

DOI: 10.13376/j.cbls/2020048

文章编号: 1004-0374(2020)04-0373-05

RNA m⁶A甲基化修饰对生物学功能调控作用的研究进展

姚牧笛, 马 严, 蒋 沁*

(南京医科大学附属眼科医院, 南京 210029)

摘要: 目前发现的 RNA 表观遗传修饰存在多种方式, 如 N⁶-甲基腺嘌呤 (N⁶-methyladenosine, m⁶A)、N¹-甲基腺嘌呤 (N¹-methyladenosine, m¹A)、5-甲基胞嘧啶 (5-methylcytosine, m⁵C) 和假尿嘧啶核苷 (pseudouridine, PD) 等。m⁶A 是最常见的一种修饰, 它是由甲基转移酶和去甲基化酶以及结合蛋白所催化的一种动态可逆的修饰方式, 具有重要的调控功能, 参与多种细胞进程和疾病的病理过程。最近 5 年, 随着 RNA 检测技术的发展, m⁶A 修饰的生物学功能探索已成为 RNA 领域的前沿热点, 该文拟对 m⁶A 甲基化修饰的相关蛋白、生物学功能等方面进行简要概述。

关键词: RNA 表观遗传修饰; m⁶A; m⁶A 酶系统; 生物学功能

中图分类号: Q523; Q752 **文献标志码:** A

Advances in biological function regulation by RNA m⁶A methylation

YAO Mu-Di, MA Yan, JIANG Qin*

(The Affiliated Eye Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210002, China)

Abstract: There are multiple ways of RNA epigenetic modification including N⁶-methyladenosine (m⁶A), N¹-methyladenine (m¹A), 5-methylcytosine (m⁵C) and pseudouridine (PD) and so on. m⁶A is the most prevalent modified nucleotide in eukaryotic mRNA, which is a dynamic and reversible modification mode catalyzed by writers, erasers and readers. m⁶A has important regulatory functions and participates in a variety of cellular processes and pathological processes of diseases. In recent 5 years, with the development of RNA detection technologies, the exploration of biological functions of m⁶A has become a research frontier hotspot. This review gave a brief description of regulatory proteins and biological functions of m⁶A.

Key words: RNA epigenetic modification; m⁶A; m⁶A enzyme system; biological functions

1 m⁶A概述

RNA 表观遗传修饰是 RNA 层面调控基因表达的重要方式, 表观遗传的可逆性可能为疾病的早期干预提供科学基础。目前已鉴定出 170 余种 RNA 修饰。RNA 修饰可改变 RNA 碱基电荷和碱基配对特性, 导致 RNA 折叠变化, 也可形成识别元件, 嵌入转录序列, 调节蛋白质-RNA 相互作用^[1]。近年来的研究认为, RNA 修饰不只发生在含量丰富的 RNA, 如核糖体 RNA (ribosome RNA, rRNA) 和转运 RNA (transfer RNA, tRNA), 也同样发生在低丰度的 RNA, 如信使 RNA (messenger RNA, mRNA) 和非编码 RNA (non-coding RNA, ncRNA)^[2]。其中,

mRNA 的常见修饰包括 N⁶-甲基腺嘌呤 (N⁶-methyladenosine, m⁶A)、N¹-甲基腺嘌呤 (N¹-methyladenosine, m¹A)、5-甲基胞嘧啶 (5-methylcytosine, m⁵C) 和假尿嘧啶核苷 (pseudouridine, PD) 等^[3]。这些修饰发生后嵌入 RNA 转录本, 其信息附加在碱基序列中。m⁶A 是针对腺苷酸 N6 位点的甲基化修饰, 其酶系统包括甲基转移酶、脱甲基酶等, 这些结构共同参与调控 RNA 代谢, 包括翻译、剪接、降解等, 从而调控多种细胞进程, 包括自我修复、分化、侵袭

收稿日期: 2020-01-08; 修回日期: 2020-02-04

基金项目: 国家自然科学基金项目(81570859, 81870679)

*通信作者: E-mail: jqin710@vip.sina.com

和凋亡^[4]。

m⁶A 表达水平的改变参与多种疾病的病理过程。随着二代测序 (next-generation sequencing, NGS) 技术的发展, m⁶A 的结构和功能也渐渐被深入了解。m⁶A-seq, 也叫做 MeRIP-seq, 是使用 m⁶A 特异性抗体免疫沉淀 RNA 碎片, 随后进行测序。在编码和非编码 RNA 中, 已发现超过 1.2 万个高度保守的 m⁶A 甲基化峰 (peaks)。测序分析显示 m⁶A 修饰一般发生于共同基序 RRACH(R=G/A; H=A/C/U), 在 RRACH 基序中, m⁶A 常发生在编码区 (coding sequences, CDS) 和 3' 端非翻译区 (3'-untranslated regions, 3'-UTRs), 尤其在终止密码子附近多见^[5]。MiCLIP-seq, 即 m⁶A 单核苷酸分辨率交联和免疫沉淀法 (m⁶A individual-nucleotide resolution crosslinking and immunoprecipitation, CLIP) 结合深度测序。MiCLIP-seq 的大概原理是通过 254 nm 紫外照射 (UV irradiation) 交联 RNA 中的 m⁶A 抗体和 m⁶A 标记, 然后通过检

测 m⁶A 基团的特异性突变特征分辨出单核苷酸^[6]。MiCLIP-seq 显示 m⁶A 常分布在 CDS 和 3'UTRs 的 DRACH(D=A/G/U) 基序。与 MeRIP-seq 相比, miCLIP-seq 要求样本的 mRNA 量较大, 可能给一些研究带来难度和限制。

2 m⁶A酶系统

目前发现的 m⁶A 酶系统主要有 3 类酶蛋白: 负责催化 m⁶A 甲基化的 writers、催化去甲基化的 erasers 和识别甲基化的 readers^[1]。m⁶A 几乎参与了 RNA 代谢的所有进程, 包括 mRNA 翻译、降解、剪接、出核和折叠, 在细胞、发育和疾病进程中发挥作用^[1](图 1)。

2.1 m⁶A writers

m⁶A 甲基化过程由甲基转移酶复合体 (methyltransferase complex, MTC) 介导。MTC 包括多种酶蛋白: METTL (methyltransferase-like protein) 3、METTL14、

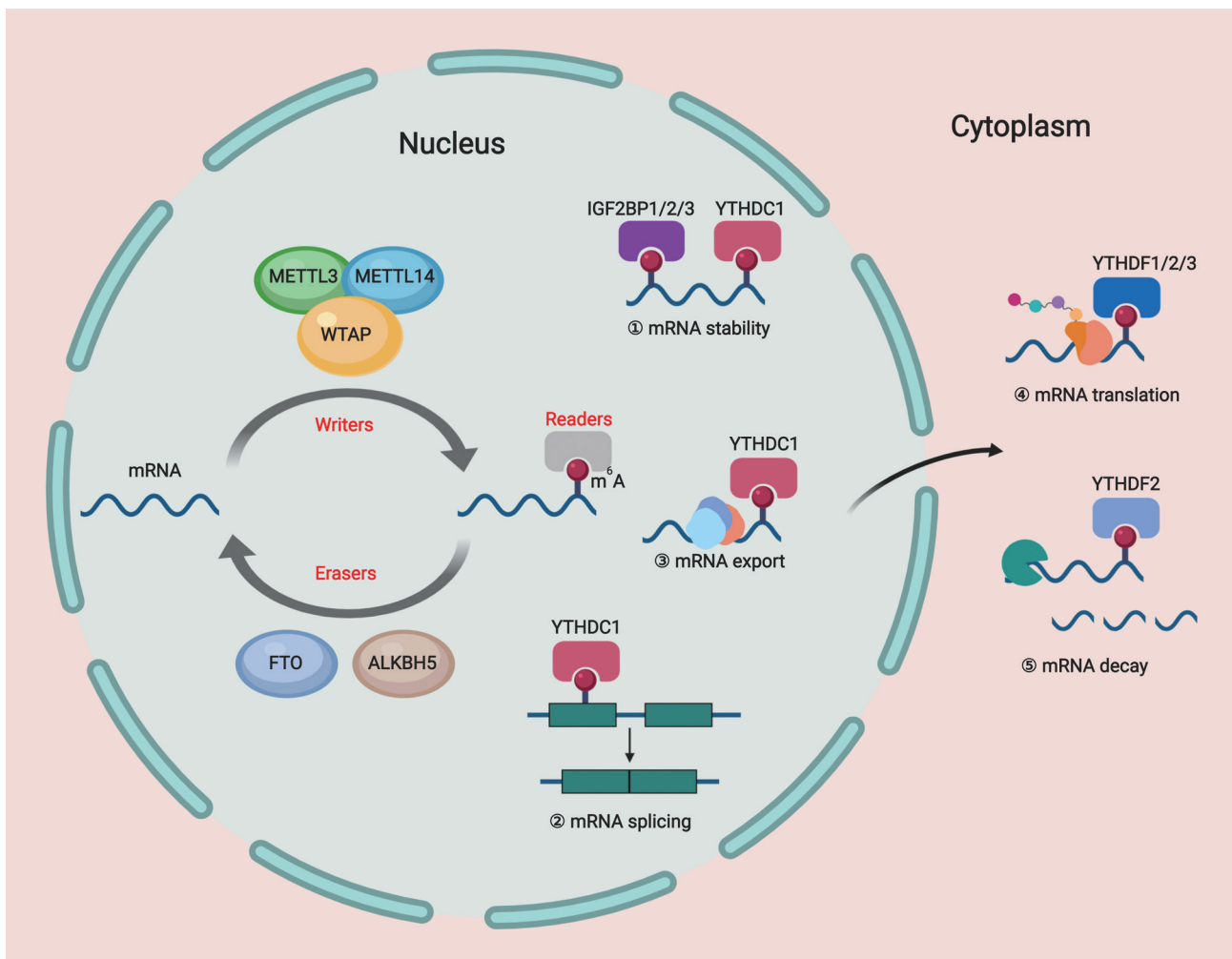


图1 m⁶A酶系统

METTL16、WTAP (wilms tumor 1 associated protein)、RBM15 (RNA binding motif 15)、VIRMA (Vir-like m⁶A methyltransferase-associated protein) 和 CBL1 (Casitas B-lineage lymphoma-transforming sequence-like protein 1) 等^[1]。METTL3 是重要的催化亚基; METTL14 本身无甲基化酶活性, 主要作为 METTL3 酶活性的蛋白构象激活剂, 帮助 METTL3 识别底物; METTL16 参与催化 m⁶A 修饰; WTAP 与 METTL3 直接结合, 确保 METTL3-METTL14 异二聚体的定位, 提高催化活性。除此类关键 writer 蛋白外, 其他 writers 则大多通过细胞间信号相互作用与 m⁶A 复合体结合发挥作用, 招募 m⁶A 复合体到达特定的 RNA 位点。总的来说, MTC 根据胞外信号与组蛋白标记或转录因子相互作用, 共转录调控 m⁶A 的动态作用^[7]。关于 m⁶A 酶的作用、转录的详细过程和特殊定位仍然需要大量的研究。

2.2 m⁶A erasers

Erasers 主要包括 FTO 和 ALKBH5, 均属于 Fe²⁺/ α -酮戊二酸依赖型双氧酶 ALKB 家族成员^[2]。FTO 基因的相关研究主要针对人类肥胖和代谢平衡, 其作为去甲基化酶的机制仍未完全阐明。FTO 和 ALKBH5 负责将细胞核中 mRNA 的 m⁶A 氧化去除, 而 FTO 负责细胞质中 mRNA 的 m⁶A 氧化去除。不同的微环境诱因促使 m⁶A 的沉积和去除, 使得 m⁶A 成为动态的过程, 导致了条件特异性甲基化模式 (condition-specific methylation patterns), 一方面甲基化作用可作为识别元件 (即 readers), 另一方面又可作为空间屏障 (steric barrier, 即 antireaders)^[8]。m⁶A 的具体动态过程仍有争议, 但是大致上是按照细胞种类特异性和发育特异性模式对微环境刺激作出应答。

2.3 m⁶A readers

目前发现, readers 主要通过直接或间接结合 RNA 的方式发挥作用。直接 RNA 结合由 readers 的一个专门识别修饰的结构域介导, 如 YTH (YT521-B homology) 家族蛋白, 包括 YTHDF1、YTHDF2、YTHDF3、YTHDC1 和 YTHDC2, 可在细胞核和细胞质中直接结合甲基化修饰的靶基因发挥作用。YTH 蛋白有的含有低复杂度区域 (low-complexity region, LCR), 可形成蛋白相位分离 (phase separation)^[9], 导致细胞质 YTHDF-m⁶A-RNA 聚合体变为 P 小体 (processing bodies, P-bodies)。P 小体是 mRNA 处理小体, 是细胞质中含有多种功能蛋白和 RNA 的聚集体^[10]。最近发现, 有些 m⁶A readers

不含有 YTH 结构域, 只含有普通 RNA 结合域, 如人胰岛素样生长因子 2 mRNA 结合蛋白 (IGF2 mRNA-binding proteins, IGF2BPs)、真核起始因子 3 (eukaryotic translation initiation factor 3, eIF3)。这两个 readers 的 RNA 结合过程与 YTH 蛋白不同, 但如何精准地完成 m⁶A 相关过程尚未完全明确^[11-12]。m⁶A 具有在热力学上破坏短的双螺旋结构的能力, 间接 RNA 结合依赖于甲基化诱导的 RNA 解螺旋, 从而暴露隐藏的蛋白质结合基序, 使蛋白质更易与 RNA 结合。

3 m⁶A 的生物学功能

3.1 生物发育

研究发现, m⁶A 在性别决定、母源 mRNA 清除、精子发生、神经发育等功能中都发挥重要作用。在性别决定中, 雌果蝇的 mRNA 可通过可变剪接 (alternative splicing) 产生功能性蛋白, writers 负责通过在果蝇性别决定主导基因 Sxl (Sex lethal) 的前体 mRNA (pre-mRNA) 上增加 m⁶A 修饰, 使得 Sxl 的 mRNA 被正常剪接, 决定果蝇发育的性别。除了决定果蝇性别, Sxl 的 m⁶A 修饰还是生殖干细胞开始分化所必需的^[13]。在母源 mRNA 清除中, 发现 m⁶A readers 蛋白 YTHDF2 在斑马鱼胚胎早期调控母体-合子过渡 (maternal-to-zygotic transition, MZT) 期间的 mRNA 水平, 从而调控斑马鱼子代发育过程^[14]。在精子发生中, 研究人员发现在早期生精细胞内敲除 METTL3 或 METTL14, 可导致精原干细胞丢失, 接着通过一系列 m⁶A 相关实验说明, m⁶A 参与调控小鼠精原干细胞命运决定和精子形成的相关基因转录后翻译效率^[15]。在神经发育中, YTHDF2 可促进 mRNA 降解, YTHDF2 缺失在小鼠胚胎发育晚期有致死可能, 且神经干细胞/祖细胞 (neural stem/progenitor cells, NSPCs) 的自我更新和神经元生成在小鼠大脑皮层中受损严重, NSPCs 的增殖和分化能力均降低, 神经元无法产生正常的神经突触, 这说明 YTHDF2 可能通过促进神经发育相关的 mRNA 的 m⁶A 依赖性降解来调节神经发育^[16]。

3.2 干细胞分化

在神经干细胞 (neural stem cells, NSCs) 的研究中发现, mRNA 和组蛋白修饰相互作用, 调控 NSCs 自我更新和分化。在 METTL3/METTL14 基因敲除小鼠中, 发现 m⁶A 可以促进 NSCs 增殖, 延长放射状胶质细胞的细胞周期。这种调控可能促进阿尔茨海默症、帕金森症和认知相关神经系统疾病的干细

胞治疗和基因靶向治疗的发展^[17-18]。m⁶A 修饰对造血干细胞 (hematopoietic stem cells, HSCs) 的命运决定也有调控作用。HSCs 具有长期自我更新的能力和分化成各类成熟血细胞的潜能, 在成人造血功能中起到重要作用。研究人员通过 m⁶A-seq 证实 m⁶A 修饰与血液发育过程密切相关, 随后在 METTL3 敲除的胚胎中发现, HSCs 不能正常产生, 血管的内皮特性却明显增强, 说明内皮-造血转化过程被阻断^[19]。此外, METTL3 敲除还显著影响了动脉内皮发育相关基因 notch1a 的 m⁶A 和 mRNA 水平^[6]。除了 NSCs 和 HSCs, 对于肿瘤干细胞, m⁶A 也有其独到的调控作用。Zhang 等^[20]的研究表明, m⁶A 去甲基化酶 ALKBH5 参与调控胶质母细胞瘤干细胞样细胞 (glioblastoma stem-like cells, GSCs) 的自我更新。

3.3 肿瘤发生和转移

由于类型和发病机制的复杂性, 肿瘤自始至终都是各种研究的热点话题。时至今日, 已有各种研究探究了 m⁶A 在各种肿瘤中的作用靶点和调控作用。m⁶A 影响多种肿瘤增殖、分化、侵袭和转移, 如 FTO 在急性髓细胞白血病 (acute myelocytic leukemia, AML) 和脑肿瘤中显示抗肿瘤作用^[21]; ALKBH5 在乳腺癌中有促肿瘤发生作用^[22]; METTL3 和 METTL14 在 AML 中可能通过调节髓系分化发挥促肿瘤作用^[23]; METTL3 在促进肝癌和肺癌发生发展中发挥作用。其中, METTL14 具有促进和抑制肿瘤发生的双重角色。

在有关 m⁶A 的研究中, 也不乏有颇具争议的声音出现。有课题组报道, METTL3 增强某些肿瘤基因的翻译效率并不需要依赖甲基化活性位点, 也就是 METTL3 的调控作用可能与 m⁶A 修饰并无关系^[22], 这与其他一些报道产生了分歧, 但是具体分子机制仍需进一步研究。

3.4 免疫炎症

免疫炎症在疾病中的作用涉及到多种多样机制, 关于 m⁶A 和免疫炎症的关系研究不多。研究发现, 树突状细胞 (dendritic cell, DC) 表达趋化因子受体 CCR7, 通过抑制 DC 中一种新型长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) lnc-Dpf3 上的 m⁶A 修饰, 上调 lnc-Dpf3 表达, 负向调控 DC 迁移, 抑制炎症性疾病的发生发展^[24]。另有研究发现, m⁶A 参与调控 T 细胞稳态, METTL3 通过靶向 IL-7/STAT5/SOCS 信号轴来调控 Naïve CD4 T 细胞分化, 维持免疫平衡, 调节肠炎的发生发展^[25]。

3.5 与非编码RNA的相互调控

m⁶A 和非编码 RNA (non-coding RNA, ncRNA) 之间的相互调控也是 m⁶A 的研究热点之一。研究最为广泛的 ncRNA 包括微小 RNA (microRNA, miRNA)、lncRNA 和环状 RNA (circle RNA, circRNA), 如 METTL3 通过调控 pri-miRNA 的识别发挥作用; lncRNA MALAT1 茎环结构中的 m⁶A 修饰参与调控 pre-mRNA 合成^[26]; lncRNA FOXM1-AS 中的 ALKBH5 相关 m⁶A 修饰调控癌细胞增殖^[20]; m⁶A 诱导 lncRNA RP11 靶向结直肠癌细胞迁移^[27]; circRNA 中的 m⁶A 修饰参与编码蛋白质^[28]。

4 小结

根据目前研究, 可以看出, RNA m⁶A 甲基化修饰在各种生物学功能中都起到重要作用。m⁶A 可在细胞层面影响多种生物学进程, 进而参与多种疾病过程。除了本文提到的生物学作用, m⁶A 还与 DNA 损伤修复、脂类代谢、热休克反应和昼夜节律等均有有证可循的联系; 但是, 其具体组成和各个成分的作用仍有很大争议, 如在研究某一种 m⁶A 酶蛋白时是否应关注其他酶蛋白的表达水平变化, 以挖掘它们之间的协同或拮抗作用关系; 关于 m⁶A 的临床转化应如何实现, 是否会带来系统性的副作用。诸如此类, 还需要科学家们长期深入的探索。

[参 考 文 献]

- [1] Alderman MH 3rd, Xiao AZ. N⁶-methyladenine in eukaryotes. *Cell Mol Life Sci*, 2019, 76: 2957-66
- [2] Zhao W, Qi X, Liu L, et al. Epigenetic regulation of m⁶A modifications in human cancer. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2019, 19: 405-12
- [3] Traube FR, Carell T. The chemistries and consequences of DNA and RNA methylation and demethylation. *RNA Biol*, 2017, 14: 1099-107
- [4] Huang H, Weng H, Chen J. The biogenesis and precise control of RNA m⁶A methylation. *Trends Genet*, 2020, 36: 44-52
- [5] Dominissini D, Moshitch-Moshkovitz S, Schwartz S, et al. Topology of the human and mouse m⁶A RNA methylomes revealed by m⁶A-seq. *Nature*, 2012, 485: 201-6
- [6] Zhang C, Chen Y, Sun B, et al. m⁶A modulates haematopoietic stem and progenitor cell specification. *Nature*, 2017, 549: 273-6
- [7] Liao S, Sun H, Xu C. YTH domain: a family of N⁶-methyladenosine (m⁶A) readers. *Genom Proteom Bioinf*, 2018, 16: 99-107
- [8] Yang Y, Hsu PJ, Chen YS, et al. Dynamic transcriptomic m⁶A decoration: writers, erasers, readers and functions in RNA metabolism. *Cell Res*, 2018, 28: 616-24

- [9] Ries RJ, Zaccara S, Klein P, et al. m⁶A enhances the phase separation potential of mRNA. *Nature*, 2019, 571: 424-8
- [10] Wang X, Lu Z, Gomez A, et al. N⁶-methyladenosine-dependent regulation of messenger RNA stability. *Nature*, 2014, 505: 117-20
- [11] Choe J, Lin S, Zhang W, et al. mRNA circularization by METTL3-eIF3h enhances translation and promotes oncogenesis. *Nature*, 2018, 561: 556-60
- [12] He H, Wu W, Sun Z, et al. MiR-4429 prevented gastric cancer progression through targeting METTL3 to inhibit m⁶A-caused stabilization of SEC62. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 517: 581-7
- [13] Haussmann IU, Bodi Z, Sanchez-Moran E, et al. m⁶A potentiates Sxl alternative pre-mRNA splicing for robust *Drosophila* sex determination. *Nature*, 2016, 540: 301-4
- [14] Zhao BS, Wang X, Beadell AV, et al. m⁶A-dependent maternal mRNA clearance facilitates zebrafish maternal-to-zygotic transition. *Nature*, 2017, 542: 475-8
- [15] Xu K, Yang Y, Feng GH, et al. Mettl3-mediated m⁶A regulates spermatogonial differentiation and meiosis initiation. *Cell Res*, 2017, 27: 1100-14
- [16] Li M, Zhao X, Wang W, et al. Ythdf2-mediated m⁶A mRNA clearance modulates neural development in mice. *Genome Biol*, 2018, 19: 69
- [17] Wang Y, Li Y, Yue M, et al. N⁶-methyladenosine RNA modification regulates embryonic neural stem cell self-renewal through histone modifications. *Nat Neurosci*, 2018, 21: 195-206
- [18] Yoon KJ, Ringeling FR, Vissers C, et al. Temporal control of mammalian cortical neurogenesis by m⁶A methylation. *Cell*, 2017, 171: 877-89.e17
- [19] Vu LP, Cheng Y, Kharas MG. The biology of m⁶A RNA methylation in normal and malignant hematopoiesis. *Cancer Discov*, 2019, 9: 25-33
- [20] Zhang S, Zhao BS, Zhou A, et al. m⁶A demethylase ALKBH5 maintains tumorigenicity of glioblastoma stem-like cells by sustaining FOXM1 expression and cell proliferation program. *Cancer Cell*, 2017, 31: 591-606.e6
- [21] Huang Y, Su R, Sheng Y, et al. Small-molecule targeting of oncogenic FTO demethylase in acute myeloid leukemia. *Cancer Cell*, 2019, 35: 677-91.e10
- [22] Zhang C, Samanta D, Lu H, et al. Hypoxia induces the breast cancer stem cell phenotype by HIF-dependent and ALKBH5-mediated m⁶A-demethylation of NANOG mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113: E2047-56
- [23] Barbieri I, Tzelepis K, Pandolfini L, et al. Promoter-bound METTL3 maintains myeloid leukaemia by m⁶A-dependent translation control. *Nature*, 2017, 552: 126-31
- [24] Liu J, Zhang X, Chen K, et al. CCR7 chemokine receptor-inducible lnc-Dpf3 restrains dendritic cell migration by inhibiting HIF-1 α -mediated glycolysis. *Immunity*, 2019, 50: 600-15.e15
- [25] Li HB, Tong J, Zhu S, et al. m⁶A mRNA methylation controls T cell homeostasis by targeting the IL-7/STAT5/SOCS pathways. *Nature*, 2017, 548: 338-42
- [26] Warda AS, Kretschmer J, Hackert P, et al. Human METTL16 is a N⁶-methyladenosine (m⁶A) methyltransferase that targets pre-mRNAs and various non-coding RNAs. *EMBO Rep*, 2017, 18: 2004-14
- [27] Wu Y, Yang X, Chen Z, et al. m⁶A-induced lncRNA RP11 triggers the dissemination of colorectal cancer cells via upregulation of Zeb1. *Mol Cancer*, 2019, 18: 87
- [28] Zhou C, Molinie B, Daneshvar K, et al. Genome-wide maps of m⁶A circRNAs identify widespread and cell-type-specific methylation patterns that are distinct from mRNAs. *Cell Rep*, 2017, 20: 2262-76