



秦曦明教授, 2010 年从美国 Vanderbilt 大学获得博士学位, 现任职于安徽大学健康科学研究院。课题组主要研究方向是生物钟(近日节律)的分子与结构基础、生物钟组分的功能和生物钟调节健康的靶点分子的研究。曾经利用蓝绿细菌作为模式生物, 阐述核心振荡器和次级振荡器之间的联系与相互作用, 并提出真核生物可能存在不依赖转录翻译环路的核心分子振荡器的假设。通过研究生物钟蛋白分子的相互作用, 解析生物钟如何维持稳定的相关机制。相关的研究成果发表在 *Nature*、*Proc Natl Acad Sci USA*、*PLoS Biology*、*Current Biology*、*J Biol Rhythms* 等学术期刊上。目前主持国家自然科学基金面上项目与安徽省自然科学基金项目。

哺乳动物生物钟的遗传和表观遗传研究进展

岳敏^{1,2}, 杨禹¹, 郭改丽¹, 秦曦明¹

1. 安徽大学健康科学研究院, 合肥 230601;
2. 安徽大学生命科学学院, 合肥 230601

摘要: 生物钟对生物机体的生存与环境适应具有着重要意义, 其相关研究近年来受到人们的广泛关注。生物钟的重要性质之一是内源节律的周期性, 当前的研究认为这种周期性是由生物钟相关基因转录翻译的多反馈环路构成核心机制调控着近似 24 h 的节律振荡。哺乳动物的生物钟系统存在一个多层次的结构, 包括位于视交叉上核的主时钟和外周器官和组织的子时钟。虽然主时钟和子时钟存在的组织不同, 但是参与调节生物钟的分子机制是一致的。近年来, 通过正向、反向遗传学方法和表观遗传学的研究方法, 对生物钟的分子机制的解析和认知愈发深入。本文在简单回顾生物钟基因发现历史的基础上, 重点从遗传学和表观遗传学两个方面, 从振荡周期的角度, 对哺乳动物生物钟分子机制的研究进展进行了综述性介绍, 以期对靶向调节生物钟来改善机体的稳态系统的研究提供参考, 同时希望能促进时间生物学领域与更多其他领域形成交叉研究。

关键词: 生物钟; 近日节律; 生物钟基因; 转录翻译反馈环路; 顺式作用元件; 转录因子; 表观遗传学

收稿日期: 2017-10-27; 修回日期: 2017-11-16

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 31571208), 安徽省自然科学基金项目(编号: 1608085MH212)和安徽大学大学生科研训练计划项目(编号: J10118520418)资助[Supported by the National Natural Science Foundation of China (No.31571208), the Natural Science Foundation of Anhui Province (No. 1608085MH212), and Anhui University Undergraduate Student Training Grant (No. J10118520418)]

作者简介: 岳敏, 本科, 专业方向: 生物科学。E-mail: yuemin_ahu@163.com

通讯作者: 秦曦明, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 生物钟分子组分的功能及其相互作用参与生物钟调控的分子机制。

E-mail: qin.ximing@ahu.edu.cn

DOI: 10.16288/j.yczs.17-350

网络出版时间: 2017/11/16 19:01:54

URI: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20171116.1901.003.html>

Genetic and epigenetic regulations of mammalian circadian rhythms

Min Yue^{1,2}, Yu Yang¹, Gaili Guo¹, Ximing Qin¹

1. Institute of Health Sciences, Anhui University, Hefei 230601, China;

2. School of Life Sciences, Anhui University, Hefei 230601, China

Abstract: The circadian clocks are vital to many organisms for their survival and adaption to the surrounding environment. More and more people are interested in the circadian clock and related researches. One of the key characteristics of this endogenous clock is its periodicity. Mechanisms underlying the mammalian circadian rhythms with ~24 h periodicity involve interlocked transcriptional and translational feedback loops. The circadian clock system in mammals consists of hierarchical structures, with the suprachiasmatic nucleus (SCN) as the central pacemaker and peripheral oscillators in other organs. In spite of the central and peripheral oscillators, the molecular mechanisms are the same within the SCN and peripheral organs. In the past decades, major achievements are accomplished by using forward and reverse genetics, as well as epigenetic approaches. In this review, we recapitulate the history of how clock-related genes were identified, and summarize the main achievements in genetics and epigenetics to understand the molecular underpinnings. We hope it can offer basic knowledge for further researches, a reference for experimental designs aiming to adjust organisms' homeostasis by modulating the clock, and provide a foundation to build interdisciplinary research networks.

Keywords: Circadian clock; circadian rhythm; clock genes; transcriptional and translational feedback loop; cis-regulating elements; transcription factors; epigenetics

地球生物在漫长的演化历史中, 为了适应环境的周期性变化, 其生理活动形成了各种不同时间尺度的生物节律, 例如近年节律、季节节律、近月节律、近日节律和超日节律。其中, 产生近日节律(circadian rhythms, 指其周期接近地球自转一圈所需的时间 24 h)的运行机制就是人们通常所说的生物钟。生物钟是生物机体内源自主产生的一种调控系统, 周期约为 24 h, 由能够进行自我维持的振荡器组成^[1]。不同物种的生物钟周期存在一定的差异, 介于 20~28 h 之间。健康人群的内源生物钟平均周期通常会比 24 h 多出 11 ± 16 min, 但在外界环境的同步化过程中每天会被调整为 24 h^[2]。因此, 生物钟的基本性质除了内源性和周期性之外, 保持和外界同步也是生物钟的另一个重要特性。生物钟的同步化(synchronization)是指外界环境对机体生物钟节律重置的过程, 类似于人们对钟表的校时。同步化不仅是指机体生物钟的周期与地球的自转周期保持一致, 更重要的是, 机体生物钟的时相(phase)与外界时间信号的时相之间存在一个稳定的相位关系^[3,4]。一个与外界时间信号保持同步的生物钟能够促进生物机体形成生存优势, 提高机体适应环境的能力, 这已经在蓝绿细菌和小鼠中被证实^[5,6]。

生物钟是被人们熟知的生物节律之一。在过去的几十年中, 从生物钟相关基因的发现、克隆, 到提出精确的分子机制阐述节律振荡的发生, 再到从组织水平发现外周组织拥有独立的自主振荡现象, 人们在生物钟研究领域取得一系列的突破性成果^[7~9]。从细菌到昆虫再到高等动物, 近似于 24 h 的周期行为被广泛发现, 并通过正向遗传学操作鉴定出各个物种的生物钟基因。在机体水平上, 哺乳动物的生物钟系统是一个多层次结构, 由主时钟和位于外周组织的子时钟构成, 其中的主时钟位于下丘脑中的视交叉上核(suprachiasmatic nucleus, SCN)。外界环境中对哺乳动物影响最大的是光照信息, 首先它通过视网膜被传递到 SCN 这个主时钟, 经过处理和整合后, 再通过激素和自主神经系统将环境信息传递到外周组织的子时钟^[10]。在哺乳动物中, 生物钟节律振荡被发现几乎存在于全身所有细胞和组织中, 并参与优化调节组织或器官的生理活动^[9,11]。

哺乳动物的不同组织和器官虽然存在很大的功能差异性, 但是参与调节生理活动的生物钟的分子机制却是一致的。当前时间生物学领域普遍认同的分子机制是生物钟基因转录与翻译水平的多反馈环来产生并维持节律振荡的理论^[8,12]。本文将对哺乳动

物生物钟产生的分子基础,从遗传学和表观遗传学两个方面展开综述性的介绍,主要内容包括重要生物钟基因的发现、转录翻译反馈环路的调控模型的确立、生物钟通路中主要的顺式作用元件、生物钟振荡节律循环中的分子相互作用及此过程中的主要表观遗传修饰等相关研究进展。

1 遗传学研究发现的主要生物钟基因

研究生物钟及其参与环境适应性的学科被称为时间生物学。早在 1960 年,美国冷泉港定量生物学研讨会“生物钟专场”,学科奠基人 Colin Pittendrigh 和 Jürgen Aschoff 在大会做重要报告并出版论文,标志该学科的创立^[13,14]。此后,人们对生物钟展开了更为大量的科学研究,研究的对象从植物、果蝇(*Drosophila melanogaster*),逐渐扩展到高等动物及人类。随着现代遗传学的建立,一批生物钟基因得到鉴定,促进了人们对生物钟振荡的理解。早期的分子研究是在果蝇中展开,发现了许多重要的生物钟基因,这为哺乳动物的研究打下了坚实的基础。

20 世纪 70 年代, Seymour Benzer 和他的博士后 Ronald Konopka 通过化学诱变筛选的正向遗传学方法,得到第一个生物钟基因突变的动物——昼夜活动节律变长(29 h)、变短(19 h)或者节律消失的果蝇;这些突变体被命名为周期基因突变体^[15]。20 世纪 80 年代, Michael Rosbash、Jeffrey Hall 和 Michael Young (三人共享 2017 年诺贝尔生理学或医学奖)克隆得到果蝇的“周期基因”——*Period*, 并且发现 *Period* 的转录产物呈现近似 24 h 的节律变化^[16,17]。随后的研究过程中,果蝇的另一个生物钟基因 *Timeless* 被克隆出来,并且发现其蛋白产物(TIM)和周期蛋白(PER)相互作用生成二聚体,而且会抑制 *Period* 基因的转录过程^[18-20]。之后, Rosbash 和 Hall 继续通过化学诱变筛选及相关的生物化学方法,发现了 *Clock* 基因的果蝇突变体,突变体的 *Period* 和 *Timeless* 的转录水平显著下降^[21];同时也发现了 *Cycle* 基因的突变体,表现出与 *Clock* 突变体相似的表型,并且 CYC 蛋白(*Cycle* 基因编码)与 CLK 蛋白(*Clock* 基因编码)形成异二聚体^[22]。与此同时, Young 也利用了化学突变鉴定出新的生物钟表型突变的果蝇,命名为 *Double-time* 突变体;*Double-time* 是哺乳动物酪蛋白

激酶家族的同源基因,并且 DOUBLETIME 蛋白控制 PER 蛋白的稳定性^[23]。综上所述,三位诺贝尔奖获得者的工作在果蝇中初步确立了由转录翻译反馈环路构成的生物钟调控的分子作用模型。

90 年代中, Joseph Takahashi 的课题组在小鼠(*Mus musculus*)中应用化学诱变筛选,同样通过正向遗传学方法,发现了第一个哺乳动物的生物钟基因——“钟基因”(Clock),突变的小鼠的昼夜活动节律变长^[24]。之后,其他参与调控小鼠生物钟的基因相继被发现:通过蛋白相互作用的方法筛选到 *Bmal1* 基因,其产物(BMAL1)与钟基因的蛋白产物(CLOCK)相互作用生成异二聚体^[25,26];果蝇周期基因在哺乳动物中的同源基因 *Per1*、*Per2* 和 *Per3*^[27-31];与周期蛋白相互作用的隐花色素的基因 *Cry1*(cryptochrome 的简写)和 *Cry2*^[32,33];负责磷酸化周期蛋白(PER),及隐花色素蛋白(CRY)的酪蛋白激酶的基因 *Csnk1e*^[34];介导 PER 和 CRY 蛋白磷酸化后进入蛋白酶体降解途径的 *Btrc*(编码 E3 连接酶 BTRCP)和 *Fbxl3/Fbxl21*(编码 E3 连接酶 FBXL3/FBXL21)^[35-37]。以上基因及其转录翻译产物构成生物钟的核心分子环路,同时参与调控生物钟辅助振荡环路的更多基因也被发现,例如维甲酸受体相关孤儿受体基因 *Ror-α*、*Ror-β* 和 *Rev-erb*。其中, *Ror-α* 和 *Ror-β* 的蛋白产物(分别是 ROR-A 和 ROR-B)参与 *Bmal1* 转录的正调节^[38],而 *Rev-erb* 的蛋白产物(REV-ERB)抑制 *Bmal1* 的转录^[39]。此外,表达 DBP 蛋白的基因不仅是一个受生物钟控制表达的基因,其蛋白产物也参与对核心生物钟基因 *Bmal1* 和 *Cry* 的转录调控,更在生物钟下游参与多种代谢酶的昼夜节律调控^[40,41]。人类的基因组存在着与小鼠完全同源的生物钟基因。

2 生物钟振荡的转录翻译反馈分子模型

在果蝇中发现 *Period* 基因及其转录翻译产物存在 24 h 的振荡规律后, Rosbash 和他的同事们提出了一个反馈抑制环路的分子模型,用以解释生物钟振荡的产生^[42]。此时的反馈抑制环路模型相对简单,仅仅包括 *Period* 的转录翻译产物对其自身的反馈抑制(图 1A)。随着更多的时钟基因被发现,尤其是在哺乳动物中发现了多个果蝇时钟基因的同源基因,这一分子模型逐渐发展成为较为复杂的多重反馈环

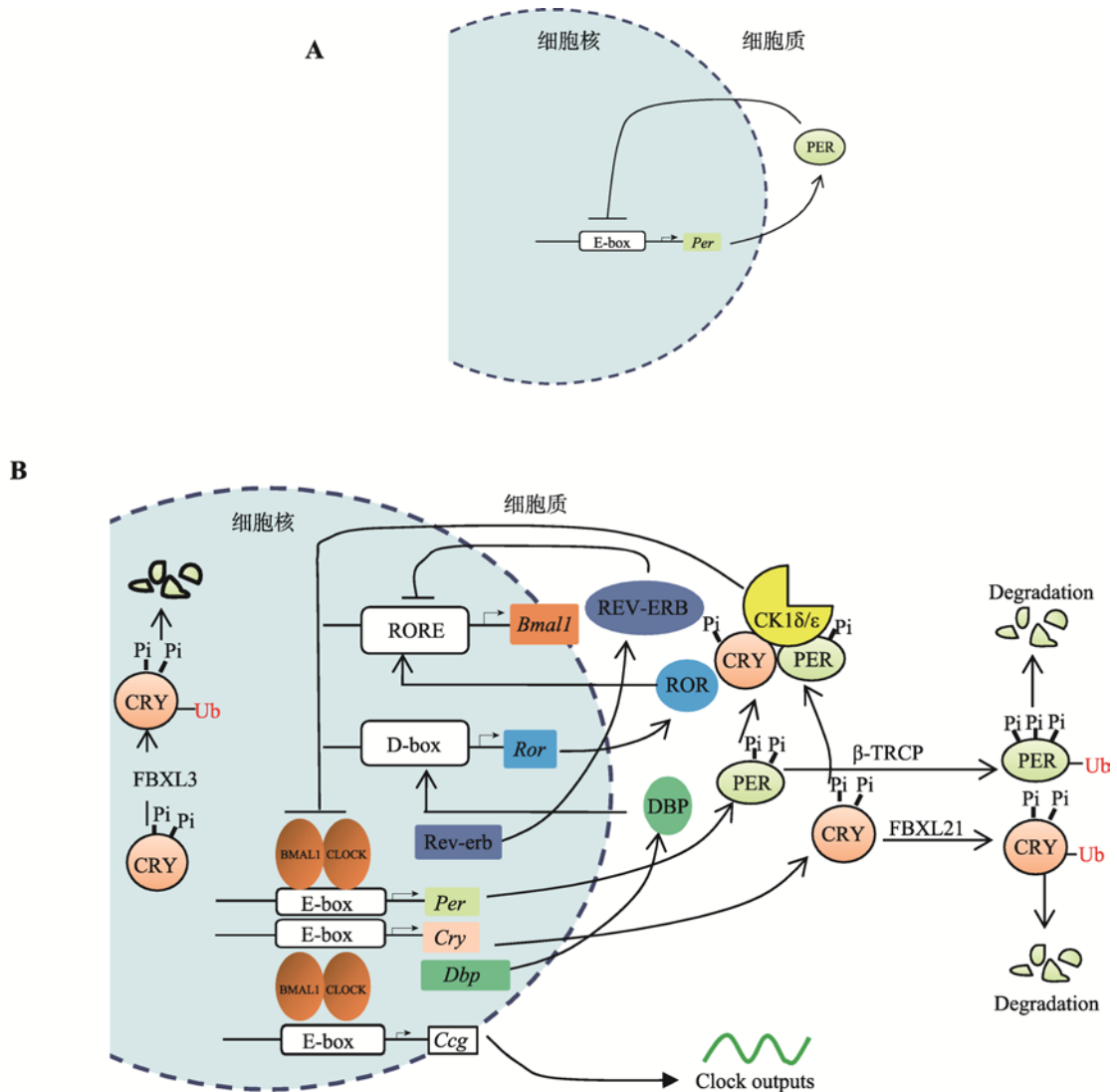


图 1 哺乳动物生物钟的分子模型

Fig. 1 The molecular model of the circadian clock in mammals

A: 原始的转录翻译反馈抑制环路, 由 Rosbash 提出^[42]。该简单模型仅仅由当时发现的 *Period* 基因及其转录翻译产物 PER 蛋白组成, 其他的细节在当时都不清楚。B: 当前生物钟的分子模型是一个包括转录调控和转录后调控的转录翻译多反馈环路。这个多反馈环路中的核心部分, BMAL1 和 CLOCK 蛋白形成异二聚体, 结合在启动子上游含有 E-box 的 DNA 区域, 激活下游基因的转录, 其中包括 *Per*、*Cry*、*Rev-erb*、*Dbp* 和其他的钟控基因(Ccg)。*Per* 和 *Cry* 基因的蛋白产物 PER 和 CRY 会形成复合物, 回到细胞核抑制 BMAL1/CLOCK 复合物的激活功能。PER 和 CRY 蛋白的降解受到蛋白酶和 E3 连接酶(β -TRCP, FBXL21 和 FBXL3)的调控。这个多反馈环路中的稳定环路中, *Bmal1* 基因受到核受体 REV-ERB 的负调节和 ROR 的正调节。其中, 编码 ROR 的基因 *Ror* 的表达被 DBP 激活。

路构成的生物钟分子模型^[43]。在机体水平上, 哺乳动物的生物钟系统由几乎全身所有细胞的细胞时钟构成。一系列的切除和移植手术的实验揭示在下丘脑中存在一个首要调节时钟(主时钟), 它存在的核团正好位于视神经交叉的上部, 因此被命名为视交叉上核^[44,45]。不同的研究小组将金黄仓鼠(*Mesocricetus*

auratus)的 SCN 去除, 观察到动物活动的昼夜节律变得杂乱无章, 然后将其他仓鼠的 SCN 移植到切除 SCN 的仓鼠脑中, 节律又得到恢复, 并且受体动物表现出的节律周期和 SCN 供体动物一致^[46,47]。SCN 对于节律性的荷尔蒙分泌和活动至关重要, 是多层次结构的生物钟系统的核心指导者。虽然生物钟基

因的表达存在部分的组织特异性,全身所有组织(生殖系统除外)的细胞时钟的基础分子模型是一致的。生物钟基因组织特异性表达的范例之一便是 *Clock* 和 *Npas2*(是 *Clock* 的同源基因),其中 *Clock* 基因的存在对于外周器官的生物钟振荡是必需的^[48,49]。

当前的研究表明,哺乳动物包括人类的生物钟的分子模型是一个包括转录调控和转录后调控的转录翻译多反馈环路(图 1B),较之前已经更加丰富和完善。前面提到的生物钟分子组分,*Clock*、*Bmal1*、*Per1*、*Per2*、*Cry1*、*Cry2*、*Csnk1e*、*Ror-α*、*Ror-β*、*Rev-erba*、*Fbxl3* 和 *Fbxl21* 等基因和它们的蛋白产物相互作用,组成多反馈环,传导信号到基因组,然后进行转录和翻译后调控,产生一个完整的近日节律周期^[8]。这个分子模型的核心是转录翻译负反馈环路,由正调控元件 BMAL1 及 CLOCK 和负调控元件 PER1/2 及 CRY1/2 组成。在细胞水平上,当一天开始的时候,*Per* 和 *Cry* 基因的转录水平很低,然后 BMAL1/CLOCK 复合物激活了 *Per* 和 *Cry* 基因上游的 E-box 元件序列(下文有详细介绍),正向调节基因转录,在前半天这两个基因的转录水平到达峰值^[50]。在细胞质中经过翻译后,PER 和 CRY 蛋白形成同二聚体或者异二聚体,并最终迁移进入细胞核^[51]。在细胞核内,PER 和 CRY 蛋白聚合物抑制 BMAL1/CLOCK 复合物的激活功能,也包括 *Per* 和 *Cry* 基因自身转录的抑制^[52]。由于蛋白的不稳定性和转录活动的抑制,PER 和 CRY 的蛋白水平在下半天达到峰值,然后越来越少。与此同时,由于负调控元件 PER 和 CRY 的减少,BMAL1/CLOCK 复合物的激活功能在夜间又开始慢慢变强。这样,在经历了大约一天的周期后,开始了一个新的转录循环。正调控元件 BMAL1 及 CLOCK 和负调控元件 PER1/2 及 CRY1/2 还参与对钟控基因(clock controlled genes, 指生物钟调控的基因)的昼夜调控,而这些钟控基因在不同的外周组织中表达有所不同^[53-55]。除了这个核心的负反馈环路外,孤核受体(orphan nuclear receptor)家族成员 ROR- α/β 和 REV-ERB α/β 会形成另一个环路,调控重要的正调控元件 *Bmal1* 基因的转录。ROR- α/β 结合到 *Bmal1* 启动子区上游的 ROR 作用元件(RORE 元件,下文有详细介绍)正向激活转录,而 REV-ERB α/β 则会竞争结合到同一位点抑制转录的

发生^[38,39]。这个环路又被称为“稳定环路”,其结果是 *Bmal1* 的转录在一天中的后半天达到峰值,与 *Per*、*Cry* 的转录产物相反(图 1)。

转录后调控在生物钟基因以及钟控基因的近日节律的维持过程中发挥重要作用。转录后修饰控制蛋白的降解,尤其是负调控元件 PER 和 CRY 蛋白的降解对于一个完整的生物钟周期是不可或缺的。有多个转录后修饰会影响 PER 和 CRY 蛋白的稳定性,从而调节它们对 BMAL1/CLOCK 复合物的抑制作用。研究最多的就是它们的磷酸化和去磷酸化过程,一方面磷酸化的过程会影响到 PER 和 CRY 蛋白的细胞定位^[56,57],另一方面磷酸化会介导 PER 和 CRY 蛋白被泛素化降解途径的 E3 连接酶识别,进入降解途径^[35,37]。研究发现,磷酸化 PER 和 CRY 蛋白的激酶包括 CK1 δ 、CK1 ϵ 、CK2、AMPK 和 GSK-3 β ^[34,58-61]。PER 和 CRY 蛋白被泛素化后降解的过程,会加速或者减缓生物钟的运行,调节近日节律的周期。其他的转录后修饰对于生物钟的调节也很重要,例如 RNA 水平的修饰调节,蛋白的糖基化,蛋白的乙酰化等^[62,63]。

下面将重点介绍近日节律产生过程中转录激活和抑制过程的分子机制,包括生物钟调控过程中主要的顺式作用元件,生物钟节律振荡过程中转录水平上的分子相互作用,以及节律过程中的表观遗传修饰等。

3 生物钟调控网络中的顺式作用元件

生物钟基因及其转录翻译产物组成的多反馈环,是哺乳动物生物钟分子调控的基础。因此在转录过程中,不可或缺地会发生对启动子区域的 DNA 顺式作用元件的调节。已有的研究表明,DNA 顺式作用元件,如 E-box、RORE、D-box 等,在生物钟的网络调控和对下游钟控基因的调节过程具有着重要的调控功能(图 2)。

3.1 E-box 元件

自从 1985 年在免疫球蛋白的重链基因的启动子区域,E-box 作为一个调控元件被发现后,人们发现它能够广泛地参与大量基因的表达调控^[64]。这些基因有的几乎没有什么关联,如肌动蛋白基因(*Actin*)、鸟氨酸脱羧酶基因(*Odc1*)、前胸腺素基因

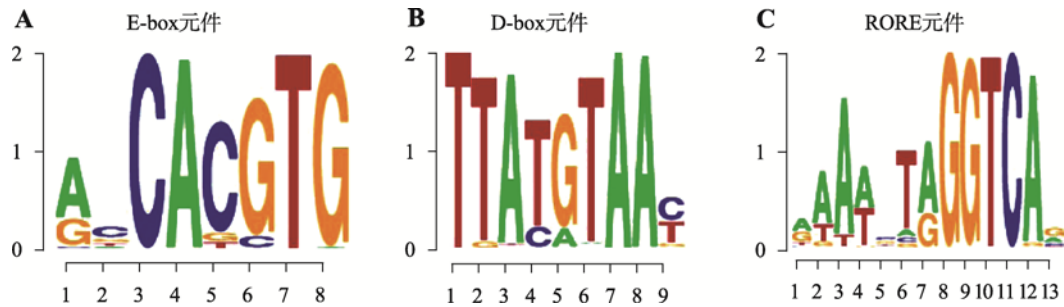


图 2 生物钟调控网络中的顺式作用元件

Fig. 2 Cis-regulating motifs that bind clock transcription factors

A : E-box 元件,包含一段由具有 bHLH(碱性-螺旋-环-螺旋)结构域的转录因子所识别的核心序列:CANNTG,能被生物钟节律振荡中的正调节因子 BMAL1、CLOCK 和 NPAS2 蛋白特异性结合。B : RORE 元件,是由一段(G/A)GGTCA 核心序列加上一段 AT 富集的前导序列构成,能被转录激活因子 ROR、转录抑制因子 REV-ERB α 和 REV-ERB β 特异性结合。C : D-box 元件,是两段 GTAA(C/T)一个正向和一个反向组成的 9~10 个碱基的回文序列,在特定的相位被 DBP、E4BP4、HLF 和 TEF 等富含脯氨酸和酸性氨基酸的碱性亮氨酸(PAR-bZIP)转录因子家族的蛋白特异性结合。

(*Ptma*)、赖氨酸加压素基因(*Avp*)、生长因子- β 基因(*Tgfb*)、乳腺癌基因 2(*Brca2*)、细胞周期蛋白 B1 基因(*Ccnb1*)、血型糖蛋白-B 基因(*Gypb*)以及肌球蛋白基因(*Myo*)等^[65]。E-box 作用元件包含了一段由具有 bHLH(碱性-螺旋-环-螺旋)结构域的转录因子所识别的核心序列 CANNTG。E-box 依赖的调控途径具有复杂的多样性,人们根据已有的 E-box 对可能具有的反式作用因子展开了大量研究。毫无意外,研究人员发现了大量可以识别 E-box 的转录调控因子,而这些转录调控因子均通过 bHLH 结构域与启动子或者其他蛋白相互作用。以其中的一小部分举例,这些结合 E-box 的转录因子包括 MYC、ARNT、MAX、MYOD、MAD、USF、TFE3、TAL1 等,以及生物钟节律振荡中的正调节因子 BMAL1、CLOCK 和 NPAS2^[65]。研究发现,E-box 侧翼的各种序列通过改变 DNA 的构象能够使 E-box 特异性去识别哺乳动物蛋白质组中含有 bHLH 结构域的不同蛋白^[66]。

在果蝇中发现了周期基因 *Period* 后,人们在对 *Period* 的研究分析过程中,很快发现了 E-box 顺式元件参与生物钟基因的转录调控^[67]。之后,在哺乳动物中的研究进一步证实 E-box 与生物钟的调控存在紧密的关联^[68]。作为参与生物钟调控的 E-box 元件,其具有的一个最重要的特征即是能够特异性招募 BMAL1/CLOCK 复合物。更为重要的是,人们发现如果两个 E-box 在间隔 6~7 个碱基重复出现的情况下,BMAL1/CLOCK 复合物对这部分 E-box 具

有更强的亲和力,并且由于这种协同作用,可以使 BMAL1/CLOCK 复合物更容易招募到其他转录元件^[69]。经过比较 *Rev-erba* 基因座上转录因子 BMAL1 的结合数量和 RNA 的表达量,发现并不是所有的 E-box 元件都结合了 BMAL1,这表明 BMAL1 对增强子的结合可能受到一些表观遗传修饰或者其他转录因子的影响。其他的研究发现 BMAL1/CLOCK 复合物结合的靶基因的生物钟表达存在不同的相位^[70],更加表明在对 E-box 的结合的调控过程中存在表观遗传机制参与的高阶调控,或者其他的转录因子,例如 MYC、ARNT、MAX 等参与这个过程^[71]。

虽然一些含有 bHLH 的转录因子和 BMAL1 在对 E-box 的偏好性上有着微小的差异,但是这些转录因子还是可能会占用到 BMAL1 结合位点,特别是由于一些疾病导致这些 bHLH 蛋白表达异常时,错误结合率会有所增加^[72,73]。例如,含有 bHLH 结构域致癌因子 MYC 能够通过结合 E-box 直接激活许多生物钟转录抑制因子的表达,包括了 *Rev-erba* 和 *Rev-erb β* ,从而干扰了 BMAL1 主导的生物钟基因转录本和生物钟蛋白的周期节律振荡和葡萄糖昼夜代谢振荡。经染色质免疫共沉淀(chromatin immunoprecipitation, ChIP)分析发现转录激活因子 USF1 与 Dbp、Per1 和 Per2 的增强子区域结合,证明 USF1 也可以通过结合 E-box 元件进行转录水平的调控。而且通过突变 *Usf1* 启动子导致的 USF1 表达上调可以恢复 CLOCK 突变小鼠昼夜节律相关的表型的实

验,进一步证明 USF1 通过 E-box 参与转录调控^[73]。

3.2 RORE 和 RevDR2 元件

RORE 元件是由一段(G/A)GGTCA 核心序列加上一段 AT 富集的前导序列构成,最早是在参与维甲酸相关的孤核受体家族成员 ROR 激活调控通路中作为高特异的结合位点而被发现的^[74,75]。之后,又发现了在 ROR 激活调控中与其结合的 2 个成员,它们是来自核受体超家族的 REV-ERB α 和 REV-ERB β ^[76,77]。REV-ERB α 既可以单体形式结合在 RORE 上,也能形成同二聚体结合到具有间隔 2 个碱基的 RORE 串联序列(这个作用元件被称为 DevDR2)的基因上,参与对基因的转录抑制调控。起初,人们认为仅有 REV-ERB α 负调控 Bmal1 基因的转录^[39],但是很快就发现仅有 RORE 存在的增强子也能够驱动荧光素酶报告基因(启动子驱动萤火虫荧光素酶报告基因,可用来检测启动子的转录状态)的生物钟振荡表达^[78]。这表明,RORE 作用元件不仅有转录抑制的负调节元件 REV-ERB α ,还存在它的正向调节元件。很快,人们就确认已知的 RORE 正调节因子 ROR 参与对 Bmal1 的转录激活,而且发现 *Ror- α* 的 mRNA 在 SCN 组织中振荡表达,而 *Ror- γ* 的 mRNA 在肝脏组织中振荡表达^[38]。不论是 *Ror* 基因家族或是 *Rev-erb* 基因家族进行全身敲除,还是进行组织特异性敲除,都会导致各种组织中生物钟振荡的紊乱或是振荡的相位迁移。因此,ROR 蛋白和 REV-ERB 蛋白被证实是以昼夜振荡的方式分别与 RORE 元件和 Rev-DR2 元件结合,共同增强了核心生物钟蛋白(BMAL1、NPAS2 和 CRY1 等)的生物钟节律性表达的稳定性的。

作为核受体的家族成员,虽然 ROR 的天然配体仍然存在争议,但似乎固醇可以激活 ROR^[79]。此外,ROR 似乎可以一直保持活性状态(即其不依赖配体就处于激活状态),或者其持续的活性是由于 ROR 一直与天然配体结合。有研究表明,氧合甾醇是高亲和性的 ROR-C 激动剂^[80],而 7 位氧合的甾醇作为 ROR-A 和 ROR-C 的反向激动剂发挥作用^[79]。还有许多其他天然物质结合 ROR 被报道,其中包括全反式视黄酸能够以高亲和力结合 ROR-B 和 ROR-C,但是不与 ROR-A 结合^[81]。脂代谢产物对生物钟的影

响可能是下一步的研究方向。

3.3 D-box 元件

D-box 元件是指各种碱性亮氨酸拉链(bZIP)家族成员结合的顺式元件,是两段 GTAA(C/T)一个正向和一个反向组成的 9~10 个碱基的回文序列。D-box 元件在特定的相位能被 DBP、E4BP4、HLF 和 TEF 等富含脯氨酸和酸性氨基酸的碱性亮氨酸(PAR-bZIP)转录因子家族的蛋白所结合。虽然 BMAL1/CLOCK 通过调控 *Dbp*、*Hlf* 和 *Tef* 启动子区域的 E-box 元件,使它们的表达呈现出节律振荡,并且这 3 个转录激活因子具有很高的序列相似性,在功能上也存在着冗余性。但有趣的是,对于这 3 个基因同时进行全身敲除既不会影响个体行为昼夜节律性的表现,也不会影响生物钟基因的表达^[82]。因而推测,DBP、HLF 和 TEF 更有可能对生物钟下游的输出基因而不是核心基因进行调控。

与 DBP、HLF 和 TEF 这 3 个转录激活因子相比,被 REV-ERB α 通过 RevDR2 元件调控的转录抑制因子 E4BP4 正好在与 DBP 等因子相反的相位进行表达。被 REV-ERB α 抑制的基因通过 D-box 元件,同样成为 E4BP4 的靶标^[83]。因此,E4BP4 被认为调控了一条与 DBP、HLF 和 TEF 调控的截然不同的生物钟下游输出途径,并且它借由 D-box 促进了目标基因转录“开”与“关”两种状态的切换。

4 转录过程中的分子间相互作用

哺乳动物的生物钟基因被发现以后,人们注意到一个事实,就是正调控因子 BMAL1 和 CLOCK 的蛋白上有 PAS(Per-Arnt-Sim)结构域,负调控因子 PER 蛋白上有同样的 PAS 结构域。和果蝇中的 CYC 与 CLK 类似,BMAL1 和 CLOCK(或者 NPAS2)的 PAS 结构域形成异二聚体结构,结合到钟控基因的启动子附近的 E-box 区启动转录^[84,85]。下面将介绍一个完整的生物钟振荡过程中转录水平上的分子相互作用,包括蛋白-蛋白相互作用和转录因子-顺式元件的相互作用。

BMAL1/CLOCK 复合物结合到启动子附近的增强子上之后,除了 CLOCK 本身具有一定的组蛋白乙酰化酶功能外,BMAL1 的 C 端柔性区负责招募

转录共激活因子 CBP/p300, 启动转录^[86]。CBP/p300 不仅可以作为蛋白相互作用的支架招募包含转录聚合酶在内的转录复合物, 还具有乙酰转移酶活性。另外, BMAL1/CLOCK 复合物类似于转录活动的开拓者, 可以使结合的靶基因上的核小体有节律性的脱离染色质, 而染色质这种有节律性的松散(开放转录)可以促进像 HNF4、HNF6、CEBPA、STAT5 以及 REV-ERB 等转录因子装载到 DNA 之上^[87]。这种协同作用的结合方式有效增强了转录起始的速率, 从而提高转录活性。在生物钟的多反馈环通路中, ROR 作为结合在 RORE 元件上的正向激活因子, 对靶基因的调节常常是与其他转录激活或者转录抑制因子的竞争发挥作用。在肝脏中, ROR- α 有节律地结合在 RORE 上, 但是肝脏中 *Rora* 的蛋白表达量很高且几乎没有振荡变化, 那么猜测 ROR- α 节律性地结合在 DNA 上是由于主要在白天表达的 REV-ERB 蛋白与 ROR- α 竞争结合 RORE 元件^[88]。事实证明, REV-ERB 在 RORE 上结合的相位与 ROR- α 相反。当 ROR 结合到 DNA 上, 会招募转录共激活因子来调节靶基因的转录表达。

在转录抑制的过程中, 有报道在 E-box 元件附近, PER 蛋白会形成分子量很大的复合物, 其中包含数十个以上的蛋白, 包括生物钟蛋白 BMAL1、CLOCK、CRY1/2 和 CK1 δ/ϵ , 以及其他的转录抑制蛋白因子如 PSF、SIN3 和 HDAC^[89]。这个转录抑制复合物构成一个 PER-SIN-HDAC 分子轴, 使组蛋白 3 和组蛋白 4 去乙酰化, 从而抑制 BMAL1/CLOCK 复合物的转录活性。另外, 还有研究发现, PER 蛋白可以与 BMAL1/CLOCK 复合物结合, 使 BMAL1 脱离 E-box 元件区域, 从而终结了 BMAL1/CLOCK 复合物的转录活性^[90]。相对于 PER 蛋白的抑制效果, CRY 蛋白的抑制能力更强, 其中 CRY1 的抑制主要发生在生物钟振荡的起始期^[70], 而 CRY2 的抑制是通过和 PER 蛋白的协同作用而发生的。CRY1 和 CBP/p300 竞争结合到 BMAL1 的 C 端柔性区, 从而解除 BMAL1 对 CBP/p300 的招募^[86]。BMAL1 的 C 端片断(末尾的 43 个氨基酸)对于结合 CRY1, 以及维持正常的生物钟振荡周期是必需的^[91]。如果在细胞内将 BMAL1 的 C 端结构域上的 L606/L607 突变为丙氨酸, 那么 BMAL1 不仅与 CRY1 的相互作用

消失, 细胞的生物钟振荡也失去了节律^[86]。

除了蛋白-蛋白相互作用引起生物钟周期的转录抑制外, 转录因子间的相互竞争也会抑制 BMAL1/CLOCK 复合物对 E-box 的结合, 如转录抑制作用因子 DEC1 和 DEC2 以及转录激活因子 USF1 会与 BMAL1/CLOCK 发生竞争^[92]。同样, 由于存在竞争结合顺式作用元件的情况, 不具有节律振荡的转录因子也会影响生物钟基因的表达, 比如 MYC 会与 BMAL1/CLOCK 发生竞争^[72], ARNT 也会发生同样的情况^[71]。因此, 在许多疾病(癌症以及代谢类疾病等)个体中, 生物钟功能紊乱的现象很普遍。

5 转录激活/抑制过程中的表观遗传修饰

在细胞中, DNA 在组蛋白八聚体周围缠绕约 1.65 圈形成核小体, 并进一步凝缩成染色质。转录过程中, 转录复合物需要结合到 DNA 上, 而凝缩的染色质会在空间上阻碍转录复合物的结合, 但是核小体的修饰可以松散或者打开核小体的结构。因此核小体的修饰会影响转录状态, 从而调节基因的表达^[93]。组蛋白 H3K4(组蛋白 H3 上第 4 位的赖氨酸)的甲基化与常染色质(euchromatin)相关, 如 H3K4me1(H3K4 发生 1 个甲基修饰)常位于增强子元件附近, 而 H3K4me3(H3K4 发生 3 个甲基修饰)则出现在活性转录起始位点附近^[94]。H3K9(组蛋白 H3 上第 9 位的赖氨酸)的甲基化促进异染色质(heterochromatin)的形成并抑制转录, 而 H3K9ac(H3K9 发生乙酰化修饰)则是常染色质的标记及与转录状态的激活相关, 并且 H3K27ac 是转录活跃的增强子标记。此外, 组蛋白变体 H2A.Z 会出现在转录起始位点和增强子附近, 从而减弱 DNA 与核小体的结合^[95]。除组蛋白的修饰外, DNA 甲基化等表观遗传学修饰, 不依赖于 DNA 序列的改变而引起的可遗传的基因表达和细胞表型的变化。

越来越多的实验证据表明生物钟振荡过程中, 基因表达与染色质的表观遗传学修饰密切相关(图 3)。例如, 增强子的活性标志物 H3K27ac 和 H3K9ac, 都被证实存在昼夜节律性, 且与生物钟基因的表达有正相关的关系^[95-97]。REV-ERB α 通过将共抑制复合物 NCoR 和/或 SMRT 募集到 RORE 元件来抑制转录。NCoR 和/或 SMRT 复合物的稳定成员 HDAC3

(组蛋白去乙酰化酶)能使 RORE 元件附近的组蛋白节律性的脱乙酰化,从而赋予表观基因组层面上的生物钟基因调控。E-box 附近的 H3K9 呈现出昼夜节律的甲基化修饰,而且小鼠肝脏中 H3K9 的甲基化与乙酰化在相反的相位发生^[89,96]。在 Per1 和 Per2 基因的启动子上最早发现了组蛋白修饰参与昼夜节律调控^[98]。Per1 和 Per2 基因启动子上的组蛋白 H3K9 节律性乙酰化,并且其乙酰化的节律与两个基因的转录活性是一致的^[98]。

图 3 所示,生物钟振荡的转录开始阶段,BMAL1/CLOCK 复合物招募组蛋白乙酰化酶 p300/CBP,使 E-box 附近组蛋白乙酰化,从而使得染色质松散有助于基因的转录激活过程^[96,99]。有报道称 CLOCK 自身具有乙酰转移酶(HAT)活性,可以将组蛋白 H3K9 和 H3K14(组蛋白 H3 的第 14 位赖氨酸)进行乙酰化修饰,且 BMAL1 与 CLOCK 的结合能增强其酶活性^[100]。组蛋白的乙酰化水平由组蛋白去乙酰化酶 HDAC 和组蛋白乙酰转移酶 HAT 调节。长寿因子(sirtuins, SIRT1)是一类参与核心生物钟的 HDAC,其辅因子 NAD⁺在许多生理系统中处于严格的昼夜节律调控下,其表达受 CLOCK、BMAL1 和 PER2 调控^[101]。受到 BMAL1/CLOCK 调控的目的基因 *Nampt* 节律性表达,使得 NAD⁺的水平呈现出节律振荡,使得 SIRT1 的活性呈现节律振荡,而 SIRT1 的活性增高时就会反过来抑制 BMAL1/CLOCK 复合物的转录激活作用^[102,103]。H3K4 甲基化通常与转录激活基因和增强子附近同一核小体中的赖氨酸残基的乙酰化同时发生,在生物钟的遗传机制中也不例外。H3K4me3 是活性基因启动子上的普遍标志,其水平在生物钟基因转录起始位点(transcription start sites, TSSs)附近呈现节律振荡^[104,105]。转移酶 MLL 家族的成员参与 H3K4 节律性的三甲基化^[106~108]。其中 MLL1 与 CLOCK 转录激活域($\Delta 19$ 突变体)相互作用,这对 CLOCK 招募到 DNA 上至关重要。此外,MLL1 的甲基化活性也由乙酰化和去乙酰化调控,其中去乙酰化由 SIRT1 节律性调控。相关的甲基转移酶 MLL3 也表现出节律性振荡,同时也与 H3K4me3 有关,但是 MLL3 并不是凭借 BMAL1 或是 CLOCK 招募至 DNA 上^[106]。CLOCK 和 BMAL1 还与特异性组蛋白脱甲基酶 JARID1A 及 LSD1 相互作用以促进

BMAL1/CLOCK 招募到 Per 启动子上以增强其转录^[109,110]。在 E-box 附近单泛素化的组蛋白 H2B (H2Bub)的水平也出现节律振荡^[111]。在转录激活的后期,DDB1-CUL4 介导的 H2Bub 积累,通过招募 PER-CRY 复合物到与 E-box 结合的 BMAL1/CLOCK 来启动抑制过程^[111]。目前,推测还有几种蛋白可能结合或读取 H2B 单泛素化的核小体,可能存在于 PER-CRY 抑制复合物中,但是迄今为止并没有确定。在激活到抑制的过程中,随着 PER 和 CRY 的积累并转移到细胞核,BMAL1/CLOCK 复合体与 PER-CRY 复合物相互作用。由 CRY 和 PER 介导的转录抑制的主要机制是直接招募包含 HDAC1 和 HDAC2 的 Sin3 复合物和 Mi-2-核小体重塑去乙酰化酶(NuRD)转录共抑制复合物,使附近的组蛋白脱乙酰化^[112]。BMAL1/CLOCK 也能够招募核心蛋白复合体 2(PRC2),使目的基因的组蛋白 H3K27 被三甲基化后抑制该基因的表达^[113,114]。

在抑制过程中,由 SUV3 甲基转移酶介导 E-box 附近的 H3K9 二甲基化。甲基化的 H3K9(在转录激活期间,此赖氨酸被乙酰化),成为异染色质蛋白 1 α (HP1 α)的结合位点,并在生物钟基因转录的抑制阶段介导异染色质节律性的形成^[115,116]。有趣的是,在 CRY-PER 降解后,时钟基因仍然受到很强的抑制作用^[70,88],由此可见,H3K9me 和 HP1 可以作为钟表基因表达的表观遗传学沉默子,直到 BMAL1/CLOCK 重新激活并开始新一轮循环^[89]。该机制还暗示了在 BMAL1/CLOCK 结合之前或之后 H3K9 活跃的昼夜节律去甲基化,但是潜在的机制仍然未知。

DNA 的甲基化由 DNA 甲基转移酶催化,是一种被广泛研究的表观遗传修饰,在基因调控中具有复杂的作用。在哺乳动物中,它主要发生在胞嘧啶-鸟嘌呤(CpG)二核苷酸中的胞嘧啶上,在分化过程中组织特异性的基因组 DNA 甲基化模式对建立细胞识别方面发挥着重要的作用。在小鼠的肝脏和脑中,DNA 甲基转移酶节律性的表达^[117],并且也有证据表明在 LINE-1 元件上呈现出昼夜节律的 DNA 甲基化^[118]。经典的 E-box 元件 CACGTG 中心含有可被甲基化的 CpG 部分,并且 CpG 的甲基化会改变某些 bHLH 蛋白的结合^[119],但是并不清楚 E-box 的甲基化是否会影响 BMAL1/CLOCK 的结合。

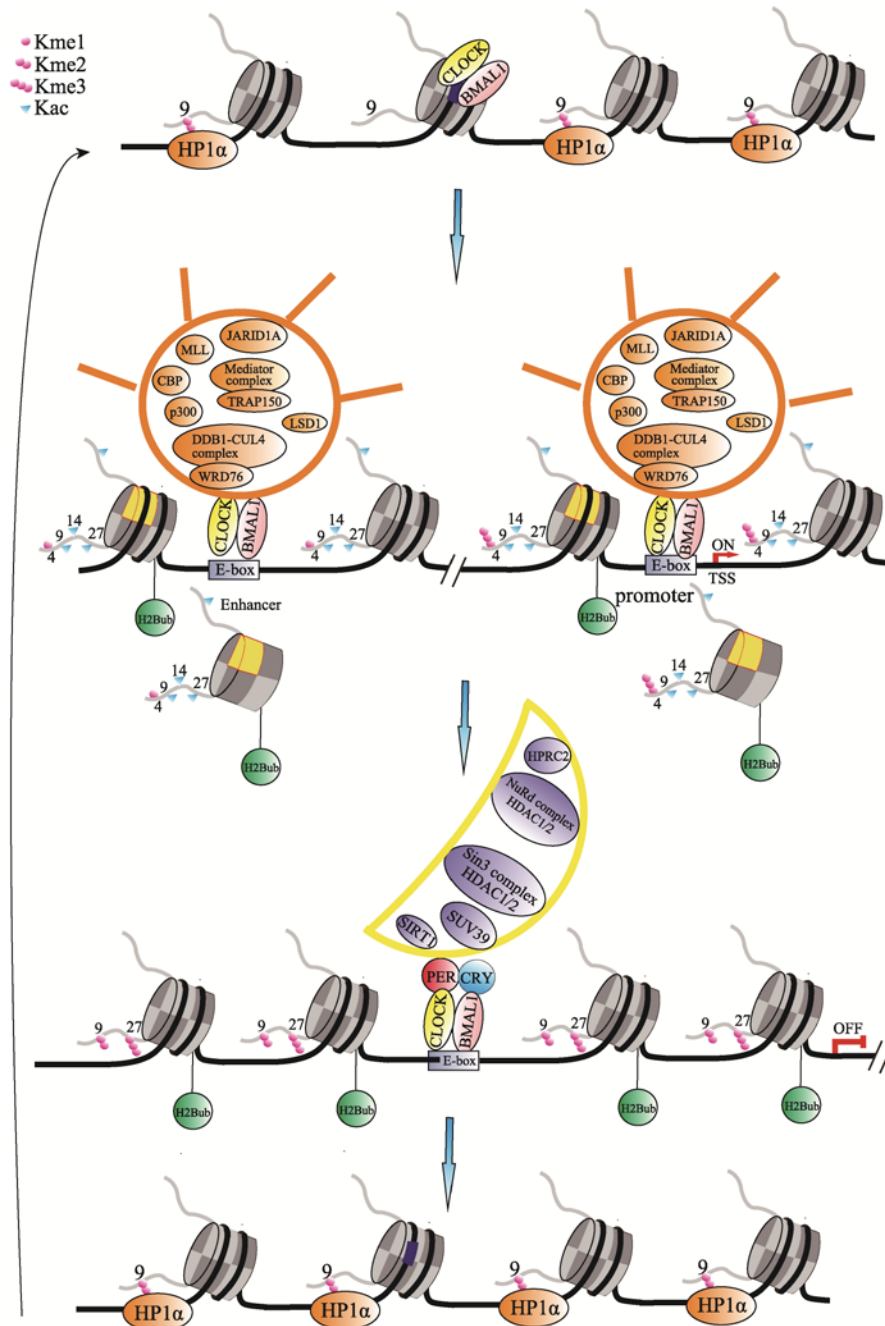


图 3 生物钟振荡周期中的表观遗传修饰

Fig. 3 Epigenetic modification in the cycle of circadian clock

生物钟振荡的转录激活阶段, BMAL1/CLOCK 二聚体与 E-box 结合并招募 CBP 和 p300, 它们的组蛋白乙酰化酶活性能够使附近的组蛋白乙酰化, 包括 H3K9ac、H3K14ac 及 H3K27ac。还有组蛋白甲基转移酶系 MLL 家族, 能够特异性的使 H3K4 甲基化。不同的是, 增强子上的活性标记为 H3K4me1, 而启动子上的活性标记为 H3K4me3, 同时还有 H2A.Z 突变体随着 BMAL1/CLOCK 与 E-box 的结合而替换 H2A。BMAL1 和 CLOCK 还与特异性组蛋白脱甲基酶 JARID1A 及 LSD1 相互作用, BMAL1/CLOCK 与酶相互作用介导的一系列组蛋白修饰, 促使核小体松散离开 DNA, 从而促进转录。在转录激活后期, DDB1-CUL4 介导的 H2Bub 在 E-box 附近积累, 通过招募 PER-CRY 复合体到与 E-box 结合的 BMAL1/CLOCK 来启动抑制过程。BMAL1/CLOCK 也能够招募核心蛋白复合体 2 (PRC2), 使目的基因的组蛋白 H3K27 被三甲基化后抑制该基因的表达。在转录抑制阶段, 由 CRY 和 PER 介导的转录抑制的主要机制是直接招募包含 HDAC1 和 HDAC2 的 Sin3 复合物和 Mi-2-核小体重塑去乙酰化酶 (NuRD) 转录共抑制复合物, 使附近的组蛋白脱乙酰化, 同时还有由 SUV39 甲基转移酶介导 E-box 附近的 H3K9 二甲基化, 而 H3K9me2 为异染色质蛋白 HP1α 的结合位点, 能促使染色质进一步凝缩成为异染色质, 从而使转录沉默, 直到 BMAL1/CLOCK 重新激活并开始新一轮循环。

6 结语与展望

从果蝇的正向遗传学研究发现第一个高等动物生物钟开始, 本文简单介绍了高等动物生物钟基因的历史发现, 并主要从转录翻译的反馈环路角度综述了哺乳动物生物钟的遗传学和表观遗传学研究进展。这些研究进展从分子水平解释了内源性的生物钟的周期性的发生。尽管在其他的模式生物中存在一个不依赖于转录和翻译的反馈环路的基础生物钟^[120], 但转录翻译反馈环路仍然构成了高等生物的生物钟基础。在过去的几十年中, 从正向遗传学的表型鉴定到反向遗传学对分子组分研究的深入发展, 为深刻理解生物钟提供了大量的实验数据和理论。

近年来, 一系列的研究发现表明生物钟紊乱会招致严重的健康后果, 包括心血管疾病、肥胖、精神类疾病。生物钟几乎存在所有的物种内, 能帮助这些物种有效地预测环境, 适应环境。果蝇生物钟基因的克隆与分子机制获得 2017 诺贝尔生理学及医学奖之后, 将会有更多的科研工作者关注和深入生物钟系统的研究, 尤其是生物钟及其调控的周期节律紊乱与人类健康相关课题的研究将会是热点科学问题。因此, 从分子生物钟、遗传学、及表观遗传学多个层次解释生物钟的作用机理, 将会为人们彻底理解生物钟与其他生物学领域的相关性打下扎实基础, 并推动时间生物学和其他学科的交叉研究。

参考文献(References):

- [1] Dunlap JC, Loros JJ, DeCoursey PJ. Chronobiology: Biological Timekeeping. Sunderland: Sinauer Associates, Inc. Publishers, 2004. [DOI]
- [2] Czeisler CA, Duffy JF, Shanahan TL, Brown EN, Mitchell JF, Rimmer DW, Ronda JM, Silva EJ, Allan JS, Emens JS, Dijk DJ, Kronauer RE. Stability, precision, and near-24-hour period of the human circadian pacemaker. *Science*, 1999, 284(5423): 2177–2181. [DOI]
- [3] Duffy JF, Wright KP Jr. Entrainment of the human circadian system by light. *J Biol Rhythms*, 2005, 20(4): 326–338. [DOI]
- [4] Qin XM, Guo JH. Synchronization of the mammalian central and peripheral circadian clocks. *Chin Sci Bull*, 2017, 62(25): 2849–2856.
秦曦明, 郭金虎. 哺乳动物生物钟同步化的研究进展. *科学通报*, 2017, 62(25): 2849–2856. [DOI]
- [5] Ouyang Y, Andersson CR, Kondo T, Golden SS, Johnson CH. Resonating circadian clocks enhance fitness in cyanobacteria. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(15): 8660–8664. [DOI]
- [6] Spoelstra K, Wikelski M, Daan S, Loudon ASI, Hau M. Natural selection against a circadian clock gene mutation in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113(3): 686–691. [DOI]
- [7] Takahashi JS. Molecular components of the circadian clock in mammals. *Diabetes Obes Metab*, 2015, 17(Suppl 1): 6–11. [DOI]
- [8] Takahashi JS. Transcriptional architecture of the mammalian circadian clock. *Nat Rev Genet*, 2017, 18(3): 164–179. [DOI]
- [9] Schibler U, Gotic I, Saini C, Gos P, Curie T, Emmeringer Y, Sinturel F, Gosselin P, Gerber A, Fleury-Olela F, Rando G, Demarque M, Franken P. Clock-Talk: Interactions between central and peripheral circadian oscillators in mammals. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 2015, 80: 223–232. [DOI]
- [10] Buijs RM, Hermes MHLJ, Kalsbeek A. The suprachiasmatic nucleus—paraventricular nucleus interactions: a bridge to the neuroendocrine and autonomic nervous system. *Prog Brain Res*, 1998, 119: 365–382. [DOI]
- [11] Balsalobre A, Damiola F, Schibler U. A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells. *Cell*, 1998, 93(6): 929–937. [DOI]
- [12] An Y, Xu Y. The mechanism of mammalian circadian rhythms. *Chin Bull Life Sci*, 2015, 27(11): 1372–1379. 安扬, 徐璿. 哺乳动物昼夜节律机制研究进展. *生命科学*, 2015, 27(11): 1372–1379. [DOI]
- [13] Pittendrigh CS. Circadian rhythms and the circadian organization of living systems. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 1960, 25: 159–184. [DOI]
- [14] Aschoff J. Exogenous and endogenous components in circadian rhythms. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 1960, 25: 11–28. [DOI]
- [15] Konopka RJ, Benzer S. Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1971, 68(9): 2112–2116. [DOI]
- [16] Reddy P, Zehring WA, Wheeler DA, Pirrotta V, Hadfield C, Hall JC, Rosbash M. Molecular analysis of the *period* locus in *Drosophila melanogaster* and identification of a transcript involved in biological rhythms. *Cell*, 1984, 38(3): 701–710. [DOI]

- [17] Bargiello TA, Jackson FR, Young MW. Restoration of circadian behavioural rhythms by gene transfer in *Drosophila*. *Nature*, 1984, 312(5996): 752–754. [DOI]
- [18] Sehgal A, Price JL, Man B, Young MW. Loss of circadian behavioral rhythms and per RNA oscillations in the *Drosophila* mutant timeless. *Science*, 1994, 263(5153): 1603–1606. [DOI]
- [19] Myers MP, Wager-Smith K, Wesley CS, Young MW, Sehgal A. Positional cloning and sequence analysis of the *Drosophila* clock gene, *timeless*. *Science*, 1995, 270(5237): 805–808. [DOI]
- [20] Gekakis N, Saez L, Delahaye-Brown AM, Myers MP, Sehgal A, Young MW, Weitz CJ. Isolation of *timeless* by PER protein interaction: defective interaction between *timeless* protein and long-period mutant PER^L. *Science*, 1995, 270(5237): 811–815. [DOI]
- [21] Allada R, White NE, So WV, Hall JC, Rosbash M. A mutant *Drosophila* homolog of mammalian *Clock* disrupts circadian rhythms and transcription of *period* and *timeless*. *Cell*, 1998, 93(5): 791–804. [DOI]
- [22] Rutila JE, Suri V, Le M, So WV, Rosbash M, Hall JC. CYCLE is a second bHLH-PAS clock protein essential for circadian rhythmicity and transcription of *Drosophila period* and *timeless*. *Cell*, 1998, 93(5): 805–814. [DOI]
- [23] Price JL, Blau J, Rothenfluh A, Abodeely M, Kloss B, Young MW. *double-time* is a novel *Drosophila* clock gene that regulates PERIOD protein accumulation. *Cell*, 1998, 94(1): 83–95. [DOI]
- [24] Vitaterna MH, King DP, Chang AM, Kornhauser JM, Lowrey PL, McDonald JD, Dove WF, Pinto LH, Turek FW, Takahashi JS. Mutagenesis and mapping of a mouse gene, *Clock*, essential for circadian behavior. *Science*, 1994, 264(5159): 719–725. [DOI]
- [25] Gekakis N, Staknis D, Nguyen HB, Davis FC, Wilsbacher LD, King DP, Takahashi JS, Weitz CJ. Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism. *Science*, 1998, 280(5369): 1564–1569. [DOI]
- [26] Bunger MK, Wilsbacher LD, Moran SM, Clendenen C, Radcliffe LA, Hogenesch JB, Simon MC, Takahashi JS, Bradfield CA. *Mop3* is an essential component of the master circadian pacemaker in mammals. *Cell*, 2000, 103(7): 1009–1017. [DOI]
- [27] Tei H, Okamura H, Shigeyoshi Y, Fukuhara C, Ozawa R, Hirose M, Sakaki Y. Circadian oscillation of a mammalian homologue of the *Drosophila period* gene. *Nature*, 1997, 389(6650): 512–516. [DOI]
- [28] Sun ZS, Albrecht U, Zhuchenko O, Bailey J, Eichele G, Lee CC. *RIGUI*, a putative mammalian ortholog of the *Drosophila period* gene. *Cell*, 1997, 90(6): 1003–1011. [DOI]
- [29] Albrecht U, Sun ZS, Eichele G, Lee CC. A differential response of two putative mammalian circadian regulators, *mper1* and *mper2*, to light. *Cell*, 1997, 91(7): 1055–1064. [DOI]
- [30] Shearman LP, Zylka MJ, Weaver DR, Kolakowski LF Jr, Reppert SM. Two *period* homologs: circadian expression and photic regulation in the suprachiasmatic nuclei. *Neuron*, 1997, 19(6): 1261–1269. [DOI]
- [31] Takumi T, Taguchi K, Miyake S, Sakakida Y, Takashima N, Matsubara C, Maebayashi Y, Okumura K, Takekida S, Yamamoto S, Yagita K, Yan L, Young MW, Okamura H. A light-independent oscillatory gene *mPer3* in mouse SCN and OVLT. *EMBO J*, 1998, 17(16): 4753–4759. [DOI]
- [32] van der Horst GT, Muijtjens M, Kobayashi K, Takano R, Kanno S, Takao M, de Wit J, Verkerk A, Eker AP, van Leenen D, Buijs R, Bootsma D, Hoeijmakers JH, Yasui A. Mammalian Cry1 and Cry2 are essential for maintenance of circadian rhythms. *Nature*, 1999, 398(6728): 627–630. [DOI]
- [33] Vitaterna MH, Selby CP, Todo T, Niwa H, Thompson C, Fruechte EM, Hitomi K, Thresher RJ, Ishikawa T, Miyazaki J, Takahashi JS, Sancar A. Differential regulation of mammalian *period* genes and circadian rhythmicity by cryptochromes 1 and 2. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(21): 12114–12119. [DOI]
- [34] Lowrey PL, Shimomura K, Antoch MP, Yamazaki S, Zemenides PD, Ralph MR, Menaker M, Takahashi JS. Positional syntenic cloning and functional characterization of the mammalian circadian mutation *tau*. *Science*, 2000, 288(5465): 483–491. [DOI]
- [35] Siepka SM, Yoo SH, Park J, Song WM, Kumar V, Hu YN, Lee C, Takahashi JS. Circadian mutant *Overtime* reveals F-box protein FBXL3 regulation of *Cryptochrome* and *Period* gene expression. *Cell*, 2007, 129(5): 1011–1023. [DOI]
- [36] Hirano A, Yumimoto K, Tsunematsu R, Matsumoto M, Oyama M, Kozuka-Hata H, Nakagawa T, Lanjakornsi-ripan D, Nakayama KI, Fukada Y. FBXL21 regulates oscillation of the circadian clock through ubiquitination and stabilization of cryptochromes. *Cell*, 2013, 152(5): 1106–1118. [DOI]
- [37] Shirogane T, Jin JP, Ang XL, Harper JW. 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): 26863–26872. [DOI]
- [38] Sato TK, Panda S, Miraglia LJ, Reyes TM, Rudic RD, McNamara P, Naik KA, FitzGerald GA, Kay SA, Hogenesch JB. A functional genomics strategy reveals Rora as a component of the mammalian circadian clock. *Neuron*, 2004, 43(4): 527–537. [DOI]
- [39] Preitner N, Damiola F, Lopez-Molina L, Zakany J, Duboule D, Albrecht U, Schibler U. The orphan nuclear receptor REV-ERBa controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. *Cell*, 2002, 110(2): 251–260. [DOI]
- [40] Yamaguchi S, Mitsui S, Yan L, Yagita K, Miyake S, Okamura H. Role of DBP in the circadian oscillatory mechanism. *Mol Cell Biol*, 2000, 20(13): 4773–4781. [DOI]
- [41] Oishi K, Miyazaki K, Kadota K, Kikuno R, Nagase T, Atsumi GI, Ohkura N, Azama T, Mesaki M, Yukimasa S, Kobayashi H, Iitaka C, Umehara T, Horikoshi M, Kudo T, Shimizu Y, Yano M, Monden M, Machida K, Matsuda J, Horie S, Todo T, Ishida N. Genome-wide expression analysis of mouse liver reveals CLOCK-regulated circadian output genes. *J Biol Chem*, 2003, 278(42): 41519–41527. [DOI]
- [42] Hardin PE, Hall JC, Rosbash M. Feedback of the *Drosophila* period gene product on circadian cycling of its messenger RNA levels. *Nature*, 1990, 343(6258): 536–540. [DOI]
- [43] Panda S, Antoch MP, Miller BH, Su AI, Schook AB, Straume M, Schultz PG, Kay SA, Takahashi JS, Hogenesch JB. Coordinated transcription of key pathways in the mouse by the circadian clock. *Cell*, 2002, 109(3): 307–320. [DOI]
- [44] Mosko SS, Moore RY. Neonatal suprachiasmatic nucleus lesions: effects on the development of circadian rhythms in the rat. *Brain Res*, 1979, 164(1–2): 17–38. [DOI]
- [45] Kafka MS, Marangos PJ, Moore RY. Suprachiasmatic nucleus ablation abolishes circadian rhythms in rat brain neurotransmitter receptors. *Brain Res*, 1985, 327(1–2): 344–347. [DOI]
- [46] Ralph MR, Foster RG, Davis FC, Menaker M. Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science*, 1990, 247(4945): 975–978. [DOI]
- [47] Sujino M, Masumoto KH, Yamaguchi S, Van Der Horst GTJ, Okamura H, Inouye SIT. Suprachiasmatic nucleus grafts restore circadian behavioral rhythms of genetically arrhythmic mice. *Curr Biol*, 2003, 13(8): 664–668. [DOI]
- [48] DeBruyne JP, Weaver DR, Reppert SM. CLOCK and NPAS2 have overlapping roles in the suprachiasmatic circadian clock. *Nat Neurosci*, 2007, 10(5): 543–545. [DOI]
- [49] DeBruyne JP, Weaver DR, Reppert SM. Peripheral circadian oscillators require CLOCK. *Curr Biol*, 2007, 17(14): R538–R539. [DOI]
- [50] Kondratov RV, Chernov MV, Kondratova AA, Gorbacheva VY, Gudkov AV, Antoch MP. BMAL1-dependent circadian oscillation of nuclear CLOCK: posttranslational events induced by dimerization of transcriptional activators of the mammalian clock system. *Genes Dev*, 2003, 17(15): 1921–1932. [DOI]
- [51] Lee C, Etchegaray JP, Cagampang FRA, Loudon ASI, Reppert SM. Posttranslational mechanisms regulate the mammalian circadian clock. *Cell*, 2001, 107(7): 855–867. [DOI]
- [52] Shearman LP, Sriram S, Weaver DR, Maywood ES, Chaves I, Zheng BH, Kume K, Lee CC, Van Der Horst GTJ, Hastings MH, Reppert SM. Interacting molecular loops in the mammalian circadian clock. *Science*, 2000, 288(5468): 1013–1019. [DOI]
- [53] Marcheva B, Ramsey KM, Buhr ED, Kobayashi Y, Su H, Ko CH, Ivanova G, Omura C, Mo S, Vitaterna MH, Lopez JP, Philipson LH, Bradfield CA, Crosby SD, JeBailey L, Wang XZ, Takahashi JS, Bass J. Disruption of the clock components CLOCK and BMAL1 leads to hypoinsulinaemia and diabetes. *Nature*, 2010, 466(7306): 627–631. [DOI]
- [54] Janich P, Pascual G, Merlos-Suárez A, Batlle E, Ripperger J, Albrecht U, Cheng HYM, Obrietan K, Di Croce L, Benitah SA. The circadian molecular clock creates epidermal stem cell heterogeneity. *Nature*, 2011, 480(7376): 209–214. [DOI]
- [55] Nam D, Yechoor VK, Ma K. Molecular clock integration of brown adipose tissue formation and function. *Adipocyte*, 2015, 5(2): 243–250. [DOI]
- [56] Vielhaber E, Eide E, Rivers A, Gao ZH, Virshup DM. Nuclear entry of the circadian regulator mPER1 is controlled by mammalian casein kinase I ϵ . *Mol Cell Biol*, 2000, 20(13): 4888–4899. [DOI]
- [57] Yagita K, Tamanini F, Yasuda M, Hoeijmakers JHJ, Van Der Horst GTJ, Okamura H. Nucleocytoplasmic shuttling and mCRY-dependent inhibition of ubiquitylation

- of the mPER2 clock protein. *EMBO J*, 2002, 21(6): 1301–1314. [DOI]
- [58] Yang Y, Xu TT, Zhang YF, Qin XM. Molecular basis for the regulation of the circadian clock kinases CK1 δ and CK1 ϵ . *Cell Signal*, 2017, 31: 58–65. [DOI]
- [59] Tamaru T, Hirayama J, Isojima Y, Nagai K, Norioka S, Takamatsu K, Sassone-Corsi P. CK2 α phosphorylates BMAL1 to regulate the mammalian clock. *Nat Struct Mol Biol*, 2009, 16(4): 446–448. [DOI]
- [60] Lamia KA, Sachdeva UM, DiTacchio L, Williams EC, Alvarez JG, Egan DF, Vasquez DS, Juguilon H, Panda S, Shaw RJ, Thompson CB, Evans RM. AMPK regulates the circadian clock by cryptochrome phosphorylation and degradation. *Science*, 2009, 326(5951): 437–440. [DOI]
- [61] Sahar S, Zocchi L, Kinoshita C, Borrelli E, Sassone-Corsi P. Regulation of BMAL1 protein stability and circadian function by GSK3 β -mediated phosphorylation. *PLoS One*, 2010, 5(1): e8561. [DOI]
- [62] Yu B, Wu T, Ni YH, Zhou JL, Zhuge F, Sun L, Fu ZW. Posttranscriptional and posttranslational regulation of circadian clock. *Chin Bull Life Sci*, 2011, 23(5): 470–476. 俞波, 吴涛, 倪银华, 周静露, 诸葛芬, 孙璐, 傅正伟. 生物钟的转录后与翻译后水平调控进展. *生命科学*, 2011, 23(5): 470–476. [DOI]
- [63] Kim EY, Jeong EH, Park S, Jeong HJ, Edery I, Cho JW. A role for O-GlcNAcylation in setting circadian clock speed. *Genes Dev*, 2012, 26(5): 490–502. [DOI]
- [64] Church GM, Ephrussi A, Gilbert W, Tonegawa S. Cell-type-specific contacts to immunoglobulin enhancers in nuclei. *Nature*, 1985, 313(6005): 798–801. [DOI]
- [65] Muñoz E, Brewer M, Baler R. Circadian transcription thinking outside the E-Box. *J Biol Chem*, 2002, 277(39): 36009–36017. [DOI]
- [66] Gordân R, Shen N, Dror I, Zhou TY, Horton J, Rohs R, Bulyk ML. Genomic regions flanking E-box binding sites influence DNA binding specificity of bHLH transcription factors through DNA shape. *Cell Rep*, 2013, 3(4): 1093–1104. [DOI]
- [67] Hao H, Allen DL, Hardin PE. A circadian enhancer mediates PER-dependent mRNA cycling in *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Biol*, 1997, 17(7): 3687–3693. [DOI]
- [68] Hogenesch JB, Gu YZ, Jain S, Bradfield CA. The basic-helix-loop-helix-PAS orphan MOP3 forms transcriptionally active complexes with circadian and hypoxia factors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(10): 5474–5479. [DOI]
- [69] Rey G, Cesbron F, Rougemont J, Reinke H, Brunner M, Naef F. Genome-wide and phase-specific DNA-binding rhythms of BMAL1 control circadian output functions in mouse liver. *PLoS Biol*, 2011, 9(2): e1000595. [DOI]
- [70] Koike N, Yoo SH, Huang HC, Kumar V, Lee C, Kim TK, Takahashi JS. Transcriptional architecture and chromatin landscape of the core circadian clock in mammals. *Science*, 2012, 338(6105): 349–354. [DOI]
- [71] Wu YL, Tang DB, Liu N, Xiong W, Huang HW, Li Y, Ma ZX, Zhao HJ, Chen PH, Qi XB, Zhang EE. Reciprocal regulation between the circadian clock and hypoxia signaling at the genome level in mammals. *Cell Metab*, 2017, 25(1): 73–85. [DOI]
- [72] Altman BJ, Hsieh AL, Sengupta A, Krishnanaiyah SY, Stine ZE, Walton ZE, Gouw AM, Venkataraman A, Li B, Goraksha-Hicks P, Diskin SJ, Bellovin DI, Simon MC, Rathmell JC, Lazar MA, Maris JM, Felsner DW, Hogenesch JB, Weljie AM, Dang CV. MYC disrupts the circadian clock and metabolism in cancer cells. *Cell Metab*, 2015, 22(6): 1009–1019. [DOI]
- [73] Shimomura K, Kumar V, Koike N, Kim TK, Chong J, Buhr ED, Whiteley AR, Low SS, Omura C, Fenner D, Owens JR, Richards M, Yoo SH, Hong HK, Vitaterna MH, Bass J, Pletcher MT, Wiltshire T, Hogenesch J, Lowrey PL, Takahashi JS. *Usl1*, a suppressor of the circadian *Clock* mutant, reveals the nature of the DNA-binding of the CLOCK: BMAL1 complex in mice. *eLife*, 2013, 2: e00426. [DOI]
- [74] Giguère V, Tini M, Flock G, Ong E, Evans RM, Otulowski G. Isoform-specific amino-terminal domains dictate DNA-binding properties of ROR α , a novel family of orphan hormone nuclear receptors. *Genes Dev*, 1994, 8(5): 538–553. [DOI]
- [75] Giguère V, McBroom LD, Flock G. Determinants of target gene specificity for ROR α 1: monomeric DNA binding by an orphan nuclear receptor. *Mol Cell Biol*, 1995, 15(5): 2517–2526. [DOI]
- [76] Harding HP, Lazar MA. The orphan receptor Rev-ErbA α activates transcription via a novel response element. *Mol Cell Biol*, 1993, 13(5): 3113–3121. [DOI]
- [77] Baes M, Gulick T, Choi HS, Martinoli MG, Simha D, Moore DD. A new orphan member of the nuclear hormone receptor superfamily that interacts with a subset of retinoic acid response elements. *Mol Cell Biol*, 1994, 14(3): 1544–1552. [DOI]
- [78] Ueda HR, Chen WB, Adachi A, Wakamatsu H, Hayashi

- S, Takasugi T, Nagano M, Nakahama K, Suzuki Y, Sugano S, Iino M, Shigeyoshi Y, Hashimoto S. A transcription factor response element for gene expression during circadian night. *Nature*, 2002, 418(6897): 534–539. [DOI]
- [79] Solt LA, Burris TP. Action of RORs and their ligands in (patho)physiology. *Trends Endocrinol Metab*, 2012, 23(12): 619–627. [DOI]
- [80] Zhang Y, Luo XY, Wu DH, Xu Y. ROR nuclear receptors: structures, related diseases, and drug discovery. *Acta Pharmacol Sin*, 2015, 36(1): 71–87. [DOI]
- [81] Stehlin-Gaon C, Willmann D, Zeyer D, Sanglier S, Van Dorsselaer A, Renaud JP, Moras D, Schüle R. All-*trans* retinoic acid is a ligand for the orphan nuclear receptor ROR β . *Nat Struct Biol*, 2003, 10(10): 820–825. [DOI]
- [82] Gachon F. Physiological function of PARbZip circadian clock-controlled transcription factors. *Ann Med*, 2007, 39(8): 562–571. [DOI]
- [83] Fang B, Everett LJ, Jager J, Briggs E, Armour SM, Feng D, Roy A, Gerhart-Hines Z, Sun Z, Lazar MA. Circadian enhancers coordinate multiple phases of rhythmic gene transcription *in vivo*. *Cell*, 2014, 159(5): 1140–1152. [DOI]
- [84] Huang ZJ, Edery I, Rosbash M. PAS is a dimerization domain common to *Drosophila* period and several transcription factors. *Nature*, 1993, 364(6434): 259–262. [DOI]
- [85] Huang N, Chelliah Y, Shan YL, Taylor CA, Yoo SH, Partch C, Green CB, Zhang H, Takahashi JS. Crystal structure of the heterodimeric CLOCK: BMAL1 transcriptional activator complex. *Science*, 2012, 337(6091): 189–194. [DOI]
- [86] Xu HY, Gustafson CL, Sammons PJ, Khan SK, Parsley NC, Ramanathan C, Lee HW, Liu AC, Partch CL. Cryptochrome 1 regulates the circadian clock through dynamic interactions with the BMAL1 C terminus. *Nat Struct Mol Biol*, 2015, 22(6): 476–484. [DOI]
- [87] Menet JS, Pescatore S, Rosbash M. CLOCK: BMAL1 is a pioneer-like transcription factor. *Genes Dev*, 2014, 28(1): 8–13. [DOI]
- [88] Zhang YX, Fang B, Emmett MJ, Damle M, Sun Z, Feng D, Armour SM, Remsberg JR, Jager J, Soccio RE, Steger DJ, Lazar MA. Discrete functions of nuclear receptor Rev-erba couple metabolism to the clock. *Science*, 2015, 348(6242): 1488–1492. [DOI]
- [89] Duong HA, Weitz CJ. Temporal orchestration of repressive chromatin modifiers by circadian clock Period complexes. *Nat Struct Mol Biol*, 2014, 21(2): 126–132. [DOI]
- [90] Ye R, Selby CP, Ozturk N, Annayev Y, Sancar A. Biochemical analysis of the canonical model for the mammalian circadian clock. *J Biol Chem*, 2011, 286(29): 25891–25902. [DOI]
- [91] Kiyohara YB, Tagao S, Tamanini F, Morita A, Sugisawa Y, Yasuda M, Yamanaka I, Ueda HR, Van Der Horst GTJ, Kondo T, Yagita K. The BMAL1 C terminus regulates the circadian transcription feedback loop. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(26): 10074–10079. [DOI]
- [92] Honma S, Kawamoto T, Takagi Y, Fujimoto K, Sato F, Noshiro M, Kato Y, Honma K. *Dec1* and *Dec2* are regulators of the mammalian molecular clock. *Nature*, 2002, 419(6909): 841–844. [DOI]
- [93] Jenuwein T, Allis CD. Translating the histone code. *Science*, 2001, 293(5532): 1074–1080. [DOI]
- [94] Soshnev AA, Josefowicz SZ, Allis CD. Greater than the sum of parts: complexity of the dynamic epigenome. *Mol Cell*, 2016, 62(5): 681–694. [DOI]
- [95] Vollmers C, Schmitz RJ, Nathanson J, Yeo G, Ecker JR, Panda S. Circadian oscillations of protein-coding and regulatory RNAs in a highly dynamic mammalian liver epigenome. *Cell Metab*, 2012, 16(6): 833–845. [DOI]
- [96] Ripperger JA, Schibler U. Rhythmic CLOCK-BMAL1 binding to multiple E-box motifs drives circadian *Dbp* transcription and chromatin transitions. *Nat Genet*, 2006, 38(3): 369–374. [DOI]
- [97] Feng D, Liu T, Sun Z, Bugge A, Mullican SE, Alenghat T, Liu XS, Lazar MA. A circadian rhythm orchestrated by histone deacetylase 3 controls hepatic lipid metabolism. *Science*, 2011, 331(6022): 1315–1319. [DOI]
- [98] Etchegaray JP, Lee C, Wade PA, Reppert SM. Rhythmic histone acetylation underlies transcription in the mammalian circadian clock. *Nature*, 2003, 421(6919): 177–182. [DOI]
- [99] Lee Y, Lee J, Kwon I, Nakajima Y, Ohmiya Y, Son GH, Lee KH, Kim K. Coactivation of the CLOCK-BMAL1 complex by CBP mediates resetting of the circadian clock. *J Cell Sci*, 2010, 123(Pt 20): 3547–3557. [DOI]
- [100] Nakahata Y, Kaluzova M, Grimaldi B, Sahar S, Hirayama J, Chen D, Guarente LP, Sassone-Corsi P. The NAD⁺-dependent deacetylase SIRT1 modulates CLOCK-mediated chromatin remodeling and circadian control. *Cell*, 2008, 134(2): 329–340. [DOI]
- [101] Asher G, Gatfield D, Stratmann M, Reinke H, Dibner C, Kreppel F, Mostoslavsky R, Alt FW, Schibler U. SIRT1

- regulates circadian clock gene expression through PER2 deacetylation. *Cell*, 2008, 134(2): 317–328. [DOI]
- [102] Nakahata Y, Sahar S, Astarita G, Kaluzova M, Sassone-Corsi P. Circadian control of the NAD⁺ salvage pathway by CLOCK-SIRT1. *Science*, 2009, 324(5927): 654–657. [DOI]
- [103] Ramsey KM, Yoshino J, Brace CS, Abrassart D, Kobayashi Y, Marcheva B, Hong HK, Chong JLC, Buhr ED, Lee C, Takahashi JS, Imai SI, Bass J. Circadian clock feedback cycle through NAMPT-mediated NAD⁺ biosynthesis. *Science*, 2009, 324(5927): 651–654. [DOI]
- [104] Le Martelot G, Canella D, Symul L, Migliavacca E, Giarlardi F, Liechti R, Martin O, Harshman K, Delorenzi M, Desvergne B, Herr W, Deplancke B, Schibler U, Rougemont J, Guex N, Hernandez N, Naef F, CycloX Consortium. Genome-wide RNA polymerase II profiles and RNA accumulation reveal kinetics of transcription and associated epigenetic changes during diurnal cycles. *PLoS Biol*, 2012, 10(11): e1001442. [DOI]
- [105] Malapeira J, Khaitova LC, Mas P. Ordered changes in histone modifications at the core of the Arabidopsis circadian clock. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(52): 21540–21545. [DOI]
- [106] Valekunja UK, Edgar RS, Oklejewicz M, Van Der Horst GTJ, O'Neill JS, Tamanini F, Turner DJ, Reddy AB. Histone methyltransferase MLL3 contributes to genome-scale circadian transcription. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(4): 1554–1559. [DOI]
- [107] Katada S, Sassone-Corsi P. The histone methyltransferase MLL1 permits the oscillation of circadian gene expression. *Nat Struct Mol Biol*, 2010, 17(12): 1414–1421. [DOI]
- [108] Kim DH, Rhee JC, Yeo S, Shen RK, Lee SK, Lee JW, Lee S. Crucial roles of mixed-lineage leukemia 3 and 4 as epigenetic switches of the hepatic circadian clock controlling bile acid homeostasis in mice. *Hepatology*, 2015, 61(3): 1012–1023. [DOI]
- [109] DiTacchio L, Le HD, Vollmers C, Hatori M, Witcher M, Secombe J, Panda S. Histone lysine demethylase JARID1a activates CLOCK-BMAL1 and influences the circadian clock. *Science*, 2011, 333(6051): 1881–1885. [DOI]
- [110] Nam HJ, Boo K, Kim D, Han DH, Choe HK, Kim CR, Sun W, Kim H, Kim K, Lee H, Metzger E, Schuele R, Yoo SH, Takahashi JS, Cho S, Son GH, Baek SH. Phosphorylation of LSD1 by PKC α is crucial for circadian rhythmicity and phase resetting. *Mol Cell*, 2014, 53(5): 791–805. [DOI]
- [111] Tamayo AG, Duong HA, Robles MS, Mann M, Weitz CJ. Histone monoubiquitination by Clock-BMAL1 complex marks *Per1* and *Per2* genes for circadian feedback. *Nat Struct Mol Biol*, 2015, 22(10): 759–766. [DOI]
- [112] Kim JY, Kwak PB, Weitz CJ. Specificity in circadian clock feedback from targeted reconstitution of the NuRD corepressor. *Mol Cell*, 2014, 56(6): 738–748. [DOI]
- [113] Etchegaray JP, Yang XM, DeBruyne JP, Peters AHFM, Weaver DR, Jenuwein T, Reppert SM. The polycomb group protein EZH2 is required for mammalian circadian clock function. *J Biol Chem*, 2006, 281(30): 21209–21215. [DOI]
- [114] Nguyen KD, Fentress SJ, Qiu YF, Yun KR, Cox JS, Chawla A. Circadian gene *Bmal1* regulates diurnal oscillations of Ly6C^{hi} inflammatory monocytes. *Science*, 2013, 341(6153): 1483–1488. [DOI]
- [115] Bannister AJ, Zegerman P, Partridge JF, Miska EA, Thomas JO, Allshire RC, Kouzarides T. Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature*, 2001, 410(6824): 120–124. [DOI]
- [116] Lachner M, O'Carroll D, Rea S, Mechtler K, Jenuwein T. Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature*, 2001, 410(6824): 116–120. [DOI]
- [117] Maekawa F, Shimba S, Takumi S, Sano T, Suzuki T, Bao JH, Ohwada M, Ehara T, Ogawa Y, Nohara K. Diurnal expression of *Dnmt3b* mRNA in mouse liver is regulated by feeding and hepatic clockwork. *Epigenetics*, 2012, 7(9): 1046–1056. [DOI]
- [118] Xia L, Ma SH, Zhang Y, Wang T, Zhou MY, Wang ZQ, Zhang JF. Daily variation in global and local DNA methylation in mouse livers. *PLoS One*, 2015, 10(2): e0118101. [DOI]
- [119] Hu SH, Wan J, Su YJ, Song QF, Zeng YX, Nguyen HN, Shin J, Cox E, Rho HS, Woodard C, Xia SL, Liu S, Lyu HB, Ming GL, Wade H, Song HJ, Qian J, Zhu H. DNA methylation presents distinct binding sites for human transcription factors. *eLife*, 2013, 2: e00726. [DOI]
- [120] Nakajima M, Imai K, Ito H, Nishiwaki T, Murayama Y, Iwasaki H, Oyama T, Kondo T. Reconstitution of circadian oscillation of cyanobacterial KaiC phosphorylation in vitro. *Science*, 2005, 308(5720): 414–415. [DOI]