

哺乳類 *Period* の真の機能とは何か

明石 真[✉]

山口大学 時間学研究所 時間生物学研究室

2017年10月、最初の時計遺伝子としてショウジョウバエの *Period* (*Per*) をクローニングした米国の3名の研究者へノーベル賞が贈られたことは記憶に新しい。この研究成果から十数年を経て、1997年によろしく、ショウジョウバエ *Per* のホモログが哺乳類でクローニングされた。その後、そのコードするタンパク質である *Period* (*PER*) の機能解析が急速に進められ、1999年には、その機能は *BMAL1-CLOCK* 転写因子複合体の抑制であると早くも結論づけられ、現在もこれが *PER* の機能だと広く受け入れられている。しかしながら、従来モデルにおいて示される *PER* の機能では説明できない多くの矛盾が存在している。したがって、クローニングされてから20年以上経過した今でも *PER* の真の機能は不明だと言わざるを得ないが、最近になって新たな機能的側面が分子レベルでわかってきた。すなわち、哺乳類の *PER* は *CRY* による転写抑制において緩衝因子として働く側面を持つということが明らかになってきたのである。本稿では、この機能的側面について私たちの研究成果を交えて概説するとともに、この機能の意義についても考察したい。

1. はじめに

1971年、ショウジョウバエにおいて概日リズムの突然変異体が単離され、概日時計が遺伝子による制御を受けていることが示唆された¹。それから13年後の1984年にはその原因遺伝子 *Per* が同定され、いよいよ概日時計の分子生物学が花開くこととなった^{2,3}。多くの場合、ショウジョウバエの遺伝子がクローニングされれば、速やかに哺乳類のオルソログが発見されることが多い。すなわち、種間で保存された生理機能を司る遺伝子ならば、遺伝子構造の保存性が高い場合が多いため、例えば、核酸のハイブリダイゼーションのような物理的相互作用の性質を利用して単離できる。概日時計は種に関わらずほとんどの生物が共通にもつ普遍的生理機能であることから、当時の研究者はほどなくして哺乳類の *Per* が単離されると心待ちにしたのではないだろうか。

ところが、哺乳類の最初の *Per* が同定されるまで、さらに13年後の1997年まで待つこととなったのである⁴。意外なことに、ショウジョウバエの *dPer* と哺乳類の *Per1* の構造的類似性は低かった。最もアミノ酸配列の類似性が高かった *PAS* ドメインにおいても、哺乳類の *PER1* (本稿ではタンパク質を大文字で、核酸は小文字斜体で示すことで区別する) と *dPER* の配列は41%しか一致しなかったのである。核酸レベルにおける両者の一致率はずっと低いと想定される。

これに対し、例えば、*MAP* キナーゼ (*ERK*) のアミノ酸配列を哺乳類とショウジョウバエで比較した場合、全長にわたるアミノ酸の同一性が80%にも及ぶことから考えて、*PER* の低い同一性は想定外ではないだろうか。このように、配列の類似性が低かったために、従来のクローニング方法では哺乳類の *Per* の単離は成功しなかったが、東京大学のグループが開発した *PCR* 法によってようやく同定に至った。簡単に説明すると、*dPER* の *PAS* ドメインに対応するヒトゲノム中の塩基配列を *Degenerate* プライマーによって増幅することで *Per* に相当する *DNA* 断片を得る方法である。

2. 従来モデルにおける *PER* の機能

Per1 遺伝子がクローニングされるとすぐに、これがコードする時計タンパク質である *PER1* の機能解析がスタートした。既にショウジョウバエの研究において、*dPER* の過剰発現が内在性の *dPer* の発現を抑制することが示唆されており、遺伝子産物が自己の転写を抑制するという「ネガティブフィードバックループ」こそが概日時計の分子メカニズムであると考えられていた⁵。したがって、哺乳類の *PER1* についても、同様な機能が期待されるのは当然の流れであろう。まず、時計転写因子である *BMAL1* と *CLOCK* のヘテロダイマーが認識するエンハンサー配列である *E-*

✉ akashima@yamaguchi-u.ac.jp

box が、*Per1* の転写開始点上流において種間で保存されて存在していることが判明した⁶。さらに、BMAL1 と CLOCK の過剰発現によって E-box を介した *Per1* の転写活性化が確認された。あとは、PER1 が、dPER と同様に、*Per1* の転写を抑制することが示されれば、哺乳類の概日時計においてもネガティブフィードバックモデルが証明される。

しかしながら、実際にレポーターアッセイを試みた研究者は数多くいると思うが、PER1 を過剰に発現させても *Per1* の転写抑制が明確には検出できないのである。私たち自身の実験によると、発現ベクターの量を可能な限り増やして PER1 を細胞内に大量に発現させても、*Per1* の転写抑制は 50% にも至らなかった。これでは、PER1 が転写抑制因子と結論づけるのは難しいのではないかと。それにも関わらず、少なくとも部分的には転写を抑制する機能が示されていることから、PER (以下、PER の表記は PER1 に加え、後にクローニングされる PER2 および PER3 を含む) は BMAL1 と CLOCK に対する抑制因子であるとみなされるようになり、この考え方は今も広く受け入れられている。

3. 明らかとなった矛盾

しかし、その後の多くの報告で、PER が単なる転写抑制因子であるというモデルは徐々に疑わしいものになる。まず、PER に続いて CRY1 および CRY2 が BMAL1 と CLOCK の転写因子活性を抑制する因子であることが報告され、その抑制作用は PER とは比べものにならないほど強かった。例えば、先ほどのレポーターアッセイの例では、微量の CRY 発現ベクターを細胞に導入するだけで、BMAL1 と CLOCK による *Per1* の転写活性化は完全に抑制されることがわかった⁷。これでは転写抑制因子としての PER の存在意義が霞んでしまう。問題はこれだけではない。PER が転写抑制因子であれば、その機能欠損によって E-box を介した転写が活性化して *Per* の mRNA 量は上昇するはずであるが、実際には *Per2* の機能欠損マウスにおいて *Per1* や *Per2* の mRNA 量が顕著に減少することが示された⁸。CRY1 および CRY2 については、そのダブル機能欠損マウスにおいて *Per1* および *Per2* の mRNA 量が恒常的に高く維持されていることが確認されており、転写抑制因子であることは *in vivo* においても明確である⁹。さらに、一部の遺伝子プロモーターを用いたレポーターアッセイにおいて、PER の過剰発現はむしろ転写量を上昇させることが報告された¹⁰。

Per1 の機能欠損マウスでは、後にクローニングされた *Per2* の機能欠損マウスと同様、概日リズムの機能不全が確認されている^{11,12}。さらに *Per1* と *Per2* のダブル機能欠損マウスでは概日リズムはほとんど失われる結果となったことから、PER1 や PER2 が概日時計において必須の因子であることは間違いないはずである。しかし、上述の理由から、PER1 や PER2 が BMAL1 と CLOCK の抑制因子と結論付けることは困難ではないだろうか。

4. 転写抑制の緩衝因子としての PER

私たちは、PER1 や PER2 の過剰発現は *Per1* に対してはわずかな転写抑制効果を示すが、*Per2* に対してはむしろ転写を促進することに注目して研究を進めた¹³。この際、細胞に導入する PER1 や PER2 の発現ベクター量が少なくても転写活性化が起こり、比較的少量のベクターでこの活性化は上限に達したことから、なんらかの内因性の因子を介して間接的に転写を活性化していると考えた。つまり、過剰な外因性の PER1 や PER2 は内因性の CRY (以下、CRY の表記は CRY1 および CRY2 の両方を含むものとする) を抑制したと考えたのである。そこで、私たちは、CRY1 および CRY2 のダブル欠損マウスの胚性線維芽細胞を用いてレポーターアッセイを行い、PER2 による *Per2* の転写活性化が起こらなくなることを確認した (図 1)。

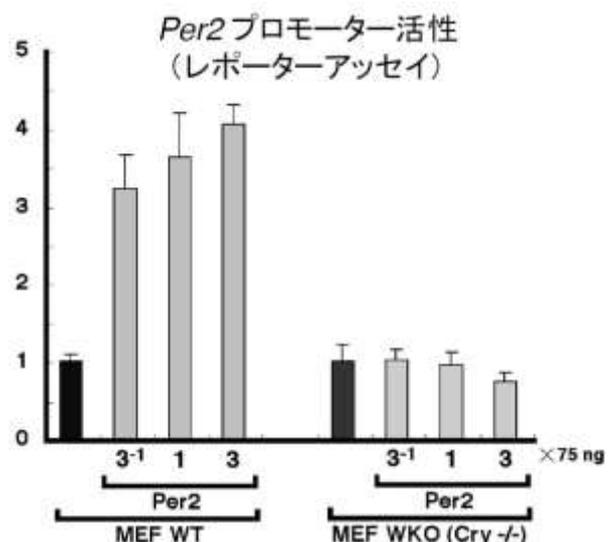


図 1 PER2 は CRY 依存的に *Per2* 発現を活性化する胚性線維芽細胞を用いたレポーターアッセイの結果を示す。野生型の細胞では PER2 の過剰発現は転写を活性化するのに対して (左側のグラフ)、*Cry* ノックアウトマウスの線維芽細胞、すなわち内因性の CRY の非存在下では PER2 による転写活性化が全く起こらない (右側のグラフ)。

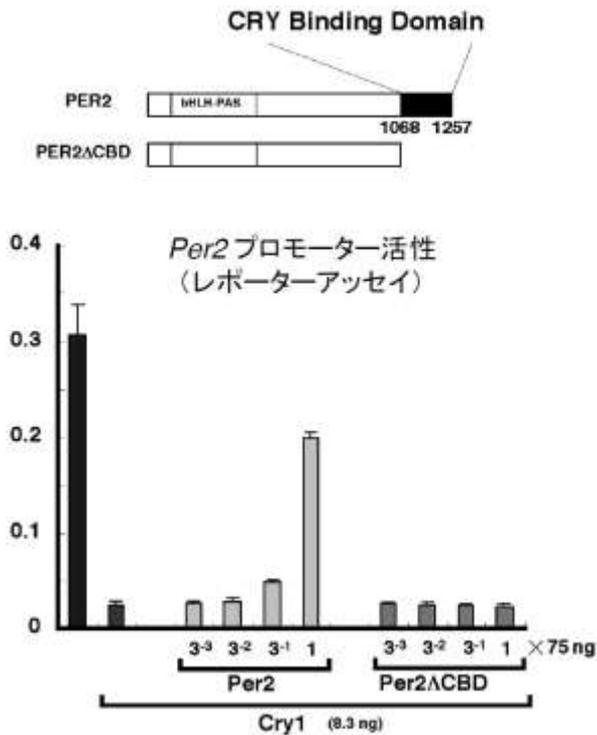


図2 PER2はCRYとの直接結合によってCRYを抑制している

(上) CRY結合ドメインを欠失したPER2の模式図を示す。
 (下) NIH3T3細胞を用いたレポーターアッセイの結果を示す。CRYの過剰発現による転写抑制はPER2の発現によって緩衝されるのに対して(薄いグレーのグラフ)、CRY結合ドメインを欠いたPER2ではこれが全く起こらない(濃いグレーのグラフ)。

次に、NIH3T3細胞(マウス胚性線維芽細胞)によって以下の実験を行った。まず、既知の通りCRYの過剰発現でPer2の転写は強力に抑制されるが、PER2をCRYと同時に過剰発現するとCRYが安定化することにもかかわらず、CRYによる転写抑制が緩和されることがわかった(図2)。PER2によってCRYの細胞内局在が変化したために転写抑制が低下した可能性も考えられたが、この緩衝効果はPER2の核内外局在に依存しないことを、核内外移行シグナル配列を利用した実験で確認している。さらに、CRYとの結合領域(PER2のC末端の約200アミノ酸)を欠失するとPER2はCRYを抑制できなくなり、逆に、このPER2のC末端のみを発現させると全長のPER2よりも強力にCRYを抑制できることもわかった。このことは、全長のPER2においてはC末端が立体的にマスクされており、翻訳後修飾等によってC末端が露出すると、CRYへの抑制機能が上昇することを示唆している。ところで、内在性のCRYの核内移行はPER1やPER2とのダイマー形成に完全に依存することが示されていることから¹⁴、核内における両者の分子数は同等であると想定されるが、この量比を考慮した実験条件においてもPER2はCRYを抑制できることを確認した。

5. PERがCRYを抑制するメカニズム

PER1やPER2がCRYを抑制するメカニズムを完全に明らかにするのは難しい。なぜならば、CRYがBMAL1とCLOCKを抑制するメカニズムも未だ良くわからないからである。現時点では、BMAL1の転写活性化ドメインにコアクチベーターが結合するのをCRYが同じ部位へ排他的に結合することで阻害している、という報告が有力な証拠を示しているかもしれない¹⁵。私たちは、HEK293細胞(ヒト胎児腎細胞)で時計タンパク質を人工合成させ、これを精製してEMSA(タンパク質のDNAへの結合を電気泳動の移動度で検討するアッセイ)を行ってみたところ、CRY1はBMAL1-CLOCK複合体とともに3量体としてE-boxに結合することが示された(図3)。次に、CRY1とPER2を複合体として精製して実験に利用したところ、BMAL1-CLOCK複合体にCRY1が取り込まれにくくなることがわかった。また、C末端だけのPER2を用いた場合は、全長のPER2よりもずっと強力にCRY1のリクルートを抑制した。やはり全長のPER2ではC末端が立体的にマスクされているのかもしれない。これらのEMSAの実験結果から言えることは、PER2はCRY1がBMAL1-CLOCKに

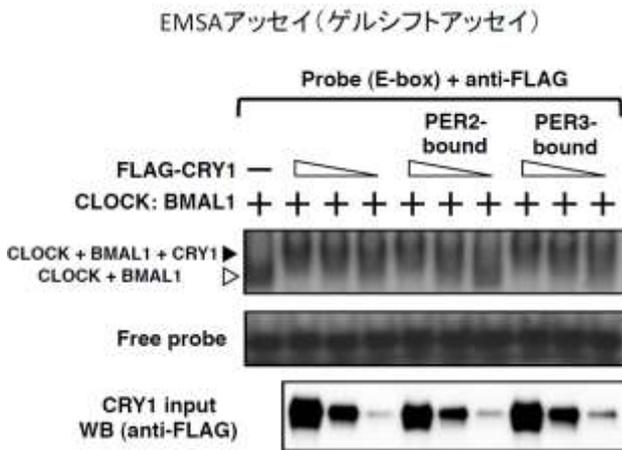


図3 PERと結合したCRYはBMAL1-CLOCK-E-box複合体に結合できない

精製タンパク質を用いたEMSAアッセイの結果を示している。(レーン2から4)CRYの同複合体への結合が、FLAG抗体によるスーパーシフトで確認できる。(レーン5から7)あらかじめPER2と結合させたCRYでは、複合体への結合が低下している。(レーン8から10)PER3と結合させたCRYでは、この結合低下は起こらない。

アクセスするのを阻止することで、CRY1 による転写抑制を緩衝しているということである。

上記の結果を私たちは論文にまとめてあるジャーナルに投稿したのだが、査読者たちは私たちのデータに興味を示しながらも判断は慎重なものだった。残念ながら、一度完成したモデルに物申すには、相当なデータ量で証明しないと受け入れられないということであろう。ただ、私たちは、これらの現象が *in vitro* におけるアーティファクトではなく、PER の真の機能の側面を示唆していると感じていた。その根拠を以下に記す。

6. *in vivo* データとの整合性

PER2 の機能欠損マウスにおいて *Per1* や *Per2* の転写量が減少することが示されていることから、PER2 が転写に対して正に働くことは *in vivo* において既に示唆されていたと言える。私たちはさらに *in vivo* との相関を明らかにするために、PER3 に注目して実験を行った。PER3 は、PER1 や PER2 とは異なり、その機能欠損はマウスの概日時計振動に対して大きな影響を及ぼさないことが示されていた¹⁶。しかしながら、従来モデルで示されてきた転写の抑制因子としての機能においては、PER1 や PER2 と同様に PER3 も同等の弱い転写抑制活性を示すことがわかっており⁷、PER3 が他の PER と異なっていることを示す機能的理由は何も見つかっていなかった。私たちが *in vitro* で見つけた現象が真実ならば、PER3 において他の PER との違いが見出されるはずである。実際、私たちのデータは、興味深いことに、PER1 や PER2 で見られた CRY を抑制する機能は、PER3 では存在しないか微弱であることを明確に示した (図4)。したがって、PER3 の機能欠損が及ぼす概日時計本体への影響が小さいのは、PER3 には CRY を抑制する機能がほとんど無いからである、と解釈できる。さらに、上記の EMSA アッセイで検出された、CRY と BMAL1-CLOCK の物理的相互作用の抑制においても、PER3 はほとんど作用を示さなかったのである (図3)。

もうひとつ、*in vivo* との相関を示すデータが得られた。これまで、PER2 の部位欠損変異体である PER2^{brdm1} がなぜ loss of function であるのか、分子メカニズムについては何もわかっていなかった⁸。PAS ドメインの一部を含む 87 アミノ残基が欠失していることから、BMAL1 や CLOCK との相互作用において異常があることが理由であると予想されたが、実験的な証明は何も為されていなかった。そこで、*Per1*

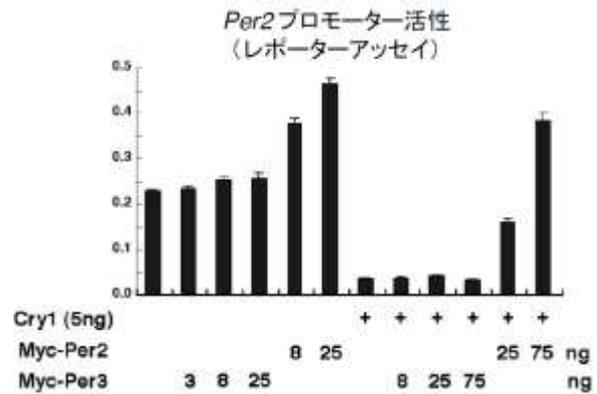


図4 PER3 は CRY を抑制できない
NIH3T3 細胞を用いたレポーターアッセイの結果を示す。(レーン2から6) PER2 とは異なり、PER3 は Per2 プロモーターを活性化できない。(レーン7から12) PER2 とは異なり、PER3 は CRY による転写抑制を緩衝できない。

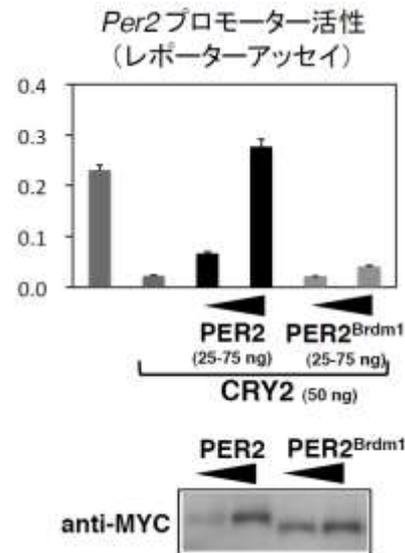


図5 PER2^{Brdm1} は CRY2 を抑制できない
NIH3T3 細胞を用いたレポーターアッセイの結果を示す。野生型の PER2 が CRY2 による転写抑制を顕著に緩衝するのに対して、変異 PER2 (PER2^{Brdm1}) はほとんど緩衝できない。

のプロモーターに対する転写抑制機能を比較したところ、PER2 の野生型も変異体も同様に微弱な転写抑制を示した。ところが、興味深いことに、私たちは、この PER2 変異体が CRY2 に対する阻害機能を顕著に失っていることを明らかにした (図5)。このことは、PER2 による CRY2 の抑制機能が、*in vivo* の現象を良く裏付けていることを示唆している。しかし、なぜこの変異体 PER2 は CRY1 に対しては依然として抑制効果を示すのか、そして、なぜ PAS ドメイン近傍領域の欠失でこのような表現系が現れるのか、現状では説明ができない。

7. PER と CRY による CLOCK のリン酸化制御

PER1 や PER2 による CRY の機能抑制のメカニズムは、CRY が BMAL1-CLOCK と物理的に結合するのを阻害していることが理由であると説明してきた。これに加えて、私たちはその後の研究によって、BMAL1 の存在下で起こる CLOCK のリン酸化もこのメカニズムに関与することを示唆するデータを得た¹⁷。まず、私たちはこの CLOCK のリン酸化の役割を知るために、キナーゼ阻害剤ライブラリーを用いた CLOCK リン酸化阻害剤のスクリーニングを実施し、チロシンキナーゼ阻害剤である Erbstatin analog を見出した。この阻害剤を用いると、BMAL1 の共発現によって起こる CLOCK のリン酸化が部分的に抑制された。この阻害剤の特異性が低いためにキナーゼを特定することは断念したが、約 80 種類の阻害剤の中で唯一明確に CLOCK のリン酸化を抑制したことから、同リン酸化の意義を知るために有力なツールである。

予想通り、この阻害剤で NIH3T3 細胞を処理すると、E-box を介した遺伝子発現が抑制された。すなわち、BMAL1 との共存によって起こる CLOCK のリン酸化は、E-box を介した転写活性化に必要であることが示唆された。一方、この CLOCK のリン酸化は CRY の過剰発現によって顕著に抑制されることから、CRY による転写抑制のメカニズムは CLOCK のリン酸化の抑制にあることが示唆された。これを支持するように、フラビン結合に必須なアミノ酸に点変異を導入することで転写抑制活性を失った CRY では、CLOCK のリン酸化抑制は起こらなかった。興味深いことに、この CRY による CLOCK のリン酸化レベルの低下は、PER1 や PER2 の過剰発現によって保護できることがわかった (図 6)。そして、やはり PER3 はこの作用を示さなかった。このように、PER1 や PER2 による CRY の抑制には、CLOCK のリン酸化制御が関与しているかもしれない。しかしながら、いくつかの報告によると CLOCK のリン酸化サイトは多数存在することが示唆されており、その部位によって役割が全く異なる可能性がある。今後、CLOCK の活性化に関わるリン酸化サイトを突き詰めることで、この仮説の正しさを証明する必要があるだろう。

8. PER の新機能を支持する続報

私たちが PER1 や PER2 による転写抑制緩衝機能について発表した約 3 週間後、PER2 の CRY 結合ドメインと CRY1 の photolyase homology region (PHR) の複合体を結晶化して構造解析した報告が発表され

CLOCK のリン酸化解析 (ウエスタンブロット)

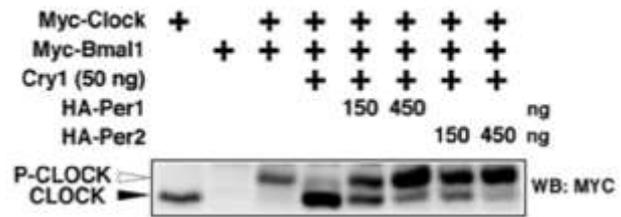


図 6 PER は CLOCK のリン酸化を保護する NIH3T3 細胞へ過剰発現させた時計タンパク質をウエスタンブロットにより解析した。(レーン 3) BMAL1 の共発現により CLOCK のリン酸化が起こる。(レーン 4) CRY を発現させると、このリン酸化は強力に抑制される。(レーン 5 から 8) PER1 または PER2 の発現によって、CLOCK のリン酸化は CRY から保護される。なお、PER3 ではこの保護作用は全く確認できない。

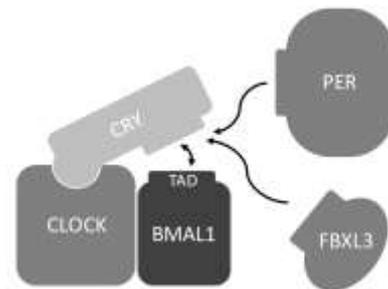


図 7 立体構造解析から明らかになった時計タンパク質複合体の状態

CRY と BMAL1 の結合面は、CRY と PER および CRY と FBXL3 の結合面とオーバーラップしており、3 者の結合は排他的関係にある。TAD とは BMAL1 と転写コアクチベーターの結合ドメインを意味する。CRY は TAD をマスクすることで転写を抑制すると考えられるが、PER が CRY に結合しているとこれが起きなくなる。また、CLOCK には CRY との結合ポケットが存在する。

た¹⁸。この論文の目玉は、PER2 と CRY1 の結合面には亜鉛結合部位が存在しており、亜鉛の存在量が *in vivo* における両者の結合強度に影響を与える点である。また、CRY1 の分解に関わるユビキチンリガーゼである FBXL3 とは排他的に PER2 は CRY1 と結合するという知見は、PER による CRY の安定化のメカニズムを明確に示しておりとても興味深い。さらに、これらに加えて明らかにされたことは、CRY と PER の結合面は、CRY と BMAL1 の結合面とオーバーラップしているという点である (図 7)。これはすなわち、PER が CRY に結合すると CRY は BMAL1 に結合できないことを示唆しており、私たちが示した PER1 や PER2 が持つ転写抑制の緩衝機能が構造面

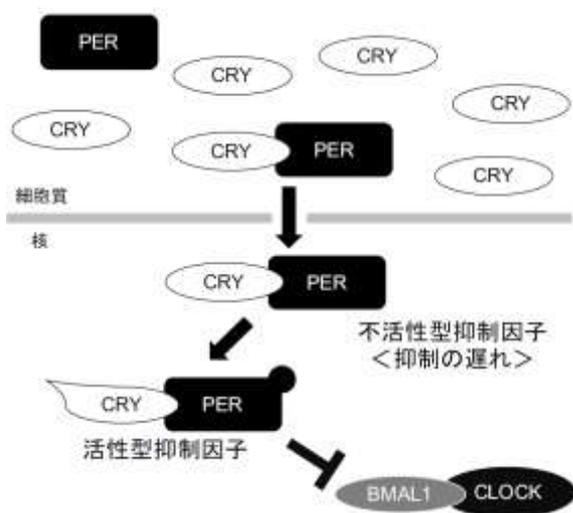


図8 PERの機能における新たな側面
 内在性のCRYは単独では核内移行できない。PERがCRYと結合すると、CRYはFBXL3による分解から保護され、さらに核内へ移行する。しかし、PERによってCRYとBMAL1の結合面がマスクされているために、ただちに転写抑制は起きないと想定される。この転写抑制の「遅れ」は、概日リズムのような長周期振動を生み出すには不可欠であろう。PER-CRY複合体はリン酸化などの翻訳後修飾によって、BMAL1-CLOCKを抑制できるようになると考えられる。

から証明されたと言えるのではないだろうか。そして、これらの構造的特徴は、同じ年に報告された、PER2とCRY2における同様のタンパク質領域を使用した複合体の立体構造解析によっても明らかにされている¹⁹。実は、BMAL1とPERがCRYとの結合部位で競合することはずっと以前に生化学的に示唆されていたのだが²⁰、上述の構造解析の研究成果によってこの関係性がさらに明確にされたと言える。

PER2がCRYによる転写抑制を緩衝することは、4-hydroxytamoxifen (4-OHT)によってPER2が核移行する細胞実験系を用いた研究でも報告されている²¹。この実験系においては、PER2-ER (PER2とエストロゲン受容体のリガンド結合部位との融合タンパク質)を発現する培養細胞に4-OHTを添加すると、PER2-ERが直ちに細胞質から核内へ移行する。E-boxを介して転写調節される遺伝子は、従来モデル通り、4-OHTを添加するとただちに転写抑制される。しかしながら、遺伝子の種類によっては、むしろ転写が促進することが示されたのである。そしてこの転写促進はCRYの存在に依存していることから、PER2はCRYによる転写抑制を緩衝することで転写を促進したと想定されるのである。上述の私たちのEMSAの実験では、PER2の存在下ではBMAL1とCLOCKの複合体にCRY1が結合できない結果となっており上述の立体構造の報告と整合性があるが、この報告に

においてはPER1/2-CRY1/2-BMAL1-CLOCKの4量体として丸ごとE-boxから引き離されると主張されている。CRYはBMAL1との結合面のみならずCLOCKの結合ポケットにも結合することが結晶構造解析の報告で示唆されており²²、PER1やPER2によって結合面がマスクされてCRYがBMAL1と結合できなくても、CRYとCLOCKとの結合によって4量体は維持されるのだと考えることができる。私たちのEMSA実験におけるバッファー環境や電気泳動条件では、CRY-CLOCK間の結合が外れたのかもしれない。それにしても、時計タンパク質群とE-boxの複合体形成状態については、全ての研究報告に対して整合性のあるモデルを考えるのが難しい。実験手法や材料によって様々な報告がある。例えば、PER1/2、CRY1/2、BMAL1およびCLOCKが複合体としてE-box上に存在することが、ChIPアッセイによって示唆されている²³。

PER2が転写促進に働くことは、*Per2*のUTR解析の結果からも明確に示唆されている²⁴。この報告によると、マウス*Per2*の3'UTR領域をノックインによって欠失させると、microRNAによる標的部位が失われることで翻訳が促進され、内在性のPER2タンパク質量が増加する結果となる。興味深いことに、PER2の機能欠損マウスにおいて*Per2*の転写量が減少するという過去の報告に矛盾せず、このマウスにおいてはPER2の増加によって*Per2*の転写が促進された。まさに、上述の私たちの実験結果が*in vivo*の条件下において再現されたのである。そして、おそらくはPER2の増加が起こしたCRYによる転写抑制の遅れによって、このマウスの行動リズムの周期長は延長を示した。

9. おわりに

以上のように、PERの機能において従来とは異なる側面がわかってきた。すなわち、転写抑制因子CRYの緩衝因子としての役割である。これにより、従来の転写抑制因子としての機能では矛盾していた現象が説明できるようになる。例えば、PER2の欠失によって*Per1*や*Per2*の転写量が減少するのは、CRYによる転写抑制に歯止めが利かなくなるためであろう。このPER1やPER2によるCRYの緩衝作用は、概日時計の振動を安定に保つために意味があると考えられる(図8)。すなわち、BMAL1とCLOCKによって発現した強力な転写抑制因子であるCRYが、即座にBMAL1とCLOCKによる転写を抑制してしまうと、長周期の遺伝子発現リズムを形成することが難しく

なるため、PER1 や PER2 による緩衝効果が重要な意味を持つと考えられる。

しかし、ここで大きな疑問が二つ残る。一つには、PER1/2-CRY1/2 転写抑制複合体は一時的に不活化した状態から活性化する必要があるのだが、このメカニズムが全く不明である。おそらく、CKIε や δ によるリン酸化など、PER1/2 や CRY1/2 の翻訳後修飾によって転写抑制複合体として活性化すると推察するが、現時点では私たちは明確な証拠を持っていない。もう一つ、PER1 や PER2 はどのようにして遺伝子特異的に役割を変えているのか、やはり現時点ではメカニズムが全く不明である。E-box の外側にある転写調節領域の関与を考える必要があり、この証明は簡単ではないだろう。

このように、PER の真の機能が明らかになるにはまだまだ時間を要する。

参考文献

1. Konopka, R. J. & Benzer, S. Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **68**, 2112-2116 (1971).
2. Bargiello, T. A., Jackson, F. R. & Young, M. W. Restoration of circadian behavioural rhythms by gene transfer in *Drosophila*. *Nature* **312**, 752-754 (1984).
3. Zehring, W. A. *et al.* P-element transformation with *period* locus DNA restores rhythmicity to mutant, arrhythmic *Drosophila melanogaster*. *Cell* **39**, 369-376 (1984).
4. Tei, H. *et al.* Circadian oscillation of a mammalian homologue of the *Drosophila period* gene. *Nature* **389**, 512-516 (1997).
5. Darlington, T. K. *et al.* Closing the circadian loop: CLOCK-induced transcription of its own inhibitors *per* and *tim*. *Science* **280**, 1599-1603 (1998).
6. Gekakis, N. *et al.* Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism. *Science* **280**, 1564-1569 (1998).
7. Kume, K. *et al.* mCRY1 and mCRY2 are essential components of the negative limb of the circadian clock feedback loop. *Cell* **98**, 193-205 (1999).
8. Zheng, B. *et al.* The mPer2 gene encodes a functional component of the mammalian circadian clock. *Nature* **400**, 169-173, doi:10.1038/22118 (1999).
9. Okamura, H. *et al.* Photic induction of *mPer1* and *mPer2* in *Cry*-deficient mice lacking a biological clock. *Science* **286**, 2531-2534 (1999).
10. Kaasik, K. & Lee, C. C. Reciprocal regulation of haem biosynthesis and the circadian clock in mammals. *Nature* **430**, 467-471 (2004).
11. Bae, K. *et al.* Differential functions of *mPer1*, *mPer2*, and *mPer3* in the SCN circadian clock. *Neuron* **30**, 525-536 (2001).
12. Zheng, B. *et al.* Nonredundant roles of the *mPer1* and *mPer2* genes in the mammalian circadian clock. *Cell* **105**, 683-694 (2001).
13. Akashi, M. *et al.* A positive role for PERIOD in mammalian circadian gene expression. *Cell Rep* **7**, 1056-1064 (2014).
14. Lee, C., Etchegaray, J. P., Cagampang, F. R., Loudon, A. S. & Reppert, S. M. Posttranslational mechanisms regulate the mammalian circadian clock. *Cell* **107**, 855-867 (2001).
15. Xu, H. *et al.* Cryptochrome 1 regulates the circadian clock through dynamic interactions with the BMAL1 C terminus. *Nat Struct Mol Biol* **22**, 476-484 (2015).
16. Shearman, L. P., Jin, X., Lee, C., Reppert, S. M. & Weaver, D. R. Targeted disruption of the *mPer3* gene: subtle effects on circadian clock function. *Mol Cell Biol* **20**, 6269-6275 (2000).
17. Matsumura, R. *et al.* The mammalian circadian clock protein period counteracts cryptochrome in phosphorylation dynamics of circadian locomotor output cycles kaput (CLOCK). *J Biol Chem* **289**, 32064-32072 (2014).
18. Schmalen, I. *et al.* Interaction of circadian clock proteins CRY1 and PER2 is modulated by zinc binding and disulfide bond formation. *Cell* **157**, 1203-1215 (2014).
19. Nangle, S. N. *et al.* Molecular assembly of the period-cryptochrome circadian transcriptional repressor complex. *Elife* **3**, e03674 (2014).
20. Chaves, I. *et al.* Functional evolution of the photolyase/cryptochrome protein family: importance of the C terminus of mammalian

- CRY1 for circadian core oscillator performance. *Mol Cell Biol* **26**, 1743-1753 (2006).
21. Chiou, Y. Y. *et al.* Mammalian Period represses and de-represses transcription by displacing CLOCK-BMAL1 from promoters in a Cryptochrome-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**, e6072-e6079 (2016).
 22. Michael, A. K. *et al.* Formation of a repressive complex in the mammalian circadian clock is mediated by the secondary pocket of CRY1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **114**, 1560-1565 (2017).
 23. Koike, N. *et al.* Transcriptional architecture and chromatin landscape of the core circadian clock in mammals. *Science* **338**, 349-354 (2012).
 24. Yoo, S. H. *et al.* Period2 3'-UTR and microRNA-24 regulate circadian rhythms by repressing PERIOD2 protein accumulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **114**, e8855-e8864 (2017).