

13 遗传筛选

研究生物学不仅需要重视思考概念，而且需要重视研究途径。

面临的生物学问题或过程，需要选择合适的方法或方法的组合，形成有效的途径，提出解决问题的方案，剖析生物学机理。生物学的研究方法有来自生物学本身（如遗传、生物检定），也有来自物理（如电生理、光学成像、磁学技术）、更多来自化学（如化学分析），还有计算和数学等等。

纵观过去和未来一百年，发现新的分子、发现分子新的功能，围绕分子理解生物学、发明应用将长期是生命科学的重要研究核心。以分子为核心的研究，除了猜想某个特定的分子，更好的途径是在不知道特定分子的情况下，通过筛选或者分析，找到其重要功能的分子，这样可以得到出乎意料的发现，也可能通过同样方法的反复发现，找到功能相关的分子，甚至形成理解。

这样的方法有四种：本章的遗传筛选；遗传分析，特别有前景的是人类遗传分析，在家系或大队列进行表型和基因型的相关性分析，找到新的基因；第 15 章的分子生物学筛选；第 16 章的生物化学分离纯化。

遗传学除了作为科学之外，也是研究生物学的强有力方法。本章专注讨论遗传筛选为核心研究途径。筛选可以有多种，在不同水平（如系统、环路、细胞、分子）、或不同技术进行筛选。最基本的遗传筛选是通过基因突变，找到参与生物学过程的基因，根据基因产物作用的原理，结合人工操纵基因和操纵表达基因的细胞，推论生物学过程的分子和细胞机理。

遗传学另外一个方法：遗传分析，也非常重要。特别有前景的是人类遗传分析，在家系或大队列进行表型和基因型的相关性分析，找到新的基因。这一方法将对生物学研究有越来越重要的贡献。

13.1 行为研究的范式

行为是可以被其他动物和人类研究者所观察到的动物外在动作表现。

行为研究的范式在 1960 年以前比较简单，以描述现象为主，而机理研究不多。俄国科学家巴甫洛夫 (Ivan Pavlov, 1849-1936) 发现条件反射。例如：狗见到食物会分泌唾液，而铃声不会诱导狗分泌唾液，但在铃声与食物多次同时出现后，单独出现铃声也可诱导狗分泌唾液，说明声音刺激与食物刺激之间可以建立联系。巴甫洛夫称食物为无条件刺激，铃声为条件刺激，对条件刺激的反应为条件反射。这种简单的行为学实验是 20 世纪初行为研究的重要进展。

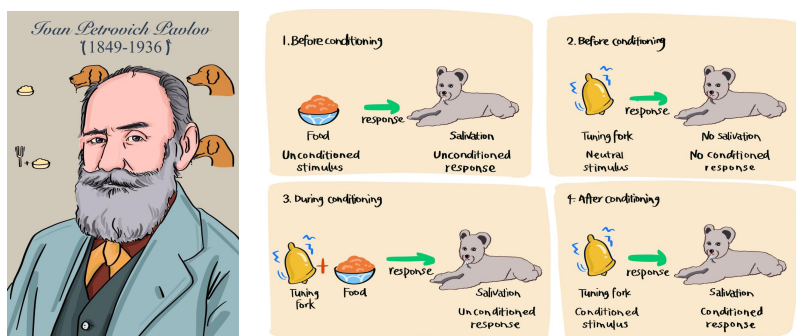


图 13-1 巴甫洛夫与条件反射

行为既与生理学和神经生物学相关，也是心理学的内容。行为主义开创者 John B Watson (1878-1958) 于 1913 年发表《行为主义者宣言》，提出人和动物的行为由后天经历所塑造。他是美国心理学家和教育家杜威的研究生，后任教于霍普金斯大学。1920 年他和助手 11 个月的男孩 Albert 做实验，试图说明只需后天就能刺激建立恐惧的情绪反应。Albert 本不怕的有毛的动物如大鼠、兔、狗，但听见铁棒噪音会哭。如果在 Albert 摸到大鼠时让他同时听到铁棒噪音，经过几次训练，Albert 不敢摸鼠、甚至哭，而且也怕其他有毛动物（兔、狗）(Watson and Rayner, 1920)。

美国心理学家 B. F. Skinner (1904-1990) 推广行为主义。他设计了一种新的实验：操作性条件反射。巴甫洛夫的条件反射只看动物的被动的生理反应（分泌唾液）、不看其主动行为（动作）。Skinner 用鸽子做实验，在鸽笼装两个钮，鸽子碰一个钮会得到吃的奖赏，触另一钮无奖。一段时间后，鸽子会经常去碰有奖钮，这种条件反射为操作性条件反射，迄今仍为研究学习记忆的重要模型之一。

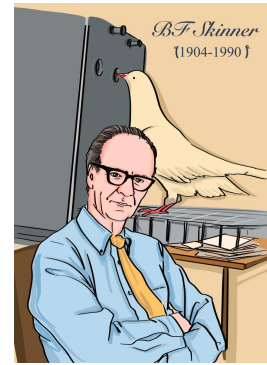


图 13-2 Skinner

奥地利的 Konrad Lorenz (1903-1989) 和 Karl von Frisch (1886-1982)、荷兰的 Nikolaas Tinbergen (1907-1988) 研究动物行为。von Frisch 研究蜜蜂的行为有多个发现，如蜜蜂有识别偏振光的能力。更为一般所知的发现是蜜蜂舞蹈：蜜蜂发现食物后，飞回蜂巢通过舞蹈的模式告诉其他蜜蜂食物的远近和角度、食物的多少。

Tinbergen 和 Lorenz 研究动物的本能行为。本能的行是天生行为。本能并不一定是幼年表现，比如生殖行为无需教导、也无需观察而在一定年龄后才表现。Tinbergen 和 Lorenz 发现动物的刻板动作，如在交配后，公鹅有一套特定动作；而有些特征可刺激鱼视之为敌而攻击。Lorenz 还发现行为的印迹 (imprinting)。他用灰腿鹅做实验，出生最初期小鹅看见什么动就跟着什么，如果小鹅见到的移动物体只是 Lorenz 本人，那么以后这些鹅视 Lorenz 为母亲，他走到哪里，它们跟到哪里，甚至长大后碰见真鹅，它们犹豫再三还是跟着 Lorenz 本人。印迹只能在特定时期产生，称为临界期。

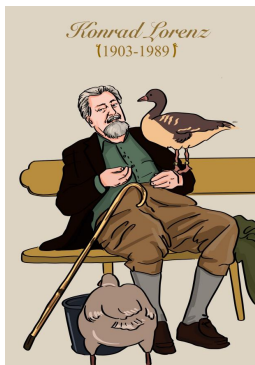


图 13-3 Lorenz, Frisch, Tinbergen

1951 年 Tinbergen 总结研究行为的四个方面，两个为近端原因 (proximate causes): 发育 (行为如何在个体发育过程中形成)，机理 (个体行为的原理)。两个终极原因 (ultimate causes): 进化，和功能 (如打架是为了抢食物、或争配偶)。迄今为止，大多数行为的研究在四个方面都不是很深。甚至还有停留在描述的程度行为研究。如 2009 年 von Bayern 等的论文，描述乌鸦如何被迫用小石头帮助自己获得嘴够不着的食物。

13.2 生物钟

生物钟的研究属于行为研究的范畴。通过观察行为是了解生物钟现象的途径，也是检测生物钟的简便方法。

生物钟是生物节律的俗称，人们熟知多种：动物的昼行夜伏、植物的春华秋实...。常见的近 24 小时昼夜节律 (circadian rhythm) 是典型的生物钟之一。生物钟的现象看似简单，其实不尽然。例如：每天早上并非太阳出来在先、向日葵指向东方在后，而是相反。而理解生物钟的本质就更不容易。

生物节律与其他节律一样，有振荡的幅度、周期、相位。节律是生物钟的外在表现，生物钟是内在的定时机理。生物钟本身是自我维持的生理和行为节律发生器 (pacemaker)，可以受外界环境因素 (zeitgebers) 所影响、可以同步化。

生物有多种节律，不同的生物有着不同的节律，同一生物也有多种节律。有些动物每年一个周期的冬眠、有些植物每年一个周期的长叶落叶，动物还有更快的周期如呼吸和心跳...，而人们熟知

的节律是昼夜节律。不仅大家熟悉的睡眠有昼夜节律，一些其他行为和有些生理指标也有昼夜节律。

公元四世纪，Androsthene知道罗望子树叶的运动有昼夜差别(McClung, 2006)。意大利的Santorio Santorio (1561-1636)前后30年记录自己从早到晚的摄食量、排泄量和体重变化，发现有昼夜规律。但他们未能区分外界影响的节律与生物自主的节律。1729年，法国天文学家Jacques Ortois de Mairan (1678-1771)用含羞草做材料，观察其叶片和花的变化。含羞草放置在全暗处一段时间，叶片仍然有张有合，不依赖阳光，但他当时没敢提出植物的昼夜节律是内在的(de Mairan, 1729; Szymanski, 1918)。达尔文也研究过植物的节律，并提出昼夜节律的可遗传性(Darwin and Darwin, 1880)。现在通过红外照相机可以看到年轻的向日葵朝向东方早于日出，所以也有内在节律所驱动的环节，虽然白天向日葵还有趋光性的环节(Atamian et al., 2016)。昼夜节律并不依赖于地球自转：放到太空，节律照常(Sulzman et al., 1984)。

Aschoff和Wever(1976)总结人的昼夜节律，德国大学生待在二战留下的堡垒中，灯光恒定、食物恒定、温度恒定、声音控制。在外界环境线索缺乏的情况下，人们仍然保持昼夜节律，只是在十几天后相位滞后。

现在知道，从简单的单细胞细菌蓝绿藻到多细胞的人，很多生物有节律。昼夜节律周期接近24小时(常见22至25小时)。节律的相位由最后一次环境线索(如光、或温度等)所确定。在缺乏环境线索时可以继续维持，在环境噪音中，节律也照常运行。在一定范围内，节律周期并不随温度的改变而剧烈改变，有温度补偿机制，这不同于一般生化反应：如温度每上升10°C，酶的催化活性提高一倍。

地球上生物生长的能量来自太阳，太阳的光照过强也会对生物的大分子造成破坏，因此地球上的生物有要应对阳光强度周期性变化的要求。

蓝绿藻有昼夜节律，把生物钟正常的与周期异常的蓝绿藻在一起长期培养，发现最后生物钟正常的细菌占了绝大多数，由此可见生物钟对生物体有利(Ouyang et al., 1998; Woelfle et al., 2004)。

通过研究正常拟南芥及周期缩短或延长的拟南芥突变种，发现从固碳量、生长、存活来看，周期与环境设定昼夜周期相吻合的拟南芥最适合，即：短周期突变株在20小时昼夜环境下生活得更好；而长周期突变株在28小时的模拟环境下更好(Dodd et al., 2005)。这些观察，反应了只有当内外源周期保持一致时才最有利于植物生长。

观察到周期正常有利于植物，不等于能够解释为什么，所以我们仍然是知其然、不知其所以然。

13.3 生物钟研究的新人和新途径

怎么研究生物钟？

能看到动物、植物的变化，是外在表现，可以看到钟的长针、短针运动的轨迹，不等于理解了指挥它们运动的机械装置。而生物钟的核心在于振荡发生器。

早期科学家用电生理研究生物钟，用电极记录细胞电活动，曾观察到哺乳类脑内特定部位视交叉上核(suprachiasmatic nucleus, SCN)的电活动有昼夜周期。在鸟类发现松果体很重要(Gaston and Menaker, 1968; Zimmerman and Menaker, 1979)。一系列研究表明SCN为哺乳类动物的主钟(master clock)、松果体为鸟类的主钟。损毁主钟导致动物失去昼夜节律(Moore and Eichler, 1972; Stephan and Zucker, 1972)；将主钟加回损毁后的动物可恢复昼夜节律(Lehman et al., 1987)；在损毁后，移植其他动物的主钟，新节律与移植来源的动物节律一样，例如，如果移植来自周期22小时的动物，那么接受移植的动物周期也是22小时，而如果移植来自周期20小时的动物，接受移植的动物也获得20小时的周期(Ralph et al., 1990)。

遗传学从孟德尔经摩尔根到1960年代初主要研究遗传的原理，揭示个体和群体的遗传规律。而1960年代末开始，遗传学作为重要的工具，成为研究生物现象的途径。通过突变观察到基因异常导致的表型，推论基因正常的功能，了解生物学机理。将遗传学作为研究途径的早期代表为美国生物学家Leland Hartwell (1939-)，他率先筛选酵母细胞分裂的遗传突变，推论参与细胞分裂的基因，推动理解细胞周期的分子机理，也有助于理解癌症。通过异常现象了解正常规律，通过个别例外发现普适原理，是遗传学作为研究途径的特征。用遗传筛选研究生物现象，所谓正向遗传学，随机筛选影响特定生物现象的突变，无需假设机理。这是遗传筛选的优点，但当时倾向于认为遗传筛选有很大的缺点：很多行为恐怕不是单个或几个基因所决定的，复杂的行为需要有很多基因参与，用遗传筛选对单个和少数基因参与的过程有效，对更多基因参与的行为可能效果很差。影响行为的基因也可能影响其他生理过程，从而难以区分是否参与特定行为的基因。有些看起来影响行为的基因，其

作用可能很间接，如先影响发育后导致行为变化。即使在已经多次证明遗传筛选很有效的今天，对于特定筛选的怀疑仍然存在。

纽约出生的波兰犹太移民后裔本哲 (Seymour Benzer, 1921-2007) 在大学年物理专业，1945 年至 1953 年任教于普度大学物理系，先研究过当时的热门：镭 (Benzer, 1946) 1948 年他开始通过参加暑期课程、访问实验室来学习生物。1953 年转到生物系任教，在分子生物学有两个很重要的工作：他证明遗传突变就是 DNA 碱基序列的变化 (Benzer, 1955)；他提出基因的顺反子定义 (Benzer, 1959)。1960 年代，几位分子生物学的开创者一道转行研究神经生物学。他们包括英国科学家、DNA 双螺旋共同发现者 Francis Crick (1916-2004)，南非出生的犹太裔英国科学家、mRNA 发现者 Sydney Brenner (1927-)，和本哲等。他们认为，分子生物学的重要问题已解决、框架已建立，只有细节给后辈，而他们应该找下一个重要的领域。他们都选了神经生物学：Crick 决定研究意识；Brenner 决定需要新的模式生物研究神经生物学，他挑选了秀丽线虫，开发了线虫的遗传学，带出一批学生用线虫研究了发育生物学和神经生物学，于 2002 年因为研究线虫获奖。本哲学习神经生物学后，决定用果蝇研究行为。1967 年，本哲转到加州理工学院，并开始发表果蝇行为的遗传学研究论文 (Benzer, 1967)。

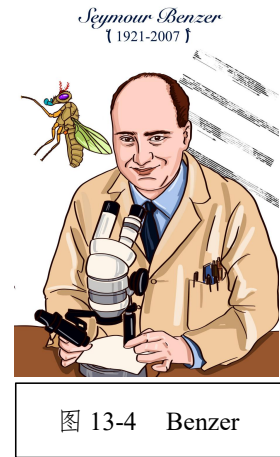


图 13-4 Benzer

本哲自 1967 年至 2007 年一直研究果蝇的行为。研究神经生物学的初期，不仅同事笑他（研究脑袋愚蠢的果蝇，是不是研究者脑袋有毛病），Jerry Hirsch (1922-2008) 曾认为不能用单基因解释、也就难以通过遗传筛选的方法研究果蝇行为，只能同时改变很多基因进行代间选择来推断。而本哲认为果蝇的行为可以用突变单个基因的前馈遗传学来进行研究。1970 年代，他们曾发生激烈争论，Hirsch 甚至给本哲所在加州理工学院的每一个教授写信称本哲的研究是伪科学。“聪明”的、想成功的人很多并不乐意做本哲的学生。早期他们的学生要么不求功利、要么不懂生物、要么……。其后四十年的实践证明，本哲和他的学生们研究的很多方面都领先世界，包括学习记忆、性行为、离子通道、眼发育、人类神经退行性疾病的果蝇模型等。

13.4 偷懒是创新之母

1971 年和 1972 年出现三篇用遗传学研究生物钟的文章：影响果蝇生物钟的基因突变 (Konopka and Benzer, 1971)、影响真菌（红色面包霉）生物钟的基因突变 (Feldman and Wasar, 1971)、影响绿藻生物钟的基因突变 (Bruce, 1972)。

早在 1935 年就知道果蝇有生物节律 (Kalmus, 1935)。因为果蝇的研究者多，其研究工具多于真菌和绿藻，加上研究果蝇生物钟的科学家前赴后继，最终研究果蝇对生物钟的理解起到的推动作用最大。在本哲用遗传研究行为的总体框架中，具体提出用果蝇筛选生物钟基因突变的是研究生 Ronald Konopka (1947-2015) (Rosbash, 2015)。

遗传筛选的实验设计是：建立检测表型的方法，用致变剂诱导特定生物的不同基因发生突变，检测不同突变种的表型。具体到果蝇的生物钟，就应该是建立检测生物钟的方法，用化学诱变剂诱导不同基因突变，然后一只一只检测果蝇，以便发现改变了昼夜节律的突变种。

1970 年代初无人知道果蝇有约两万个基因，化学分子诱发随机突变，只做两万只果蝇不够，其中部分突变在相同基因，所以应该加几倍到几百倍，才可能大部分基因都突变过一次。因行为有漂移，一个基因的突变种，不能仅检测一只果蝇，应该检测几只到几十只。果蝇是二倍体，每个基因有两套，一套坏了可以被另一个等位基因所代偿，所以最好不要做子一代 (F1) 的筛选，而最好是 F2 代，传代后再筛选，而 F2 代只有四分之一是同一基因突变的纯合子那么需要筛选的数量应一两百万，才能保证对果蝇所有基因进行了一遍筛选（所谓全基因组筛选）。

检测果蝇昼夜节律的标准方法，是将单只果蝇放到透明的管中，管子只容一只果蝇来回走动。一束光射过小管的中央，凡是果蝇走过管中央，计算机就记录果蝇运动了一次。以此检测果蝇活动的变化，发现确实有昼夜规律。但如果需要筛选检测很多果蝇，工作量就比较大。

Konopka 和 Benzer 用了两个偷工减料方法来加快速度。其一是他们决定不筛选昼夜节律，而筛另一节律：果蝇羽化。果蝇受精卵成为胚胎，发育成为幼虫，三次蜕皮后成为蛹，蛹经羽化成为成虫。

昼夜活动节律是果蝇成虫每天经历一次、几十天周而复始的循环。而果蝇一生仅羽化一次。正

常果蝇羽化一般在黎明前，最迟也在上午。上世纪三十年代至五十年代的研究明确提出羽化为独立于温度的生物钟所控制 (Kalmus, 1935, 1940a, 1940b, Pittendrigh, 1954)。但是，一生一次的羽化的生物钟与成虫每天活动的生物钟是否有关，当时并不清楚。

Konopka 觉得羽化作为筛选方法很容易操作。用单只果蝇做经典的昼夜活动规律检测比较慢。如果用羽化作为筛选方法，就很便当：化学诱变处理得到各种突变的果蝇后，Konopka 每天上午不来上班，午后到实验室把所有羽化的果蝇倒掉，留下其他蛹，下午到晚上再羽化的就是影响节律的突变种，因为它们的羽化时间不同于“正常”（野生型）果蝇。这样的方法大大简化了检测、加速了筛选。

Konopka 和 Benzer 偷懒的另外一个方面是遗传学捷径。他们用了附着 X 染色体。附着 X 是果蝇的一种突变。其发现者是摩尔根的妻子 Lilian Morgan。她本是独立的科学家，但与摩尔根结婚后暂停工作十几年，生儿育女后重返实验室。她五十多岁独立发现含附着 X 的果蝇 (Morgan, 1922)。这一突变对果蝇研究很有用处：化学诱变雄性果蝇，使其 X 染色体突变，然后与附着 X 的雌性果蝇交配，获得的 F1 存活的后代中，所有雄性都携带来自 F0 雄性的突变、而且只要 F0 有表型就必定 F1 也有表型，F1 代所有雌性都不含突变。这样，只要挑雄果蝇就可以，而雌雄很容易从外表区分，只要获得生物钟突变之后，以后无需每一代检测生物钟来追寻、保持突变种。

如果不用附着 X 的雌性，在 F1 代的雄性有三分之二果蝇不含突变，F1 的雌性含 F0 的突变、但若是隐形突变就不会有表型。那么每一代需要通过检测生物钟来鉴定生物钟的突变，保持生物钟的突变，需要的工作量就很大。如果不研究 X 染色体，而研究其他染色体的突变，工作量就更大。

Konopka 和 Benzer 用了附着 X，交配和筛选简单，加快了筛选速度。做先驱是有好处的：可以选的路径和方法有自由度，先选容易的。容易的方法如果被穷尽了，后面的人只好用麻烦的方法。先驱的危险是定错了方向、选错了课题。

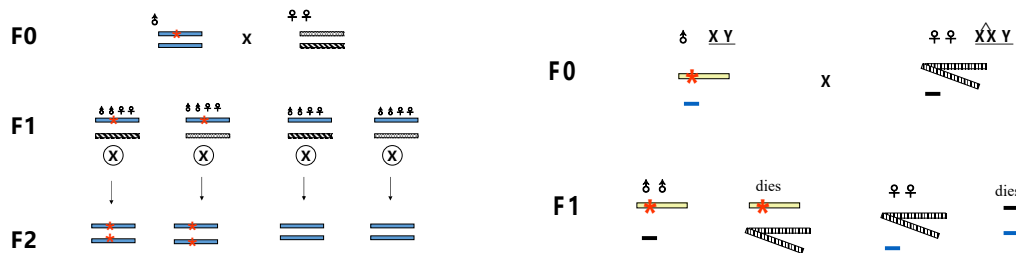


图 13-5 左：筛选 X 染色体上隐性突变的常规方法；右：使用 attached X 染色体的筛选方法

偷懒，依赖人脑想办法的偷懒，（有时）是创新之母。

13.5 生物钟研究的突破

对一个研究生来说，用如此简单的方法，可以筛选几万只、几十万只、几百万只果蝇。但 Konopka 只筛选了不到两百种品系的果蝇就得到第一个失去周期突变品系，继续筛选约一千九百种品系的果蝇再得到两个突变品系（分别是周期缩短和周期延长）。

用羽化筛到突变品系后，更重要的是用检测个体运动的方法看昼夜活动是否变化，结果发现确实突变果蝇运动的昼夜节律也有异常。有趣的是，他们发现的三种品系的突变果蝇在表型上并不相同：一种是无节律，一种节律缩短到 19 小时，一种节律变慢到 28 小时。他们交配突变果蝇以确立三种突变在染色体图谱的大概位置，结果发现很近，他们进一步进行本哲发明的顺反检测，试图确立它们是否同一基因，他们根据得到的结果推测三种突变可能是同一个基因的不同突变。他们把这个基因命名为 *Period* (*Per*)，无节律的为 *Per⁰* (*per zero*)、短节律的为 *Per^s* (*per short*)、长节律的为 *Per^l* (*per long*)。这里需要说明，他们进行的顺反检测并不严格，只做了反位 (*trans*) 的检测没做顺位 (*cis*) 的检测，所以只从 1971 年的文章不能完全断定三个突变是否同一基因，虽然支持这一可能。

他们筛选的果蝇数量不多，却得到了一个基因的三种不同方向的突变，因此特别有运气。

各种筛选和检测生物钟的方法，都有可能在一些非生物钟关键的基因导致的突变而有所影响。同一个基因可以出现三个方向的突变，不仅是运气，而且对于这个基因的功能也提供了很好的支持：很难设想不参与驱动生物钟的基因可以导致三个不同方向的突变表型。如果三个突变确为一个基因的三种突变，那么 *Per* 基因很可能是生物钟的关键基因之一。

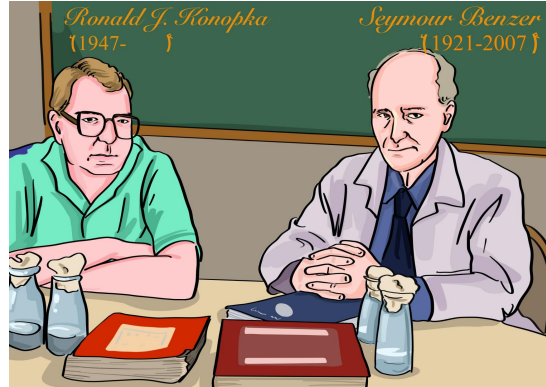


图 13-6 Konopka 和 Benzer

德国物理学家转美国生物学家的 Max Delbrück (1906-1981) 是本哲在加州理工学院的同事。本哲于 1940 年代末跟他学了生物、1969 年因为开创噬菌体研究获诺奖。他不信 Konopka 和本哲找到了生物钟的基因：

Delbrück: “No, that’s impossible ”

Benzer: “But Max, he’s already done it!”

Delbrück: “No, that is impossible.”

13.6 克隆 *per* 基因：竞争的好处

1971 年，因为技术缺乏，不可能得到 *per* 基因的 DNA (“克隆基因”)。重组 DNA 技术于 1973 年才发明，而克隆果蝇 DNA 的技术还要等到 1978 年斯坦福大学的 David Hogness (1925-2019) 和加州理工学院的 Tom Maniatis (1943) 等人的工作推动下才能进行。等到所有技术都成熟以后才开始研究是明显的事情，但也很容易成为跟风；不等到技术成熟，就开始研究才是开拓。但这种领先有很大的风险，如果领先几十年，可能开拓者一生也看不到下一步，也就不很确定自己的开拓是有效，是否误导大家走进了死胡同。

1980 年代是基因克隆的烽火连天时代。针对果蝇的 *per* 基因，两个团队竞争克隆：洛克菲勒大学的杨迈克 (Michael Young, 1949-); Brandeis 大学的霍尔 (Jeffrey Hall, 1945-) 与罗斯巴希 (Michael Rosbash, 1944-)。杨迈克本科的时候跟德克萨斯大学的 Burke Judd 从事研究，Judd 的兴趣是研究果蝇染色体上基因的分布，特别是研究了 X 染色体上一小段上有多少基因。杨迈克的研究生课题就继续研究 X 染色体的基因，他读到 Konopka 和 Benzer 的文章后，意识到 *Per* 基因应该就在他们研究的区段。杨迈克就要来 Konopka 的果蝇，通过实验证明自己不久前发现的一个突变 T(1,4)JC43 也是 *Per* 基因的突变，因为这一突变是染色体移位，以后将有助于在克隆 DNA 过程中定位 *Per* 基因的边界。他在做博士后期间跟斯坦福大学的 David Hogness，学习克隆 DNA 技术。杨迈克到洛克菲勒任教后，试图克隆两个果蝇的基因：与耶鲁大学的希腊裔生物学家 Spiros Artavanis-Tsakonas (1946-) 竞争克隆 *Notch* 基因；*Per* 基因。

霍尔跟本哲做博士后而研究果蝇，到 Brandeis 大学后继续研究果蝇，包括参与果蝇的性行为的 *fruitless* 基因。罗斯巴希多年用酵母研究 mRNA 剪接机理，实验室搬到霍尔同一大楼后，两实验室开始合作克隆 *Per* 基因。

1984 年，杨迈克和霍尔—罗斯巴希两个团队都拿到 *Per* 基因附近的基因组 DNA (Bargiello and Young, 1984; Reddy *et al.*, 1984; Zehring *et al.*, 1984)。这段 DNA 产生两个不同长度的 mRNA：分别为 4.5kb (千碱基对) 和 0.9kb，而且对应两个基因。霍尔—罗斯巴希组观察到 0.9kb 之 mRNA 的含量有昼夜变化 (Reddy *et al.*, 1984; Zehring *et al.*, 1984)，认为相应的 DNA 为 *Per* 基因。杨迈克认为 4.5kb 对应 *Per* 基因。后来两个团队都确认 4.5kb 是 *Per* 基因 (Bargiello *et al.*, 1984; Hamblen *et al.*,

1986; Lorenz *et al.*, 1989)。将编码 4.5kb mRNA 的 DNA 转入果蝇, 可以使 *Per* 突变种果蝇的昼夜节律恢复正常。改变导入的 *Per* 基因表达的相位可改变果蝇昼夜节律的相位 (Edery *et al.*, 1994)。

在两个团队的竞争过程中, 一个团队出现错误 (霍尔—罗斯巴希组最初错认了 *Per* 基因), 被另一团队所纠正, 是竞争对科学的好处。

两组科学家都确定了 *Per* 基因在最初三种影响生物钟突变株的 DNA 变化: *Per⁰* 所含碱基变化导致蛋白质合成提前终止, *Per^s*、*Per^l* 分别是两个不同部位的单碱基变化 (Baylies *et al.*, 1987; Yu *et al.*, 1987a)。

霍尔—罗斯巴希组的俞强还发现, 缺失 *Per* 蛋白质特定一段区域, 昼夜活动节律不受影响, 只影响求偶时果蝇翅膀有节律的歌唱 (Yu *et al.*, 1987b)。霍尔实验室在 1980 年发现果蝇求偶时的翅膀振荡有节律 (Kyriacou and Hall, 1980), 不过其后有争议至今 (Stern, 2014; Kyriacou *et al.*, 2017; Stern *et al.*, 2017)。

13.7 *Per* 的功能: 竞争的坏处

克隆到基因令人鼓舞。

但是, 得到基因不一定就能懂得机理。例如, 单纯测序人类基因组只是工具, 而不是美国总统等政治人物与羞耻感较弱的科技工作者齐称测序人类基因组就揭示了人类奥秘, 其实单纯测序不可能自动解开人类奥秘, 所以今天对人类的奥秘还远不清楚。通过表型找到基因, 是了解功能的重要一步, 优于单纯测序。不过, 拿到了 *Per* 基因的 DNA, 并不知道它所编码产生的蛋白质的功能, 也不能立即推导出生物钟的机理。其实有些基因被发现很长时间后, 人们都不能理解其机理。例如, 患“莱—尼” (Lesch-Nyhan) 综合症的病人是很特殊的疾病: 病人自残。而其基因已知多年, 它编码的 HGPRT (次黄嘌呤磷酸核糖转移酶) 是核酸代谢的一个酶, 但人类迄今并不理解为什么缺 HGPRT 的病人会自残。

两个组都看到 *Per* 蛋白质有部分序列是重复的, 杨迈克实验室还以为果蝇 *Per* 重复序列与小鼠的序列相似 (Shin *et al.*, 1985), 后来发现并非如此。要推导出一个基因所编码蛋白质的功能, 如果其预计的氨基酸序列与其他某种已知蛋白质有相似性, 那么功能可能类似, 从而提供研究的着力点。1986 年, 两个课题组都发表文章称 *Per* 蛋白质是蛋白多糖 (Jackson *et al.*, 1986; Reddy *et al.*, 1986)。这次两个课题组都错了, 竞争的课题组对成一样是合理的, 而错成一样是咄咄怪事。

1987 年, 杨迈克课题组与爱因斯坦医学院的 David Spray 实验室合作发表文章 (Bargiello *et al.*, 1987), 称 *Per* 影响了细胞间交流 (提示 *Per* 可能起缝隙连接相关的功能, 比如缝隙蛋白), 这一结果很可能是从猜测 *Per* 是蛋白多糖——可能是膜蛋白——也就有可能是缝隙蛋白而推论。但是, *Per* 突变影响缝隙连接的结果不能重复, 1992 年杨迈克和 Spray 发表道歉、收回 1987 年的文章 (Saez *et al.*, 1992)。霍尔—罗斯巴希组于 1993 年也发表文章认为 *Per* 不参与细胞间连接 (Flint *et al.*, 1993)。

从 1984 至 1987, 在激烈竞争的过程中, 两个课题组都错了两次: 各自分别错了一次, 同时错了一次。

13.8 *Per* mRNA 的研究: 仔细不是坏事

克隆了基因, 研究很自然的下一步包括检测基因表达。

检测基因表达可以通过检测 mRNA 的表达或蛋白质。一般来说, 一个动物的绝大多数细胞含同样的 DNA, 而含有不同的 mRNA 和蛋白质。霍尔—罗斯巴希组、杨迈克组都检测 *Per* mRNA 和 *Per* 蛋白质表达在什么时间和空间 (James *et al.*, 1986; Saez and Young, 1988; Liu *et al.*, 1988; Siwicki *et al.*, 1988; Zerr *et al.*, 1990; Liu *et al.*, 1992), 其中检测蛋白质需要费了很大的劲制造识别 *Per* 蛋白质的抗体。他们发现 *Per* 蛋白质既可以存在于细胞核、也可以存在于细胞质 (Saez and Young, 1988; Siwicki *et al.*, 1988; Liu *et al.*, 1992)。

既然 *Per* 基因参与昼夜节律, 那么其 mRNA 或蛋白质是否也有昼夜周期? 不难检测 mRNA 含量, 但最初未观察到 *Per* mRNA 的昼夜变化。1990 年, 从果蝇头部提取 RNA, 发现了 *Per* mRNA 有昼夜周期性变化。此前没有观察到变化的一种可能是做实验的人技术不好、或不仔细, 另一可能是细节: 传说最初在全身检测 *Per* mRNA, 有可能身体其他部分 (如腹部) 所含 RNA 量大而不变掩盖了头部 mRNA 随昼夜周期的变化。为什么需要专门研究头部的 *Per*? 这与昼夜节律的关键部分存在于身体什么部位有关。在得到 *Per* 基因突变后, 曾有实验在不同突变型的果蝇之间进行局部区域组织细胞的移植, 以确定哪个部位起决定性作用: 从 *per^s* 果蝇取得脑组织, 移植到 *per⁰* 果蝇腹腔中,

发现 *per⁰* 变成了 *per^s*, 显示脑是确定节律的部位 (Handler and Konopka, 1979)。1983 年, 离开加州理工学院在 Clarkson 大学的 Konopka 等再用遗传嵌合体 (genetic mosaics) 做实验: 让果蝇部分区域的细胞含突变的 *per* (如 *per^s*), 而其余部分仍然正常, 结果发现如果脑含 *per^s*, 果蝇的生物钟就变短 (Konopka *et al.*, 1980)。所以, 移植实验和嵌合体实验皆支持 *Per* 基因在脑中控制全身的昼夜节律。

1990 年, 霍尔—罗斯巴希组的博士后 Paul Hardin 从果蝇头部取样, 24 小时中每个小时取一些果蝇的头制备 mRNA, 再检测 *Per* mRNA, 发现它呈昼夜变化 (Hardin, Hall, Rosbash, 1990)。

在 *per^s* 中, *Per* mRNA 昼夜周期也缩短。他们提出简单的模型: *Per* 基因转录 *Per* mRNA、翻译产生 *Per* 蛋白质的过程存在负反馈, 其 mRNA 或蛋白质产生后, 可以影响 *Per* 基因自身的转录。他们当时不能排除 *Per* 调节昼夜节律这一行为之后, 行为再通过更复杂的反馈作用于 *Per* 基因转录。这里需要用 Occam 剃刀原则, 既首先用最简单的解释, 最简单的不能解释才用更复杂的解释。这一简单解释提供了生物钟机制的理论突破, 是迄今为止仍被公认的“转录-翻译负反馈环路 (transcription-translation feedback loop, TTFL)”的基础。

不久, 霍尔—罗斯巴希组又用抗体检测发现 *Per* 蛋白质的表达也有昼夜节律, 这种节律的长短也被 *Per* 基因所调节, 因为 *per^s* 中, *Per* 的蛋白质昼夜周期也缩短 (Zerr *et al.*, 1990)。mRNA 的昼夜节律与蛋白质昼夜节律之间有一定的间隔, 既相位不同。几年之后知道不仅 *Per* 蛋白质含量变化, 而且其亚细胞定位变化: 昼夜周期中, *Per* 蛋白质进入细胞核的时间有昼夜周期变化 (Curtin *et al.*, 1995)。

13.9 基因转录调控

1990 年, 研究果蝇生物钟的 Hardin 等提出 *Per* 蛋白质可能调节基因转录, 依据间接证据。如果这一假设正确, 那么 *Per* 蛋白质就是基因的转录调节因子。而 1980 年代有很多转录因子的研究进展, 为研究 *Per* 和生物钟的机理提供很好的借鉴。1991 年和 1992 年, 其他途径的研究发现促进对 *Per* 的理解。果蝇的 *single minded (sim)* 基因控制果蝇胚胎腹侧中线的神经细胞发育 (Nambu *et al.*, 1990)。研究环境致癌物二恶英 (dioxin) 的两个实验室发现编码其受体 AhR 的基因 (Hoffman *et al.*, 1991; Burbach *et al.*, 1992)。序列比对发现 *Per*、AhR 和 Sim 三个蛋白质有相似的区域, 称为 PAS 区域。

从 AhR 是转录因子可以提示 *Per* 和 SIM 也是转录调节因子, 但 *Per* 与 AhR 的相似只在 PAS 区域而缺 AhR 所含专门结合 DNA 并调节基因转录的 bHLH 区域, 所以 *Per* 是否调节基因转录并不确定, 如果调节, 并不清楚是如何调节。1993 年, 罗斯巴希实验室的黄佐实证明, PAS 区域是蛋白质—蛋白质相互作用区域, 一个蛋白质所含的 PAS 可以结合另一蛋白质的 PAS 区域 (Huang *et al.*, 1993)。

进一步研究提出, 具有 bHLH 和 PAS 区域的蛋白质可能是转录激活因子, 而只有 PAS、缺 bHLH 的 *Per* 蛋白质不能激活转录但可能抑制转录 (Lindebro *et al.*, 1995)。Hardin 自己独立实验室后, 证明 *Per* 蛋白质调控 *Per* 基因转录, 依赖于 *Per* 基因在蛋白质编码区域之上游 (分子生物学称为 5' 端) 的 DNA 序列 (Hao *et al.*, 1997)。以后有更多证据表明, *Per* 参与调节多个基因的转录。

13.10 更多参与果蝇生物钟的基因

影响生物钟不可能只有一个基因。

1971 年发现第一个影响果蝇生物钟的基因 *Per*。1983 年, Jackson 发表了影响果蝇生物钟的其他基因 (Jackson, 1983), 但无果而终。1990 年, 霍尔—罗斯巴希组发表“新”的果蝇昼夜节律基因“钟” (*Clock*) (Dushay *et al.*, 1990), 不过他们于 1992 年发现这不是新的基因而仅为 *Per* 基因的另一突变 (Dushay *et al.*, 1992), 辛勤努力化为一江春水。

1991 年 Konopka 等发表第二个影响果蝇生物钟的新基因 *Andante* (Konopka *et al.*, 1991)。注意这一基因的人不多, 到 2003 年它才被 Tufts 大学的 Jackson 实验室所克隆 (Akten *et al.*, 2003)。

1991 年洛克菲勒大学杨迈克实验室的博士后 Amita Sehgal 等在会议上报道她们筛选影响果蝇生物钟的新基因 (Sehgal *et al.*, 1991)。

1994 年, 杨迈克实验室报道他们发现了 *Timeless* 基因 (“无时间”, 简称 *Tim*): Sehgal 等通过筛选七千多个位于第二号和第三号染色体的突变种, 找到第三个影响果蝇生物钟的新基因 (Sehgal *et al.*, 1994)。他们用了转座子插入诱导突变, 以利克隆基因。她们用于检测生物钟的首先也是羽化时间, 而后用活动的昼夜节律核实。杨迈克实验室很快克隆到 *Tim* 基因 (Myers *et al.*, 1995)。虽然预计的 *Tim* 蛋白质序列看不出它是怎么作用的蛋白质, 但因为它可以结合 *Per*, 那么估计也是转录因子。

Sehgal 等还发现 *Tim* 的 RNA 表达量也呈昼夜节律, *Tim* 的突变也影响 *Per* 的 RNA 昼夜变化 (Sehgal *et al.*, 1995)。杨迈克实验室的研究生 Leslie Vosshall 发现 *Tim* 影响 *Per* 蛋白质出入细胞核 (Vosshall *et al.*, 1994)。Weitz 实验室发现 *Tim* 蛋白质与 *Per* 蛋白质可以直接相互结合 (Gekakis *et al.*, 1995)。罗斯巴希实验室的研究生曾红葵发现 *Tim* 与 *Per* 两个蛋白质的相互作用有昼夜节律, 而光可以调节 *Tim* 蛋白质的稳定性, 从而提供了光对生物钟的调节的分子机理 (Zeng *et al.*, 1996)。

多种生物, 从细菌、植物到包括人在内的动物, 都有节律、有昼夜节律 (Herzog, 2007)。存在于多种生物的生物钟, 是否用同样的分子? 是否用同样的机理? 红色面包霉的生物钟基因 *Frequency* (*frq*, “频率”) 于 1989 年被克隆, 当时以为它与 *Per* 有部分序列相似 (McClung *et al.*, 1989), 后来发现不相似。控制有些细菌生物钟的基因也纷纷被克隆 (如, Liu *et al.*, 1995; Ishiura *et al.*, 1998)。1995 年, 调节植物 (如拟南芥) 生物钟的基因突变被发现 (Millar *et al.*, 1995)。1998 年, 调节植物生物钟的基因被克隆 (Wang and Tobin, 1998; Schaffer *et al.*, 1998)。

那么: 哺乳类的生物钟, 用什么基因?

13.11 千呼万唤始出来: 哺乳动物的生物钟基因

调节哺乳动物生物钟的第一个基因 *tau* 的突变种于 1988 年被偶然发现 (Ralph and Menaker, 1988), 但克隆这一基因需要等到 2000 年 (Lowrey *et al.*, 2000), 它编码一个蛋白激酶 (CKI ϵ)。

果蝇的 *Per* 基因在 1984 年被克隆后, 长期有人 (如麻省大学伍斯特校区的 Steven Reppert) 试图在高等动物中找到 *Per* 基因, 但费九牛二虎之力而无果。曾找到了蚕的 *Per* 基因 (Reppert *et al.*, 1994), 但它居然没有帮助找哺乳类的 *Per*。一般来说, 一个基因在低等动物中发现后, 在高等动物中比较容易找到, 有多种方法可以通过 DNA 序列相似性找到。找不到有几种可能: *Per* 在高等动物不存在, 例如果蝇可能与高等动物的生物钟不同, 也可以是果蝇和高等动物生物钟大体类似但其中有分子不同 (如果蝇用 *Per* 但高等动物不用); 另一可能是研究者技术上的问题, 在高等动物存在 *Per*, 但未找到。从 1984 年到 1997 年都找不到哺乳动物的 *Per* 的情况下, 人们担心哺乳类无 *Per* 基因, 可能果蝇和高等动物有不同的生物钟。

时代呼唤英雄, 找到哺乳类生物钟基因的英雄。在美国芝加哥北郊西北大学工作的日裔科学家高桥 (Joseph S Takahashi, 1951-) 决定不再依赖容易的方法, 而用老鼠做遗传筛选。

用老鼠做研究比果蝇要贵很多。如果通过筛选找基因, 经费的问题使绝大多数人望而却步, 所以很少科学家用老鼠进行随机基因突变后的筛选。为了在一定范围省时间和经费, 高桥实验室不筛选纯合体突变种, 而筛杂合体。不过筛杂合体虽省了工作量, 但也降低了突变检出率。即使这样, 筛一遍所有基因突变也需要超过十万只老鼠。有个笑话: 做这种实验, 需要在老鼠身上开销豪华旅馆的经费。1994 年世界上没实验室敢做这类研究, 担心用完了经费还找不到影响老鼠生物钟的基因。

高桥带领实验室决定筛选, 这是发愤图强、还是铤而走险?

他们的勇气为运气所迎接。

他们到 1994 年共筛选了 304 只小鼠, 第 25 只就是影响生物钟的突变体, 他们将突变相应的基因命名为“钟” (*Clock*) (Vitaterna *et al.*, 1994)。鼠生物钟的正常周期是 23.7 小时, *Clock* 突变杂合鼠昼夜节律为 24.8, 需要灵敏和可靠的检测才能发现不大的变化。从杂合体检测出小的、但可靠的变化后, 高桥实验室很容易通过交配小鼠而获得 *Clock* 基因突变的纯合体, 再检测发现: 完全丧失昼夜节律。1997 年, 高桥实验室发表两篇论文, 报道他们克隆了小鼠 *Clock* 基因的 DNA (King *et al.*, 1997; Antoch *et al.*, 1997)。

从基因序列可以推测 *Clock* 蛋白质不仅含蛋白质相互作用的 PAS 区域, 且有直接结合 DNA 的 bHLH 区域 (King *et al.*, 1997), 从而容易理解它如何调节基因转录。*Clock* 基因本身也表达于 SCN。

人、鸡、蛙、鱼、蜥蜴也有 *Clock* 基因 (King *et al.*, 1997), 因此 *Clock* 是普适于生物钟的基因, 很可能是生物钟的机理也是普适。

1997 年, 两个实验室找到老鼠和人的 *Per* (Tei *et al.*, 1997; Sun *et al.*, 1997)。美国华人科学家在研究其他问题的时候, 发现一个基因与 *Per* 序列相似 (Sun *et al.*, 1997)。以前没找到的原因是哺乳类与果蝇的 *Per* 基因在整个基因的相似性不很高, 而局部序列相似性高。用整体去找很难, 而用局部片段的困难在于以前并不知道用哪段才好。

哺乳类有三个 *Per* 基因: *Per1*、*Per2*、*Per3* (Shearman *et al.*, 1997), *Per* 基因表达在 SCN (Shearman *et al.*, 1997), 其表达随昼夜节律变化而变化, 这一节律受 *Clock* 基因的调节 (Jin *et al.*, 1999)。

1998 年, 霍尔—罗斯巴希组通过遗传筛选, 在果蝇找到 *Jrk* 基因, 测序后显示它就是果蝇的 *Clock*

1998)。它可以调节 Per 蛋白质的稳定性。高桥实验室于 2000 年克隆了金仓鼠的 *tau* 基因，发现原来也是 CKI ϵ (Lowrey *et al.*, 2000)。开始研究蛋白激酶导致磷酸化、磷酸化调节蛋白质稳定性。到 2001 年，已知多个基因在果蝇和小鼠都调节生物钟：包括果蝇的一个 *Per* 和小鼠的三个 *Per* 基因、果蝇的一个 *Cry* 和小鼠的两个 *Cry*、果蝇的 *Jrk* 和小鼠的 *Clock* 和 *Npas2*、果蝇的 *Cycle* 和小鼠的 *Bmal1*、果蝇的 *Doubletime* 和小鼠的 *CKI δ* 和 *CKI ϵ* 基因 (Reppert and Weaver, 2001)。

13.13 筛选生物钟相关基因的其他途径

在完全不理解分子机理的情况下，用遗传筛选生物钟相关的基因是很有效的方法，未尝不可称之为“盲筛”。盲筛的优点在于无需事先知道机理，而通过遗传得到突变、在通过克隆 DNA 得到序列、序列特征揭示所编码蛋白质、所编码蛋白质如果与现有蛋白质有序列相似性可以提示功能，有了功能很有可能再揭示机理。这是一些人所谓的“遗传学的令人敬畏的力量” (the awesome power of genetics)。这一途径被用于多个重要问题的研究，生物钟是早期的研究对象之一。

当然，遗传学并非唯一途径。早在 1995 年，哈佛医学院 Weitz 实验室的 Gekakis 等通过 Per 蛋白质寻找与 Per 直接相互作用的蛋白质，找到 Tim 蛋白质，发现 Tim 与 Per 两个蛋白质直接结合 (Gekakis *et al.*, 1995)。寻找相互作用的蛋白质，理论上可以用生物化学的途径，也可以用当时诞生不久的酵母双杂交 (Y2H) 方法，在酵母细胞中，构建分子探针，寻找文库中与之相互结合的蛋白质。Weitz 用 Y2H 发现 Tim 与同期杨迈克实验室用果蝇遗传筛选发现 Tim 有异曲同工之妙。

因为 Per (和 Tim) 的 RNA 有昼夜节律，提示也可以专门找其 RNA 有昼夜节律的基因，其中也会有参与生物钟的基因 (例如: Abruzzi *et al.*, 2017)，而不都是生物钟的结果。后来知道蛋白激酶参与生物钟，也就可以专门找其磷酸化有昼夜变化的蛋白质，发现之后进行基因突变以检测是否参与生物钟。

当技术发展，如分子生物学的 RNAi (RNA 干扰) 技术等之后，也自然可以用新技术研究老问题。2009 年，美国圣地亚哥加州大学 Steve Kay 实验室的博士后张二荃用 RNAi 筛选生物钟的基因。他利用当时已知多种细胞有生物钟，而设计在体外培养的人类细胞用 Per 基因插入荧光素基因，通过荧光素基因的表达周期显示生物钟。在这样的细胞中，引入不同的 RNAi，张二荃因此找到影响人类生物钟的基因 (Zhang *et al.*, 2009)。有了 CRISPR-CAS9 技术后，也可以用于生物钟研究。

从 1971 年的果蝇筛选到 2009 年人的筛选，研究的时间跨度很大，但基因并没有找全。果蝇的筛选就没有筛完，而是每次都有局限，哺乳动物的筛选更没有完。如果以后有更多、更好的途径和方法，包括已用过但未充分使用的方法，再发现影响生物钟的基因，不会令人惊讶。

13.14 生物钟的分子和细胞机理

发现基因固然重要。但生物学基础研究的目的是阐明机理。

综合多年的研究结果，可以看到，*Per* 调节基因转录，是分子机理的突破。简而言之，*Clock* 和 *Cycle* 蛋白质组成复合体，直接刺激一些下游靶基因的转录，这些靶基因进一步控制生物钟。而 *Per* 和 *Tim* 蛋白复合体抑制 *Clock* 和 *Cycle* 的作用。*Per* 基因和 *Tim* 基因本身还是 *Clock* 和 *Cycle* 的靶基因，从而组成转录负反馈环。*Per* 蛋白质的稳定性被磷酸化所调节，也就被 *Doubletime* 或 *CKI δ* 和 ϵ 等蛋白激酶和去除磷酸化的蛋白磷酸酶所调节 (Wijnen and Young, 2006; Benito *et al.*, 2007)。Per 和 *Clock* 蛋白质可以被糖基化修饰，并因此被调节。*Cry* 介导光调节 *Tim/Per* 的稳定性。在 *Clock/Cycle* 和 *Per/Tim* 参与的主要转录环之外，还有其他转录环，有其他基因如 *pdp1*、*vri*、*RORa* 和 *REV-ERBa* 参与转录调控。

Per 和 *Tim* 蛋白质不仅有稳定性的问题，还有亚细胞定位问题：在细胞浆、还是细胞核。作为转录调节因子，它们只有在进入细胞核才能见到基因调节的机器，调节基因转录 (Sieppka *et al.*, 2007; Dubowy and Sehgal, 2017)。*Per* 和 *Tim* 的 mRNA 在白天逐渐升高，到傍晚达最高峰。两个蛋白质的合成晚于其 mRNA 几小时后逐渐积累，先在细胞浆，午夜进入细胞核。*Tim* 蛋白质既在细胞浆内稳定 *Per* 蛋白质，也促进 *Per* 进入细胞核 (Meyer, Saez and Young, 2006)。

有趣的是，虽然细菌、真菌、和植物分别由其他分子组成生物钟，其分子也是通过正反馈和负反馈来实现振荡。外界的光或其它因素通过一定方式影响它们的生物钟也用了转录调控、和磷酸化调节等 (综述见 Wijnen and Young, 2006)。植物的生物钟也用了细胞浆和细胞质定位的调节 (Wang and Tobin, 1998; Mas, 2008)。从细菌到人不同生物的生物钟虽然分子不同，但原理有共同性。

在细胞层面，动物体内绝大多数细胞 (甚至所有细胞) 都有生物钟 (Emery *et al.*, 1997;

Giebultowicz and Hege, 1997; Plautz *et al.*, 1997)。果蝇的翅膀切下后依然可以观察到其中的生物钟影响(Plautz *et al.*, 1997), 人的细胞体外培养也表现出代谢上的节律 (Balsalobe *et al.*, 1998)。

在果蝇脑内大约 150 个表达 *Per* 和 *Tim* 基因的神经细胞组成主钟。Konopka 和 Benzer 在 1971 年的文章就指出, 突变基因起作用的解剖部位很重要。也就是说如果能够找到这些细胞, 就可能找到主生物钟。一般推测果蝇脑含约 10 万个神经细胞, 而其中 150 个细胞是主生物钟, 推测是依据 *Per* 和 *Tim* 的功能和基因表达部位 (Konopka and Benzer, 1971; Vosshall and Young, 1995; Kaneko, Helfrich-Forster, Hall, 1997; Panda, Hogenesch and Kay, 2002; Helfrich-Forster, 2005)。它们包括: 背侧的神经元 DN1、DN2、DN3, 侧后神经元 LPNs, 侧面偏背神经元 LN_d、侧面偏腹小神经元 sLN_{vs}、侧面偏腹大神经元 lLN_{vs}。其中 lLN_{vs} 神经元全部含 PDF 神经肽, 而 5 个 sLN_{vs} 中 4 个含 PDF (Nitabach and Taghert, 2008)。PDF 在生物钟也起重要作用 (Renn *et al.*, 1999)。这些细胞的功能也不一样, 含 PDF 的 sLN_{vs} 细胞为控制果蝇早上活动的早晨细胞, 而 LN_d 和不含 PDF 的 sLN_{vs} 细胞为控制果蝇傍晚活动的傍晚细胞。

人的主钟 SCN 含约 5 万个细胞, 小鼠 SCN 含约两万个细胞。哺乳动物主钟内部也有分工和协调。SCN 的神经细胞分离的状态下, 分别有节律但不同步, 而它们在一起时节律同步, 有神经肽等分子参与, 有神经网络。

13.15 人的生物钟相关基因

科学较晚理解人的生物钟, 而其中遗传和基因分析也起了突破性的作用。

用 8753 对成年双胞胎的研究表明: 人的昼夜节律有很强的遗传性 (Koskenvuo *et al.*, 2007)。

1999 年, 通过人类遗传学分析发现三家生物钟节律加快的家系, 称为 (家族性睡眠相位提前综合征, FASPS), 表现为常染色体显性遗传 (Jones *et al.*, 1999)。2001 年, 当时在 Utah 大学的 Fu 和 Ptáček 两个实验室合作发现, 人的 *Per2* 基因 (*hPer2*) 与人的生物钟相关。他们研究的一家 FASPS, 每天早上 4 点半醒, 晚上 7 点半睡, 相位比一般人提前 4 小时。Fu 和 Ptáček 的遗传分析发现, 该家系成员凡有 *hPer2* 编码的特定位置变化者发生相位提前, 凡这个位点正常者无相位提前问题 (Toh *et al.*, 2001)。基因变化对应于蛋白质序列的 662 位氨基酸, 正常是丝氨酸 (简称 S)。

还有其他基因参与人的生物钟 (He *et al.*, 2009)。杨迈克实验室于 2017 年发现人的 *Cry1* 基因突变可以导致生物钟相位推迟 (晚睡晚起) (Patke *et al.*, 2017)。

13.16 小结

生物钟遗传研究确实有运气, 但也有勇气。

运气, 外在而缥缈; 勇气, 内生而实在。在用遗传学研究生物钟的过程中, 事先难以预料能否取得突破, 事后分析发现勇气足以成功, 而运气是锦上添花, 虽然花开的特别灿烂。生物钟的研究有几次看上去非常有运气, 但仔细分析发现勇气更重要。在看不清前途时默默探索, 在一个小领域内长期耕耘; 遇困难出差错恐在所难免, 碰运气获机遇也时有所得。粗看似似乎运气重要, 细看可见勇气更重要: 勇于做前人没做过、旁人没想过、伟人不相信的工作。

Konopka 和 Benzer 从两千一百多品系果蝇中筛到三只突变果蝇, 竟然是同一个基因的三个影响完全不同的突变。遗传学研究的历史上可能只有这一次, 生物学历史可能也只有这一次。如果没有这样的突变, 可能有些人会比较犹豫生物钟能否用遗传学进行研究, 因当时很容易设想一些在果蝇生物钟筛选方法中有表型, 但不一定反映生物钟核心机构的基因。表型能否可靠并直接地帮助遗传学家研究核心问题, 是非常重要的问题。果蝇生物钟的表型, 几十年后的今天看来非常可靠, 但当初并不清楚。正如今天问: 从果蝇检测的睡眠, 是否真是睡眠? 很多人, 包括研究果蝇的科学家, 今天也不敢清晰地回答这一问题。

高桥实验室在老鼠的筛选过程中, 第 25 只老鼠就是影响生物钟的突变, 也有很大的运气。如果没这样的运气, 就要花很多的时间, 很多研究, 缺乏资源就难以支撑足够力量。一般人预计成本后就不敢做这样的研究。具有讽刺意味的是, 后来高桥得到很大经费专门筛选小鼠, 却很不成功, 钱的作用有时很奇怪。

我们可以事后诸葛亮, 总结多个实验以后而意识到: 实际上只要做足够的筛选, 例如筛两万只果蝇, 一定能找到生物钟的突变。虽难以得到一个基因的三种不同方向的突变, 但同样可能带来突破。多次筛选果蝇生物钟突变种, 只有两次比较倒霉, 一次是重复发现以前的基因、一次搞错了, 其他每次筛选都找到基因, 而且是新基因。

高桥实验室用老鼠筛选生物钟突变基因，也有运气。但事后看来，筛选超过几千只就应该能得到影响生物钟的基因。而几千只老鼠的经费，并非只有高桥实验室才有。对这一经验的总结并非徒劳，原在美国西南医学中心、现在日本筑波国际睡眠医学研究所的 Masashi Yanagisawa 及其团队，就用较大经费专门筛选小鼠睡眠的突变种，找到影响小鼠睡眠的基因 (Funato *et al.*, 2016)。

Konopka 在研究过程中遇到了生物学史上空前绝后的运气，但个人际遇却相当不好。他毕业后到斯坦福大学做过短暂博士后，1974 年回加州理工任助理教授，但评终身教授时未通过。他到 Clarkson 大学任教，再次未获终身教授，1990 年回到加州辅导高中生，2015 年因心脏病去世 (Rosbash, 2015)。

而高桥在第一次成功地筛选到 *Clock* 之后，获得很多经费支持进行大规模筛选，却未获进一步突破。居然在筛选小鼠生物钟的突变这一实验，出现经费投入量与工作成就的负相关。高桥在生物钟方面还有筛选之外的其他研究。

今天，有关生物钟的重要问题并未全部解决。

主钟细胞内的基因恐怕没有穷尽，而是还有。已发现的参与生物钟的基因，其机理并非完全清晰。主钟的细胞间如何相互作用？已知 SCN 的几万个细胞在一起的时候是同步的，而它们分开后继续有节律、但不同步。神经肽参与其同步，是否还有其他机理？只是神经细胞参与生物钟，还是有神经胶质细胞参与 (Brancaccio *et al.*, 2017; Tso *et al.*, 2017)？环路如何构建？中枢主钟如何调节外周钟。生物钟与代谢、代谢疾病的关系及其机理，也没有完全理解 (Turek *et al.*, 2005; Lamia *et al.*, 2008; Marcheva *et al.*, 2010; Robles, Humphrey and Mann, 2017)。了解参与生物钟蛋白质，能否构建很好的数学模型，在定性的基础上迈进定量的时代？非 24 小时的其他节律，它们的机理是什么？

现代社会对于调节时差有较大需求。各种值班导致欧美近六分之一的上班族需要调时差，而且人类跨时区旅行量每年数以亿计，老年人睡眠问题相当部分是生物钟异常所致，所以调节时差对于工作效率和生活质量都很重要。

注 1：人类遗传疾病一例。遗传分析，对于生命科学非常重要。

人类遗传分析在 1970 年代到 1990 年代的三十年中，找到很多导致人类疾病的基因突变(俗称“人类疾病基因”，实际为影响人类疾病罹患的基因突变)。人类遗传分析在基因组分析的辅助下，将在生物医学研究中起越来越重要的作用。

这里举一个简单的例子：痛觉的基因。

世界上，完全缺乏痛觉的人当然极为罕见。科学上报道第一例缺乏痛觉的人是 1932 年 (Dearborn, 1932)，迄今也不过十几例 (Landrieu, Said and Allaire, 1990; Nagasako, Oaklander and Dworkin, 2003; Cox *et al.*, 2006)。在巴基斯坦发现三个遗传痛觉缺失的家系，都是近亲结婚的家庭。其中一位小孩 14 岁不到就去世，原因是他没有痛觉，平时经常在街头表演刀刺自己、火上行走，他不感到痛，但这并不意味着他不受到伤害，而是受了伤害不感到痛。人如果从来不感到痛，对世界的理解会出现偏差。这个孩子后来跳楼，当然他确实不痛，但与常人一样，跳楼可以导致死亡。

有一种病称为“红斑肢痛症” (erythralgia) (Mitchell, 1878)，患者会自发或者受到轻微的刺激就出现肢体剧烈疼痛、皮肤红、灼热。1966 年，美国 Mayo 医院的医生发现阿拉巴马州有一个较大的家系，5 代 51 人中 21 位有自发疼痛 (Burbank, Spittell and Fairbairn, 1966)。1992 年，进一步发现这一家系有更多(共 29)人患病 (Finley *et al.*, 1992)。荷兰遗传学家联系美国阿拉巴马州的医生，获得这一家系多个病人和正常人的 DNA 样本，进行分子遗传分析，发现病人是因为 2 号染色体特定段落出现突变，这段含约 50 个基因，但他们不知道是哪个基因导致自发疼痛。

北京大学第一医院皮肤科的杨勇，发现一家三代有“红斑肢痛症”。他进一步分析了这 50 个基因，发现包含有一组钠通道基因，而其中 *SCN9A* 比较特异地表达在外周神经，与伤害感受有关，是最可能的致病基因。他们发现 *SCN9A* 基因在一个 3 代 13 人家系中每一病人(共 7 位)都有相同的点突变，而正常人没有。散发病人有一位也在同一基因有另外一个点突变。杨勇因此提出 *SCN9A* 突变是“红斑肢痛症”的致病原因 (Yang *et al.*, 2004)。*SCN9A* 基因这些点突变导致钠离子通道蛋白功能增强，从而感到痛 (Cummins, Dib-Hajj and Waxman, 2004)。

2006 年，英国遗传学家专门研究巴基斯坦三个先天缺乏疼痛的家系，三家有六位完全没有痛觉。分析发现他们都是 *SCN9A* 的功能缺失型突变而失去痛觉。他们的触觉、压觉、温度感觉、本体感觉没有受影响 (Cox *et al.*, 2006)。

在概念上，这是没有被研究者预计到的：传导痛觉的感觉神经纤维上有特异的钠离子通道。因

为所有神经细胞上都有钠离子通道，神经纤维的钠离子通道介导钠离子内流，是动作电位的基础。一般就以为所有神经纤维上的钠离子通道是一样的。如果不一样，也只是不同的动力学。没有预料到不同的感觉神经上有不同的钠离子通道。这一发现当然也就激发很多研究试图发明治疗痛觉的药物，通过抑制 Nav1.7(或者后来发现还有 Nav1.8)来抑制痛觉。

注2：人类遗传分析的前景。人类遗传分析主要是经典的家系分析，以及不断深化和扩展的大队列分析。对有主要效应起作用的表型(单个基因突变影响表型达到可以检测的程度)，家系分析将继续提供重要的信息。在能够收集到的家系含11个减数分裂后代的成员时，一个大家系就可能确定导致表型的基因。在家系不够大，采用多家系，加上一些队列分析，也可能确定突变基因。而队列的人数越来越多、其表型检测质量越来越高之后，研究将广泛开展。

人类遗传分析的第一大优点是直接找到影响人类表型的基因突变。经常有人观察到，在人类之外的生物发现的一些基因，在人类疾病中占比例不高。一般简单推论动物与人不同。实际上，常常不是不同，而是机理类似，但研究人员在动物研究的基因，在人类自然突变的频率不高，如果突变带来与动物同样的结果，只是发生率不高、而不是本质不同。用人类遗传分析可以避免这种问题，而直接找到人类变异频率相对较高、至少在研究的人群中影响表型的基因突变。人类遗传分析的第二个优点是可以研究只有人才有的表型。显然，人类的高级认知、思维和语言，动物缺乏，必需用人进行研究。有些人类疾病，用动物也是不可能或者非常困难，隔靴搔痒。例如缺乏动物自私的模型。也没有真正能够准确和全面模拟人类精神分裂症的动物模型。人类遗传分析的第三个优点是不同人群可以进行同样的研究，但因为基因组背景和环境的不同，不会仅仅验证而可以有新的发现。人类遗传分析的第四个优点是其方法可以类推到研究环境因素对人类表型的影响，所以学好了人类遗传分析可以以后研究环境因素对人类的影响。人类遗传分析的第五优点是影响表型的有多个基因、多个环境因素，其相互作用也值得研究。例如，某种疾病不仅突变的基因不同，而且用药不同。这种简单的“精准医学”原理，可以更加推广到有些其他治疗方式(包括外科手术)的治疗效果也可以受基因型的影响。所以，可以预计人类遗传分析的研究领域会茁壮成长。人类遗传分析的研究人员，不需要自己能够做实验，主要是统计分析，不同于生物医学传统研究的主导模式。

注3：巴甫洛夫因研究消化系统而获1904年诺贝尔生理或医学奖。Lorenz、von Frisch和Tinbergen获1973年诺贝尔生理学或医学奖。Hartwell因为用遗传筛选调节细胞周期的基因获2001年诺贝尔生理学或医学奖。Max Delbrück因为研究噬菌体获1969年诺贝尔生理学或医学奖。

注4：John Watson的研究有争议，从一例先天智力障碍的患者得出结论能否推广，另有伦理问题(用小孩做干涉性实验如何消除对小孩的不良影响)。

注5：虽然只有动物有视觉，但动物和植物(以及有些细菌)都有感光系统，而动物植物分别用一些分子感光，但只有Cry蛋白质是动植物都用于感光的分子。这本来也是研究Cry是否参与昼夜节律的一个原因，但奇怪的是，后来的实验表明参与昼夜节律的Cry并不能感光，现在Cry的作用机理不明。

注6：Benzer逝世于2007年，Konopka逝世于2015年。杨迈克、霍尔和罗斯巴希获2017年诺贝尔生理学或医学奖。

参考文献

- Abruzzi KC, Zadina A, Luo W, Wiyanto E, Rahman R, Guo F, Shafer O and Rosbash M (2017) RNA-seq analysis of *Drosophila* clock and non-clock neurons reveals neuron-specific cycling and novel candidate neuropeptides. *PLoS Genetics* 13:e1006613.
- Akten B, Jauch E, Genova GK, Kim EY, Edery I, Raabe T and Jackson FR (2003) A role for CK2 in the *Drosophila* circadian oscillator. *Nature Neuroscience* 6:251-257.
- Allada R, White NE, So WV, Hall JC and Rosbash M (1998) A mutant *Drosophila* homolog of mammalian *Clock* disrupts circadian rhythms and transcription of *period* and *timeless*. *Cell* 93:791-804.
- Allada R and Chung BY (2010) Circadian organization of behavior and physiology in *Drosophila*. *Annual Review of Physiology* 72:605-624.
- Antoch MP, Song EJ, Chang AM, Vitaterna MH, Zhao Y, Wilsbacher LD, Sangoram AM, King DP, Pinto LH and Takahashi JS (1997) Functional identification of the mouse circadian *Clock* gene by transgenic BAC rescue. *Cell* 89:655-67.
- Aschoff J and Wever R (1976) Human circadian rhythms: a multioscillator system. *Federation Proceedings* 35:2326-2332.

- Atamian HS, Creux NM, Brown EA, Garner AG, Blackman BK and Hamer SL (2016) Circadian regulation of sunflower heliotropism, floral orientation and pollinator visits. *Science* 353:587-590.
- Bao S, Rihel J, Bjes E, Fan J-Y and Price JL (2001) The *Drosophila* double-times mutation delays the nuclear accumulation of period protein and affects the feedback regulation of period mRNA. *Journal of Neuroscience* 21:7117-7126.
- Balsalobe A, Damiola F and Schibler U (1998) A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells. *Cell* 93:929-937.
- Bargiello TA and Young MW (1984) Molecular genetics of a biological clock in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 81:2142-2146.
- Bargiello TA, Jackson FR and Young MW (1984). Restoration of circadian behavioral rhythms by gene transfer in *Drosophila*. *Nature* 312:752-754.
- Bargiello TA, Saez L, Baylies MK, Gasic G, Young MW and Spray DC (1987) The *Drosophila* clock gene *per* affects intercellular junctional communication. *Nature* 328:686-691.
- Baylies MK, Bargiello TA Jackson FR and Young MW (1987) Changes in abundance of structure of the *per* gene product can alter periodicity of the *Drosophila* clock. *Nature* 326:390-392.
- Bell-Pedersen D, Cassone VM, Earnest DJ, Golden SS, Hardin PE, Thomas TL and Zoran MJ (2005) Circadian rhythms from multiple oscillators: lessons from diverse organisms. *Nat Rev Genet* 6:544-556.
- Benito J, Zheng H, Ng FS and Hardin PE (2007) Transcriptional Feedback Loop Regulation, Function, and Ontogeny in *Drosophila*. *Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology* 72:437-444.
- Benzer S (1955) Fine structure of a genetic region in bacteriophage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 41:344-354.
- Benzer S (1959) On the topology of the genetic fine structure. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 45:1607-1620.
- Benzer S (1967) Behavioral mutants of *Drosophila* isolated by countercurrent distribution. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 58:1112-1119.
- Brancaccio M, Patton AP, Chesham JE, Maywood ES and Hastings HM (2017) Astrocytes control circadian timekeeping in the suprachiasmatic nucleus via glutamergic signaling. *Neuron* 93:1420-1435.
- Brandes C, Plautz JD, Stanewsky R, Jamison CF, Straume M, Wood KV, Kay SA and Hall JC (1996) Novel features of *Drosophila* period transcription revealed by real-time luciferase reporting. *Neuron* 16:687-692.
- Bruce VG (1972) Mutants of the biological clock in *Chlamydomonas reinhardi*. *Genetics* 70:537-548.
- Burbach KM, Poland A and Bradfield CA (1992) Cloning of the Ah-receptor cDNA reveals a distinct ligand activated transcription factor. *Proceeding of the National Academy of Sciences* 89:8185-8189.
- Burbank MK, Spittell JA Jr., Fairbairn JF II (1966) Familial erythromelgia: genetic and physiologic observations. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 68:861.
- Citri Y, Colot HV, Jacquier AC, Yu Q, Hall JC, Baltimore D and Rosbash M (1987) A family of unusually spliced biologically active transcripts encoded by a *Drosophila* clock gene. *Nature* 326:42-47.
- Cox JJ, Feimann F, Nicholas AK, Thornton G, Roberts E, Springell K, Karbani G, Jafri H, Mannan J, Raashid Y, Al-Gazali L, Hamamy H, Valente EM, Gorman S, Williams R, McHale DP, Wood JN, Gribble FM and Woods CG (2006) An *SCN9A* channelopathy causes congenital inability to experience pain. *Nature* 444:894-898.
- Crosthwaite SK, Dunlap JC and Loros JJ (1997) *Neurospora wc-1* and *wc-2*: transcription, photoresponses, and the origins of circadian rhythmicity. *Science* 276:763-769.
- Cummins TR, Dib-Hajj SD and Waxman SG (2004) Electrophysiological properties of mutant Nav1.7 sodium channels in a painful inherited neuropathy. *Journal of Neuroscience* 24:8232-8236.
- Curtin KD, Huang ZJ and Rosbash M (1995) Temporally regulated nuclear entry of the *Drosophila* period protein contributes to the circadian clock. *Neuron* 14:365-372.
- Cyran SA Yiannoulos G, Buchsbaum AM Saez L, Young MW and Blau J (2005) The double-time protein kinase regulates the subcellular localization of the *Drosophila* clock protein period. *Journal of Neuroscience* 25:5430-5437.
- Darlington TK, Wager-Smith K, Ceriani MF, Staknis D, Gekakis N, Steeves TD, Weitz CJ, Takahashi JS and Kay SA (1998) Closing the circadian loop: CLOCK-induced transcription of its own inhibitors *per* and *tim*. *Science* 280: 1599-1603.
- Darwin C and Darwin F (1880) The power of movement in plants. J. Murray, London.
- de Mairan J (1729) Observation botanique. *Kurfürstlich-Brandenburgische Societät der Wissenschaften* 35-36.

- Dearborn G (1932) A case of congenital general pure analgesia. *Journal of Nervous and Mental Diseases* 75:612-615.
- Dodd AN, Salathia N, Hall A, Kevei E, Toth R, Nagy F, Hibberd JM, Millar AJ and Webb AAR (2005) Plant circadian clocks increase photosynthesis, growth, survival, and competitive advantage. *Science* 309:630-33.
- Dubowy C and Sehgal A (2017) Circadian rhythms and sleep in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 205:1373-1397.
- Dushay MS, Konopka RJ, Orr D, Greenacre ML, Kyriacou CP, Rosbash M and Hall JC (1990) Phenotypic and genetic analysis of Clock, a new circadian rhythm mutant in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 125:557-578.
- Dushay MS, Rosbash M and Hall JC (1992) Mapping the clock rhythm mutation to the period locus of *Drosophila melanogaster* by germline transformation. *Journal of Neurogenetics* 8:173-179.
- Ederly I, Rutila JE and Rosbash M (1994) Phase shifting of the circadian clock by induction of the *Drosophila* period protein. *Science* 263:237-240.
- Ederly I, Zwiebel LJ, Dembinska ME and Rosbash M (1994) Temporal phosphorylation of the *Drosophila* period protein. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 91:2260-2264.
- Emery P, So WV, Kaneko M, Hall JC and Rosbash M (1998) CRY, a *Drosophila* clock and light-regulated cryptochrome, is a major contributor to circadian rhythm resetting and photosensitivity. *Cell* 95:669-679.
- Emery IF, Noveral JM, Jamison CF and Siwicki KK (1997) Rhythms of *Drosophila* period gene expression in culture. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 94:4092-4096.
- Feldman JF and Wasar N (1971) in *Biochronometry* (ed. M. Menaker) 652-656, National Academy of Science, Washington DC.
- Finley WH, Lindsey JR Jr, Fine J-D, Dixon GA and Burbank MK (1992) Autosomal dominant erythromelalgia. *American Journal of Medical Genetics* 42:310-315.
- Funato H, Miyoshi C, Fujiyama T, Kanda T, Sato M, Wang Z, Ma J, Nakane S, Tomita J, Ikkyu A, Kakizaki M, Hotta-Hirashima N, Kanno S, Komiya H, Asano F, Honda T, Kim SJ, Harano K, Muramoto H, Yonezawa T, Mizuno S, Miyazaki S, Connor L, Kumar V, Miura I, Suzuki T, Watanabe A, Abe M, Sugiyama F, Takahashi S, Sakimura K, Hayashi Y, Liu Q, Kume, K, Wakana S, Takashi JS and Yanagisawa M (2016) Forward-genetics analysis of sleep in randomly mutagenized mice. *Nature* 539:378-383.
- Gaston S and Menaker M (1968) Pineal function: the biological clock in the sparrow. *Science* 160:1125-1127.
- Gekakis N, Saez L, Delahaye-Brown AM, Myers MP, Sehgal A, Young MW and Weitz CJ (1995) Isolation of timeless by PER protein interaction: defective interaction between timeless protein and long-period mutant PERL. *Science* 270:811-815.
- Gekakis N, Staknis D, Nguyen HB, Davis FC, Wilsbacher LD, King DP, Takahashi JS and Weitz CJ (1998) Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism. *Science* 280:1564-1569.
- Giebultowicz JM and Hege DM (1997) Circadian clock in Malpighian tubules. *Nature* 386:664.
- Green RM, Tingay S, Wang ZY and Tobin EM (2002) Circadian rhythms confer a higher level of fitness to *Arabidopsis* plants. *Plant Physiology* 129:576-84.
- Hamblen M, Zehring WA, Kyriacou CP, Reddy P, Yu Q, Wheeler DA, Zwiebel LJ, Konopka RJ, Rosbash M and Hall JC (1986) Germ-line transformation involving DNA from the period locus in *Drosophila melanogaster*: overlapping genomic fragments that restore circadian and ultradian rhythmicity to per⁰ and per⁻ mutants. *Journal of Neurogenetics* 3:249-291.
- Handler AM and Konopka RJ (1979) Transplantation of a circadian pacemaker in *Drosophila*. *Nature* 279:236-238.
- Hao H, Allen DL and Hardin PE (1997) A circadian enhancer mediates PER-dependent mRNA cycling in *Drosophila melanogaster*. *Molecular and Cellular Biology* 17:3687-369.
- Hardin PE, Hall JC and Rosbash M (1990) Feedback of the *Drosophila* period gene product on circadian cycling of its messenger RNA levels. *Nature* 343:536-540.
- He Y, Jones CR, Fujiki N, Xu Y, Guo B, Holder Jr. JL, Rossner MJ, Nishino S and Fu Y-H (2009) The Transcriptional Repressor DEC2 Regulates Sleep Length in Mammals. *Science* 325:866-870.
- Helfrich-Forster C (1995) The period clock gene is expressed in central nervous system neurons which also produce a neuropeptide that reveals the projections of circadian pacemaker cells within the brain of *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 92:612-616.

- Herzog ED (2007). Neurons and networks in daily rhythms. *Nature Reviews Neuroscience* 8:790-802.
- Hirota T, Lewis WG, Liu AC, Lee JW, Schultz PG and Kay SA (2008) A chemical biology approach reveals period shortening of the mammalian circadian clock by specific inhibition of GSK-3 β . *Proceedings of the National Academy of Science USA* 105:20746–20751.
- Hoffman EC, Reyes H, Chu FF, Sander F, Conley LH, Brooks BA and Hankinson O (1991) Cloning of a factor required for the activity of Ah (dioxin) receptor. *Science* 252:954-958.
- Hotta Y and Benzer S (1970) Genetic dissection of the *Drosophila* nervous system by means of mosaics. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 67, 1156-1163.
- Huang ZJ, Edery I and Rosbash M (1993) PAS is a dimerization domain common to *Drosophila* period and several transcription factors *Nature* 364:259-62.
- Hunter-Ensor M, Ousley A, Sehgal A (1996) Regulation of the *Drosophila* protein timeless suggests a mechanism for resetting the circadian clock by light. *Cell* 84:677-685.
- Ishiura M, Kutsuna S, Aoki S, Iwasaki H, Andersson CR, Tanabe A, Golden SS, Johnson CH and Kondo T (1998) Expression of a gene cluster kaiABC as a circadian feedback process in cyanobacteria. *Science* 281:1519-1523.
- Jackson FR (1983) Isolation of biological rhythm mutations on the autosomes of *Drosophila melanogaster*. *Journal of Neurogenetics* 1:3-15.
- Jackson FR, Bargiello TA, Yun SH and Young MW (1986) The product of per locus of *Drosophila* shares homology with proteoglycans. *Nature* 320:185–188.
- James AA, Ewer J, Reddy P, Hall JC and Rosbash M (1986) Embryonic expression of the period clock gene in the central nervous system of *Drosophila melanogaster*. *European Molecular Biology Organization Journal* 5:2313–2320.
- Jin X, Shearman LP, Weaver DR, Zylka MJ, De Vries GJ and Reppert SM (1999) A molecular mechanism regulating rhythmic output from the suprachiasmatic circadian clock. *Cell* 96:57–68.
- Jones CR, Campbell SS, Zone SE, Cooper F, DeSane A, Murphy PJ, Jones B, Czajkowski L and Ptacek LJ (1999) Familial advanced sleep-phase syndrome: a short-period circadian rhythm variant in humans. *Nature Medicine* 5:1062-1065.
- Kalmus H (1935). *Biologia Generalis* 11:93-114.
- Kalmus H (1940a) New research in the diurnal periodicity of animals. *Acta medicina Scandinavia* (supplement) 108:227-233.
- Kalmus H (1940b) Diurnal rhythms in the axolotl larva and in *Drosophila*. *Nature* 14:72-73.
- Kaneko M, Helfrich-Forster C and Hall JC (1997) Spatial and temporal expression of the period and timeless gene in the developing nervous system of *Drosophila*: newly identified pacemaker candidates and novel features of clock gene product cycling. *Journal of Neuroscience* 17:6745-6760.
- Kim EY, Jeong EH, Pakr S, Jeong H-J, Edery I and Cho JW (2012) Temporal phosphorylation of the *Drosophila* period protein. *Genes and Development* 26:490-502.
- King DP, Zhao Y, Sangoram AM, Wilsbacher LD, Tanaka M, Antoch MP, Steeves TDL, Vitaterna MH, Kornhauser JM, Lowrey PL, Turek FW and Takahashi JS (1997) Positional cloning of the mouse circadian *Clock* gene. *Cell* 89:641-653.
- Ko HW, Kim EY, Chiu J, Vanselow JT, Kramer A and Edery I (2010) A hierarchical phosphorylation cascade that regulates the timing of Period nuclear entry reveals novel roles for proline-directed kinases and GSK-3 β /SGG in circadian clocks. *Journal of Neuroscience* 30:12664-12675.
- Konopka RJ and Benzer S (1971) Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 68:2112-2116.
- Konopka R, Wells S and Lee T (1983) Mosaic analysis of a *Drosophila* clock mutant. *Molecular and General Genetics* 190:284-88.
- Konopka RJ, Smith RF and Orr D (1991) Characterization of Andante, a new *Drosophila* clock mutant, and its interactions with other clock mutants. *Journal of Neurogenetics* 7:103-114.
- Koskenvuo M, Hublin C, Partinen M, Heikkilä K and Kaprio J (2007) Heritability of diurnal type: A nationwide study of 8753 adult twin pairs. *Journal of Sleep Research* 16:156–162.
- Kyriacou CP and Hall JC (1980) Circadian rhythm mutations in *Drosophila melanogaster* affect short-term fluctuations in the male's courtship song. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 77:6729-6733.
- Kyriacou CP, Green EW, Piffer A and Dowse HB (2017) Failure to reproduce *period*-dependent song cycles in *Drosophila* is due to poor automated pulse-detection and low-intensity courtship. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114:1970-1975.

- Lamia KA, Storch KF and Weitz CJ (2008) Physiological significance of a peripheral tissue circadian clock. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 105:15172-15177.
- Landrieu P, Said G and Allaire C (1990) Dominantly transmitted congenital indifference to pain. *Annals of Neurology* 27:574-578.
- Lehman MN, Silver R, Gladstone WR, Kahn RM, Gibson M and Bittman EL (1987) Circadian rhythmicity restored by neural transplant. Immunocytochemical characterization of the graft and its integration with the host brain. *Journal of Neuroscience* 7:1626-1638.
- Lindebro MC, Poellinger L and Whitelaw ML (1995) Protein-protein interaction via PAS domains: role of the PAS domain in positive and negative regulation of the bHLH/PAS dioxin receptor-Arnt transcription factor complex. *European Molecular Biology Organization Journal* 14:3528-39.
- Liu X, Lorenz L, Yu Q, Hall JC and Rosbash (1988) Spatial and temporal expression of the period gene in *Drosophila melanogaster*. *Genes and Development* 2:228-238.
- Liu X, Zwiebel LJ, Hinton D, Benzer S, Hall JC and Rosbash M (1992) The period gene encodes a predominantly nuclear protein in adult *Drosophila*. *Journal of Neuroscience* 12:2735-2744.
- Liu Y, Tsinoremas NF, Johnson CH, Lebedeva NV, Golden SS, Ishiura M and Kondo T (1995) Circadian orchestration of gene expression in cyanobacteria. *Genes and Development* 9:1469-78.
- Lorenz LJ, Hall JC and Rosbash M (1989) Expression of a *Drosophila* mRNA is under circadian clock control during pupation. *Development* 107:869-880.
- Lowrey PL, Shimomura K, Antoch MP, Yamazaki S, Zemenides PD, Ralph MR, Menaker M and Takahashi JS (2000) Positional syntenic cloning and functional characterization of the mammalian circadian mutation tau. *Science* 288:483-492.
- Majercak J, Kalderon D and Ederly I (1997) *Drosophila melanogaster* deficient in protein kinase A manifests behavior-specific arrhythmia but normal clock function. *Molecular and Cellular Biology* 17:5915-5922.
- Marcheva B, Ramsey KM, Buhr ED, Kobayashi Y, Su H, Ko CH, Ivanova G, Omura C, Mo S and Vitaterna MH (2010) Disruption of the clock components CLOCK and BMAL1 leads to hypoinsulinaemia and diabetes. *Nature* 466:627-631.
- Mas P (2008) Circadian clock function in *Arabidopsis thaliana*: time beyond transcription. *Trends in Cell Biology* 18:273-81.
- McClung CR (2006) Plant circadian rhythms. *Plant Cell* 18:792-803.
- McClung CR, Fox BA and Dunlap JC (1989) The *Neurospora* clock gene *frequency* shares a sequence element with the *Drosophila* clock gene *period*. *Nature* 339:558-562.
- Meyer P, Saez L and Young MW (2006) PER-TIM interactions in living *Drosophila* cells: an interval timer for the circadian clock. *Science* 311:226-229.
- Millar AJ, Carré IA, Strayer CA, Chua N-H and Kay SA (1995) Circadian clock mutants in *Arabidopsis* identified by luciferase imaging. *Science* 267:1161-1163.
- Millar AJ, Straume M, Chory J, Chua NH and Kay SA (1995) The regulation of circadian period by phototransduction pathways in *Arabidopsis*. *Science* 267:1163-1166.
- Mitchell SW (1878) On a rare vaso-motor neurosis of the extremities, and on the maladies with which it may be confounded. *American Journal of Medical Sciences* 76:17-36.
- Moore RY, Eichler VB (1972). Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Research* 42:201-206.
- Morgan LV (1922). Non-criss-cross inheritance in *Drosophila melanogaster*. *Biological Bulletin* 42:267-274.
- Myers MP, Wager-Smith K, Wesley CS, Young MW and Sehgal A (1995) Positional cloning and sequence analysis of the *Drosophila* clock gene, timeless. *Science* 270:805-8.
- Myers MP, Wager-Smith K, Rothenfluh-Hilfiker A and Young MW (1996) Light-induced degradation of Timeless and entrainment of the *Drosophila* circadian clock. *Science* 271:1736-1740.
- Nagasako EM, Oaklander AL and Dworkin RH (2003) Congenital insensitivity to pain: an update. *Pain* 213-219.
- Nitabach MN and Taghert P (2008) Organization of the *Drosophila* circadian control circuit. *Current Biology* 18:R84-R93.
- Ouyang Y, Andersson CR, Kondo T, Golden SS and Johnson CH (1998) Resonating circadian clocks enhance fitness in cyanobacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 95:8660-8664.
- Panda S, Hogenesch JB and Kay SA (2002) Circadian rhythms from flies to human *Nature* 417:329-335.
- Patke A, Murphy PJ, Onat OE, Krieger AC, Özçelik T, Campbell SS and Young MW (2017) Mutation of

- the human circadian clock gene *Cry1* in delayed sleep phase disorder. *Cell* 169:203-215.
- Pittendrigh CS (1954) On temperature independence in the clock system controlling emergence time in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 40:1018-1029.
- Plautz JD, Straume M, Stanewsky R, Jamison CF, Brandes C, Dowse HB, Hall JC and Kay SA (1997) Quantitative analysis of *Drosophila period* gene transcription in living animals. *Journal of Biological Rhythms* 12:204-217.
- Plautz JD, Kaneko M, Hall JC and Kay SA (1997) Independent photoreceptive circadian clocks throughout *Drosophila*. *Science* 278:1632-1635.
- Price JL, Blau J, Rothenfluh A, Abodeely M, Kloss B and Young MW (1998) double-time is a novel *Drosophila* clock gene that regulates PERIOD protein accumulation. *Cell* 94:83-95.
- Ralph MR and Menaker M (1988) A mutation of the circadian system in golden hamsters. *Science* 241:1225-1227.
- Ralph MR, Foster RG, Davis FC and Menaker M (1990) Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science* 247:975-978.
- Reddy P, Zehring WA, Wheeler DA, Pirrotta V, Hadfield C, Hall JC and Rosbash M (1984) Molecular analysis of the period locus in *Drosophila melanogaster* and identification of a transcript involved in biological rhythms. *Cell* 38:701-710.
- Reddy P, Jacquier AC, Abovich N, Petersen G, Rosbash M (1986) The period clock locus of *D. melanogaster* codes for a proteoglycan. *Cell* 46:53-61.
- Renn SC, Park JH, Rosbash M, Hall JC and Taghert PH (1999) A pdf neuropeptide gene mutation and ablation of PDF neurons each cause severe abnormalities of behavioral circadian rhythms in *Drosophila*. *Cell* 99:791-802.
- Reppert SM, Tsai T, Roca AL and Sauman I (1994) Cloning of a structural and functional homolog of the circadian clock gene period from the giant silkworm *Antheraea pernyi*. *Neuron* 13:1167-1176.
- Reppert SM and Weaver DR (2001) Molecular analysis of mammalian circadian rhythms. *Annual Review of Physiology* 63:647-676.
- Robles MS, Boyault , Knutti D, Padmanabhan K and Weitz CJ (2010) Identification of RACK1 and proteinase C1 as integral components of the mammalian circadian clock *Science* 327:463-466.
- Robles MS, Humphrey SJ and Mann M (2017) Phosphorylation is a central mechanism for circadian control of metabolism and physiology. *Cell Metabolism* 25:118-127.
- Rosbash M (2015) Ronald J Konopka (1947-2015) *Cell* 161:187-188.
- Rutila JE, Zeng H, Le M, Curtin KD, Hall JC and Rosbash M (1996) The *tim^{SL}* mutant of the *Drosophila* rhythm gene *timeless* manifests allele-specific interactions with period gene mutants. *Neuron* 17:921-929.
- Rutila JE, Suri V, Le M, So WV, Rosbash M and Hall JC (1998) CYCLE is a second bHLHPAS clock protein essential for circadian rhythmicity and transcription of *Drosophila* period and timeless. *Cell* 93:805-14.
- Saez L and Young MW (1988) In situ localization of the per clock protein during development of *Drosophila melanogaster*. *Molecular and Cellular Biology* 8:5378-5385.
- Saez L, Young MW, Baylies MK, Gasic G, Bargiello TA and Spray DC (1992) Per-no link to gap junctions. *Nature* 360:542.
- Saez L and Young MW (1996) Regulation of nuclear entry of the *Drosophila* clock proteins period and timeless. *Neuron* 17:979-990.
- Schaffer R, Ramsay N, Samach A, Corden S, Putterill J, Carre IA and Coupland G (1998) The late elongated hypocotyl mutation of *Arabidopsis* disrupts circadian rhythm and the photoperiodic control of flowering. *Cell* 93:1219-1229.
- Sehgal A, Man B, Price JL, Vosshall LB and Young MW (1991) New clock mutations in *Drosophila*. *Annals of the New York Academy of Science* 618:1-10.
- Sehgal A, Price JL, Man B and Young MW (1994) Loss of circadian behavioral rhythms and per RNA oscillations in the *Drosophila* mutant *timeless*. *Science* 263:1603-1606.
- Sehgal A, Rothenfluh-Hilfiker A, Hunter-Ensor M, Chen Y, Myers MP and Young MW (1995) Rhythmic expression of *timeless*: a basis for promoting circadian cycles in period gene autoregulation. *Science* 270:808-810.
- Shearman LP, Zylka MJ, Weaver DR, LKolakowski Jr. LF and Reppert SM (1997) Two *period* homologs: circadian expression and photic regulation in the suprachiasmatic nuclei. *Neuron* 19:1261-1269.
- Shin HS, Bargiello TA, Clark BT, Jackson FR and Young MW (1985) An unusual coding sequence from a

- Drosophila clock gene is conserved in vertebrates. *Nature* 317: 445–448.
- Siwicki KK, Eastman C, Petersen G, Rosbash M and Hall JC (1988) Antibodies to the period gene product of *Drosophila* reveal diverse tissue distribution and rhythmic changes in the visual system. *Neuron* 1:141–50.
- Stanewsky R, Jamison CF, Plautz JD, Kay SA and Hall JC (1997) Multiple circadian-regulated elements contribute to cycling *period* gene expression in *Drosophila*. *European Molecular Biology Organization Journal* 16:5006-5018.
- Stanewsky R, Kaneko M, Emery P, Beretta B, Wager-Smith K, Kay SA, Rosbash M and Hall JC (1998) The *cry^b* mutation identifies cryptochrome as a circadian photoreceptor in *Drosophila*. *Cell* 95:681–692.
- Stephan, FK and Zucker I (1972) Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 69:1583-1586.
- Stern DL (2014) Reported *Drosophila* courtship song rhythms are artifacts of data analysis. *BioMedCentral Biology* 12:38.
- Stern DL, Clemens J, Coen P, Calhoun AJ, Hogenesch JB, Arthur BJ and Murthy M (2017) Experimental and statistical reevaluation provides no evidence for *Drosophila* courtship song rhythms. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 114:9978-9983.
- Sulzman F, Ellman D, Fuller C, Moore-Ede M and Wassmer G (1984) *Neurospora* circadian rhythms in space: a reexamination of the endogenous-exogenous question. *Science* 225:232-34.
- Sulzman F, Ellman D, Fuller C, Moore-Ede M and Wassmer G (1984) *Neurospora* circadian rhythms in space: a reexamination of the endogenous-exogenous question. *Science* 225:232–34.
- Sun ZS, Albrecht U, Zhuchenko O, Bailey J, Eichele G and Lee CC (1997) *RIGUI*, a putative mammalian ortholog of the *Drosophila period* gene. *Cell* 90:1003-1011.
- Szymanski JS (1918) Versuche über Aktivität und Ruhe bei Säuglingen. *Pflüger's Archive für die gesamte Physiologie des Menschen und der Tiere* 172:424–429.
- Syed S, Saez L and Young MW (2011) Kinetics of doubletime kinase dependent degradation of the *Drosophila* period protein. *Journal of Biological Chemistry* 286:27654-27662.
- Tei T, Okamura H, Shigeyoshi Y, Fukuhara C, Ozawa R, Hirose M and Sakaki Y (1997) Circadian oscillation of a mammalian homologue of the *Drosophila period* gene. *Nature* 389:512-516.
- Tinbergen N (1951) *The study of instinct*. Clarendon Press, Oxford.
- Toh KL, Jones CR, He Y, Eide EJ, Hinz WA, Virshup DM, Ptáček LJ and Fu YH (2001) An hPer2 phosphorylation site mutation in familial advanced sleep phase syndrome. *Science* 291:1040-1043.
- Tso CF, Simon T, Greenlaw AC, Puri T, Mieda M and Herzog ED (2017) Astrocytes regulate daily rhythm in the suprachiasmatic nucleus and behavior. *Current Biology* 27:1055-1061.
- Turek FW, Joshu C, Kohsaka A, Lin E, Ivanova G, McDearmon E, Laposky A, Losee-Olson S, Easton A and Jensen DR (2005) Obesity and metabolic syndrome in circadian Clock mutant mice. *Science* 308:1043-1045.
- Vanselow K, Vanselo JT, Westermarck PO, Reischl S, Maier B, Korte T, Hermann A, Herzog H, Schlosser A and Kramer A (2006) Differential effects of PER2 phosphorylation: molecular basis for the human familial advanced sleep phase syndrome (FASPS). *Genes and Development* 20:2660-2672.
- Vielhaber E, Eide E, Rivers A, Gao Z-H and Virshup DM (2000) Nuclear entry of the circadian regulator mPer1 is controlled by the mammalian casein kinase I epsilon. *Molecular Cell Biology* 20:4888-4899.
- Vitaterna MH, King DP, Chang A-M, Kornhauser JM, Lowrey PL, McDonald JD, Dove WF, Pinto LH, Turek FW and Takahashi JS (1994) Mutagenesis and mapping of a mouse gene, Clock, essential for circadian behavior. *Science* 264:719-725.
- von Bayern AMP, Heathcote RJP, Rutz C and Kacelnik A (2009) The role of experience in problem solving and innovative tool use in crows. *Current Biology* 19:1965-1968.
- Vosshall LB, Price JL, Sehgal A, Saez L and Young MW (1994) Block in nuclear localization of period protein by a second clock mutation, timeless. *Science* 263:1606-1609.
- Vosshall L and Young MW (1995) Circadian rhythms in drosophila can be driven by period expression in a restricted group of central brain cells. *Neuron* 15:345-360.
- Wang ZY and Tobin EM (1998) Constitutive expression of the *CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1)* gene disrupts circadian rhythms and suppresses its own expression. *Cell* 93:1207-1217.
- Watson JB and Rayner R (1920) Conditioned emotional reactions. *Journal of Experimental Psychology* 3:1-14.

- Welsh DK, Takahashi JS and Kay SA (2010) Suprachiasmatic nucleus: cell autonomy and network properties. *Annual Review of Physiology* 72:551-577.
- Wheeler DA, Kyriacou CP, Greenacre ML, Yu Q, Rutila JE, Rosbash M and Hall JC (1991) Molecular transfer of a species-specific behavior from *Drosophila simulans* to *Drosophila melanogaster*. *Science* 251:1082-1085.
- Woelfle MA, Ouyang Y, Phanvijhitsiri K and Johnson CH (2004) The adaptive value of circadian clocks: an experimental assessment in cyanobacteria. *Current Biology* 14:1481-1486.
- Xu Y, Padiath QS, Shapiro RE, Jones CR, Wu SC, Saigoh N, Saigoh K, Ptáček LJ and Fu YH (2005) Functional consequences of a CKI δ mutation causing familial advanced sleep phase syndrome. *Nature* 434:640-644.
- Xu Y, Toh KL, Jones CR, Shin JY, Fu YH and Ptáček LJ (2007) Modeling of a human circadian mutation yields insights into clock regulation by PER2. *Cell* 128:59-70.
- Yang Y, Wang Y, Li S, Xu Z, Li H, Ma L, Fan J, Bu D, Liu B, Fan Z, Wu G, Jin J, Ding B, Zhu X and Shen Y (2004). Mutations in SCN9A, encoding a sodium channel α subunit, in patients with primary erythralgia. *Journal of Medical Genetics* 41:171-174.
- Young MW and Judd BH (1978) Nonessential sequences, genes, and the polytene chromosome bands of *Drosophila Melanogaster*. *Genetics* 88:723-742.
- Yu Q, Jacquier AC, Citri Y, Hamblen M, Hall JC and Rosbash M (1987a) Molecular mapping of point mutations in the period gene that stop or speed up biological clocks in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 84:784-788.
- Yu Q, Colot HV, Kyriacou CP, Hall JC and Rosbash M (1987b) Behavior modification by in vitro mutagenesis of a variable region within the *period* gene of *Drosophila*. *Nature* 326:765-769.
- Zehring WA, Wheeler DA, Reddy P, Konopka RJ, Kyriacou CP, Rosbash M and Hall JC (1984) P element transformation with *period* locus DNA restores rhythmicity to mutant, arrhythmic *Drosophila melanogaster*. *Cell* 39:369-376.
- Zerr DM, Hall JC, Rosbash M and Siwicki KK (1990) Circadian fluctuations of period protein immunoreactivity in the CNS and the visual system of *Drosophila*. *Journal of Neuroscience* 10:2749-2762.
- Zhang EE, Liu AC, Hirota T, Miraglia LJ, Welch G, Pongsawakul PY, Liu X, Atwood A, Huss JW 3rd, Janes J, Su AI, Hogenesch JB and Kay SA (2009) A genome-wide RNAi screen for modifiers of the circadian clock in human cells. *Cell* 139:199-210.
- Zimmerman NH and Menaker M (1979) The pineal gland: a pacemaker within the circadian system of the house sparrow. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 76:999-1003.
- Zwiebel LJ, Hardin PE, Liu X, Hall JC and Rosbash M (1991) A post-translation mechanism contributes to circadian cycling of a period-galactosidase fusion protein. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 88:3882-3886.

阅读

- Konopka RJ and Benzer S (1971) Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 68:2112-2116.
- Vitaterna MH, King DP, Chang A-M, Kornhauser JM, Lowrey PL, McDonald JD, Dove WF, Pinto LH, Turek FW and Takahashi JS (1994) Mutagenesis and mapping of a mouse gene, Clock, essential for circadian behavior. *Science* 264:719-725.