

探索決定生命節奏的機制

時鐘是近代文明的產物，鐘擺、發條、齒輪、擒縱器乃至不斷在電壓驅使下震動的石英晶體都是我們這個高度人工化的機械世界的典型部件。它們和大自然，特別是生命本身，好像是毫不相干的。雖然人和昆蟲都依日夜作息，候鳥和花草依四季時序而有南征北返和榮枯——這就是所謂生物的晝夜節律(circadian rhythm)和季節規律(circannual rhythm)，但這些似乎只是對外界明暗寒暑變化的自然生理反應，和獨立計時的能力是完全不一樣的。

其實，生命的結構比我們一般想像的要奧妙、精巧和複雜得多。生物學家早就已經知道，所有高等的真核細胞生物(eukaryotic organism)和大部分較低等的原核細胞生物(prokaryotic organism)，都具有獨立計時的能力。也就是說，它們的生理節奏(例如作息進食的時刻)雖然也受外界刺激影響，但在某一段時間內卻又頗為獨立和固定，似乎是由一個內在時鐘決定。問題是：這內在時鐘的生理基礎是甚麼？特別是：它核心的定頻器(pacemaker，例如鐘擺系統或石英振盪器)構造如何？是否一種十分精巧的大腦或神經器官？這問題的答案現在已逐漸露出端倪了。令人驚奇的是：生物的計時機制並非甚麼複雜器官，卻是由細胞核中某幾個特殊基因的作用造成。因此，它很可能是一種普遍性(universal)，在所有生物都大致相同的機制。

一 周期基因

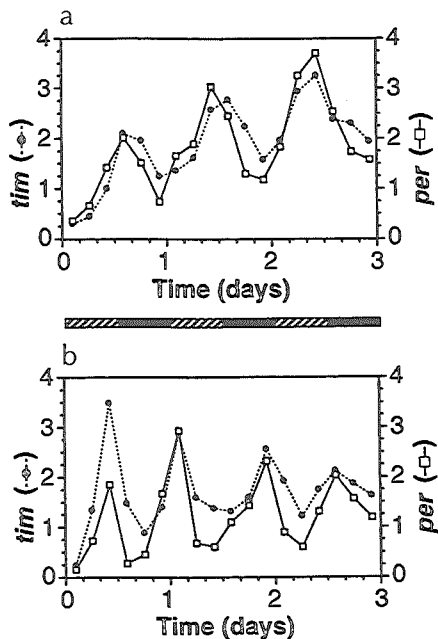
這些基因最早發現的，是由加州理工學院的賓澤爾(Seymour Benzer)^①和干奴卡(Ron Konopka)在果蠅(*Drosophila Melanogaster*)

體中所找到的周期(period)基因(簡稱 *per*)。從它所複製出來的PER蛋白質可以觀察到兩個現象：第一，細胞的PER含量(那也代表 *per* 的活動水平)有24小時周期變化；第二，*per* 基因的變異會改變果蠅活動的周期，令其延長、縮短，甚至消失。這樣，就可以初步判定，*per* 基因和計時機制密切相關。這一發現，已是1971年的事了。

但 *per* 基因究竟如何產生一個固定，可以用以計時的周期呢？這部分可能是由於它所產生的PER蛋白質的「負反饋」(negative feedback)作用造成，也就是說，PER在細胞質的濃度增加之後會反過來抑制 *per* 基因的產製作用；同時，PER並不穩定，*per* 不活動的話，PER便會自動分解、消失，從而解除對 *per* 的抑制。但是雖然PER的確證明有負反饋現象，這卻還不足以造成它濃度的周期循環，因為用簡單數學可以證明，單純負反饋只會將PER濃度維持在一個穩定平衡點，而並不會令之不斷作周期性擺動。

二 搜尋恆定基因

這一困難直到90年代才由於另一個相關基因，即所謂恆定(timeless)基因(簡稱 *tim*)的發現而大體得到解決^②。這發現是三個研究小組共同努力的結果。首先，洛克菲勒大學楊格(M. Young)的小組通過研究行為節奏異常的果蠅找到 *tim* 基因的突變型，並且將之「克隆」(clone)和「定序」(sequence，即決定其核酸及氨基酸序列結構)。同時，哈佛大學醫學院的韋茲(Charles Weitz)採用所謂「酵母雙雜交篩選法」(yeast two-hybrid screen)來尋找 *tim* 基因



Reprinted with permission from *Science* 270, 809.
Copyright 1995 American Association for the Advancement of Science.

圖1 果蠅頭部所含由 *tim* 和 *per* 基因所釋放的RNA分量(相對於試劑分量)的周期性變化。(a) 正常果蠅：周期為1日；(b) 基因為 *per^s* 的變異果蠅：周期為17-18小時(見下文)。兩圖間的白、黑橫分別表示日、夜。

本身。這方法的中心意念是既然已知的PER蛋白質和找尋中的TIM蛋白質(即 *tim* 基因的產物)都與「生物鐘」有密切關係，那麼兩者應該會結合，形成二聚複合體(dimer)。因此可以用已知的PER為「餌」，去「誘釣」未知的TIM。果然，韋茲小組在測試了果蠅體內約二千萬種不同mRNA(即信使核糖核酸，它是根據基因序列而產製蛋白質的關鍵中介生物分子)之後，發現其中只有48種蛋白產物能和PER形成二聚體。然而，這其中有那些的確和「生物鐘」有關呢？

這時，楊格小組終於找到了一個特殊基因 *x*，它比 *tim* 基因的突變型只多一個關鍵的產製段：而且，賓州大學的西加(Amita Sehgal)(她是楊格以前的「博士後」助手)更證明 *x* 所製的蛋白質和PER一樣，有24小時周期變化：還有，兩者的變化是緊密同步的

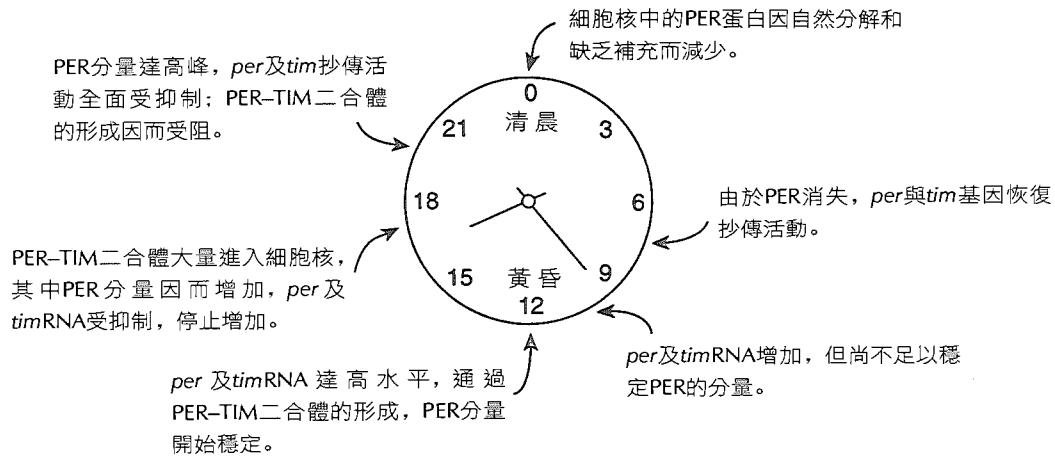
(圖1)。因此 *x* 很可能就是 *tim*。最後，韋茲小組把他們已經圈定的48種蛋白質與 *x* 的序列比較，發現其中有16種的確與 *x* 部分序列相同，這樣才終於通過近乎大海撈針式的搜索，把 *tim* 基因找到③。

三 生物定頻器模型

然而，找尋 *tim* 雖然困難，找尋的方法本身，卻為生物計時機制提供了重要線索：這線索就是PER和TIM蛋白質之能夠結合為二聚體。順着這線索，楊格、韋茲和西加提出了這樣一個生物定頻器模式的構想：PER和TIM蛋白質都各自對本身的基因 *per* 和 *tim* 有抑制作用，也就是各自形成一個負反饋系統，這兩個系統之所以會產生周期性變化是由於它們有下列耦合(coupling)：PER不能單獨進入細胞核，而必須和TIM在細胞質中結合，成為二聚體之後，才能一同進入細胞核，各自抑制本身的基因。

這個耦合所產生的關鍵性改變是：在細胞質中PER和TIM這兩種蛋白質必須各自達到相當高濃度才有機會相遇和結合成二聚體，所以它們進入細胞核並抑制本身基因的時間延遲了，這樣就會在某一時段產生過量的PER，然後在下一時段形成過分抑制作用，從而產生周期性變化，成為一個生物定頻器(圖2)。用數學語言來說，原來PER和TIM的濃度所各自依循的是獨立的一階線性微分方程，各有常數解；二者耦合之後則成為高階非線性方程，那就有周期解了。

這個模式目前還只是一個假設，但也有若干支持的證據。其中最主要的是韋茲小組發現PER有一個變異形態 PER^L (L指long，即「長周期」)，它和TIM的結合比較困難、緩慢，這正好可以解釋具 *per^L* 基因的變異果蠅有長於24小時(達到29小時)的晝夜周期。同樣，另一



Reprinted with permission from *Science* 270, 810. Copyright 1995 American Association for the Advancement of Science.

圖2 解釋 *per* 與 *tim* 基因的相互作用如何通過耦合負反饋產生晝夜周期的可能機制。

種變異PER^S蛋白質(S指short, 即「短周期」)結合力比正常的更強, 因而令果蠅的生理周期縮短到17-18小時。換而言之, PER和TIM這兩種蛋白的結合能力, 是決定晝夜周期長度的一個關鍵因素。

四 展 望

當然, 這一證據還不能確實證明生物定頻器的機制正如上述假設一樣。例如TIM蛋白質的各種性質、它與PER相互作用的細節、它在果蠅體內濃度的晝夜變化等等, 都還有待測度和研究。從更廣角度來看, 生物鐘應當是一個完整的系統: 維持有固定周期的振動訊號是它作為生物時計的核心部分: 除此之外, 它還須要利用環境因素(例如光暗)令生物各部分細胞的生物鐘同步(synchronous), 並且要用這鐘的周期訊號對各種生理現象起調節作用。例如, 就高等的哺乳類動物而言, 生物鐘的主訊號是產生於丘腦下區中心(hypothalamic center), 而它振動的起點或相(phase), 則受眼目所感到的日照光暗影響。由於時差(jet lag)所引起的暫時生理紊亂, 便反映了生物鐘

的「相移」(phase shift)過程。至於植物和候鳥時鐘(它的周期長得多, 所依循的是季節規律)的起點, 則往往受日照長短影響^④。

*per*和*tim*這兩個可能對所有生物都有普遍意義的基因無疑是生物時鐘的基本部件, 正如機械鐘的鐘擺或電子鐘的石英震盪器一樣。至於鐘的同步機制和調節機制如何, 很可能因生物類別而異, 那就都有待進一步深入研究了。

——麥繼強教授

香港中文大學生物系

① 賓澤爾在60年代以研究T4噬菌體的rII基因著名, 跟着得到美國國家科學基金會的有力資助, 轉向果蠅生物鐘系統的研究。經過五、六年努力, 才找到*per*基因變異型系列。而這一成果的真正發展, 卻要等到20年後。

② 本文主要取材於*Science* 270, 732 (November 3, 1995) M. Baringnaa 的介紹以及 L. Wetterberg: *Light and Biological Rhythms in Man* (New York: Pergamon Press, 1993)。

③ 報導上述發現的三篇論文分別刊載於*Science* 270, 805; 808; 811 (November 3, 1995)。

④ 關於候鳥生理的季節規律(circannual rhythms)研究, 可參閱Eberhard Gwinner, *Scientific American* (April 1986), pp. 76-86。