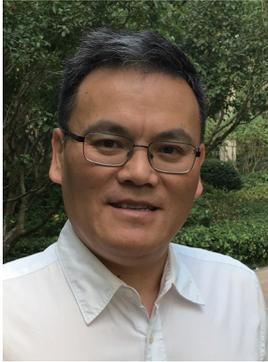


DOI: 10.13376/j.cblls/2015189

文章编号: 1004-0374(2015)11-1364-08



王晗, 苏州大学特聘教授。主要研究斑马鱼生物钟调控机制及其在医药领域的运用。

斑马鱼生物钟分子遗传学和基因组学研究进展

仲兆民[#], 张淑青[#], 王 晗^{*}
(苏州大学生物钟研究中心, 苏州 215123)

摘 要: 生物钟是生物长期适应地球昼夜循环变化而演化的内在自持的计时机制。生物钟对分子、生化、细胞、生理和行为等基本生命过程起到重要的调节作用。生物钟紊乱会导致机体失调而引发各类疾病。斑马鱼作为一种重要的脊椎动物模型在研究生物钟方面有其独特的特点与优势。现主要综述利用转基因技术、突变体分析和转录组手段等解析斑马鱼生物钟调节机制的最新进展。

关键词: 斑马鱼; 生物钟; 突变体分析; 反向遗传学; 基因组学

中图分类号: Q41; Q59.468 **文献标志码:** A

Molecular genetic and genomic mechanisms of the zebrafish circadian clock

ZHONG Zhao-Min[#], ZHANG Shu-Qing[#], WANG Han^{*}
(Center for Circadian Clocks, Soochow University, Suzhou 215123, China)

Abstract: The circadian clock is endogenous and self-sustained time-keeping mechanisms evolved from long-term adaptation of life to the cycling physical environment of the Earth, and plays modulatory roles in various fundamental life processes from molecular, biochemical, cellular, physiological, to behavioral levels. Circadian misalignment leads to malfunctions and in-balance of the body, and a variety of diseases. The zebrafish (*Danio rerio*) as an important animal model has recently figured prominently for investigating regulatory mechanisms of vertebrate circadian clocks. Here we focus on reviewing the latest progresses of employing the transgenic technique, mutational analysis and transcriptome tools to elucidate molecular genetic and genomic mechanisms underlying the zebrafish circadian clock.

Key words: zebrafish; circadian clocks; mutational analysis; reverse genetics; genomics

收稿日期: 2015-07-10

基金项目: 国家重大科学研究计划(2012CB947600); 国家自然科学基金重点项目(31030062)

[#]共同第一作者

^{*}通信作者: E-mail: han.wang88@gmail.com; wanghan@suda.edu.cn

地球上的昼夜交替使环境因素,特别是光和温度呈现大约 24 h 的周期性节律现象。生物适应这种地球环境,演化出体内自持的计时机制,即生物钟。生物钟从分子、生化、生理到行为等水平调控几乎所有的有机体的生命过程。生物钟系统对生物日常节律的调控是从分子水平实现的。哺乳动物中,昼夜节律是由下丘脑的视交叉上核 (suprachiasmatic nucleus, SCN) 中的核心振荡器驱动的。SCN 能够控制激素和神经环路等,同时接受反馈信号,进而调控生物节律^[1]。在非哺乳动物包括斑马鱼中,松果体是感光 and 调控生物钟系统的器官^[2]。在几乎所有被研究过的生物中,生物钟系统的核心机制是基于转录/翻译的负反馈调节环路。在脊椎动物中,3 种包含 PAS (PER-ARNT-SIM) 结构域的转录因子 CLOCK、NPAS2、BMAL 组成了正向调控元件部分。CLOCK 或 NPAS2 与 BMAL 结合形成异二聚体,作为转录激活复合体与 *Per* 和 *Cry* 基因家族启动子上游的 E-box 元件结合激活其转录。PER 和 CRY 蛋白将形成异二聚体,并能进入细胞核内通过蛋白质-蛋白质间的相互作用抑制 CLOCK(NPAS2):BMAL 介导的转录激活效应^[3]。这些分子水平的相互作用形成基因表达的周期性振荡,进而驱动生物钟系统的运行。

斑马鱼作为一种脊椎动物的模式动物在发育遗传学和医药等方面的研究中有着广泛的应用^[4]。斑马鱼生物钟系统的组成和运行机制与哺乳动物高度相似,并且有许多其他模式生物无法媲美的优势,如成熟周期短、易于饲养繁殖等,并且斑马鱼的胚胎透明、体外发育、有独立于母体的胚胎生物钟^[5]。随着近期迅速发展的 TALEN (transcription activator like effector nuclease)、CRISPR-Cas9 [Clustered, regularly interspaced, short palindromic repeats (CRISPR)-CRISPR-associated (Cas) systems] 等技术在斑马鱼中的成功应用,对斑马鱼进行转基因和基因敲除、敲入等基因修饰变得易于操作。因此,越来越多的科学工作者关注斑马鱼生物钟分子遗传机制的研究和应用。如何利用斑马鱼的优势并通过新的手段来研究生物钟系统,以期获得新的生物钟基因或钟控基因,发现新的生物钟调节机制,进而利用斑马鱼筛选出能够治疗生物钟紊乱所导致的相关疾病的药物,是斑马鱼生物钟研究渴望达到的目标。现将重点介绍斑马鱼生物钟分子遗传学及基因组学研究的重要进展。

1 斑马鱼的生物钟系统及其生理和行为节律

斑马鱼的生物钟系统在组成和功能上与果蝇和小鼠有许多相似之处,其核心也是一个以大约 24 h 为周期的转录-翻译的负反馈环路。斑马鱼的生物钟系统具体为正调控元件 Clock、Bmal 驱动负调控元件 *period* (*per*) 和 *cryptochrome* (*cry*) 以及钟控基因的转录,包含 bHLH-PAS 结构域的转录激活因子 Clock 和 Bmal 形成异二聚体,识别并结合 *per* 和 *cry* 基因启动子中的 E-box 元件,启动 *per* 和 *cry* 基因的表达。Per 和 Cry 蛋白二聚化并转移到细胞核,与 Clock : Bmal 复合体相互作用,抑制其驱动的转录激活效应。因此,下游的钟控基因表现出相应的节律性表达模式。此外,还存在一个 Rev-erba 和 Rora 参与的环路调控 *bmal* 的表达,以稳定核心环路^[6]。

与小鼠不同的是,硬骨鱼在系统演化过程中发生过额外的第三次全基因组的复制,因此,与其他脊椎动物相比,斑马鱼的许多基因具有额外的拷贝数^[7]。在演化过程中,有些额外的基因拷贝可能丢失,有些仍然保留。这些多拷贝的基因有些具有相似的功能,有些在功能上出现了分化,行使不同的功能^[8]。目前的研究结果表明,斑马鱼有 3 个 *bmal* 基因^[9]、3 个 *clock* 基因^[7]、4 个 *per* 基因^[10] 和 6 个 *cry* 基因^[8]。不同的钟基因拷贝在漫长的演化过程中分化出了不同的功能。复制基因的存在使斑马鱼生物钟系统的组成和调控机制更加精细复杂,同时,也为生物钟功能的研究提供了更多的机会和方向。

斑马鱼的松果体拥有典型的感光细胞,与视网膜感光细胞的结构和功能相似,并且有类似的基因表达谱^[11]。斑马鱼的松果体存在一个内在的生物钟,能够驱动褪黑激素周期性地合成。Clock : Bmal 异二聚体对褪黑素合成的编码限速酶 5-羟色胺-N-乙酰转移酶 (Aanat) 的基因转录调控使褪黑素的水平在白天低,晚上高^[11]。*aanat* 基因的表达虽然受生物钟系统的调控,在夜晚接受光照后表达迅速被抑制。松果体被认为是斑马鱼生物钟系统的中央起搏器,环境中的光暗信息由此被传入神经系统,产生神经信号和神经内分泌信号^[12]。

生物钟的一个重要的输出表现为运动行为的近 24 h 节律。在小鼠及果蝇中均有明显的行为节律。在持续黑暗的条件下,小鼠或果蝇生物钟突变体会表现为无节律、周期延长、缩短或时相发生变化^[13]。在斑马鱼研究中,行为节律同样是生物钟相关的一项重要表型。1998 年, Gregory Cahill 实验室^[14]首

先证明了斑马鱼幼鱼运动昼夜节律的存在, 野生型斑马鱼幼鱼的运动平均周期为 25.6 h; 之后 Hurd 等^[15]又通过不同的光暗处理发现第二天的光照对于行为节律的启动和诱导是十分关键的, 并且前四天的正常光暗条件会大大提升斑马鱼幼鱼在以后持续黑暗条件下的节律行为。斑马鱼是昼行性动物, 这点与小鼠不同但与人相同, 这也凸显了用斑马鱼研究生物钟相比于小鼠的一个优势。斑马鱼幼鱼个体很小, 可以在 96 孔板中开展大规模、高通量的行为研究。在一个封闭的盒子里可放置 96 孔、48 孔或者 24 孔板, 其上有红外线摄像头, 并且盒子里有独立的可调节亮度的光源和可控制水温的传感器。斑马鱼幼鱼放置在孔板中, 可连续数日记录其运动轨迹、距离及速度。斑马鱼幼鱼在正常光暗条件及持续低强度光照条件下, 均表现出明显的节律行为。根据此行为特征, 2012 年, Tovin 等^[16] 研究报道, 用吗啉环反义寡核苷酸技术敲除 *camk1gb* (钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶 I Gb) 基因导致斑马鱼幼鱼的行为时相与对照组相比有明显不同。Storz 等^[17] 报道了 CK1 δ 抑制剂可以扰乱斑马鱼幼鱼的行为节律性, 但是 CK1 ϵ 的抑制剂却不能改变幼鱼的节律性。Appelbaum 等^[18] 展示了在加入褪黑色素后斑马鱼幼鱼的运动节律性发生显著降低。同时, 由于其高通量性, 该设备也可用于药物筛选, 检测潜在的治疗生物钟紊乱以及睡眠障碍的药物^[19]。在成鱼实验中, Hurd 等^[15] 也展示了其行为是有近 24 h 生物节律的, 但是仅在 21°C 的条件下有较好的节律, 低温及高温均会使得成鱼的行为节律比率降低。

2 斑马鱼生物钟遗传突变体的研究

通过基因敲除获得的突变体是研究基因功能十分有用的材料, 而通过敲除单一基因研究个体的表型会发现该基因的功能。突变体的构建技术在小鼠中已十分的成熟, 应用胚胎干细胞和基因同源重组技术可获得敲除特异基因的小鼠。在传统的斑马鱼研究中, 突变体筛选一般是采用 ENU 诱变, 再利用观察表型的正向遗传学方法或利用 TILLING 的反向遗传学手段来筛选出所感兴趣的突变体^[20]。

Gregory Cahill 实验室通过行为学正向筛选 ENU 诱变的 6 500 个 F₂ 代幼鱼, 发现 8 种斑马鱼突变体的行为周期与野生型相比有 1~2.5 h 的差异, 其中 7 种突变体表现为周期缩短, 而仅有一种表现为周期增加^[21]。DeBruyne 等^[21] 聚焦在 *lag^{deg2}* 这个突变体上, 在 24 °C 的条件下纯合突变体的运动周期为 24 h, 杂

合体为 24.7 h, 而野生型斑马鱼的运动周期为 25.3 h, 且纯合突变体斑马鱼并无明显的发育及形态缺陷^[21]。将纯合、杂合及野生型斑马鱼成鱼的松果体取出后, 在 21°C 的条件下进行组织培养, 之后检测其褪黑色素的分泌量。尽管 3 种类型的松果体中褪黑色素的产量及节律幅度没有显著性差异, 但是纯合突变斑马鱼的松果体要比野生及杂合体褪黑色素分泌周期短 0.7 h, 而野生和杂合突变体之间并无显著性差异。为了检测该突变体所突变的基因, DeBruyne 等^[21] 通过微卫星标记连锁图谱方法发现该突变体定位在第七号染色体上, 而 *per1b* 基因是唯一已知的位于第七号染色体上的生物钟基因, 但是经测序后发现该突变体的 *per1b* 基因并未发生突变。因此, 可能有尚未发现的生物钟基因突变导致了该表型的出现。

Cahill 实验室还报道了第二种影响斑马鱼幼鱼节律行为的突变体——P36。该纯合突变体的行为周期为 24.3 h, 杂合体为 24.8 h, 而野生型为 25.3 h。同时, 褪黑色素表达量的周期时间也存在差异, 纯合突变体的周期为 24.1 h, 杂合突变体为 24.9 h, 野生型为 25.3 h。分子遗传分析发现该突变体的 *clock1a* 基因第 254 位氨基酸由异亮氨酸突变为天冬酰胺, 而改变其重要的功能域——PAS 结构域^[22]。

然而, ENU 诱变正向筛选方法存在一些缺点, 如费时费力, 往往需要筛选成千上万种品系, 又要克隆与表型对应的突变位点。ENU 诱变为随机诱变, 有可能在多个基因上都发生突变, 因此, 需要进行多次的外交 (outcross) 才能获得单基因的突变体。另外, 通过反转录插入病毒的方法构建出了很多种突变体。相比于 ENU 诱变后正向筛选, 反转录插入病毒方法能够更快地定位到病毒所插入的基因位点上, 从而获得感兴趣的突变体^[23]。我们实验室成功获得了通过反转录病毒插入方法而构建的斑马鱼生物钟 *per1b* 基因的突变体 (表 1), 病毒插入至该基因的第二个内含子中造成其转录的终止^[24]。实时定量 PCR 及整体原位杂交检测展示纯合突变体中该基因的表达量要显著低于野生型斑马鱼。行为学结果表明纯合突变的幼鱼在持续黑暗的条件下 (DD), 其运动周期要比野生型斑马鱼幼鱼短 1.3 h, 其时相前移, 振幅比野生型明显的升高。该基因的突变造成斑马鱼其他 *per* 基因的上调, 说明 *Per1b* 在斑马鱼生物钟调节环路中起到抑制作用^[24]。我们还证明了斑马鱼 *per1b* 基因纯合突变体与人类注意力缺陷多动症 (attention-deficit/hyperactivity disorder, ADHD) 的症状是类似的, 有多动、学习记忆程度降低及冲

动性这3个明显的行为学特征, 且发现生物钟可调控多巴胺代谢通路中的关键基因^[24]。

最近几种基因组定点修饰的反向遗传学技术, 如 ZFN (锌指核酸酶)、TALEN (转录激活因子样效应蛋白核酸酶)、CRISPR-Cas9 (集群定期间隔的短的回文重复及 CRISPR 相关的酶系统) 的出现, 给斑马鱼突变体构建工作带来了极大的便利^[25]。锌指核酸酶技术是第一个克服了传统的依赖于胚胎干细胞的基因敲除技术, 但是其脱靶率高、费用较高且组装周期较长的缺点使得其现在逐渐被 TALEN 及 CRISPR-Cas9 技术所取代。TALEN 的发现始于 1989 年对植物病原菌黄单胞菌属 (*Xanthomonas*) 的研究^[26], 但在之后的 20 年里并未受到足够的重视。2009 年, 将从植物中分离的 TALE 蛋白同核酸酶 FokI 结合后作为人工定点核酸酶才证实了其定点修饰靶基因的能力^[27]。TALEN 相比于 ZFN 有更严格的序列靶向规则, 脱靶率大幅度降低^[28-29], 其费用及组装时间也大大的减少。自 2010 年第一次将 TALEN 技术应用到酵母以来, 该技术已在人细胞及小鼠、大鼠、牛、猪、爪蟾、斑马鱼、青鳞鱼、果蝇、蚕、线虫、拟南芥、水稻等生物中得到广泛应用^[30-34]。为了提高该技术的突变效率, 许多实验室还对其进行改造优化, 从效率、时间及费用上都得到了改善^[35]。该技术的诸多优点已经推动了斑马鱼生物钟的分子遗传研究^[36]。该技术诞生之前已经

报道的斑马鱼生物钟突变体仅有上述的两个^[21-22]。而缺少突变体给斑马鱼生物钟的研究带来了极大的困难^[3]。为了更好地研究斑马鱼生物钟机制, 我们实验室利用 TALEN 技术敲除斑马鱼核心生物钟 *per2* 基因并且获得了相关的纯合突变体 (表 1)。该突变体在持续黑暗条件下表现出行为周期增加 1.3 h, 并且发现了 Per2 可通过 E-box 抑制 *aanat2* 的表达, 并通过 RORE 增强 *bmal1b* 表达, 从而说明 Per2 在斑马鱼生物钟中起着双重作用^[36]。

CRISPR-Cas9 技术是基于一种在细菌和古细菌进化中形成的抵抗外来病毒及质粒入侵的自适应防御机制^[37]。该技术, 如 TALEN 技术一样迅速地在不同物种中得以广泛并且越来越多的应用^[37-41], 如可以同时敲除多个基因; 可敲除长片段或 miRNA; 因为突变效率高在 F₀ 代斑马鱼突变体中即可检测表型等^[42]。斑马鱼生物钟基因很多都是多拷贝基因, 这给生物钟研究带来一定的困难, 而 CRISPR-Cas9 技术可以解决这个问题。它既可以让其起到长效吗啉环反义寡核苷酸 (morpholino) 的作用, 在 F₀ 就可以检测其行为或生理水平的表型, 又可以同时敲除多拷贝基因, 快速地获得多基因突变体。该技术的诞生对斑马鱼研究是一个很大的机遇, 利用此技术能够大大地加速斑马鱼生物钟领域的研究。本实验室利用 TALEN 及 CRISPR-Cas9 等技术已构建了斑马鱼核心生物钟基因的全套突变体 (表 1)。

表1 本实验室已建立的斑马鱼生物钟基因突变体

基因名称	Ensembl编号	突变方法
<i>per1a</i>	ENSDARG00000056885	CRISPR-Cas9
<i>per1b</i>	ENSDARG00000012499	反转录病毒插入
<i>per2</i>	ENSDARG00000034503	TALEN
<i>per3</i>	ENSDARG00000010519	TALEN
<i>cry1aa(cry1a)</i>	ENSDARG00000045768	TALEN
<i>cry1ab(cry1b)</i>	ENSDARG00000011583	TALEN
<i>cry1ba(cry2a)</i>	ENSDARG00000069074	ENU&TILLING
<i>cry2(cry3)</i>	ENSDARG00000024049	TALEN
<i>cry3(cry4)</i>	ENSDARG00000011890	TALEN
<i>clock1a(clock)</i>	ENSDARG00000011703	TALEN
<i>clock1b(clock3)</i>	ENSDARG00000003631	ENU&TILLING
<i>clock2(npas2)</i>	ENSDARG00000016536	CRISPR-Cas9
<i>bmal1a(arntl1a)</i>	ENSDARG00000006791	CRISPR-Cas9
<i>bmal1b(arntl1b)</i>	ENSDARG000000035732	ENU&TILLING
<i>bmal2(arntl2)</i>	ENSDARG000000041381	TALEN
<i>timeless</i>	ENSDARG000000078497	TALEN
<i>e4bp4-5(nfil3-5)</i>	ENSDARG000000094965	TALEN
<i>rev-erba</i>	ENSDARG000000033160	TALEN

3 转基因斑马鱼在生物钟研究中的应用

斑马鱼的一个显著优势是胚胎体外发育、透明且个体较小,因此,较易制备斑马鱼转基因品系^[43]。转基因斑马鱼在生命科学的研究中发挥了至关重要的作用,如研究某种特定蛋白质的产生、发育,各种细胞的迁移,疾病的产生均能利用转基因斑马鱼动态的描述,而无需将其处死^[44]。同样,在斑马鱼生物钟的研究中,转基因技术也起到了很重要的作用。

在哺乳动物小鼠中,视交叉上核(SCN)是感光器官,是生物钟系统的起搏器,而在斑马鱼中起主要感光功能的组织是松果体及视网膜^[45]。Gothilf等^[46]通过构建 $aanat2$ 基因驱动的GFP得到在松果体特异表达绿色荧光蛋白(GFP)的转基因斑马鱼 $Tg(aanat2:EGFP)^8$,并且通过与已知的松果体突变体 flh 及 mib 杂交后,发现其GFP的荧光强度确实在 $flh/-$ 背景中降低,而在 $mib/-$ 的背景中升高。Ziv等^[47]利用转基因斑马鱼证明了在斑马鱼松果体中光诱导的 $per2$ 基因的表达是 $aanat2$ 基因节律建立的关键;Appelbaum等^[48]则发现 otx 的敲降导致该转基因鱼的荧光强度的减弱,说明 otx 位于 $aanat2$ 的上游。利用 $Tg(aanat2:EGFP)^8$ 转基因斑马鱼可定位松果体,且松果体位于斑马鱼前脑表面的特性,Toyama等^[49]将该转基因鱼幼鱼及成鱼的松果体在中午及午夜取出后进行转录组芯片分析,发现在中午和午夜有大约500个有差异表达的基因,占芯片检测基因数目的3%,同时,发现 $unc119$ 基因的表达有昼夜节律的变化,并推测该基因在松果体发育中起到了作用。这些研究者还证实该基因与 $arl311/2$ 基因共同在 $Wnt4a$ 的产生和分泌上起调节作用^[49]。Tovinn等^[16]也是连续进行2 d 12个时间点的取样后测序分析,发现 $camk1gb$ 基因对生物钟的作用。Alon等^[50]同样采用芯片分析调查松果体中主要的顺式作用元件,发现最主要的元件为 Crx/Otx 绑定位点TAATC,而另外一个元件CAATC在松果体里也有特异的高表达,但是尚未确定该元件是哪个转录因子的主要位点,对于该元件的研究将会使我们对生物钟的调控机制有进一步的了解。Li等^[45]利用另外的转基因斑马鱼 $Tg(Gnat2:gal4-VPI6/UAS:nfsB-mCherry)$ 品系揭示了视网膜感光细胞可以感知光信号并且输出节律行为,但仅有视网膜感光细胞并不足以维持其节律性。

荧光素酶报告系统对于研究生物钟基因的表

达也有重要的作用。Kaneko和Cahill^[51]用斑马鱼 $per3$ 基因的启动子驱动萤火虫的荧光素酶基因,构建出第一个斑马鱼生物钟基因启动子驱动的生物发光转基因斑马鱼,并采用不同的光暗影响,发现在22℃的条件下6 d的正常光暗条件处理会使得转基因鱼的生物发光强度有很强的节律性。Kaneko等^[52]又将该转基因斑马鱼的许多器官分离出来,进行体外组织培养,发现心脏、肾及胆在持续黑暗及持续光照的条件下生物发光强度均有强烈的生物钟节律,同时,在较高的温度条件下,视网膜中的荧光素酶基因表达也有明显的节律。Rawashdeh等^[53]利用该转基因斑马鱼来研究不同条件刺激下的生物钟时相的变化。Hirota等^[54]也利用该转基因鱼验证了小分子化合物 $longdaysin$ 对于生物钟周期的延长作用。Weger等^[55]利用一个小启动子和4个E-boxes来驱动荧光素酶报告基因,构建出 $Tg(4xE-box:Luc)$ 的转基因品系。该转基因鱼在正常光暗及持续黑暗条件下均表现出强烈的生物发光节律性;并且利用该转基因鱼成功地发现氯化锂及 $longdaysin$ 均能够延长生物发光的周期。

4 转录组分析在斑马鱼生物钟研究中的应用

测序新技术的出现会带动新基因的发现。斑马鱼的诸多优点使得时间生物学家期待利用斑马鱼作为发现新基因或基因新功能的模式生物。Tovinn等^[16]将成年 $Tg(aanat2:EGFP)^8$ 转基因斑马鱼的松果体通过荧光显微镜取出,在持续黑暗的条件下每隔4 h取一次样品,连续取2 d 12个点;利用DNA微阵列及RNA测序分析不同时间点的斑马鱼松果体基因表达情况;利用DNA微阵列发现有36个潜在的生物钟相关基因,而利用RNA测序技术分析出有279个潜在的生物钟相关基因,其中有30个基因是利用这两种技术共同发现的。在这30个基因中有9个基因是已报道的核心生物钟基因或钟控基因。为了验证两种转录组分析技术的准确性,Tovinn等^[16]随机选取了9个基因进行了实时定量PCR或者整体原位杂交分析,其中有8个基因的表达均有节律振荡性,显示了这两种方法的可靠性。为了进一步分析基因的新功能,他们选取了之前没有人报道过的,但在松果体中表达特异的基因—— $camk1gb$ 。幼鱼的整体原位杂交结果表明,在CT6的时间点该基因RNA水平最高。通过吗啉环反义寡核苷酸技术敲除该基因后,其行为水平表现出运动幅度的显著降低,而注射该基因RNA进行基因拯救后又能恢复

其正常表型, 说明该基因确实可以影响生物钟系统的输出水平——行为的改变。在 RNA 水平上, 用吗啉环反义寡核苷酸技术敲除 *camklgb* 基因后, 并不影响核心生物钟基因 *per1b* 及其他生物钟基因的表达, 而仅使得 *aanat2* 基因的表达显著下调。因此, *camklgb* 可以影响 *aanat2*, 进而影响到褪黑素的产生量, 从而导致行为的异常, 但是该基因并不能调控核心生物钟, 表明其可能是受生物钟调控的下游基因。很多钟基因或钟控基因仅在特定的组织中表现出节律性, 而在另外的组织中却无节律, 因此, 对钟基因的研究工作带来了许多困难。斑马鱼幼鱼个体小, 可以将许多条斑马鱼幼鱼整体放在一起进行分析, 从而从整体水平上得出基因的节律性。Li 等^[56]通过对斑马鱼 5~6 d 的幼鱼进行在正常光暗条件 (LD) 及持续黑暗条件 (DD) 下, 每隔 4 h, 总共 2 d 12 个时间点的连续取样后, 用芯片分析发现在两种光暗条件下均有节律的基因有 2 856 个, 占整个幼鱼表达基因数目的 17%, 且这些基因绝大部分表达在视网膜及其感光层, 以及肠泡 (intestine bulb) 中。而这 2 856 个基因中, 有 94% 的基因在 LD 及 DD 条件下, 时相差别都是小于 4 h 的。其中 233 个基因在 DD 条件下的振幅小于 LD 条件, 有 21 个基因在 DD 条件下的振幅却大于 LD 条件, 提示这些基因可能受到光的显著影响。在这些基因中, *mitfa* 作为一个转录因子控制黑色素形成的基因。在斑马鱼中, *mitfa* 主要表达在色素细胞和视网膜色素上皮细胞中^[56]。*mitfa* 在斑马鱼幼鱼中的表达是节律性的, 而导致斑马鱼幼鱼黑色素细胞区域及黑色素的含量均有节律, 同时证明了 *clock* 基因可以调控该基因的表达^[56]。

光是调节生物钟的最重要的外界信号。Weger 等^[57]通过对斑马鱼幼鱼、体外培养的心脏组织以及斑马鱼细胞系在 DD 条件下分别给予 1 h 及 3 h 的光照, 与未给予光照的对照组芯片分析比较, 发现有 117 个光调节基因, 其中有 90 个受光上调的基因, 27 个为被光抑制的基因。这 117 个基因的功能集中在生物钟调控、应激反应、视网膜光接收、代谢及 DNA 修复上。在生物钟调控分类中, *per2* 基因是上调最显著的, 在幼鱼中接受 3 h 光照后上调了 30 倍, 在细胞系中上调了 23 倍。*cry1aa* 及 *cry1ba* 是另外两个在幼鱼和细胞系中均显著上调的基因。另外, *bmal2* 基因在幼鱼、*clock1b* 在体外心脏组织以及 *cry2* 在细胞系中也是上调的^[57]。通过对上调的基因启动子分析发现, 很多启动子都是富

含 D-box 及 E-box 绑定点的^[57]。E-box 是生物钟 Clock-Bmal 复合体绑定的最主要的元件, 该结果也说明了光反应跟生物钟是紧密联系的, 并且能够调节许多光诱导基因^[57]。

5 总结与展望

斑马鱼生物钟的研究业已获得令人振奋的成果, 特别是近年来灵活、快捷和易操作性的定点基因组修饰技术^[26,58]和深度、高通量新一代 DNA 测序技术^[16]以及单细胞测序技术^[59]的出现, 使得斑马鱼生物钟遗传学和基因组学研究迎来了“黄金时期”。

对已知斑马鱼生物钟基因突变体 (表 1) 的深入研究, 既可以确定这些基因在生物钟调节环路中的重要功能, 又可以阐明生物钟在基本生命过程诸如发育、生殖、睡眠、免疫以及重要生理功能等的调节机制, 为预防、诊断和治疗由生物钟紊乱导致的各类疾病提供新的靶点和科学依据。利用基于 TALEN 和 CRISPR-Cas9 基因敲入技术^[28], 既可以建立斑马鱼生物钟基因绿色荧光蛋白或荧光素酶报告基因品系, 又可以对这些生物钟基因进行内源性标记, 会有助于发现斑马鱼生物钟调节新功能。基于 CRISPR-Cas9 技术建立生物钟基因组织特异的条件性敲除^[60]或过表达斑马鱼品系, 也会揭示生物钟在特定器官, 如松果体、视网膜和肝脏以及特殊细胞如感光细胞中的作用新机制。

随着新一代测序技术不断涌现, DNA 测序技术也越来越经济、快捷。这将有助于发现斑马鱼基因组中受生物钟调控的新基因, 包括可能在生物钟调节中发挥作用的 miRNAs 和 lncRNAs。单细胞 DNA 测序技术的应用也将阐明与生物钟相关细胞如松果体、视网膜中感光细胞的生物钟调节新功能。

尽管生物钟的重要性越来越受到广泛的关注, 生物钟研究仍然尚有许多未解之谜还在等待科学家们去探索。药物在机体内的作用可能会因为服用的时间不同而产生不同的效果甚至毒性。斑马鱼作为一种药物筛选的优良材料将会在研发治疗生物钟紊乱药物中发挥重要作用。

[参 考 文 献]

- [1] Ripperger JA, Jud C, Albrecht U. The daily rhythm of mice. FEBS Lett, 2011, 585(10): 1384-92
- [2] Toyama R, Chen X, Jhawar N, et al. Transcriptome analysis of the zebrafish pineal gland. Dev Dyn, 2009, 238(7): 1813-26

- [3] Vatine G, Vallone D, Gothilf Y, et al. It's time to swim! Zebrafish and the circadian clock. *FEBS Lett*, 2011, 585(10): 1485-94
- [4] Xu C, Tabebordbar M, Iovino S, et al. A zebrafish embryo culture system defines factors that promote vertebrate myogenesis across species. *Cell*, 2013, 155(4): 909-21
- [5] Postlethwait JH, Yan YL, Gates MA, et al. Vertebrate genome evolution and the zebrafish gene map. *Nat Genet*, 1998, 18(4): 345-9
- [6] Wang MY, Huang GD, Wang H. Advances in the zebrafish circadian clock mechanisms. *Hereditas: Beijing*, 2012, 34(9): 1133-43
- [7] Wang H. Comparative analysis of teleost fish genomes reveals preservation of different ancient clock duplicates in different fishes. *Mar Genomics*, 2008, 1(2): 69-78
- [8] Liu C, Hu J, Qu C, et al. Molecular evolution and functional divergence of zebrafish (*Danio rerio*) cryptochrome genes. *Sci Rep*, 2015, 5: 8113
- [9] Wang H. Comparative genomic analysis of teleost fish *bmal* genes. *Genetica*, 2009, 136(1): 149-61
- [10] Wang H. Comparative analysis of period genes in teleost fish genomes. *J Mol Evol*, 2008, 67(1): 29-40
- [11] Gothilf Y, Coon SL, Toyama R, et al. Zebrafish serotonin N-acetyltransferase-2: marker for development of pineal photoreceptors and circadian clock function. *Endocrinology*, 1999, 140(10): 4895-903
- [12] Falcon J, Besseau L, Sauzet S, et al. Melatonin and neuroendocrine regulations in fish. *J Soc Biol*, 2007, 201(1): 21-9
- [13] Peschel N, Helfrich-Forster C. Setting the clock--by nature: circadian rhythm in the fruitfly *Drosophila melanogaster*. *FEBS Lett*, 2011, 585(10): 1435-42
- [14] Cahill GM, Hurd MW, Batchelor MM. Circadian rhythmicity in the locomotor activity of larval zebrafish. *Neuroreport*, 1998, 9(15): 3445-9
- [15] Hurd MW, DeBruyne J, Straume M, et al. Circadian rhythms of locomotor activity in zebrafish. *Physiol Behav*, 1998, 65(3): 465-72
- [16] Tovin A, Alon S, Ben-Moshe Z, et al. Systematic identification of rhythmic genes reveals *camk1gb* as a new element in the circadian clockwork. *PLoS Genet*, 2012, 8(12): e1003116
- [17] Storz SS, Tovin A, Mracek P, et al. Casein kinase 1 δ activity: a key element in the zebrafish circadian timing system. *PLoS One*, 2013, 8(1): e54189
- [18] Appelbaum L, Vallone D, Anzulovich A, et al. Zebrafish arylalkylamine-N-acetyltransferase genes - targets for regulation of the circadian clock. *J Mol Endocrinol*, 2006, 36(2): 337-47
- [19] Rihel J, Prober DA, Arvanites A, et al. Zebrafish behavioral profiling links drugs to biological targets and rest/wake regulation. *Science*, 2010, 327(5963): 348-51
- [20] Haffter P, Granato M, Brand M, et al. The identification of genes with unique and essential functions in the development of the zebrafish, *Danio rerio*. *Development*, 1996, 123: 1-36
- [21] DeBruyne J, Hurd MW, Gutierrez L, et al. Isolation and phenogenetics of a novel circadian rhythm mutant in zebrafish. *J Neurogenet*, 2004, 18(2): 403-28
- [22] Tan Y, DeBruyne J, Cahill GM, et al. Identification of a mutation in the *Clock1* gene affecting zebrafish circadian rhythms. *J Neurogenet*, 2008, 22(2): 149-66
- [23] Wang D, Jao LE, Zheng N, et al. Efficient genome-wide mutagenesis of zebrafish genes by retroviral insertions. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(30): 12428-33
- [24] Huang J, Zhong Z, Wang M, et al. Circadian modulation of dopamine levels and dopaminergic neuron development contributes to attention deficiency and hyperactive behavior. *J Neurosci*, 2015, 35(6): 2572-87
- [25] Huang P, Zhu Z, Lin S, et al. Reverse genetic approaches in zebrafish. *J Genet Genomics*, 2012, 39(9): 421-33
- [26] Huang P, Xiao A, Zhou M, et al. Heritable gene targeting in zebrafish using customized TALENs. *Nat Biotechnol*, 2011, 29(8): 699-700
- [27] Boch J, Scholze H, Schornack S, et al. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science*, 2009, 326(5959): 1509-12
- [28] Zu Y, Tong X, Wang Z, et al. TALEN-mediated precise genome modification by homologous recombination in zebrafish. *Nat Methods*, 2013, 10(4): 329-31
- [29] Gaj T, Gersbach CA, Barbas CF 3rd. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol*, 2013, 31(7): 397-405
- [30] Wang H, Hu YC, Markoulaki S, et al. TALEN-mediated editing of the mouse Y chromosome. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(6): 530-2
- [31] Ding Q, Lee YK, Schaefer EA, et al. A TALEN genome-editing system for generating human stem cell-based disease models. *Cell Stem Cell*, 2013, 12(2): 238-51
- [32] Ansai S, Sakuma T, Yamamoto T, et al. Efficient targeted mutagenesis in medaka using custom-designed transcription activator-like effector nucleases. *Genetics*, 2013, 193(3): 739-49
- [33] Ma S, Zhang S, Wang F, et al. Highly efficient and specific genome editing in silkworm using custom TALENs. *PLoS One*, 2012, 7(9): e45035
- [34] Carlson DF, Tan W, Lillico SG, et al. Efficient TALEN-mediated gene knockout in livestock. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(43): 17382-7
- [35] Xiao A, Wang Z, Hu Y, et al. Chromosomal deletions and inversions mediated by TALENs and CRISPR/Cas in zebrafish. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41(14): e141
- [36] Wang M, Zhong Z, Zhong Y, et al. The zebrafish *period2* protein positively regulates the circadian clock through mediation of retinoic acid receptor (RAR)-related orphan receptor α (Rora). *J Biol Chem*, 2015, 290(7): 4367-82
- [37] Chang N, Sun C, Gao L, et al. Genome editing with RNA-guided Cas9 nuclease in zebrafish embryos. *Cell Res*, 2013, 23(4): 465-72
- [38] Shen B, Zhang J, Wu H, et al. Generation of gene-modified mice via Cas9/RNA-mediated gene targeting. *Cell Res*, 2013, 23(5): 720-3
- [39] Mali P, Yang L, Esvelt KM, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*, 2013, 339(6121):

- 823-6
- [40] Friedland AE, Tzur YB, Esvelt KM, et al. Heritable genome editing in *C. elegans* via a CRISPR-Cas9 system. *Nat Methods*, 2013, 10(8):741-3
- [41] Bassett AR, Tibbit C, Ponting CP, et al. Highly efficient targeted mutagenesis of *Drosophila* with the CRISPR/Cas9 system. *Cell Rep*, 2013, 4(1): 220-8
- [42] Wang H, Yang H, Shivalila CS, et al. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell*, 2013, 153(4): 910-8
- [43] Asakawa K, Suster ML, Mizusawa K, et al. Genetic dissection of neural circuits by Tol2 transposon-mediated Gal4 gene and enhancer trapping in zebrafish. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(4): 1255-60
- [44] Ni TT, Lu J, Zhu M, et al. Conditional control of gene function by an invertible gene trap in zebrafish. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(38): 15389-94
- [45] Li X, Montgomery J, Cheng W, et al. Pineal photoreceptor cells are required for maintaining the circadian rhythms of behavioral visual sensitivity in zebrafish. *PLoS One*, 2012, 7(7): e40508
- [46] Gothilf Y, Toyama R, Coon SL, et al. Pineal-specific expression of green fluorescent protein under the control of the serotonin-N-acetyltransferase gene regulatory regions in transgenic zebrafish. *Dev Dyn*, 2002, 225(3): 241-9
- [47] Ziv L, Levkovitz S, Toyama R, et al. Functional development of the zebrafish pineal gland: light-induced expression of period2 is required for onset of the circadian clock. *J Neuroendocrinol*, 2005, 17(5): 314-20
- [48] Appelbaum L, Anzulovich A, Baler R, et al. Homeobox-clock protein interaction in zebrafish. A shared mechanism for pineal-specific and circadian gene expression. *J Biol Chem*, 2005, 280(12): 11544-51
- [49] Toyama R, Kim MH, Rebbert ML, et al. Habenular commissure formation in zebrafish is regulated by the pineal gland-specific gene *unc119c*. *Dev Dyn*, 2013, 242(9):1033-42
- [50] Alon S, Eisenberg E, Jacob-Hirsch J, et al. A new cis-acting regulatory element driving gene expression in the zebrafish pineal gland. *Bioinformatics*, 2009, 25(5): 559-62
- [51] Kaneko M, Cahill GM. Light-dependent development of circadian gene expression in transgenic zebrafish. *PLoS Biol*, 2005, 3(2): e34
- [52] Kaneko M, Hernandez-Borsetti N, Cahill GM. Diversity of zebrafish peripheral oscillators revealed by luciferase reporting. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(39): 14614-9
- [53] Rawashdeh O, de Borsetti NH, Roman G, et al. Melatonin suppresses nighttime memory formation in zebrafish. *Science*, 2007, 318(5853): 1144-6
- [54] Hirota T, Lee JW, Lewis WG, et al. High-throughput chemical screen identifies a novel potent modulator of cellular circadian rhythms and reveals CKI α as a clock regulatory kinase. *PLoS Biol*, 2010, 8(12): e1000559
- [55] Weger M, Weger BD, Diotel N, et al. Real-time *in vivo* monitoring of circadian E-box enhancer activity: a robust and sensitive zebrafish reporter line for developmental, chemical and neural biology of the circadian clock. *Dev Biol*, 2013, 380(2): 259-73
- [56] Li Y, Li G, Wang H, et al. Analysis of a gene regulatory cascade mediating circadian rhythm in zebrafish. *PLoS Comput Biol*, 2013, 9(2): e1002940
- [57] Weger BD, Sahinbas M, Otto GW, et al. The light responsive transcriptome of the zebrafish: function and regulation. *PLoS One*, 2011, 6(2): e17080
- [58] Hwang WY, Fu Y, Reyon D, et al. Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(3): 227-9
- [59] Junker JP, Noel ES, Guryev V, et al. Genome-wide RNA tomography in the zebrafish embryo. *Cell*, 2014, 159(3): 662-75
- [60] Ablain J, Durand EM, Yang S, et al. A CRISPR/Cas9 vector system for tissue-specific gene disruption in zebrafish. *Dev Cell*, 2015, 32(6): 756-64