

评述与展望

Review and Progress

蓝藻生物节律性分子调控机制的研究进展

李青雁 庞羽彤 李小龙 周飞飞 张芳 霍宇鹏 赵宇玮*

西北大学生命科学学院, 西安, 710069

* 通讯作者, zhaoyw@nwu.edu.cn

摘要 生物钟现象是一种普遍存在于生物界细胞的内源节律性保持机制。生物钟机制的存在可以使生物体的代谢行为产生并维持以 24 h 为周期的昼夜节律, 从而更好地适应于地球自转所产生的环境条件昼夜间节律性变化。蓝藻是目前生物钟分子机制研究中的模式生物, 其依赖于 *kai* 基因家族成员的核心生物钟调控模式已经被众多研究者详细阐明。蓝藻生物钟的核心振荡器是由蓝藻 *kaiA/B/C* 的编码产物来调控的, *Kai* 蛋白的表达模式具有节律性。*KaiC* 蛋白磷酸化状态的节律性循环及输入、输出途径相关组成蛋白的翻译后修饰状态节律性循环共同组成其反馈回路, 负责维持生物钟节律性振荡的持续进行并与环境周期保持同步。传统的蓝藻生物钟分子机制模型认为, 节律性表达基因翻译产物的转录/翻译负反馈抑制环是生物节律性维持和输出的关键。遗憾的是, 在其它物种生物钟分子机制研究中未发现由 *kai* 基因家族成员同源基因组成的节律性标签, 这表明以 *kaiA/B/C* 为核心振荡器的生物钟系统并不是一种跨物种保守的生物钟系统。近期, 人们发现非转录/翻译依赖的振荡器(NTO)也具有成为生物节律性产生和维持的“源动力”的可能。过氧化物氧化还原酶(PRX)氧化还原状态节律性是第一种被报道的跨物种保守的 NTO 节律性标签, 这也日渐成为蓝藻生物钟分子机制研究新的热点。

关键词 蓝藻, 节律性, 钟基因, 非转录依赖的振荡器, 转录 - 翻译负反馈回路

Progress in the Molecular Mechanism of Circadian Clock in Cyanobacterium

Li Qingyan Pang Yutong Li Xiaolong Zhou Feifei Zhang Fang Huo Yupeng Zhao Yuwei*

Life Sciences School of Northwest University, Xi'an, 710069

* Corresponding author, zhaoyw@nwu.edu.cn

DOI: 10.3969/gab.032.000677

Abstract Circadian clocks are endogenous time-keeping mechanisms which are ubiquitous in a variety of organisms from bacteria to mammals. In order to coordinate with and adapt to the daily environmental changes which are driven by the self-rolling of the earth, the circadian clock controls various metabolic and biological activities with a circle period of 24 h. One of the cyanobacterial species, *Synechococcus elongatus* PCC7942 is a model organism for the circadian clock system. Three proteins encoded by the *kaiA/B/C* gene cluster, which is functional basis for the circadian rhythm, generate the basic timing loop of the circadian clock in *Synechococcus*. Circadian time clue is transmitted from the KaiABC-based central oscillator to the clock-controlled transcription factors. KaiC, an autokinase and autophosphatase, is the central component of the cyanobacterial circadian clock. The daily auto-phosphorylation and auto-dephosphorylation cycle of KaiC and the post-translational modification of the proteins, which consisted the inputting and output pathways of the circadian clock, have composed the transcriptional and translational feedback loop (TTFL). In traditional theory of circadian clock model in cyanobacteria, TTFL regulation of clock genes are thought to be essential for sustaining and outputting of the basic circadian timing loop in *Synechococcus*. But surprisingly, KaiABC-based central oscillators are only found in cyanobacteria and very few prokaryotic species. It

基金项目: 本研究由国家自然科学基金项目(31200091 和 J1210063)、陕西省重点实验室科研计划项目(2010JS092 和 12JS104)、陕西省教育厅科学研究项目计划(2010JK855)、公益性行业(农业)科研专项经费项目(201203062)、陕西省大学生创新计划项目和西北大学大学生创新计划项目共同资助

seems that this Kai-based clock is not an ubiquitous time-keeping mechanism that has been selected by organisms during natural evolution. Recently, some circadian clock research groups have demonstrated that non-transcriptional and translational oscillators could be the driving force of the generating and sustaining of biological circadian rhythm. The peroxiredoxins (PRX) are reported to be conserved markers of circadian rhythms, which are also thought to be a new focus of the researches on the molecular mechanism of circadian clock in cyanobacteria.

Keywords *Cyanobacteria rhythmic*, Clock gene, Non-transcriptional oscillator, Transcriptional-translational feedback loop

地球自转带来的环境条件昼夜间节律性变化,是所有地球生物体必须面对的基本环境事件之一。目前,研究者在古核生物、细菌和真核生物体内都已发现了因这一自然节律性事件而形成的生命体内源时间保持机制。不同物种的内源时间保持机制均由核心生物钟基因(如蓝藻的 *kaiA/B/C* 基因家族,拟南芥的 *lhy* 等,哺乳动物的 *per1/per2* 等)的节律性表达调控形成了一个生物钟核心分子振荡器。而节律性输入和输出途径相关蛋白的协同作用,构成上述核心振荡器的反馈抑制环,一方面将外界环境时间信息(光信号和热信号等)输入核心振荡器,另一方面将核心振荡器形成的节律性信息传递给下游受生物钟控制的节律性表达基因,进而形成生物遗传与代谢的节律性表型(Schultz and Kay, 2003)。以分子振荡器为核心的生物钟调节机制赋予地球生物体感受环境条件日变化和光信号周期性反应,并通过输出途径调控自身代谢模式的能力(李经才等, 2004)。生物节律事件广泛存在于生物界,越来越多的研究报道显示:无论是原核单细胞有机体、高等动植物还是人类的许多生理代谢活动都是在生物钟控制下进行的。

1 蓝藻的生物钟

细胞的基础生命活动都要受到周期大约是 24 h 的生物节律性调控,这是从蓝藻到人类几乎所有生物体都具有的最根本的遗传特性。在之前的研究中已经发现蓝藻的昼夜节律性表型是最简单的生物钟模型。蓝藻基因组中超过 60% 的基因表达受到生物钟控制,其细胞内的许多生命活动都受到内源生物钟的调控并且具有明显的节律性,如光合作用、呼吸作用、固氮作用、细胞分裂以及基因表达等生理代谢过程。蓝藻是能够进行光合作用的原核生物,它兼具微生物和植物的特点,除此之外,蓝藻具有的结构简单、繁殖迅速、分布广泛和易于培养等的优势特点,使其成为一种理想的转基因模式生物。研究者已经在蓝藻基因组中找到了多个与生物钟分子调控相关的基因,如 *kai* 基因家族(Shiura et al., 1998)、*sasA*

(Iwasaki et al., 2000)、*pex* (Kutsuna et al., 1998)、*cikA* (Nair et al., 2002)、*rpoD4* (Nair et al., 2002)、*sigC* 和 *cpmA* (Katayama et al., 1999)等,其中在 *Anabaena* sp. PCC 7120 和 *Synechocystis* sp. PCC6803 中发现的 *kai* 基因的纯化表达产物是目前唯一能够在体外重建的生物钟节律性振荡器(徐虹和章军, 2004)。

Ishiura 等(1998)最早发现 *kai* 基因家族的三个成员 *kaiA*、*kaiB*、*kaiC* 在蓝藻基因组 DNA 中成簇排列,其编码产物通过相互作用形成生物钟的核心振荡器。进一步的研究发现,聚球藻的生物钟是通过一个转录-翻译水平上的负反馈环(transcriptional-translational feedback loop, TTFL)来调控节律性的输出的。环境时间信号(光或温度等)首先通过一个输入通道(input pathway)来启动“核心生物钟”基因的转录和表达(Rutter et al., 2002),并且借助核心生物钟 *kaiC* 表达产物的磷酸化状态循环来进一步调控下游基因的节律性表达,而这些受“生物钟”调控的基因及其表达产物又通过多种输出通道或反馈抑制“生物钟”基因的表达(即完成 TTFL),或调控其它受生物钟控制的生理、代谢过程。这一发现对我们了解生物钟进化有非常大的影响。Tomita 等(2005)人证明即使没有 *kaiB/C* mRNA 的积累, *KaiC* 蛋白也能够表现出特定昼夜节律性的磷酸化表型。这表明蓝藻的内源时间保持机制不仅仅依赖于单一的 TTFL 途径来维持,换言之,蓝藻细胞内应当还存在着另外一种不依赖于转录-翻译调控的时间保持机制。

符合上述假设的是:有研究发现,在 *Ostreococcus tauri* 和成熟的人血红细胞内 γ -Cys Prx 蛋白在缺乏转录调控机制的情况下能够保持周期大约为 24 h 的周期性氧化-还原状态循环,而其它 Prx 家族成员则尚未发现能够发生与之类似的翻译后修饰状态节律性变化(O'Neill et al., 2011)。蓝藻在进化过程中,为了应对日益增加的环境过氧化胁迫而进化出了一套精巧的抗氧化防御系统:其基因组编码一个超氧化物歧化酶(*slr1516*)、一个过氧化氢-过氧化物酶(*slr1987*)和 5 个过氧化物氧化还原酶 Peroxiredoxins (Prx)。研究

者们通过对敲除 *prx* 基因蓝藻及其它模型生物的抗氧化能力进行分析,确定 Prx 的氧化状态以大约 24 h 为周期的节律性震荡现象是一种在所有真核细胞内普遍存在的节律性遗传标记,并且这种非转录依赖的节律性遗传标记,可能是进化过程中最早出现在细胞内的高度保守的周期性震荡机制。在持续培养条件下,这种周期性的氧化还原状态循环能够得以维持,同时,这种节律性还具有能够被环境条件重置和温度补偿等两个生物钟本质特性(Ederly, 2000)。最近在蓝藻细胞中发现的 Prx 氧化状态以大约 24 h 为周期的节律性震荡现象则表明,细胞内可能既存在依赖于转录翻译的生物钟机制,也可能存在不依赖于转录翻译的生物钟机制(van Ooijen and Millar, 2012)。

2 依赖于转录 - 翻译负反馈抑制调控机制的生物钟分子机制研究进展

2.1 转录 - 翻译反馈调控的核心元件

在生物节律性产生和维持过程中,蓝藻以 *kai* 基因为核心的震荡器的起搏和维持需要一个与真核生物中类似的周期约 24 h 的转录 - 翻译反馈控制环路控制。与真核生物生物钟调控模式不同的是,位于同一操纵子上的蓝藻 *kaiB/C* 表达调控并不完全依赖于特异性的启动子活性。

最早的蓝藻 *kai* 基因是从 *Synechococcus* sp. PCC7942 中克隆得到的,由 *kaiA*、*kaiB* 和 *kaiC* 三个基因组成一个基因簇。它们的表达产物共同构成蓝藻的生物钟核心振荡器,在这个振荡器产生和维持生物节律性周期振荡信号的过程中,KaiC 蛋白磷酸化状态的周期性循环发挥着至关重要的作用。此外,生物钟核心振荡器产生的时相信息也要借助于被 KaiC 蛋白的磷酸化状态所偶联的下游钟蛋白复合体的形成与解聚来维持与传递。KaiA 和 KaiB 能够调节 KaiC 的磷酸化状态(林少苑和李淑彬, 2006)。核心振荡器是维持内源性生物钟运作的核心元件,蓝藻生理节律性的维持必须依赖于 *kaiA*、*kaiB* 和 *kaiC* 的正确转录与表达,这三个基因中的任何一个突变都会导致蓝藻细胞正常节律的丧失(Golden et al., 1998)。

上述钟基因中 *kaiA* 基因仅在蓝藻中发现(Dvornyk et al., 2003),其长度具有可变性,例如,单细胞蓝藻的中 *kaiA* 基因长度与丝状蓝藻中的 *kaiA* 基因长度相差很大,单细胞蓝藻中 *kaiB* 基因约 300 bp,而丝状蓝藻则可达 858 bp。在不同蓝藻种类中,存在两种类型 *kaiC* 基因:具有两个重复的结构域、两个

ATP/GTP 结合位点的长基因和只含有一个结构域的短基因。长的 *kaiC* 基因约为短的 *kaiC* 基因的两倍,且长的 *kaiC* 基因的第二个结构域与短的 *kaiC* 基因结构域的同源性非常高,然而在 *kaiA* 和 *kaiB* 基因中,长基因分子与短基因分子只是在 3' 端存在同源性(徐虹和章军, 2004)。

KaiA 蛋白能够正调控 *kaiB/C* 基因的表达,其氨基酸一级序列由两种结构域构成:约含有 180 个氨基酸的 N 端和约 100 个氨基酸的 C 端,并且在不同的蓝藻类型中只有 C 端序列保持高度保守(Golden et al., 1998),这种保守性能够在促进 KaiC 自磷酸化的同时,激活 KaiB 蛋白抑制 KaiC 自磷酸化的活性。KaiA 蛋白的 C 端呈 4 螺旋束结构是 KaiC 蛋白的结合位点所在(Garces et al., 2004)。核磁共振研究发现其 N 端具有一个被认为可能是具有计时输入结构的伪接受域,该结构域有可能是调控 KaiA 的 C 端结构域,并且发挥激活 KaiC 的激酶活性的作用。在二聚体 KaiA 的晶体结构中,具有一个互相结合的匹配结构域即某一单体亚基的 N 端和另一亚基的 C 端,他们之间可以发生相互作用(Ye et al., 2004)。

kaiB 基因在多种蓝藻中均有发现,其长度具有可变性。KaiB 蛋白不具有借助于磷酸化作用而自激活的能力。郑锦乾等(2006)利用酵母双杂交技术在研究铜绿微藻蛋白 KaiB 自体相互作用时,发现了 KaiB 蛋白可以发生自身相互作用,并且通常是以二聚体或多聚体的形式发挥生物钟调控作用。

KaiC 蛋白,具有两个重复的结构域 C₁ 区和 C₂ 区,对蓝藻基因组转录谱表达模式有重要调控作用(Pattanayek et al., 2004)。尽管 C₁ 和 C₂ 结构类似,但是它们与 ATP 结合的特性则存在明显的差异。在聚球藻内纯化得到的 KaiC 蛋白中发现该蛋白通常是以同型的六聚体排列方式存在,其亚基周围一圈被 C₁ 和 C₂ 平行相叠形成的双层圆环结构所包围,圆环两端形成了 C₁ 区和 C₂ 区。在这两个区域中都存在一个保守的谷氨酸序列,被认为发挥着 ATP 酶的活性,圆环中间形成了一条通道,分别是由开口较宽的 C₁ 端和被个精氨酸残基封闭起来的 C₂ 端组成。KaiC 的环状六聚体结构中存在多个亚基,每个亚基具有两个 ATP 结合位点,该位点会结合 ATP 或 GTP 来形成稳定的六聚体结构。在六聚体结构中的 C₁ 区域周围具有:T432、S431 和 T426 三个重要的磷酸化位点,他们对于蓝藻细胞昼夜节律的维持至关重要。突变掉这些位点后,伴随着蓝藻细胞的昼夜节律表型也消失,然而磷酸化位点突变却不影响 KaiC 六聚

体的形成,在 KaiA、KaiB 和 SasA 蛋白形成大分子复合物的过程中 KaiC 蛋白的自磷酸化状态至关重要的,并表现出有趣的昼夜节律性(Nishiwaki et al., 2004)。

2.2 转录-翻译反馈调控的外周原件

Pattanayek 等(2011)在蓝藻生物钟分子调控机理研究中率先发现 *sasA* 的编码产物为组氨酸激酶,在维持蓝藻生物钟节律性表型的过程中与 KaiC 表现出密切联系。在聚球藻研究中发现 *sasA* 突变体除了昼夜节律周期缩短外,还会表现出节律性振幅缩窄表型(Iwasaki et al., 2000)。概括看起来,缺失 *sasA* 基因的蓝藻细胞不会导致其节律的完全丧失,但是 *sasA* 基因正常表达在维持其正常昼夜节律中必不可少。这一研究结果表明 *sasA* 不是核心生物钟基因,而是生物钟节律性输出的外周元件之一。SasA 蛋白的 N 端结构域与 KaiB 序列相似性很大,二者同源性约为 60%。但是核磁共振研究发现, KaiB 和 SasA 一些关键位点的氨基酸序列差异导致了两者的二级结构有很大不同(Vakonakis et al., 2004)。此外,该结构域也能够调控 SasA 蛋白自身的激酶活性。硫氧还蛋白折叠形成 SasA 的 N 端结构,该区域缺少活性的半胱氨酸残基,此外在硫氧还蛋白的活性位点附近还发现了保守序列,该序列被认为可能是 SasA 以及其它蛋白质结合的活性位点(Schmitz et al., 2000)。SasA 蛋白中自磷酸化位点是位于 162 位的组氨酸,该位点的突变会导致其正常功能的缺失。实验已经发现该位点突变不仅会使 *kaiBC* 启动子活性大幅度降低,还将导致节律性表型的振幅衰减。SasA 并不是简单地通过与 KaiB 竞争去和 KaiC 结合而达到上调 KaiC 表达水平,实际情况是 KaiC 利用不同的结合位点来结合 SasA 和 KaiB。SasA 在细胞生物钟的控制过程中可能是作为第一个外周蛋白来输出节律信号。首先它会与 KaiC 组成一个大分子复合物,该大分子复合物会利用其磷酸基团将节律计时信号放大后再将其传递给受生物钟控制的一个代谢过程。在整个 24 h 昼夜节律过程中, Kai 和 SasA 的关系非常紧密(Iwasaki et al., 2000),他们通过互相作用共同经历昼夜节律性震荡过程:在相对黎明与正午时, KaiB、KaiA 共同形成一个相对较小的蛋白复合物,随着时间推移而进一步积累,在相对黄昏之后 Kai 蛋白(Nakahira et al., 2004)、SasA (Kucho et al., 2005) 蛋白会形成大的复合物。在相对黎明时蛋白表达降低,蛋白复合物各自分离开来,并开始新一轮的转录调控。由于节律性调控输入途径在不同物种中的进

化不尽相同,所以关于核心振荡器在设定振荡时相时,是通过何种输入途径来接收和传递环境信号的,这一问题目前仍然没有具有普适性的研究报道出现。在蓝藻中,环境节律性信息输入核心振荡器的分子机制也还不清楚。

蓝藻的内源生物钟节律是受到环境及时间等的信号所影响的,当环境和时间信号改变时,蓝藻通过重置内源节律性信号来使其振荡周期和系统输入的环境信息保持一致(周先举等, 2005)。Schmitz 等(2000)在输入通路中,发现一种细菌光敏色素 -CikA (circadian input kinase)能感受光-暗变化,其编码基因 *cikA* 突变时,将使蓝藻基因表达昼夜节律性发生周期和相位变化。CikA 是重要的生物钟信号输入途径的组成成分,能够充当信使将自然环境节律性变化(季节变换带来的自然环境光照和温度时相变化)信息传递给蓝藻生物钟系统,并为之提供生物钟相位重置信息。该基因编码的组氨酸激酶 CikA 是可重置生物钟时相的光敏色素,既是节律性信号输入途径的关键组分,还具有协助 Kai 蛋白实现节律性保持的功能。

CikA 的 N 端氨基酸序列具有光信号接收器的作用,其中部的氨基酸序列包含有组氨酸激酶特征性的 H、N、D、F 和 G 等保守基序, C 端氨基酸序列是调控因子结合结构域。研究发现 CikA 的 N 端氨基酸序列与细菌光敏素完全相同, *cikA* 的突变除能缩短蓝藻细胞的节律性周期、改变节律性震荡相位外,还能导致突变蓝藻菌株丧失感受环境光-暗信号变化的能力(O'Neill et al., 2011)。

labA (low-amplitude and bright)是 KaiC 蛋白负反馈调控必需的调控基因。通常认为, LabA 是通过与前文提到的 SasA 协同作用而共同调控 RpaA 的功能以及细胞生理代谢。在 *labA* 缺失突变体内,由于 *kaiBC* 启动子的活性持续保持使得 KaiC 蛋白的过度积累的研究报道表明 *labA* 的敲除导致了蓝藻核心钟负反馈调控过程丧失。从 *kaiBC* 的表达表型来看,敲除 *labA* 导致 *kaiBC* 表达的谷值抬升和节律性整体振幅缩窄。这一现象显示出,野生型蓝藻 *Synechococcus* 细胞内 *labA* 的功能是在相对黑夜时相内抑制 *kaiBC* 的表达活性。而来自 *labA* 的负反馈抑制作用一旦丧失,将导致 *kaiBC* 表达上调和 KaiC 蛋白的过量积累。还有一点非常重要, *labA* 的缺失突变能够回复 *sasA* 敲除突变体的节律性表型,即在 *labA/sasA* 双突变体中 *kaiBC* 表达水平和 KaiC 的积累量均丧失正常的负反馈下调过程。分别敲除 *labA* 和 *sasA* 对 *kaiBC* 表达节律性调控产生的这种相反表型显示:二

者位于两条不同的反馈回路中(Taniguchi et al., 2007)。有报道显示 *cikA* 不仅是将环境信息输入生物钟系统的因子,还承担着与 *labA* 非常类似的 *kaiBC* 负反馈调控功能(Taniguchi et al., 2010)。

rpaA 是既参与 *labA* 又参与 *sasA* 反馈回路调控的生物钟外周环路调控基因。RpaA 蛋白具有 DNA 结合结构域,是重要的蓝藻生物钟控制基因转录输出因子(Schmita et al., 2000)。敲除 *rpaA* 蓝藻会产生和 *sasA* 敲除系相同的表型特点,即显著降低 *kaiBC* 的节律性表达,继而引起 KaiC 蛋白积累不足,并导致敲除藻株出现几乎完全无节律的表型(Nair et al., 2002)。KaiC 与 SasA 的结合引发 SasA 的自磷酸化过程,磷酸化的 SasA 再把磷酸基团传递给 RpaA。KaiC-SasA-RpaA 途径被认为可以根据 KaiABC 为基础的核心振荡器产生的时间信息在相对白天激活 *kaiBC* 表达,并输出生物钟的时相信息(Taniguchi et al., 2010)。

Pex (periodextender)是另一种被报道的生物钟外周蛋白,被认为是生物钟的修饰因子,其编码基因自身的表达既受到核心生物钟控制,又能反馈上调 *kaiA* 的表达水平。*pex* 过量表达后会延长蓝藻 *Synechococcus* sp. strain PCC7942 株系的生物钟周期,然而 *pex* 的缺失突变却导致其生物钟周期的缩短。Pex 蛋白并不会直接地与 KaiA、KaiB 和 KaiC 发生相互作用关系,*Synechocystis* sp. PCC6803 的全序列已被测出,但是未找到与 *pex* 同源性的基因,目前还不太确定其它蓝藻物种中是否存在 *pex* 基因(Kutsuna et al., 1998)。

除了 *kaiA/B/C*、*sasA*、*cikA*、*labA*、*rapA* 和 *pex* 这些基因之外,还存在一些其它的基因参与蓝藻的节律性分子调控过程,目前已经在蓝藻中鉴定出了多种与生物钟相关的基因:如聚球藻的 *pex*、*ldpA*、*cpmA* 以及编码 σ 转录因子的 *rpoD2*、*rpoD3*、*rpoD4* 和 *sigC* 等基因(Golden, 2003),但这些基因的生物钟调控相关功能尚需进一步研究确定。

2.3 DNA 拓扑结构扰动对生物钟基因表达谱的影响

Vijayan 和 O'Shea (2013)发现染色体 DNA 的拓扑状态与蓝藻生物钟基因的表达状态高度相关。如果人为在生理范围内干扰蓝藻细胞的 DNA 超螺旋状态则可以使蓝藻基因组表达谱发生显著变化。研究者发现,用 0.1 g/mL 的 DNA 旋转酶抑制剂 - 新生霉素(novobiocin)在蓝藻染色体处于超螺旋化程度最高的 CT 16 时相处理蓝藻细胞时,尽管蓝藻细胞的生长速率没有受到显著的影响,DNA 的超螺旋状态则在短暂的延迟之后变得松弛。在 5 min 的新生霉素

处理时间段内,蓝藻的 pANS 质粒的超螺旋状态达到了与正常节律性循环中最松弛状态接近的螺旋化状态。与此同时,在蓝藻 1748 个节律性基因中的 1380 (79%)的节律性时相会在新生霉素处理 5 min 后表现出与其在正常节律性循环中 DNA 处于最松弛状态接近的表达状态。这一实验结果显示,无论核心生物钟的节律性信息如何,在某一给定的节律性时相节点对蓝藻细胞的 DNA 拓扑结构进行扰动可以改变节律性基因的节律性表达时相。也就是说,DNA 超螺旋状态节律性时相信息可以对蓝藻生物钟控制的基因的表达模式产生重大影响。

3 非转录依赖时间保持分子机制的研究现状

伴随着研究者在 TTFL 蛋白翻译后调控方面报道的日渐增多,非转录依赖的震荡器(non-transcriptional oscillator, NTO)是否可以充当生物钟的核心振荡器的问题也日益成为生物钟分子机制研究的关键问题。然而最近的研究报道显示,在蓝藻中 TTFL 振荡干扰或缺失情况下,某些特定生物节律性表型仍然能够保持存在。这说明,除了 TTFL 振荡保持生物钟节律性输出外,可能还存在另外一个不依赖于转录翻译时间的节律性维持系统。2011 年,O'Neill 等(2011)连续在《Nature》上发表两篇影响重大的研究报道,报道了在人类成熟红细胞和 *Ostreococcus tauri* 细胞内存在从未被报道过的非转录依赖生物节律性标记,而 2-Cys Prx 的氧化状态节律性循环则是这一非转录依赖生物节律性标记的“主角”,这一现象被发现普遍存在于真核和原核生物之中,但 NTO 是如何具体发挥作用的,目前还有待进一步的深入研究。

蓝藻株系 *Synechococcus elongatus* PCC7942 基因组共编码六个不同 *prx* 基因家族的成员,即一个 1-cys *prx*,一个 2-cys *prx* 和四个 *prxQ* (*prxQ-A1*, *prxQ-A2*, *prxQ-A3* 和 *prxQ-B*),这些基因在不同生长条件下,呈现出基因特异的差异表达特性。2-cys *prx* 基因敲除的蓝藻藻株还体现出对过氧化氢胁迫不敏感但对过量紫外线引发的活性氧爆发胁迫的显著敏感表型。更为有趣的是,最近有研究表明 *Ostreococcus tauri* 和成熟的人血红细胞内 2-Cys Prx 蛋白在缺乏转录调控机制的情况下能够保持周期大约为 24 h 的周期性氧化状态循环,而其它 Prx 家族成员则尚未发现类似的节律性变化。这与传统细胞生物钟分子机理,即“核心钟”元件感受环境光照或温度信号后通过所谓转录 - 翻译负反馈(TTFL)机制调控受生物钟控制的基因表达的生物钟运转模式完全不同,表明除了

清除细胞内过氧化物这一确定功能之外(Nakahata et al., 2008) *prx* 家族成员可能还承担着诸如作为不依赖于转录(NTO)调控的节律性遗传标记、参与细胞内多个信号通路调控等重要功能。

4 依赖于 TTFL 机制的生物钟调控机制和 NTO 时间保持机制互动动态分析研究进展

大约在距今 2.5 亿年前,作为“大氧化事件”的结果,大气层中的氧含量急剧上升。从那时起,蓝藻中基于 Kai 蛋白的核心震荡器与 Prx 就开始相互作用了(Edgar et al., 2012)。由于氧气含量的增加以及太阳光照的规律性变化使得蓝藻体内自由基积累显著增加。一系列的研究(Zhang et al., 2006; Wood et al., 2010)都已经明确地指出,蓝藻细胞内可能存在一个依赖于氧化还原系统来维持时间保持系统的精确。氧化还原节律无处不在,如在人类中, BMAL 时钟和 SIRT1 时钟之间的复杂关系是靠氧化还原物 $NAD^+/NADH$ 比率来进行(Asher et al., 2008; van Ooijen and Millar, 2012)。既然蓝藻生物钟进化出了两个系统,那么这两个系统之间到底有什么关系,两者之间是否存在相互依赖关系呢?目前的研究推测蓝藻中 TTFL 和 NTO 之间可能存在两种的关系:(1)两者不发生相互作用各自保持节律性:由于 Kai 蛋白的核心震荡子系统是能够在体外重建的,这就使得我们在研究这两个节律表达系统关系时变得相对容易一些。科学家们已经发现在没有 TTFL 存在时, NTO 仍然可以维持稳定的 24 h 节律性周期(Nakajima et al., 2005)。此外在人类、果蝇、海藻类及一些植物的 TTFL 敲除株系中, Prx 的输出也保持节律性。我们在尚未清楚地知道 NTO 功能的情况下,很难精确地来定义其对 TTFL 的作用,特别是在钟基因 *kaiA* 敲除的没有任何节律输出情况下, Prx 仍然具有节律性周期振荡,这说明非转录的时间控制机制不仅仅是在 TTFL 中发挥作用,也有可能是在目前仍然未知的 NTO 时钟系统中发挥一定的功能;(2)TTFL 和 NTO 相互耦合:既然 TTFL 和 NTO 都有生物钟节律保持的作用,那么在这两个系统相互耦合作用时,有可能会产生一个更明显的钟节律输出信号。NTO 能够补偿 TTFL 节律输出的实验数据显示这两个系统很可能存在耦合(Qin et al., 2010)。例如:在蓝藻生物钟节律输出途径中,人们发现 Kai 蛋白的降解对 TTFL 循环的保持是必需的。在蛋白酶体活性被抑制时, TTFL 和 NTO 的节律输出都会被阻止,但是在 TTFL 被敲除情况下,蛋白酶体活性被抑制时并不会对 Prx 振荡节律产生影响(van Ooijen et

al., 2011)。黑莓菌中的研究报道则显示, TTFL 敲除株存在短时间的 *prx* 钟节律修复事件;与之类似,果蝇在 TTFL 敲除的情况下, Prx 节律仍然会存在较长时间。这些事实都表明在 TTFL 与 NTO 相互耦合时,蛋白酶体则会同时抑制这两个节律性保持机制;而 TTFL 与 NTO 非耦合的情况下, NTO 时间保持机制是与蛋白酶体相互独立的,在 TTFL 振荡存在却被干扰的情况下, NTO 会部分补偿其振荡节律;而 TTFL 振荡完全缺失时, NTO 能独立地维持节律性振荡,并与 TTFL 振荡相耦合。遗憾的是这一过程的详细的机制目前仍然未知(van Ooijen and Millar, 2012)。

5 展望

近年来随着研究技术与方法的进步,蓝藻生物钟研究也已经取得了非常大的进展,同时也激起了更多研究者对生物钟现象的深入研究与兴趣。越来越多的生物钟模型假说也得以提出和验证,如蓝藻生物钟核心震荡器的 Kai 蛋白的磷酸化旋转模型假说等。之后研究者们发现,在蓝藻细胞中其生物钟核心震荡器的运转不需要依赖于转录-翻译水平的调控,而仅需在翻译后水平上对 KaiC 磷酸化进行调控即可产生和输出生物钟节律性信息。大量的实验数据显示,蓝藻的生物钟分子调控过程是一个复杂的网络系统,目前仍存在许多问题需要进一步的研究和探讨。除此之外,有研究者相信蓝藻的内源生物钟系统在进化上并非是单一起源的,并且有可能是整个生命界生物钟系统进化中至关重要的环节。由于与高等真核生物相比,蓝藻细胞起源较早,被公认为是叶绿体进化的源头,蓝藻生物钟可能在系统发生上与一些植物生物钟系统存在内在联系,事实上许多叶绿体基因组所编码的基因也具有钟控制的节律性表达特征(Nakahira et al., 1998)。还有人推测在原始的植物细胞中 *kai* 基因可能与光合作用基因发生了整合。如果该推论正确的话,那么在蓝藻中许多未知的生物钟调控环节就有可能与真核生物中时间保持机制具有类似性。

近几年来,水体污染严重,在赤潮水华爆发中铜绿微囊藻是最典型的,水华对我们经济发展与日常生活带来巨大的威胁,使生态环境受到巨大破坏。昼夜节律现象同样存在于铜绿微囊藻中,进一步对其生物钟机制进行研究将有可能从这方面入手进行相关的生态污染防治工作(Sato et al., 1996)。由于 NTO 节律的发现,使得人们对生物钟有了更深一层的认识,有一种假说认为,细胞内应该存在一种保守的

NTO, 可以借助于蛋白激酶的磷酸化作用或其它酶的修饰作用来驱动 TTFL 蛋白的节律性产生与维持, 而后处于节律性修饰状态的 TTFL 蛋白又可以通过输出节律性信息的方式操纵细胞内每天发生的转录节律性重编程事件。在哺乳动物中新发现的非转录依赖生物节律与细胞的新陈代谢节律性、细胞质循环节律性等生理事件间存在内在关联的研究结果让我们对“在蓝藻中是否也存在这样的关系”这一问题产生了浓厚兴趣。因为蓝藻细胞中的非转录依赖生物节律性保持机制在能够维持 24 h 循环生物钟节律信息的同时, 还存在其它一些方面的未知功能 (Rey and Reddy, 2013)。

综上所述 蓝藻的钟基因表达的调控是复杂的, 多循环系统共同相互作用的一个过程, 依赖于转录翻译调控的和依赖于转录后翻译调控的时间保持机制间存在潜在的相互作用, 有许多相关分子机制的调控细节尚有待于进一步研究探讨。

作者贡献

李青雁撰写论文并完成资料的整理汇总; 庞雨彤完成规划内容的选择编辑; 李小龙和张芳完成资料的搜寻, 霍宇鹏参与搜集资料的分析讨论, 赵宇玮负责资料筛选, 并参与论文写作。

致谢

本研究受到国家自然科学基金项目(31200091 和 J1210063)、陕西省重点实验室科研计划项目(2010JS092 和 12JS104)、陕西省教育厅科学研究项目计划(2010JK855)、公益性行业(农业)科研专项经费项目(201203062)、陕西省大学生创新计划项目和西北大学大学生创新计划项目共同资助, 特此表示感谢。

参考文献

Asher G., Gatfield D., Stratmann M., Reinke H., Dibner C., Kreppel F., Mostoslavsky R., Alt F.W., and Schibler U., 2008, SIRT1 regulates circadian clock gene expression through PER2 deacetylation, *Cell*, 134(2): 317-328

Dvornyk V., Vinogradova O., and Nevo E., 2003, Origin and evolution of circadian clock genes in prokaryotes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100(5): 2495-2500

Ederly I., 2000, Circadian rhythms in a nutshell, *Physiol. Genomics*, 3(2): 59-74

Edgar R.S., Green E.W., Zhao Y., van Ooijen G., Olmedo M., Qin X., Xu Y., Pan M., Valekunja U.K., Feeney K.A., Maywood E.S., Hastings M.H., Baliga N.S., Meroow M., Millar A.J.,

Johnson C.H., Kyriacou C.P., O'Neill J.S., and Reddy A.B., 2012, Peroxiredoxins are conserved markers of circadian rhythms, *Nature*, 485(7399): 459-464

Garces R.G., Wu N., Gillon W., and Pai E.F., 2004, Anabaena circadian clock proteins KaiA and KaiB reveal a potential common binding site to their partner KaiC, *EMBO J.*, 23(8): 1688-1698

Golden S.S., 2003, Timekeeping in bacteria the cyanobacterial circadian clock, *Current Opinion in Microbiology*, 6(6): 535-540

Golden S.S., Johnson C.H., and Kondo T., 1998, The cyanobacterial circadian system: A clock apart, *Curr. Opin. Microbiol.*, 1(6): 669-673

Ishiura M., Kutsuna S., Aoki S., Iwasaki H., Andersson C.R., Tanabe A., Golden S.S., Johnson C.H., and Kondo T., 1998, Expression of a gene cluster *kaiABC* as a circadian feedback process in *Cyanobacteria*, *Science*, 281(5382): 1519-1523

Iwasaki H., Williams S.B., Kitayama Y., Ishiura M., Golden S.S., and Kondo T., 2000, A KaiC-interacting sensory histidine kinase, SasA, necessary to sustain robust circadian oscillation in cyanobacteria, *Cell*, 101(2): 223-233

Katayama M., Tsinoremas N.F., Kondo T., and Golden S.S., 1999, *cpmA*, a gene involved in an output pathway of the cyanobacterial circadian system, *Bacteriol.*, 181(11): 3516-3524

Kucho K.O., Okamoto K., Tsuchiya Y., Nomura S., Nango M., Kanehisa M., and Ishiura M., 2005, Global analysis of circadian expression in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803, *Bacteriol.*, 187(6): 2190-2199

Kutsuna S., Kondo T., Aoki S., Aoki S., and Ishiura M., 1998, A period-exender gene, *pex*, that extends the period of the circadian clock in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC7942, *J. Bacteriol.*, 180(8): 2167-2174

Li J.C., Yu D., Wang F., and He Y., 2004, Advances in studies of biological clock gene, *Yichuan (Hereditas)*, 26(1): 89-96 (李经才, 于多, 王芳, 何颖, 2004, 生物钟基因研究新进展, 遗传, 26(1): 89-96)

Lin S.Y., and Li S.B., 2006, Progress in molecular mechanisms of circadian clock in *Cyanobacteria*, *Shengwu Huaxue Yu Shengwu Wuli Jinzhan (Progress in Biochemistry and Biophysics)*, 33(8): 719-723 (林少苑, 李淑彬, 2006, 蓝藻生物钟分子机理的研究进展, 生物化学与生物物理进展, 33(8): 719-723)

Nair U., Ditty J.L., Min H., and Golden S.S., 2002, Roles for sigma factor singlobal circadian regulation of the cyanobacterial genome, *Bacteriol.*, 184(13): 3530-3538

Nakahata Y., Kaluzova M., Grimaldi B., Sahar S., Hirayama J., Chen D., Guarente L.P., and Sassone-Corsi P., 2008, The NAD⁺ dependent deacetylase SIRT1 modulates clock-mediated chromatin remodeling and circadian control, *Cell*, 134(2): 329-340

Nakahira Y., Katayama M., Miyashita H., Kutsuna S., Iwasaki H., Oyama T., and Kondo T., 2004, Global gene repression by KaiC as a master process of prokaryotic circadian system,

- Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 101(3): 881-885
- Nakahira Y., Baba K., Yoneda A., Shiina T., and Toyoshima Y., 1998, Circadian-regulated transcription of the *psbD* light-responsive promoter in wheat chloroplast, *Plant Physiol.*, 118(3): 1079-1088
- Nakajima M., Imai K., Ito H., Nishiwaki T., Murayama Y., Iwasaki H., Oyama T., and Kondo T., 2005, Reconstitution of circadian oscillation of cyanobacterial KaiC phosphorylation *in vitro*, *Science*, 308(5720): 414-415
- Nishiwaki T., Satomi Y., Nakajima M., Lee C., Kiyohara R., Kageyama H., Kitayama Y., Temamoto M., Yamaguchi A., Hijikata A., Go M., Iwasaki H., Takao T., and Kondo T., 2004, Role of KaiC phosphorylation in the circadian clock system of *Synechococcus elongatus* PCC 7942, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101(38): 13927-13932
- O'Neill J.S., and Reddy A.B., 2011, Circadian clocks in human red blood cells, *Nature*, 468(7331): 498-503
- O'Neill J.S., van Ooijen G., Dixon L.E., Troein C., Corellou F., Bouget F.Y., Reddy A.B., and Millar A.J., 2011, Circadian rhythms persist without transcription in a eukaryote, *Nature*, 468(7331): 554-558
- Pattanayek R., Wang J., Mori T., Xu Y., Johnson C.H., and Egli M., 2004, Visualizing a circadian clock protein crystal structure of KaiC and functional insights, *Molecular Cell*, 15(3): 375-388
- Pattanayek R., Williams D.R., Rossi G., Weigand S., Mori T., Johnson C.H., Stewart P.L., and Egli M., 2011, Combined SAXS/EM based models of the *S. Elongates* post-translational circadian oscillator and its interactions with the output His-kinase SasA, *PLoS One*, 6(8): e23697
- Qin X., Byrne M., Xu Y., Mori T., and Johnson C.H., 2010, Coupling of a core post-translational pacemaker to a slave transcription/translation feedback loop in a circadian system, *PLoS Biology*, 8(6): e1000394
- Rey G., and Reddy A.B., 2013, Connecting cellular metabolism to circadian clocks, *Trends in cell biology*, 23(5): 234-241
- Rutter J., Reick M., and McKnight S.L., 2002, Metabolism and the control of circadian rhythms, *Annual Review of Biochemistry*, 71(1): 307-331
- Sato M., Shibato J., Aida T., Asayama M., and Shirai M., 1996, Light-responsive and rhythmic gene expression of *psbA2* in cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* K-81, *Journal of General and Applied Microbiology*, 42(5): 381-391
- Schmitz O., Katayama M., Williams S.B., Kondo T., and Golden S.S., 2000, CikA, A bacteriophytochrome that resets the cyanobacterial circadian clock, *Science*, 289(5480): 765-768
- Schultz T.F., and Kay S.A., 2003, Circadian clocks in daily and seasonal control of development, *Science*, 301(5631): 326-328
- Shiura M., Kutsuna S., Aoki S., Iwasaki H., Andersson CR., Tanabe A., Golden S.S., Johnson C.H., and Kondo T., 1998, Expression of a clock gene cluster *kaiABC* as a circadian feedback process in cyanobacteria, *Science*, 281(5382): 1519-1523
- Taniguchi Y., Katayama M., Ito R., Takai N., Kondo T., Oyama T., 2007, *labA*: A nevol gene required for negative feedback regulation of the cyanobacterial circadian clock protein KaiC, *Genes Dev.*, 21(1): 60-70
- Taniguchi Y., Takai N., Katayama M., Kondo T., and Oyama T., 2010, Three major output pathways from the KaiABC-based oscillator cooperate to generate robust circadian *kaiBC* expression in cyanobacteria, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107(7): 3263-3268
- Tomita J., Nakajima M., Kondo T., and Iwasaki H., 2005, No transcription-translation feedback in circadian rhythm of KaiC phosphorylation, *Science*, 307: 251-254
- Vakonakis I., Klewer D.A., Williams S.B., Golden S.S., and Li-Wang A.C., 2004, Structure of the N-terminal domain of the circadian clock-associated histidine kinase SasA, *Journal of Molecular Biology*, 342(1): 9-17
- van Ooijen G., and Millar A.J., 2012, Non-transcriptional oscillators in circadian timekeeping, *Trends in Biochemical Sciences*, 37(11): 484-492
- van Ooijen G., Dixon L.E., Troein C., and Millar A.J., 2011, Proteasome function is required for biological timing throughout the twenty-four hour cycle, *Current Biology*, 21(10): 869-875
- Vijayan V., and O'Shea E.K., 2013, Sequence determinants of circadian gene expression phase in cyanobacteria, *Journal of Bacteriology*, 195(4): 665-671
- Wood T.L., Bridwell-Rabb J., Kim Y.I., Gao T., Chang Y.G., Li-Wang A., Barondeau D.P., and Golden S.S., 2010, The KaiA protein of the cyanobacterial circadian oscillator is modulated by a redox-active cofactor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107(13): 5804-5809
- Xu H., and Zhang J., 2004, Research developments on molecular mechanisms of circadian clock in *Cyanobacteria*, *Marine Sciences*, 28(7): 61-66 (徐虹, 章军, 2004, 蓝藻生物钟分子机制研究进展, *海洋科学*, 28(7): 61-66)
- Ye S., Vakonakis I., Ioerger T.R., Li-Wang A.C., and Sacchettini J.C., 2004, Crystal structure of circadian clock protein Kai A from *Synechococcus elongates*, *Journal of Biological Chemistry*, 279(19): 20511-20518
- Zhang X., Dong G., and Golden S.S., 2006, The pseudo-receiver domain of CikA regulates the cyanobacterial circadian input pathway, *Molecular Microbiol.*, 60(3): 658-668
- Zheng J.Q., Xu H., Zhang J., Wang J., and Zhu B.L., 2006, Study on self-interaction of clock protein KaiB of *Microcystis aeruginosa* by yeast two hybrid, *Haiyang Kexue (Marine Sciences)*, 30(8): 41-45 (郑锦乾, 徐虹, 章军, 王靖, 朱斌琳, 2006, 利用酵母双杂交研究铜绿微囊藻生物钟蛋白 KaiB 的自身相互作用, *海洋科学*, 30(8): 41-45)
- Zhou X.J., Yuan C.Y., Yang X.K., and Guo A.K., 2005, Progress in molecular mechanisms of circadian rhythm in *Drosophila*, *Shengwu Huaxue Yu Shengwu Wuli Jinzhan (Progress in Biochemistry and Biophysics)*, 32(1): 3-8 (周先举, 袁春燕, 杨旭科, 郭爱克, 2005, 果蝇昼夜节律的分子机制研究进展, *生物化学与生物物理进展*, 32(1): 3-8)