

DOI: 10.13376/j.cblls/2017107

文章编号: 1004-0374(2017)08-0785-05

蓝藻生物钟信号输出途径分子机制的研究进展

魏琳子¹, 吴越¹, 陈强^{1,2}, 刘森^{1,2*}

(1 三峡大学医学院, 宜昌 443002; 2 肿瘤微环境与免疫治疗湖北省重点实验室, 宜昌 443002)

摘要: 昼夜节律生物钟包括信号输入途径、核心振荡器和信号输出途径。在生物钟振荡周期与环境信号的同步过程中, 信号输入途径感应外界环境的时间变化信号致使生物钟振荡周期和环境同步, 并将其输入途径接受的外界信息传递给核心振荡器, 核心振荡器再通过不同输出途径将周期性时间信号传递出去, 产生周期性的信号调控作用。主要对蓝藻生物钟已知的三条主要输出途径 KaiC-SasA-RpaA、KaiC-LabA-RpaA 和 KaiC-CikA-RpaA 及其相关调节因子的分子机制研究进展进行综述。

关键词: 蓝藻; 生物钟; 昼夜节律; 输出途径; KaiABC

中图分类号: Q945.43; Q949.2 **文献标志码:** A

Progress in the molecular mechanism of the output pathways of the cyanobacterial circadian clock

WEI Lin-Zi¹, WU Yue¹, CHEN Qiang^{1,2}, LIU Sen^{1,2*}

(1 College of Medical Science, China Three Gorges University, Yichang 443002, China;

2 Hubei Key Laboratory of Tumor Microenvironment and Immunotherapy, Yichang 443002, China)

Abstract: Circadian clocks in organisms have three relatively independent modules: the signal input module, the core oscillator, and the signal output module. During the entrainment of a circadian clock, the timing signals from the external environment are received by the signal input module and then relayed to the core oscillator, which synchronizes the period of the circadian oscillator with that of the environmental cues. In this process, the core oscillator disseminates the rhythmical information *via* different signal output modules/pathways to rhythmically modulate downstream signals. This review summarized the recent progress in the molecular mechanism of three major signal output pathways of the cyanobacteria, including KaiC-SasA-RpaA, KaiC-LabA-RpaA, and KaiC-CikA-RpaA.

Key words: cyanobacterium; circadian clock; circadian rhythm; output pathways; KaiABC

昼夜节律是一种具有重要生理学功能的生命现象, 它使生命体感应外界环境的昼夜变化, 从而具有更好的环境适应能力。生物体昼夜节律由生物钟进行调控, 其基本结构包括信号输入途径、核心振荡器和信号输出途径三个部分。信号输入途径感应外界信号(光信号、热信号和社会行为等)的昼夜变化, 并将其传递给核心振荡器^[1]。核心振荡器是生物钟系统的核心部分, 包含生物钟基因及其自主调控环路, 输入途径的刺激传到核心振荡器后产生周期性变化信号, 再通过信号输出途径传递调控下游信号途径, 从而完成对生物体昼夜节律的调控^[2]。

这三个部分并不是孤立存在的, 只有当三者相互作用后才能形成一个完整的生物钟振荡系统。以往认为, 转录/翻译反馈环路(transcriptional/translational feedback loop, TTFL)是唯一的生物节律产生机制。但在2005年, Kondo小组首次证明, 在蓝藻的生物钟体系中存在着独立于基因转录的生物节律起搏

收稿日期: 2017-03-17; 修回日期: 2017-04-26

基金项目: 国家自然科学基金项目(31670768); 北京分子科学国家实验室开放基金; 三峡大学科研基金项目(2011071001, KJ2012B004, KJ2014H015)

*通信作者: E-mail: senliu.ctgu@gmail.com

器^[3]——翻译后振荡器 (post-translational oscillation, PTO)^[4-5]。后期研究进一步指出, 在蓝藻中, PTO 是主要的生物节律震荡起搏器, TTFL 则负责生物钟的输入和输出途径^[6]。PTO 能独立运行, 但不能完全脱离 TTFL 系统。而 TTFL 对 PTO 有稳定作用, 同时 PTO 能够补偿 TTFL 的节律性输出。同时它们之间又有明确的相互依存的关系, PTO 是核心起搏器, TTFL 是“奴隶”振荡器。当 PTO 停止工作时, TTFL 作用迅速衰减。由此, PTO 和 TTFL 系统相对独立又相互耦合, 共同组成稳定的蓝藻生物钟系统。

蓝藻是目前已知的最简单的用来研究生物钟节律的原核生物体。它的生物钟调节光合作用、呼吸作用、固氮作用、细胞分裂等多种生理过程^[7-8]。蓝藻生物钟也由 PTO 和 TTFL 两部分组成。蓝藻生物钟 PTO 的核心 *kai* 基因由 *kaiA*、*kaiB*、*kaiC* 三个基因构成, 其翻译产物 KaiA、KaiB 和 KaiC 蛋白是核心振荡器的主要组成成分, 最早是从 *Synechococcus* sp. PCC7942 中克隆得到^[9]。其中 KaiB 是一种罕见的变质蛋白, 它可在不同的自然条件下转换成不同的折叠方式。在夜晚 KaiB 可从一种高度密集的、不活跃的四聚物折叠 (KaiBgs) 转换成一种罕见的、活跃的单体折叠 (KaiBfs)^[10]。KaiC 是生物钟核心的核心, 它与 ATP 相互作用组成六聚体, 兼具激酶和磷酸酶的活性, 可以自主磷酸化和去磷酸化。*kaiA*、*kaiB* 和 *kaiC* 都是维持生理节律所必需的, 缺

失任何一个都将扰乱其正常的昼夜节律或导致基因表达的节律消失^[11-12]。PTO 控制蓝藻生物钟相互关联的三种节律: 第一是 KaiC 蛋白的磷酸化, 第二是 KaiC 蛋白的 ATP 水解酶活性, 第三是 KaiABC 蛋白复合物的相互作用^[13]。无论是在体内还是体外, KaiC 的自身磷酸化被认为是生物钟振荡的核心并且控制全组基因的表达, *kaiBC* 转录和翻译被认为是蓝藻转录基因组昼夜振荡的本质。KaiB 的构象改变和 ATP 的水解是通过 KaiC 和输出蛋白作用的结果, 它们共同协调信号和昼夜节律的变化。过度表达的 KaiA 蛋白导致 *kaiBC* 转录增加, 而过度表达的 KaiC 抑制 *kaiBC* 的转录。因此, KaiA 和 KaiC 分别被认作 *kaiBC* 表达正面和负面的监管机构^[14-15]。蓝藻生物钟循环不仅依靠 PTO 的作用, 同时也要依赖于 TTFL 感受外界环境变化和调控下游信号。本文主要介绍蓝藻的依赖于 TTFL 的主要的三条输出途径及其相关调控因子的作用^[16]。

1 蓝藻生物钟信号输出途径调控下游基因表达

研究表明, 蓝藻生物钟主要通过三条输出途径, 包括 KaiC-SasA-RpaA、KaiC-LabA-RpaA 和 KaiC-CikA-RpaA, 对其昼夜节律进行调控 (图 1)。传导到 KaiABC 振荡器的时间信息发散到以 SasA、LabA、CikA 为主要调节因子的路径上, 然后再收敛到 RpaA 上以控制不同途径的昼夜节律^[17]。三个主要输出途径可能依据单个昼夜节律调控因子产生的不

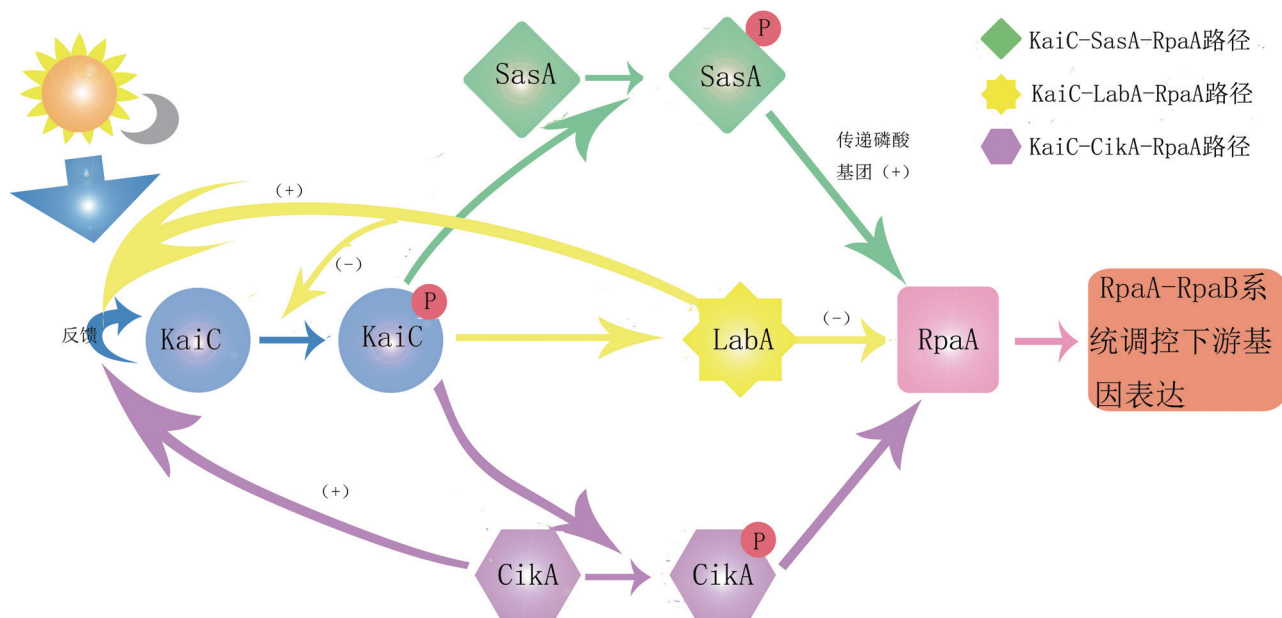


图1 蓝藻输出途径调控下游基因表达的三条主要输出途径

同时间信息源来调节 *kaiBC* 启动子的活性。SasA 根据 KaiC 的反应状态活化 *kaiBC* 启动子活性, LabA 响应于磷酸化 KaiC 的积累抑制 *kaiBC* 启动子活性, 而 CikA 在转录调节中的功能可能取决于其在时钟控制下的水平以及基于其与 KaiABC 复合物的结合^[18]。其中 SasA 和 CikA 是相互对抗的两个蛋白, 它们分别和 Kai 蛋白自动组装成控制白天和夜晚节律的复合蛋白^[10]。

RpaA 蛋白是重要的蓝藻生物钟转录输出因子, 对于维持 *kaiBC* 表达的转录 / 翻译反馈环路至关重要。RpaA 的磷酸化受两种拮抗性组氨酸激酶 SasA 和 CikA 的调控, 它们在不同的时间由 Kai 蛋白依次激活。其中 SasA 为 RpaA 的激酶, 涉及输入途径的 CikA 充当磷酸酶, CikA 和 SasA 共同调控精确地控制输出路径^[17]。磷酸化的 RpaA 的过度表达使细胞从黎明状态转变为黄昏状态并导致细胞分裂门控的关闭, 磷酸化的 RpaA 在夜间减少又能使基因表达恢复到其默认的黎明时状态且同时打开细胞分裂门控^[19]。敲除 *rpaA* 基因的蓝藻会显著降低 *kaiBC* 的节律性表达, 继而引起 KaiC 蛋白积累不足, 并表现出几乎完全的无节律状态。

2 输出途径一: KaiC-SasA-RpaA是连接核心振荡器与生物钟输出系统最主要的途径

SasA 蛋白是该通路的主要调控因子。其编码产物为组氨酸激酶, 在维持蓝藻生物钟节律性表型的过程中表现出与 KaiC 的密切关联。SasA 蛋白中自磷酸化位点是位于 162 位的组氨酸, 该位点突变极大地减弱 *kaiBC* 启动子的活性, 并导致了节律性表型的振幅衰减。因而 SasA 可能是节律信息输出的第一个成分, 与 KaiC 形成复合物, 通过磷酸基团传递作用将节律计时信号放大传递给受生物钟控制的基因^[20]。在蓝藻中, *sasA* 缺失缩短了昼夜节律周期并减弱了振荡幅度。该结果表明, *sasA* 不是生物钟核心基因。它的缺失并不会导致昼夜节律完全消失, 但却是蓝藻维持正常昼夜节律所必需的^[21]。

KaiC-SasA-RpaA 被认为是连接核心振荡器与生物钟输出系统的主要途径。在完整的 24 h 昼夜节律过程中, Kai 蛋白和 SasA 的关系非常紧密, 它们通过互相作用共同经历昼夜节律性震荡过程: 在相对黎明与正午时, KaiA 和 KaiB 共同形成一个相对较小的蛋白复合物, 随着时间推移而进一步积累, 在相对黄昏之后, Kai 蛋白、SasA 蛋白会形成较大的复合物。而后在相对黎明时, 蛋白表达又降低,

蛋白复合物各自分离开来, 并开始新一轮的转录调控^[22]。KaiC 与 SasA 的结合使 SasA 磷酸化, SasA 改变其磷酸化状态的这种能力对于在蓝藻体内产生正常的昼夜节律基因表达是至关重要的。SasA 和 KaiC 的相互作用构成一个正反馈回路, 对由 KaiABC 组成的生物钟振荡核心起放大作用, 它根据昼夜节律与 KaiC 形成异多聚体复合物——在 KaiC 的 C 末端结构域中的 ATP 酶催化位点的活性状态下, SasA 三聚体和 KaiC 六聚体在 SasA 的 N-末端结构域以 1:1 的分子彼此缔合, 且其相互作用的亲和力取决于 C 末端结构域的磷酸化状态, 磷酸化的 SasA 再把磷酸基团传递给 RpaA。RpaA 是 SasA 的同源响应因子, 可以接受 SasA 转移过来的磷酸化基团而被活化^[23]。从 KaiC 到 SasA 的信息传递通过增强的 SasA 的自磷酸化活性得以实现, 游离的未磷酸化的 SasA (unpSasAfree) 优先于游离的磷酸化的 SasA (pSasAfree) 与 KaiC 结合, 并通过 KaiC 作用增强其自磷酸化活性^[7]。然后, pSasAfree 从 pSasA-KaiC 复合物上释放, 并与输出途径的第二组分 RpaA 结合, 转移其磷酸基团。磷酸化的 RpaA 再将核心振荡器连接到时钟的两个最显著的生理输出: 全局转录组振荡和细胞分裂的门控^[23]。

3 输出途径二: KaiC-LabA-RpaA通路负调控昼夜节律的输出

在蓝藻中, KaiC 被证实在夜间可以通过 LabA 依赖性通路抑制 RpaA 的功能, 并通过 *labA* 和 *sasA* 双突变实验证实该通路与 SasA 处在不同的输出途径中。*labA* 通过基因筛选被鉴定为 KaiC 的负反馈调节不可或缺的基因, 并以剂量依赖性方式抑制昼夜节律基因表达^[17]。*labA* 的缺失使 KaiC 的负反馈调节消失, 提高了生物钟的谷值而呈现出较低的振幅^[24]。一方面, 遗传分析表明, LabA 和 SasA 一样具有调节 *rpaA* 以及 *kaiBC* 表达的功能^[25]。目前已经证实 LabA 能直接负调控 KaiC 继而影响 *kaiBC* 启动子的表达; 另一方面, 基因分析表明, KaiC 能通过 LabA 依赖途径抑制 RpaA, 但 LabA 与 RpaA 可能不是直接相互作用的, 因为在 LabA 上没有发现可以直接影响 RpaA 磷酸化的功能域, LabA 不与任何 Kai 蛋白或 RpaA 相互作用^[16], 因此这一信号转导途径的具体分子机制仍有待研究。

同时 LabA 也参与细胞的氧化还原代谢系统, 生物钟基因通过转录调控影响细胞的代谢和氧化还原状态。在光照 - 黑暗变化条件下, LabA 抑制 SasA

突变体的生长, 故 LabA 和 SasA 可能共同调节细胞的氧化还原代谢^[26]。

4 输出途径三: KaiC-CikA-RpaA的负调控作用

CikA 在发现最初被认为是光受体, 实验观察到它可通过光感应诱导调节昼夜节律^[27]。随后的研究发现在单细胞聚球藻 PCC 7942 中, CikA 不是光受体而是一种还原酶。CikA 与 SasA 属于同一蛋白激酶家族, 是组氨酸蛋白激酶 HPK 和自磷酸化酶, CikA 在输入和输出途径都发挥着重要作用^[28]。CikA 是可重置生物钟时相的光敏色素, 能感受光照 - 黑暗变化, 是信号输入途径的关键组分^[29]。其 N-端氨基酸序列表明它是对细胞的氧化还原状态敏感的感应因子, 可能起接受信号的作用。在输出途径中, CikA 的 C 端的 PsR 结构域会封闭 HPK 结构域上的磷酸化位点, 从而阻碍了 CikA 发生磷酸化, 当 PsR 与 S-KaiC (KaiC phosphorylated only on serine 431) 相互作用后解除了 CikA 对自激酶的阻碍, 促进 CikA 的磷酸化, 然后磷酸化的 CikA 再将节律信息传递给 RpaA 进而影响基因的昼夜节律性表达^[30]。与 *labA* 相同, *cikA* 基因也能增强 KaiC 过表达造成的反馈抑制, 负调节 *kaiBC* 表达。CikA 的磷酸酶活动刺激 KaiC 脱去磷酸, 从而抑制 RpaA 的作用^[10]。不同于 *labA* 对 KaiC 负反馈调节的必要性, CikA 对 KaiC 的负反馈调节不是必需的。另外 CikA 也可以影响细胞的分裂, *cikA* 缺失株细胞不分裂, 但 *cdpA* 基因可以使 *cdpA* 缺失株细胞重新产生分裂^[31]。

5 RpaA-RpaB合作系统的进一步信号整合作用

RpaA 活性对于维持 *kaiBC* 表达的转录 / 翻译反馈环路是至关重要的。然而, 近年来的研究表明, 在生物钟调节机制中, RpaB 在夜间直接结合生物钟调节的启动子, 而不是 RpaA 直接发挥作用。RpaB 结合启动子从而抑制 *kaiBC* 和其他目标基因 (*rpoD6* 和 *sigF2*) 在夜间的转录。其中 RpaB 的磷酸化水平对于细胞在光照 - 黑暗循环下的存活非常关键, 其中 RpaB 磷酸化是环境驱动的, 独立于昼夜节律钟^[31]。RpaA 在转录调节中与 RpaB 协同发挥作用, 磷酸化的 RpaA 可介导 RpaB 从靶启动子上解离, 它们共同编码 RNA 聚合酶因子, 并且可以作为全基因组转录振荡的调节子^[33]。RpaB 起到从靶基因上释放生物钟依赖性转录负调节因子的作用。然而实验发现, 在黎明, 启动子激活转录; 在黄昏, 目标基因的转录开始下降时, RpaB 结合到

启动子的水平却没有恢复^[34]。这些研究结果表明存在有额外的转录调节, 如 LabA 和 CikA。同时 RpaB 还在几种高光依赖性基因的调节中起到转录阻遏的作用, 通过从靶启动子上释放以允许在高光条件下激活转录^[35]。在蓝藻中, RpaA-RpaB 合作系统和 SasA-RpaA 生物钟输出系统之间的复杂监管共同将相关的细胞外和细胞内信号整合到生物钟上。

6 展望

在蓝藻生物钟机制的研究过程中, 不同输出途径的机制被逐渐阐明。输出途径作为生物钟体系的重要组成部分, 它的发现推动了生物钟体系的完善。但目前在输出途径的研究中还有一些机制尚未被解释清楚, 例如 RpaA 具有接受 SasA 的磷酸基团的 DNA 结构域, 但具体结合什么还不清楚; 在 KaiC-LabA-RpaA 途径中, LabA 为 KaiC 和 RpaA 的中介, 但其具体功能未知; 在 KaiC-CikA-RpaA 途径中, CikA 以未知机制影响着 KaiC 的磷酸化状态。此外还可能存在一个不依赖 SasA 和 RpaA 的输出途径, 通过控制 DNA 拓扑结构, 直接控制基因的转录表达。综上, 单从蓝藻的输出途径这一点看, 蓝藻的基因表达调控是复杂的, 还有诸多问题需要科学工作者的辛苦研究和艰苦探索。

[参 考 文 献]

- [1] 刘青青, 王颖, 何群. 生物钟蛋白质翻译后修饰的生物学功能. 生命科学, 2015, 11: 1392-402
- [2] Schultz TF, Kay SA. Circadian clocks in daily and seasonal control of development. Science, 2003, 301: 326-8
- [3] Nakajima M, Imai K, Ito H, et al. Reconstitution of circadian oscillation of cyanobacterial KaiC phosphorylation *in vitro*. Science, 2005, 308: 414-5
- [4] Teng SW, Mukherji S, Moffitt JR, et al. Robust circadian oscillations in growing cyanobacteria require transcriptional feedback. Science, 2013, 340: 737-40
- [5] Dong P, Fan Y, Sun J, et al. A dynamic interaction process between KaiA and KaiC is critical to the cyanobacterial circadian oscillator. Sci Rep, 2016, 6: 25129
- [6] Johnson CH, Stewart PL, Egli M. The cyanobacterial circadian system: from biophysics to bioevolution. Annu Rev Biophys, 2011, 40: 143-67
- [7] 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: 8564-9
- [8] Johnson CH, Egli M. Metabolic compensation and circadian resilience in prokaryotic cyanobacteria. Annu Rev Biochem, 2014, 83: 221-47
- [9] 刘松, 刘森. 蓝藻生物钟核心振荡器的KaiB-KaiC相互

- 作用机制. 生物化学与生物物理进展, 2015, 42: 220-7
- [10] Tseng R, Goularte NF, Chavan A, et al. Structural basis of the day-night transition in a bacterial circadian clock. *Science*, 2017, 355: 1174-80
- [11] Golden SS, Johnson CH, Kondo T. The cyanobacterial circadian system: a clock apart. *Curr Opin Microbiol*, 1998, 1: 669-73
- [12] 李丛鑫, 王鹏业, 王渭池. 蓝绿菌生物钟调控动力学和机制研究进展. *生命科学*, 2015, 11: 1320-7
- [13] Oyama K, Azai C, Nakamura K, et al. Conversion between two conformational states of KaiC is induced by ATP hydrolysis as a trigger for cyanobacterial circadian oscillation. *Sci Rep*, 2016, 6: 32443
- [14] Ishiura M, Kutsuna S, Aoki S, et al. Expression of a gene cluster kaiABC as a circadian feedback process in cyanobacteria. *Science*, 1998, 281: 1519-23
- [15] Xu Y, Weyman PD, Umetani M, et al. Circadian yin-yang regulation and its manipulation to globally reprogram gene expression. *Curr Biol*, 2013, 23: 2365-74
- [16] Chen AH, Lubkowicz D, Yeong V, et al. Transplantability of a circadian clock to a noncircadian organism. *Sci Adv*, 2015, 1: e1500358
- [17] Taniguchi Y, Takai N, Katayama M, et al. Three major output pathways from the KaiABC-based oscillator cooperate to generate robust circadian kaiBC expression in cyanobacteria. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107: 3263-8
- [18] Gutu A, O'Shea EK. Two antagonistic clock-regulated histidine kinases time the activation of circadian gene expression. *Mol Cell*, 2013, 50: 288-94
- [19] Markson JS, Piechura JR, Puszyńska AM, et al. Circadian control of global gene expression by the cyanobacterial master regulator RpaA. *Cell*, 2013, 155: 1396-408
- [20] Kageyama H, Kondo T, Iwasaki H. Circadian formation of clock protein complexes by KaiA, KaiB, KaiC, and SasA in cyanobacteria. *J Biol Chem*, 2003, 278: 2388-95
- [21] Iwasaki H, Williams SB, Kitayama Y, et al. A kaiC-interacting sensory histidine kinase, SasA, necessary to sustain robust circadian oscillation in cyanobacteria. *Cell*, 2000, 101: 223-33
- [22] Iijima H, Shirai T, Okamoto M, et al. Changes in primary metabolism under light and dark conditions in response to overproduction of a response regulator RpaA in the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Front Microbiol*, 2015, 6: 888
- [23] Takai N, Nakajima M, Oyama T, et al. A KaiC-associating SasA-RpaA two-component regulatory system as a major circadian timing mediator in cyanobacteria. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 12109-14
- [24] 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: 881-5
- [25] 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: 60-70
- [26] Shultzaberger RK, Boyd JS, Katsuki T, et al. Single mutations in *sasA* enable a simpler Δ cikA gene network architecture with equivalent circadian properties. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111: E5069-75
- [27] Schmitz O, Katayama M, Williams SB, et al. CikA, a bacteriophytochrome that resets the cyanobacterial circadian clock. *Science*, 2000, 289: 765-8
- [28] Stock AM, Robinson VL, Goudreau PN. Two-component signal transduction. *Annu Rev Biochem*, 2000, 69: 183-215
- [29] 李青雁, 庞羽彤, 李小龙, 等. 蓝藻生物节律性分子调控机制的研究进展. *基因组学与应用生物学*, 2013, 5: 677-84
- [30] Zhang X, Dong G, Golden SS. The pseudo-receiver domain of CikA regulates the cyanobacterial circadian input pathway. *Mol Microbiol*, 2006, 60: 658-68
- [31] Mackey SR, Choi JS, Kitayama Y, et al. Proteins found in a CikA interaction assay link the circadian clock, metabolism, and cell division in *Synechococcus elongatus*. *J Bacteriol*, 2008, 190: 3738-46
- [32] Moronta-Barríos F, Espinosa J, Contreras A. *In vivo* features of signal transduction by the essential response regulator RpaB from *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *Microbiology*, 2012, 158: 1229-37
- [33] Dvornyk V, Deng HW, Nevo E. Structure and molecular phylogeny of *sasA* genes in cyanobacteria: insights into evolution of the prokaryotic circadian system. *Mol Biol Evol*, 2004, 21: 1468-76
- [34] Hanaoka M, Takai N, Hosokawa N, et al. RpaB, another response regulator operating circadian clock-dependent transcriptional regulation in *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *J Biol Chem*, 2012, 287: 26321-7
- [35] Seki A, Hanaoka M, Akimoto Y, et al. Induction of a group 2 sigma factor, RPOD3, by high light and the underlying mechanism in *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *J Biol Chem*, 2007, 282: 36887-94