

模式生物粗糙脉孢菌光受体的研究进展*

欧秀元 何琪杨**

(中国医学科学院北京协和医学院医药生物技术研究所, 北京 100050)

摘要 粗糙脉孢菌是一种重要的模式生物, 在遗传调节机制、昼夜节律运行以及真菌光应答反应研究中起重要的作用。本综述主要介绍粗糙脉孢菌光受体 WC-1 和 VVD 的结构与功能, 以及它们参与调节昼夜节律和光适应机制方面的研究进展。在该真菌中, 所有已知的光应答反应都受蓝光调节, 由光受体 WC-1 和 VVD 介导。WC-1 是该真菌的转录因子, 介导最初的光反应过程, 产生 VVD 等多种光反应蛋白, 而 VVD 通过负反馈机制抑制 WC-1 的转录作用。此外, *vvd* 基因已经用于构建在哺乳动物中表达的光调节基因元件。

关键词 粗糙脉孢菌, 光受体, 昼夜节律, 光适应

学科分类号 Q936

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2012.00636

光对地球上的生命极其重要, 植物的光合作用构成了生态系统的基础, 并决定了大气的组成成分。对于大多数的生物来说, 光还具有调节生物发育、代谢、神经活动、昼夜节律运行等重要作用^[1]。

模式生物粗糙脉孢菌(*Neurospora crassa*)是一种丝状真菌, 属于子囊菌纲, 国内曾用名红色面包酶。该真菌生长快速、遗传操作容易、研究历史悠久, 是一种重要的模式生物。由于其子囊中的子囊孢子黑白相间有序排列, 粗糙脉孢菌是验证孟德尔第三遗传规律的经典实验材料。该真菌的全基因组已经测序完成, 共有 1 万个编码蛋白的基因^[2]。

1941 年, Beadle 和 Tatum 通过研究粗糙脉孢菌的突变体, 提出了著名的“一个基因决定一种酶”的假说^[3], 从而荣获 1958 年诺贝尔生理学 and 医学奖。

到目前为止, 所有在粗糙脉孢菌中发现的光应答反应都由蓝光诱导, 通过蓝光受体 WC-1 和 VVD 所介导, 这些受体调节光反应的基本过程已经研究清楚。此外, 利用 VVD 的特性所构建的基因调节元件, 成功地诱导哺乳动物胰岛素的表达^[4]。这些研究充分展示了基础研究成果具有不可预知的应用潜力, 因为这是意想不到的应用成果。本文主要介绍粗糙脉孢菌光受体 WC-1 和 VVD 的结构与

功能, 以及它们参与调节昼夜节律和光适应机制方面的研究进展。

1 光受体 WC-1 蛋白

1.1 第一个发现和确认的真菌光受体

真菌是生物的一大门类, 属于腐生生物。部分真菌能在光照下迅速生长, 推测可能存在与植物类似的光受体, 但一直以来缺乏直接的分子证据, 该问题导致真菌是否存在光受体的争论持续了 40 多年。在粗糙脉孢菌中, 所有光诱导的形态发生仅受蓝光激发。在蓝光照射下, 粗糙脉孢菌实现菌丝体类胡萝卜素的合成、促进分生孢子的形成以及原子囊壳的发育等功能。在该真菌中, 存在着一种被称为重复序列诱导点突变 (repeat-induced point mutation, RIP) 的特有遗传突变现象。当将相关的基

* 国家自然科学基金(81273553, 30772284), 国家“重大新药创制”科技重大专项(2012ZX09301002-001-015)和教育部博士点基金(20121106110043)资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 010-63131856, E-mail: qiyang_he@vip.163.com

收稿日期: 2013-07-18, 接受日期: 2014-02-17

因转化到含有该基因的粗糙脉孢菌中, 减数分裂后会导致引入基因和自身基因的共同沉默. 利用 RIP 技术, 得到了缺失光反应能力的突变体 white collar-1(WC-1)和 white collar-2(WC-2)^[5].

1996年, 意大利 Macino 实验室利用上述突变体成功地克隆了 *wc-1* 基因, 该基因编码 1 154 个氨基酸, 分子质量为 125 ku. 序列分析表明: *wc-1* 编码的蛋白质(WC-1)是一个具有核定位序列(KKKRK)的可溶性蛋白质, C 端具有一个锌指型 DNA 结合结构域(C-X2-C-X18-C-X2-C), 而 N 端具有一个多 Q 序列. 另外, WC-1 具有 3 个 PAS (Per-Arnt-Sim)结构域, 用于与其他蛋白的结合, 其中最靠近 N 端的 PAS 结构域, 又称为 LOV (light, oxygen or voltage)结构域^[6]. Macino 实验室的另一项成果是克隆了 *wc-2* 基因, 该基因编码 WC-1 的结合分子 WC-2, WC-2 具有一个 PAS 结构域和锌指型转录激活结构域, 分子质量为 67 ku^[7]. WC-1 和 WC-2 通过 PAS 结构域, 形成活性转录复合体(white collar-1(WC-1)/white collar-2(WC-2)-containing complex, WCC). WC-2 是 WCC 结合 DNA 和转录激活所必需的, 在 WC-2 不存在的情况下 WC-1 不能结合 DNA^[8].

但 WC-1 是否为光受体, 仍然缺乏直接的实验证据. 作为一个光受体, 最重要的依据是能结合小分子发色团(chromophore), 通过该化学物质将光信号转变为生化反应信号. 根据植物光受体的研究经验, 在大肠杆菌中异源表达的光受体基因, 均能从蛋白质中检测到发色团. 大肠杆菌或昆虫细胞表达的 WC-1 并不能结合发色团(何琪杨未发表的研究结果), 让人质疑 WC-1 作为光受体的可能性.

何琪杨等^[9]通过定点突变去除 WC-1 中的 LOV 结构域, 致使 WC-1 突变体丧失了光反应, 从而证实 WC-1 确实参与了光反应过程. 为了进一步证实 WC-1 为光受体, 何琪杨等使用了另一条全新的研究路线: 在 WC-2 蛋白两端分别连接上 myc 和多组氨酸标签, 转染到 *wc-2* 突变体中, 通过从粗糙脉孢菌内分离 WCC, 证实了 WC-1 含有核黄素类发色团(flavin adenine dinucleotide, FAD)^[9]. 另外, 达特茅斯医学院的 Dunlap 研究团队显示: 体外表达的 WCC, 只有加入 FAD 后才具有明显的转录活性^[10]. 这 2 项研究直接证明了 WC-1 确实起到光受体的功能.

1.2 WC-1 调节昼夜节律和光应答反应的机制

在粗糙脉孢菌内, WC-1 和 WC-2 形成具有转录活性的 WCC 复合体. 该复合体一方面激活昼夜钟核心分子 FRQ(frequency)的表达, 另一方面在光照的条件下, 控制光调节基因的表达. 可以说 WC-1 是自然界最为奇特的分子, 光信号转导通路只由一种分子负责. 通过蛋白质谱测定法, 何琪杨等^[11]从 WC-1 的 C 端鉴定出 5 个磷酸化位点, 这些位点与 WC-1 的光反应无关. 缺失该 5 个磷酸化位点的突变体, 其昼夜节律时相明显缩短, 表明这些位点的作用是精确控制昼夜钟的运行. 磷酸酶 PP4 通过使 WC-1 去磷酸化而恢复 WCC 的活性^[12], 从另一个方面说明磷酸化在调节 WC-1 功能中的重要作用. 通过分析光反应 *al-3* 基因启动子的表观遗传修饰, 可以观察到组蛋白 H3 的 Lys14 位乙酰化, 该过程依赖于 WC-1^[13].

何琪杨等^[14]对 WC-1 的光反应机制进行了动态研究. 利用凝胶迁移分析技术发现, 在黑暗条件分离的 WCC 与光照条件下的明显不同, 光照后, WCC 的迁移率明显下降, 称为大分子 L-WCC. 将这些受短时光照激活的 WCC 重新放在黑暗条件下, 即使达到 4 h, 迁移率也没有改变, 表明 WCC 不能循环使用. 在光照条件下, 使用染色质免疫沉淀分析发现, WCC 迅速与相关启动子结合, 5 min 达到最大值, 然后结合数量逐步下降. 接受光照 10~45 min, WC-1 蛋白出现高度磷酸化. 使用磷酸酶处理去除 WC-1 的磷酸化, 可以观察到与相关基因启动子的结合明显增加, 从而证实了光照后的 L-WCC 是由于磷酸化而影响其结合能力^[14].

2 粗糙脉孢菌光受体 VVD

2.1 光受体 VVD 的生化特征

在粗糙脉孢菌中, 最明显的光应答效应是类胡萝卜素的生物合成, 由受光诱导基因 *al-1*、*al-2* 与 *al-3* 所介导. 在黑暗条件下, 菌丝体中仅检测到微量的类胡萝卜素, 呈现白色表型. 接受光照后, 粗糙脉孢菌中所有与类胡萝卜素合成的基因迅速表达, 合成类胡萝卜素, 菌丝体呈现浅黄色表型. 通过筛选得到一种光调节缺陷的突变株, 表现出非常鲜艳的橙黄色, 命名为 VVD(vivid). 通过染色体步移法从该突变株中分离到 *vvd* 基因, 其开放阅读框具有 2 个完整 Kozak 序列的起始密码子, 它们

之间相差 9 个氨基酸, 分别能产生 186 和 177 个氨基酸的蛋白质(VVD), 分子质量分别为 21.3 和 20.3 ku^[15]. VVD 含有一个 LOV 结构域, 通过该结构域与具有 PAS 结构域的其他蛋白质相结合. 氨基酸序列比对分析显示, VVD 与各种蓝光受体具有高度相似性. 其中, VVD 与 WC-1 LOV 结构域的序列相似度高达 72%, 与植物蓝光受体向光色素和光敏色素 3(phy3)的相似性分别为 61%和 54%^[16].

在大肠杆菌中异源表达 VVD 蛋白, 可以检测到 VVD 融合蛋白能与核黄素类的发色团 FMN 或 FAD 结合, 这与 WC-1 只能结合 FAD 明显不同. 在光照下, VVD 形成核黄素 - 半胱氨酸复合物, 可循环使用, 符合光受体的典型特征, 此外, 在细胞质中检测到大量的 VVD^[17]. 2010 年 Hunt 等^[18]的研究发现, VVD 也存在于细胞核中, 能与其他核心因子相互作用.

2.2 光受体 VVD 的功能与调节

VVD 只能在光照后产生, 其基因表达由 WCC 启动, 是一种光调节基因. VVD 的主要功能是调节光适应(photoadaptation)和昼夜节律在不同环境下的分子转换, 以精确地适应周围的环境. 缺乏 *vvd* 基因的突变体, 由于不能适应光环境下持续合成类胡萝卜素而呈现鲜艳的颜色. 在该突变体中, WC-1 持续地处于超磷酸化状态^[16]. VVD 对昼夜钟的调节作用表现在黎明时防止其重新设定, 而在黄昏时, 通过影响 *frq* RNA 的转换促进昼夜钟的重新设定^[19].

对暗状态和光状态的 VVD 晶体结构分析发现: 可以观察到一种特殊的 N 端帽状结构, 形成一个插入环以接受核黄素分子. 光照射后引起核黄素质子化而导致 N 端构象变化. 将 VVD 蛋白中的半胱氨酸突变成丝氨酸后消失光引起的构象变化, 不能传递光信号^[20]. 通过排阻层析、平衡超离心以及动态和静态光散射分析, 可以观察到 VVD 形成快速交换的二聚体, 并且 VVD C71 位对形成二聚体是必需的^[21]. 通过 X 射线小角散射术分析从野生型菌种中分离的 VVD 蛋白, 可以观察到从黑暗中分离的 VVD 有两种构象, 一种为紧密结构, 另一种为与晶体 VVD 观察到的单体结构; 这两种构象的 VVD 均能对光反应而形成二聚体. 截面重构技术(envelope reconstruction)分析发现, 短暂光态二聚体的结构是平行的亚单位^[22].

3 光受体调节粗糙脉孢菌昼夜节律的机制

昼夜节律是生物体内重要的整体调节机制, 与许多疾病如肿瘤、代谢性疾病、心脑血管疾病等的发生密切相关. 该调节机制普遍存在于多数真核生物和部分原核生物中, 是生物适应地球自转的昼夜变化而产生的. 控制昼夜节律自动运行的机制由昼夜钟(circadian clock)控制. 在此, 强调一下昼夜钟与生物钟(biological clock)的区别, 生物钟概念所包括的范围更广, 除了包括昼夜节律之外, 还包括机制完全不同的女性月经周期、鱼类洄游和鸟类季节性迁移等生理现象, 国外的研究文献对此均有明确的区别.

昼夜钟包括输入、振荡器和输出 3 个部分, 通过转录 / 翻译反馈循环维持自动运行, 该基本调节机制在模式生物蓝藻^[23]、粗糙脉孢菌、果蝇^[24]和小鼠中均相似, 说明存在进化上的保守性. 多数昼夜钟核心因子的表达有昼夜性差异, 自动运行, 也就是说在恒温、完全黑暗的环境下, 昼夜钟也能正常运行. 昼夜钟的自动运行通过正负反馈环实现, 正反馈环由转录因子负责, 启动负责负反馈环的核心因子表达, 通过蛋白激酶等多种修饰负反馈因子, 抑制转录因子的活性而停止相关基因的表达. 最后, 这些蛋白通过泛素 - 蛋白酶体通路降解, 启动另一轮循环^[25-27], 从而实现昼夜钟的自动运行.

在粗糙脉孢菌中, 昼夜节律的表型是通过分生孢子带(conidiation)的出现和分布特征作为观察指标, 将菌丝接种到一种两端弯曲、特制的竞争性生长管(race tube)中实现. 共有超过 10 个组分参与该昼夜钟的运行, 其中 WC-1、WC-2、FRQ 和 FRH (frequency-interacting RNA helicase)处于核心位置. FRQ 是该菌中第一个被发现的昼夜钟负调节蛋白, 由 989 个氨基酸残基组成, 有多个磷酸化修饰位点. FRH 是一种含有 DEAD 盒的 RNA 解旋酶, 与酵母 Dob1p/Mtr4p 蛋白具有同源性, 与 FRQ 形成复合物. WC-1 和 WC-2 组成的 WCC 为正反馈环, 驱动负反馈因子 FRQ 和光调节基因的表达, FRQ 通过磷酸化等修饰抑制 WCC 的转录活性, 构成了互锁(interlocked)的控制关系^[28-30].

除了 Dunlap 院士研究团队外, 美国德州大学西南医学中心生理系的刘一教授研究团队对粗糙脉孢菌昼夜钟的核心调控也做出了十分重要的贡献. 除了上述对 WC-1 光受体的研究之外, 他们还阐明

了酪蛋白激酶 I、II 以及蛋白激酶 A、钙调蛋白激酶、磷酸酶 PP1、PP-2A、PP4 对 FRQ 和 WC-1 的磷酸化调节机制^[31-34]。何群等阐明了泛素-蛋白酶体通路(FWD-1 和 COP9)对 FRQ 降解的机制^[35-37]。在成萍等^[38]发现 FRH 结合 FRQ 调节昼夜钟的基础上, 郭金虎等^[39-40]阐明了剪切酶体(exosome)对转录后负反馈环的重要作用, 并发现 FRH/FRQ 复合体对 WCC 的调节作用。2013 年, 刘一研究团队发现使用非最适密码子能影响 FRQ 蛋白的表达^[41]。

德国海德堡大学 Brunner 研究团队对光受体调节昼夜钟的机制进行了深入研究, 阐明了磷酸化调节 WCC 活性的动态机制: 低水平磷酸化的 WCC 与 FRQ 基因的启动子结合, 而高度磷酸化的 WCC 缺乏转录活性, 磷酸酶 PP-2A 能直接使 WCC 去磷酸化而恢复其活性^[42]。此外, 他们还发现 WCC 在细胞质与细胞核之间的快速转移, FRQ 引起的 WCC 失活和 PP-2A 引起的重新活化, 在数分钟内发生^[43]。糖原合成酶激酶(glycogen synthase kinase, GSK)通过磷酸化 WC-1 而起作用, 降低 GSK 的表达能增加 WC-1 的积累, 调节昼夜节律的运行^[44]。在粗糙脉孢菌中, Brunner 研究团队发现代谢相关基因 CSP1(conidial separation 1)是一个普遍存在的抑制昼夜钟的因子, 其表达受 WCC 的控制, 但 CSP1 又能结合到 *wc-1* 的启动子上, 抑制 WC-1 的表达^[45-46]。

昼夜钟的一个重要特征是具有温度补偿(temperature compensation)。温度补偿机制是指生物对外界温度变化仍然保持昼夜钟准确设定时间的能力。对于恒温的哺乳类动物来说, 温度补偿机制可能没有那么重要。而对其他低等生物来说, 温度补偿对保持昼夜钟稳定运行起重要的作用。在粗糙脉孢菌中, 刘一教授的早期研究证明了温度调节 FRQ 的翻译控制确定昼夜钟的温度反应, 阐明了 FRQ 的表达量与温度的高低相适应, 中等温度显著影响光-暗转移而调节昼夜钟的时间设定^[47-48]。通过分析各种影响昼夜钟的激酶, Dunlap 实验室发现只有酪蛋白激酶 II, 尤其是 $\beta 1$ 亚单位与温度补偿有关, 这是直接磷酸化 FRQ 起作用的^[49]。除了 WC-1 外, VVD 在温度补偿中也有作用。*vvd* 缺失株丧失了昼夜钟的振幅, 并且随着温度降低, 其 VVD 的表达增加, 另外, FRQ 的磷酸化水平在该缺失株中也明显改变^[50]。

4 WC-1 和 VVD 互作调节光适应的机制

光适应是指生物能适应长时间光照而保持对光强度变化敏感性的能力, 是生物正确辨别时间信息所必需的。在粗糙脉孢菌中, WCC 启动光控制基因的合成, 而 VVD 是负调控因子, 抑制 WCC 活性, 以适应光环境。在光照的条件下, WC-1 有一个短暂的高度磷酸化过程, 大约 1 h 后恢复正常, 而 *vvd* 缺失株中, 持续的 WC-1 高度磷酸化而导致光适应能力的丧失就是最直接的证据^[46]。将 WC-1 LOV 结构域替换为 VVD 的 LOV 结构域, WC-1 仍然保持对光的反应性, 表明 LOV 结构域的功能是保守的^[51]。

利用荧光显微镜分析活体粗糙脉孢菌中表达连接绿色荧光蛋白 GFP 的 VVD(VVD-GFP)的分布, 发现其存在于细胞质和细胞核中, 且在细胞核中的含量非常大。此外, 甲醛交联粗糙脉孢菌细胞后分离细胞核和细胞质, 发现在细胞核组分中存在大量的 VVD^[52]。使用交联剂固定细胞, 然后进行免疫共沉淀, 发现 VVD 和 WCC 能形成复合体。VVD 除了能与 WCC 形成复合体外, 还能与 FRH 形成复合体^[48]。这些研究表明: WC-1 和 VVD 之间能相互作用, 共同调节光适应的过程, 保持昼夜钟的敏感性。

VVD 的 LOV 结构域能与 WC-1 的 LOV 结构域发生较低亲和性的相互作用, 该作用需要光的存在^[53]。WCC 和 VVD 通过 LOV 结构域形成高度动态的同源或者异源二聚体。在黑暗条件下, VVD 的节律性表达受到抑制, VVD 含量也下降到检测水平之下。在黑暗中持续几天之后, VVD 的消失使得 WCC 对光信号特别敏感。接受光照后, WCC 首先形成同源二聚体, 有效地激活 *vvd* 基因表达。光照一段时间后, VVD 不断积累成为 WCC 的竞争性抑制物, 最终导致光诱导转录反应的弱化。VVD 的表达与光强度相适应^[53]。VVD 介导的光激活 WCC 的脱敏化, 是粗糙脉孢菌光适应的分子机制。有关 WC-1 和 VVD 在光照和黑暗环境下的分子相互作用, 可见图 1。

在清晨光照的条件下, WC-1 与 WC-2 形成的蛋白复合体 WCC 启动包括 *vvd* 等多种光反应基因表达, VVD 蛋白通过与 WCC 结合而抑制其转录活性, 从而实现光适应的过程。晚上黑暗时, VVD 蛋白降解, WCC 与光反应基因的启动子解离, 准备进入下一个光反应循环。

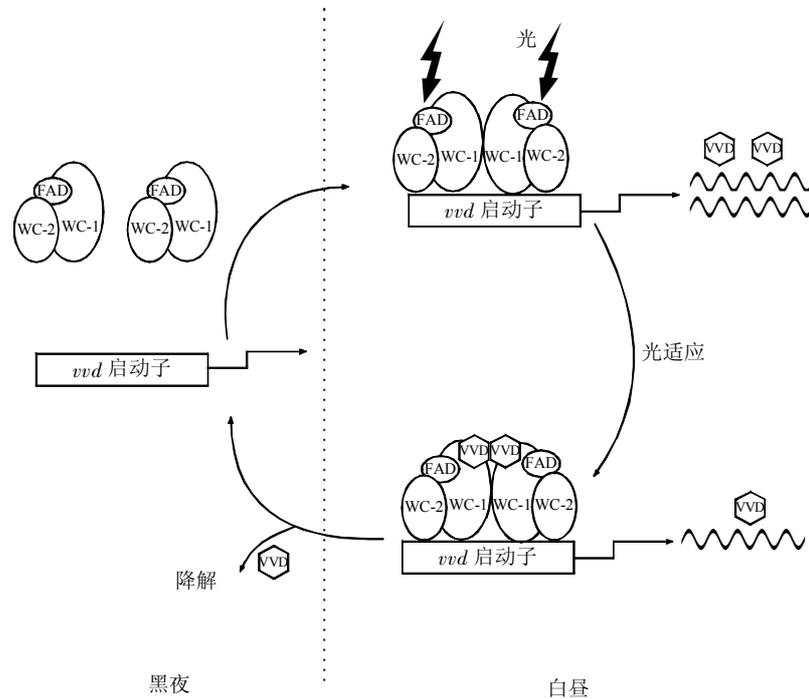


Fig. 1 The interaction and regulation mechanism of WC-1 and VVD

图 1 WC-1 和 VVD 的相互作用及其调节机制

5 研究展望

综上所述, 通过多个实验室对光受体 WC-1 和 VVD 的深入研究, 已经明确了粗糙脉孢菌光反应的精细调节过程. 通过对粗糙脉孢菌光受体的研究, 对其他真菌的光生理调节机制有重要的指导意义, 有助于真菌引起相关疾病的防治和相关代谢产物的研究. 就粗糙脉孢菌而言, 虽然 *wc-1* 缺失菌株不存在目前常规检测的光应答反应, 通过基因芯片在基因组水平分析光诱导反应, 仍然有部分基因的表达明显升高^[54]. 在粗糙脉孢菌中也存在隐花色素基因和光敏色素基因, 将这些基因突变并不影响光应答反应(刘一实验室未发表的实验结果). 有可能在粗糙脉孢菌中存在与 WC-1 和 VVD 无关的光应答反应机制, 该现象值得深入研究.

2012 年, 华东理工大学杨弋教授研究团队将 *vvd* 基因连接到哺乳动物的启动子上, 构建了受蓝光调节的新型胰岛素基因表达系统^[4]. 将该系统转染到小鼠体内, 蓝光照射能明显诱导胰岛素基因的表达. 该技术展示了控制基因表达的新模式, 开辟了基因治疗及控制基因表达研究的新途径.

参 考 文 献

- [1] 刘秀丽, 周 炜, 曾绍群. 光控制神经活动研究进展. 生物化学与生物物理进展, 2009, **36**(12): 1509-1515
Liu X L, Zhou W, Zeng S Q. Prog Biochem Biophys, 2009, **36**(12): 1509-1515
- [2] Davis R H, Perkins D D. Timeline: *Neurospora*: a model of model microbes. Nat Rev Genet, 2002, **3**(5): 397-403
- [3] Beadle G W, Tatum E L. Genetic control of biochemical reactions in *Neurospora*. Proc Natl Acad Sci USA, 1941, **27**(11): 499-506
- [4] Wang X, Chen X, Yang Y. Spatiotemporal control of gene expression by a light-switchable transgene system. Nat Methods, 2012, **9**(3): 266-269
- [5] Russo V E. Blue light induces circadian rhythms in the *bd* mutant of *Neurospora*: double mutants *bd*, *wc-1* and *bd*, *wc-2* are blind. J Photochem Photobiol B, 1988, **2**(1): 59-65
- [6] Ballario P, Vittorioso P, Magrelli A, et al. White collar-1, a central regulator of blue light responses in *Neurospora*, is a zinc finger protein. EMBO J, 1996, **15**(7): 1650-1657
- [7] Linden H, Macino G. White collar 2, a partner in blue-light signal transduction, controlling expression of light-regulated genes in *Neurospora crassa*. EMBO J, 1997, **16**(1): 98-109
- [8] Talora C, Franchi L, Linden H, et al. Role of a white collar-1-white collar-2 complex in blue-light signal transduction. EMBO J, 1999, **18**(18): 4961-4968
- [9] He Q, Cheng P, Yang Y, et al. White collar-1, a DNA binding

- transcription factor and a light sensor. *Science*, 2002, **297**(5582): 840–843
- [10] Froehlich A C, Liu Y, Loros J J, *et al.* White Collar-1, a circadian blue light photoreceptor, binding to the frequency promoter. *Science*, 2002, **297**(5582): 815–819
- [11] He Q, Shu H, Cheng P, *et al.* Light-independent phosphorylation of WHITE COLLAR-1 regulates its function in the *Neurospora circadian* negative feedback loop. *J Biol Chem*, 2005, **280**(17): 17526–17532
- [12] Cha J, Chang S S, Huang G, *et al.* Control of WHITE COLLAR localization by phosphorylation is a critical step in the circadian negative feedback process. *EMBO J*, 2008, **27**(24): 3246–3255
- [13] Grimaldi B, Coiro P, Filetici P, *et al.* The *Neurospora crassa* White Collar-1 dependent blue light response requires acetylation of histone H3 lysine 14 by NGF-1. *Mol Biol Cell*, 2006, **17**(10): 4576–4583
- [14] He Q, Liu Y. Molecular mechanism of light responses in *Neurospora*: from light-induced transcription to photoadaptation. *Genes Dev*, 2005, **19**(23): 2888–2899
- [15] Wan Y, Liu H, Li C, *et al.* Genome analysis on linkage group VI of *Neurospora crassa*. *Fungal Genet Biol*, 1997, **21**(3): 329–336
- [16] Heintzen C, Loros J J, Dunlap J C. The PAS protein VIVID defines a clock-associated feedback loop that represses light input, modulates gating, and regulates clock resetting. *Cell*, 2001, **104**(3): 453–464
- [17] Schwerdtfeger C, Linden H. VIVID is a flavoprotein and serves as a fungal blue light photoreceptor for photoadaptation. *EMBO J*, 2003, **22**(18): 4846–4855
- [18] Hunt S M, Thompson S, Elvin M, *et al.* VIVID interacts with the WHITE COLLAR complex and FREQUENCY-interacting RNA helicase to alter light and clock responses in *Neurospora*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, **107**(38): 16709–16714
- [19] Elvin M, Loros J J, Dunlap J C, *et al.* The PAS/LOV protein VIVID supports a rapidly dampened daytime oscillator that facilitates entrainment of the *Neurospora circadian* clock. *Genes Dev*, 2005, **19**(21): 2593–2605
- [20] Zoltowski B D, Schwerdtfeger C, Widom J, *et al.* Conformational switching in the fungal light sensor Vivid. *Science*, 2007, **316**(5827): 1054–1057
- [21] Zoltowski B D, Crane B R. Light activation of the LOV protein vivid generates a rapidly exchanging dimer. *Biochemistry*, 2008, **47**(27): 7012–7019
- [22] Lamb J S, Zoltowski B D, Pabit S A, *et al.* Illuminating solution responses of a LOV domain protein with photocoupled small-angle X-ray scattering. *J Mol Biol*, 2009, **393**(4): 909–919
- [23] 林少苑, 李淑彬. 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*, 2006, **33**(8): 719–723
Lin S Y, Li S B. *Prog Biochem Biophys*, 2006, **33**(8): 719–723
- [24] 周先举, 袁春燕, 杨旭科, 等. 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*, 2005, **32**(1): 3–8
Zhou X J, Yuan C Y, Yang X K, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2005, **32**(1): 3–8
- [25] Dunlap J C. Molecular bases for circadian clocks. *Cell*, 1999, **96**(2): 271–290
- [26] 徐军, 童建. 生物钟基因研究进展. *生物化学与生物物理进展*, 2001, **28**(2): 181–183
Xu J, Tong J. *Prog Biochem Biophys*, 2001, **28**(2): 181–183
- [27] 施建成, 罗敏. 生物钟体系中色噪音诱导的日夜节律振荡与内信号随机共振. *生物化学与生物物理进展*, 2010, **37**(1): 85–93
Shi J C, Luo M. *Prog Biochem Biophys*, 2010, **37**(1): 85–93
- [28] Crosthwaite S K, Dunlap J C, Loros J J. *Neurospora wc-1* and *wc-2*: transcription, photoresponses, and the origins of circadian rhythmicity. *Science*, 1997, **276**(5313): 763–769
- [29] Lee K, Loros J J, Dunlap J C. Interconnected feedback loops in the *Neurospora circadian* system. *Science*, 2000, **289**(5476): 107–110
- [30] Cheng P, Yang Y, Liu Y. Interlocked feedback loops contribute to the robustness of the *Neurospora circadian* clock. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98**(13): 7408–7413
- [31] Yang Y, Cheng P, Zhi G, *et al.* Identification of a calcium/calmodulin-dependent protein kinase that phosphorylates the *Neurospora circadian* clock protein FREQUENCY. *J Biol Chem*, 2001, **276**(44): 41064–41072
- [32] Yang Y, Cheng P, Liu Y. Regulation of the *Neurospora circadian* clock by casein kinase II. *Genes Dev*, 2002, **16**(8): 994–1006
- [33] Yang Y, He Q, Cheng P, *et al.* Distinct roles for PP1 and PP2A in the *Neurospora circadian* clock. *Genes Dev*, 2004, **18**(3): 255–260
- [34] Huang G, Chen S, Li S, *et al.* Protein kinase A and casein kinases mediate sequential phosphorylation events in the circadian negative feedback loop. *Genes Dev*, 2007, **21**(24): 3283–3295
- [35] He Q, Cheng P, Yang Y, *et al.* FWD1-mediated degradation of FREQUENCY in *Neurospora* establishes a conserved mechanism for circadian clock regulation. *EMBO J*, 2003, **22**(17): 4421–4430
- [36] He Q, Cheng P, He Q, *et al.* The COP9 signalosome regulates the *Neurospora circadian* clock by controlling the stability of the SCFFWD-1 complex. *Genes Dev*, 2005, **19**(13): 1518–1531
- [37] He Q, Cha J, He Q, *et al.* CKI and CKII mediate the FREQUENCY-dependent phosphorylation of the WHITE COLLAR complex to close the *Neurospora circadian* negative feedback loop. *Genes Dev*, 2006, **20**(18): 2552–2565
- [38] Cheng P, He Q, He Q, *et al.* Regulation of the *Neurospora circadian* clock by an RNA helicase. *Genes Dev*, 2005, **19**(2): 234–241
- [39] Guo J, Cheng P, Yuan H, *et al.* The exosome regulates circadian gene expression in a posttranscriptional negative feedback loop. *Cell*, 2009, **138**(6): 1236–1246
- [40] Guo J, Cheng P, Liu Y. Functional significance of FRH in regulating the phosphorylation and stability of *Neurospora circadian* clock protein FRQ. *J Biol Chem*, 2010, **285**(15): 11508–11515
- [41] Zhou M, Guo J, Cha J, *et al.* Non-optimal codon usage affects expression, structure and function of clock protein FRQ. *Nature*, 2013, **495**(7439): 111–115
- [42] Schafmeier T, Haase A, Káldi K, *et al.* Transcriptional feedback of *Neurospora circadian* clock gene by phosphorylation-dependent inactivation of its transcription factor. *Cell*, 2005, **122**(2): 235–246
- [43] Schafmeier T, Diernfellner A, Schäfer A, *et al.* Circadian activity

- and abundance rhythms of the *Neurospora* clock transcription factor WCC associated with rapid nucleo-cytoplasmic shuttling. *Genes Dev*, 2008, **22**(24): 3397–3402
- [44] Tataroglu Ö, Lauinger L, Sancar G, *et al.* Glycogen synthase kinase is a regulator of the circadian clock of *Neurospora crassa*. *J Biol Chem*, 2012, **287**(44): 36936–36943
- [45] Sancar G, Sancar C, Brügger B, *et al.* A global circadian repressor controls antiphasic expression of metabolic genes in *Neurospora*. *Mol Cell*, 2011, **44**(5): 687–697
- [46] Sancar G, Sancar C, Brunner M. Metabolic compensation of the *Neurospora* clock by a glucose-dependent feedback of the circadian repressor CSP1 on the core oscillator. *Genes Dev*, 2012, **26**(21): 2435–2442
- [47] Liu Y, Garceau N Y, Loros J J, *et al.* Thermally regulated translational control of FRQ mediates aspects of temperature responses in the *Neurospora* circadian clock. *Cell*, 1997, **89**(3): 477–486
- [48] Liu Y, Merrow M, Loros J J, *et al.* How temperature changes reset a circadian oscillator. *Science*, 1998, **281**(5378): 825–829
- [49] Mehra A, Shi M, Baker C L, *et al.* A role for casein kinase 2 in the mechanism underlying circadian temperature compensation. *Cell*, 2009, **137**(4): 749–760
- [50] Hunt S M, Elvin M, Crosthwaite S K, *et al.* The PAS/LOV protein VIVID controls temperature compensation of circadian clock phase and development in *Neurospora crassa*. *Genes Dev*, 2007, **21**(15): 1964–1974
- [51] Cheng P, He Q, Yang Y, *et al.* Functional conservation of light, oxygen, or voltage domains in light sensing. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100**(10): 5938–5943
- [52] Chen C H, DeMay B S, Gladfelter A S, *et al.* Physical interaction between VIVID and white collar complex regulates photoadaptation in *Neurospora*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, **107**(38):16715–16720
- [53] Malzahn E, Ciprianidis S, Káldi K, *et al.* Photoadaptation in *Neurospora* by competitive interaction of activating and inhibitory LOV domains. *Cell*, 2010, **142**(5): 762–772
- [54] Chen C H, Ringelberg C S, Gross R H, *et al.* Genome-wide analysis of light-inducible responses reveals hierarchical light signalling in *Neurospora*. *EMBO J*, 2009, **28**(8): 1029–1042

Advances in The Studies of Photoreceptors in Model Organism of *Neurospora crassa**

OU Xiu-Yuan, HE Qi-Yang**

(Institute of Medicinal Biotechnology, Peking Union Medical College and Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100050, China)

Abstract The filamentous fungus *Neurospora crassa* is an important model organism for studying genetic regulation, circadian rhythm and light response. This review summarized the structure and functions of WC-1 and VVD, and their participation in regulation of circadian rhythm and photoadaptation. All known light responses in *Neurospora* are regulated by blue light through two photoreceptors WC-1 and VVD. WC-1 is a transcription factor in this fungus and initiated the light response, generating a lot of light-responded proteins, such as VVD. VVD suppresses the transcription function of WC-1 through negative feedback mechanism. In addition, the *vvd* gene has been applied to construct the photoresponsive elements of various genes in mammalian systems.

Key words *Neurospora crassa*, photoreceptor, circadian rhythm, photoadaptation

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2012.00636

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (21873553, 30772284), National Mega-Project for Innovative Drugs (2012ZX09301002-001-015) and Ph.D. Programs Foundation of Ministry of Education of China (20121106110043).

**Corresponding author.

Tel: 86-10-63131856, E-mail: qiyang_he@vip.163.com

Received: July 18, 2013

Accepted: February 17, 2014