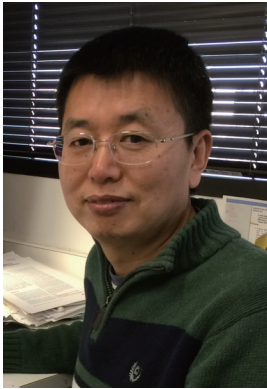


DOI: 10.13376/j.cblls/2015185

文章编号: 1004-0374(2015)11-1328-08



黄国存, 苏州大学生物钟研究中心教授。河北师范大学本科, 西北农林科技大学硕士, 中国科学院植物研究所博士。曾在美国密西根州立大学和美国德州大学西南医学中心做博士后研究。先后在美国 Yi Liu 和 Takahashi 实验室从事生物钟研究。主要研究方向: 以真菌和小鼠为材料, 利用生物化学、分子生物学和遗传学等研究手段, 寻找真核生物钟新的调控元件。发现了蛋白激酶 PKA 直接参与了生物钟蛋白的磷酸化; 通过蛋白纯化结合质谱分析, 定位了 PKA 的靶位点。相关研究发表在 *JBC*、*EMBO J*、*PNAS* 和 *Genes Dev* 等杂志上。目前主持国家自然科学基金项目 2 项。

生物钟在粗糙脉孢菌中的运行机制

张云峰, 黄国存*

(苏州大学医学部生物钟研究中心, 苏州 215123)

摘要: 尽管真菌和哺乳动物进化上相差很远, 但在分子水平上, 它们的生物钟作用机理却保守相似, 由正调控元件和负调控元件组成的负反馈环路驱动着节律基因的表达。粗糙脉孢菌生物钟的正调控元件 WC-1 和 WC-2 激活中心振荡器 *frq* 基因的表达, 而负调控元件 FRQ 和 FRH 抑制正调控元件的转录活性。负反馈环路涉及转录、转录后、翻译和翻译后等不同水平的调节, 多种蛋白激酶和磷酸酶参与这一过程, 蛋白泛素化和蛋白酶体也是不可缺少的环节。

关键词: 生物钟; 粗糙脉孢菌; 负反馈环路; FRQ

中图分类号: Q945.43; Q949.327.8 **文献标志码:** A

The circadian clock mechanism of *Neurospora crassa*

ZHANG Yun-Feng, HUANG Guo-Cun*

(The Center for Circadian Clocks, College of Medical School, Soochow University, Suzhou 215123, China)

Abstract: Despite the evolutionary distances between fungi and mammals, their circadian clock mechanisms share remarkable similarity. At the molecular level, the negative feedback loops consist of positive and negative elements, driving the rhythmic expression of core clock and clock-controlled genes. In *Neurospora*, the positive element, WC-1 and WC-2 complex (WCC) activates *frq* expression, while the negative element, FRQ-FRH complex (FFC) inhibits WCC transcription activity. The feedback loops compose of different regulations of transcription, post-transcription, translation and post-translation. Several kinases and phosphatases are responsible for clock protein phosphorylation or dephosphorylation. FRQ ubiquitination and degradation by the proteasome are essential to keep the clock running.

Key words: circadian clock; *Neurospora crassa*; negative feedback loop; FRQ

收稿日期: 2015-01-30

基金项目: 国家自然科学基金项目(31271281)

*通信作者: E-mail: guocunhuang@gmail.com

生物钟是生物体内在的计时装置, 存在于从低等原核生物到高等真核生物几乎所有活体细胞中。一般认为, 生物钟是由于地球的自转和昼夜交替, 使地球上的生物为了适应这种变化进化而来, 所以, 生物钟的周期长短近似 24 h, 也称为近日节律或昼夜节律。生物钟调控系统包括信号输入 (input)、中心振荡器 (central oscillator) 和信号输出 (output) 三部分。中心振荡器接受来自外界光照、温度或营养化学信号等, 从而做出内部调整, 并与输入信号同步化, 通过控制一系列下游基因表达完成信号输出。因此, 生物钟是生物体适应外界环境变化不可缺少的时间记录装置。

研究生物钟的常用模式生物包括蓝藻细长聚球藻 (*Synechococcus elongates*)、粗糙脉孢菌 (*Neurospora crassa*)、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)、果蝇 (*Drosophila melanogaster*) 和小鼠。由于粗糙脉孢菌在进化上与植物和动物密切相关, 而且生长周期短, 在昼夜节律分子机制研究方面对整个生物钟研究领域起到了重要的推动作用。粗糙脉孢菌属于子囊菌门, 球壳目, 脉孢菌属。由于在黑暗和室温条件下, 大约每 24 h 产生一次肉眼可见的无性孢子斑, 从而成为研究生物钟机制的模式生物。早在 1941 年, 比德尔 (George Wells Beadle) 和塔特姆 (Edward Lawrie Tatum) 用 X 射线处理粗糙脉孢菌, 通过后代突变体筛选从而提出“一个基因, 一个酶”的学说。据此, 1958 年他们分享了诺贝尔生理学或医学奖 (同年另一半诺奖授予 Joshua Lederberg)。所以, 粗糙脉孢菌作为遗传学研究的材料由来已久。

自 1984 年第一个生物钟基因果蝇 *period* (*per*) 被克隆之后, 来自粗糙脉孢菌的第二个生物钟基因 *frequency* (*frq*) 在 1989 年也相继得到克隆^[1]。1999 年, Dunlap^[2] 第一次在真菌中提出的生物钟负反馈环路机制, 现在已证实在其他物种中也保守存在。2003 年, 粗糙脉孢菌的基因组测序完成^[3], 大约 1 万个基因分布在含有 43 Mb 的 7 条染色体上。目前, 美国达特茅斯学院的一个研究项目试图得到所有基因敲除的突变体, 研究者可以咨询或订购感兴趣的菌株用于不同目的的实验。本文只对以粗糙脉孢菌为材料在生物钟研究方面的工作进行总结。

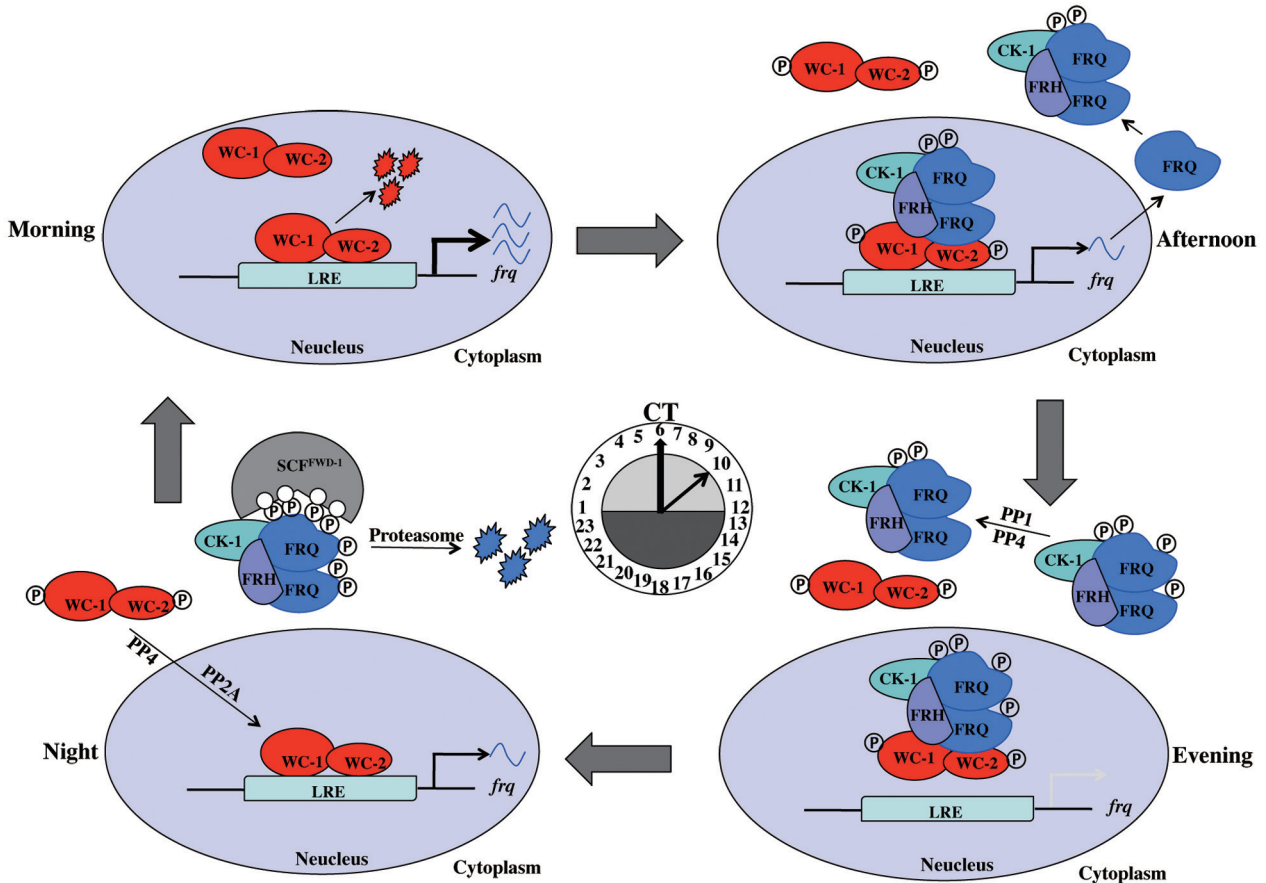
1 中心振荡器和负反馈环路

粗糙脉孢菌生物钟的中心振荡器由正调控元件和负调控元件构成的负反馈环路组成。正调控元件包括 WHITE COLLAR-1 (WC-1) 和 WHITE COLLAR-2

(WC-2) 蛋白, 负调控元件由 FREQUENCY (FRQ) 和 FRQ-interacting RNA helicase (FRH) 两种蛋白组成。在深夜 (subjective night), 当 FRQ 含量最低时, WC-1 和 WC-2 形成异源二聚体 (WCC), WCC 结合到 *frq* 基因的启动子特殊区域 (the Clock Box), 诱导该基因的转录表达。*frq* mRNA 逐渐积累, 到第二天上午达到高峰。FRQ 合成后形成同型二聚体, 与 FRH 形成复合物 FFC (FRQ-FRH complex, FFC), 然后, 再和酪蛋白激酶 CK1a (以下简称 CK-1) 结合在一起, 这个蛋白复合物就转运到细胞核中抑制 WCC 的转录活性, 使 *frq* mRNA 的含量降低。新合成的 FRQ 蛋白逐渐被蛋白激酶磷酸化, 当磷酸化达到一定程度时, 被泛素连接酶复合物 SCF 中的 F-Box 蛋白 FWD-1 识别, 接着被蛋白酶体分解。当细胞质中的 FRQ 含量降低到一定域值, 就不能和其他蛋白形成复合物转运到细胞核中抑制 WCC 的转录活性, 这样 WCC 又开始了新一轮转录激活 *frq* 的循环, 这个周期近似 24 h (图 1)。WCC 除了能够结合到 *frq* 基因的启动子区域外, 也控制着大约 10 % 的基因表达, 这些基因叫做 *ccgs* (clock-controlled genes)^[4-5]。

1.1 负调控元件FRQ和FRH

FRQ 是一个磷酸化蛋白, CK-1 是 FRQ 重要的磷酸化激酶, 与 FRQ 紧密结合。最近, 两个研究组发现体内 FRQ 多达 113 个丝氨酸 / 苏氨酸磷酸化位点^[6-7], 有些位点通过体外实验已得到证实^[7]。在一个生物钟周期中, 磷酸化的发生具有时空性。新合成的 FRQ 没有任何修饰, 磷酸化事件很快发生在位于 PEST-1 和 FFD (FRQ-FRH interacting domain, FFD) 之间的部位, 接着蛋白 C 末端开始磷酸化, 随后 PEST-1 区域磷酸化, 蛋白 N 端在一个周期的最后磷酸化。尽管磷酸化饱和后的 FRQ 发生降解, 但 C 端的磷酸化显然对 FRQ 蛋白起着稳定作用。有意思的是, 在一个蛋白激酶 A (protein kinase A, PKA) 表达较高的突变体中, FRQ 的稳定性也增强, 体外实验证实 PKA 能磷酸化 FRQ^[8], 但 PKA 在体内是否能磷酸化 FRQ 蛋白 C 端, 还不得而知。尽管单一磷酸化位点可以影响蛋白质的稳定性, 由于 FRQ 具有如此多的磷酸化位点, 据此推测单一磷酸化位点不可能具有独特的生理功能。对 FRQ 蛋白全序列氨基酸分析表明, N 末端含有较多的碱性氨基酸, 带正电荷, 而中部和 C 末端酸性氨基酸较多, 带负电荷。没有磷酸化的 FRQ 由于蛋白两端所带电荷相反, 相互结合在一起, 导致在空间上相隔



在主观的深夜，WCC开始结合到 frq 的启动子LRE区域，激活该基因的转录， frq mRNA上午达到峰值，这时WCC转录活性最高，蛋白质活性最低(Morning)。FRQ蛋白自身以二聚体形式存在，再与FRH和CK-1形成一大的蛋白质复合体，然后这个蛋白质复合体进入细胞核内抑制WCC的转录活性， frq mRNA水平降低(Afternoon)。在细胞质中，FRQ逐渐被磷酸化，两种磷酸酶PP1和PP4会拮抗这一过程；磷酸化的WCC从细胞核进入细胞质， frq 转录在晚上达到低谷(Evening)。高度磷酸化的FRQ能够被SCF^{FWD-1}识别，最后通过蛋白酶体降解；WCC被PP4或PP2A去磷酸化，然后返回细胞核，开始下一个循环(Night)。CT, Circadian Time, 生物钟时间。

图1 粗糙脉孢菌生物钟中心振荡器的负反馈环路

162个氨基酸之远的两亲性 α 螺旋(FRQ-CK1 interacting domain, FCD)相遇在一起。这一特殊的卷曲螺旋结构是CK-1和FRQ相互作用的基础。FRQ的N末端逐渐被CK-1磷酸化，等电点降低。随着磷酸基团的增加，FRQ蛋白N端逐渐带负电荷，而相同电荷互相排斥，FRQ蛋白的N端和C端开始分离，慢慢打开。由于结构改变，原来被埋藏在内部的PEST-1区域被CK-1磷酸化，从而导致FRQ的最终降解^[9]。虽然已清楚磷酸化的FRQ被泛素连接酶复合物SCF中的F-Box蛋白FWD-1识别^[10]，然后通过蛋白酶体途径降解，但至今不清楚FWD-1对FRQ蛋白的识别位点。COP9信号复合物通过SCF^{FWD-1}的稳定性调节间接参与了生物钟正常运转^[11]。另外，FRQ也可能存在其他降解途径^[12]。

FRH，一种RNA解旋酶，是Liu实验室纯化FRQ时发现的和FRQ紧密结合的新蛋白质^[13]。 frh 属于粗糙脉孢菌重要基因，基因敲除后代不能存活。在FRH基因抑制的突变体中，FRQ蛋白降低， frq mRNA含量上升，转录和翻译水平都失去了节律，说明FRH是脉孢菌生物钟中心振荡器重要的组成部分^[13]。酵母中FRH的同源基因Dob1p/Mtr4p是外切酶体的辅助因子，与RNA代谢有关。在脉孢菌中FFC能和外切酶体的催化亚基RRP44和RRP6结合，促进 frq mRNA的降解^[14]。2012年，在小鼠肝脏PER蛋白的纯化过程中，也发现两种RNA解旋酶DDX5和DDX9与FER结合在一起^[15]。这种新的生物钟转录后调控方式可能在真核生物中保守相似。

1.2 正调控元件WC-1和WC-2

WC-1 和 WC-2 能够形成 WCC 复合物, 结合到 *frq* 和许多 *ccgs* 基因的启动子区域, 调控生物钟基因的节律表达。WCC 是第一个被发现的在生物钟负反馈环路中通过 PAS-PAS 结合的异源二聚体转录因子^[16]。由于在 *frq* 基因敲除的突变体中 WCC 的磷酸化变得很低, 据此推断 FRQ 可能是某些蛋白激酶的载体^[17]。CK-1 和 CK-2 蛋白激酶除了磷酸化 FRQ 外, 也调节 WCC 的磷酸化, 并且这个过程依赖于 FRQ^[18], 但是, PKA 调节的 WC-1 磷酸化可能不依赖于 FRQ^[8]。磷酸化后的 WCC 转录活性降低, 蛋白稳定性增加; 相反, 低磷酸化的 WCC 转录活性增强, 蛋白稳定性减弱。所以, FRQ 抑制 WCC 转录活性, 减少 *frq* mRNA 的合成, 同时 FRQ 促进高磷酸化 WCC 的积累, 负反馈环路和正反馈环路同时存在^[19]。除了 FRQ 调节 WCC 蛋白稳定性外, FRH 也对 WCC 具有相似的生理功能^[20]。一般认为 WC-1 蛋白存在幅度较低的周期变化, WC-2 蛋白含量基本不变。WC-1 至少含有 10 个磷酸化位点^[6,21-22], 而且在 C 末端接近 DNA 结合区域^[21], 6 个相近的位点磷酸化发生过程有先后顺序, 由不同蛋白激酶控制^[8]。双向电泳表明, WC-2 至少含有 8 个磷酸化位点, 并且磷酸化水平呈现生物钟节律^[17]。WC-1 蛋白持续结合在基因的启动子区域, 而 WC-2 蛋白的结合具有周期性变化^[23]。作为转录复合体的 WCC, 在 DNA 结合方面为什么 WC-1 和 WC-2 又表现出如此的不同, 还需进一步研究证实。

2 参与生物钟调节的酶

2.1 蛋白激酶

由于 FRQ 是含有上百个磷酸化位点的生物钟蛋白, WC-1 和 WC-2 也是磷酸化蛋白, 已证实多种蛋白激酶参与了脉孢菌生物钟的调控, 如 CK-1^[24]、CK-2^[25-26]、CAMK-1^[27]、PRD-4^[28]、PKC^[29]、PKA^[8]、GSK-3^[30]。CK-1 参与 FRQ 和 WCC 的磷酸化调节, 也是和 FRQ 结合最紧密的蛋白激酶, 在果蝇中的相似激酶是 DBT, 哺乳动物中是 CK-1 ϵ 。CK-1 在整个生物钟周期中都与 FRQ 结合^[6], 除了行使它的激酶功能, 是否也有其他功能还不十分清楚: 因为在果蝇中 DBT 的激酶催化活性并不重要, 在 DBT-PER 复合物中, DBT 可能只是起到桥梁作用来接受其他蛋白激酶的加入^[31], 在哺乳动物细胞中也有类似报道^[32]。尽管 CK-1 和 CK-2 的

磷酸化识别位点不同, 但体外激酶磷酸化实验表明, 对于某些位点, 两种激酶都能识别^[7]。和 CK-1 不同, CK-2 可能与温度补偿性有关^[33]。

2.2 磷酸酶

和蛋白激酶功能相反, 磷酸酶是把磷酸基团从蛋白质上去除。在 PP1 催化亚基突变体中, FRQ 稳定性下降, 生物钟节律变短; 在 PP2A 调节亚基的突变体中, FRQ 稳定性没有改变, 但蛋白质含量和 *frq* mRNA 水平下降^[34]; 同时, WC-2 高度磷酸化并且失去了节律^[17]。因此, PP1 和 PP2A 两种磷酸酶参与脉孢菌生物钟的调控, 但作用不同。WCC 能够在细胞核和细胞质中快速穿梭, 存在于细胞质中的 PP2A 能够使高磷酸化的 WC-2 去磷酸化, 然后进入核内^[19]; 但是, 另一研究组认为是 PP4, 而不是 PP2A, 调节 WCC 进入核内^[35]。要搞清楚 PP4 和 PP2A 对 WCC 进入核内的调控作用, 一个重要问题是要弄清磷酸酶的细胞定位, 包括催化亚基和调节亚基。由于在细胞核质提取分离过程中, 小的蛋白质容易从核中渗漏到细胞质, 从而造成某些蛋白质的定位错误。VVD 曾被定位在细胞质中^[36], 很难解释它的光抑制作用, 直到利用 GFP-VVD 融合蛋白技术发现 VVD 其实存在于细胞核内, 通过和 WCC 结合抑制其转录活性, 从而解释了光适应的机制^[37]。

2.3 与染色质重塑有关的酶

CLOCKSWITCH 是依赖 ATP 的染色质重塑酶, 它能节律性地结合到 *frq* 的启动子区域, 通过改变染色质的结构调控 WC-2 与 WC-1 的结合^[23]。CHD1 也是一种染色质重塑酶, 该基因敲除的突变体 *frq* 基因转录和翻译水平都失去节律, 同时 *frq* 的启动子区域甲基化程度延伸扩大, 相关的甲基化酶 DIM-2 与生物钟周期节律无关, 但影响生物钟的时相^[38]。

3 信号输入

3.1 光

WC-1 也是蓝光受体, 黄素腺嘌呤二核苷酸 (FAD) 能够共价结合到保守的感光 LOV 结构域^[39-40]。把黑暗培养的脉孢菌转到光下, WCC 能迅速结合到光诱导基因的启动子 LRE 区域, 激活相关基因的表达 (例如 *frq*、*al-3* 和 *vvd* 等)^[41], 几个小时后, 这些光诱导基因表达水平又恢复到正常水平, 这种现象叫做光适应。WC-1 能发生光诱导磷酸化, 而高磷酸化 WCC 的转录活性降低^[42]。与

光适应有关的重要蛋白质是 VVD, 它含有一个 PAS/LOV 结构域, 也能与 FAD 结合, 是光受体蛋白, 其功能是在光下拮抗 WCC 的功能^[43]。VVD 能被光激活表达, 在持续黑暗条件下受生物钟调控^[43]。从蛋白质结构上分析, 光能引起 N 末端帽子结构离开 PAS/LOV 功能域, 这样两个 VVD 可以形成同源二聚体^[44]。2010 年, 3 个实验室各自独立工作证实, 光诱导合成的 VVD 快速进入细胞核内, 与 WCC 结合, 减弱 WCC 结合 DNA 的能力, 这样光诱导表达的基因转录水平被降低, 从而解释了光适应的机制^[37,45-46]。VVD 结合 WCC 也增加了 WCC 的蛋白稳定性^[46]。

3.2 温度

除了光以外, 温度也是生物钟重要的环境输入信号, 它主要影响 FRQ 蛋白的变化, 从而对生物钟节律重新设置。生长在 21 °C 和 28 °C 不同温度下的脉孢菌, 尽管 *frq* 转录水平没有太大区别, 但在高温条件下峰值 FRQ 蛋白含量是低温条件相对应峰值的 3 倍, 说明 *frq* 转录后调控决定不同温度条件下的 FRQ 含量^[47]。当把生物钟自由运转的培养物从 21 °C 改为 28 °C, 新的 FRQ 时相总是从最低点开始; 相反, 当把生物钟自由运转的培养物从 28 °C 改为 21 °C, 新的 FRQ 时相从最高点开始^[47]。根据生物钟的自由运转规律, 在 FRQ 某一特定时相, 温度改变有可能抑制生物钟的运行, 在新的生长条件下脉孢菌失去了节律, 这一现象叫做生物钟的奇异性 (singularity)^[48]。*frq* 可以翻译出相差 100 个氨基酸的两种 FRQ 蛋白, sFRQ (short FRQ) 和 lFRQ (long FRQ)。低温时两种 FRQ 含量没有区别, 高温时 lFRQ 比例增加^[49]。无论低温还是高温, 只要生物体在生理耐受的适应温度范围内, 其自由运转的生物钟周期长短不会随温度的变化而改变, 即生物钟温度补偿性, 这是生物钟的重要特性之一。

除了光和温度两种主要的生物钟输入信号外, 外部营养或化学信号也可能影响生物钟的运转。由生物钟控制的输出信号也可以作为输入信号来维持生物钟的时间准确性。

4 信号输出

中心振荡器接受外部信号, 再经过基因表达调控, 最后做出适应外部环境的变化, 这就是生物钟的信号输出, 在基因表达水平上表现为 WCC 调控 *ccgs* 的节律表达。脉孢菌在黑暗条件下产生的无性孢子斑节律就是一种生物钟控制的信号输出, 常用

来检测突变体生物钟是否发生改变的表型。一般来讲, 如果无性孢子斑的节律变长、变短或失去了节律, 在分子水平上 FRQ 含量和磷酸化也有同样的周期长短变化。

关于信号输出, 一个突出的例子是发现与渗透胁迫有关的 MAPK 通路和生物钟共同调控脉孢菌的 *ccg-1* 的表达^[50]。MAPK 磷酸化具有明显的昼夜节律, 并且受生物钟调控。如果 MAPK 通路上游的基因 *rrg-1* 基因敲除, 突变体不能表达 *ccg-1*, 从而失去了抗渗透胁迫的能力。在野生型脉孢菌中, *ccg-1* 在黎明之前达到峰值, 为即将来临的白天日光照射和高温带来的渗透胁迫做好准备, 随后表达水平降低。这种生物钟调控的信号输出对生物体有效利用自身能量提供了保证。

在众多 *ccgs* 中, 有些时相与 *frq* 相同, 在早晨达到峰值, 有些在晚上达到峰值, 但机制并不清楚, 直到 *csp1* 的发现才揭开谜底^[51]。*csp1* 编码一种转录抑制因子, 是 WCC 的直接调控基因。CSP1 和 FRQ 相似, 磷酸化后结合泛素连接酶复合物被降解。由 CSP1 调控抑制的基因表达晚上达到峰值, 和 WCC 激活的基因表达时相正好相反。在几百个 CSP1 调控的基因中, 58 个基因参与细胞膜脂类代谢。由于这些基因晚上表达最高, 暗示细胞膜合成流动性也有昼夜节律。在 *csp1* 突变体中, 生物钟周期随着培养基中葡萄糖浓度的升高而变短, 过量表达 CSP1 引起生物钟周期变长, 最后失去节律。葡萄糖增加 WC-1 的翻译, 同时, 葡萄糖通过 CSP1 抑制 *wc-1* 的转录, 所以在野生型脉孢菌中, 生物钟周期长短不会随着培养基中葡萄糖浓度的改变而改变。因此, CSP1 通过对 WC-1 负反馈抑制作用把能量代谢和生物钟紧密联系起来^[52]。

5 不依赖负反馈环路调控的代谢生物钟

从真菌到哺乳动物, 生物钟中心振荡器都是由基于转录和翻译的负反馈环路组成, 但是不同物种间的生物钟基因不同, 说明生物钟在这些物种中独立进化而来。是否生物钟在不同物种中有一共同祖先, 这一直是生物钟研究领域感兴趣的问题。人类血液中的成熟红细胞没有细胞核和线粒体, 不存在基因的转录和翻译; 但在这些细胞中发现 Peroxiredoxin (PRX) 蛋白存在一个 24 h 的氧化还原周期, 而且节律符合生物钟的标准, 如能自由运转和温度补偿等^[53]。同时, 在真核生物一种绿藻中也存在相似的代谢生物钟, 并且和负反馈环路调控的

生物钟相互作用^[54]。2012年, 基于PRX的代谢生物钟在蓝藻、脉孢菌、果蝇和小鼠中都被证实存在^[55]。PRX的重要功能是清除细胞体内的活性氧(ROS)。有意思的是, 脉孢菌活性氧的产生存在昼夜节律^[56]。代谢生物钟和基于转录和翻译的遗传生物钟怎样共同保持生物体与外部环境时间的一致性, 还需进一步研究证实。

6 结语与展望

尽管粗糙脉孢菌属于低等真核生物, 但其基因组较小, 遗传生化操作简单易行, 是一种研究生物钟的理想模式生物。以小鼠为材料, 染色质免疫沉淀结合高通量测序结果表明, 只有22%的节律表达的mRNA直接依赖于转录调控, 即这些基因新转录的包括内含子在内的pre-mRNA也具有与稳态mRNA相似的节律和时相, 这说明其他大多数具有节律表达的mRNA属于转录后调控^[57]。在脉孢菌中已报道FRH结合外切酶体参与*frq*的转录后调控^[14], 在植物中发现剪接体直接结合生物钟基因pre-mRNA^[58], 即使稳态mRNA恒定不变, polyA信号长短也可能受生物钟调控^[59]。最近, 本实验室和美国德州大学西南医学中心Liu实验室合作, 利用蛋白质免疫沉淀技术结合质谱分析, 发现酵母同源蛋白Not1和WCC结合在一起, 而Not1和去腺苷化酶Ccr4存在于一个复合体中^[60]。Ccr4-Not是一个含有至少9个蛋白质的复合物^[61], 与mRNA代谢有关^[62], 它是怎样参与生物钟转录后调控的, 我们正试图在哺乳动物中找到答案。

[参 考 文 献]

- [1] McClung CR, Fox BA, Dunlap JC. The *Neurospora* clock gene frequency shares a sequence element with the *Drosophila* clock gene *period*. *Nature*, 1989, 339(6225): 558-62
- [2] Dunlap JC. Molecular bases for circadian clocks. *Cell*, 1999, 96(2): 271-90
- [3] Galagan JE, Calvo SE, Borkovich KA, et al. The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Nature*, 2003, 422(6934): 859-68
- [4] Baker CL, Loros JJ, Dunlap JC. The circadian clock of *Neurospora crassa*. *FEMS Microbiol Rev*, 2012, 36(1): 95-110
- [5] Heintzen C, Liu Y. The *Neurospora crassa* circadian clock. *Adv Genet*, 2007, 58: 25-66
- [6] Baker CL, Kettenbach AN, Loros JJ, et al. Quantitative proteomics reveals a dynamic interactome and phase-specific phosphorylation in the *Neurospora* circadian clock. *Mol Cell*, 2009, 34(3): 354-63
- [7] Tang CT, Li S, Long C, et al. Setting the pace of the *Neurospora* circadian clock by multiple independent FRQ phosphorylation events. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(26): 10722-7
- [8] 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): 3283-95
- [9] Querfurth C, Diernfellner AC, Gin E, et al. Circadian conformational change of the *Neurospora* clock protein FREQUENCY triggered by clustered hyperphosphorylation of a basic domain. *Mol Cell*, 2011, 43(5): 713-22
- [10] 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): 4421-30
- [11] 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): 1518-31
- [12] 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): 11508-15
- [13] Cheng P, He Q, He Q, et al. Regulation of the *Neurospora* circadian clock by an RNA helicase. *Genes Dev*, 2005, 19(2): 234-41
- [14] Guo J, Cheng P, Yuan H, et al. The exosome regulates circadian gene expression in a posttranscriptional negative feedback loop. *Cell*, 2009, 138(6): 1236-46
- [15] Padmanabhan K, Robles MS, Westerling T, et al. Feedback regulation of transcriptional termination by the mammalian circadian clock PERIOD complex. *Science*, 2012, 337(6094): 599-602
- [16] Crosthwaite SK, Dunlap JC, Loros JJ. *Neurospora* wc-1 and wc-2: transcription, photoresponses, and the origins of circadian rhythmicity. *Science*, 1997, 276(5313): 763-9
- [17] Schafmeier T, Haase A, Kaldi K, et al. Transcriptional feedback of *Neurospora* circadian clock gene by phosphorylation-dependent inactivation of its transcription factor. *Cell*, 2005, 122(2): 235-46
- [18] 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): 2552-65
- [19] Schafmeier T, Diernfellner A, Schafer A, et al. Circadian activity and abundance rhythms of the *Neurospora* clock transcription factor WCC associated with rapid nucleocytoplasmic shuttling. *Genes Dev*, 2008, 22(24): 3397-402
- [20] Shi M, Collett M, Loros JJ, et al. FRQ-interacting RNA helicase mediates negative and positive feedback in the *Neurospora* circadian clock. *Genetics*, 2010, 184(2): 351-61
- [21] 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): 17526-32
- [22] Sancar G, Sancar C, Brunner M, et al. Activity of the circadian transcription factor White Collar Complex is modulated by phosphorylation of SP-motifs. *FEBS Lett*, 2009, 583(12): 1833-40
- [23] Belden WJ, Loros JJ, Dunlap JC. Execution of the circadian negative feedback loop in *Neurospora* requires the ATP-dependent chromatin-remodeling enzyme CLOCKSWITCH. *Mol Cell*, 2007, 25(4): 587-600
- [24] Gorl M, Mellow M, Huttner B, et al. A PEST-like element in FREQUENCY determines the length of the circadian period in *Neurospora crassa*. *EMBO J*, 2001, 20(24): 7074-84
- [25] Yang Y, Cheng P, He Q, et al. Phosphorylation of FREQUENCY protein by casein kinase II is necessary for the function of the *Neurospora* circadian clock. *Mol Cell Biol*, 2003, 23(17): 6221-8
- [26] Yang Y, Cheng P, Liu Y. Regulation of the *Neurospora* circadian clock by casein kinase II. *Genes Dev*, 2002, 16(8): 994-1006
- [27] 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): 41064-72
- [28] Pregueiro AM, Liu Q, Baker CL, et al. The *Neurospora* checkpoint kinase 2: a regulatory link between the circadian and cell cycles. *Science*, 2006, 313(5787): 644-9
- [29] Franchi L, Fulci V, Macino G. Protein kinase C modulates light responses in *Neurospora* by regulating the blue light photoreceptor WC-1. *Mol Microbiol*, 2005, 56(2): 334-45
- [30] Tataroglu O, 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): 36936-43
- [31] Yu W, Zheng H, Price JL, et al. DOUBLETIME plays a noncatalytic role to mediate CLOCK phosphorylation and repress CLOCK-dependent transcription within the *Drosophila* circadian clock. *Mol Cell Biol*, 2009, 29(6): 1452-8
- [32] Lee H, Chen R, Lee Y, et al. Essential roles of CKI δ and CKI ϵ in the mammalian circadian clock. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(50): 21359-64
- [33] Mehra A, Shi M, Baker CL, et al. A role for casein kinase 2 in the mechanism underlying circadian temperature compensation. *Cell*, 2009, 137(4): 749-60
- [34] Yang Y, He Q, Cheng P, et al. Distinct roles for PP1 and PP2A in the *Neurospora* circadian clock. *Genes Dev*, 2004, 18(3): 255-60
- [35] Cha J, Chang SS, 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): 3246-55
- [36] Schwerdtfeger C, Linden H. VIVID is a flavoprotein and serves as a fungal blue light photoreceptor for photoadaptation. *EMBO J*, 2003, 22(18): 4846-55
- [37] Chen CH, DeMay BS, Gladfelter AS, et al. Physical interaction between VIVID and white collar complex regulates photoadaptation in *Neurospora*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(38): 16715-20
- [38] Belden WJ, Lewis ZA, Selker EU, et al. CHD1 remodels chromatin and influences transient DNA methylation at the clock gene frequency. *PLoS Genet*, 2011, 7(7): e1002166
- [39] Froehlich AC, Loros JJ, Dunlap JC. Rhythmic binding of a WHITE COLLAR-containing complex to the frequency promoter is inhibited by FREQUENCY. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(10): 5914-9
- [40] He Q, Cheng P, Yang Y, et al. White collar-1, a DNA binding transcription factor and a light sensor. *Science*, 2002, 297(5582): 840-3
- [41] Smith KM, Sancar G, Dekhang R, et al. Transcription factors in light and circadian clock signaling networks revealed by genomewide mapping of direct targets for neurospora white collar complex. *Eukaryot Cell*, 2010, 9(10): 1549-56
- [42] He Q, Liu Y. Molecular mechanism of light responses in *Neurospora*: from light-induced transcription to photoadaptation. *Genes Dev*, 2005, 19(23): 2888-99
- [43] Heintzen C, Loros JJ, Dunlap JC. The PAS protein VIVID defines a clock-associated feedback loop that represses light input, modulates gating, and regulates clock resetting. *Cell*, 2001, 104(3): 453-64
- [44] Zoltowski BD, Schwerdtfeger C, Widom J, et al. Conformational switching in the fungal light sensor Vivid. *Science*, 2007, 316(5827): 1054-7
- [45] Hunt SM, 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): 16709-14
- [46] Malzahn E, Ciprianidis S, Kaldi K, et al. Photoadaptation in *Neurospora* by competitive interaction of activating and inhibitory LOV domains. *Cell*, 2010, 142(5): 762-72
- [47] Liu Y, Mellow M, Loros JJ, et al. How temperature changes reset a circadian oscillator. *Science*, 1998, 281(5378): 825-9
- [48] Huang G, Wang L, Liu Y. Molecular mechanism of suppression of circadian rhythms by a critical stimulus. *EMBO J*, 2006, 25(22): 5349-57
- [49] Liu Y, Garceau NY, Loros JJ, et al. Thermally regulated translational control of FRQ mediates aspects of temperature responses in the neurospora circadian clock. *Cell*, 1997, 89(3): 477-86
- [50] Vitalini MW, de Paula RM, Goldsmith CS, et al. Circadian rhythmicity mediated by temporal regulation of the activity of p38 MAPK. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(46): 18223-8
- [51] Sancar G, Sancar C, Brugger B, et al. A global circadian repressor controls antiphase expression of metabolic genes in *Neurospora*. *Mol Cell*, 2011, 44(5): 687-97
- [52] 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): 2435-42

- [53] O'Neill JS, Reddy AB. Circadian clocks in human red blood cells. *Nature*, 2011, 469(7331): 498-503
- [54] O'Neill JS, van Ooijen G, Dixon LE, et al. Circadian rhythms persist without transcription in a eukaryote. *Nature*, 2011, 469(7331): 554-8
- [55] Edgar RS, Green EW, Zhao Y, et al. Peroxiredoxins are conserved markers of circadian rhythms. *Nature*, 2012, 485(7399): 459-64
- [56] Yoshida Y, Iigusa H, Wang N, et al. Cross-talk between the cellular redox state and the circadian system in *Neurospora*. *PLoS One*, 2011, 6(12): e28227
- [57] Koike N, Yoo SH, Huang HC, et al. Transcriptional architecture and chromatin landscape of the core circadian clock in mammals. *Science*, 2012, 338(6105): 349-54
- [58] Wang X, Wu F, Xie Q, et al. SKIP is a component of the spliceosome linking alternative splicing and the circadian clock in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2012, 24(8): 3278-95
- [59] Kojima S, Sher-Chen EL, Green CB. Circadian control of mRNA polyadenylation dynamics regulates rhythmic protein expression. *Genes Dev*, 2012, 26(24): 2724-36
- [60] Huang G, He Q, Guo J, et al. The Ccr4-not protein complex regulates the phase of the *Neurospora* circadian clock by controlling white collar protein stability and activity. *J Biol Chem*, 2013, 288(43): 31002-9
- [61] Collart MA, Panasenko OO. The Ccr4--not complex. *Gene*, 2012, 492(1): 42-53
- [62] Miller JE, Reese JC. Ccr4-Not complex: the control freak of eukaryotic cells. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2012, 47(4): 315-33