History of circadian rhythm research and its molecular mechanisms

Circadian Oscillation은 지금으로부터 약 300년전 1729년 프랑스 과학자 Jean Jacques Dortous de Mairan의 연구에 의해 처음 발견되었다. 그는 미모사 잎이 아침에 열리고 저녁에 닫히는 것에 흥미를 느껴 미모사 식물을 24시간 내내 어두운 방에 두고 미모사 잎의 개폐성을 관찰하였다. 빛이 없는 경우에도 일정한 시간이 되면 잎이 열리고 닫히는 것을 확인하면서, 식물 자체적으로 inner clock을 가지고 있으며, 이를 통해 햇빛이 없어도 주기적으로 잎을 열고 닫을 수 있다고 추측하였다. 1832년 스위스 식물학자 Augustin Pyramus de Candolle은 미모사 잎 개폐 주기가 24시간보다 짧다는 것을 발견하였다. 잎 개폐 주기가 지구의 자전주기인 24시간과 일치하지 않기 때문에, circadian rhythm은 환경적 요인이 아닌 식물에 내재된 inner clock에 의해 조절됨을 입증하였다. 이후 1930년대 독일 생물학자 Erwin Bunning은 지속적인 빛 혹은 어둠에 노출된 콩의 잎 움직임이 일정한 주기를 가지는 것을 관찰하였다. 이어서, 다른 주기를 가지는 식물을 교배하여 자식 세대의 주기를 관찰하는 교차 실험을 시행하였다. 실험 결과 다음 세대는 부모 세대 주기의 중간값의 주기를 가졌으며, 이를 통해 Circadian rhythm이 유전됨을 증명하였다. 이후 1950년대 독일의 생물학자 Jurgen Walther Ludwig Aschoff는 인간의 수면, 체온, 소변 배출량 등을 관찰하면서 인간도 24시간 주기를 갖는 내재된 oscillator를 가지고 있음을 증명하였다. 또한, circadian rhythm은 체내에서 발생하지만, 빛과 같은 외부 환경적 요인들에 맞춰 동기화되는 것을 발견하였다. 이런 외부 환경적 요인을 Zeitigeber라고 지칭하였다. 1971년 Seymour Benzer와 Ronald Konopka는 fruit fly의 일부 gene에서 mutation이 일어나면 circadian rhythm에 장애가 오는 것을 관찰하면서, circadian rhythm을 조절하는 gene을 발견하였고, 이 gene을 “period” gene이라고 명명하였다. 이후 1984년 Jeffery Hall, Michaell Rosbash 그리고 Michael Young은 PER gene을 분리하는데 성공하였으며, PER protein이 낮에는 분해되고 밤에는 생성되는 일주기 현상을 발견했다. PER protein level이 24시간 주기를 가지는 것을 통해 Circadian rhythm이 circadian oscillator과 동기화되어 있음을 입증하였다. PER protein이 circadian oscillation에 관여한다는 것이 입증된 이후로, PER protein의 circadian oscillation을 설명하는 여러 모델이 제안되었다. PER protein이 pump로 작용해 membrane gradient를 형성하고 일정 임계치에 이르면, 빛에 반응하는 channel을 통해 gradient가 소멸하는 membrane gradient model과 PER protein이 proteoglycan으로 작용하여, 세포들을 모아 gap junction을 통해 세포간 inter-cellular connection을 형성한다는 model이 제시되었다. 1992년 PER protein은 전사수준에서 조절됨이 밝혀지면서 Jeffery Hall와 Michael Rosbash는 PER protein이 축적되면 PER gene의 activity를 막는다는 Inhibitory feedback loop model을 제안하였다. 이 model에 따르면, 세포질에서 합성되는 PER protein은 PER gene의 활성을 막기 위해 핵 내부로 이동해야 한다. 하지만, 세포질에 있는 물질이 핵 내로 이동하기 위해선 NLS (nuclear localization signal) domain이 필요하다. NLS domain이 nuclear pore complex에 결합해야 핵 내로 선택적 이동을 할 수 있기 때문이다. 이 의문은 1994년 Michael Young은 다른 Clock gene인 TIM gene (timeless)을 발견하면서 풀리기 시작하였다. 그는 NLS domain을 가진 TIM protein이 PER protein과 결합하여 핵 내로 이동한 후 Per protein의 self-regulation으로 인해 24시간 주기로 양적변동을 일으킨다는 것을 알아냈다. 1998년 Jeffery Hall와 Michael Rosbash는 Drosophila는 Cryptochrome (CRY)의 photoreceptor로써 작용한다는 것을 발견하였으며 같은 해 Michael Young과 함께 DBT gene을 발견하면서, 어떻게 Circadian oscillator가 약 24시간 주기를 유지하는지 밝혀냈다. 이후 Joseph Takahashi는 생쥐로부터 특정 gene에 mutation을 일으킨 후 행동 패턴을 관찰함으로써 포유류의 Clock gene을 발견하였다. 이후 발견된 Cycle gene으로부터 생성된 BMAL1 protein이 Clock protein과 결합하여 heterodimer를 형성해 포유류 PER gene의 enhancer인 E-box에 결합하여 발현을 유도한다는 것이 밝혀졌다. 이어서 Jeffery Hall와 Michael Rosbash는 Drosophila에서 Clock protein과 BMAL1 protein의 Homolog인 Clk protein과 Cyc protein을 발견했다. 이 연구 결과는 Circadian clock이 Transcription-Translation Feedback Loop(TTFL) model에 의해 조절된다는 것을 지지하는 중요한 근거가 되었다.

Drosophila의 circadian rhythm의 molecular mechanism은 세포 수준에서 Transcription-translation Feedback Loop(TTFL)에 의해 조절된다. Drosophila는 포유류와 마찬가지로 PER gene 전사 조절이 circadian rhythm에 핵심적인 역할을 담당한다. PER gene과 TIM gene은 Clock gene이 발현되어 생성된 Clk protein과 Cycle gene으로부터 생성된 Cyc protein이 결합하여 생성된 heterodimer에 의해 조절된다. 이 heterodimer에는 PAS domain과 BHLH(Basic helix-loop-helix) domain이 존재하며, BHLH domain은 DNA binding domain으로 작용하여, PER gene과 TIM gene의 enhancer인 E-box에 직접적으로 결합하여 PER gene의 전사를 유도할 수 있게 해준다. Clk/Cyc heterodimer는 PER gene 이외에 vri (vrille) gene과 pdp1ε (Par domain protein 1ε) gene의 전사를 유도한다. 이 gene으로부터 생성된 vri protein과 pdp1ε protein은 Clk gene의 전사를 각각 억제, 유도한다. 이는 Clk mRNA이 24시간 주기로 양적 변동을 일으키게끔 해준다. 전사 과정을 통해 생성된 PER mRNA과 TIM mRNA는 세포질로 빠져나와 번역 과정을 통해 PER protein과 TIM protein을 합성한다. TIM protein은 PER protein의 PAS domain과 상호작용하여 PER protein을 안정화시킨다. DBT(doubletime) gene으로부터 합성된 DBT protein은 protein kinase로 작용해 PER protein을 인산화시킨다. 인산화된 PER protein은 proteasome에 의해 분해된다. 이 과정은 PER mRNA와 PER protein 축적에 시간차를 생기도록 기여하며, circadian rhythm의 주기가 24시간이 될 수 있게 해준다. TIM protein에는 세포질에서 합성된 단백질을 핵 내로 이동시키기 위해 signal 역할을 하는 아미노산 서열인 NLS (nuclear localization sequence)가 있기 때문에, PER protein과 함께 핵 내로 이동해 자신들의 유전자 발현을 조절하는 Negative feedback loop를 형성한다. 다만, PER protein은 DNA binding domain인 BHLH domain이 없기 때문에 직접적으로 전사 조절 부위에 결합하지 못한다. 그래서, E-box에 결합할 수 있는 Clk protein의 PAS domain과 PER protein의 PAS domain이 상호작용하여 Clk protein, Cyc protein으로 구성된 heterodimer의 활성을 억제함으로써 PER gene 의 전사를 억제한다. 이후, CKL/CYC heterodimer는 E-box에서 제거되고 PER gene과 TIM gene의 전사는 종료된다. CLK protein은 아직 알려지지 않은 Kinase에 의해 인산화된 후 DBT(doubletime) protein에 의해 모집되어 분해된다.

포유류의 circadian rhythm mechanism은 drosophila의 mechanism과 비슷하다. 다만, Drosophila의 Clk protein과 cyc protein의 homolog인 Clock protein과 BMAL1 protein이 PER gene의 전사를 유도하는 전사 인자로 사용되며, Cryptochrome(CRY)1, CRY2 protein이 TIM protein 대신 PER protein과 결합하여 핵 내부로 이동한다. 또한, 포유류에는 Drosophila의 PER protein의 homolog protein인 PER1, PER2, PER3 protein이 있다. DBT protein 대신 CKIε (casein kinase 1 epsilon) protein이 PER protein에 결합해 PER protein을 인산화시킨다. Clock/BMAL1 heterodimer 역시 Per gene 이외에 Rora gene과 Rev-erbα gene의 전사를 유도한다. RoRα protein과 REV-ERBα protein은 BMAL1 gene의 전사를 유도, 억제한다. Circadian rhythm을 조절하는 유전자 혹은 전사 인자 등의 차이는 조금씩 있지만, 대부분의 생물은 비슷한 mechanism을 통해 circadian rhythm을 조절한다. 따라서, TTFL 은 보편적으로 circadian rhythm을 조절하는 mechanism으로 받아들여지고 있다.

체내 circadian clock은 세포, 조직, 개체 수준으로 circadian rhythm을 만들어내며 이는 TTFL에 의한 feedback을 통해 조절된다. 개체 수준에서 포유류는 circadian oscillation을 담당하는 central circadian clock과 peripheral circadian clock이 존재한다. 시상하부에 존재하는 Suprachiasmatic nucleus (SCN)에는 neuronal circadian oscillator가 존재하며, 이는 Master circadian clock으로 작용한다. Central circadian clock은 내재적인 circadian rhythm을 가지고 있으면서, 끊임없이 빛과 같은 환경 변화에 동기화하면서 circadian rhythm을 조절한다. 빛이 망막을 통해 들어오면 신호가 SCN으로 가며, SCN은 생명체 여러 부위에 국부적인 circadian rhythm을 조절하기 위해 Humoral factor 또는 peripheral autonomic nervous system을 이용하여 신호를 보낸다. Peripheral circadian clock은 master circadian clock과 독립적으로 circadian oscillator를 발현하기도 한다. 또한, Peripheral circadian clock은 주변 환경 신호에 의해 SCN과 동기화되기도 한다. Peripheral circadian clock은 호르몬 방출, 포도당 글리코젠 전환 등의 여러 물질대사를 주기적으로 조절하며, 이는 궁극적으로 SCN에 영향을 끼친다. 따라서, 체내 존재하는 여러 circadian clock은 서로 상호작용울 통해 동기화하면서 circadian rhythm을 조절한다.

<References>

Huang, R.-C. (2018). *The discoveries of molecular mechanisms for the circadian rhythm: The 2017 Nobel Prize in Physiology or Medicine. Biomedical Journal, 41(1), 5–8.* doi:10.1016/j.bj.2018.02.003

Wulund, L., & Reddy, A. B. (2015). *A brief history of circadian time: The emergence of redox oscillations as a novel component of biological rhythms. Perspectives in Science, 6, 27–37.* doi:10.1016/j.pisc.2015.08.002

Crane, B. R., & Young, M. W. (2014). *Interactive Features of Proteins Composing Eukaryotic Circadian Clocks. Annual Review of Biochemistry, 83(1), 191–219.* doi:10.1146/annurev-biochem-060713-035644

Patke, A., Young, M. W., & Axelrod, S. (2019). *Molecular mechanisms and physiological importance of circadian rhythms. Nature Reviews Molecular Cell Biology.* doi:10.1038/s41580-019-0179-2

Lin, C., Top, D., Manahan, C. C., Young, M. W., & Crane, B. R. (2018). *Circadian clock activity of cryptochrome relies on tryptophan-mediated photoreduction. Proceedings of the National Academy of Sciences, 115(15), 3822–3827.* doi:10.1073/pnas.1719376115