

生物钟基因研究进展

徐军* 童建

(苏州大学预防医学系, 苏州 215007)

摘要 昼夜节律是以大约 24 h 为周期波动的生物现象. 这些节律包括血压、体温、激素水平、血中免疫细胞的数量、睡眠觉醒周期循环等. 基因水平上的昼夜节律研究还只是刚起步, 介绍不同物种控制昼夜行为的共同基因 (如 period、timless、clock 基因等) 的研究进展, 特别是一些有关调控昼夜节律基因的转录因子的研究. 同时讨论果蝇和人类生物钟调节的共同分子机制.

关键词 生物钟, 昼夜节律, 基因

学科分类号 R33, R394.2

千百年来, 地球以白天和黑夜的交替而周期性地变化, 地球上的动物、植物和微生物也相应地循环调节其行为和生理活动. 昼夜节律是所有生物体对可预测的环境改变的一种综合性的适应, 它是可以持续运行并且以大约 24 h 为周期的生物节律. 已在各种生命水平上开展着对昼夜节律的研究, 包括组织器官、神经核团、细胞组分和生物分子. 然而直到 20 世纪末, 从基因水平上对昼夜节律的研究还只是刚刚开始. 就是现在, 我们对于那些导致昼夜生物循环的基因分子还知之甚少. 但是通过抑制 RNA 或蛋白质合成的干扰性实验, 却提示这些振荡性变化的基因分子确实是存在的.

运用基因修饰技术, 已经部分地阐明了昼夜生物钟基因的运行机制. 在果蝇 (*Drosophila melanogaster*) 中首先发现了 2 种昼夜钟基因的突变体, 即 period (per) 和 timeless (tim) 基因^[1,2]. 果蝇脑中特定部位的 per 和 tim 基因的 mRNA 和相应的蛋白质产物的量, 以大约 24 h 的周期循环变化^[3]. Kaneko 等^[4]以这些分子的振荡作为标记指标, 探索了不同发育阶段果蝇脑中可能的节律起搏细胞. 在成年果蝇脑中, 蛋白质表达定位研究显示, 在脑中央和视叶之间的侧神经元处, per 基因呈周期性表达, 因此认为侧神经元是支配成年果蝇日活动节律的可能起搏部位. 而在幼虫脑中, Kaneko 等^[4]的研究表明, per 和 tim 基因的产物也可在特定神经元中检测到, 且表达呈昼夜周期性. 其中 5 种侧神经元细胞的表达较为明显. 在幼虫的早期阶段, PER 蛋白的出现提示可能与幼虫期的孵化和日常活动调节有关. 另一个有趣的发现, 是有一簇神经元对 per 和 tim 基因的周期表达恰与侧

神经元呈反相关系. 这些结果说明, 在一个个体中, 可以存在着多个振荡子同时调节不同的生理或行为过程的节律. Kaneko 等^[4]通过测定 per 基因启动子依赖的 report 基因的表达, 描述了起搏神经元分布联系的解剖学特征, 从而将分子解剖学的方法应用于脑节律系统的功能定位.

转录的昼夜节律控制提供了分析顺式作用元件及反式作用因子的一个突破口, 以了解昼夜钟是如何调节钟控制的基因表达^[2]. 这些顺式作用元件被称为时间箱 (time-box)^[5], 可能定位于钟控基因的启动子和增强子区域之间, 并且在持续恒定条件下可调节内源性的昼夜生理节律. 最近, 在果蝇 per 基因的启动子区域又发现了一个新的时间箱. 尽管 per 基因已被假定通过抑制转录而介导 mRNA 的周期变化 (mRNA cycling), 但由于 PER 中缺乏一个 DNA 结合区, 故 per 基因和 DNA 间不太可能发生直接交互作用. Hardin 研究小组^[6]采用 per-lacZ 融合基因的转基因果蝇, 详尽分析了 per 基因的启动子区域. 他们在一个 69 bp 的 DNA 片段中确定了一个昼夜节律的转录增强子, 其中包含了 per 基因上游的一处 E-box 并控制 per 基因的夜间表达活性. 该 E-box 是一个已知的转录因子基础螺旋-环-螺旋结构的结合位点.

最近, 由前向基因法 (forward genetic strategy) 克隆的 clock 基因被认为是振荡子内的重要反式作用因子^[7]. Takahashi 的研究小组分离并分析了昼夜突变型小鼠的日活动度^[7]. 在持续黑暗条件下,

* 通讯联系人.

Tel: 0512-5195696-2041, E-mail: xujun51@sohu.com

收稿日期: 2000-04-24, 接受日期: 2000-06-07

数天后表现长周期的 clock 突变体失去节律性. Takahashi 及同事们成功地克隆了相应基因, 并确定了由 clock 基因编码的蛋白质突变区域^[7]. 有意思的是, 这种 clock 蛋白含有一个蛋白质-蛋白质结合区域 (PAS), 且被定位于果蝇 per 基因以及可与 DNA 结合的基础螺旋-环-螺旋结构中. 不仅如此, 通过导入正常的 clock 基因, 可使长周期及无节律性表型的 clock 突变型小鼠完全回复至正常状态.

Allada 等^[8]描述了在果蝇及人类 clock 基因分子中, 负责产生昼夜节律的相同组分. 他们采用化学诱变的方法, 寻找和筛选出一个能改变或消除活动度昼夜节律性的果蝇突变体, 并将其命名为 Jrk 突变体. 在 Jrk 突变体果蝇中, 由于转录水平下降, period 和 timeless 蛋白的表达水平很低. 该基因具有惊人的序列保守性, 与哺乳动物的昼夜节律基因 clock 有高度的相似性, 故将此果蝇基因重新命名为 dClock. 象小鼠的 clock 基因一样, dClock 基因也含有基础螺旋-环-螺旋结构和 PAS 区域, 以及一个转录活化区域.

近年对哺乳动物及果蝇的研究表明, 两个物种中 CLOCK 的蛋白伴侣也呈现进化保守现象 (命名为 BMAL)^[9,10]. 在果蝇中, CLOCK-BMAL 二聚体可与 per 和 tim 基因的启动区结合, 并能反向激活这两个基因. 此外, PERIOD-TIMELESS (PER-TIM) 基因的表达又可抑制 CLOCK-BMAL 介导的信使诱导. 因此有人提出了一个负反馈模型 (图 1).

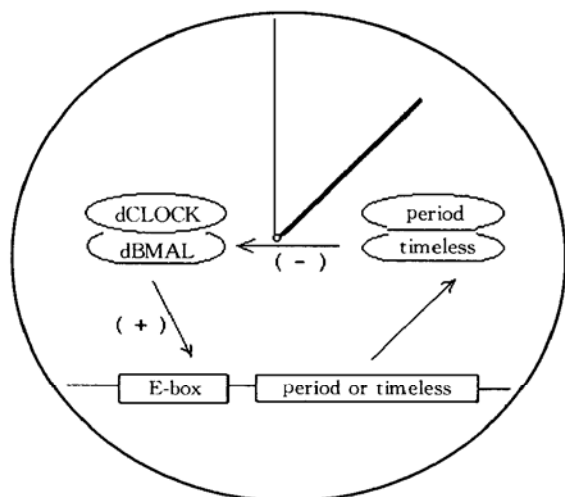


Fig. 1 The negative feedback model of molecular biological clock

图 1 分子生物钟的负反馈模型

CLOCK-BMAL 二聚体可与 per 和 tim 基因的启动区结合, 并能反向激活这两个基因, 而PER-TIM 基因的表达又可抑制 CLOCK-BMAL 介导的信使诱导.

许多解剖学和生理学的研究结果均指出, 哺乳动物下丘脑的视交叉上核 (suprachiasmatic nucleus SCN) 是昼夜节律的一个主要起搏器^[11]. 它控制机体的行为和生理节律, 包括运动、睡眠-觉醒、体温、心血管功能和许多内分泌过程等. SCN 自身节律性具有内在的遗传基础, 同时又受到环境光照信号以及某些化学物质 (如褪黑素和 5-羟色胺等) 的诱导和影响^[12]. 褪黑素 (melatonin) 是松果体分泌的吲哚类激素, 血中浓度夜高昼低, 合成和分泌的节律受 SCN 的传入调节. 而褪黑素可通过 SCN 中褪黑素受体反过来调节 SCN 的节律性^[13].

最近报道, 在小鼠和人类中存在 3 个果蝇 period 基因的同源基因^[14], 并且在 SCN 中这些同源基因的 mRNA 也呈现昼夜振荡. 但到目前为止, 尚无这些基因与昼夜活动度的功能行为相关联的报道. 为阐明哺乳动物的 per 同源基因与活动度昼夜节律间的关系, Ishida 研究小组克隆了一个大鼠的 per 同源基因并建立了 SCN 受损大鼠的无节律性模型, 以此监测外周组织的昼夜节律活动^[15]. 为验证大鼠的 PERIOD 2 (RPER2) mRNA 的节律性是否能在 SCN 以外的组织中表达, 采用 RNA 印迹测定眼、脑、心脏、肺和肾脏等组织. 结果各被测组织均出现 RPER2 mRNA 的节律性表达, 不同之处只是各个组织的夜间/白昼表达比率存在差异^[15]. 由于 RPER2 象果蝇 per 基因一样, 在组织中的表达均为夜间较高, 故认为二者是同源基因. 在哺乳动物和果蝇之间的基因同源性, 以及昼夜钟定位中 SCN 和侧神经元的功能同源性, 清楚地表明了这些物种间在进化史上的近缘关系.

鉴于 SCN 是哺乳动物昼夜节律的起搏点, Ishida 的工作组测定了 RPER2 在多个组织中的昼夜节律表达是否受 SCN 损伤的影响^[15]. 令人奇怪的是, 各组织 RPER2 表达的节律性可因 SCN 的损伤而完全消失. 因此可以认为, 外周组织中 RPER2 的表达是在 SCN 的控制之下进行的. 这是首次有关多组织的昼夜节律可由哺乳动物的一个脑时钟, 即下丘脑的 SCN 所支配的研究报道. 该研究还发现, 当大鼠活动度的昼夜节律消失时, 整个机体的 RPER2 mRNA 的昼夜表达也消失. 这表明哺乳动物 per 同源基因 (RPER2) 可能参与哺乳动物活动度的昼夜节律控制. 为了完全证明这一结论, 还必须建立具有 RPER2 基因功能缺失或功能获得型突变体的转基因动物. 此外, RPER2

mRNA 节律性的表达在不同组织中完全依赖于 SCN 这一事实提示, 对整个机体的昼夜节律进行协调还需要另外一些信号。在一个 SCN 的移植研究中, 提出了源于 SCN 的体液因子的重要性^[16]。这些体液因子对外周组织中 RPER2 基因的昼夜节律表达, 可能是必不可少的。因此, 就象在发生生物学中所发现的情况一样, 生物钟的关键分子构成在果蝇和哺乳动物之间是高度保守的。可以预计, 在 21 世纪不久的将来, 人类将会解开从细菌到他自身的生物钟分子机制之谜^[17]。

参 考 文 献

- Sehgel A, Price J L, Man B, *et al.* Loss of circadian behavioral rhythms and per RNA. *Science*, 1994, **263** (5153): 1603~1606
- Matsumoto A, Tomioka K, Chiba Y, *et al.* Timrit lengthens circadian period in a temperature-dependent manner through suppression of PERIOD protein cycling and nuclear localization. *Mol Cell Biol*, 1999, **19** (6): 4343~4354
- Takahashi J S. Molecular neurobiology and genetics of circadian rhythms in mammals. *Annu Rev Neurosci*, 1995, **18**: 531~553
- Kaneko M, Helfrich-Forster C, Hall J C. Spatial and temporal expression of the period and timeless genes in the developing nervous system of *Drosophila*: newly identified pacemaker candidates and novel features of clock gene product cycling. *J Neurosci*, 1997, **17** (17): 6745~6760
- Kako K, Ishida N. The role of transcription factors in circadian gene expression. *Neurosci Res*, 1998, **31** (4): 257~264
- Hao H, Allen D L, Hardin P E. A circadian enhancer mediates PER-dependent mRNA cycling in *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Biol*, 1997, **17** (7): 3687~3693
- King D P, Zhao Y, Sangoram A M, *et al.* Positional cloning of the mouse circadian clock gene. *Cell*, 1997, **89** (4): 641~653
- Allada R, White N E, Venus S W, *et al.* A mutant *Drosophila* homolog of mammalian Clock disrupts circadian rhythms and transcription of period and timeless. *Cell*, 1998, **93** (5): 791~804
- Rutila J E, Suri V, Le M, *et al.* CYCLE is a second bHLH-PAS clock protein essential for circadian rhythmicity and transcription of *Drosophila* period and timeless. *Cell*, 1998, **93** (5): 805~814
- Darlington T K, Wager-Smith K, Ceriani M F, *et al.* Closing the circadian loop: CLOCK-induced transcription of its own inhibitors per and tim. *Science*, 1998, **280** (5369): 1599~1603
- Meijer J H, Rietveld W J. Neurophysiology of the suprachiasmatic circadian pacemaker in rodents. *Physiol Rev*, 1989, **69** (3): 671~707
- Starkey S J. Melatonin and 5-hydroxytryptamine phase advance the rat circadian clock by activation of nitric oxide synthesis. *Neurosci Lett*, 1996, **211** (3): 199~202
- McArthur A J, Hunt A E, Gillette M U. Melatonin action and signal transduction in the rat suprachiasmatic circadian clock: activation of protein kinase C at dusk and dawn. *Endocrinology*, 1997, **138** (2): 627~634
- Dunlap J C. Molecular bases for circadian clocks. *Cell*, 1999, **96** (2): 271~290
- Sakamoto K, Nagase T, Fukui H, *et al.* Multitissue circadian expression of rat period homolog (rPer2) mRNA is governed by the mammalian circadian clock, the suprachiasmatic nucleus in the brain. *J Biol Chem*, 1998, **273** (42): 27039~27042
- Silver R, LeSauter J, Tresco P A, *et al.* A diffusible coupling signal from the transplanted suprachiasmatic nucleus controlling circadian locomotor rhythms. *Nature (London)*, 1996, **382** (6594): 810~813
- Kondo T, Tsinoremas N F, Golden S S, *et al.* Circadian clock mutants of cyanobacteria. *Science*, 1994, **266** (5188): 1233~1236

Progress in the Studies of Biological Clocks Genes

XU Jun^{*}, TONG Jian

(Department of Preventive Medicine, Soochow University, Suzhou 215007, China)

Abstract Circadian rhythms describe biological phenomena that oscillate with an 24 hour cycle. These rhythms include blood pressure, body temperature, hormone level, the number of immune cells in blood, and the sleep-wake cycle. The aim is to introduce common genes between species that are responsible for determining the circadian behavior, especially some transcription factors that serve to regulate many circadian rhythm genes. And the common molecular mechanism of biological clocks between fly and human will be introduced.

Key words biological clocks, circadian rhythm, genes

^{*} Corresponding author. Tel: 86-512-5195696-2041, E-mail: xujun51@sohu.com

Received: April 24, 2000 Accepted: June 7, 2000