

生物钟基因研究新进展

李经才,于多,王芳,何颖

(沈阳药科大学时间生物学研究室,沈阳 110016)

摘要:生物钟基因普遍存在于生物界,其作用在于产生和控制昼夜节律的运转。生物钟基因及其编码的蛋白质组成反馈回路,维持振荡系统持续进行并与环境周期保持同步。各级进化水平物种生物钟的基因组和控制途径有同有异。此文主要介绍蓝细菌、脉孢菌、果蝇、鼠和人昼夜钟的分子运作机制以及研究钟基因的意义和展望。

关键词:昼夜节律;钟基因;反馈回路

中图分类号:Q811.213

文献标识码:A

文章编号:0253-9772(2004)01-0089-08

Advances in Studies of Biological Clock Gene

LI Jing-Cai, YU Duo, WANG Fang, HE Ying

(Chronobiology Laboratory, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

Abstract: The circadian clock genes, which generate and control the running of the circadian rhythms, exist in organisms ranging from prokaryotes to mammals. The oscillator genes and its coding proteins compose the feedback loops of circadian system. The kind, number and regulating route of clock genes are characterized by living things at different evolution levels. The molecular mechanism of the run of circadian clock genes in cyanobacteria, neurospore, fruit fly, mouse and human being is introduced in this article.

Key words: circadian rhythm; clock genes; feedback loop

生物节律广泛存在于生物界,从某些原核单细胞有机体、低等生物、高等动植物直至人类的生命活动都是在生物钟控制下进行的。其中以昼夜钟(circadian clock)研究最深入,本文将重点论述。多细胞生物可分为母钟(主钟、中枢钟)和子钟(外周钟、细胞钟)。前者位于中枢部位,进化不同阶段的生物,母钟所在位置不同。业已证实,哺乳动物的母钟位于下丘脑视交叉上核(suprachiasmatic nucleus, SCN),由此发出信息控制全身的节律活动;子钟位于组织细胞内,调控效应器的节律。生物钟是机体固有的,具有内源性和自我维持运转的特点,在无外界环境信号的作用时,依然以近于24小时周期自激(free running)进行。在自然状态下,生物钟接受外界光-暗和温度等周期信号,调整自身的位相,与外界环境保持同步^[1,2]。近十余年来,钟基因分离、鉴定并克隆成功,在分子水平上阐明生物钟机制的研究,突飞猛进,获得巨大进展,举世瞩目。

昼夜钟可分3个部分:(1)生物振荡器(oscillator),由一组呈节律表达的基因及其编码的蛋白质组成。节律基因启

动后,经转录、翻译生成相应的蛋白质。当此蛋白质浓度达到一定程度,反馈作用于自身基因的启动部位,使其浓度高低以24小时周期进行振荡^[3]。在昼夜振荡反馈回路中,正性成分(positive element),启动生物钟基因,使之进行表达;负性成分(negative element),阻断正性成分的作用,使表达减弱或停止^[4],如图1所示。振荡器是生物钟运作的核心元件,它收外界传入的信号,引起相应的基因表达,进而控制钟信号的输出路径,使生物体展现昼夜节律活动;(2)输入系统,接受环境周期信号传入到振荡器,调节相关基因的表达,矫正节律位相,由感受器和传入路径组成。最重要的授时因子(Zeitgeber)为光-暗和温度;(3)输出系统,包括与信号输出有关的钟基因和一些钟控基因(clock-controlled genes, CCG),将母钟节律振荡信号,经体液和神经途径送达效应器,调节其生理、生化和行为的昼夜节律^[5]。

研究钟基因的方法很多。最初采用单基因突变法,使用致突变剂,如ENU(N-乙基-N-亚硝基脲),尔后用基因敲除法,观察突变后机体行为周期的长度或节律发生某种障碍,

以确定该基因起什么作用。其次,用免疫组化、原位杂交或荧光素酶法,测定基因转录与翻译前后 mRNA 和蛋白质含量的变化。亦可采用分离、鉴定、克隆某个机能基因,以了解

其对昼夜钟的影响。近年用离体组织或细胞系进行体外培养,研究外周钟的基因组成和反馈调节方式,已取得有益的成果。

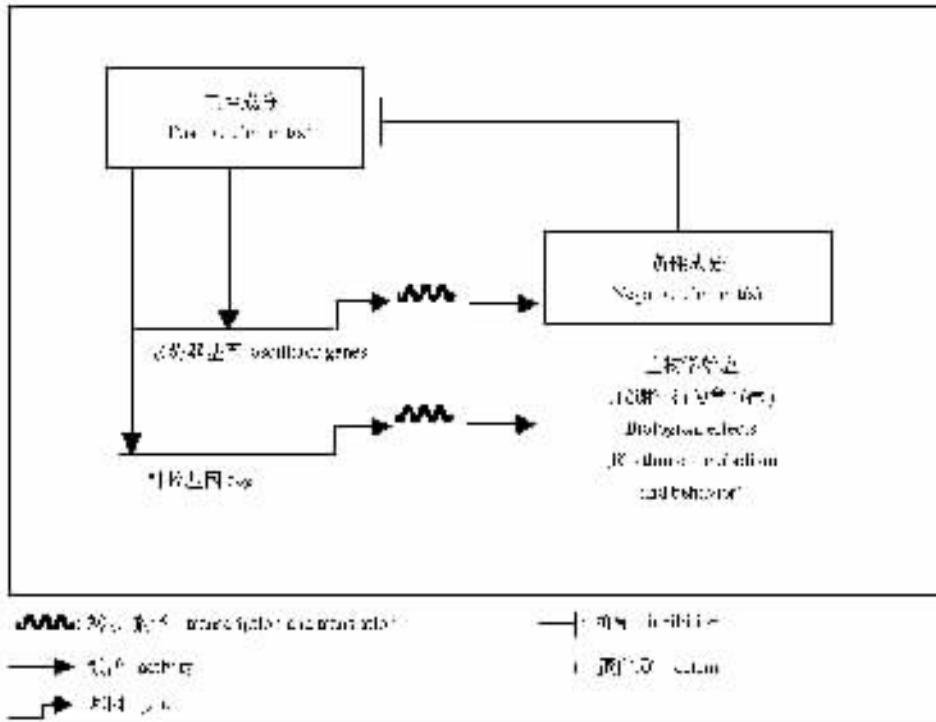


图1 生物钟基因反馈调节示意图

Fig. 1 A scheme of autoregulatory biological clock gene

在系统研究多细胞生物的昼夜钟时发现,同一基因在不同种类生物亦可能存在,为示区别常在其前冠以一符号。如 *clock* 基因在果蝇写作 *Dclock*、小鼠为 *Mclock*、大鼠为 *Rclock*、人为 *HCLOCK*。生物在进化过程中钟的结构逐渐复杂,功能也日臻完善。本文拟从蓝细菌、脉孢菌、果蝇、小鼠和人的昼夜钟基因的运作规律进行阐述,以了解国际科学界在这个领域研究的新进展和开展此项工作的重要意义。

1 蓝细菌

行光合作用的蓝细菌 *Synechococcus elongatus* 为原核单细胞有机体,是已知具有昼夜节律最简单的生物。Ishiura 证明^[6],蓝细菌的 3 个基因 *kaiA*、*kaiB*、*kaiC* 在 DNA 片段中成簇排列,其编码的蛋白质,相互作用形成自动调节的反馈回路,是此物种昼夜钟的主要振荡器。其运转过程是:3 个 *kai* 基因经转录、翻译生成相应蛋白质,KaiA 蛋白属于阳性成分,作用于 *kaiBCp* 的启动子 *kaiBCp*,增强 *kaiB* 和 *kaiC* 的活性。当生成的 KaiC 属于阴性成分,当其浓度达到一定水平,负反馈作用于 *kaiBCp*,切断 *kaiB*、*kaiC* 基因转录,使这一回路终止。实验表明^[7],KaiA 蛋白的水平一般比较恒定,而 KaiB 和 KaiC 的含量则呈现明显的昼夜节律。其中 *kaiC* 对

维持昼夜振荡起主要作用。KaiC 蛋白生成后逐渐磷酸化而降解,解除对 *kaiBCp* 的抑制,基因的转录和翻译得以重新启动,从而产生往复振荡,如图 2 所示^[4,8]。

应当指出的是 3 种基因任何一个失活 (inactivation), 均可以引起蓝细菌的 *kaiBCp* 活性下降,乃至昼夜节律消失。另一方面,*kaiC* 持续地过度表达,则抑制启动子 *kaiBCp*,而 *kaiA* 的过度表达可提高 *kaiBCp* 活性;瞬时 *kaiC* 过度表达可引起节律位相发生偏移。Mori 等^[9] 研究钟基因与细胞分裂的关系,发现敲除 *kaiC*,则钟基因表达和细胞分裂的节律消失。若使 *ftsZ* 基因过度表达,蓝细菌细胞分裂停止而生长继续,形体变为细丝状,但仍然保持着明显的昼夜节律。表明蓝细菌的昼夜系统是稳定和自我维持的,不因细胞生存条件变化而改变。

蓝细菌 *kai* 基因发生突变可产生许多变异个体,其昼夜节律的周期和位相发生不同程度的改变。在 3 种 Kai 蛋白的分子结构中,未能发现 DNA 结合结构域 (domain),但在 KaiC 启动子中有核苷酸 ATP/GTP 的结合位点。当定向诱发此位点突变时,ATP 结合降低,*kaiB*、*kaiC* 表达的昼夜节律消失。

研究表明,在蓝细菌中可能还有某种或某几种蛋白质协助 Kai 蛋白完成昼夜系统的功能。蓝细菌以昼夜钟协调自

身的活动与自然界的温度及光一暗周期保持同步。Schmitz 等^[10]在输入通路中,发现一种细菌光敏色素-CikA 能感受光暗变化,当其编码基因 *cikA* 失活,使蓝细菌基因表达昼夜的周期缩短约两小时且使节律位相发生紊乱。氢代谢在蓝细菌至关重要。在钟的输出系统中,该作者^[11]又定量地分析了编码氢化酶的两个钟控基因-*hoxEF* 和 *hoxUYH* 的转录

与表达过程的节律变化。最近 Nair 等报道^[12],称为 Σ 因子的 4 个基因: *rpoD2*, *rpoD3*, *rpoD4* 和 *sigC*,其过度表达或失活均可影响钟控基因-*psbLI* 的节律变化,其作用在于传递昼夜节律信息给下游基因。看来此物种虽系单细胞结构,但其钟基因的调节机制并非如此简单。许多学者认为,蓝细菌生物钟的运作模式与真核生物有很多共性。

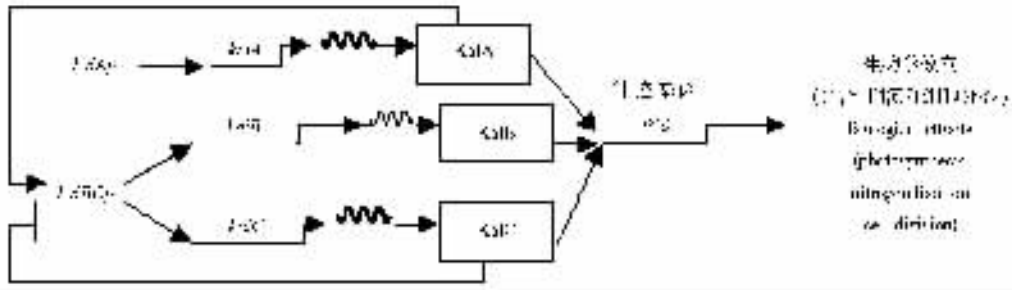


图 2 蓝细菌生物钟基因调节示意图

Fig. 2 Identify and regulation of circadian clock in the *Cyanobacteria*

2 脉孢菌

脉孢菌(*Neurospora crassa*)系真核单细胞生物,属于真菌类,光一暗周期和温度对其生命活动起重要调节作用。这种生物振荡器的中心成分是 *frequency* (*frq*) 基因。其产物蛋白 FRQ 进入细胞核,通过负反馈作用阻遏 *frq* 继续转录,由此构成回路,这是脉孢菌振荡器运作的中心环节^[13]。FRQ 生成后,在酪蛋白激酶(CK II)的作用下不断磷酸化,其浓度逐渐下降,解除了对 *frq* 表达的反馈抑制,使其继续进行转录和翻译,以维持钟的振荡。Yang 等^[14]证明 CK II 基因受损,FGQ 磷酸化程度降低,其浓度上升。CK II 突变, *frq* mRNA、FEQ 蛋白和钟控基因的昼夜节律消失。

近来研究发现^[15], *white collar-1* (*wc-1*)、*white collar-2* (*wc-2*) 及其产物蛋白 WC-1、WC-2 在昼夜系统中也发挥重要作用。脉孢菌的生命活动受光一暗信号的影响与环境周期保持同步。蓝光调节其生理功能。业已证明^[16], WC-1 是蓝光受体,介导光波输入到 *frq* 基因的启动子, WC-2 在 *frq* 昼夜表达中也是必不可少的,它与 WC-1 形成异二聚体作为正性成分,使 *frq* 的转录量增加,维持振荡器 24 小时振荡。

在当日早晨脉孢菌 WC 异二聚体激活 *frq* 基因,开始转录,4 小时后 *frq* 的 mRNA 高峰出现。尔后被生成的 FRQ 蛋白阻遏,8 小时后降到较低水平,FGQ 逐渐达峰值, *frq* 表达被关闭。翌日黎明 *frq* 又被 *wc* 编码的正性成分激活,昼夜循环重新启动^[4]。研究表明, *wc-1* 是生物振荡器相关基因。接受并传递光波到振荡器及按光一暗周期校准生物钟的位相。WC-2 是振荡器组成成分,其产物在昼夜系统中确定周期长度和温度代偿方面起关键作用^[4]。

WC-1 和 WC-2 分子具有 Per-Snt-Sim(PAS) 结构域 (domain)^[17]。PAS 是蛋白质相互作用界面,也是感光作用和钟基

因集群作用的重要结构。钟蛋白以各自的 PAS 结构域相互作用而二聚化,调控基因的转录。下文将论述的多细胞生物的钟基因蛋白分子亦具此结构,且多一个 bHLH(碱性螺旋—环—螺旋)DNA 结合基。光受体与振荡器间可能通过 PAS 发生某些联系。在大多数有机体内对维持昼夜节律起重要作用。新近的研究发现^[18],一种控制脉孢菌对光反应的重要蛋白 VIVID。VIVID 含有 PAS 结构域,能与 WC-1 通过各自的 PAS 结构域相互作用,形成 VIVID:WC-1 复合物,阻断 WC-1:WC-2 复合物对 *frq* 的激动作用。 *vivid* 能够受光照诱导进行表达,同时也受控于 WC-1:WC-2 复合物。VIVID 阻断 WC-1:WC-2 复合物的活性,对自身进行调控。此外, VIVID 蛋白参与“门控”作用,即在昼夜循环的某一阶段使生物振荡器对光照不敏感。脉孢菌依据光照周期对生物钟进行校准,也需要 VIVID^[4]。脉孢菌昼夜钟运作模式,如图 3 所示。

如前所述,光是通过 WC-1:WC-2 复合物使 *frq* 转录, *frq* mRNA 和 FRQ 水平与日周期位相同步,打破 *frq* 水平,必将引起日周期长度的改变。光的瞬时作用,只有通过 WC-1 才能实现。在夜晚早期给予短时光照,脉孢菌日周期延长,这是由于此时 *frq* 水平处在下降阶段,光照促使生物钟返回到高峰期;反之,在黑夜晚期给予光照,日周期缩短。温度对脉孢菌的作用相似于光,但存在温度补偿。与光作用于 *frq* 的转录过程不同,温度主要是作用于 *frq* 的翻译过程。 *frq* 编码能生成两种 FRQ 蛋白:长链 FRQ(989 个氨基酸)和短链 FRQ(890 个氨基酸),这是由于蛋白质内部 ATG 密码子翻译的起点不同。低温时,有利于短链 FRQ 的生成,高温时有利于长链 FRQ 生成。这样,脉孢菌通过 FRQ 的数量和两种形式蛋白的比率实现温度代偿,即在一定温度范围维持昼夜节律的稳定^[4]。

在脉孢菌的输出系统中,已发现十余个钟控基因(*ccg*)。如 *ccg-4* 和 *ccg-6* 控制发育的昼夜节律, *con-6*、*con-10* 为分生孢

子的特异基因, *ccg-1*、*ccg-9*、*ccg-12* 调节应激反应的节律, *ccg-7* 在代谢的中心环节~糖酵解通路发挥重要作用。这些基因失

活昼夜钟依然运转,但某些生理活动会受到严重影响^[4]。有资料表明,振荡器在转录过程对这些基因进行调控。

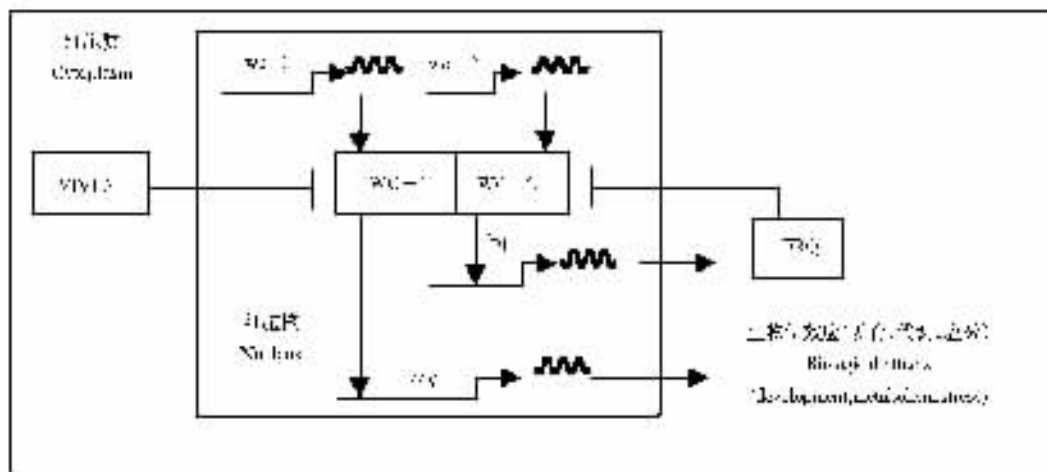


图3 脉孢菌生物钟基因调节示意图

Fig. 3 Identify and regulation of elements in the neurospora clock

上述是脉孢菌昼夜钟的基本运作模式。最近经详细研究表明,还有更多基因参与钟的活动,振荡器可能也不止一个^[19]。人类对生物钟基因的认识还在不断深入。

3 果蝇

黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)属于多细胞动物昆虫类,其蛹的羽化和成虫的运动活动均呈现昼夜节律。果蝇类钟基因的研究上世纪70年代初已开始,积累资料颇丰。已确认的主要钟基因有 *period* (*per*)、*timeless* (*tim*)、*Clock* (*Clk*)、*cycle* (*cyc*)、*double-time* (*dbt*)、*vri* (*vri*) 和 *cryptochrome* (*cry*) 等^[5]。果蝇的主钟由两簇神经元组成,位于脑部。以后研究发现,在其身体其他组织亦有钟结构^[4]。

per 是1993年首次被鉴定和克隆成功的钟基因,长10kb,可编码1200氨基酸的蛋白质,其中一个氨基酸被取代,就会使周期和转录循环发生改变。*per* 缺陷可改变生物节律。业已证实,它有3个变异的等位基因:长周期基因、短周期基因和无周期基因,分别使果蝇的周期长度变为28小时、19小时或无节律。我们现在对昼夜钟的认识是从 *per* 的结构、调节和产物开始的^[4]。*per* 是果蝇的主控基因,影响昼夜节律和超日节律。*per* 经转录和翻译后,形成PER蛋白,组成钟的反馈回路。但其须与另一种钟蛋白组成异二聚体后,才能作为负性成分发挥作用^[20]。

dbt 基因产物DBT是一种蛋白激酶,在细胞质内对PER进行磷酸化,使其稳定性降低,从而易于与TIM结合。二者结合为异二聚体后性能稳定,进入细胞核。

tim 是果蝇第二个被确证的生物钟基。它对 *per* 转录后调节,如细胞核内定位、蛋白质稳定性等方面发挥作用^[21]。

per 和 *tim* 在下午提高转录水平,黄昏时 mRNA 达高峰,PER和TIM蛋白的积累峰在6小时后出现,二者形成异二聚体进入核内,作为负性成分发挥作用。黎明后光使TIM降解,致使PER不稳定^[22],导致PER:TIM对CLOCK:CYC的抑制作用降低,开启新一轮的循环^[23]。时间生物学研究表明,光-暗周期可导引昼夜节律使其位相重调(reset)。在黑夜的早期给果蝇光照,使昼夜周期延长,由于此时 *tim* 的 mRNA 处于高峰期稳定,TIM被光解后可能迅速被新合成的TIM替补,系统推迟节律后再回到光照前的位点上;在夜间晚期给予光照,昼夜节律缩短,这可能由于大多TIM被光降解,此时正处于节律的低谷期,很少或无 *tim* mRNA 替补之故^[22]。

CLOCK和CYCLE(CYC)均为转录因子,分别是由 *Clk* 和 *cyc* 编码的蛋白,含有bHLH的PAS结构域。通常以异二聚体形式,发挥正性调节作用。*per* 和 *tim* 两种基因启动子的E-框是其作用的目标靶。CLOCK:CYC异二聚体,激活 *per*、*tim* 基因转录,生成PER和TIM两种蛋白。而且也激活 *vri*、*pdf*、*cgc* 等基因生成蛋白质或引起相应生物学效应^[24](见图4)。

CLK也呈节律表达。*Clk* 或 *cyc* 单基因突变,*Clk* mRNA水平上调,*per* 突变下调 *Clk* mRNA,*per* 和 *dClk* 或 *cyc* 双突变,上调 *dClk* mRNA。*Clk* 和 *cyc* 发生突变可使 *per*、*tim* 的表达降低,果蝇的生物钟变为无节律。研究表明,CLK可作为自身的抑制剂^[25]。Glossop^[26]认为有独立于PER、CLOCK、CYC的 *Clk* 激动物存在。由此可见,果蝇的生物钟有两个反馈回路:*per-tim* 回路,由CLK:CYC激活,受PER:TIM抑制;*dClk* 回路,由dCLK:CYC抑制,由PER:TIM降低dCLK:CYC的抑制作用。

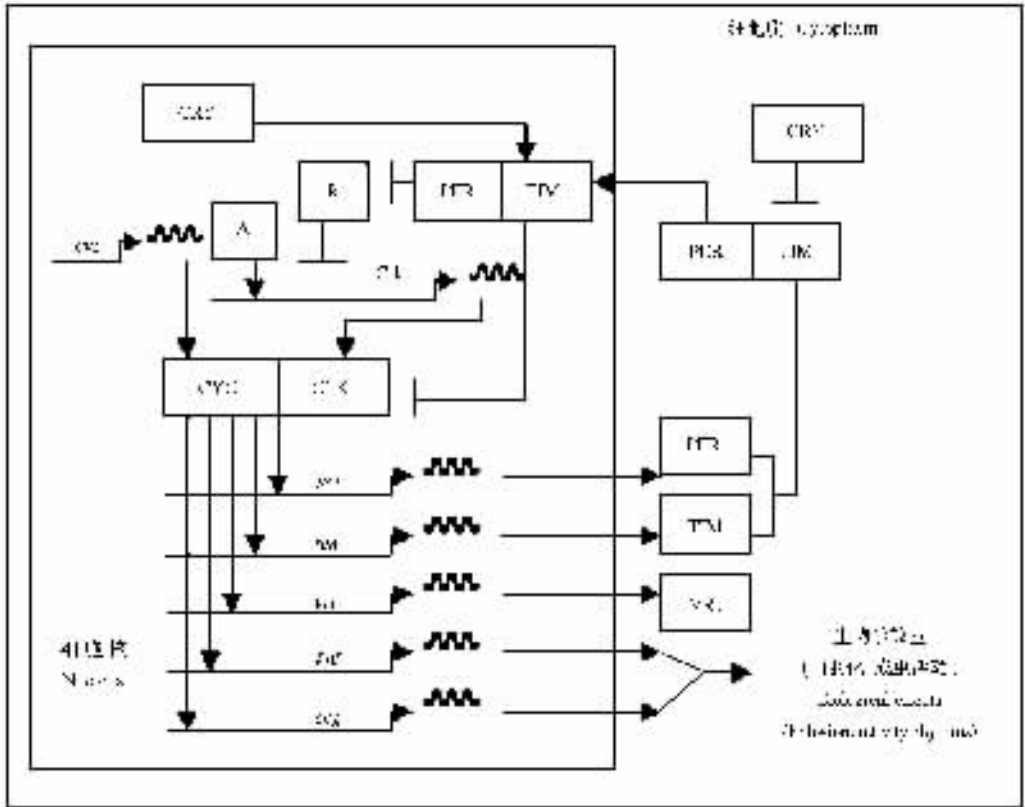


图4 果蝇生物钟基因调节示意图

Fig.4 Identify and Regulation of Elements in the *Drosophila* Oscillator clock



另外,最近又发现一种 *vri* 基因^[4],*vri* 的 mRNA 在腹背神经元(LNs)和光受体细胞上进行表达。dCLOCK : CYC 依赖的 *per* 激活机制同样运用于 *vri*,证明 *vri* 有 E-框靶序列。VRI 剂量减半,果蝇运动活动周期缩短一小时;*vri* 振荡的破坏打破其他基因产物如 TIM 等的正常循环,说明 VRI 可能是生物振荡器的中心成分之一。

隐色素(CRYPTOCHROME,CRY)是由 *cry* 基因编码的一种黄素蛋白。作为光受体,接受光波并将其传递到振荡器的钟基因。Fernanda 等研究表明^[27],CRY 接受光信号刺激后,发生光化学变化,在胞浆和细胞核内直接与 TIM 发生光依赖性结合,促使 PER : TIM 复合物失活,从而终止其在反馈回路中的作用。果蝇的 *cry* 基因突变成 *cryb* 后,突变体脑的昼夜钟仍表现正常的昼夜节律,但外周钟则变为无节律。提示中枢钟与外周钟的机制不同^[28],果蝇的光受体可能不止 CRY 一种。神经元的振荡器还可从其他输入途径获得光信号。

在果蝇昼夜钟的输出系统中,除 *cgg* 基因外,还有色素分散因子(pigment-dispersing factor,PDF)调节其行为的节律性活动。无 *pdf* 编码 PDF 的果蝇,在正常光暗条件下,能够与环境周期保持一致,而在夜里其活动高峰期则比野生型果蝇提前一个小时;在连续黑暗条件下昼夜钟自激运转,

50%~98%的果蝇表现节律失常^[29]。

4 哺乳类(小鼠、地鼠和人类)

哺乳动物的主钟位于下丘脑视交叉上核,其运作模式仍然是:钟基因转录(包括转录后一翻译),生成钟蛋白,构成自动调节的反馈回路。与前述生物不同的是,参与钟的功能基因更多,调节途径更为复杂。

在小鼠和人体内也发现类似于果蝇的 *per* 基因,二者均含有保守的 PAS 结构域^[4]。小鼠的 *mper*(约 16kb,有 23 个外显子序列)演化为 3 个基因,均为负性调节成分,它们在表达部位和时相上存在着差异。*Per1* 的产物主要在外周钟和主钟及其输出通路上发挥作用,mRNA 呈现明显昼夜节律,在 SCN 其峰值于光照开始后 4 小时(CT4),在视网膜和外周组织于 CT10 出现。*per2* 的主要作用在主钟。*per3* 主要在输出通路及在胚胎期起作用。Lauren 认为^[30],mPER1 可能起到稳定反馈回路中蛋白质成分的作用;mPER2 正性驱动 *Bmal1* 基因转录,形成 BMAL1 回路;CCG 及 PER3 主要是作为输出信号。连续黑暗条件下小鼠 *mper2* 突变缩短了昼夜节律,随后就是生物钟节律性消失,PER2 在体外可对 *mper1* 进行调节,研究表明 mPER2 是生物钟的主要成分之

一,正性地调节节律性基因的表达^[31]。目前,已经确证人类有3种PER蛋白(hPER1、hPER2、hPER3)。后又发现,7号染色体上的一段单拷贝基因序列的产物与PER家族具有相似性,现已确证为hPER4^[32]。

果蝇*dbt*是鼠TAU的同源基因,它编码的是酪蛋白激酶CKIε(DBT)。果蝇PER、TIM二聚体不被BDT修饰,迁移到细胞核内,抑制*per*、*tim*基因转录。但TIM降解后,DBT可对PER作用。这一作用也同样发生在哺乳动物体内^[5]。

果蝇*tim*是生物钟基因的主要成分之一,在鼠和人体内也找到了果蝇*tim*的同源基因,分别称为mTIM和hTIM),但其功能发生变化^[33]。鼠的TIM蛋白可在体外抑制CLOCK:BMAL1介导的转录,但不能将mPER由胞浆转移到细胞核内,也不具有光敏性^[30]。研究认为,哺乳动物的*tim*基因,可能是新发现的果蝇*timout*基因(也称*tim-2*)的直向同源基因,果蝇*tim*基因的功能已经被哺乳动物其他相关的钟基因篡夺^[33]。mTIM在鼠SCN中高度表达,但节律很弱或无节律,而其在视网膜上却有节律性。小鼠CLOCK是第一个被分离并克隆的哺乳动物昼夜钟基因^[4],是果蝇相应基因的同源基因。它位于5号染色体,长约100kb,有24个外显子,其cDNA约10kb。哺乳动物CLOCK蛋白须形成异二聚体,才可驱动基因转录。但与果蝇有所不同,哺乳动物的CLOCK与BMAL1(MOP3)形成二聚体^[34],二者都含有bHLH-PAS结构域。CLOCK:BMAL1通过E-框驱动3种*per*基因(*per1*、*per2*、*per3*)和两种*cry*基因(*cry1*、*cry2*)转录^[35],生成的PER和CRY蛋白形成PER:CRY复合物,转移至细胞核内,作为哺乳动物昼夜钟反馈回路的调节成分^[30,32]。CRY蛋白作为负性调节成分,直接与CLOCK或BMAL1或其二者作用,抑制转录,形成另一个负反馈回路。也有人认为CRY1和CRY2的负反馈作用,是由于二者抑制活性强于任何PER蛋白。人类除hMOP3外,还有hMOP4及hMOP9(CLIF)两种转录因子家族成员,这两种蛋白在结构上分别与hCLOCK和hBMAL1相似,因hMOP4、BMAL1及CLOCK:hMOP9(CLIF)异二聚体在体外能通过E-框激活转录,hMOP4及hMOP9(CLIF)具有调节昼夜钟的作用^[32]。

*bmal1*的表达调控另一个回路:mPER2启动*Bmal1*转录翻译生成BMAL1蛋白。BMAL1具有节律性,有助于CLOCK与BMAL1形成异二聚体,以便在恰当的昼夜时间启动*per*、*cry*基因转录,而*per*的产物蛋白之一mPER2又可以推动下一轮循环^[30]。

CRY是植物蓝光受体,因此有人将CRY作为哺乳动物生物钟的光受体。近来研究^[36]发现,小鼠CRY基因分布在多个组织;mCRY2基因在中枢和外周视网膜高度表达,mCRY1基因在SCN高度表达。由此认为哺乳动物的*cry*还有导引节律同步的功能。*mcry2*被敲除,降低了SCN中mPER1对光波的敏感性,使周期较正常延长1小时^[37],这表明*cry*在哺乳动物昼夜钟的调节中发挥光导引用。连续黑暗条件下,CRY1缺陷的大鼠转轮运动的周期缩短,CRY2缺陷的大鼠转轮周期延长^[38]。而CRY1、CRY2双缺陷的大鼠昼夜节律失常。Lauren^[30]证明CRY1和CRY2是核内蛋白,

不依赖于PER、TIM或两者复合物,抑制CLOCK:BMAL1诱导的转录。在CRY1、CRY2双缺陷的大鼠中,光诱导昼夜位相移动不能完成,这表明CRY1和CRY2在光诱导的生物钟相移动中是不可少的。由此可认为,CRY在哺乳动物中既是光受体又是振荡器的组成部分^[39,40]。

TAU是哺乳动物昼夜基因另一研究热点。1988年发现叙利亚地鼠TAU突变。突变鼠的睡眠-觉醒周期由24缩短到20小时。体外培养该鼠的视网膜,其中褪黑素(MT)的合成节律可维持正常,但TAU缺陷地鼠的视网膜中MT合成昼夜节律周期的缩短了4小时^[41]。TAU定位于小鼠的15号染色体、人的22号染色体,它是果蝇DBT的同系物。研究表明,哺乳动物体内TAU基因编码的酪蛋白激酶CKIε可掩蔽PER细胞核内的定位信号和降解,有利于PER磷酸化、细胞核内迁移及PER转录的抑制。

在哺乳动物,光照可诱导一系列立早基因的表达^[42],如*c-FOS*、*NGFI-A*、*JUN-B*等的产物蛋白皆可作为转录因子,调控其下游的钟控基因。最近Cheng等^[43]发现CK2基因及其受体,其作用限于SCN内,能将输出到靶器官的信号与主钟保持同步。输出系统与振荡器的联系正逐步被揭示。

最近研究发现,机体的心、肺、肝、肾等外周器官和离体培养细胞(如鼠成纤维细胞)均有钟基因和昼夜振荡器存在,且其活动方式与主钟相似。如大鼠心脏细胞^[44]的钟基因有:*bmal*、*clock*、*cry1*、*cry2*、*per1*、*per2*、*per3*、*dbp*、*hlf*、*tef*等,不但调节局部组织的昼夜节律且与病理变化有关。

5 结束语与展望

生物节律普遍存在于生物的各级水平,是生命科学的重要基础理论问题。由于钟基因的发现和活动规律的揭示,使这问题的研究获得突破性进展。昼夜系统由一系列钟基因及其编码的蛋白质组成,彼此相互作用,构成一个或多个反馈回路,以近于24小时的周期进行振荡。光受体接受光-暗周期信号,经输入系统到达振荡器,再通过输出系统的基因及钟控基因,调节效应器的活动并与环境周期保持同步,这是不同种类生物的生物钟运作的普遍分子机制^[44]。业已证明,外周器官的子钟(细胞钟)的基因种类和振荡模式与母钟基本相似^[45,46]。

不同物种的昼夜钟基因,在亿万年间适应环境的过程中,经自然选择,被保存下来,使生物在地球上得以生存和发展。尽管不同等级物种的运作模式有所区别,但研究表明,从果蝇到哺乳动物的钟基因有如下特征。(1)同源性^[5,47]:如鱼、蛙、小鼠和人等物种的*per*、*tim*、*clk*、*cyc*、*vri*、*cry*和*dbt*7个钟基因均来源于果蝇昼夜钟的相应基因。爪蟾视网膜CRY蛋白氨基酸的排列顺序,85%与小鼠的相应蛋白相似,表明两者有类似的功能。(2)分化性^[48]:随着进化,机体机能结构逐渐复杂,一个同源基因可演变成几个基因,如果蝇的PER在人分为*hPER1*、*hPER2*、*hPER3*和*hPER4*共4个基因。(3)结构多态性^[49]:基因的某些核苷酸可发生一定的变异而使表型呈现多种形态,表达后行为节律出现差异。如*mPER3*的6个氨基酸发生变化可导致睡眠时相延迟症。

粗糙脉孢菌钟基因突变型对野生型呈不完全显性,其昼夜周期长度有很大差异^[50]。(4)基因结构保守性^[51]:随着千万年的进化基因结构变化不大,如真核生物的钟蛋白均具有 PAS 结构域。基因的研究对深入了解生物钟运作的分子机制和在微观世界阐明生物进化的规律有重要的理论意义。

在应用方面,生物钟基因的研究有助于对遗传性疾病的了解。钟基因突变可使机体昼夜周期延长或缩短,从而造成机体与环境失同步,导致精神性疾病,如精神分裂症、双极症、抑郁症和季节性情绪障碍等。通过基因改造治疗遗传病是一条新的医疗途径^[52]。利用基因结构的多态性可分析病理病因,如人 *hPER3* 基因中的一种单倍型与睡眠时相延迟症有关。而家族性睡眠时相提前征与 *hPER2* 磷酸化位点突变有关。有实验证明,同步因子光周期频繁改变,影响钟基因(或相关基因)表达,使动物的寿命缩短。施用褪黑素可以矫正这种作用,使生存期恢复正常乃至有所延长^[53,54]。最近发现,医疗用某些药物也可能对生物钟(中枢和外周)基因造成损害,如 α 干扰素可影响钟基因 mRNA 的表达,而对机体产生不利因素影响^[55],此乃药物副作用的一种新类型。

生物钟基因运作机制的深入研究,对揭示生命节律性活动的本质、生物进化的分子基础和开拓遗传学研究新领域具有重要意义。可为医疗保健和农牧业生产实践,提供新的理论依据。

参 考 文 献 (References):

[1] Li J C. The circadian pacemaker of mammals. *Trends of Biological Science*, 1983, (6): 13~18.
李经才. 哺乳动物昼夜节律的起搏点. 生物科学动态, 1983, (6): 13~18.

[2] Li J C. Chronopharmacology. Yang Z C *et al* eds. The general principles of pharmacology. Beijing: Renminweisheng Publishing House, 1989, 538~559.
李经才. 时间药理学. 见: 杨藻宸等主编, 药理学总论. 北京: 人民卫生出版社, 1989, 538~559.

[3] Ripperger J A, Schibler U. Circadian regulation of gene expression in animals. *Curr Opin Cell Biol*, 2001, 13: 357~362.

[4] Dunlap J C. Molecular bases for circadian clock. *Cell*, 1999, 96: 271~290.

[5] Young M W. Circadian rhythms-marking time for a kingdom. *Science*, 2000, 288: 451~453.

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

[7] Xu Y, Mori T, Johnson C H. Circadian clock-protein expression in *Cyanobacteria*: rhythms and phase setting. *EMBO J*, 2000, 19: 3349~3357.

[8] Barinaga M. New timepiece has a familiar ring. *Science*, 1998, 281: 1429~1431.

[9] Mori T, Johnson C H. Independence of circadian timing from cell di-

vision in *Cyanobacteria*. *J Bacteriol*, 2001, 183: 2439~2444.

[10] Schmitz O, Katayama M, Williams S B, Kondo T, Golden S S. CikA, a bacteriophytochrome that resets the *cyanobacterial* circadian clock. *Science*, 2000, 289: 765~768.

[11] Schmitz O, Bionson G, Bothe H. Quantitative analysis of expression of two circadian clock-controlled gene clusters coding for the bidirectional hydrogenase in the *Cyanobacterium synechococcus sp.* PCC7942. *Mol Microbiol*, 2001, 41: 1409~1417.

[12] Nair U, Ditty J L, Min H, Golden S S. Roles for sigma factors in global circadian regulation of the *Cyanobacterial* genome. *J Bacteriol*, 2002, 184: 3530~3538.

[13] Aronson B D, Johnson K A, Loros J J, Dunlap J C. Negative feedback defining a circadian clock: autoregulation of the clock gene frequency. *Science*, 1994, 263: 1578~1584.

[14] Yang Y, Cheng P, Liu Y. Regulation of the *Neurospora* circadian clock by casein kinase II. *Genes*, 2002, 16: 994~1006.

[15] Crosthwaite S K, Dunlap J C, Loros J L. *Neurospora wc-1* and *wc-2*: Transcription, photoresponses and the origins of circadian rhythmicity. *Science*, 1997, 276: 763~769.

[16] Froehlich A C, Liu Y, Loros J J, Dunlap J C. White Collar-1, a circadian blue light photoreceptor, binding to the frequency promoter. *Science*, 2002, 297: 815~819.

[17] Kay S A. PAS, present and future, clues to the origins of circadian clock. *Science*, 1997, 276: 753~754.

[18] Pando M P, Sassone-corsi P. A vivid loop of light. *Nature*, 2001, 410: 311~313.

[19] Bell-Pedersen D, Crosthwaite S K, Jakin-Thomas P L, Merrow M, Okland M. The *neurospora* circadian clock: simple or complex. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2001, 356: 1697~1709.

[20] Hardin P E, Hall J C, Rosbach M. Feedback of the *drosophila* period gene product on circadian cycling of its messenger RNA levels. *Nature*, 1990, 343: 536~540.

[21] Mgers M P, Wager-Smith K, Rothenflich-Hilfiker A, Young M W. Light-induced degradation of timeless and entainment of the *drosophila* circadian clock. *Science*, 1996, 271: 1736~1740.

[22] Zeng H, Qian Z, Myers M P, Rosbash M. A light-entrainment mechanism for the *drosophila* circadian clock. *Nature*, 1996, 380: 129~135.

[23] Lee C, Parikh V, Itsukaichi T, Bae K, Edery I. Resetting the *drosophila* clock by photic regulation of PER and a PER-TIM complex. *Science*, 1996, 271: 1740~1744.

[24] Plautz J D, Kaneko M, Hall J C, Kay S A. Independent photoreceptive circadian clocks throughout *drosophila*. *Science*, 1997, 278: 1632~1635.

[25] Darlington T K, Wager-Smith K, Cerlari M F, Staknis D, Gekakis N, Steeves T D, Weitz C J, Takahashi J S, Kay S A. Closing the circadian loop: clock-induced transcription of its own inhibitors *per* and *tim*. *Science*, 1998, 280: 1599~1603.

[26] Glossop N R J, Lyons L C, Hardin P E. Interlocked feedback loops within the *drosophila* circadian oscillator. *Science*, 1999, 286: 766~768.

- [27] Ceriani M F, Darlington T K, Staknis D, Mas P, Petti A A, Weitz C J, Kay S A. Light-dependent sequestration of Timeless by cryptochrome. *Science*, 1999, 285: 553~556.
- [28] Krishnan B, Levine J D, Lynch M K, Dowse H B, Funes P, Hall J C, Hardin P E, Dryer S E. A new role for cryptochrome in a *Drosophila* circadian oscillator. *Nature*, 2001, 411: 313~317.
- [29] Scully A L, Kay S A. Tim flies for *Drosophila*. *Cell*, 2000, 100: 279~300.
- [30] Shearman L P, Sriram S, Weaver D R, Maywood E S, Chaves I, Zheng B, Kume K, Lee C C, van der Horst G T, Hastings M H, Reppert S M. Interacting molecular loops in the mammalian circadian clock. *Science*, 2000, 288: 1013~1019.
- [31] Zheng B, Larkin D W, Albrecht U, Sun Z S, Sage M, Eichele G, Lee C C, Bradley A. The *mper2* gene encodes a functional component of the mammalian circadian clock. *Nature*, 1999, 400: 169~173.
- [32] Clayton J D, Kyriacou C P, Reppert S M. Keeping time with the human genome. *Nature*, 2001, 409: 829~831.
- [33] Reppert S M, Weaver P R. Comparing clockworks: mouse versus fly. *J Biol Rhythms*, 2000, 15: 357~364.
- [34] Bunger M K, Wilsbacher L D, Moran S M, Clendenin C, Radcliffe L A, Hogenesch J B, Simon M C, Takahashi J S, Bradfield C A. Mop3 is an essential component of the master circadian pacemaker in mammals. *Cell*, 2000, 103: 1009~1017.
- [35] Gekakis N, Staknis D, Nguyen H B, Davis F C, Wilsbacher L D, King D P, Takahashi J S, Weitz C J. Role of the clock protein in the mammalian circadian mechanism. *Science*, 1998, 280: 1564~1569.
- [36] Cashmore A R, Jarillo J A, Wu Y J, Liu D. Cryptochromes: blue light receptors for plants and animals. *Science*, 1999, 284: 760~765.
- [37] Vitaterna M H, Selby C P, Todo T, Niwa H, Thompson C, Fruechte E M, Hitomi K, Thresher R J, Ishikawa T, Miyazaki J, Takahashi J S, Sancar A. Differential regulation of mammalian period genes and circadian rhythmicity by cryptochromes, 1 and 2. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 12114~12119.
- [38] van der Horst G T, Muijtjens M, Kobayashi K, Takano R, Kanano S, Takao M, de Wit J, Verkerk A, Eker A P, van Leenen D, Buijs R, Bootsma D, Hoeijmakers J H, Yasui A. Mammalian CRY1 and CRY2 are essential for maintenance of circadian rhythms. *Nature*, 1999, 398: 627~630.
- [39] Okamura H, Miyake S, Sumi Y, Yamaguchi S, Yasui A, Muijtjens M, Hoeijmakers J H, van der Horst G T. Photic induction of mPer1 and mPer2 in cry-deficient mice lacking a biological clock. *Science*, 1999, 286: 2531~2534.
- [40] Hardin P R, Glossop N K. The *crys* of flies and mice. *Science*, 1999, 286: 2460~2461.
- [41] Tosini G, Menaker M. Circadian rhythms in cultured mammalian retina. *Science*, 1996, 272: 419~420.
- [42] Jin X, Shearman L P, Weaver D R, Zylka M J, de Vries G J, Reppert S M. A molecular mechanism regulating rhythmic output from the suprachiasmatic circadian clock. *Cell*, 1999, 96: 57~68.
- [43] Cheng M Y, Bullock C M, Li C, Lee A G, Bermak J C, Belluzzi J, Weaver D R, Leslie F M, Zhou Q Y. Prokineticin 2 transmits the behavioural circadian rhythm of the suprachiasmatic nucleus. *Nature*, 2002, 417: 405~410.
- [44] HOU B K, YU H M. Recent developments in molecular mechanisms of biological clock. *Hereditas (Beijing)*, 1996, 18(4): 42~44.
侯丙凯, 于惠敏. 生物钟的分子机制研究进展. *遗传*, 1996, 18(4): 42~44.
- [45] Young M E, Razeghi P, Taegtmeier H. Clock genes in the heart: characterization and attenuation with hypertrophy. *Circ Res*, 2001, 88: 1142~1150.
- [46] Yagita K, Tamanini F, van Der Horst G T, Okamura H. Molecular mechanisms of the biological clock in cultured fibroblasts. *Science*, 2001, 292: 278~281.
- [47] Meyer-Bernstein E L, Schgal A. Molecular regulation of circadian rhythm in *Drosophila* and mammals. *Neuroscientist*, 2001, 7: 496~505.
- [48] Bae K, Jin X, Maywood E S, Hastings M H, Reppert S M, Weaver D R. Differential functions of *mper1*, *mper2* and *mper3* in the SCN circadian clock. *Neuron*, 2001, 30: 525~536.
- [49] Ebizawa T, Uchiyama M, Kajimura N, Mishima K, Kamei Y, Katoh M, Watanabe T, Sekimoto M, Shibui K, Kim K, Kudo Y, Ozeki Y, Sugishita M, Toyoshima R, Inoue Y, Yamada N, Nagase T, Ozaki N, Ohara O, Ishida N, Okawa M, Takahashi K, Yamauchi T. Association of structural polymorphisms in the human period 3 gene with delayed sleep phase syndrome. *EMBO Rep*, 2001, 2: 342~346.
- [50] LIU Q Y, Dunlap J C. Clock gene mutant *prd-4* exhibits incomplete dominance over wild type *pre-4*. *Acta Genetica Sinica*, 1998, 25(1): 80~85.
刘秋云, Dunlap J C. 生物钟基因突变型 *prd-4* 对野生型 *prd-4* 呈不完全显性. *遗传学报*, 1998, 25(1): 80~85.
- [51] Balder M. Gene for mammals' body clocks found. *Science*, 1997, 19: 277: 1762.
- [52] Mitterauer B. Clock genes, feedback loops and their possible role in the etiology of bipolar disorders: an integrative model. *Med Hypotheses*, 2000, 55: 155~159.
- [53] Li J C, Xu F. Influences of light - dark shifting on the immune system, tumor growth and life span of rats, mice and fruit flies as well as on the counteraction of melatonin. *Biol Signals*, 1997, 6: 77~89.
- [54] HUO Yan, LI Jing-Cai, JIANG Yan, LI Hong. Effect of melatonin on the *c-fos* gene expression in suprachiasmatic nucleus of mice. *Chin. Pharmacol Bull*, 2000, 16(3): 261~264.
霍艳, 李经才, 江岩, 李宏. 褪黑素对小鼠视交叉上核 *c-fos* 基因表达的影响. *中国药理学通报*, 2000, 16: 261~264.
- [55] Ohdo S, Koyanagi S, Suyama H, Higuchi S, Aramaki H. Changing the dosing schedule minimizes the disruptive effects of interferon on clock function. *Nat Med*, 2001, 7: 356~360.