

## KaiA 调控蓝藻生物钟的分子机制研究进展

李金奎<sup>1,2</sup>, 曹春雨<sup>1</sup>, 喻玲玲<sup>1</sup>, 刘森<sup>1,2</sup>

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

2 湖北工业大学 教育部发酵工程重点实验室/工业微生物湖北省重点实验室, 湖北 武汉 430068

李金奎, 曹春雨, 喻玲玲, 等. KaiA 调控蓝藻生物钟的分子机制研究进展. 生物工程学报, 2019, 35(5): 795–804.

Li JK, Cao CY, Yu LL, et al. Progress in the molecular mechanism of KaiA regulating cyanobacterial circadian clock. Chin J Biotech, 2019, 35(5): 795–804.

**摘 要:** 蓝藻生物钟系统主要包括输入途径、核心振荡器和输出途径 3 部分, 核心振荡器主要由时钟蛋白 KaiA、KaiB、KaiC 构成。3 种蛋白之间的相互作用产生节律信号及调控输入、输出信号进而维持生物振荡的精确与稳定。文中围绕蓝藻生物钟核心振荡器及核心振荡器组成蛋白的结构、功能与相互作用特点, 结合本实验室近期取得的研究成果, 针对时钟蛋白 KaiA 调节 KaiC 的酶活性、介导核心振荡器的时相重置、与 CikA 竞争 KaiB 的结合位点等方面近年来的研究进展进行了综述。

**关键词:** 蓝藻, 生物钟, 核心振荡器, 时钟蛋白 KaiA

## Progress in the molecular mechanism of KaiA regulating cyanobacterial circadian clock

Jinkui Li<sup>1,2</sup>, Chunyu Cao<sup>1</sup>, Lingling Yu<sup>1</sup>, and Sen Liu<sup>1,2</sup>

1 Hubei Key Laboratory of Tumor Microenvironment and Immunotherapy, Medical School, China Three Gorges University, Yichang 443002, Hubei, China

2 Key Laboratory of Fermentation Engineering (Ministry of Education) & Hubei Key Laboratory of Industrial Microbiology, Hubei University of Technology, Wuhan 430068, Hubei, China

**Abstract:** The cyanobacterial circadian clock has three relatively independent parts: the input path, the core oscillator, and the output path. The core oscillator is composed of three clock proteins: KaiA, KaiB, and KaiC. The interactions among these three proteins generate a rhythmic signal and convey the input signals to the output signals to maintain the accuracy and stability of the oscillation of downstream signals. Based on the cyanobacterial circadian clock and the structure, function, and interaction of the clock proteins of the core oscillator, combining the recent results from our laboratory, this review summarized the recent progresses of the molecular mechanism of KaiA in regulating KaiC's enzymatic activity, mediating

**Received:** January 9, 2019; **Accepted:** March 13, 2019

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (No. 31670768), Wuhan Science and Technology Bureau Frontier Basic Research Project (No. 2018060401011319).

**Corresponding author:** Sen Liu. Tel/Fax: +86-717-6397179; E-mail: senliu.ctgu@gmail.com

国家自然科学基金 (No. 31670768), 武汉市科技局前沿基础研究项目 (No. 2018060401011319) 资助。

网络出版时间: 2019-05-09

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.q.20190507.1555.001.html>

phase reset of the oscillator, and competing with CikA for the binding site of KaiB.

**Keywords:** cyanobacterium, circadian clock, core oscillator, clock protein KaiA

昼夜节律现象广泛存在于生物体中,即使简单的原核生物蓝藻也表现出昼夜节律行为。生物体昼夜节律受到体内生物钟的调控,蓝藻生物钟是目前已知的最简单的生物钟,也是生物钟分子机制研究中最重要模型之一。蓝藻生物钟系统主要包括输入途径、核心振荡器和输出途径3部分。核心振荡器是蓝藻生物钟的关键部分,它不同于DNA转录和RNA翻译所形成的负反馈振荡器,属于翻译后振荡器<sup>[1]</sup>。更为重要的是,蓝藻生物钟的核心振荡器是迄今为止唯一能仅通过将其组成蛋白(KaiA、KaiB、KaiC三种蛋白)混合在适当的缓冲溶液中即可实现体外重建的生物振荡器。因此,蓝藻生物钟核心振荡器一直是生物钟研究的热点,而解析其组成蛋白KaiA、KaiB、

KaiC的结构和阐明其分子机制具有重要意义。

文中围绕蓝藻生物钟核心振荡器及其组成蛋白的结构和功能特点,针对时钟蛋白KaiA调节KaiC的酶活性、介导核心振荡器的时相重置、与CikA竞争KaiB的结合位点等方面对近年来的研究进展进行了综述(图1)。

## 1 蓝藻生物钟核心振荡器简介

生物钟的分子机制一直以来都是研究者们感兴趣的内容。以往的研究认为,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<sup>[2]</sup>。但在2005年,Kondo等首次证明在蓝藻的生物钟体系中存在独立于基因转录的生物节律起搏器<sup>[3]</sup>——翻译后

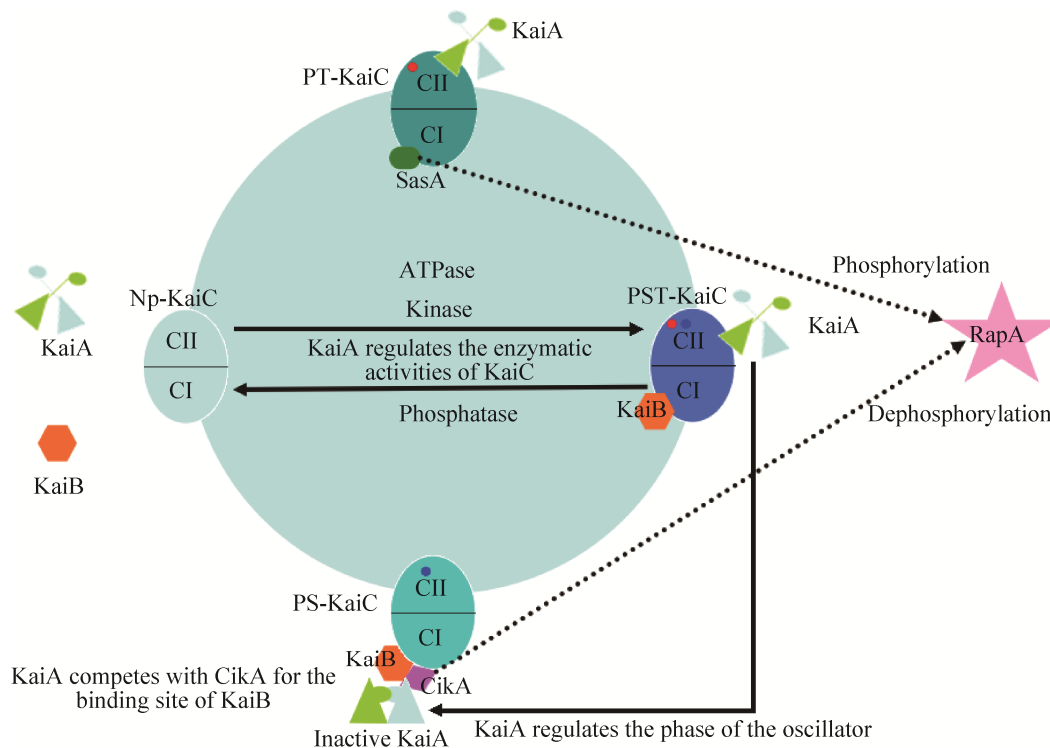


图1 KaiA调控蓝藻生物钟的分子机制总体图示

Fig. 1 Overall diagram of the molecular mechanism that KaiA regulation cyanobacterial clock.

振荡器 (Post-translational oscillation, PTO)<sup>[4-5]</sup>。后期研究表明,蓝藻的生物钟由 PTO 和 TTFL 两部分组成,PTO 是核心起搏器,TTFL 则负责生物钟的输入和输出途径。PTO 和 TTFL 共同调节蓝藻的生物钟系统<sup>[6]</sup>。

蓝藻生物钟 PTO 部分的核心,由一簇称为 *kaiABC* 的基因所编码的生物钟蛋白组成。该基因簇包括 *kaiA*、*kaiB* 和 *kaiC* 三个基因<sup>[7]</sup>。*kaiABC* 基因簇所编码的蛋白 KaiA、KaiB 和 KaiC 是蓝藻生物钟核心振荡器的主要组成成分。蓝藻生物钟核心振荡器产生昼夜节律的计时机制表现在 2 个方面:基因簇转录水平呈高低的节律性变化;KaiA 和 KaiB 共同作用使 KaiC 蛋白的磷酸化水平表现出节律性变化<sup>[8]</sup>。

## 2 蓝藻生物钟核心振荡器组成蛋白的结构和功能特点

蓝藻生物钟核心振荡器的组成蛋白 KaiA、KaiB、KaiC 之间存在多种相互作用,从而控制 KaiC 的磷酸化水平呈现节律性振荡。Kai 蛋白中的任意两种均可以相互作用,任何 Kai 蛋白的缺失将使核心振荡器丧失功能,3 种 Kai 蛋白同时存在时核心振荡器才能正常运行<sup>[9]</sup>。在此基础上,研究人员对 KaiA、KaiB 和 KaiC 的空间结构及功能特点进行了大量研究。

### 2.1 核心振荡器组成蛋白 KaiC 的结构和功能特点

KaiC 的主要形式为 6 个单体组成的同源六聚体结构。每个 KaiC 单体具有 2 个结构域,分别是 C 端的 CII 结构域和 N 端的 CI 结构域。KaiC 蛋白同时兼备自激酶 (Autokinase) 和自磷酸酶 (Autophosphatase) 活性。激酶可以使 KaiC 自身亚基相互磷酸化,磷酸酶则推动 KaiC 去磷酸化。激酶和磷酸酶同时存在是 KaiC 发生磷酸化-去磷酸化周期性变化的基础<sup>[10]</sup>。KaiC 的 CII 结构域上

存在 2 个磷酸化位点,分别是 431 位的丝氨酸残基和 432 位的苏氨酸残基。因此,每个 KaiC 单体就具备 4 种可能的磷酸化状态,且能够按照顺序磷酸化<sup>[11]</sup>。

### 2.2 核心振荡器组成蛋白 KaiB 的结构和功能特点

KaiB 蛋白有单体、二聚体、四聚体甚至多聚体等多种状态。在整个振荡周期中,KaiB 蛋白会根据 KaiC 蛋白磷酸化状态的改变形成不同的聚合体。KaiB 蛋白在这些不同的聚合体之间转换状态,以此来适应 KaiC 的状态进而与 KaiC 结合<sup>[12]</sup>。最近的研究发现,KaiB 蛋白会在 2 个不同的三维折叠之间转换,从而提供时间延迟并使该振荡器的时相与地球旋转的时相相匹配<sup>[13]</sup>。

### 2.3 核心振荡器组成蛋白 KaiA 的结构和功能特点

KaiA 蛋白有 3 个功能结构域:放大振荡幅度的 N 端结构域,产生节律性振荡的 C 端结构域,以及将 N 端和 C 端连接的中间结构域。

KaiA 的 N 端结构域一般指第 1–135 位氨基酸残基。N 端一半的结构展现出与传统信号接收结构域类似的折叠。但是与传统信号接收结构域相比,KaiA 的 N 端结构域缺乏磷酸基转移反应所需的保守 Asp 残基,所以 KaiA 的 N 端结构域被认为是伪受体结构域<sup>[14]</sup>。

KaiA 的 C 端结构域 (第 180–284 位氨基酸残基) 高度保守。该结构域由 4 个  $\alpha$  螺旋组成,负责 KaiA 的同源二聚化,介导 KaiA 与 KaiC 相互作用,促进 KaiC 的磷酸化<sup>[15]</sup>。

连接 N 端和 C 端的中间结构域,包含第 136–179 位的氨基酸残基。最近的研究表明中间结构域会影响 KaiA 的活性状态<sup>[16]</sup>。

## 3 核心振荡器组成蛋白 KaiA 的调控机制

对于 Kai 蛋白相互作用的研究表明,KaiA 刺

激 KaiC 发生磷酸化,而 KaiB 的主要作用是结合磷酸化状态的 KaiC,通过阻止 KaiA 与 KaiC 的作用,从而促进 KaiC 去磷酸化<sup>[9]</sup>。在核心振荡器的组成蛋白中,KaiC 能发生磷酸化水平的变化,所以 KaiC 是振荡器的核心。在整个振荡周期中,KaiA 直接作用于 KaiC 来调控 KaiC 的磷酸化状态,而 KaiB 主要是通过影响 KaiA 来间接调控 KaiC 的磷酸化状态<sup>[17]</sup>。因此,较多的研究集中于阐明 KaiA 对核心振荡器的调控机制。

### 3.1 KaiA 通过调节 KaiC 多种酶的活性影响核心振荡器节律

KaiC 兼具激酶、磷酸酶以及 ATP 酶等多种酶活性,并通过这些酶活性的共同作用调控核心振荡器的节律<sup>[18]</sup>。核心振荡器的节律表现在 KaiC 磷酸化水平的高低变化。通过体外重建实验和复合物结构解析,研究人员发现 KaiA 通过 C 末端与 KaiC 直接作用,这种相互作用能调节 KaiC 多种酶的活性,进而改变 KaiC 磷酸化水平的高低,从而影响核心振荡器的节律<sup>[19]</sup>。

#### 3.1.1 KaiA 调节 KaiC 激酶和磷酸酶活性影响核心振荡器节律的产生

KaiC 的 C 末端 488–497 残基形成的 A-Loop 区(简称 A 环)有埋藏和暴露 2 种状态。A 环的埋藏和暴露状态决定了 KaiC 自磷酸酶和自激酶的活性水平,进而影响 KaiC 的磷酸化水平<sup>[20]</sup>。当 A 环处于埋藏状态,KaiC 自磷酸酶活性较高;当 A 环暴露时,KaiC 自激酶活性占优势。在解析出的 KaiC 晶体结构中,A 环处于埋藏状态,此时 ATP 的  $\gamma$ -磷酸基团与磷酸化位点的距离较远,KaiC 难以发生磷酸化<sup>[21]</sup>。所以,KaiC 自身的磷酸酶较激酶活性占优势,KaiC 本身具有低水平的自激酶活性。

当 KaiA、KaiC 共同存在时,KaiA 通过 C 末端直接结合 KaiC 的 A 环并稳定 A 环的暴露状态。A 环的暴露使 ATP 更靠近磷酸化位点,KaiC 自激

酶的活性增加,伴随 KaiC 磷酸化水平升高。当 A 环无法稳定在暴露状态,ATP 的  $\gamma$ -磷酸基团在空间上将远离磷酸化位点 S431 和 T432,KaiC 自磷酸酶活性占据优势,伴随 KaiC 磷酸化水平的降低。KaiA 的 C 末端与 KaiC 的 C 末端通过结合和解离作用来决定 KaiC 磷酸酶和自激酶活性的倾向,产生 KaiC 磷酸化水平的高低变化,从而产生振荡的节律(图 2)<sup>[22]</sup>。通过实时量化 KaiA 与 KaiC 在亚秒级时间尺度上的相互作用后发现,KaiA 对 KaiC 激酶的刺激作用为瞬时动态过程,且 KaiC 的磷酸化对 KaiA 的结合存在着反馈机制。随着 KaiC 磷酸化水平的升高,KaiA 对 KaiC 激酶的刺激作用逐渐减弱。通过这种瞬时动态作用和反馈机制,可以稳定振荡体系不被体内的其他代谢活动所干扰<sup>[23]</sup>。

上述过程中,KaiB 不直接与 A 环相互作用,也不影响 KaiC 自身磷酸化。相反,KaiB 通过使 KaiA 失活而起作用,从而使高磷酸化状态 KaiC 的磷酸酶活性占据优势,发生去磷酸化<sup>[24]</sup>。

#### 3.1.2 KaiA 调节 KaiC 的 ATP 酶活性影响核心振荡器的周期

从结构上分析,KaiC 的 N 和 C 末端结构域均含有典型的 Walker's 基序。该基序是一种保守的氨基酸序列,广泛存在于各种 GTP 结合蛋白中,可以结合 ATP<sup>[25]</sup>。研究表明,KaiC 具有弱的 ATP 酶活性,并且 ATP 酶的活性会发生节律性波动,更为重要的是,KaiC 的 ATP 酶活性对周期的形成具有重要意义<sup>[26-27]</sup>。

研究表明,KaiC 的去磷酸化通过磷酸化反应的逆转而发生,振荡节律由 KaiC 可逆自磷酸化反应的周期性变化产生<sup>[28]</sup>。当 KaiC 单独存在时,其 ATP 酶活性保持恒定。当 KaiA、KaiC 共同存在时,KaiA 刺激 KaiC 的 ATP 酶活性升高,加速 KaiC 结合的 ADP 与外源 ATP 交换来促进正向反应。而 KaiB 会抑制 KaiA 的作用致使 KaiC 的 ATP

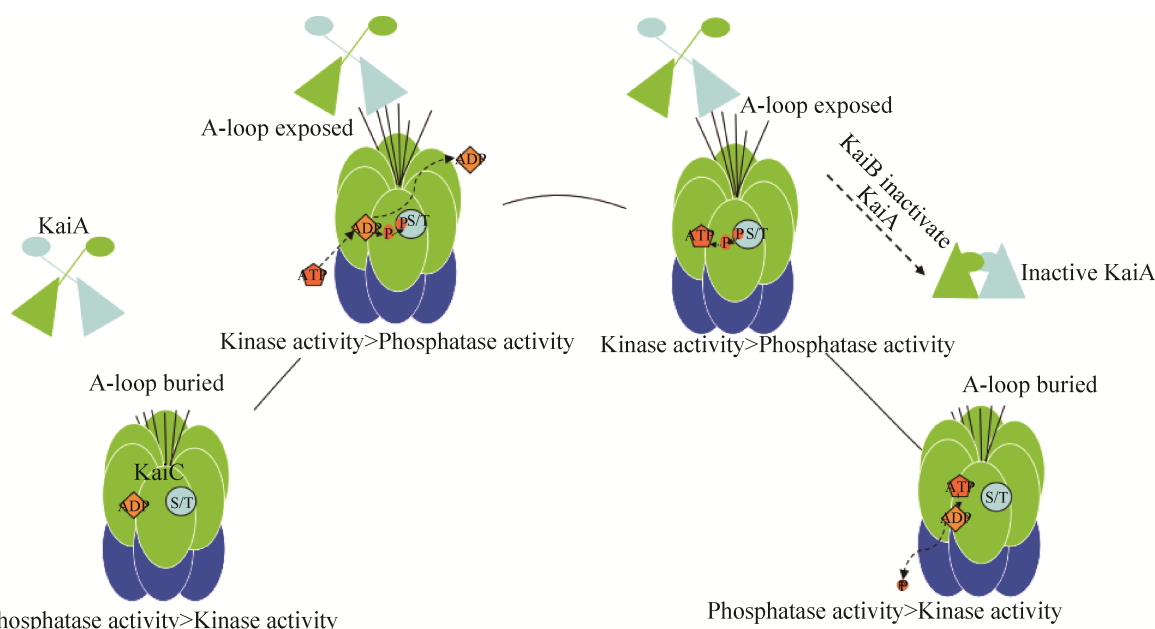


图2 KaiA 通过影响 KaiC 的 A-Loop 调节 KaiC 的酶活性

Fig. 2 KaiA regulates the enzymatic activities of KaiC by affecting the A-Loop.

酶活性降低,进而保留 KaiC 结合的 ADP,从而促进逆反应。因为 KaiA 与 KaiC 的 A 环相互作用,而 A 环靠近 CII 结构域的 ATP 酶活性位点,所以 KaiA 可能通过调节 A 环的状态来影响 ATP 酶的活性,进而决定可逆自磷酸化反应的方向<sup>[29]</sup>。

综上所述, KaiA 通过调节 KaiC 的 ATP 酶、激酶和磷酸酶活性来影响核心振荡器的节律。

### 3.2 KaiA 通过活性状态的转换调控核心振荡器的时相

虽然单个 Kai 蛋白的结构和功能被广泛研究,但是 Kai 蛋白之间动态作用的机制仍存在众多疑问。例如, KaiA 与未磷酸化的 KaiC 结合的分子细节,以及 KaiC 由磷酸化状态转变为去磷酸化状态这一动态过程中 KaiA 作用的分子机制均不清楚。近年来的研究在 KaiA 与 KaiC 之间的动态相互作用方面取得了一些新的进展。

#### 3.2.1 KaiA 在 Kai 复合物中转变活性状态

研究表明,在整个振荡周期中, KaiA 的活性状态会发生改变<sup>[30]</sup>。KaiC 未发生磷酸化时, KaiA 处于活性状态,通过 C 末端结合 KaiC 刺激 KaiC

发生磷酸化<sup>[15]</sup>。随着 KaiC 磷酸化水平的升高, KaiA 的刺激能力减弱,当磷酸化的 KaiC 与 KaiB 结合时, KaiA 对 KaiC 的刺激能力进一步减弱<sup>[31]</sup>。KaiA、KaiB 和 KaiC 在相互作用形成 KaiABC 三元复合物后, KaiA 转变为非活性状态,并且非活性状态 KaiA 的出现启动了 KaiC 的去磷酸化。

在振荡周期中, Kai 蛋白以各种组合发生相互作用,重复装配和分解形成同源和异源多聚 Kai 复合物。在磷酸化开始阶段, KaiA 迅速并反复与 KaiC 接触促进 KaiC 磷酸化,这种反复作用形成了动态的 KaiAC 复合物,此时 KaiA 处于活性状态。当高磷酸化水平的 KaiC 出现后, KaiC 结合 KaiB。KaiC 与 KaiB 的结合则使 KaiA 逐渐失去活性状态, KaiC 的去磷酸化阶段开始启动<sup>[24]</sup>。当稳定的 KaiABC 三元复合物形成时,该复合物会阻止 KaiA 与 KaiC 的反复作用, KaiA 呈现为非活性状态<sup>[32]</sup>。当 KaiC 的磷酸化水平回降时, KaiB 与 KaiC 分离, KaiA 也被分离出来并恢复活性状态(图 3)<sup>[30]</sup>。在体外振荡期间, KaiA 有节律性地在不同的复合物中转变活性状态<sup>[33]</sup>。

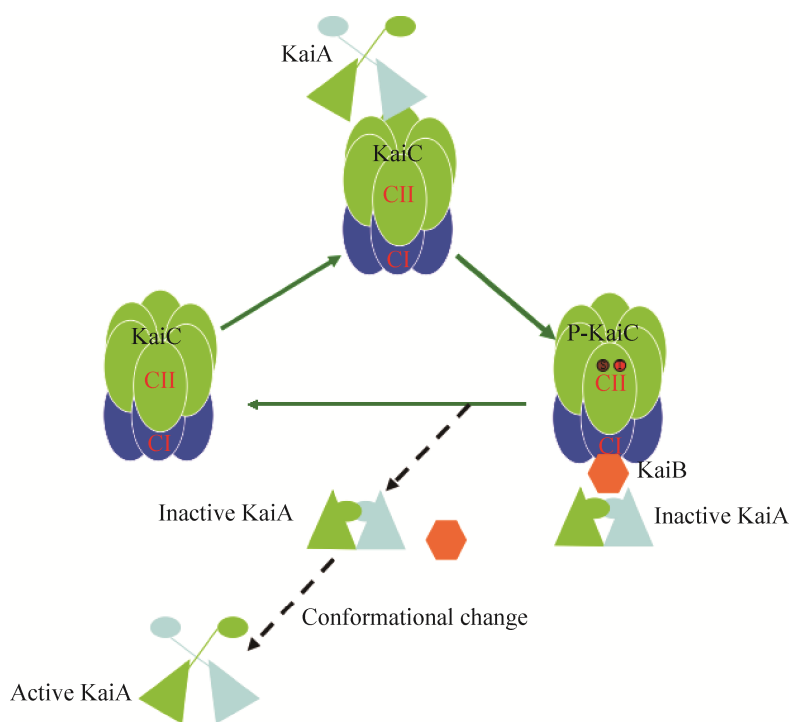


图3 KaiA 在活性态与非活性态之间转换进而调控核心振荡器的时相

Fig. 3 KaiA converts between active and inactive states to regulate the phase of the core oscillator.

### 3.2.2 活性态 KaiA 与 KaiC 形成动态变化的结合构象介导 KaiC 的磷酸化

研究者在 KaiA 与未磷酸化的 KaiC 结合介导 KaiC 发生磷酸化的分子机制上存在着不同的观点。KaiC 的 C 末端氨基酸序列无固定构象，是一段无序区域，而 KaiA 通过其 C 末端结构域与 KaiC 的该无序区域结合。电子显微镜分析 KaiAC 复合物的结果显示：KaiA 与 KaiC 的结合可以是“tethered”模型或者是“engaged”模型。在 tethered 模型中，KaiA 被 KaiC 的 C 末端捕获，但没有与 KaiC 的 CII 结构域的圆顶结构直接接触。在 engaged 模型中，KaiA 接近并与 KaiC-CII 的圆顶结构直接接触<sup>[34]</sup>。通过 NMR 测定的 KaiAC 复合物的结构显示：KaiC 的 C 末端衍生肽采用无规则卷曲构象结合在 KaiA 同源二聚体的 C 末端结构域之间的凹陷空间中<sup>[35]</sup>。通过 X 射线测定的 KaiAC 复合物结构显示：KaiC 的 C 末端衍生肽采用  $\alpha$  螺旋构象与 KaiA 结合<sup>[15]</sup>。几种技术测定的

结构完全不同，无法确定 KaiA-KaiC 相互作用的正确模型。

本课题组利用“second-site suppressor”策略来研究 KaiA 和 KaiC 的相互作用机制，使用蛋白质序列分析以及诱变研究的手段，将所得数据与之前所报道的数据相结合，并建立了数学模型解释。本课题组的研究提出，KaiA 和 KaiC 的固有无序尾部在结合过程中通过构象选择和诱导拟合经历显著的结构变化，两者间的作用为动态过程，形成不同的结合构象<sup>[4]</sup>。这包含了之前所用技术测定的结合构象。因为 KaiC 的 C 末端尾部是一个本质上无序区域，它可以采用不同的构象与蛋白质配偶体结合。所以，KaiC 的 C 末端尾部在与 KaiA 作用时具有不同的构象是合理的。NMR 结构中测定的构象可能是正在进行“蛋白质捕获”这一过程，X 射线测定的折叠构象可能是真正发挥作用的结构。通过这种方式，KaiA 与 KaiC 的相互作用可以被精细调节，并具有高特异性。

### 3.2.3 KaiA 通过自我构象抑制切换活性状态介导 KaiC 的去磷酸化

近两年的研究也报道了 KaiBC 复合物使 KaiA 失活的具体细节。KaiA 的中间结构域曾被认为是起放大振幅和作为 KaiB 结合位点的作用<sup>[36-37]</sup>, 而本课题组通过设计不同形式的 KaiA 蛋白, 并结合分子动力学分析, 提出 KaiA 的中间结构域会发生不对称的构象变化, 并使 KaiA 在活性和非活性形式之间发生可逆性转换<sup>[38]</sup>。在 KaiC 磷酸化期间, KaiA 二聚体的 C 末端结构域使用对称位点结合 KaiC 的 CII 结构域的 C 末端序列。KaiC 磷酸化水平的升高促使 KaiBC 复合物的形成, 进而和 KaiA 形成 KaiABC 复合物。晶体结构的数据指出, KaiA 二聚体在与 KaiBC 复合物结合时经历较大的构象变化, KaiA 中间结构域的  $\beta$  折叠发生旋转, 并与 KaiB 的一个  $\beta$  折叠形成反向平行的  $\beta$  折叠结构。同时, KaiA 中间结构域的  $\alpha$  螺旋向下旋转到自身二聚体界面上的 KaiC 结合位点, 从而阻断 KaiC 蛋白 CII 结构域的 C 末端多肽与 KaiA 的结合<sup>[30]</sup>。因此, 通过远程变构机制, KaiA 上的 2 个 KaiC 结合位点在自己抑制构象中被有效阻断, 伴随 KaiC 去磷酸化阶段的启动。

本课题组的研究结果与晶体结构及核磁共振的数据共同表明, KaiA 处于活性和非活性构象的动态平衡中, KaiB 会诱导 KaiA 的自我构象抑制。因此, KaiA 通过自我构象抑制的方式切换活性状态从而调控振荡器的时相。

## 3.3 KaiA 与 CikA 竞争 KaiB 同一结合位点影响核心振荡器的信号传输

### 3.3.1 信号传输蛋白 CikA 的结构和功能

CikA 蛋白在核心振荡器的信号输入和输出途径中都发挥重要作用, 它与信号输出蛋白 SasA 属于同一蛋白激酶家族, 是组氨酸蛋白激酶和自磷酸化酶<sup>[39]</sup>。CikA 具有 3 个结构域: GAF 结构域, 组氨酸蛋白激酶 (HPK) 结构域和伪受体

(PSR) 结构域。CikA 的 N 端结构域与信号接受结构域类似, 提示该结构域可能起接收信号的作用。CikA 的 C 端 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 结构域与 S-KaiC (KaiC 仅在 S431 位点磷酸化) 相互作用时, HPK 结构域的限制将被解除, CikA 发生磷酸化。磷酸化的 CikA 充当 RpaA 的磷酸酶进而影响基因的节律性表达<sup>[40]</sup>。

### 3.3.2 KaiA 与 CikA 竞争结合 KaiBC 复合物的相同位点

CikA 可以感知细胞的氧化还原状态, 并且通过与 KaiABC 蛋白质复合物的结合, 重置基于 KaiABC 的昼夜节律振荡器<sup>[41]</sup>。KaiB 与 KaiC 的混合物可以激活使 RpaA 去磷酸化的 CikA 的磷酸酶活性, 间接说明了 KaiBC 复合物可以与 CikA 结合<sup>[13]</sup>。晶体结构的数据证实了 CikA 的 PsR 接收域直接与 KaiBfs-KaiC 复合物相互作用 (KaiBfs 为折叠转换态的 KaiB)。KaiBfs-KaiC 复合物也会与 KaiA 相互作用, 将 KaiA 稳定在自己抑制构象, 锁定 KaiA 处于非活性的状态。在形成的 PsR-KaiB-KaiC 三元复合物中, CikA 的 PsR 结构域的  $\beta 2$  折叠和 KaiBfs 的  $\beta 2$  折叠相互平行作用。在 KaiA-KaiB-KaiC 三元复合物中, KaiBfs 使用相同的  $\beta 2$  折叠来结合 KaiA 的  $\beta 2$  折叠。突变 KaiBfs 的  $\beta 2$  链中的关键残基, 同时降低了其与 KaiA 及 PsR 结构域的相互作用<sup>[30]</sup>。

### 3.3.3 KaiA 与 CikA 的竞争影响振荡器信号的传输

如上所述, KaiA 和 CikA 的 PsR 结构域结合在 KaiB 的相同结合位点。KaiBfs-KaiC 会实现对 KaiA 的灭活, 进而启动 KaiC 的去磷酸化。CikA 通过与 KaiA 竞争 KaiB 上的同一位点来激活使 RpaA 去磷酸化的磷酸酶活性。通过这种竞争机制, 可以将 KaiC 去磷酸化的信息传输到下游。

KaiA 和 CikA 的 N 端在结构上均属于类信号



转导蛋白,在振荡器的输入途径中,两者的N端结构域都对细胞的氧化还原状态敏感<sup>[42]</sup>。而在输出途径中,KaiA和CikA竞争结合同一位点,KaiB和SasA也是如此。SasA和CikA又会在输出途径中共同调节RpaA的活性进而影响下游的节律信号。因此,信号输入、中心振荡器和信号输出形成紧密耦合。

## 4 总结与展望

生物钟的分子机制被广泛研究,目前可将其分为TTFL和PTO这2种。相比TTFL,PTO更为广泛存在,在古菌、细菌、真核生物(包括人)中都有发现<sup>[43]</sup>。因此,PTO机制可能是物种间更为保守的生物振荡机制。最早确认的PTO,是蓝藻中基于KaiA、KaiB、KaiC三个蛋白质的生物钟体系<sup>[3]</sup>。KaiABC体系并不是广泛存在跨物种保守的PTO。相比KaiABC,以过氧化物氧化还原蛋白为核心的氧化-还原节律性循环组成的PTO更为广泛和保守存在<sup>[44]</sup>。但是,KaiABC是目前唯一能在体外重现的PTO体系,并且生物钟系统的自我维持性、周期性及温度补偿性都可以在KaiABC中重现。所以,对生物钟PTO机制的研究中,蓝藻生物钟是最有利的研究模型之一。

虽然蓝藻生物钟是目前已知的最简单的生物钟,但由KaiA、KaiB、KaiC蛋白组成的蓝藻生物钟核心振荡器的动态机制十分复杂。目前对KaiA作用机制的研究揭示了其影响输入、输出信号,并调控核心振荡器,维持生物振荡的精确与稳定。对KaiA作用机制的研究仍存在一些需要解决的问题:例如KaiA的单体-二聚体转变是否在振荡系统中起重要作用;KaiA的N端结构域在动态周期中发挥怎样的功能;外界信号是否通过调控KaiA的N端结构域达到对该振荡体系进行调控;KaiA如何通过与细胞的代谢活动相关联进而稳定核心振荡器。对于这些问题的解决,可能需要通过生物学、物理学、数学分析等各种手段

获取Kai蛋白在动态作用过程中的相关信息。利用X射线晶体衍射和电镜三维重构技术测定生物钟蛋白的三维结构有助于我们了解生物钟蛋白相互作用的分子细节。生物钟蛋白的进化树分析也能帮助我们理解不同物种间生物钟的潜在联系和机制。

这些问题的解决不仅对理解蓝藻的生物钟运行机制有重要意义,同时能以此为基础去研究更为复杂的真核生物如哺乳动物的生物钟,进而为生物钟的应用提供科学的指导。比如,哺乳动物因生物钟的紊乱造成肝脏代谢的异常,可以根据哺乳动物生物钟所处的时相特点给与相应剂量的药物治疗。肠道细菌也有明显的生物节律,肠道细菌的代谢紊乱将加重营养吸收方面的负担,理解肠道细菌的生物节律将能为食物的摄取和营养的吸收提供科学的依据。稳定的生物节律能让植物更好地进行光合作用,适应土壤环境,从而提高植物农作物的产量,对生物钟系统与外界环境信号联系机制的研究将为生物钟系统的稳定提供清晰的见解。所以,生物钟系统的研究在疾病预防、农牧业生产乃至进化层面具有重大意义。

## REFERENCES

- [1] Teng SW, Mukherji S, Moffitt JR, et al. Robust circadian oscillations in growing cyanobacteria require transcriptional feedback. *Science*, 2013, 340(6133): 737-740.
- [2] Dunlap JC. Molecular bases for circadian clocks. *Cell*, 1999, 96(2): 271-290.
- [3] Nakajima M, Imai K, Ito H, et al. Reconstitution of circadian oscillation of cyanobacterial KaiC phosphorylation *in vitro*. *Science*, 2005, 308(5720): 414-415.
- [4] Dong P, Fan Y, Sun JQ, et al. A dynamic interaction process between KaiA and KaiC is critical to the cyanobacterial circadian oscillator. *Sci Rep*, 2016, 6: 25129.
- [5] Wong DC, O'Neill JS. Non-transcriptional processes



- in circadian rhythm generation. *Curr Opin Physiol*, 2018, 5: 117–132.
- [6] Hosokawa N, Kushige H, Iwasaki H. Attenuation of the posttranslational oscillator viatranscription-translation feedback enhances circadian-phase shifts in *Synechococcus*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(35): 14486–14491.
- [7] 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): 1519–1523.
- [8] Swan JA, Golden SS, Liwang A, et al. Structure, function, and mechanism of the core circadian clock in cyanobacteria. *J Biol Chem*, 2018, 293(14): 5026–5034.
- [9] Egli M. Intricate protein-protein interactions in the cyanobacterial circadian clock. *J Biol Chem*, 2014, 289(31): 21267–21275.
- [10] Oyama K, Azai C, Matsuyama J, et al. Phosphorylation at Thr432 induces structural destabilization of the CII ring in the circadian oscillator KaiC. *FEBS Lett*, 2018, 592(1): 36–45.
- [11] Rust MJ, Markson JS, Lane WS, et al. Ordered phosphorylation governs oscillation of a three-protein circadian clock. *Science*, 2007, 318(5851): 809–812.
- [12] 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): 173–190.
- [13] Chang YG, Cohen SE, Phong C, et al. A protein fold switch joins the circadian oscillator to clock output in cyanobacteria. *Science*, 2015, 349(6245): 324–328.
- [14] Wood TL, Bridwell-Rabb J, Kim YI, et al. The KaiA protein of the cyanobacterial circadian oscillator is modulated by a redox-active cofactor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(13): 5804–5809.
- [15] Pattanayek R, Egli M. Protein-protein interactions in the cyanobacterial circadian clock: structure of KaiA dimer in complex with C-terminal KaiC peptides at 2.8 Å resolution. *Biochemistry*, 2015, 54(30): 4575–4578.
- [16] Chen Q, Liu S, Yang LT, et al. The influence of KaiA mutations on its function in the KaiABC circadian clock system. *Data Brief*, 2018, 18: 241–247.
- [17] Egli M. Architecture and mechanism of the central gear in an ancient molecular timer. *J R Soc Interface*, 2017, 14(128): 20161065.
- [18] Goda K, Kondo T, Oyama T. Effects of adenylates on the circadian interaction of KaiB with the KaiC complex in the reconstituted cyanobacterial Kai protein oscillator. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2014, 78(11): 1833–1838.
- [19] 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–E3945.
- [20] Egli M, Pattanayek R, Sheehan JH, et al. Loop-loop interactions regulate KaiA-stimulated KaiC phosphorylation in the cyanobacterial KaiABC circadian clock. *Biochemistry*, 2013, 52(7): 1208–1220.
- [21] Kim YI, Dong G, Carruthers Jr CW, et al. The day/night switch in KaiC, a central oscillator component of the circadian clock of cyanobacteria. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(35): 12825–12830.
- [22] Ishii K, Terauchi S, Murakami R, et al. Site-directed spin labeling-electron spin resonance mapping of the residues of cyanobacterial clock protein KaiA that are affected by KaiA-KaiC interaction. *Genes Cells*, 2014, 19(4): 297–324.
- [23] Mori T, Sugiyama S, Byrne M, et al. Revealing circadian mechanisms of integration and resilience by visualizing clock proteins working in real time. *Nat Commun*, 2018, 9: 3245.
- [24] Murakami R, Mutoh R, Ishii K, et al. Circadian oscillations of KaiA-KaiC and KaiB-KaiC complex formations in an *in vitro* reconstituted KaiABC clock oscillator. *Genes Cells*, 2016, 21(8): 890–900.
- [25] Hayashi F, Itoh N, Uzunaki T, et al. Roles of two ATPase-motif-containing domains in cyanobacterial circadian clock protein KaiC. *J Biol Chem*, 2004, 279(50): 52331–52337.
- [26] Das S, Terada TP, Sasai M. Role of ATP hydrolysis

- in cyanobacterial circadian oscillator. *Sci Rep*, 2017, 7: 17469.
- [27] 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.
- [28] Nishiwaki T, Kondo T. Circadian autodephosphorylation of cyanobacterial clock protein KaiC occurs via formation of ATP as intermediate. *J Biol Chem*, 2012, 287(22): 18030–18035.
- [29] Nishiwaki-Ohkawa T, Kitayama Y, Ochiai E, et al. Exchange of ADP with ATP in the CII ATPase domain promotes autophosphorylation of cyanobacterial clock protein KaiC. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(12): 4455–4460.
- [30] Tseng R, Goularte NF, Chavan A, et al. Structural basis of the day-night transition in a bacterial circadian clock. *Science*, 2017, 355(6330): 1174–1180.
- [31] Snijder J, Schuller JM, Wiegard A, et al. Structures of the cyanobacterial circadian oscillator frozen in a fully assembled state. *Science*, 2017, 355(6330): 1181–1184.
- [32] Qin X, Byrne M, Mori T, et al. Intermolecular associations determine the dynamics of the circadian KaiABC oscillator. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(33): 14805–14810.
- [33] Pajmians J, Lubensky DK, Ten Wolde PR, et al. A thermodynamically consistent model of the post-translational Kai circadian clock. *PLoS Comput Biol*, 2017, 13(3): e1005415.
- [34] Pattanayek R, Williams DR, Pattanayek S, et al. Analysis of KaiA-KaiC protein interactions in the cyano-bacterial circadian clock using hybrid structural methods. *EMBO J*, 2006, 25(9): 2017–2028.
- [35] Vakonakis I, Liwang AC. Structure of the C-terminal domain of the clock protein KaiA in complex with a KaiC-derived peptide: implications for KaiC regulation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(30): 10925–10930.
- [36] Chang YG, Kuo NW, Tseng R, et al. Flexibility of the C-terminal, or CII, ring of KaiC governs the rhythm of the circadian clock of cyanobacteria. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(35): 14431–14436.
- [37] Uzumaki T, Fujita M, Nakatsu T, et al. Crystal structure of the C-terminal clock-oscillator domain of the cyanobacterial KaiA protein. *Nat Struct Mol Biol*, 2004, 11(7): 623–631.
- [38] Chen Q, Liu S, Yang LT, et al. The reversible function switching of the circadian clock protein KaiA is encoded in its structure. *Biochim Biophys Acta (BBA) - Gen Subj*, 2017, 1861(11): 2535–2542.
- [39] Gutu A, O'Shea EK. Two antagonistic clock-regulated histidine kinases time the activation of circadian gene expression. *Mol Cell*, 2013, 50(2): 288–294.
- [40] 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(7): 3263–3268.
- [41] Pattanayak GK, Phong C, Rust MJ. Rhythms in energy storage control the ability of the cyanobacterial circadian clock to reset. *Curr Biol*, 2014, 24(16): 1934–1938.
- [42] Ivleva NB, Gao T, Liwang AC, et al. Quinone sensing by the circadian input kinase of the cyanobacterial circadian clock. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(46): 17468–17473.
- [43] O'Neill JS, Reddy AB. Circadian clocks in human red blood cells. *Nature*, 2011, 469(7331): 498–503.
- [44] O'Neill JS, van Ooijen G, Dixon LE, et al. Circadian rhythms persist without transcription in a eukaryote. *Nature*, 2011, 469(7331): 554–558.

(本文责编 郝丽芳)