

DOI: 10.13376/j.cblls/2015193

文章编号: 1004-0374(2015)11-1392-11



何群, 中国农业大学生物学院微生物学及免疫学系教授。主要研究方向包括: 粗糙脉孢菌生物钟调控的分子遗传机制; 粗糙脉孢菌表观遗传修饰影响基因表达的机制; COP9 信号体 (COP9 signalosome) 调控粗糙脉孢菌生长发育的分子机制。课题主要获得国家基金委、科技部及教育部等的资助。主讲本科生的《分子生物学》并参与多项本科生科研训练项目。

生物钟蛋白质翻译后修饰的生物学功能

刘青青, 王颖, 何群*

(中国农业大学生物学院农业生物技术国家重点实验室, 北京 100193)

摘要: 生物钟作为内源的分子机器调控生物体的生化反应、生理及行为各层面的活动。真核生物生物钟运行的分子机制非常保守, 都是由正调因子和负调因子构成的基于转录/翻译的负反馈调控环来控制。泛素-蛋白酶体途径引发的生物钟蛋白降解是生物钟调控的重要步骤。从真菌、动物到植物, 基于磷酸化的生物钟蛋白的泛素化及降解是决定生物钟周期长短的主要调控方式。尽管各物种进化出的生物钟蛋白差异较大, 它们都有效地利用了细胞中进化上非常保守的组分, 如蛋白激酶、磷酸酶、泛素连接酶、去泛素酶以及蛋白酶体等来调控生物钟的运行。

关键词: 生物钟; 磷酸化; 泛素化; 泛素连接酶; 蛋白酶体; 反馈调控

中图分类号: Q41 **文献标志码:** A

The roles of the modifications of clock protein in the control of circadian clocks

LIU Qing-Qing, WANG Ying, HE Qun*

(State Key Laboratory of Agrobiotechnology, College of Biological Sciences,
China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract: Circadian clocks are endogenous molecular machineries that control a large number of biochemical, physiological and behavioral activities in most eukaryotic organisms. The eukaryotic clocks are regulated by transcription-translation negative feedback loops containing positive and negative elements. The ubiquitin-proteasome pathway is an essential component of eukaryotic clocks by controlling the degradation rates of clock proteins. From fungi, animals to plants, phosphorylation-dependent ubiquitination and degradation of clock proteins play a major role in period determination in eukaryotes. Although eukaryotic organisms evolved different clock proteins, they adapted the conserved components, such as kinases, phosphatases, ubiquitin ligases, deubiquitinases and proteasome, to regulate the oscillation of circadian clocks.

Key words: circadian rhythm; phosphorylation; ubiquitination; ubiquitin ligase; proteasome; feedback loop

收稿日期: 2015-02-04

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(“973”项目)(2012CB947603); 国家自然科学基金重点项目(31330004)

*通信作者: E-mail: qunhe@cau.edu.cn

地球自转形成的昼夜交替深刻地影响了生活在地球上的生物。如果生物能够预知时间并协调各项生命活动, 对生物个体的生存及整个物种的繁盛会十分有利。在长期的进化中, 从原核生物到真核生物都形成了能够测量时间的分子机器——生物钟 (circadian clock), 该钟的输出就是生物的昼夜节律 (circadian rhythm), 周期约为 24 h^[1-3]。

生物钟系统由输入途径、核心振荡器和输出途径组成 (图 1)^[1]。输入途径主要用来感受环境中的光照、温度和营养等信号, 并将其传送到核心振荡器。核心振荡器接收传入的环境时间信号, 在细胞中产生内源性的昼夜节律, 将时间信息传达给输出途径, 从而控制众多生命活动的周期性过程。

通过对粗糙脉孢菌、果蝇、小鼠、人和拟南芥等生物的研究, 人们对生物钟运行的分子机制有了深入的认识^[1-2, 4-9]。它们虽然在进化上的距离较远, 但其生物钟运行的分子机制却非常保守, 都是由基于转录/翻译的负反馈调控环构成的^[1-2, 6-8, 10]。核心振荡器的正调控因子通常都是含有 PAS 结构域的转录因子, 它们能结合到负调控因子编码基因的启动子区域激活其表达; 当负调控因子产生之后, 它们能够抑制正调控因子的转录活性, 从而负反馈抑制自身的转录^[11-15]。

生物钟蛋白的磷酸化是生物钟系统最重要的调控方式。磷酸化是引发生物钟蛋白通过泛素—

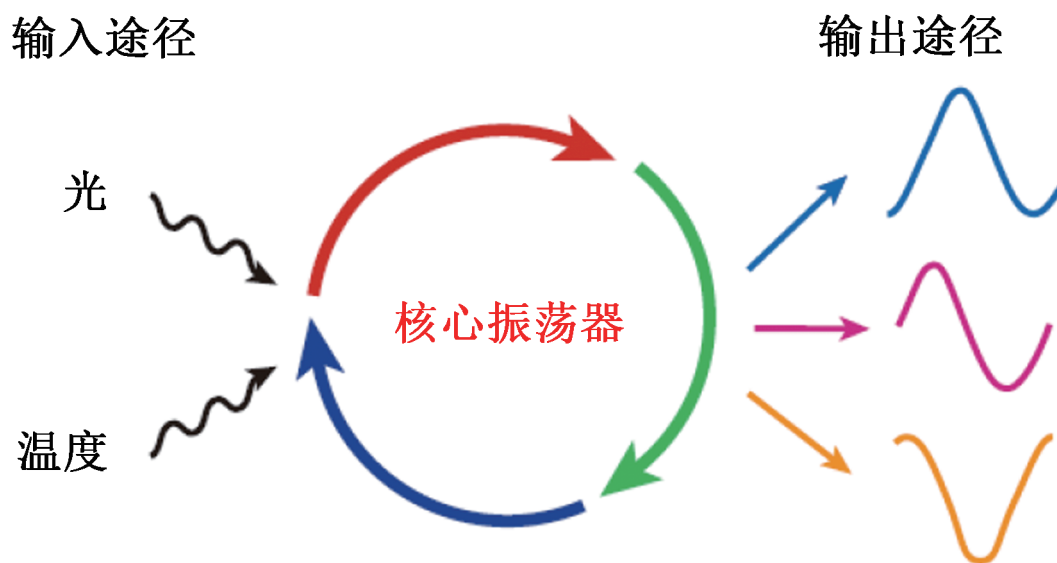
蛋白酶体途径降解的重要修饰。因此, 生物钟蛋白翻译后修饰及降解是决定生物钟周期长短的关键步骤^[16-24]。

在真核细胞内, 大约 80% 的蛋白质是通过泛素—蛋白酶体途径被降解的。泛素分子通过泛素活化酶 E1、泛素偶联酶 E2 和泛素连接酶 E3 三个连续的酶促反应被加到底物蛋白上^[25-29]。底物被加上一个泛素分子后, 更多的泛素分子与前一个泛素第 48 位的赖氨酸残基 (K48) 形成异肽键, 逐渐形成多聚泛素链。当多聚泛素链超过四个泛素分子, 底物蛋白就被 26S 蛋白酶体识别并降解^[30]。泛素连接酶 E3 决定了待降解蛋白的特异性。

尽管各物种进化出的生物钟蛋白差异较大, 但它们有效地利用了细胞中非常保守的组分, 如蛋白激酶、磷酸酶、泛素连接酶、去泛素酶以及蛋白酶体等来调控生物钟的运行 (图 2)。

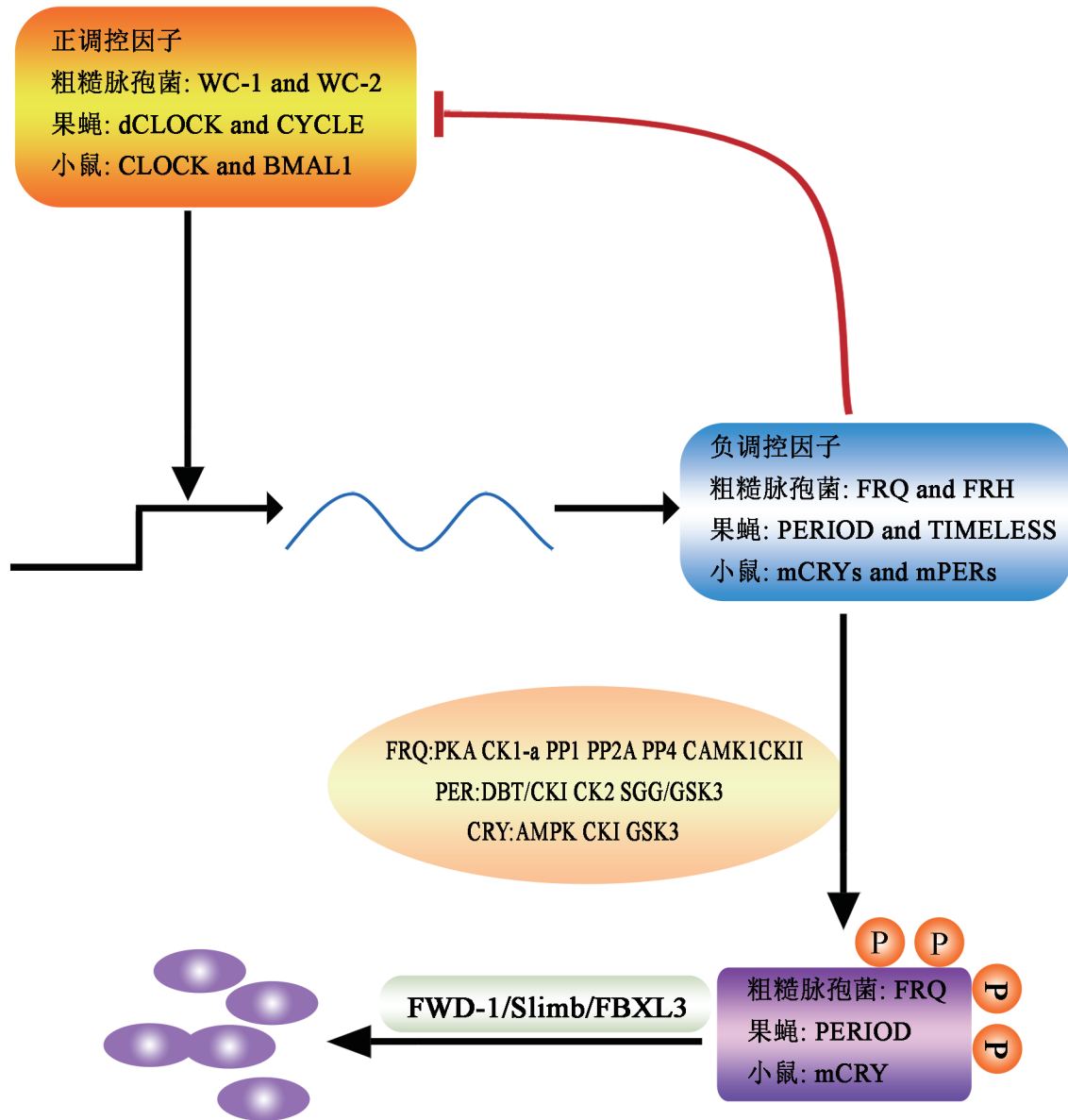
1 蛋白质翻译后修饰在粗糙脉孢菌生物钟调控中的作用

粗糙脉孢菌由于其分生孢子产生具有显著的节律性成为研究生物钟的最佳模式生物之一。其核心振荡器由 WHITE COLLAR-1 (WC-1)、WHITE COLLAR-2 (WC-2)、FREQUENCY (FRQ) 和 FRQ interacting RNA helicase (FRH) 组成, 其中 WC-1 和 WC-2 是正调控因子^[12, 31], FRQ 和 FRH 是负调控



生物钟系统由三个相对独立的部分组成: 输入途径(响应外界环境信号, 如光、温度和营养等)、核心振荡器(接收信号, 产生内源性昼夜节律)、输出途径。

图1 生物钟系统模式简图



粗糙脉孢菌、果蝇和小鼠的核心振荡器都是基于自我调控的负反馈调控环。这些负反馈调控环都是由正调控因子和负调控因子组成，所有的正调控因子都是含有PAS结构域的转录因子。正调控因子都能直接结合到负调控因子基因启动子区域激活其转录。负调控因子通过与正调控因子相互作用或者促进其磷酸化的方式抑制它们的转录活性。在抑制阶段的末期，负调控因子的磷酸化促进其进入泛素-蛋白酶体降解途径，从而解除对正调控因子转录的抑制，开启新一轮循环。

图2 真核生物核心振荡器的保守性

因子^[16, 18, 32]。WC-1和WC-2是两个含有PAS结构域的GATA型转录因子，它们通过各自的PAS结构域互作形成WC复合体(WC complex, WCC)。在黑暗条件下，WC复合体周期性地结合到 frq 基因启动子的C-box(clock-box)上，激活 frq 基因的转录。在细胞质中，新生成的FRQ蛋白互作形成同源二聚体，并与FRH形成FFC复合体。当积累到一定量之后，FFC复合体进入细胞核中，并迅速抑制WC复合体的转录活性，从而关闭 frq 基因的转录。

FFC复合体通过与WC复合体直接互作、介导激酶对其磷酸化以及促进WC复合体从 frq DNA上解离并向细胞质转移等方式抑制WC复合体的活性^[31-34]。随着时间的推移，当FRQ蛋白降低到不足以抑制WC复合体的水平，其对WC复合体的抑制解除， frq 基因的转录重新被激活，从而开始新一轮的循环，由此产生了粗糙脉孢菌的昼夜节律^[35]。因此，FRQ蛋白的产生、积累和降解对于粗糙脉孢菌转录/翻译的负反馈调控环路非常重要。

1.1 磷酸化修饰在粗糙脉孢菌生物钟调控中的作用

在持续黑暗条件下, FRQ 蛋白的总量和磷酸化水平呈现明显的昼夜节律。FRQ 蛋白的状态和量决定了粗糙脉孢菌生物钟周期的长短。FRQ 蛋白含有众多结构域: CC 结构域 (coiled-coiled domain) 介导 FRQ 蛋白形成同源二聚体, FCD 结构域 (FRQ-CKI interacting domain) 介导 FRQ 与激酶 CKI 之间的互作, FFD 结构域 (FRQ-FRH interacting domain) 介导 FRQ 与 FRH 的互作, PEST-1/2 结构域与 FRQ 稳定性有关^[36]。FRQ 蛋白合成后立即被磷酸化, 磷酸化水平随时间逐渐升高。FRQ 的磷酸化水平也呈现周期性的变化, 这说明其磷酸化受到精确调控, 并具有生理功能。FRQ 蛋白至少有 75 个位点能够发生磷酸化, 这些位点分散在 FRQ 的每一个区域。

磷酸化是决定 FRQ 蛋白降解速率的主要因素^[37], 也是决定周期长短的重要因素, 如 PEST-1 结构域缺失或者其中一些磷酸化位点的突变导致 FRQ 蛋白磷酸化水平降低、降解速率减慢、分生孢子形成节律丧失^[19]。大多数位点的磷酸化促进 FRQ 的降解, 一些发生在 FRQ C 端的磷酸化则会抑制其降解^[37-38]。磷酸化还能影响 FRQ 蛋白的功能和细胞定位。新生成的 FRQ 磷酸化水平低, 主要定位于细胞核, 其作用是抑制 WCC 的活性; 高磷酸化的 FRQ 主要定位于细胞质, 能促进 WCC 组装从而维持 WC-1 的水平^[39-41]。

FRQ 的磷酸化调控具有明显的时序性。位于 PEST-1 和 FFD 结构域之间的部分首先被磷酸化, 此区域的磷酸化位点突变不影响分生孢子的昼夜节律。随后是 C 端, 该区域的磷酸化抑制 FRQ 的降解。在昼夜节律的中期, PEST-1 被迅速磷酸化, 从而促进 FRQ 的降解。最后被磷酸化的是 large FRQ 特有的 N 端序列, 也促进 FRQ 降解^[36, 42]。

FRQ 的磷酸化受到众多蛋白激酶和磷酸酶的精确调控。casein kinase-1a (CK-1a)^[43]、casein kinase-2 (CKII)^[16]、calmodulin kinase (CAMK-1)^[31]、cyclic AMP-dependent protein kinase A (PKA)^[38] 和 check point kinase 2 (PRD-4/chk2)^[44] 都参与 FRQ 的磷酸化。CK-1a 和 CKII 对 FRQ 的磷酸化促进其降解, 相反, PKA 介导的磷酸化抑制 FRQ 降解。PRD-4/chk2 负责 DNA 损伤之后的 FRQ 的磷酸化^[44], 而 CAMK-1 介导光诱导过程 FRQ 的磷酸化。

已知有 3 个磷酸酶 PP1 (protein phosphatase 1)^[45]、PP4 (protein phosphatase 4)^[46]、PP2A (protein phosphatase 2A)^[45] 参与 FRQ 蛋白磷酸化的负调控。在

ppp-1 (PP1 的催化亚基)、*rgb-1* (编码 PP2A 催化亚基) 或者 *pp4* (PP4 的催化亚基) 突变体中, FRQ 磷酸化水平增高, 分生孢子形成节律周期变短, 相位前移^[45]。

WC-1 蛋白上至少有 10 个磷酸化修饰位点^[42, 47-48], 5 个紧邻 DNA 结合结构域位点 (Ser988~Ser995) 的磷酸化抑制 WC-1 的转录活性。光处理 15 h 之后, WC-1 处于高磷酸化状态, 导致 WCC 转录活性降低和 WC-1 的降解^[48]。双向电泳显示 WC-2 蛋白至少存在 8 个磷酸化位点^[40], WC-2 Ser433 位点的磷酸化是质谱分析确定的^[42, 47]。将 WC-2 S433 突变为丙氨酸 (Ala) 导致 WCC 转录活性升高, 分生孢子形成节律周期变短^[40]。低磷酸化时, WCC 的转录活性高; 而高磷酸化时, WCC 的转录活性低。在持续黑暗条件下, WC-1 和 WC-2 的磷酸化水平呈现周期性的变化, 对 *frq* 转录激活和转录抑制交替进行。

WC-1 和 WC-2 的磷酸化受到 PKA^[38]、CK-1a^[43, 49]、CKII^[43]、PKC^[50] 等蛋白激酶和 PP1、PP4、PP2A 等磷酸酶的双向调控^[45-46]。在磷酸化过程中, PKA 可能起始 WC-1 和 WC-2 的磷酸化, 进而促进依赖于 FRQ 的 CK-1a 和 CKII 催化的磷酸化^[38]。

1.2 泛素化修饰在粗糙脉孢菌生物钟调控中的作用

高磷酸化 FRQ 蛋白的降解是经泛素—蛋白酶体途径进行的。泛素连接酶 SCF^{FWD-1} 识别高磷酸化的 FRQ 并对其泛素化^[51-52]。泛素连接酶 SCF^{FWD-1} 由支架蛋白 Cullin1、RING 结构域蛋白 Rbx1、接头蛋白 Skp-1 和底物募集蛋白 FWD-1 组成。FWD-1 是一个含有 F-box 和 WD40 结构域的蛋白, 它利用 F-box 结构域与接头蛋白 Skp-1 结合, 通过 WD40 结构域募集底物蛋白 FRQ。在 *fwd-1* 突变体中, FRQ 磷酸化程度极高但不能降解, 而且分生孢子形成昼夜节律完全丧失, 说明 SCF^{FWD-1} 介导的泛素化对于 FRQ 降解以及生物钟运行是必需的。FRQ 蛋白能与缺少 F-box 结构域的 FWD-1 结合说明 SCF^{FWD-1} 介导的 FRQ 泛素化过程是非常迅速的。SCF^{FWD-1} 泛素连接酶调控的 FRQ 降解又受到 COP9 信号复合体 (CSN) 的精确调控^[52-53]。

目前, 调控 WC 蛋白泛素化的 E3 仍然不清楚。

2 蛋白质翻译后修饰在果蝇生物钟调控中的作用

果蝇生物钟核心振荡器也是由转录/翻译的负反馈调控环构成。含有 PAS 结构域的转录因子 CLOCK 和 CYCLE 是果蝇核心振荡器的正调控因子, PERIOD (PER) 和 TIMELESS (TIM) 是负调控

因子。CLOCK/CYCLE (CLK/CYC) 异源二聚体周期性地结合到 *per* 和 *tim* 的启动子上, 激活它们的转录。新生成的 PER 和 TIM 互作形成蛋白质复合物, 反过来抑制 CLK/CYC 的转录活性, 从而关闭自身的转录。除了激活 *per* 和 *tim* 外, CLK/CYC 还能激活 VRI 和 PDP1 的表达。VRI 和 PDP1 是另外两个转录因子, VRI 抑制 *clock* 基因的表达, 而 PDP1 则促进其表达。PER 和 TIM 降解之后, 对 CLK/CYC 的抑制解除, 重新开始新一轮的转录^[54-56]。

2.1 磷酸化修饰在果蝇生物钟调控中的作用

与粗糙脉孢菌极为相似, 磷酸化是决定 PER 和 TIM 蛋白降解速率的主要因素, 也是决定果蝇生物钟周期长短的重要因素。PER 蛋白合成之后会立即被磷酸化, 随着时间推移, 磷酸化水平逐渐升高。PER 的磷酸化水平也呈现周期性的变化, 这说明 PER 的磷酸化受到精确调控, 并具有重要生理功能。PER 和 TIM 蛋白在 DOUBLE TIME (DBT) CK1 ϵ ^[20]、CK2^[57]、NEMO^[58] 和 GSK3^[23] 的作用下被逐渐磷酸化^[56]。同时, PER 和 TIM 的磷酸化状态又受到磷酸酶 PP2A 和 PP1 的调控^[59]。PER 和 TIM 蛋白的磷酸化能加速它们的降解。细胞核内磷酸化的 PER 能够诱导 CLOCK 的磷酸化, 进而从染色质上解离; 随着 PER 蛋白在清晨降解, CLK/CYC 依赖的转录重新开始。

2.2 泛素化修饰在果蝇生物钟调控中的作用

2.2.1 SCF^{Slimb}在黑暗条件下调控PER和TIM蛋白的泛素化和降解

Slimb 蛋白能够募集磷酸化的底物蛋白通过蛋白酶体途径降解^[60-61]。*slimb* 基因编码一个含有 F-box 和 WD40 结构域的蛋白。在 Hedgehog 和 Wingless 信号转导途径中, Slimb 蛋白负责调控转录因子蛋白的水平。*slimb* 突变体果蝇的昼夜节律完全丧失, 异位表达野生型的 Slimb 能够完全补救节律缺陷表型^[60]; 同样, 过表达 dominant-negative 的 Slimb 也造成节律丧失表型^[60-61]。这些遗传学结果证明, Slimb 蛋白是果蝇生物钟的必需组分。生化实验显示, 当 Slimb 下调表达后, 在黑暗条件下, 高磷酸化的 PER 和 TIM 不能被降解^[60-61]。Slimb 与 PER 的互作证明其作为 SCF^{Slimb} 复合体的底物募集亚基调控 PER 和 TIM 进行泛素化并通过蛋白酶体降解。

2.2.2 SCF^{JET}调控光诱导的TIM和CRY蛋白的泛素化和降解

两个研究小组获得的果蝇突变体 *jetlag*^[62] 和 *Veela*^[63] 在持续光照条件下展现出很强的节律性。

野生型果蝇在持续光照条件下 1~2 d 后就会丧失节律性, 而这些突变体经历 1 周的持续光照仍能维持节律^[63-64]。在完全黑暗条件下, 突变体与野生型表型却一致。突变体展示出的表型与之前获得的果蝇光受体突变体 *cry* 的表型极其相似, 说明突变的基因参与果蝇光诱导途径的调控。在光照条件下, CRY 与 TIM 互作并引起后者的降解。*jetlag* 基因编码一个含有 F-box 和 leucine-rich repeats 结构域的蛋白, 可能也是 SCF 型泛素连接酶底物识别亚基。在短时光照引起的相位迁移反应测试中, 突变体相位迁移与野生型相比明显降低^[62-63], 说明 JETLAG 蛋白参与调控 TIM 的降解。尽管在黑暗条件下 JETLAG 对 TIM 蛋白水平影响很小, 但暴露在光下时, JETLAG 会迅速降低 TIM 蛋白水平。JETLAG 能够与 TIM 互作, 并在 CRY 蛋白存在时促进 TIM 蛋白的泛素化^[62]。与 SCF^{Slimb} 不同, SCF^{JET} 泛素连接酶特异性调控光依赖的 TIM 的泛素化和降解^[64]。因此, JETLAG E3 连接酶介导 TIM 和 CRY 的泛素化, 响应光诱导的降解, 以预见并重新设定相。

2.2.3 Cullin-3参与调控TIM的振荡

由于 Slimb 不能单独调控 PER 和 TIM 稳定性的全部过程, 其他类型的泛素连接酶复合体也可能参与它们稳定性的调控。降低表达 Cullin-3 蛋白引起 rest-activity 节律的缺陷, 说明 TIM 振荡丧失。生化实验证实, Cullin-3 能够与低磷酸化的 TIM 形成复合体, 尤其在 PER 缺失情况下, 暗示 Cullin-3 参与 TIM 蛋白在夜晚积累的调控^[65]。

由此可见, 果蝇至少具有 3 种机制来调控 TIM 蛋白水平。其中两种调控机制利用不同的 F-box 蛋白作为 SCF 型复合体的底物识别亚基。Slimb 在生物钟控制中使用, 而 JETLAG 是在光诱导过程中使用。Slimb 和 JETLAG 都属于 SCF 型泛素连接酶的底物募集亚基^[66]。非常有趣的是, JETLAG 依赖的蛋白质降解又受到 COP9 复合体的调控, 而 Slimb 依赖的蛋白质降解并不受该复合体调控^[67]。

3 蛋白质翻译后修饰在哺乳动物生物钟调控中的作用

哺乳动物主生物钟位于下丘脑视交叉上核 (suprachiasmatic nucleus, SCN), 与外周器官 (如肝脏和肾脏) 的副钟协同调节各种生理节律, 包括睡眠/觉醒、激素分泌、体温维持以及摄食等。小鼠生物钟是正负反馈环路相互作用的结果, 此环路推动生物钟基因 mRNA 和蛋白质周期性表达。正调

控因子 CLOCK 和 BMAL1 形成异二聚体结合到生物钟基因的 E-box 上, 驱动三种 *Per* 基因 (*Per1*、*Per2* 和 *Per3*) 和两种 *Cry* 基因 (*Cry1* 和 *Cry2*) 的转录。生成的 PER 和 CRY 蛋白在细胞质中积累, 并形成 PER/CRY 复合物, 进而被 CKI ϵ 、GSK3 β 等蛋白激酶磷酸化, 磷酸化的 PER 和 CRY 蛋白可以转运回细胞核内。在核内, PER 和 CRY 作为负调控因子直接与 CLOCK/BMAL1 互作, 并抑制 *Per* 和 *Cry* 基因的转录, 关闭负反馈环路。在抑制阶段的末期, PER 和 CRY 的降解解除对 CLOCK/BMAL1 转录激活的抑制作用, 重新开始新一轮的转录^[55]。除负反馈调控环路外, 小鼠还有与之嵌套的调控环路: 在 CLOCK/BMAL1 异二聚体激活 *Per* 和 *Cry* 转录的同时也激活核内受体 *Rev-Erba* 基因的转录, 生成的 REV-ERBa 蛋白反过来可以抑制 *Bmal1* 的转录, 结果导致 *Bmal1* mRNA 水平下降, PER 和 CRY 水平升高^[68]。当 CRY 蛋白进入核内抑制 *Per* 和 *Cry* 的转录时也抑制 *Rev-Erba*。当 *Rev-Erba* 表达受抑制时, ROR 可提供 *Bmal1* 转录的正反馈驱动^[69]。

3.1 磷酸化修饰在哺乳动物生物钟调控中的作用

在哺乳动物中, CKI、CK2、GSK3 和 AMPK (adenosine monophosphate-activated protein kinase) 等蛋白激酶也参与生物钟的调控^[70]。PER 蛋白的周期性磷酸化是哺乳动物生物钟的重要特征, 也是正常生物钟周期维持的保障。CKI 是负责 PER 蛋白磷酸化的重要激酶, CKI 突变后导致生物钟周期变短^[71]。CK2 在哺乳动物中的底物是 PER2 和 BMAL1, CK2 对 PER2 蛋白 Ser10、Thr12、Ser13 和 Thr15 位点的磷酸化对 PER2 起稳定作用^[72], 对 Ser53 的磷酸化则使 PER2 的稳定性下降^[73]。CK2 通过对 BMAL1 Ser90 的磷酸化促进其入核。GSK3 β 能够磷酸化 CLOCK、BMAL1、CRY2 和 PER2 等。CLOCK、BMAL1 和 CRY2 被 GSK3 β 磷酸化后会加速降解^[74-76]。AMPK 是最近发现的磷酸化 CRY 蛋白的激酶^[77]。在小鼠肝脏细胞中, AMPK 的活性和核定位呈现出周期性变化: 在日间, AMPK 在细胞核中积累并被 liver kinase B1 (LKB1) 激活, 从而磷酸化 CRY 的 Ser71 和 Ser280 残基, 促进 CRY 蛋白的降解; 在夜间, AMPK 在细胞核内的积累量减少, 活性降低, 导致 CRY 蛋白在核内累积^[77]。

3.2 泛素化修饰在哺乳动物生物钟调控中的作用

3.2.1 磷酸化的 PER 蛋白通过泛素—蛋白酶体途径降解

与粗糙脉孢菌和果蝇的调控方式相似, 哺乳动

物中磷酸化的 PER 蛋白能够被泛素连接酶 SCF $^{\beta-TrCP}$ 识别并多聚泛素化, 随后通过蛋白酶体途径降解。 $\beta-TrCP$ 是 FWD-1 和 Slimb 在哺乳动物中的同源蛋白。CKI ϵ 可与 PER1 和 PER2 形成稳定复合体调控其磷酸化, 是促进 PER 通过泛素—蛋白酶体途径降解的重要激酶^[78]。 $\beta-TrCP1$ 和 $\beta-TrCP2$ 是磷酸化依赖型的 SCF 泛素连接酶底物识别亚基, 它们能特异性地与高磷酸化的 PER 互作^[79-81]。如果在细胞中表达 dominant-negative 的 Cullin1 或 $\beta-TrCP$, CKI ϵ 介导的 PER1 和 PER2 的降解将会受阻, 说明 PER 蛋白通过泛素—蛋白酶体途径降解。在细胞系中用 RNAi 方法敲减 $\beta-TrCP1$ 和 $\beta-TrCP2$ 蛋白后, 磷酸化 PER1 的降解也会受阻。因此, SCF $^{\beta-TrCP}$ 通过调控磷酸化的 PER1 和 PER2 的泛素化和降解来维持哺乳动物生物钟的正常运转。

3.2.2 CRY 蛋白通过泛素—蛋白酶体途径降解

虽然 PER 和 CRY 都是哺乳动物负反馈调控环路的必需组分, 但是 CRY 是核心振荡器的限速抑制因子。因此, CRY 的周期性表达和降解需要更为精细的调控^[82]。通过生化和遗传学方法, 研究者找到了第一个 CRY 蛋白泛素连接酶底物识别亚基——FBXL3^[83-85]。它是一个含有 F-box 和 leucine-rich repeats 结构域的蛋白。在亲和纯化过程中 FBXL3 与 CRY1 和 CRY2 存在于一个复合体中, 敲减 FBXL3 的细胞中 CRY 蛋白的稳定性增强, 并扰乱 *Cry* 和 *Per* 基因的周期性表达, 这暗示 CRY 蛋白可能是 FBXL3 泛素化的底物^[83]。

正向遗传筛选也得到了 FBXL3 突变的小鼠。其中一个研究小组获得的突变小鼠 *Afterhours* 的生物钟周期大约为 26.5 h, 长于野生型小鼠的 23.6 h^[84]。基因定位以及测序结果表明, *Afterhours* 小鼠的 *Fbxl3* 基因发生 Cys358Ser 点突变, 导致 CRY 蛋白的降解速率减缓, *Per2* 基因的表达受到影响, 生物钟周期变长。另一小组获得的突变小鼠 *Overtime* (*Ovtm*) 也是 *Fbxl3* 基因第 364 位的 Ile 突变为 Thr^[85]。OVTM 和 FBXL3 都可以与 CRY 蛋白互作介导 CRY 蛋白的降解, 表明 FBXL3 具有特异识别并泛素化 CRY 的作用^[86-87]。

泛素连接酶复合体 SCF FBXL21 是第二个通过泛素化 CRY 蛋白来调控生物钟的 E3^[88-89]。*Past-time* (*Psttm*) 是通过 ENU 诱变筛选到的突变小鼠, 其生物钟周期 (22.91 h) 短于野生型小鼠 (23.67 h)。这一表型是由于另一个含有 F-box 结构域的蛋白 FBXL21 上第 149 位的 Gly 突变为 Glu 引起的。FBXL21 的敲

减对核内外 CRY 蛋白的稳定性产生了不同的影响: 细胞核内 CRY 蛋白的降解速率加快, 而细胞质中 CRY 蛋白的降解则减缓。与 FBXL3 只存在于细胞核内不同, FBXL21 在核内外均有分布, 虽然 FBXL21 结合 CRY 的能力比 FBXL3 强, 但降解 CRY 的能力却比 FBXL3 弱^[88]。这表明 SCF^{FBXL21} 泛素连接酶具有双重功能: 在核内, FBXL21 与 FBXL3 竞争结合 CRY, 从而减弱了 FBXL3 对 CRY 的泛素化和降解作用; 在核外, FBXL21 起缓慢泛素化和降解 CRY 蛋白的作用。因此, 两种泛素连接酶之间的这种拮抗关系和作用方式对于维持 CRY 蛋白稳定与降解的平衡具有重要意义。

4 蛋白质翻译后修饰在高等植物生物钟调控中的作用

一个调节精准的生物钟对于植物的光合作用、生长发育和产量来说是必需的^[90]。高等植物生物钟核心振荡器主要由 CCA1 (circadian clock associated 1)、LHY (late elongated hypocotyl) 和 TOC1 (timing of cab expression 1) 三种蛋白构成, 其中, CCA1 和 LHY 是含有 Myb 结构域的转录因子。这三个蛋白之间形成一个负反馈环路: TOC1 激活 *CCA1* 和 *LHY* 基因的表达, 而 CCA1 和 LHY 反馈抑制 *TOC1* 的表达。PHYB 和 PIF3 (phytochrome interacting factor 3) 复合体结合到 *CCA1* 和 *LHY* 启动子的 G 区上, 激活 *CCA1* 和 *LHY* 转录。CCA1 和 LHY 结合到 *TOC1* 启动子的“夜间元件”(AAAATATCT) 上, 负调节 *TOC1* 基因的转录。当 TOC1 的含量增加时促进 *CCA1* 和 *LHY* 的转录, 当 CCA1 和 LHY 的含量相应地增加时, 又会反过来抑制 *TOC1* 的转录, 由此形成的转录负反馈环路使时间节奏不断地被重新设置^[91]。

除了上述转录反馈调控环路以外, 植物生物钟及其相关信号转导通路的蛋白也能够被磷酸化和泛素化修饰, 这些蛋白质翻译后修饰在高等植物生物钟调控机制中具有重要作用。

4.1 磷酸化修饰在高等植物生物钟调控机制中的作用

在真菌、果蝇以及哺乳动物中, 激酶和磷酸酶信号级联通路已经成为调控生物钟蛋白活性与稳定性的重要机制^[55]。蛋白激酶 CK2 也参与拟南芥生物钟的调控过程^[92]。CK2 是一种非常保守的 Ser/Thr 蛋白激酶, 由两个调节亚基 α 和两个催化亚基 β 组成, 形成 $\alpha_2\beta_2$ 异四聚体。CK2 可以磷酸化包括转录因子在内的许多底物^[93]。CK2 对 CCA1 的磷酸化是其行使正常功能所必需的。在 *cka1a2a3* 三

突变体中, 由于缺失了 3 个 CK2 α 核定位亚基, 导致 CCA1 蛋白累积、磷酸化水平降低^[94]。CK2 的 β 亚基对生物钟的调控也十分重要。CKB3 是 CK2 的一个调节亚基, 可与 CCA1 互作使其磷酸化。过表达 CKB3 能导致生物钟周期变短, 并且 CKB3 有利于 CCA1 结合到 CHLOROPHYLLA/B BINDING PROTEIN 1 (CAB1) 的启动子区域。CK2 的另一调节亚基 CKB4 的磷酸化呈周期性变化, 磷酸化的 CKB4 将导致自身的降解, 从而降低 CK2 的活性。与过表达 CKB3 相似, 过表达 CKB4 同样会使生物钟周期变短。过表达 CKB4 的植株中, 生物钟输出信号和核心钟蛋白表达水平的改变说明 CKB4 与核心振荡器密切相关^[95]。

4.2 泛素化修饰在高等植物生物钟调控机制中的作用

在拟南芥中, 已发现多个 ZEITLUPE (ZTL) 家族蛋白与生物钟系统有关。它们的特点是都含有一个 F-box 结构域, 暗示它们可能通过 SCF 型泛素连接酶复合体的形式行使功能^[96]。在 *ztl-1* 突变体中, TOC1 与 ZTL 的相互作用消失, 导致 TOC1 蛋白持续表达。ZTL 能够与 TOC1 和 PRR5 蛋白相互作用, 介导它们通过蛋白酶体途径降解。因此, ZTL 介导的 TOC1 蛋白的降解对生物钟周期的精确调控具有重要意义。

维持 TOC1 蛋白的稳定和降解平衡的机制非常复杂^[97-99]。*TOC1* (*PRR1*) 是伪反应调控因子 (pseudoresponse regulator, PRR) 家族成员之一, 与其他 4 个 PRR 共同参与植物生物钟调控^[100-101]。*PRR9*、*PRR7*、*PRR5*、*PRR3* 和 *TOC1* 每隔 2~3 h 相继表达, *PRR9* 在黎明时开始表达, 直到夜间 *TOC1* 才表达。而且, 这 5 个 PRR 都可以被磷酸化并对生物钟产生不同的影响。PRR3 和 TOC1 的磷酸化会促进两者的互作, 从而保护 TOC1 不被 ZTL 识别和降解, 然而, PRR3 稳定 TOC1 的机制尚不清楚^[98]。PRR5 与 TOC1 结合也起到稳定 TOC1 的作用, 但 PRR5/TOC1 的互作不依赖于两者的磷酸化状态。它们的互作还可以促进 TOC1 在核内的积累, 能使两者与胞质中的 ZTL 形成空间上的隔离, 暗示 PRR5 可能会影响 ZTL 对 TOC1 的降解, 这一情况与 PER/TIM、CLK/CYC 以及 PER2/CRY 的互作非常相似^[102]。与 PRR5 的结合能促进 TOC1 的磷酸化, 增强 TOC1 与 ZTL 的相互作用。PRR5 的磷酸化也促进其与 ZTL 的相互作用并被泛素化, 导致最终被降解。

遗传学数据已证实 ZTL 是负责降解 TOC1 和 PRR5 的主要 F-box 蛋白。在植物中, ZTL 还有两

个类似物: LKP2 (LOV 和 KELCH PROTEIN 2)^[103] 和 FKF1 (FLAVIN、KELCH、F-BOX 1)^[104]。它们都含有 1 个 PAS 结构域、1 个 F-box 和 6 个重复的 kelch 结构域, 因此, 也可能组成 SCF 型泛素连接酶。*fkf1* 或者 *lkp2* 的单基因缺失突变对生物钟的影响并不大, 但是 *ztl fkf1* 双突变体和 *ztl fkf1 lkp2* 三基因突变体则显著影响了植物生物钟的功能, 表明 LKP2 和 FKF1 能够靶向作用于 TOC1 和 PRR5, 并介导它们的泛素化和降解^[105]。

PRR7 和 PRR9 蛋白作为 *CCA1* 和 *LHY* 的负调控因子在“morning loop”中起作用。在日间, 随着时间的推移, PRR7 和 PRR9 逐渐被磷酸化, 这一进程与 PRR5 和 TOC1 的磷酸化一致^[98], 暗示 PRR7 和 PRR9 的磷酸化也会导致它们的泛素化和降解。然而, 至今尚未找到负责 PRR7 和 PRR9 泛素化的 F-box 蛋白或其他类型的泛素连接酶。

[参 考 文 献]

- [1] Dunlap JC. Molecular bases for circadian clocks. *Cell*, 1999, 96(2): 271-90
- [2] Young MW, Kay SA. Time zones: a comparative genetics of circadian clocks. *Nat Rev Genet*, 2001, 2(9): 702-15
- [3] Hardin PE. Transcription regulation within the circadian clock: the E-box and beyond. *J Biol Rhythms*, 2004, 19(5): 348-60
- [4] Johnson CH, Golden SS. Circadian programs in cyanobacteria: adaptiveness and mechanism. *Annu Rev Microbiol*, 1999, 53: 389-409
- [5] Golden SS, Johnson CH, Kondo T. The cyanobacterial circadian system: a clock apart. *Curr Opin Microbiol*, 1998, 1(6): 669-73
- [6] Hall JC. Genetics of biological rhythms in *Drosophila*. *Adv Genet*, 1998, 38: 135-84
- [7] Harmer SL, Panda S, Kay SA. Molecular bases of circadian rhythms. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2001, 17: 215-53
- [8] King DP, Takahashi JS. Molecular genetics of circadian rhythms in mammals. *Annu Rev Neurosci*, 2000, 23: 713-42
- [9] Sehgal A, Ousley A, Yang Z, et al. What makes the circadian clock tick: genes that keep time? *Recent Prog Horm Res*, 1999, 54: 61-84; discussion 84-5
- [10] Mizoguchi T, Wheatley K, Hanzawa Y, et al. LHY and CCA1 are partially redundant genes required to maintain circadian rhythms in *Arabidopsis*. *Dev Cell*, 2002, 2(5): 629-41
- [11] Allada R, White NE, So WV, et al. A mutant *Drosophila* homolog of mammalian clock disrupts circadian rhythms and transcription of period and timeless. *Cell*, 1998, 93(5): 791-804
- [12] 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
- [13] Gekakis N, Staknis D, Nguyen HB, et al. Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism. *Science*, 1998, 280(5369): 1564-9
- [14] King DP, Zhao Y, Sangoram AM, et al. Positional cloning of the mouse circadian clock gene. *Cell*, 1997, 89(4): 641-53
- [15] Rutila JE, 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): 805-14
- [16] Yang Y, Cheng P, Liu Y. Regulation of the *Neurospora* circadian clock by casein kinase II. *Genes Dev*, 2002, 16(8): 994-1006
- [17] Edery I, Zwiebel LJ, Dembinska ME, et al. Temporal phosphorylation of the *Drosophila* period protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91(6): 2260-4
- [18] Garceau NY, Liu Y, Loros JJ, et al. Alternative initiation of translation and time-specific phosphorylation yield multiple forms of the essential clock protein FREQUENCY. *Cell*, 1997, 89(3): 469-76
- [19] Gorl M, Merrow 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
- [20] Kloss B, Price JL, Saez L, et al. The *Drosophila* clock gene *double-time* encodes a protein closely related to human casein kinase I α . *Cell*, 1998, 94(1): 97-107
- [21] Lee J, Zhou P. DCAFs, the missing link of the CUL4-DDB1 ubiquitin ligase. *Mol Cell*, 2007, 26(6): 775-80
- [22] Liu Y, Loros J, Dunlap JC. Phosphorylation of the *Neurospora* clock protein FREQUENCY determines its degradation rate and strongly influences the period length of the circadian clock. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(1): 234-9
- [23] Martinek S, Inonog S, Manoukian AS, et al. A role for the segment polarity gene *shaggy*/GSK-3 in the *Drosophila* circadian clock. *Cell*, 2001, 105(6): 769-79
- [24] Toh KL, Jones CR, He Y, et al. An hPer2 phosphorylation site mutation in familial advanced sleep phase syndrome. *Science*, 2001, 291(5506): 1040-3
- [25] Petrucelli L, Dawson TM. Mechanism of neurodegenerative disease: role of the ubiquitin proteasome system. *Ann Med*, 2004, 36(4): 315-20
- [26] Pickart CM. Back to the future with ubiquitin. *Cell*, 2004, 116(2): 181-90
- [27] Hochstrasser M. Ubiquitin-dependent protein degradation. *Annu Rev Genet*, 1996, 30: 405-39
- [28] Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life. *EMBO J*, 1998, 17(24): 7151-60
- [29] Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem*, 1998, 67: 425-79
- [30] Baumeister W, Walz J, Zuhl F, et al. The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease. *Cell*, 1998, 92(3): 367-80
- [31] 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
- [32] Aronson BD, Johnson KA, Loros JJ, et al. Negative feedback defining a circadian clock: autoregulation of the clock gene frequency. *Science*, 1994, 263(5153): 1578-84
- [33] Denault DL, Loros JJ, Dunlap JC. WC-2 mediates WC-1-FRQ interaction within the PAS protein-linked circadian feedback loop of *Neurospora*. *EMBO J*, 2001, 20(1-2): 109-17
- [34] Mellow MW, Garceau NY, Dunlap JC. Dissection of a circadian oscillation into discrete domains. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(8): 3877-82
- [35] Loros JJ, Dunlap JC. Genetic and molecular analysis of circadian rhythms in *Neurospora*. *Annu Rev Physiol*, 2001, 63: 757-94
- [36] Baker CL, Loros JJ, Dunlap JC. The circadian clock of *Neurospora crassa*. *FEMS Microbiol Rev*, 2012, 36(1): 95-110
- [37] Jinhu G, Yi L. Molecular mechanism of the *Neurospora* circadian oscillator. *Protein Cell*, 2010, 1(4): 331-41
- [38] 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
- [39] Schafmeier T, Kaldi K, Diernfellner A, et al. Phosphorylation-dependent maturation of *Neurospora* circadian clock protein from a nuclear repressor toward a cytoplasmic activator. *Genes Dev*, 2006, 20(3): 297-306
- [40] 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
- [41] Diernfellner AC, Querfurth C, Salazar C, et al. Phosphorylation modulates rapid nucleocytoplasmic shuttling and cytoplasmic accumulation of *Neurospora* clock protein FRQ on a circadian time scale. *Genes Dev*, 2009, 23(18): 2192-200
- [42] 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
- [43] 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
- [44] Pogue 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
- [45] 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
- [46] 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
- [47] 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
- [48] He Q, Liu Y. Molecular mechanism of light responses in *Neurospora*: from light-induced transcription to photoadaptation. *Genes Dev*, 2005, 19(23): 2888-99
- [49] Querfurth C, Diernfellner A, Heise F, et al. Posttranslational regulation of *Neurospora* circadian clock by CK1a-dependent phosphorylation. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 2007, 72: 177-83
- [50] 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
- [51] He Q, Liu Y. Degradation of the *Neurospora* circadian clock protein FREQUENCY through the ubiquitin-proteasome pathway. *Biochem Soc Trans*, 2005, 33(Pt 5): 953-6
- [52] 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
- [53] 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
- [54] Hardin PE. The circadian timekeeping system of *Drosophila*. *Curr Biol*, 2005, 15(17): R714-22
- [55] Gallego M, Virshup DM. Post-translational modifications regulate the ticking of the circadian clock. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8(2): 139-48
- [56] Ederly I. Role of posttranscriptional regulation in circadian clocks: lessons from *Drosophila*. *Chronobiol Int*, 1999, 16(4): 377-414
- [57] Akten B, Jauch E, Genova GK, et al. A role for CK2 in the *Drosophila* circadian oscillator. *Nat Neurosci*, 2003, 6(3): 251-7
- [58] Chiu JC, Ko HW, Ederly I. NEMO/NLK phosphorylates PERIOD to initiate a time-delay phosphorylation circuit that sets circadian clock speed. *Cell*, 2011, 145(3): 357-70
- [59] Kim EY, Ko HW, Yu W, et al. A DOUBLETIME kinase binding domain on the *Drosophila* PERIOD protein is essential for its hyperphosphorylation, transcriptional repression, and circadian clock function. *Mol Cell Biol*, 2007, 27(13): 5014-28
- [60] Grima B, Lamouroux A, Chelot E, et al. The F-box protein slimb controls the levels of clock proteins period and timeless. *Nature*, 2002, 420(6912): 178-82
- [61] Ko HW, Jiang J, Ederly I. Role for Slimb in the degradation of *Drosophila* period protein phosphorylated by doubletime. *Nature*, 2002, 420(6916): 673-8
- [62] Koh K, Zheng X, Sehgal A. JETLAG resets the *Drosophila* circadian clock by promoting light-induced degradation of TIMELESS. *Science*, 2006, 312(5781): 1809-12
- [63] Peschel N, Veleri S, Stanewsky R. *Veela* defines a molecular link between Cryptochrome and Timeless in the light-input pathway to *Drosophila*'s circadian clock. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(46): 17313-8
- [64] Van Gelder RN. *Timeless* genes and *jetlag*. *Proc Natl Acad*

- Sci USA, 2006, 103(47): 17583-4
- [65] Grima B, Dognon A, Lamouroux A, et al. CULLIN-3 controls TIMELESS oscillations in the *Drosophila* circadian clock. PLoS Biol, 2012, 10(8): e1001367
- [66] Nakayama KI, Nakayama K. Regulation of the cell cycle by SCF-type ubiquitin ligases. Semin Cell Dev Biol, 2005, 16(3): 323-33
- [67] Knowles A, Koh K, Wu JT, et al. The COP9 signalosome is required for light-dependent timeless degradation and *Drosophila* clock resetting. J Neurosci, 2009, 29(4): 1152-62
- [68] Preitner N, Damiola F, Lopez-Molina L, et al. The orphan nuclear receptor REV-ERBa controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. Cell, 2002, 110(2): 251-60
- [69] Shearman LP, Sriram S, Weaver DR, et al. Interacting molecular loops in the mammalian circadian clock. Science, 2000, 288(5468): 1013-9
- [70] Reischl S and Kramer A. Kinases and phosphatases in the mammalian circadian clock. FEBS Lett, 2011, 585(10): 1393-9
- [71] Ralph MR, Menaker M. A mutation of the circadian system in golden hamsters. Science, 1988, 241(4870): 1225-7
- [72] Maier B, Wendt S, Vanselow JT, et al. A large-scale functional RNAi screen reveals a role for CK2 in the mammalian circadian clock. Genes Dev, 2009, 23(6): 708-18
- [73] Tsuchiya Y, Akashi M, Matsuda M, et al. Involvement of the protein kinase CK2 in the regulation of mammalian circadian rhythms. Sci Signal, 2009, 2(73): ra26
- [74] Kurabayashi N, Hirota T, Sakai M, et al. DYRK1A and glycogen synthase kinase 3 β , a dual-kinase mechanism directing proteasomal degradation of CRY2 for circadian timekeeping. Mol Cell Biol, 2010, 30(7): 1757-68
- [75] Sahar S, Zocchi L, Kinoshita C, et al. Regulation of BMAL1 protein stability and circadian function by GSK3 β -mediated phosphorylation. PLoS One, 2010, 5(1): e8561
- [76] Spengler ML, Kuropatwinski KK, Schumer M, et al. A serine cluster mediates BMAL1-dependent CLOCK phosphorylation and degradation. Cell Cycle, 2009, 8(24): 4138-46
- [77] Lamia KA, Sachdeva UM, DiTacchio L, et al. AMPK regulates the circadian clock by cryptochrome phosphorylation and degradation. Science, 2009, 326(5951): 437-40
- [78] Akashi M, Tsuchiya Y, Yoshino T, et al. Control of intracellular dynamics of mammalian period proteins by casein kinase I epsilon (CKI ϵ) and CKI δ in cultured cells. Mol Cell Biol, 2002, 22(6): 1693-703
- [79] Reischl S, Vanselow K, Westermarck PO, et al. β -TrCP1-mediated degradation of PERIOD2 is essential for circadian dynamics. J Biol Rhythms, 2007, 22(5): 375-86
- [80] Eide EJ, Woolf MF, Kang H, et al. Control of mammalian circadian rhythm by CKI ϵ -regulated proteasome-mediated PER2 degradation. Mol Cell Biol, 2005, 25(7): 2795-807
- [81] Shirogane T, Jin J, Ang XL, et al. SCF β -TRCP controls clock-dependent transcription via casein kinase 1-dependent degradation of the mammalian period-1 (Per1) protein. J Biol Chem, 2005, 280(29): 26863-72
- [82] Kume K, Zylka MJ, Sriram S, et al. mCRY1 and mCRY2 are essential components of the negative limb of the circadian clock feedback loop. Cell, 1999, 98(2): 193-205
- [83] Godinho SI, Maywood ES, Shaw L, et al. The after-hours mutant reveals a role for Fbx13 in determining mammalian circadian period. Science, 2007, 316(5826): 897-900
- [84] Siepka SM, Yoo SH, Park J, et al. Circadian mutant *Overtime* reveals F-box protein FBXL3 regulation of *Cryptochrome* and *Period* gene expression. Cell, 2007, 129(5): 1011-23
- [85] Busino L, Bassermann F, Maiolica A, et al. SCFFbx13 controls the oscillation of the circadian clock by directing the degradation of cryptochrome proteins. Science, 2007, 316(5826): 900-4
- [86] Virshup DM, Forger DB. *After hours* keeps clock researchers CRYing *Overtime*. Cell, 2007, 129(5): 857-9
- [87] Gatfield D, Schibler U. Proteasomes keep the circadian clock ticking. Science, 2007, 316(5828): 1135-6
- [88] Yoo SH, Mohawk JA, Siepka SM, et al. Competing E3 ubiquitin ligases govern circadian periodicity by degradation of CRY in nucleus and cytoplasm. Cell, 2013, 152(5): 1091-105
- [89] Hirano A, Yumimoto K, Tsunematsu R, et al. FBXL21 regulates oscillation of the circadian clock through ubiquitination and stabilization of cryptochromes. Cell, 2013, 152(5): 1106-18
- [90] Dodd AN, Salathia N, Hall A, et al. Plant circadian clocks increase photosynthesis, growth, survival, and competitive advantage. Science, 2005, 309(5734): 630-3
- [91] Martinez-Garcia JF, Huq E, Quail PH. Direct targeting of light signals to a promoter element-bound transcription factor. Science, 2000, 288(5467): 859-63
- [92] Daniel X, Sugano S, Tobin EM. CK2 phosphorylation of CCA1 is necessary for its circadian oscillator function in *Arabidopsis*. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(9): 3292-7
- [93] Meggio F, Pinna LA. One-thousand-and-one substrates of protein kinase CK2? FASEB J, 2003, 17(3): 349-68
- [94] Lu SX, Liu H, Knowles SM, et al. A role for protein kinase casein kinase 2 α -subunits in the *Arabidopsis* circadian clock. Plant Physiol, 2011, 157(3): 1537-45
- [95] Perales M, Portoles S, Mas P. The proteasome-dependent degradation of CKB4 is regulated by the *Arabidopsis* biological clock. Plant J, 2006, 46(5): 849-60
- [96] Matsushika A, Makino S, Kojima M, et al. Circadian waves of expression of the APRR1/TOC1 family of pseudo-response regulators in *Arabidopsis thaliana*: insight into the plant circadian clock. Plant Cell Physiol, 2000, 41(9): 1002-12
- [97] Makino S, Matsushika A, Kojima M, et al. The APRR1/TOC1 quintet implicated in circadian rhythms of *Arabidopsis thaliana*: I. Characterization with APRR1-overexpressing plants. Plant Cell Physiol, 2002, 43(1): 58-69
- [98] Strayer C, Oyama T, Schultz TF, et al. Cloning of the *Arabidopsis* clock gene *TOC1*, an autoregulatory response regulator homolog. Science, 2000, 289(5480): 768-71
- [99] Fujiwara S, Wang L, Han L, et al. Post-translational regu-

- lation of the *Arabidopsis* circadian clock through selective proteolysis and phosphorylation of pseudo-response regulator proteins. *J Biol Chem*, 2008, 283(34): 23073-83
- [100] Kiba T, Henriques R, Sakakibara H, et al. Targeted degradation of PSEUDO-RESPONSE REGULATOR5 by an SCFZTL complex regulates clock function and photomorphogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, 2007, 19(8): 2516-30
- [101] Mas P, Kim WY, Somers DE, et al. Targeted degradation of TOC1 by ZTL modulates circadian function in *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 2003, 426(6966): 567-70
- [102] Wang L, Fujiwara S, Somers DE. PRR5 regulates phosphorylation, nuclear import and subnuclear localization of TOC1 in the *Arabidopsis* circadian clock. *EMBO J*, 2010, 29(11): 1903-15
- [103] Schultz TF, Kiyosue T, Yanovsky M, et al. A role for LKP2 in the circadian clock of *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2001, 13(12): 2659-70
- [104] Nelson DC, Lasswell J, Rogg LE, et al. *FKF1*, a clock-controlled gene that regulates the transition to flowering in *Arabidopsis*. *Cell*, 2000, 101(3): 331-40
- [105] Baudry A, Ito S, Song YH, et al. F-box proteins FKF1 and LKP2 act in concert with ZEITLUPE to control *Arabidopsis* clock progression. *Plant Cell*, 2010, 22(3): 606-22