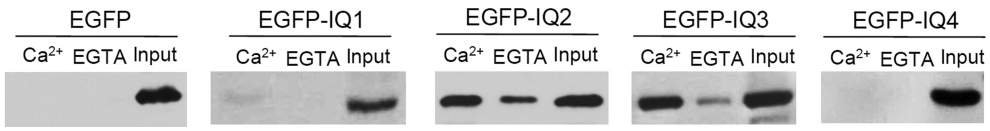

Fig. 2. Characterization of CaM binding of each single IQ motif of IQGAP1 using CaM 4B pull-down in HEK293T cells. CaM binding of overexpressed single IQ motif of IQGAP1 fused to EGFP in HEK293T cells using CaM 4B pull-down. Similar to CaM binding *in vitro* in Figure 1B, EGFP-IQ1 and IQ3 but not IQ4 showed Ca^{2+}-dependent CaM binding. On the contrary, EGFP-IQ2 showed significant CaM binding, which is slightly Ca^{2+}-dependent. Bound proteins were visualized by immunoblotting using anti-GFP antibody. HEK293T cell lysates expressing EGFP-IQs proteins were equally divided and incubated with CaM 4B at 4 °C for 1 hr in binding. Each experiment was typically repeated at least three times to obtain convincing results.

(*Fig.* 2). IQ 부위가 fusion된 EGFP-IQ1와 IQ3와 IQ4는 CaM과 결합함을 확인할 수 있었다. *Fig.* 2에서 보여지듯이 이들의 결합성은 *in vitro*와 비슷하다. EGFP-IQ1의 경우는 약하게 Ca^{2+}/CaM과 결합하고, EGFP-IQ4는 CaM과 전혀 결합하지 않았으며 EGFP-IQ3는 의미있는 Ca^{2+}-의존성 결합성을 보였다. 따라서, 이러한 사실을 종합해서 정리하면, IQ1은 CaM과 약한 Ca^{2+}-의존성 결합력을 갖고, IQ4는 CaM과의 결합성이 없고, 반면 IQ3는 Ca^{2+}-의존성 CaM과의 결합력을 갖고 있음을 알 수 있다. 그러나, IQ2의 경우는 *in vitro*에서는 CaM이 결합을 하지 않았던 실험 결과와는 다르게 HEK293T 세포에서는 Ca^{2+}-비의존성 CaM 결합의 형태를 보여 주었다(*Fig.* 2). 그렇다면, *in vitro*에서는 결합하지 않았던 IQ2가 어떻게 HEK293T 세포에서 CaM 4B와 결합할 수 있는가? 비록 CaM과의 결합에 GST와 EGFP의 영향을 완전히 배제할 수는 없지만, EGFP-IQ2는 HEK293T세포에서 CaM 4B과 결합하는 다른 단백질이 매개가 되어 간접적으로 결합하는 것으로 여겨진다. 이러한 가능성을 뒷받침해 주듯 S100B, S100p, Mlclsa 와 Rap1등의 다양한 단백질이 IQ 부위와 결합할 수 있음이 보고되었다.[11-13] 따라서, IQ2는 CaM 4B pull-down에서 다른 결합단백질에 의해서 간접적으로 CaM에 결합할 것으로 판단된다.

3.3. HEK293T 세포에서 새로운 IQ 부위들의 CaM 결합성 분석

IQGAP1은 proCaM과 의미 있게 결합하는 대표적인 Ca^{2+}-비의존성 CaM 결합단백질이다. IQGAP1내에 존재하는 IQ 부위는 IQGAP1의 CaM 결합에 중요하다고 알려져 있다. 그러므로, IQ 부위는 Ca^{2+}-비의존성 CaM 결합력을 갖고 있어야 한다. 그런데, 본 연구 결과에 의하면 IQ 부위내에서 유일하게 의미있는 결합을 하는 IQ3의 경우에도 proCaM과의 결합이 약하다는 사실을 확인할 수 있었다(*Fig.* 2). 그렇다면, 어느 부위가 proCaM과 의미 있게 결합할 수 있는가?

최근의 연구에서 IQ3에서 IQ2의 일부를 포함하는 IQ(2.7-3)이 의미있는 proCaM과의 결합력이 있음을 *in vitro*에서 확인하였다.[14] 그러나, 이들의 세포내의 결합

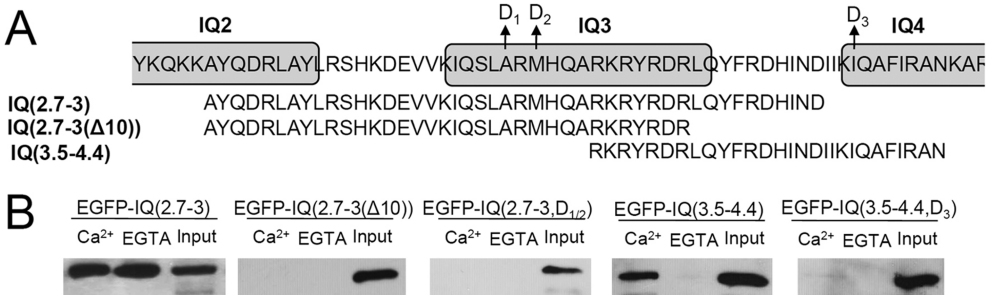

Fig. 3. CaM binding of IQ (2.7-3) and IQ (3.5-4.4) in HEK293T cells. (A) A schematic representation of the IQ motif of IQGAP1. Alignment of amino acid sequences of each constructs. The arrow indicates a point mutation to Asp (D) or Ala (A). (B) CaM binding of overexpressed IQ motifs of IQGAP1 using 3xFLAG-hCaM IP. EGFP-IQ (2.7-3) showed Ca^{2+}-independent CaM binding. On the other hand, EGFP-IQ (2.7-3(Δ10)), and IQ (2.7-3, $D_{1/2}$) did not show any CaM binding in 3xFLAG-hCaM IP. EGFP-IQ (3.5-4.4) showed Ca^{2+}-dependent CaM binding. Meanwhile, EGFP-IQ (3.5-4.4, D_3), and IQ (3.5-4.4, AAA) did not show any CaM binding in 3xFLAG-hCaM IP. Bound proteins were visualized by immunoblotting using an anti-GFP antibody. Each experiment was repeated three times.

www.kci.go.kr

을 검증하지 못했다. 따라서, HEK293T 세포에서 EGFP-IQ(2.7-3)을 발현시켜 CaM 4B pull-down을 이용해서 이들의 결합을 확인해 보고자 하였다. *Fig.* 3B에서 볼 수 있듯이 IQ(2.7-3)은 IQ3과는 다르게 의미있는 proCaM 결합을 확인할 수 있다. 이러한 결과는 *in vitro*뿐 아니라, HEK293T 세포에서도 IQ(2.7-3)이 의미 있는 CaM 결합하는 부위임을 확인하는 중요한 실험 결과다.

새로이 동정된 IQ 부위와 CaM과의 결합의 특성을 좀더 분석하기 위해 다양한 돌연변이 단백질을 제작하여 이들의 결합을 비교하여 보았다. 먼저, C-말단의 10개의 아미노산을 줄여 결합에 중요한 단백질 부위를 세분화하여 동정하기 위해 EGFP-IQ(2.7-3(Δ10))을 제작하였다. 이를 이용해 CaM과의 결합성을 분석한 결과, 흥미롭게도 결합성이 사라지는 것을 확인할 수 있었다(*Fig.* 3B). 이러한 사실을 통해 CaM 결합에 full-length의 IQ3가 필요하다는 것을 알게 되었다.

결합에 필요한 단백질 아미노산 서열의 특성을 분석하기 위하여 결합부위의 소수성 아미노산을 산성 아미노산으로 바꾸어준 돌연변이체(ARM->DRD)를 제작하였다. 돌연변이체를 이용하여 CaM과의 결합을 분석해 본 결과, 산성 아미노산 성격을 띠는 IQ 부위는 CaM와의 결합이 사라지는 것을 확인할 수 있었다(*Fig.* 3B). 이러한 결과를 통해서 IQ 부위의 CaM과의 결합에는 소수성 아미노산들이 중요한 역할을 한다는 것을 밝힐 수 있었다.

다음 실험에서는 CaM과 결합하는 부위로 새로이 분리된 IQ(3.5-4.4)의 세포내 결합 검증을 확인하고자 하였다. 최근의 연구를 통해 Ca^{2+}-의존성 CaM 결합력이 있음을 *in vitro*에서 확인하였으나[14], 세포내에서의 결합성을 검증하지 못했기 때문에, EGFP-IQ(3.5-4.4)을 HEK293T 세포에 발현시킨 후, CaM 4B를 이용해 결합성을 알아보았다. 그 결과 *Fig.* 3B에서 볼 수 있듯이 IQ(3.5-4.4)는 의미있는 Ca^{2+}/CaM 결합의 특성을 나타내었다. 이러한 사실을 통해 *in vitro*뿐 아니라 HEK293T 세포에서도 IQ(3.5-4.4)이 의미있는 Ca^{2+}/CaM 결합 단백질이라는 중요한 사실을 검증할 수 있었다. 또한, 결합 부위의 아미노산을 소수성 아미노산에서 산성 아미노산으로 치환한 돌연변이 단백질(IQ->DQ)을 만들어서 이들의 결합을 분석한 결과, 산성 아미노산 치환 돌연변이 단백질은 CaM과의 결합력이 사라짐을 알 수 있었다(*Fig.* 3B). 따라서, 소수성 아미노산이 IQ(3.5-4.4)가 CaM 결합하기 위해 필수적이라는 사실을 알 수 있었다. 이러한 결과를 통해 세포내 환경에서 IQGAP1에 존재하는 4개의 IQ 부위 이외에 각각의 IQ 부위와 이들의 일부를 포함하는 새로운 부위, 즉 IQ(2.7-3)과 IQ(3.5-4.4)가 CaM 결합에 중요한 역할을 한다는 사실을 한다는 알 수 있었다.

이전의 연구에서는 4개의 IQ 부위가 Ca^{2+}/CaM 결합에 관여하고, IQ3와 IQ4가 proCaM 결합에 관여한다고 보고하였다.[10] 이러한 연구 결과는 이전의 연구 결과와 상반된 것처럼 보이지만 이들을 자세히 분석해 보면 IQ1의 경우 약한 Ca^{2+}/CaM 결합을 보여주므로 이전의 결과와 부합한다. IQ2의 경우는 *in vitro*에서는 결합력이 없으나, HEK293T세포에서 pull-down 실험을 수행한 경우 CaM 결합을 보인다. 이전 결과와 차이가 나는 점은 proCaM과도 의미 있는 결과를 보이는 점이다. IQ3의 경우는 의미 있는 CaM 결합력이 있음을 확인하였고, 이는 이전 결과와 부합한다. 마지막으로 IQ4의 경우는 CaM과의 결합성이 *in vitro*와 HEK293T세포에서 보이지 않는다. 그러나, IQ4 부위내에 있는 IQ를 DQ로 바꾼 돌연변이체가 IQ(3.5-4.4)의 CaM 결합성이 사라지는 결과를 고려하면, 이전의 연구 결과에서 IQ4가 CaM 결합성이 있다고 결론을 내린 사실은 실은 돌연변이에 의해 IQ(3.5-4.4)의 CaM 결합성이 사라지기 때문이라고 설명할 수도 있을 것이다. 그러나, 여전히 IQ4가 proCaM과 결합한다는 사실을 설명하기 위해서는 좀더 세밀한 결합 분석을 통한 연구가 필요하다.

4. 결 론

IQGAP1은 세포내에서 CaM이 결합하는 대표적인 단백질로 알려져 있으며 IQGAP1내에는 CaM이 결합할 수 있는 4개의 IQ 부위가 존재한다. 이전의 연구 결과에서는 IQGAP1의 IQ1, IQ2, IQ3, IQ4 모두 Ca^{2+}/CaM 결합에 관여하고, IQ3, IQ4가 proCaM에 관여한다고 보고하였다. 그러나, 본 연구를 통해서 *in vitro*에서 IQ1은 약하게 Ca^{2+}/CaM과 결합하고, IQ3은 CaM과 의미있는 결합성이 있음을 알게 되었다. 반면, 다른 IQ 부위들은 CaM과의 결합성이 없음을 알게 되었다. IQ2의 경우는 *in vitro*에서는 결합성이 없으나, HEK293T세포에 발현시켜 CaM 4B pull-down실험을 수행한 경우에서는 CaM 결합성이 나타남을 고려해 볼 때, IQ2는 CaM과 직접 결합하는 것이 아니라, HEK293T 세포내에 다른 단백질이 매개되는 간접적인 결합일 것으로 판단된다. 또한, IQ 부위들 내에 있는 다른 부분들인 IQ(2.7-3)과 IQ(3.5-4.4)도 CaM과

www.kci.go.kr

의미 있는 결합성이 있음을 다시 한번 확인할 수 있게 되었다. 이러한 사실은 CaM과의 결합을 통한 IQGAP1의 세포의 생리적 작용을 연구하는데 중요한 토대를 마련할 수 있을 것이다.

참고문헌

1. J. Noritake, T. Watanabe, K. Sato, S. Wang 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. M. W. Briggs and D. B. Sacks, *FEBS Lett.*, **542**(1-3), 7-11 (2003).
4. Y. D. Ho, J. L. Joyal, Z. Li and D. B. Sacks, *J. Biol. Chem*., **274**(1), 464-470 (1999).
5. Z. Li, S. H. Kim, J. M. Higgins, M. B. Brenner and D. B. Sacks, *J. Biol. Chem.,* **274**(53), 37885-37892 (1999).
6. M. W. Briggs, Z. Li and D. B. Sacks, *J. Biol. Chem*. **277**(9), 7453-7465 (2002).
7. 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).
8. A. R. Rhoads and F. Friedberg, *FASEB J.,* **11**(5), 331-340 (1997).
9. M. Bahler and A. Rhoads, *FEBS Lett.,* **513**(1), 107-113 (2002).
10. Z. Li and D. B. Sacks, *J. Biol. Chem.,* **278**(6), 4347-4352 (2003).
11. H. W. Jeong, Z. Li, M. D. Brown and D. B. Sacks, *J. Biol. Chem.,* **282**(28), 20752-20762 (2007).
12. A. Heil, A. R. Nazmi, M. Koltzscher, M. Poeter, J. Austermann, N. Assard, J. Baudier, K. Kaibuchi and V. Gerke, *J. Biol. Chem.* **286**(9), 7227-7238 (2011).
13. S. Pathmanathan, S. F. Elliott, S. McSwiggen, B. Greer, P. Harriott, G. B. Irvine and D. J. Timson, *Mol. Cell. Biochem.,* **318**(1-2), 43-51 (2008).
14. D. J. Jang, B. Ban and J. A. Lee, Mols. Cells, in press (2011).

www.kci.go.kr