

DOI: 10.13376/j.cbls/2015184

文章编号: 1004-0374(2015)11-1320-08

· 评述与综述 ·



王渭池, 1964年5月生。1984年毕业于南京大学生物系, 获学士学位。1984年至1987年在中国医学科学院血液学研究所工作。1990年获南京医科大学硕士学位。1993年在中国科学院生物物理所获博士学位。1993年至1995年, 中国科学院过程工程所生化工程国家重点实验室博士后。1995年11月至2000年1月分别在法国国家农业研究院和旧金山加州大学做访问学者研究工作。2000年5月至2001年11月任中国科学院过程工程所生化工程国家重点实验室研究员。2001年11月至今, 任中国科学院物理所软物质物理重点实验室研究员, 博士生导师, 主要研究方向为生物物理学和计算生物学。

蓝绿菌生物钟调控动力学和机制研究进展

李丛鑫, 王鹏业, 王渭池*

(中国科学院物理研究所北京凝聚态物理国家实验室-软物质物理重点实验室, 北京 100190)

摘要: 生物钟的振荡过程是生命体中典型的非线性动力学现象, 它们对细胞基因表达、信号转导以及细胞的新陈代谢等过程起重要的调控作用。通过对生物钟振荡过程各个调控单元或模块之间动力学和调控机制的定量分析, 有助于更深入、更直观地了解生物钟在时间尺度和空间尺度上如何精确地调控生物体的生命过程。

关键词: 蓝细菌; 生物钟; KaiC; 磷酸化; 网络; 动力学

中图分类号: Q945.43; Q949.2 **文献标志码:** A

Regulatory mechanism and dynamics of cyanobacterial circadian clock

LI Cong-Xin, WANG Peng-Ye, WANG Wei-Chi*

(Key Laboratory of Soft Matter Physics, Beijing National Laboratory for Condensed Matter Physics, Institute of Physics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China)

Abstract: Circadian oscillation is a typical nonlinear behaviour in nature. A sustained oscillatory rhythm is fundamental for gene expression, signal transduction and metabolism in living cells. By quantifying the interactions among the elements (or modules) of biological clocks, it is certainly helpful for us to understand how precisely the circadian clocks regulate the life processes in spatiotemporal context.

Key words: cyanobacteria; biological clock; KaiC; phosphorylation; network; dynamics

生命体的振荡现象普遍存在于生物体系的各个层次, 振荡周期小到毫秒量级, 大到若干年。这种生命节律的调控机制与复杂的动力学行为受到了包括生物学、数学、物理学和化学等诸多领域科学家的广泛关注^[1-2]。数学物理方法与生物学的结合在定量研究生命体复杂动力学过程中获得了巨大的成

功, 其中最经典的例子莫过于 Hodgkin 与 Huxley 对神经动作电位产生机理的里程碑式研究。在非生

收稿日期: 2015-06-17

基金项目: 国家自然科学基金项目(31070751); 国家重点基础研究发展计划(“973”项目)(2009CB930704)

*通信作者: E-mail: weichi@iphy.ac.cn

命系统中, Belousov 和 Zhabotinsky 发现了化学反应的振荡现象, 并由 Prigogine 等一批科学家通过总结与演绎提出了“布鲁塞尔子”模型, 这无疑为有机体内时空自组织过程的研究奠定了坚实的非线性动力学与非平衡统计力学基础。

生物钟的昼夜节律振荡行为, 是生命活动最重要的调控方式之一。蓝细菌是具有生物钟的最简单原核生物, 其生物钟核心的振荡过程可仅由 3 种时钟蛋白 (clock protein) 在体外重组产生^[3]。这种不依赖于基因调控的核心振荡机制似乎与传统观点相悖, 对它的研究有助于更深入地了解原核以及真核生物的生物钟起源和内在的精确调控方式。

1 蓝细菌的生物钟

地球的自转, 令众多生物体进化出内在的时钟机制, 即生物钟, 并以此来更好地适应每天的环境变化^[4]。对生物钟机制的研究至少可以追溯到 16 世纪。20 世纪中叶, 由 Pittendrigh 和 Aschoff 开创了现代时间生物学领域的研究, 他们定义与建立了整个生物钟研究的原理与规则^[1-2]。大量研究表明, 真核生物的生物钟核心振荡机制具有相似的“设计”, 主要通过钟蛋白对其自身基因的正负反馈来产生持续振荡, 即转录-翻译振荡 (transcription-translation-derived oscillation, TTO)^[5-6]。

20 世纪 90 年代初之前, 生物钟仅为真核生物专有的观点一直被研究人员普遍支持与认同, 但是 80 年代末的一些实验观测却表明生物钟同样存在于蓝细菌 (或蓝绿藻) 中^[7]。蓝细菌的祖先作为第一个光合自养生物出现在距今约 35 亿年前, 这个突破性的发现说明生物钟是一种极为古老的调控机制。首次报道的蓝细菌生物钟行为是 *Synechococcus* sp. RF-1 菌族在持续光照条件下的固氮循环。目前所知, 蓝细菌生物钟调控着许多生理过程, 如光合作用、氨基酸吸收、糖类合成以及细胞分裂等^[8-9]。由于具有很多实验技术上的优势, *S. elongatus* PCC 7942 常被用来研究蓝细菌生物钟的调控机制。与多细胞生物不同, 蓝细菌的生物钟及其稳定性几乎是单个细胞特有的性质, 而细胞与细胞间的耦合与相互交流似乎可以忽略不计, 这表明蓝细菌的生物钟起源于细胞内部极其稳定的分子振荡网络^[10]。

2 蓝细菌生物钟核心—Kai 振子

与高等生物不同, 蓝细菌中约 70% 的基因表达受生物钟的调控。更重要的是, 众多基因表达的

时序信号呈现出各种各样的波形、振幅与相位关系^[11]。以荧光素酶作为报告蛋白, Liu 等^[11]观测了蓝细菌基因组中绝大部分基因表达的生物荧光信号, 并按照波形把这些信号分为 5 类。第 1、2、3 类波形近似为光滑对称的类正弦曲线, 只是三者的相位不同, 第 1 类与第 2 类反相, 第 3 类相位在前两者之间。第 4 类为不对称的“锯齿”状波形。带有双峰以及呈“阶梯”状的波形被归为第 5 类。同时, 这几类信号的相位也有不同的分布。这种多模式的全基因组调控是蓝细菌昼夜时钟最重要的特征之一。

Ishiura 等^[12]发现了蓝细菌的钟基因簇, 它包含 3 种钟基因: *kaiA*、*kaiB* 与 *kaiC*, 其中 *kaiB* 与 *kaiC* 共用一个启动子。敲除或失活任意一个基因都会造成基因表达生物钟的彻底消失。因此, 这 3 个 *kai* 基因都是蓝细菌产生生物钟振荡信号必不可少的基因^[12-13]。钟蛋白 KaiB 与 KaiC 在细胞中的含量呈明显的 ~24 h 周期振荡, 而 KaiA 浓度在昼夜循环中则相对保持不变。在细胞内, KaiA 和 KaiC 以钟依赖性的方式定位聚集于细胞某一端的不连续区域内, 这种极性分布方式在夜间尤甚, 而且 KaiA 的定位依赖于 KaiC^[14]。按照转录-翻译振荡的生物钟核心机制, 蓝细菌中有相应的基因调控反馈回路。Iwasaki 等^[15]研究发现, KaiC 的过量表达可以抑制自身基因 *kaiBC* 的表达, KaiA 过量表达则促进 *kaiBC* 启动子的活性。这表明 KaiC 与 KaiA 分别作为负反馈与正反馈元件调控 *kaiBC* 的表达。KaiC 与 DNA 解旋酶 DnaB 以及 RecA 同属一个超家族, 虽然 KaiC 没有保守的 DNA 结合序列, 但 KaiC 与分岔 DNA (forked DNA) 有弱结合能力。不过 KaiC 是否直接结合到 *kaiBC* 启动子附近起调控作用还尚不清楚。

Nakahira 等^[13]研究发现, Kai 蛋白的反馈作用并非只特定作用于其自身的启动子, 当 KaiC 过量表达时所有被检验的基因 (>800 个) 的表达都受到抑制; 如果把 *kaiBC* 的启动子换成其他物种的启动子, 如 *E. coli* 中可诱导的启动子, 基因表达的节律依然存在, 表明 KaiC 对几乎所有基因的表达都起调控作用。他们推测, KaiC 很可能周期性地控制整个染色体拓扑结构的变化, 其松散与紧密的状态调控着基因表达的活性。蓝细菌染色体的拓扑结构的节律性变化被随后的一系列实验所证实^[16-17]。2009 年, Vijayan 等^[18]研究结果表明, 染色体的给定构象唯一对应于一种全基因组的表达模式。

对 Kai 蛋白反馈回路研究的目的是要寻找基于转录 - 翻译的核心振子, 而最终发现了染色体的周期构型变化, 这是非常有意义的发现。蓝细菌生物钟的核心是什么, 它是如何控制染色体的拓扑结构变化的, 对 Kai 蛋白, 尤其是 KaiC 磷酸化的研究揭开了蓝细菌生物钟核心的神秘面纱。

KaiC 的自主磷酸化 (autophosphorylation) 对于生物钟的产生是必不可少的^[19-20], 其磷酸化位点的突变可破坏体内基因表达的昼夜振荡节律^[19]。KaiC 磷酸化受另两个 Kai 蛋白调控, 其中 KaiA 促进 KaiC 的磷酸化^[15,21], 而 KaiB 则削弱 KaiA 的作用^[22]。Tomita 等^[23] 研究发现, 即使在连续黑暗条件下 (蓝细菌几乎没有基因表达), KaiC 的磷酸化仍呈现稳定的 ~24 h 周期振荡。这个结果显然有悖于传统的转录 - 翻译振子机制。

出人意料的是, 当仅把 KaiA、KaiB、KaiC 以及 ATP 在体外混合时, KaiC 的磷酸化呈现出持续的昼夜振荡, 并且具有非常好的温度补偿性质^[3]。这表明蓝细菌生物钟的核心是由 3 个 Kai 蛋白组成的, 在没有基因调控的情况下仍能保持自身固有的节律持续振荡。Kai 振子是如何产生振荡并如何作为核心时钟调控蓝绿藻中全局基因表达的, 高等生物的生物钟是否也存在类似调控机制, 这些成为越来越多研究人员感兴趣的问题。

KaiC 是蓝细菌生物钟核心的核心, 它与 ATP 相互作用形成环形的六聚体^[24]。KaiC 单体类似哑铃形, 包含两个相似的区域, 即 CI 与 CII 区域。CI (N 末端) 与 CII (C 末端) 都包含 ATP 的结合域, 其中 N 末端优先结合 ATP^[24]。只有 CI 的 KaiC 突变体仍可形成六聚体, 而只有 CII 的突变体却不能, 这表明 N 末端为 KaiC 六聚化所必需, 而 C 末端的结构则相对松散^[25]。KaiC 兼具激酶与磷酸酶的活性, 并可以自主磷酸化以及自主去磷酸化^[26]。KaiC 还具有弱 ATP 酶活性, 并与激酶活性同步。

KaiC 六聚体的磷酸化为亚基间磷酸化, 发生在相邻亚基的交界面处^[20,25]。Kitayama 等^[27] 研究表明, KaiC 六聚体亚基之间的信息交换能增强蓝细菌昼夜节律的鲁棒性。当没有 KaiA 与 KaiB 存在时, KaiC 可以进行自主磷酸化与去磷酸化, 而其去磷酸化速率要远大于磷酸化速率, 高度磷酸化的 KaiC 在 30 h 后几乎全部转变为非磷酸化形式并保持不变^[28]。KaiA 以二聚体的形式存在, 并结合到 KaiC 六聚体形成 KaiAC 复合物, 来促进 KaiC 的自主磷酸化^[15]。Kageyama 等^[28] 研究表明, KaiA-KaiC

的结合快而松散, 可视为 KaiA 在 KaiC 六聚体之间以跳跃模式促进 KaiC 的磷酸化, KaiA 与 KaiC 六聚体的亲和力与 KaiC 的磷酸化状态几乎不相关, 但在连续光照条件下 (LL), KaiC/KaiA 的数量比率决定了 KaiC 的磷酸化振幅大小^[29]。KaiB 在溶液中存在单体、二聚体或四聚体, 并且以单体形式与 KaiC 结合^[30-32]。2008 年, Pattanayek 等^[33] 研究表明, KaiBC 复合物由 2 个 KaiB 二聚体与 1 个 KaiC 六聚体结合形成。KaiB 与 KaiC 的结合相对较慢, 两者的结合与解离速率均小于 KaiA-KaiC 的相应值^[28]。KaiB 与 KaiC 的结合明显地依赖于 KaiC 的磷酸化状态^[28,34], 尤其是 S431 的磷酸化水平^[35]。KaiB 不直接影响总体的 KaiC 磷酸化与去磷酸化速率, 而在 KaiA-KaiB-KaiC 相互作用时削弱 KaiA 对 KaiC 磷酸化的促进作用, 即 KaiB 与 KaiA 竞争结合 KaiC^[36] 以及通过 KaiABC 复合物束缚 KaiA 的活性^[28]。KaiABC 复合物中包含多个 KaiA 与 KaiB 的二聚体, 确切的化学计量数现在还不确定。KaiA 和 KaiB 在 KaiC 六聚体上的数量很可能随 KaiC 的磷酸化状态改变^[28], 因此, 给定时间内测量的是多种 KaiABC 复合物成分的平均值, 这也对定量分析其化学计量数造成了困难。

每个 KaiC 亚基 (C 末端) 有两个进化保守的非等同磷酸化位点, Ser431 与 Thr432^[19-20,34-35]。实验研究表明, KaiC 两个磷酸化位点存在拮抗性; 进一步的数学模型分析发现这种拮抗性产生了一个超敏感的开关, 使得 KaiC 的磷酸化振荡在一个较广泛的浓度范围内保持稳定^[37]。最近的研究认为, 第三个位点 Thr426 可能也对磷酸化振荡起调控作用。在 KaiC 的晶体结构中, S431、T432 与 ATP 的 γ -磷酸根之间呈一近似的等边三角形, T432 比 S431 更接近 ATP 的 γ -磷酸根, 这预示着 T432 有较强的磷酸化反应活性。进一步研究证实, 无论从动态过程还是稳态水平, T432 更容易被磷酸化^[19-20]。在仅有 KaiA 与 KaiC 时, KaiC 的磷酸化水平可达到 90% 以上, 其中仅 T432 磷酸化的亚基占总 KaiC 数量的 46.6%, 仅 S431 磷酸化的亚基占 11.9%, 双位点磷酸化的亚基占 33%^[19]。这个分布不仅表明了两个位点的磷酸化难易程度不同, 更揭示了它们的磷酸化过程是相互依赖的 (双位点磷酸化比单 S431 磷酸化亚基比例还多)。体内的位点突变实验表明, 如果突变 S431 (S431A), KaiC 的磷酸化水平要比野生型的高^[20], 这说明 S431 位点磷酸化对整体 KaiC 的磷酸化起抑制作用。最近实验给出一种

KaiC 体外磷酸化振荡的顺序 (或有序) 反应机制, 即 KaiC (单体) 先在 T432 磷酸化, 然后此 T432 磷酸化形式继续在 S431 磷酸化形成双位点磷酸化形式, 双位点磷酸化形式的去磷酸也是先 T432 后 S431^[34-35]。其中任一位点的突变都会打破这个机制而造成 KaiC 磷酸化振荡的完全缺失^[34-35]。

体外 Kai 振子的重组实验及其后续工作确立了 Kai 蛋白的核心振子地位。而一个完整的生物钟系统除了核心还需要输入与输出元件, 即外界环境与生物钟交流进行导引或重置的方式, 以及核心时序信号向下游生命活动传递的信号转导通路。

CikA、LdpA 以及 Pex 这 3 种蛋白质是蓝细菌生物钟输入系统的关键元件^[38]。任意一种对应基因的失活都会缩短生物钟周期, 这说明输入通路的作用是放慢生物钟的运转速度^[38]。Arita 等^[39]研究表明, *pex* 基因突变体在 12 h 光照 / 12 h 黑暗的循环条件下失去了减缓时钟振荡的能力; Pex 蛋白具有典型的 DNA 结合域, Pex 二聚体优先结合 *kaiA* 基因的启动子区域。这种结合抑制 *kaiA* 基因的表达, 因为 *pex* 的失活造成 *kaiA* 的表达水平高于野生型^[40]。缺少 *cikA* 的细胞表现出显著的输入通路的缺失, 它们在整个周期中完全感受不到黑暗刺激, 因此, 也无法重置生物钟^[41]。光照的强度变化会改变节律的周期, 失去 *ldpA* 基因的蓝细菌就不能通过感受光强来调整振荡周期。

生物钟的输出通路可以通过转导与放大核心时序信号来调控细胞的各种生理过程。蓝细菌中几乎整个基因组的表达都受生物钟的调控^[11], 这表明其体内存在着一种内在的全局调控机制。染色体拓扑结构的变化是全局基因表达所必需的, 但是仅有染色体构型变化是不够的, 因为当突变 *sasA* 或 *rpaA* 基因时, 染色体构象的周期振荡仍然存在, 但全局基因表达则受到极大影响^[16], 也就是说 SasA-RpaA 通路是生物钟核心传递信号的通道, 而染色体构象变化是驱动全局基因表达的机器, 若没有信号发送机器本身也无法完全正常工作。转录因子 RpaA 受两个拮抗因子 SasA 和 CikA 的调控, 从而来精确控制 KaiC 的磷酸化节律^[42]。SasA 可以直接与 KaiC 六聚体结合, KaiC 促进 SasA 的自主磷酸化, 而 SasA 不直接影响 KaiC 的磷酸化过程, 所以, 这是一条单向信号传输路径^[16]。磷酸化的 SasA 会把磷酸根转移给 RpaA, 而 RpaA 则会与下游蛋白或 DNA 相互作用。SasA-RpaA 通路是一条正反馈路径, 因为任意基因的突变都会造成基因表达活性的降

低。*rpaA* 基因的缺失将导致全局性的蓝细菌基因表达节律的丧失^[43]。另一种蛋白 LabA 是输出通路中的负反馈元件, 它可以传导 KaiC 的过量表达对整个基因组表达的抑制信号^[44]。当缺少 LabA 时, KaiC 的过量表达就不能再抑制基因表达, 而如果过量表达 LabA 则会减弱整体基因表达活性^[44]。在蓝细菌的生长过程中, PTR (posttranslational regulation) 通路就能充分产生振荡节律, 但当缺乏 TTR (transcriptional-translational feedback regulation) 回路时, 单个蓝细菌细胞的振荡节律显得不太稳定, 同时整个生长群体丧失同步性^[45]。最近研究发现, 蓝细菌 *kaiABC* 内源性节律的鲁棒性表达只出现在某些环境条件下, 而在另一些条件下则不然^[46]。目前, 蓝细菌生物钟振荡信号的完整调控途径还没有完全确定, 仍然有很多问题没有解决, 如基因表达的多相位与多波形是如何产生的。但唯一确定的是, 调控途径是多层次的复杂网络结构, 振荡过程的鲁棒性需要多种机制的协同合作。

3 当前Kai振子的理论模型概述

Kai 振子的体外持续振荡引起了很多研究者的关注, 由于这个系统非常简单 (相对于高等生物体内转录 - 翻译回路) 而且实验数据丰富, 所以, 它是非常理想的理论建模研究的对象。以下是对若干典型 Kai 振子模型的简单介绍与评述。

Emberly 和 Wingreen^[47] 提出了体外 KaiC 昼夜磷酸化的第一个定量模型。模型的主要机制为 KaiC 六聚体之间在磷酸化相中进行单体交换, 在去磷酸化相中多个完全磷酸化的 KaiC 六聚体聚合成团簇 (cluster), 当 KaiC 团簇的磷酸化水平降低到给定阈值时, 团簇即解聚成 KaiC 六聚体。这个模型第一次提出了单体交换机制, 模型本身没有显性描述单体交换的动力学过程, 只是通过六聚体由 KaiC 单体随机组合来体现, 而在随后的实验中则证实了单体交换的存在; 但单体交换发生在去磷酸化相初始而不是在磷酸化相^[28]。六聚体形成团簇的假设始终没有在实验中得到证实。

Mehra 等^[48] 较系统地研究了 3 个 Kai 蛋白之间的相互作用, 并提出了 KaiC 的自催化模型。其关键假设为两个 KaiC 六聚体之间的自催化机制, 即一个磷酸化的 KaiC 六聚体 (在 KaiA 存在时) 可以与另一个非磷酸化的 KaiC 六聚体碰撞 (或相互作用) 并使后者磷酸化。模型进一步研究了 KaiA、KaiB 辅助 KaiC 磷酸化 - 去磷酸化的动力学过程,

指出 KaiABC 复合物的稳定性, 尤其影响 KaiC 昼夜磷酸化的周期与振幅。由于总体模型设计为一闭合环形回路, 故而振荡的稳定性稍差, 满足稳定振荡的参数范围较窄。

Kurosawa 等^[49]的模型则强调 KaiA 与 KaiB 多种状态的反转造成 KaiC 的磷酸化振荡。模型假设 KaiA 与 KaiB 分别具有激活和失活两种状态, 激活的 KaiA 促进 KaiC 的磷酸化, 激活的 KaiB 促进 KaiC 的去磷酸化。两者激活与失活状态的翻转依赖于 KaiC 的磷酸化程度, 磷酸化的 KaiC 越多, 激活态的 KaiA 越少而激活态的 KaiB 越多。模型还将 Kai 振子与基因表达相互耦合, 给出不同光照条件下基因表达的动力学行为。事实上, KaiA 与 KaiB 的不同状态从未在实验中直接观测到, 这样的描述只能算是一种唯象的假设。

Clodong 等^[50]用全局系统优化算法研究了 KaiC 六聚体之间的反馈机制, 并筛选了最佳的动力学参数组。为了简化, 模型仅考虑 KaiC 亚基上的同一磷酸化位点, 从非磷酸化到完全磷酸化只需 6 步 ($C^0 \rightarrow \dots \rightarrow C^6$)。完全磷酸化的六聚体 C^6 可以结合 KaiB 形成 KaiBC 复合物 (BC^6), 并从 BC^6 开始去磷酸化直至 BC^0 , BC^0 解离 KaiB 变为 C^0 。以稳定的高振幅振荡为目标, 模型利用非线性全局优化算法搜索了最佳的 C 与 BC 磷酸化形式之间的正负反馈模式及其参数范围, 结果表明, KaiBC 对 KaiC 磷酸化过程的负反馈是产生鲁棒性高振幅振荡的最佳条件。

Mori 等^[51]的模型把 KaiC 六聚体按照构象与磷酸化状态大致分为 4 种不同状态, 其不同构象间的转化与 KaiC 的磷酸化水平相关, 同时, 在这 4 种状态之间引入单体交换。不同状态的 KaiC 对 KaiA 或 KaiB 的亲和力不同, 并且状态之间的单体交换速率也有差别。此模型等同考虑了 KaiC 亚基上的 3 种磷酸化位点 (S431、T432 和 T426), 即令 3 者磷酸化或去磷酸化反应速率一致。KaiC 磷酸化的同步主要是通过单体交换过程来实现的, 如果没有单体交换, 模型就不能产生持续的振荡。此后, Yoda 等^[52]同样基于 KaiC 六聚体构象变化与单体交换提出了相似的模型。

van Zon^[53]等提出了 KaiC 磷酸化的别构模型。每个 KaiC 六聚体磷酸化形式由于亚基间相互作用存在两种构象, 一种倾向磷酸化, 另一种倾向去磷酸化。别构转化采用了 MWC 模型 (Monod-Wyman-Changeux model) 的同变模式, 磷酸化水平越高,

六聚体则更趋向于去磷酸化构象。模型还假设 KaiA (或 KaiB) 与 KaiC 六聚体的亲和力随 KaiC 的磷酸化水平呈非线性变化, 如磷酸化越高, KaiA-KaiC 的结合就越弱。这样高度磷酸化的 KaiC 减慢反应速率, 等待低磷酸化的 KaiC “追赶”上来, 如此造成系统的同步。模型为了简化只考虑了亚基上同一类磷酸化位点。

Rust 等^[34]和 Teng 等^[45]以其实验结果为基础, 提出了一个类平均场式的简单模型。此模型第一次将两类磷酸化位点 (S431 与 T432) 非等同对待, 4 种 KaiC 单体磷酸化形式之间相互转化为有序模式 (先 T432 后 S431)。磷酸化 (或去磷酸化) 速率受 KaiA 的激活 - 失活状态调控, 而 KaiA 的激活 - 失活状态的转变则仅由 S431 位点磷酸化的亚基数量来控制, 其数量越多 KaiA 失活速率越快。模型没有显性考虑 KaiC 六聚体的动力学及其与 KaiA 和 (或) KaiB 的相互作用过程, KaiA 的激活 - 失活仍是唯象的描述。

在前面的章节中, 介绍了 KaiC 昼夜磷酸化的体外重组实验, 并评述了一系列 Kai 振子的理论模型, 但大多数模型都过于简化了一个非常重要的事实: S431 和 T432 位点在 KaiC 磷酸化循环中不能等同对待^[19-20,34-35]。基于 S431 与 T432 的非等同性, Li 等^[54]提出了一个步进式的 (step-by-step) KaiC 磷酸化网络模型。其中, KaiC 六聚体的磷酸化或去磷酸化被赋予动力学协同性, 即反应速率随 KaiC 自身的磷酸化水平 (磷酸化的 S431 与 T432 位点数量) 呈非线性的变化。若进一步假设, KaiA 与 KaiB 可以增强反应协同性, 同时增加网络拓扑结构的复杂性, 最终造成 Kai 系统精准和稳定的昼夜振荡。

在决定性模型中, KaiC 昼夜磷酸化的时序模式具有动力学多样性, 即不同磷酸化状态的 KaiC 六聚体表现出多种多样的波形、振幅和相位关系^[54], 这一特性似乎与蓝细菌全基因组表达的时序模式非常相似^[11]。进一步对模型进行随机性模拟, 能够重现细胞内生物钟的动力学特性。基于这种多样性, Li 等^[54]进一步提出了万花筒式的基因调控模式。在此模式中, 某一 KaiC 六聚体磷酸化形式或多个磷酸化形式的组合可作为独立的振荡信号输出来控制基因在不同相位的表达。Kai 反应网络的鲁棒性通过两不同相位 Kai 系统的混合, 以及改变蛋白质浓度和反应温度得到了充分的检验。进一步分析表明, KaiB 与 KaiC 结合的微小变化很可能是造成在

同步改变 Kai 蛋白浓度时, 两个独立实验产生相反结果的原因^[28,34]。另外, 通过瞬时扰动 KaiA 的浓度, 研究 Kai 振子的相位响应曲线, 这将有助于探究 Kai 振子在体内和体内的导引 (entrainment) 机制。

此外, Johnson 等^[55]还提出了其他的 Kai 振子模型, 简介可参考相关文献, 在这里不再详述。所有这些模型共有 3 类基本特征: 第一类, 考虑 KaiC 六聚体之间的偶合或相互作用; 第二类, 考虑 KaiA 或 KaiB 的多种活性状态; 第三类, 考虑 KaiC 或 KaiC 六聚体自身内部的相互作用。早期模型的特征基本属于第一类或第二类。单体交换与六聚体团簇^[47], KaiC 六聚体之间的自催化^[48]与 KaiC 六聚体之间的反馈机制^[50]都属于第一类, 它们通过 KaiC 六聚体之间的相互耦合实现同步。其中最成功的是对单体交换的预测, 但是至今为止单体交换对 KaiC 磷酸化振荡的作用尚不清楚。Rust 等^[34]和 Phong 等^[56]的工作具有第二类特征, 其主要思想是由依赖于 KaiC 磷酸化状态的 KaiA 或 KaiB 活性状态来间接实现 KaiC 之间的相互耦合。随着研究的进一步发展, KaiC 六聚体自身的性质, 即多亚基多位点的相互作用开始得到重视, Mori 等^[51]和 Yoda 等^[52]的模型是从研究 KaiC 六聚体之间的耦合到探究六聚体自身内在相互作用的过渡, 它们同时考虑了 KaiC 单体交换 (六聚体间) 以及构象变化 (六聚体自身)。van Zon 等^[53]的模型则彻底抛开了直接的 KaiC 六聚体之间的任何耦合而深入分析六聚体亚基间的相互作用 (第三类特征), 并直白地把 KaiA 或 KaiB 激活 - 失活过程演绎为 Kai 蛋白之间结合常数随 KaiC 磷酸化水平的变化, 而模型只简化考虑了 KaiC 的一类磷酸化位点, 而没有强调两种位点的非等同性。事实上, 这是大多数模型共同的简化考虑, 即使考虑了多位点^[47,51], 也是把所有位点等同看待, 没有区分位点间反应性的不同。Rust 等^[34,57]则以两个磷酸化位点的非等同性为基础, 但没有考虑 KaiC 六聚体的动力学信息以及 Kai 蛋白之间相互作用的显性描述, 而是用唯象的方式来描述 KaiA 的激活 - 失活来调控 KaiC 的磷酸化过程。蓝细菌生物钟核心蛋白之间相互作用的定量关系和动力学机制, 以及蓝细菌生物钟对基因组的表达调控模式依然备受关注^[6,45,58]。

参 考 文 献

- [1] Aschoff J. Exogenous and endogenous components in circadian rhythms. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1960, 25: 11-28
- [2] Pittendrigh CS. On temporal organization in living systems. Harvey Lect, 1960, 56: 93-125
- [3] Nakajima M, Imai K, Ito H, et al. Reconstitution of circadian oscillation of cyanobacterial KaiC phosphorylation *in vitro*. Science, 2005, 308(5720): 414-5
- [4] Ouyang Y, Andersson CR, Kondo T, et al. Resonating circadian clocks enhance fitness in cyanobacteria. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(15): 8660-4
- [5] Harmer SL, Panda S, Kay SA. Molecular bases of circadian rhythms. Annu Rev Cell Dev Biol, 2001, 17: 215-53
- [6] Xu Y, Weyman PD, Umetani M, et al. Circadian yin-yang regulation and its manipulation to globally reprogram gene expression. Curr Biol, 2013, 23(23): 2365-74
- [7] Grobbelaar N, Huang TC, Lin HY, et al. Dinitrogen-fixing endogenous rhythm in *Synechococcus* RF-1. FEMS Microbiol Lett, 1986, 37(2): 173-7
- [8] Johnson CH, Egly M. Metabolic compensation and circadian resilience in prokaryotic cyanobacteria. Annu Rev Biochem, 2014, 83: 221-47
- [9] Diamond S, Jun D, Rubin BE, et al. The circadian oscillator in *Synechococcus elongatus* controls metabolite partitioning during diurnal growth. Proc Natl Acad Sci USA, 2015, 112(15): E1916-25
- [10] Mihalcescu I, Hsing W, Leibler S. Resilient circadian oscillator revealed in individual cyanobacteria. Nature, 2004, 430(6995): 81-5
- [11] Liu Y, Tsinoremas NF, Johnson CH, et al. Circadian orchestration of gene expression in cyanobacteria. Genes Dev, 1995, 9(12): 1469-78
- [12] 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): 1519-23
- [13] 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): 881-5
- [14] Cohen SE, Erb ML, Selimkhanov J, et al. Dynamic localization of the cyanobacterial circadian clock proteins. Curr Biol, 2014, 24(16): 1836-44
- [15] 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): 15788-93
- [16] Smith RM, Williams SB. Circadian rhythms in gene transcription imparted by chromosome compaction in the cyanobacterium *Synechococcus elongatus*. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103(22): 8564-9
- [17] Woelfle MA, Xu Y, Qin X, et al. Circadian rhythms of superhelical status of DNA in cyanobacteria. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104(47): 18819-24
- [18] Vijayan V, Zuzow R, O'Shea EK. Oscillations in supercoiling drive circadian gene expression in cyanobacteria. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 106(52): 22564-8
- [19] 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): 13927-32
- [20] 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): 13933-8
- [21] Williams SB, Vakonakis I, Golden SS, 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): 15357-62
- [22] 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): 2127-34
- [23] Tomita J, Nakajima M, Kondo T, et al. No transcription-translation feedback in circadian rhythm of KaiC phosphorylation. *Science*, 2005, 307(5707): 251-4
- [24] Hayashi F, Suzuki H, Iwase R, et al. ATP-induced hexameric ring structure of the cyanobacterial circadian clock protein KaiC. *Genes Cells*, 2003, 8(3): 287-96
- [25] Hayashi F, Iwase R, Uzumaki T, et al. Hexamerization by the N-terminal domain and intersubunit phosphorylation by the C-terminal domain of cyanobacterial circadian clock protein KaiC. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 348(3): 864-72
- [26] Nishiwaki T, Iwasaki H, Ishiura M, et al. Nucleotide binding and autophosphorylation of the clock protein KaiC as a circadian timing process of cyanobacteria. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(1): 495-9
- [27] Kitayama Y, Nishiwaki-Ohkawa T, Sugisawa Y, et al. KaiC intersubunit communication facilitates robustness of circadian rhythms in cyanobacteria. *Nat Commun*, 2013, 4: 2897
- [28] 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): 161-71
- [29] Hosokawa N, Kushige H, Iwasaki H. Attenuation of the posttranslational oscillator via transcription-translation feedback enhances circadian-phase shifts in *Synechococcus*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(35): 14486-91
- [30] Hitomi K, Oyama T, Han S, et al. Tetrameric architecture of the circadian clock protein KaiB. A novel interface for intermolecular interactions and its impact on the circadian rhythm. *J Biol Chem*, 2005, 280(19): 19127-35
- [31] Snijder J, Burnley RJ, Wiegard A, et al. Insight into cyanobacterial circadian timing from structural details of the KaiB-KaiC interaction. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(4): 1379-84
- [32] Iida T, Mutoh R, Onai K, et al. Importance of the monomer-dimer-tetramer interconversion of the clock protein KaiB in the generation of circadian oscillations in cyanobacteria. *Genes Cells*, 2015, 20(3): 173-90
- [33] Pattanayek R, Williams DR, 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): 1767-78
- [34] Rust MJ, Markson JS, Lane WS, et al. Ordered phosphorylation governs oscillation of a three-protein circadian clock. *Science*, 2007, 318(5851): 809-12
- [35] Nishiwaki T, Satomi Y, Kitayama Y, et al. A sequential program of dual phosphorylation of KaiC as a basis for circadian rhythm in cyanobacteria. *EMBO J*, 2007, 26(17): 4029-37
- [36] Garces RG, 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): 1688-98
- [37] Lin J, Chew J, Chockanathan U, et al. Mixtures of opposing phosphorylations within hexamers precisely time feedback in the cyanobacterial circadian clock. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(37): E3937-45
- [38] Williams SB. A circadian timing mechanism in the cyanobacteria. *Adv Microb Physiol*, 2007, 52: 229-96
- [39] Arita K, Hashimoto H, Igari K, et al. Structural and biochemical characterization of a cyanobacterium circadian clock-modifier protein. *J Biol Chem*, 2007, 282(2): 1128-35
- [40] Kutsuna S, Kondo T, Aoki S, et al. A period-extender gene, *pex*, that extends the period of the circadian clock in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. *J Bacteriol*, 1998, 180(8): 2167-74
- [41] Schmitz O, Katayama M, Williams SB, et al. CikA, a bacteriophytochrome that resets the cyanobacterial circadian clock. *Science*, 2000, 289(5480): 765-8
- [42] Gutu A, O'Shea EK. Two antagonistic clock-regulated histidine kinases time the activation of circadian gene expression. *Mol Cell*, 2013, 50(2): 288-94
- [43] Markson JS, Piechura JR, Puszynska AM, et al. Circadian control of global gene expression by the cyanobacterial master regulator RpaA. *Cell*, 2013, 155(6): 1396-408
- [44] Taniguchi Y, Katayama M, Ito R, et al. *labA*: a novel gene required for negative feedback regulation of the cyanobacterial circadian clock protein KaiC. *Genes Dev*, 2007, 21(1): 60-70
- [45] Teng SW, Mukherji S, Moffitt JR, et al. Robust circadian oscillations in growing cyanobacteria require transcriptional feedback. *Science*, 2013, 340(6133): 737-40
- [46] Xu Y, Ma P, Shah P, et al. Non-optimal codon usage is a mechanism to achieve circadian clock conditionality. *Nature*, 2013, 495(7439): 116-20
- [47] Emberly E, Wingreen NS. Hourglass model for a protein-based circadian oscillator. *Phys Rev Lett*, 2006, 96(3): 038303
- [48] Mehra A, Hong CI, Shi M, et al. Circadian rhythmicity by autocatalysis. *PLoS Comput Biol*, 2006, 2(7): e96
- [49] Kurosawa G, Aihara K, Iwasa Y. A model for the circadian rhythm of cyanobacteria that maintains oscillation without gene expression. *Biophys J*, 2006, 91(6): 2015-23
- [50] Clodong S, Duhring U, Kronk L, et al. Functioning and robustness of a bacterial circadian clock. *Mol Syst Biol*, 2007, 3: 90
- [51] Mori T, Williams DR, Byrne MO, et al. Elucidating the ticking of an *in vitro* circadian clockwork. *PLoS Biol*, 2007, 5(4): e93

- [52] Yoda M, Eguchi K, Terada TP, et al. Monomer-shuffling and allosteric transition in KaiC circadian oscillation. *PLoS One*, 2007, 2(5): e408
- [53] van Zon JS, Lubensky DK, Altena PR, et al. An allosteric model of circadian KaiC phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(18): 7420-5
- [54] Li C, Chen X, Wang P, et al. Circadian KaiC phosphorylation: a multi-layer network. *PLoS Comput Biol*, 2009, 5(11): e1000568
- [55] Johnson CH, Stewart PL, Egli M. The cyanobacterial circadian system: from biophysics to bioevolution. *Annu Rev Biophys*, 2011, 40: 143-67
- [56] Phong C, Markson JS, Wilhoite CM, et al. Robust and tunable circadian rhythms from differentially sensitive catalytic domains. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(3): 1124-9
- [57] Rust MJ. Orderly wheels of the cyanobacterial clock. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(42): 16760-1
- [58] Ma L, Ranganathan R. Quantifying the rhythm of KaiB-C interaction for *in vitro* cyanobacterial circadian clock. *PLoS One*, 2012, 7(8): e42581