

蓝藻生物钟核心振荡器的 KaiB-KaiC 相互作用机制*

刘松 刘森**

(三峡大学医学院分子生物学研究所, 宜昌 443002)

摘要 蓝藻是已知的具有昼夜节律生物钟调控机制的最简单生物, 其生物钟的核心是一个由三个蛋白质(KaiA、KaiB、KaiC)组成的, 不依赖于转录翻译水平调控的核心振荡器。研究表明这三个蛋白质仅在体外试管中反应就会表现出周期性磷酸化振荡现象。分子水平研究表明: KaiA 加速 KaiC 的自磷酸化, 而 KaiB 抑制 KaiA 使 KaiC 去磷酸化, 从而 KaiC 的磷酸化/去磷酸化形成周期性反复。但是 KaiB 如何与 KaiA、KaiC 相互作用, 目前还不清楚。本文重点介绍了最近几年来在 KaiB-KaiC 相互作用机制上的研究进展, 并结合我们的一些初步研究, 对 KaiB-KaiC 相互作用的关键问题进行展望, 以期为该体系的深入研究提供参考。

关键词 生物振荡器, 生物钟, KaiB, KaiC

学科分类号 Q6, Q7

DOI: 10.16476/j.pibb.2014.0203

生物钟广泛存在于生物体内, 与基因表达、细胞代谢、细胞分裂增殖、生物节律行为都息息相关, 调控着生命活动的几乎所有过程^[1-3], 表现出周期反复的生命现象(如生物展现的 24 h 昼夜节律行为)。蓝藻是已知的具有昼夜节律生物钟的最简单模式生物。研究表明, 蓝藻生物钟的核心振荡器由三个蛋白质(KaiA、KaiB、KaiC)维持, 且不依赖于 DNA 转录水平和 RNA 翻译水平的调控(transcription/translation feedback loop, TTFL)^[4], 称为翻译后振荡(post-translational oscillation, PTO)^[5]。更为重要的是, 该 PTO 振荡器可以仅用这三个蛋白质, 在缓冲溶液中进行重构, 表现出严格的昼夜节律振荡现象^[6]。因此, 该体系对于体外研究蛋白质相互作用网络模式具有重要意义, 对理解昼夜节律振荡器的形成机理也具有重要价值。

1 KaiABC 核心振荡器简介

KaiA、KaiB 和 KaiC 蛋白质是组成蓝藻(以 *Synechococcus elongatus* PCC7942 为例)生物钟核心振荡器的组分。Ishiura 等^[7]于 1998 年发现 *kaiA*、*kaiB* 和 *kaiC* 基因, 后来逐渐解析得到它们所编码

的蛋白质 KaiA、KaiB、KaiC 的三维结构。KaiA 通过结构域交换, 形成类似“蝴蝶”形状的同源二聚体^[7]。KaiB 具有类硫氧还蛋白折叠结构, 可形成二聚体、四聚体或六聚体^[8]。KaiC 以外表类似双环状的同源六聚体形式存在, 每个 KaiC 单体的 N 端和 C 端相似, 分别称为 KaiC-C I 和 KaiC-C II 亚基。在并列的每两个 C I 及 C II 亚基之间, 各能结合 1 个 ATP 分子。在 C II 亚基“尾端”(也是 KaiC 的“尾端”序列)包含残基 498~519 位, 与 ATP 的代谢及 KaiA 的结合有较大的联系^[9]。

Kondo 等于 2005 年将这三个 Kai 蛋白在含有 ATP 的缓冲溶液中混合, 发现可以重建出约 24 h 的昼夜节律振荡现象^[6]。该体外振荡器主要表现为: KaiC 以约 24 h 为周期在低磷酸化状态和高磷

* 国家自然科学基金(21103098), 北京分子科学国家实验室开放基金和三峡大学科研基金(2011071001, KJ2012B004, KJ2014H015)资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 0717-6397179, E-mail: senliu.ctgu@gmail.com

收稿日期: 2014-11-04, 接受日期: 2014-12-03

酸化状态之间进行交替变化^[9]. 质谱法和 X 射线衍射证实 KaiC 有 2 个关键的磷酸化位点, 分别是在 C II 亚基的 S431 和 T432 位^[11]. KaiC 的磷酸化 / 去磷酸化循环包括四个步骤: a. T432 的磷酸化; b. S431 的磷酸化; c. T432 的去磷酸化; d. S431 的去磷酸化^[12]. 这 2 个磷酸化位点的磷酸化和去磷酸化严格按照上面的顺序进行, 形成一个精密的时间记录元件, 单向记录时间的流逝. 节律振荡现象如何形成, 需从 KaiA、KaiB、KaiC 蛋白质的最基本结构及其相互作用机制上去探究.

2 KaiA 与 KaiC 相互作用

KaiC 的 C II 亚基同时具有激酶和磷酸酶活性, 形成同源六聚体后, 分别使相邻的 C II 亚基磷酸化和去磷酸化. C II 亚基处于低磷酸化状态时, KaiA 通过结合 C II 端的序列(即 A-loop, 488~497 位), 使 KaiC 的激酶活性升高, 加速其向高磷酸化状态的转变; 达到一定的磷酸化程度后, KaiB 会结合 KaiA, 抑制其作用, 从而使 KaiC 在磷酸酶的优势活性下, 向低磷酸化状态转变^[13-16]. 仅仅一个单独的 KaiA 二聚体就可以有效上调 KaiC 六聚体的磷酸化状态使其达到磷酸化饱和水平^[17]. Liwang 等^[18]用核磁共振波谱法确定了 KaiA 连接在 KaiC 的 C 端“触须”上(473~518 位). KaiC-C II 亚基上有一个 S 形环结构(称为 A-loop, 488~497 位), KaiA 可将 A-loop 推向 KaiC 六聚体中心位置, 使埋藏在 KaiC 内部的 A-loop 显露出来, 这种结构变化进一步使 ATP 更加接近 T432/S431 这 2 个磷酸化位点, 从而启动磷酸化循环^[19-20].

3 KaiB 与 KaiC 相互作用形式的争议

与 KaiA 以二聚体的形式连接到 KaiC C 端的“触须”(473~518 位)部位不同, KaiB 对这些“触须”不显示任何亲和力. 而且在整个磷酸化循环中, KaiA 均可以和 KaiC 结合, 但是 KaiB 在不同磷酸化时, 相对 KaiC 的结合程度不同, 优先选择结合 KaiC 的高磷酸化形式^[21]. 利用不同的结构生物学的研究方法, 包括低温电镜、负染色电镜、X 射线晶体学方法、非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(Native PAGE)、荧光标记方法和氢-氘交换质谱分析等, 不同研究人员对 KaiB 与 KaiC 的相互作用方式, 得出了截然不同的结论. Egli, Stewart 等的实验证明 KaiB 结合到 KaiC 的 C II 环上^[22-25], 而 Liwang, Rust 等的实验证明 KaiB 结合在 C I 环

上^[26-29]. 同时, KaiB 与 KaiC 的不同结合形式, 通过何种机制影响和调控 KaiA-KaiC 的相互作用, 也由于上述结合位点的争议, 而产生不同的解释途径. 另外, 对于 KaiB 以单体、二聚体还是四聚体的形式结合到 KaiC 上, 也有不同的观点^[15, 23-25, 27, 30].

3.1 KaiB 与 KaiC 的结合位点

KaiB 与 KaiC 相互作用区域迄今尚不明确, 且存在争议. 目前的研究表明, KaiB 似乎既可以和 KaiC 的 C II 亚基结合, 也可以和 C I 亚基发生结合. 但对于 KaiB 是否只能与其中之一发生相互作用或结合, 这是争议最大的地方.

KaiB 是可以和 KaiC 的 C II 亚基发生结合的, 因为用构建的 C II 亚基蛋白质和 KaiB 反应后, 在 Native PAGE 实验中, 会有条带迁移现象, 但构建的 C I 亚基蛋白质和 KaiB 反应后无此现象^[21]. 有证据证明 KaiB 倾向于与高磷酸化状态的 KaiC 发生结合^[21]. 小角散射模型显示, KaiB 以四聚合体的形式接近 KaiA 与 KaiC 的 C II 端结合的顶部^[22-24], 由于 KaiB 邻近 KaiA, 则有可能占据 KaiA 与 KaiC 相互作用的某些位点. 这有利于解释 KaiB 对抗 KaiA 的作用, 解释 KaiC 的去磷酸化现象, 也和 KaiB 与高磷酸化 KaiC 发生相互作用这一现象一致. 冷冻电镜和负染电镜观察到 KaiB 和带有 6xHis 标签胶体金颗粒标记的 KaiC C II 端结合, 更加直接地从影像上证明了 KaiB 结合在 KaiC 的 C II 端^[25]. 而最近的氢-氘交换实验, 证明 KaiC 和六个单体 KaiB 发生结合, 联合分子动力学模拟, 则更加清楚地表明 KaiB 和 KaiC 发生相互作用的位点在 C II 亚基上, 认为 KaiB 能和 ATP 竞争 C II 亚基某些位点^[30]. Villarreal 等^[25]的研究, 较好地支持 KaiB-KaiC 相互作用发生在 C II 端的 ATP 沟槽, 模拟和实验结果也说明 KaiB 和 KaiC C II 结构域发生结合.

具有争议的是, 目前也有一些实验证明 KaiB 是和 KaiC 的 C I 结构域发生相互作用. 利用 NMR 分析和分子筛实验, Chang 等^[26]证明 KaiB 结合在 KaiC C I 结构域. 但 KaiB 一般情况下是不能结合到 KaiC 的 C I 亚基上的, 因为这个结合位点是隐藏的. 但是当 C II 和 C I 之间有堆积力的作用, 使 C I 构象发生变化, 暴露出 KaiB 结合位点时, KaiB 才能结合上去. 而且在 KaiB 的协助下, KaiA 也会结合到 KaiC 的 C I 结构域^[27]. 从而, KaiB 与 KaiA 形成复合物, 拮抗 KaiA 对 KaiC 的促磷酸化作用. Phong 等^[28]通过免疫共沉淀实验证

明, 当 KaiC 的 C I 催化结构域发生突变时, KaiB 结合到 KaiC 的量会显著减少, 但 C II 催化结构域的突变不会有这种变化. 这说明 KaiB 有可能结合在 C I 结构域来调节 KaiC 的磷酸化程度. 当 KaiB 不能和 KaiC C I 结构域结合时, KaiC 会一直保持着高磷酸化状态, 从而不能维持一个正常的磷酸化振荡^[28]. 随后 Mutoh 等^[29]将 *T. elongatus* KaiC 和 KaiB₁₋₉₄ 孵育, 利用 Native PAGE 的方法, 也证实了 KaiB 和 KaiC C I 发生结合, 而没有和 KaiC C II 结合. 在这个实验中 KaiB₁₋₉₄ 是和 KaiC 单体或 KaiC C I 单体结合, 但是野生型 KaiB 不和 KaiC 单体结合. 后来 Liwang 等利用 NMR 实验, 进一步证明截短了的 KaiB(用 KaiB* 表示, KaiB₁₋₉₄ 位, 且有突变 Y8A/Y14A)和 KaiC C I 能形成复合物. 截短了 N 端的 KaiA(KaiA^N, 147~281 位)和 KaiC C I 不能形成复合物, 但是在 KaiB* 存在的情况下, KaiA^N 能和 KaiC C I、KaiB* 形成三元复合物^[27]. 这个研究表明, KaiB 是和 KaiC C I 结构域发生结合的, 且结合后的结构能为 KaiA 提供结合位点, 从而拮抗 KaiA 对 KaiC 的促磷酸化作用, 由此或加速或稳定此磷酸化振荡. 该研究进一步认为 KaiB 和 KaiC 反应发生在 C I 结构域的 B-loop (116~123 位), B-loop 由一些非极性氨基酸及带负电的氨基酸残基组成. 综上所述, 可以看出 KaiB 和 KaiC C I 结构域发生相互作用时, 是发生在 KaiC 非六聚体状态, 或高磷酸化的六聚体状态. 这意味着 KaiB 与 KaiC 在发生结合时, 有一个构象变化的过程, 但是这个过程是如何发生的, 目前并不清楚. 有可能是 KaiB 和 KaiC C I 结构域发生相互作用, 影响 C I 结构域的 ATP 酶活性, 从而影响 KaiC 的磷酸化振荡^[21, 27-28].

无论上述哪一方面的研究, 从细微处分析, 都有不尽完善的地方. 在支持 KaiB 与 KaiC 的 C II 亚基结合的研究中, 冷冻电镜虽然能观察到 KaiB 和 KaiC C II 结构域有结合, 但是其分辨率显然是不够的, 而且 KaiC 两个结构域的对称性导致很难说清楚 KaiB 究竟与哪个结构域发生结合^[31]; 虽然用胶体金标记后的 C II 和 KaiB 发生结合现象较明显, 但是这个过程有 6xHis 标签的引入, 也容易出现假象; Native PAGE 实验的误差可能会较大, 而且这两个结构域蛋白质是改造后的, 或许会改变其某些性质^[22]. 而在支持 KaiB 与 KaiC 的 C I 亚基结合的研究中, 作为实验材料的 KaiB*, KaiC C I 结构域, KaiC 都是人为改造过的, KaiB₁₋₉₄ 是截断

了其 C 端的 KaiB, 而不是野生型 KaiB, 高磷酸化的 KaiC 用 KaiC_{EE}(S431E, T432E)进行模拟等, 这些变化使实验结果也存在疑点. 因此, 在今后的研究中, 还有待进一步阐明 KaiB 与 KaiC 的准确结合部位.

3.2 KaiB 对 KaiABC 体系的调节机制

虽然 KaiB 与 KaiC 的具体结合位点存在争议, 但不管 KaiB 结合在 KaiC 的哪个部位, KaiB 的结合都应该可以占领或影响 KaiA 与 KaiC 的结合, 因为在 KaiB 的作用形式上, 目前的研究一致认为通过抑制 KaiA 与 KaiC 的结合, 来实现使 KaiC 从高磷酸化状态向低磷酸化状态的转变. 实验证据是, 在没有 KaiB 参与的情况下, KaiC 不能维持稳定的磷酸化振荡, 而只是持续的高磷酸化状态, 同时 KaiB 偏向结合高磷酸化状态的 KaiC^[13].

实验证据表明, 不同磷酸化状态的 KaiC 在结构上会有一些变化^[32], 由此推测 KaiB 结合到 KaiC 上需要在特定的时期, 此时 KaiC 结构变化能提供 KaiB 的结合位点^[10, 26-27]. 这说明 KaiC 的空间结构在磷酸化反应时必定有随时间的渐变过程. 如何解释 KaiB 在此过程中的参与形式, 也与 KaiB 在 KaiC 上的结合位点密切相关, 因此也有不同的观点.

若 KaiB 是结合在 KaiC 的 C II 亚基上, 那么 KaiB 最可能是通过结合在 KaiC 的 C II 端, 直接占据 KaiA 的结合位点, 或形成空间位阻, 来影响 KaiA 与 KaiC 的结合. 实验证据表明, KaiB 最易和 KaiC pST 状态(KaiC 431 位丝氨酸已磷酸化, 而 432 位苏氨酸未磷酸化状态)发生结合, 因此 KaiB 结合到高磷酸化状态的 KaiC 上使其进入去磷酸化相位^[10, 32]. KaiB 易于和 KaiC pST 状态结合, 而 KaiC 高磷酸化的表面静电势明显不同于低磷酸化的 KaiC 表面静电势. KaiB 结合到 KaiC pST 状态后会改变 KaiC 的磷酸化, 也会改变 KaiC 的表面静电势. 故可以理解为 KaiB 是通过改变 KaiC 的表面静电势而改变 KaiC 的磷酸化状态. 而此时的 KaiC pST 状态则是一个表面静电势能改变的临界状态, KaiB 结合到 C II 结构域后, 可能会改变 KaiC 此时的表面静电势, 而推动 KaiC 进入去磷酸化相位^[24]. 此外, 也有研究表明, KaiB 可能通过结合到 KaiC C II 亚基的 ATP 结合槽上, 影响 ATP 的结合, 调节 KaiC 磷酸化振荡. 当 KaiC 达到一定的磷酸化程度后, 其 C II 的激酶活性由于 KaiB 对 ATP 结合槽的影响而转向为 ATP 合成酶活性和 ATP 水解酶活性, 从而进入去磷酸化相位^[29, 33]. 这

一点也意味着, ATP/ADP 的浓度比例能影响 KaiABC 磷酸化振荡体系. 因此, 从一定意义上可以说, KaiB 是 KaiABC 磷酸化振荡体系的核心调节元件, 该调控受到 ATP 比例^[29, 33]及体系所处氧化还原状态和其他因子的调节^[27].

如前所述, 目前也有很多研究支持 KaiB 结合到 KaiC C I 亚基而非 C II 亚基. KaiC 的 C I 亚基只有 ATP 酶活性, KaiB 的结合会影响 C I 亚基的 ATP 酶活性. 但目前的实验证据, 都表明 KaiB 只和 C I 单体, 或 C I 环中 B-loop(116~123 位)位点结合. B-loop 是 C I 结构域上一个表面带负电荷较强的区域, KaiB 截断 C 端后的蛋白(KaiB₁₋₉₄ 和 KaiB*)能有效结合上去. KaiB₁₋₉₄ 和 KaiB* 不同于全长 KaiB 的是它会暴露出正电荷较强的区域^[34], 因此从表面电势角度能很好地解释 KaiB 与 KaiC C I 亚基 B-loop 的相互作用. C I 结构域是一个比较稳定的结构域, 但是研究表明, KaiB 单体只与 KaiC C I 单体或 C II-C I 堆积后的结构发生结合^[26-27, 29], 这说明 KaiB 结合到 KaiC 上后, 会导致 KaiC C I 结构的不稳定. 由于这一点能够更好地解释 KaiC 的单体交换模型, 因此 KaiB 对 C I 的结合可能有利于 KaiC 之间的单体交换, 从而保证 KaiC 能有稳健的磷酸化振荡现象^[10, 15, 31].

有研究表明, 截去 KaiB C 端后的蛋白(KaiB₁₋₉₄), 不影响 KaiABC 体外重构体系的正常磷酸化循环, 但是会减弱体内条件下的 KaiC 磷酸化反应节律^[34]. 这也许意味着, KaiB 是一个调节 KaiC 的因子, 需要特殊的空间结构, 在此结构中, KaiB 的 C 端残基(95~108 位)与体外调节 KaiC 无关, 但是很可能在体内被 KaiA 及其他蛋白所调节^[27], 从而使该体系在体内没有正常的磷酸化振荡, 在体外却有正常的磷酸化振荡. 而 KaiB₁₋₉₄ 的表面电荷有很大的改变, 可能更利于和 KaiC 的结合. 同时, KaiB 的 C 端对 KaiB 形成聚合体也可能有一定的影响.

3.3 KaiB 与 KaiC 结合时的聚合体状态

虽然当前的研究都表明, KaiB 可以与 KaiC 直接发生相互作用, 但对于 KaiB 以何种形式与 KaiC 结合, 却有不同观点. Kageyama 等^[15]用分子筛实验显示, KaiB 以二聚体的形式和 KaiC 结合. 而 Akiyama 等^[23]用小角散射结合模拟的方法, 显示 KaiB 以四聚体的形式和 KaiA 的二聚体一起结合在 KaiC C II 亚基顶端. 同样是用小角散射的方法,

Pattanayek 等^[24]却发现 KaiB 是以二聚体的形式结合在 KaiC 的 C II 亚基上的. Murakami 等^[34]的研究显示, KaiB 的二聚体、四聚体都参与了 KaiC 的正常体外磷酸化振荡反应. 而最近 Villarreal 等^[25]的研究指出, KaiB 是以单体的形式与 KaiC 形成复合物的. Tseng 等^[27]的研究进一步预测了 KaiB 单体和 KaiC 的结合位点, 完善了 KaiA-KaiB-KaiC 体外磷酸化反应机制. 有意思的是, Snijder 等^[30]用质谱的手段发现在与 KaiC 的结合过程中, KaiB 的单体、二聚体、四聚体等形式都有参与, 他们指出 KaiB 单体是和 KaiC 发生反应的基本单位, 而且不排除 KaiB 能和 KaiC 的 C I、C II 环都发生反应. 综合来看, 最为合理的解释是, KaiB 的单体、二聚体和四聚体形式, 在不同的阶段, 与 KaiC 形成不同的复合物, KaiB 聚合状态的动态变化, 可能与 KaiC 的磷酸化振荡息息相关. 为研究 KaiB-KaiC 的相互作用形式, 我们在研究中以蛋白质模拟及基因工程的方法构建了 KaiB 的共价二聚体, 以使其不能解离为单体, 结果发现该 KaiB 聚合体形式不能维持 KaiA-KaiB-KaiC 体系的正常体外磷酸化振荡(待发表结果).

故综合上述, 我们总结 KaiB 对于 KaiABC 体系的意义于图 1. KaiB 的尾端可能对其聚合状态有重要的影响, 不同时期可能 KaiB 有不同的聚合体形式和 KaiC 发生相互作用. 据目前的实验表明, KaiB 可能结合在 KaiC C I 和 C II 亚基. 如果 KaiB 结合在 C II 亚基上则主要可能是通过影响 KaiC C II 的表面电势能调节 KaiC 运行. 也有可能是阻碍 KaiA 与 KaiC 的结合位点来调节 KaiC 的振荡. 还有可能是调节 ATP 与 KaiC 的反应来调节 KaiABC 的正常运行. 如果 KaiB 结合在 KaiC C II 亚基上, 我们将其归纳为对 KaiC 磷酸化位点的直接调节作用. 由于 KaiC C I 结构的特殊性, 只有 ATP 酶活性, 且较稳定. KaiB 如果结合在 KaiC C I 上则会影响 KaiC C I ATP 酶活性. KaiB 与 KaiC C I B-loop 结合也会为 KaiA 提供结合位点. KaiB 结合到 C I 上有可能导致 C I 结构不稳定, 而有利于 KaiC 进行单体交换. SasA 结合在 C I 上, KaiB 可能对其有竞争作用, 从而调节 SasA, 通过 SasA 而调节下游的反应. 如果 KaiB 结合到 C I 亚基上, 则可能是从 KaiC 的结构稳定性方面来间接调节 KaiABC 反应, 我们将其归纳为对 KaiC 结构稳定性的间接调节作用.

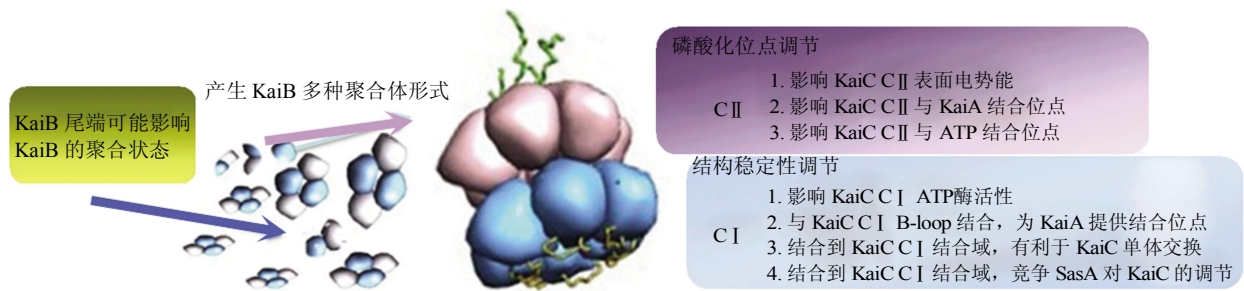


Fig. 1 The meanings of KaiB interacting on different KaiC subdomain

图 1 KaiB 作用于 KaiC 不同亚基的意义

KaiB 的多种聚合体形式能结合到 KaiC 的不同亚基, 如果结合到 C II 亚基上, 则可能是通过对 C II 亚基的磷酸化位点进行调节, 如果结合到 C I 亚基上, 则可能是通过对 C I 的结构稳定性进行调节, 从而调节 KaiABC 反应。

4 KaiABC 相互作用机制的推测

如前所述, 在 KaiB 与 KaiC 的结合位点上, 目前不同的研究有不同的观点. 我们注意到, 支持 KaiB 与 KaiC 的 C II 亚基结合的结论大多来自于电镜实验^[23-25,31]. 由于电镜的分辨率较低, 且 KaiC 的 C I、C II 亚基及其相似, 因此事实上很难确定 KaiB 是与 C II 亚基结合. 进一步导致不确定性的

是, KaiB 的结合会导致 KaiC 结构的变化, C I 亚基的平面结构有可能在 KaiB 结合后变成类似 C II 亚基的曲面结构^[26]. 因此, 综合目前的研究来看, KaiB 与 KaiC 的 C I 端结合的模型具有更高的可信度^[27,30]. 但是也不排除 KaiB 与 KaiC 的 C I、C II 亚基在不同的时期都有结合反应. 我们以此为基础, 提出 KaiA-KaiB-KaiC 相互作用的一个可能机制如下(图 2).

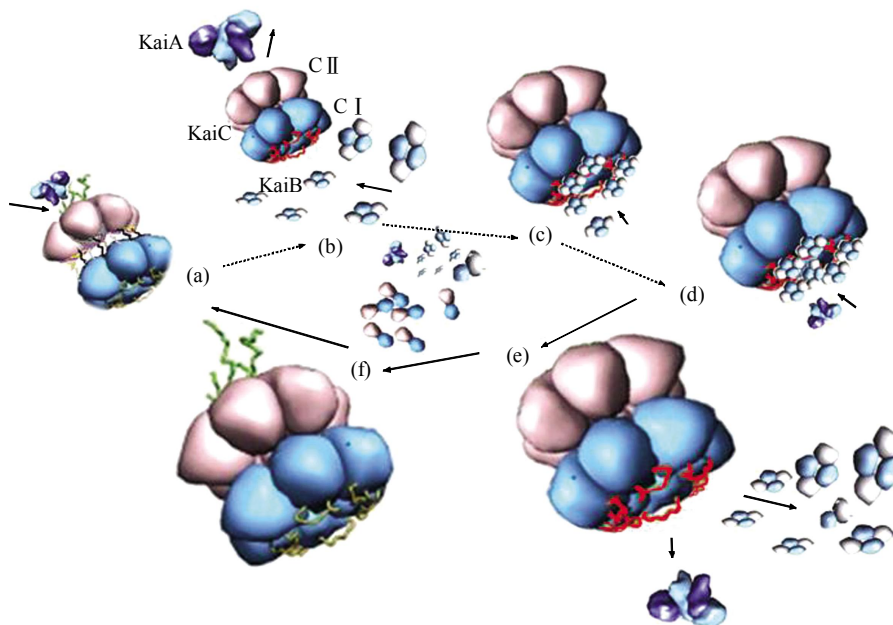


Fig. 2 The model of KaiABC core oscillator

图 2 KaiABC 核心振荡器动态反应模型

(a) KaiA 结合 KaiC C II 环的 A-loop. (b) KaiC C I-C II 产生变构效应, KaiB 结合 C I 环的 B-loop. (c) KaiC 自身激酶活性达到最大值. (d) KaiC 磷酸酶活性增加, 开始去磷酸化. (e) KaiA, KaiB 的作用加速 KaiC 的去磷酸化. (f) KaiC 回到初始状态, 准备新一轮磷酸化循环。

a. KaiC C II 环的 A-loop(488~497 位)与 KaiA 结合, 导致其 A-loop 从 C II 环里被牵引出来, 引起 C I -C II 的环 - 环堆积(ring-ring stacking), 使 KaiC 自身激酶活性升高^[19-20,26].

b. C I -C II 发生变构效应, 导致 C I 能暴露出和 KaiB 结合的位点 B-loop(116~123 位, 红色部分表示 B-loop 暴露出结合位点), 从而 KaiB 能与 C I 结合, 同时 KaiA 随着 KaiC 自身激酶活性的升高, 其和 KaiC 的结合数量慢慢减少^[27].

c. 当 KaiC 自身激酶活性达到最高时, 与 KaiC 结合的 KaiB 也是最多的. 此时 KaiC 内部的磷酸化状态达到最高, C I -C II 结构变得极其致密. KaiC 结构的这种变化, 得到了实验的证实^[32].

d. 由于 KaiC 结构的变化, 此时其磷酸酶活性上升, KaiC 开始去磷酸化, KaiB-KaiC 结合后极其饱满, C I 环会由原来较平坦的状态形成凸起的曲面, 导致其形态像 C II 环, 也给 KaiA 结合提供了合适的空间结构^[27].

e. KaiA 结合到 KaiB-KaiC 的结合部位, 但此三元复合物状态反应时间很短, 所以目前没有在做实验中得到该结合状态的模型. KaiA 转移结合到能给它提供结合位点的 C I 亚基上, 使其不再促进 KaiC 的磷酸化, 反而加速去磷酸化, 从而 KaiC 由其高磷酸化状态向低磷酸化状态转变^[21,27].

f. KaiC 去磷酸化到一定程度, 其 C I -C II 结构由紧密堆积变疏松, C I 环的 B-loop 重新隐藏, 而 C II 环的 A-loop 逐渐有利于被牵引出, 此时磷酸化酶活性最低, 自身激酶活性开始逐渐升高, KaiC 六聚体慢慢转变成一种“感受态”状态, 为 KaiA 的下一轮结合做好准备.

通过上述机制, KaiABC 体系从而得以循环往复, 表现出有节律的 KaiC 磷酸化振荡现象. 当然, 此过程中可能伴随着 KaiC 的单体交换, KaiB 的聚合体状态的改变等情况.

5 总结与展望

KaiABC 体系, 是目前唯一一个能在试管中进行重构的, 不含 DNA 和 RNA 水平调控的昼夜节律生物振荡器. 因此研究其分子机制, 对理解蛋白质相互作用网络、生物振荡器以及高等生物昼夜节律现象等, 都具有重要价值. 目前的研究表明, 在该体系中, KaiA 的结合使 KaiC 加速磷酸化, 而 KaiB 拮抗 KaiA 的作用, 由此实现 KaiC 磷酸化状态的周期性变化. 在此过程中, 当前的研究对于

KaiB 与 KaiC 的具体结合部位、结合形式、结合状态等都存在一些争议, 有些观点甚至是截然相反.

对这些争议的解决, 有待更多实验证据的出现. 例如得到 KaiB-KaiC 相互作用复合物的高分辨率结构及 KaiA-KaiB-KaiC 三元复合物的高分辨率结构, 将能有效帮助回答 KaiB 在 KaiC 上的结合位点的问题. 进一步若能通过实验手段, 捕获该体系动态转变过程中不同阶段的复合物, 将有可能回答 KaiB 与 KaiC 的结合是否存在构象和位置的连续动态变化, 从而统一目前的争议观点. 我们相信, 对 KaiB-KaiC 相互作用机制的阐明, 将大大加深我们对 KaiABC 核心振荡体系的理解, 并对相关体系的研究产生重大影响, 也有助于我们对其他复杂生物钟的理解.

参 考 文 献

- [1] Ouyang Y, Andersson C R, Kondo T, *et al.* Resonating circadian clocks enhance fitness in cyanobacteria. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95**(15): 8660-8664
- [2] Dong G, Yang Q, Wang Q, *et al.* Elevated ATPase activity of KaiC applies a circadian checkpoint on cell division in *Synechococcus elongatus*. *Cell*, 2010, **140**(4): 529-539
- [3] Mackey S R, Choi J S, Kitayama Y, *et al.* Proteins found in a CikA interaction assay link the circadian clock, metabolism, and cell division in *Synechococcus elongatus*. *J Bacteriol*, 2008, **190**(10): 3738-3746
- [4] Ishiura M, Kutsuna S, Aoki S, *et al.* Expression of a gene cluster kaiABC as a circadian feedback process in cyanobacteria. *Science*, 1998, **281**(5382): 1519-1523
- [5] Teng S W, Mukherji S, Moffitt J R, *et al.* Robust circadian oscillations in growing cyanobacteria require transcriptional feedback. *Science*, 2013, **340**(6133): 737-740
- [6] Nakajima M, Imai K, Ito H, *et al.* Reconstitution of circadian oscillation of cyanobacterial KaiC phosphorylation *in vitro*. *Science*, 2005, **308**(5720): 414-415
- [7] Ye S, Vakonakis I, Ioerger T R, *et al.* Crystal structure of circadian clock protein KaiA from *Synechococcus elongatus*. *J Biol Chem*, 2004, **279**(19): 20511-20518
- [8] Iwase R, Imada K, Hayashi F, *et al.* Functionally important substructures of circadian clock protein KaiB in a unique tetramer complex. *J Biol Chem*, 2005, **280**(52): 43141-43149
- [9] Pattanayek R, Wang J, Mori T, *et al.* Visualizing a circadian clock protein: crystal structure of KaiC and functional insights. *Mol Cell*, 2004, **15**(3): 375-388
- [10] Ito H, Kageyama H, Mutsuda M, *et al.* Autonomous synchronization of the circadian KaiC phosphorylation rhythm. *Nat Struct Mol Biol*, 2007, **14**(11): 1084-1088
- [11] Xu Y, Mori T, Pattanayek R, *et al.* Identification of key phosphorylation sites in the circadian clock protein KaiC by crystallographic and mutagenetic analyses. *Proc Natl Acad Sci*

- USA, 2004, **101**(38): 13933–13938
- [12] Rust M J, Markson J S, Lane W S, *et al.* Ordered phosphorylation governs oscillation of a three-protein circadian clock. *Science*, 2007, **318**(5851): 809–812
- [13] Iwasaki H, Nishiwaki T, Kitayama Y, *et al.* KaiA-stimulated KaiC phosphorylation in circadian timing loops in cyanobacteria. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**(24): 15788–15793
- [14] Williams S B, Vakonakis I, Golden S S, *et al.* Structure and function from the circadian clock protein KaiA of *Synechococcus elongatus*: a potential clock input mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**(24): 15357–15362
- [15] Kageyama H, Nishiwaki T, Nakajima M, *et al.* Cyanobacterial circadian pacemaker: Kai protein complex dynamics in the KaiC phosphorylation cycle *in vitro*. *Mol Cell*, 2006, **23**(2): 161–171
- [16] Kitayama Y, Iwasaki H, Nishiwaki T, *et al.* KaiB functions as an attenuator of KaiC phosphorylation in the cyanobacterial circadian clock system. *EMBO J*, 2003, **22**(9): 2127–2134
- [17] Hayashi F, Ito H, Fujita M, *et al.* Stoichiometric interactions between cyanobacterial clock proteins KaiA and KaiC. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, **316**(1): 195–202
- [18] Vakonakis I, Liwang A C. Structure of the C-terminal domain of the clock protein KaiA in complex with a KaiC-derived peptide: implications for KaiC regulation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101**(30): 10925–10930
- [19] Kim Y I, Dong G, Carruthers C W, Jr., *et al.* The day/night switch in KaiC, a central oscillator component of the circadian clock of cyanobacteria. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, **105**(35): 12825–12830
- [20] Egli M, Pattanayek R, Sheehan J H, *et al.* Loop-loop interactions regulate KaiA-stimulated KaiC phosphorylation in the cyanobacterial KaiABC circadian clock. *Biochemistry*, 2013, **52**(7): 1208–1220
- [21] Qin X, Byrne M, Mori T, *et al.* Intermolecular associations determine the dynamics of the circadian KaiABC oscillator. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, **107**(33): 14805–14810
- [22] Pattanayek R, Williams D R, Pattanayek S, *et al.* Structural model of the circadian clock KaiB-KaiC complex and mechanism for modulation of KaiC phosphorylation. *EMBO J*, 2008, **27**(12): 1767–1778
- [23] Akiyama S, Nohara A, Ito K, *et al.* Assembly and disassembly dynamics of the cyanobacterial periodosome. *Mol Cell*, 2008, **29**(6): 703–716
- [24] Pattanayek R, Williams D R, Rossi G, *et al.* Combined SAXS/EM based models of the *S. elongatus* post-translational circadian oscillator and its interactions with the output His-kinase SasA. *PLoS One*, 2011, **6**(8): e23697
- [25] Villarreal S A, Pattanayek R, Williams D R, *et al.* CryoEM and molecular dynamics of the circadian KaiB-KaiC complex indicates that KaiB monomers interact with KaiC and block ATP binding clefts. *J Mol Biol*, 2013, **425**(18): 3311–3324
- [26] Chang Y G, Tseng R, Kuo N W, *et al.* Rhythmic ring-ring stacking drives the circadian oscillator clockwise. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, **109**(42): 16847–16851
- [27] Tseng R, Chang Y G, Bravo I, *et al.* Cooperative KaiA-KaiB-KaiC interactions affect KaiB/SasA competition in the circadian clock of cyanobacteria. *J Mol Biol*, 2014, **426**(2): 389–402
- [28] Phong C, Markson J S, Wilhoite C M, *et al.* Robust and tunable circadian rhythms from differentially sensitive catalytic domains. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, **110**(3): 1124–1129
- [29] Mutoh R, Nishimura A, Yasui S, *et al.* The ATP-mediated regulation of KaiB-KaiC interaction in the cyanobacterial circadian clock. *PLoS One*, 2013, **8**(11): e80200
- [30] Snijder J, Burnley R J, Wiegand A, *et al.* Insight into cyanobacterial circadian timing from structural details of the KaiB-KaiC interaction. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, **111**(4): 1379–1384
- [31] Mori T, Williams D R, Byrne M O, *et al.* Elucidating the ticking of an *in vitro* circadian clockwork. *PLoS Biol*, 2007, **5**(4): e93
- [32] Murayama Y, Mukaiyama A, Imai K, *et al.* Tracking and visualizing the circadian ticking of the cyanobacterial clock protein KaiC in solution. *EMBO J*, 2011, **30**(1): 68–78
- [33] Nishiwaki-Ohkawa T, Kitayama Y, Ochiai E, *et al.* Exchange of ADP with ATP in the C II ATPase domain promotes autophosphorylation of cyanobacterial clock protein KaiC. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, **111**(12): 4455–4460
- [34] Murakami R, Mutoh R, Iwase R, *et al.* The roles of the dimeric and tetrameric structures of the clock protein KaiB in the generation of circadian oscillations in cyanobacteria. *J Biol Chem*, 2012, **287**(35): 29506–29515

The Mechanism of KaiB-KaiC Interaction of The Cyanobacterial Circadian Oscillator*

LIU Song, LIU Sen**

(Institute of Molecular Biology, College of Medical Science, China Three Gorges University, Yichang 443002, China)

Abstract Cyanobacteria are the simplest organisms with a confirmed circadian clock system. The pacemaker of cyanobacterial circadian clock is made of three proteins, KaiA, KaiB, and KaiC. A major finding on this system is that the circadian oscillation of the pacemaker system is independent of transcriptional/translational controls, and what is more intriguing is that this oscillation can be reconstituted *in vitro* with only these three proteins, in addition to ATP and an appropriate inorganic buffer. Molecular studies have shown that KaiA promotes the self-phosphorylation of KaiC, whereas KaiB antagonize KaiA's role and induce the de-phosphorylation of KaiC. An unsolved question is how KaiB interacts with KaiC exactly, including the binding site of KaiB on KaiC, the oligomerization form of KaiB, and the exact modulating mechanism of KaiB. Here, we reviewed the most recent progress on the KaiB-KaiC interaction mechanism, including our preliminary results on the KaiB-KaiC interaction, and provided a possible molecular mechanism of the molecular oscillator. We hope this review will provide a timely perspective on the study of this model system.

Key words circadian oscillator, circadian clock, KaiB, KaiC

DOI: 10.16476/j.pibb.2014.0203

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (21103098), Beijing National Laboratory for Molecular Sciences, and China Three Gorges University (2011071001, KJ2012B004, KJ2014H015).

**Corresponding author.

Tel: 86-717-6397179, E-mail: senliu.ctgu@gmail.com

Received: November 4, 2014 Accepted: December 3, 2014