

蓝藻生物钟分子机理的研究进展

林少苑 李淑彬*

(华南师范大学生命科学学院, 广州 510631)

摘要 蓝藻是具有内源性生物钟的简单生物. 虽然蓝藻生物钟具有跟真核生物同样的基础特征, 但其相关基因和蛋白质与真核生物没有同源性. 蓝藻生物钟的核心是 *kai* 基因簇及其编码的蛋白 KaiA, KaiB 和 KaiC. 这三种 Kai 蛋白相互作用调节 KaiC 的磷酸化状态, 从而产生昼夜节律信息. KaiC 的磷酸化循环是昼夜节律的起搏器, 调控包括 *kai* 基因在内的相关基因的节律性表达. 组氨酸蛋白激酶的磷酸化传递可将环境信息输入和将节律信息输出生物钟核心.

关键词 蓝藻, 生物钟基因, 昼夜节律

学科分类号 Q29

生物钟是一种以近似 24 h 为周期的自主维持的振荡器. 从单细胞到多细胞生物, 从原核到真核生物, 都存在内源性生物钟驱动的以近 24 h 为周期的昼夜节律现象. 生物钟接受环境周期变化的信号并自激振荡来调控机体生理周期和生理活动, 使生物体能适应外界环境的变化. 由生物体内源性生物钟所产生的昼夜节律是近年来的研究热点.

蓝藻是目前发现的具有昼夜节律的最简单生物, 其许多生理过程如固氮活性、细胞分裂和氨基酸吸收等都具有节律性. 蓝藻生物钟和其他所有的生物钟一样, 具有三部分: 中央振荡器(central oscillator), 信息输入途径(input)和信息输出途径(output)^[1]. 中央振荡器是生物钟的核心, 产生昼夜节律信息. 输入途径将环境信号如光、温度、化学物质等传给振荡器, 使机体内在周期与外界环境变化同步化. 输出途径将节律信息放大并传递到下游钟控基因(clock-controlled genes), 实现对各种生理活动的调控.

虽然蓝藻生物钟具有跟真核生物同样的基础特征, 但蓝藻的生物钟基因和相关蛋白质与真核生物不具同源性^[1]. 对蓝藻昼夜节律的研究有助于从生理上和遗传上阐明生物节律的基本分子机制. 本文主要介绍蓝藻生物钟组分, 包括昼夜节律基因和调控蛋白质的结构和功能分析的研究进展.

1 中央振荡器 *kai* 基因簇的表达调控

中央振荡器是由一组呈近日节律表达的基因及其编码的蛋白质组成, 是维持内源性生物钟运作的核心元件. 直到最近, 多数研究者都认为, 和真核生物相似, 蓝藻昼夜节律的产生和维持等核心过程, 主要建立在对基因进行周期约 24 h 的转录-翻译水平上的负反馈调节的基础上. 但蓝藻振荡器的核心基因 *kai* (日语中意为“周期”)和真核生物的基因无序列相似性.

kaiA, *kaiB*, *kaiC* 以单一拷贝成簇排列, *kaiA* 单独转录, *kaiB* 和 *kaiC* 在同一启动子(P *kaiBC*)的控制下共转录. *kaiA*, *kaiB* 和 *kaiC* 都是维持聚球藻生理节律所必需的, 缺失任何一个都将扰乱其正常的昼夜节律或导致基因表达的节律消失^[2]. 和真核生物生物钟基因不同, *kaiBC* (即 *kaiB* 和 *kaiC*) 自动调节的反馈环不需要特异性的启动子.

kaiA, *kaiB*, *kaiC* 分别编码三种蛋白质 KaiA, KaiB 和 KaiC, 其中 KaiC 是核心. KaiC 的持续过量表达抑制 *kaiBC* 的表达, 与 KaiC 作用相反, KaiA 正调控 *kaiBC* 的表达^[2]. 由此推断, 蓝藻昼夜节律的产生建立在 *kai* 转录-翻译水平上, Kai 蛋

* 通讯联系人. Tel: 020-85211372, E-mail: zhourc@scnu.edu.cn

收稿日期: 2006-04-24, 接受日期: 2006-06-02

白通过对自身基因的反馈调节作用而产生昼夜节律. 进一步的研究发现, 在 *kaiA* 基因敲除突变体中, KaiC 的过量表达并没有抑制, 反而是稳定地诱导 *kaiBC* 的表达^[3]. KaiA 和 KaiC 之间很可能存在某种未知的联合调控机制. KaiA 能增强 KaiC 的磷酸化作用, KaiA 和 KaiC 的联合调控可能是通过 KaiC 磷酸化实现的. 有趣的是, *kaiC* 突变, *kaiBC* 启动子的活性并没有增强, 这说明 *kaiBC* 可能有其他的负调控因子存在或者 KaiC 在某些条件下也具有正反馈调控作用^[3]. Takigawa-Imamura 等^[4]通过建立 KaiC 对生物钟转录调控机制的动力学模型研究, 筛选出两种可能的转录调控机制: 一是转录抑制模型, KaiC 磷酸化后抑制生物钟基因的转录; 一是转录活化模型, 即 KaiC 磷酸化后诱导转录. 电脑模拟实验显示, 转录活化模型可以解释大部分的突变性状, 而转录抑制模型只能解释一半的突变性状, 且转录活化模型比转录抑制模型更能防止细胞分裂或细胞伸长阻断生物钟节律, 因此转录活化模型更接近于 *kai* 基因的转录机制.

在持续光照下, 除了 KaiA, KaiB 和 KaiC 水

平均呈节律性变化. 蓝藻是专性光合自养生物, 转入黑暗中后转录和翻译迅速减少, 但 KaiC 在持续黑暗处理中仍呈节律性表达. 这对昼夜节律转录-翻译振荡机制模型产生疑问. Tomita 等^[5]发现, 持续黑暗下, 聚球藻中即使没有 *kaiBC* 产生的 mRNA 的累积, 或者有足量的转录/翻译抑制剂存在, KaiC 的磷酸化仍呈现昼夜节律性, 且具有温度补偿性. 因此, Tomita 等提出昼夜节律不需要转录-翻译水平的调控就可以产生.

综上所述, 蓝藻生物钟的调控机制十分复杂, Kai 蛋白翻译后水平调控构成最小的计时环, 但 Kai 蛋白如何影响和中央振荡机制相关的转录水平调控等许多细节还不清楚. 图 1 是蓝藻生物钟偶联转录-翻译环的翻译后水平振荡调控模型.

2 Kai 蛋白分子结构, 功能及其相互作用

KaiC 蛋白全长 519 个氨基酸, 由 2 个重复的结构域 (即 1~260 位氨基酸的 C I 区和 261~519 位的 C II 区, 中间由 13 个氨基酸残基连起来, 248 到 260 位) 组成, C I 区和 C II 区十分相似, 但二者功能并不相同. KaiC 可以结合叉状 DNA^[6], 对基因整体表达有重要调控作用.

KaiC 形成六聚体环状结构, 在电子显微镜下观察到六聚体形成的颗粒^[6]. 聚球藻的 KaiC 同型六聚体结晶结构是由 C I 和 C II 平行相叠而成的双圆环结构, 各个亚基围成一圈, 在中央形成一条沟. 中央沟的一端, C I 端开口较宽, 而 C II 端则由 6 个精氨酸残基将沟封闭起来, 可以控制开和关^[7]. 每个亚基具有 2 个 ATP 结合位点, 结合 ATP 或 GTP 形成稳定的环状同型六聚体结构. C I 区和 C II 区各有一个保守的谷氨酸残基, 被认为具有 ATP 酶活性. C II 区 ATP 结合区域附近存在 3 个重要的磷酸化位点 T432, S431, T426, 这些位点突变使昼夜节律消失^[8,9]. 但磷酸化位点突变并不影响 KaiC 六聚体的形成^[8,9]. KaiC 蛋白的自磷酸化活性, 是和 KaiA、KaiB 和 SasA 形成大分子复合物所必需的^[8], 具有昼夜节律性.

KaiC 是与其他钟蛋白形成的同型/异型复合物的核心. KaiC 结构为 KaiABC 大分子复合物的形成提供了支架^[7]. KaiC 单体分子质量 (58 ku) 大约是 KaiB (11 ku) 和 KaiA (10~32 ku) 分子质量和的 6 倍, KaiC 形成六聚体 (348 ku) 而 KaiB 和 KaiA 都只是分别形成二聚体. 通过酵母双杂交系统分别在 KaiC I 区和 C II 区发现 2 个能与 KaiA 相互

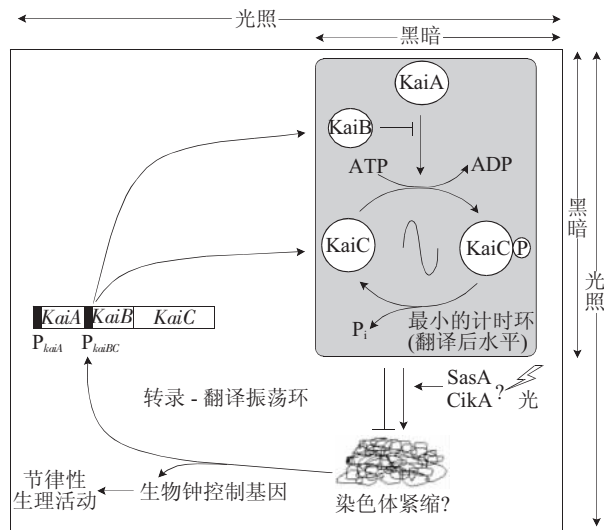


Fig. 1 Oscillation model for the cyanobacterial circadian clock^[5]

图 1 蓝藻生物钟振荡模式^[5]

KaiC 磷酸化循环构成最小的计时环, 是蓝藻昼夜节律的起搏器. (灰色部分)黑暗中, 即使没有转录和翻译调控, KaiA 和 KaiB 仍维持 KaiC 磷酸化昼夜节律循环. 持续光照下, 来自光合作用的能量供应活化基因表达, 使节律延伸到转录-翻译环. 两个组氨酸激酶 SasA 和 CikA 将翻译后水平调控的振荡机制和整体的转录机制偶联起来, 如通过改变染色体超螺旋结构, 调节 *kaiBC* 启动子 (P_{kaiBC}) 的活性, 并调控其他钟控基因使其呈昼夜节律性表达 (白色部分).

作用的区域(KaiA-binding domains) C_{KABD1} 和 C_{KABD2} . C_{KABD} -KaiA 的相互作用对于蓝藻昼夜节律的计时机制极为重要, 在 C_{KABD} 上发生的突变能导致 C_{KABD} -KaiA 相互作用的改变, 从而使聚球藻的昼夜节奏发生改变. C_{KABD1} 位于 C I 区和 C II 区交界的“腰部”, 而 C_{KABD2} 则位于六聚体结晶 C II 区的顶端表面. 将 KaiC 和 KaiA 的相互作用位点映射到 KaiC 的六聚体结晶结构上, 这些位点均在中央沟的表面或附近^[7].

KaiA 蛋白是 *kaiBC* 表达的正调控因子, 包含约 180 个氨基酸的 N 端和约 100 个氨基酸的 C 端两个结构域. C 端氨基酸序列在很多不同种类蓝藻中高度保守, 能够刺激 KaiC 自磷酸化, 并促进 KaiB 减弱 KaiC 自磷酸化作用, 并具有二聚化作用使 KaiA 成为同型二聚体. KaiA 的 C 端呈新型的 4 螺旋束结构^[10,11], 具有 KaiC 结合位点. 核磁共振研究表明, 其 N 端具有伪接受域, 该区域可能是计时输入结构, 调控 KaiA 的 C 端结构域以激活 KaiC 的自激酶活性. 同型二聚体 KaiA 的结晶结构是一个功能区转换(domain-swapping)结构, 一个单体亚基的 N 端和另一亚基的 C 端可以相互作用^[11]. Garces 等^[10]对鱼腥藻 *Anabaena* 的 KaiB 同型二聚体分析发现 KaiB 呈 α - β 迂回结构.

KaiC 具有磷酸酶和磷酸激酶活性, 在没有 KaiA 存在的情况下转为激酶活性. KaiA 促进 KaiC 的磷酸化, (或) 抑制 KaiC 的去磷酸化, 而 KaiB 则消除 KaiA 的作用. Kitayama 等^[12]的研究发现, 在体内和体外 KaiB 均可减弱 KaiC 蛋白的磷酸化, 并观察到 KaiB 在深夜里与 KaiA-KaiC 复合物发生相互作用, 而且 KaiB-KaiC 的形成总是伴随着 KaiC 磷酸化活性的迅速降低和以 KaiC 为核心的钟蛋白复合物的分解.

通过比较 3 种 Kai 蛋白的结构, Wang 等^[13]提出旋转生物钟 (Rotary clock) 假说, 认为 Kai 蛋白系统类似于 F1-ATP 合成酶系统, KaiC 类似于 $\alpha_3\beta_3$, KaiA 类似于 γ δ , KaiB 则是其抑制因子. 在 KaiC 六聚体和 KaiABC 复合物组装后, 位于 KaiC 中央沟中的 KaiA 二聚体旋转驱动 KaiC 旋转磷酸化. 完全磷酸化后的 KaiC 六聚体脱离复合物, 未磷酸化的 KaiC 六聚体又结合上去形成复合物.

Nakajima 等^[14]将 3 种 Kai 蛋白依照其在体内的重量比进行混合培养, 加入少量 ATP, 竟然成功地在体外重现 KaiC 磷酸化的昼夜节律. 虽然节律的振幅有所减小, 但不论在持续光照或是持续黑暗

中, 节律周期却很稳定且具温度补偿性. 而且从节律周期突变体中获得的 KaiC, 其体外培养所呈现的磷酸化周期和体内一致. 这说明不需转录-翻译水平上的调控, 3 种 Kai 蛋白就足以产生节律. KaiA 和 KaiB 调节的 KaiC 磷酸化节律循环就是昼夜节律的起搏器.

3 生物钟相关基因和蛋白质

sasA 编码的组氨酸激酶 SasA (*Synechococcus* adaptive sensor) 和 KaiC 有密切的关系. 聚球藻中, *sasA* 突变缩短了昼夜节律周期并减弱振荡幅度^[15]. *sasA* 不是生物钟核心基因, 它的缺失并不会导致昼夜节律完全消失, 但却是聚球藻维持正常昼夜节律所必需的. SasA 的 N 端感应结构域可以调控自身激酶活性, 和 KaiB 具有很高相似性, 二者序列 26% 相同, 60% 相似. 尽管如此, 核磁共振发现由于二者关键的氨基酸位点的不同导致两者的二级结构有很大差异^[16]. SasA 并不是通过类似于 KaiB 的结构与 KaiB 竞争着和 KaiC 结合, 从而增强 KaiC 的表达. 二者都能结合 KaiC, 但结合位点不同. SasA 的 N 端是规范的硫氧还蛋白折叠结构, 但缺乏具有还原活性的半胱氨酸残基, 在硫氧还蛋白活性位点附近存在保守序列, 可能是 SasA 和蛋白质结合的活性位点^[16]. SasA 第 162 位上的组氨酸是自磷酸化位点, 是其功能所必需的. 该位点突变极大地减弱 *kaiBC* 启动子活性, 降低昼夜节律的振幅. SasA 可能是节律信息输出的第一个成分, 通过与 KaiC 形成复合物, 该复合物通过磷酸基团传递作用将节律计时信号放大传递给受生物钟控制的过程^[15]. SasA 和 KaiC 的相互作用构成一个反馈回路, 对由 *kaiABC* 组成的生物钟振荡核心起放大器的作用, 从而增强昼夜节律.

SasA 和 Kai 蛋白形成的 400~600 ku 异型多聚体钟蛋白的聚合呈昼夜节律性变化, 在不同时段作为正负调控因子反馈调控包括自身基因在内的钟控基因的表达. 这种钟蛋白复合物的核心蛋白 KaiC 过量表达不仅抑制本身基因的表达, 而且抑制基因组范围内的基因表达^[17]. Kucho 等^[18]首次运用 DNA 微阵列技术, 对已知全序列的集胞藻 *Synechocystis* sp. PCC6803 基因组范围内基因节律性表达的研究发现, 在严格筛选条件下和较宽松条件下分别有 2% 和 9% 的基因表达具有昼夜节律性. 这些节律性表达基因的生理功能涵盖呼吸、PHA 合成、转录、翻译等重要的生理过程, 且大部分的基因表达都在

由白昼转入黑夜的时候达到最高,表明这种昼夜节律调控对细胞生理功能具有重要的意义^[18].生物钟输出途径涉及整个基因组,目前对这些呈节律性的生理活动的调控仍不清楚.由于 *kaiBC* 的启动子是非特异性的, *KaiC* 蛋白能够结合 DNA, 可能 *KaiC* 可以通过改变 DNA 超螺旋结构引起基因组基因的节律性表达.

除了 *kai*, *sas* 基因, 蓝藻的节律性表达中还存在一些发挥关键作用的基因. 目前在蓝藻中已鉴定了几种生物钟相关基因: 聚球藻的 *cikA*, *pex*, *ldpA*, *cpmA* 以及编码 σ 转录因子的 *rpoD2*, *rpoD3*, *rpoD4*, *sigC* 等基因^[1].

外界环境的时间信号如光照和温度等都可以引导生物钟使其振荡周期和环境同步^[19]. 输入途径接收信号并传送信号到中央振荡器, 设定振荡时相. 不同生物的输入途径不同, 在蓝藻中, 环境因子进入中央振荡器的机制还不清楚. 聚球藻中, *cikA* (circadian input kinase) 突变, 昼夜节律缩短约 2 h, 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 (bacteriophytochrome), 是信号输入途径的关键组分^[20].

Katayama 等^[21]通过转座子插入突变鉴定了参与光输入途径的基因 *ldpA* (for light-dependent period), *ldpA* 突变明显地降低聚球藻感受光强度变化的能力. 从序列推断 *ldpA* 编码的 *LdpA* 蛋白含有 2 个铁硫中心 3Fe-4S, 4Fe-4S, 参与氧化还原反应, 从而影响昼夜节律^[21]. Ivleva 等^[22]发现 *LdpA* 蛋白含有 2 个 Fe_4S_4 铁硫中心, 能够感受细胞的氧化还原状态, 并可节律性地与其他钟蛋白形成复合物.

4 结语与展望

近年来随着研究的深入和研究手段的多样化, 对蓝藻生物钟相关基因的研究取得了很大进展, 也引发了人们对生物钟系统更深入的思考, 如提出了 *Kai* 蛋白磷酸化旋转模型假说, 最新发现蓝藻中央振荡器不需转录 - 翻译水平的调控, 只需翻译后水平上对 *KaiC* 磷酸化的调控即可产生节律. 但 *KaiC* 蛋白和 *Kai* 蛋白的转录 - 翻译环路如何偶联起来, 是否如 Nakajima 等所比喻的钟摆和操纵机构一样, 钟摆发出的信息通过操纵机构 *Kai* 转录 - 翻译反馈环把节律信息输送出去等, 诸多问题还有待进一步研究和证实. 实际上蓝藻生物钟是非线形的复杂网络系统, 但相信随着生物钟的分子机制研究的进一

步深入, 人们将更深刻地了解细胞生理和钟控基因调节机理.

参 考 文 献

- Golden S S. Timekeeping in bacteria: the cyanobacterial circadian clock. *Curr Opin Microbiol*, 2003, **6** (6): 535~540
- 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
- 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
- Takigawa-Imamura H, Mochizuki A. Transcriptional autoregulation by phosphorylated and non-phosphorylated KaiC in cyanobacterial circadian rhythms. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, 2005-12-29
- Tomita J, Nakajima M, Kondo T, *et al.* No transcription-translation feedback in circadian rhythm of KaiC phosphorylation. *Science*, 2005, **307** (5707): 251~254
- Mori T, Saveliev S V, Xu Y, *et al.* Circadian clock protein KaiC forms ATP-dependent hexameric rings and binds DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99** (26): 17203~17208
- Pattanayek R, Wang J, Mori T, *et al.* Visualizing a circadian clock protein crystal structure of KaiC and functional insights. *Molecular Cell*, 2004, **15** (5): 375~388
- Nishiwaki T, Satomi Y, Nakajima M, *et al.* Role of KaiC phosphorylation in the circadian clock system of *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101** (38): 13927~13932
- 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
- Garces R G, Wu N, Gillon W, *et al.* *Anabaena* circadian clock proteins KaiA and KaiB reveal a potential common binding site to their partner KaiC. *EMBO J*, 2004, **23** (8): 1688~1698
- 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
- Kitayama Y, Iwasaki H, Nishiwaki T, *et al.* Kai B functions as an attenuator of KaiC phosphorylation in the cyanobacterial circadian clock system. *EMBO J*, 2003, **22** (9): 2127~2134
- Wang J. Recent cyanobacterial Kai protein structures suggest a rotary clock. *Structure*, 2005, **13** (5): 735~741
- Nakajima M, Imai K, Ito H, *et al.* Reconstitution of circadian oscillation of cyanobacterial KaiC phosphorylation in vitro. *Science*, 2005, **308** (5720): 414~415
- Iwasaki H, Williams S B, Kitayama Y, *et al.* A KaiC-interacting sensory histidine kinase, SasA, necessary to sustain robust circadian oscillation in cyanobacteria. *Cell*, 2000, **101** (2): 223~233
- Vakonakis I, Klewer D A, Williams S B, *et al.* Structure of the N-terminal domain of the circadian clock-associated histidine kinase SasA. *J Mol Biol*, 2004, **342** (1): 9~17

- 17 Nakahira Y, Katayama M, Miyashita H, *et al.* Global gene repression by KaiC as a master process of prokaryotic circadian system. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101** (3): 881~885
- 18 Kucho K O, Okamoto K, Tsuchiya Y, *et al.* Global analysis of circadian expression in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J Bacteriol*, 2005, **187** (6): 2190~2199
- 19 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
- 20 Schmitz O, Katayama M, Williams S B, *et al.* CikA, a bacteriophytochrome that resets the cyanobacterial circadian clock. *Science*, 2000, **289** (5480): 765~768
- 21 Katayama M, Kondo T, Xiong J, *et al.* *ldpA* encodes an iron-sulfur protein involved in light-dependent modulation of the circadian period in the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *J Bacteriol*, 2003, **185** (4): 1415~1422
- 22 Ivleva N B, Bramlett M R, Lindahl P A, *et al.* Ldp A: a component of the circadian clock senses redox state of the cell. *EMBO J*, 2005, **24** (6): 1202~1210

Progress in Molecular Mechanisms of Circadian Clock in Cyanobacteria

LIN Shao-Yuan, LI Shu-Bin*

(College of Life Science, South China Normal University, Guangzhou 510631, China)

Abstract Cyanobacteria are simple organisms which possess an endogenous circadian clock. Although the cyanobacterial clock has the same fundamental properties as circadian clocks in eukaryotes, its components are non-homologous to those of eukaryotes. The clock core of the cyanobacteria consists of the *kai* gene cluster and three Kai proteins KaiA, KaiB and KaiC, which the *kai* genes encode. The interactions among the Kai proteins modulate the phosphorylation state of KaiC, which generates circadian rhythm. The KaiC phosphorylation cycle constitutes the pacemaker of the cyanobacterial circadian rhythm. And signal transduction into and out of the clock core could occur *via* histidine protein kinase-based phosphorylation relays.

Key words cyanobacteria, clock genes, circadian rhythm

*Corresponding author . Tel: 86-20-85211372, E-mail: zhourc@scnu.edu.cn

Received: April 24, 2006 Accepted: June 2, 2006