

DOI: 10.13376/j.cbls/2021071

文章编号: 1004-0374(2021)06-0677-10

· 评述与综述 ·

植物DNA和mRNA中N6-甲基腺嘌呤的比较研究

周笑琦, 吕政熠, 管 伦, 张超瑛, 陈 鹏*

(华中农业大学植物科学技术学院, 武汉 430070)

摘 要: DNA、RNA 的甲基化作为重要的表观遗传标记, 在真核生物多个细胞过程中发挥作用。DNA 中的 N6-甲基腺嘌呤 (N6-methyladenine in DNA, 6mA) 和 RNA 中的 N6-甲基腺嘌呤 (N6-methyladenine in RNA, m6A) 均为来自腺嘌呤第 6 位的甲基化修饰, 在合成和功能上有相似性也有区别。6mA 或 m6A 的修饰缺陷影响植物胚胎发育、干细胞分化、组织器官发生及应激反应等。meRIPseq 等技术的发展为全组甲基化位点鉴定提供了基础, 未来将更加注重于功能研究。该文对近年来植物 6mA 或 m6A 甲基化位点的全组鉴定、合成、调控及成员功能研究进行回顾和比较, 并展望未来的研究方向。

关键词: m6A; 6mA; 腺嘌呤甲基化; 甲基组; 植物; 功能调控

中图分类号: Q75; Q943 **文献标志码:** A

Comparative study of DNA and mRNA N6-methyladenine in plants

ZHOU Xiao-Qi, LV Zheng-Yi, GUAN Lun, ZHANG Chao-Ying, CHEN Peng*

(College of Plant Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: As important epigenetic markers, DNA and RNA methylation play essential roles in multiple cellular processes in eukaryotes. N6-methyladenine in DNA (6mA) and N6-methyladenine in RNA (m6A) are both derived from the methylation of adenosine at the N6-position. They are similar in terms of synthesis, but are very different in target molecules and biological functions. In higher plants, 6mA or m6A modification defects impair plant growth and development, stem cell differentiation, tissue organogenesis, stress response and so on. Advances in meRIPseq and other technologies provide the possibility to identify methylation sites at the whole genome or whole transcriptome level, and more attention will be paid to functional research in the future. This review summarizes the latest advances in the identification, distribution, synthesis and function of m6A and 6mA in plants, and discusses the future prospects of this research field in order to have a better understanding of these two adenosine methylation markers.

Key words: m6A; 6mA; adenosine methylation; methylome; plant; functional regulation

中心法则指出: 遗传信息从 DNA 传递给 RNA, 再由 RNA 翻译成具有不同功能的蛋白质。基因表达调控可以发生在其中的每一个步骤, 核苷修饰 (nucleoside modification) 通过在 DNA 或 RNA 碱基或核糖上引入额外的化学基团, 影响 RNA 或 DNA 的二级结构及与蛋白质的作用方式, 从而使相同的核苷酸序列也能表达出不同的遗传信息。

DNA 甲基化 (DNA methylation) 由 DNA 甲基转移酶 (DNA methyltransferase, DNMT) 催化, 可以发生在胞嘧啶的 C-5 位、N-4 位及腺嘌呤的 N-6 位等

位点, 形成 5mC (5-methylcytosine)、4mC (4-methylcytosine) 和 6mA (6-methyladenine)。其中, 5mC 是真核生物中最常见的 DNA 甲基化修饰, 影响染色体结构、基因沉默及胚胎发育等生物进程^[1]。5mC 还可被 TET 蛋白催化氧化, 形成 5-羟甲基胞嘧啶 (5-hydroxymethylcytosine, 5hmC)、5-甲酰基胞嘧啶 (5-formylcytosine, 5fC) 和 5-羧基胞嘧啶 (5-carboxylcytosine,

收稿日期: 2021-01-13; 修回日期: 2021-02-09

基金项目: 湖北省自然科学基金项目(2016CFB438)

*通信作者: E-mail: chenpeng@mail.hzau.edu.cn

5caC)^[2]。6mA 在原核生物和真核生物中都存在^[3-5]，参与 DNA 复制、修复和宿主防御。从类别上来说，细胞中的 RNA 含有比 DNA 更为复杂多样的化学修饰，且不同修饰可能分布于不同的 RNA 分子上，如信使 RNA (mRNA)、转运 RNA (tRNA)、核糖体 RNA (rRNA)、核内小 RNA (snRNA)、小干扰 RNA (siRNA) 以及长链非编码 RNA (lncRNA) 等^[6]，进而调控不同的生物学过程。在真核生物 mRNA 上的甲基化修饰中，N6-甲基腺嘌呤是含量最高的一种，首次在细菌 DNA 中被发现^[7]。近年来越来越多的研究表明，m6A (6-methyladenine in RNA) 修饰在 mRNA 的剪接、定位、稳定性和翻译效率等过程中发挥重要作用^[8]。由于 6mA 和 m6A 在结构上的一致性和修饰途径的相似性 (图 1)，本文针对这 2 种分别发生于 DNA 和 RNA 分子上的 N6-甲基腺嘌呤的分布、合成、动态调控和生物学功能进行回顾和比较。

1 6mA和m6A在不同物种中的含量分布

6mA 最初被发现于大肠杆菌中^[9]，随后在嗜热四膜虫^[10-11]、真菌^[12]、果蝇^[13]、植物^[14-15]和人类^[16]等真核物种中均被检测到。不同物种中的 6mA 含量与分布存在较大差异，例如嗜热四膜虫中 6mA 含量为 0.8%，且只存在于营养核中^[10]；线虫基因组 DNA 中的 6mA 含量为 0.01%~0.4%，富集在 AGAA 和 GAGG 基序^[4]；在果蝇胚胎发育的早期阶段，6mA 水平为 0.07%，而后期降至 0.001%^[5]。在同一物种的不同发育组织或发育阶段中，6mA 含量也有所不同^[13]，例如拟南芥不同发育时段基因组中检测到的 6mA 的含量在 0.006%~0.138% 之间^[4]，水稻基因组中 6mA 含量为 0.2%，富集基序为 GAGG^[15]。在单细胞生物中，6mA 主要在转录

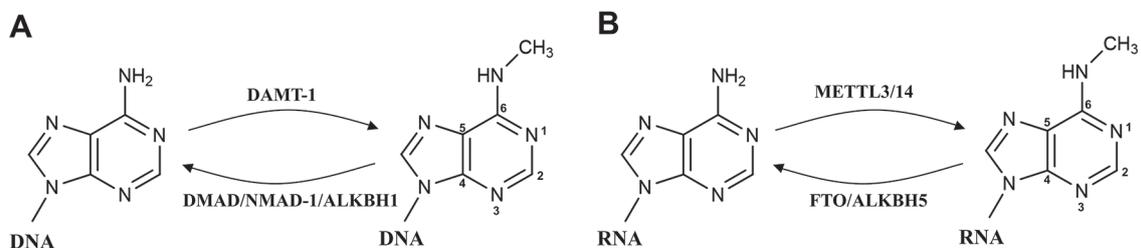
起始位点 (transcription start site, TSS) 附近成簇分布，功能为激活基因表达；而在多细胞生物中，6mA 呈广泛分布，但一般外显子区的 6mA 丰度高于基因间区^[14]。在果蝇中，6mA 更多地富集在转座子区，有促进转座子表达的作用^[5]。

RNA 中的 m6A 由于不影响碱基配对，因此通过传统测序方法难以检测。MeRIP-Seq (又称 m6A-seq) 技术利用 m6A 特异性抗体来捕获和富集含有 m6A 标记的转录本，然后进行平行测序，通过富集度定性分析转录本上 m6A 的分布^[17-18]。据此方法，研究人员在人类和小鼠细胞中测定了 7 676 个 mRNA 上的 m6A 和上百个 lncRNA 中的 m6A 峰^[17]。和 6mA 类似，m6A 的丰度也随物种和发育时段及不同组织呈现一定的浮动，并且在转录本不同区段呈现差异分布。在原核生物、低等真核、植物和动物中，m6A 分布的基序序列也有所不同。除了 mRNA 上的 m6A，在 tRNA^[19]、rRNA^[20-21]、miRNA^[22] 和 lncRNA^[23] 上也有 m6A 的分布，因此这种 N6-甲基腺嘌呤几乎参与了所有种类 RNA 的合成和代谢调控。

部分原核生物和真核生物中的 6mA 和 m6A 修饰总结详见表 1。

2 6mA和m6A的合成和动态调控

m6A 和 6mA 这两种 N6-甲基腺嘌呤的甲基组 (methylome) 由甲基转移酶 (writer, 合成蛋白/编码器)、去甲基化酶 (eraser, 去除蛋白/消码器) 和识别/阅读蛋白 (reader, 读码器) 共同构成，writer 和 eraser 分别负责甲基集团的添加和去除，reader 通过识别发生甲基化标记的大分子影响其稳定性、运输或其他生物学过程。下面分别就 6mA 和 m6A 甲基组系统成员构成和功能进行简要回顾。



A: DNA 6mA 甲基化酶和去甲基化酶，分别以线虫 DAMT-1 和果蝇、线虫、小鼠中的去甲基化酶 DAMD、NMAD-1 和 ALKBH1 为代表。B: RNA 上 m6A 的甲基化酶和去甲基化酶，分别以人类 m6A 甲基化复合体核心成员 METTL3/METTL14 以及人类 FTO 和 ALKBH5 m6A 去甲基化酶为代表。

图1 真核生物DNA的6mA和RNA的m6A甲基修饰系统

表1 部分原核生物和真核生物中的6mA和m6A修饰

甲基化修饰	物种	含量(%) / 富集基序	分布区域	参考文献
DNA 6mA	大肠杆菌	1.9 / GATC、CTGCAGCCWGG、ACCACC、CCACN8TGA[T/C]、[A/G]TCAN8GTGG	基因组的回文序列上	[24]
	真菌	2.8 / AT	转录起始位点(TSS)周围的ApT二核苷酸处	[12]
	四膜虫	0.8 / AT	TSS;核小体之间的连接DNA处	[10-11]
	衣藻	0.5 / CATG、GATC	TSS周围的ApT二核苷酸处呈双峰分布	[3]
	果蝇	0.001~0.07	转座子的基因间区	[5]
	线虫	0.01~0.4 / AGAA、GAGG	广泛分布	[4]
	人	0.051 / [G/C]AGG[C/T]	广泛分布, 在编码区(CDS)富集	[16]
	小鼠	0.00006~0.0003	基因间区	[25]
	斑马鱼	0.1~0.2 / CACACACA、CCTAGC、CAGCAG	基因组的重复区域	[26]
	拟南芥	0.006~0.138 / ANYGA、ACCT、GAGG	广泛分布, 富集于基因体	[14]
	水稻	0.1~0.2 / GAGG	基因间区和启动子	[15]
	小麦	0.1 / TGATCA	在含有活跃复制线粒体的细胞囊泡中	[27]
	mRNA m6A	大肠杆菌	GCCAU	开放阅读框(ORF)
病毒		[G/A][G/A]AC[A/C/U]、[A/C]GAC[G/U]、UGAC	5'非翻译区(UTR)和CDS区	[29]
酿酒酵母		0.7~0.9	3'端区域	[30]
哺乳动物		0.1~0.4	5'UTR和3'UTR, 终止密码子和外显子	[17]
果蝇		[G/A][G/A]AC[A/C/U]	起始密码子和终止密码子	[31]
斑马鱼			起始密码子和终止密码子附近	[32]
拟南芥		0.45~0.65	在起始密码子附近富集	[33]
水稻		[G/A][G/A]AC[A/C/U]	3'UTR 和终止密码子	[34]
玉米		U[A/G]UA[C/U]	3'UTR 和终止密码子	[35]
tRNA m6A		大肠杆菌		在密码子-反密码子双链体上堆积
rRNA m6A	大肠杆菌		细胞核	[20]
	人		细胞核	[21]
miRNA m6A	人	GGACU、GACU、ACU、GAC	蛋白质编码的转录本中	[22]
lncRNA m6A	人	[A/G/U][A/G]AC[A/C/U]	在整个转录本上高度富集	[23]

2.1 6mA甲基修饰系统

目前对 6mA 甲基组系统的研究主要为 writer 和 eraser 的成员鉴定, 对于 DNA 分子上识别 6mA 甲基标记的特异识别蛋白近两年才报道^[36]。通过分析原核生物中甲基转移酶的同源基因^[37], 在真核生物中发现了一族可能由细菌 M.Mun I-like 6mA 甲基转移酶进化而来的包含 MT-A70 结构域的家族蛋白^[38]。2015 年, 首次报道秀丽隐杆线虫中存在 DNA 6mA 甲基转移酶 DAMT-1, 其含有一个 MT-A70 结构域, 敲除 DAMT-1 可造成 6mA 甲基化水平显著降低和线虫生育能力缺陷^[4]。在纤毛虫中,

DAMT-1 同源基因 MTA1 的缺失可导致全基因组 6mA 缺失, 阻碍核小体的占位和染色体组装^[39]。值得指出的是, 目前鉴定的 RNA m6A 甲基转移酶 METTL3 和 METTL14 也属于 MT-A70 家族蛋白, 在体外具有微弱的以 DNA 为底物形成 6mA 修饰的活性^[40]。在哺乳动物中, DAMT-1 同源基因 METTL4 的敲除会导致新生小鼠发育不良和面部畸形及成年小鼠造血功能异常^[36]。与动物中不同, 小麦中的 Wadmtase 蛋白属于 tRNA 甲基转移酶 TRM11 家族, 参与线粒体 DNA 6mA 修饰, 以及 tRNA 第 10 位鸟嘌呤的甲基化, 形成 2-methylguanosine (m²G)^[37], 而

植物中其他的甲基转移酶尚待鉴定。

果蝇 DNA 中的 6mA 可以被去甲基化酶 DMAD 去除^[5]。DMAD 是哺乳动物 TET 家族蛋白的同源物, 能促进果蝇早期的生殖分化, 调控胚胎发育以及抑制转座子表达。目前发现的大多数 DNA 和 RNA 去甲基化酶从蛋白质结构上属于 ALKB 家族, 该家族在进化中相当保守^[41]。哺乳动物中至少存在 9 个 ALKB 成员, 分别为 ALKBH1~8 和 FTO (fat mass and obesity-associated protein), 其中 ALKBH5 和 FTO 已被鉴定为 m6A 的去甲基化酶, 而 ALKBH1 和 ALKBH4 为 6mA 的去甲基酶^[16,42]。秀丽隐杆线虫的 NMAD1 去甲基化酶也属于 ALKB 家族, 抑制其表达会导致胞内 6mA 水平的升高^[4]。在植物中, 水稻 OsALKBH1 也被证实具有 6mA 去甲基化功能^[15]。

目前已鉴定的 6mA 甲基化酶与去甲基化酶总结详见表 2。

6mA 功能的实现还需要 reader 的参与。事实上, 在 6mA 甲基化核苷被发现之前, 其他甲基化标记的 reader 已被发现, 例如哺乳动物中的 MBD 家族蛋白 (MBD1、MBD2、MBD3、MBD4 和 MeCP2) 是发现最早的 5mC reader^[46]。目前已发现小鼠中存在 2 种 6mA reader——ASXL1 和 MPND^[36], 其他真核生物中更多的特异性 6mA reader 尚待发现。

2.2 m6A 甲基修饰系统

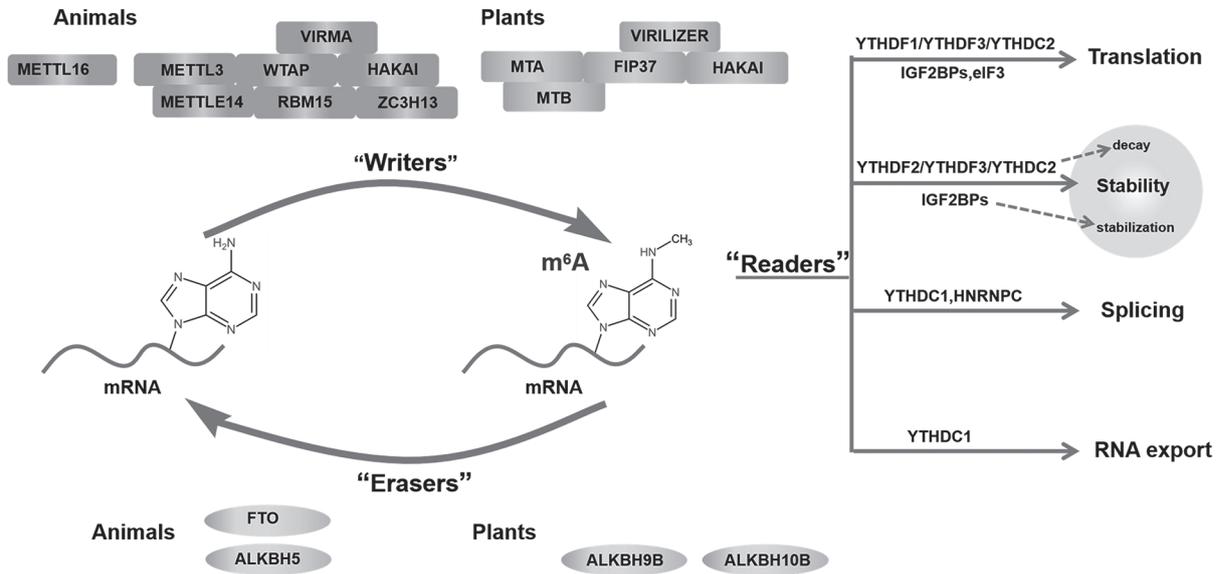
目前对动物和植物中 m6A 甲基化的研究进行

得如火如荼, 已发现的 m6A 甲基化修饰酶核心成员包括 METTL3 (methyltransferase-like 3)、METTL14 (methyltransferase-like 14) 和 WTAP (Wilms' tumor 1 associating protein)(图 2)。METTL3 起催化核心亚基的作用, 而 METTL14 则促进 METTL3 与底物 RNA 结合, 形成具有高催化活性的复合体^[47]。WTAP 没有甲基转移酶活性, 但它能将 METTL3 和 METTL14 定位到作用区域^[40]。其他已鉴定的 m6A writer 蛋白还包括 METTL6^[48]、KIAA1429^[49]、RNA Binding Motif Protein15 (RBM15)^[23]等。拟南芥中 METTL3、METTL14 和 WTAP 的直系同源物为 AtMTA、AtMTB 和 AtFIP37, 影响胚胎及根的发育^[34]。水稻中 OsFIP (WTAP) 和 OsMTA2 (METTL3) 突变影响雄配子发生和愈伤组织分化^[34]。

已鉴定的 m6A 去甲基化酶为哺乳动物中的 ALKBH5 和 FTO, 均属于 Fe²⁺/α-酮戊二酸依赖型双氧酶 ALKB 家族成员^[50-52]。FTO 是第一个被鉴定的去甲基化酶, 影响人类肥胖和代谢平衡^[50], 敲除 FTO 也会导致小鼠生长缓慢甚至畸形^[51]。ALKBH 类蛋白是大肠杆菌 AlkB 家族同源物, 小鼠 ALKBH5 缺失可导致 m6A 水平升高和精子畸变^[52]。植物中未发现 FTO 同源物, 但在拟南芥中发现了 13 个 ALKB 家族同源蛋白^[8], 它们在不同组织和不同细胞器中的分布不同, 其中 ALKBH10B 被鉴定为 m6A 去甲基化酶, 影响拟南芥的生长和成花转变^[53](图 2)。

表2 目前已鉴定的6mA甲基化酶与去甲基化酶

蛋白	家族	甲基组成员	物种	表型	参考文献
DAM	DAM-like	Writer	大肠杆菌	Dam酶甲基化GATC位点上的腺嘌呤残基	[43]
N6AMT1	HemK	Writer	人	沉默N6AMT1基因可降低癌细胞基因组6mA水平, 促进肿瘤发生	[16]
DAMT-1	MT-A70	Writer	线虫	DAMT-1的敲除造成6mA水平显著降低和线虫生育能力缺陷	[4]
AMT1	MT-A70	Writer	四膜虫	调控基因表达, AMT1功能缺失导致严重的发育缺陷	[44]
METTL4	MT-A70	Writer	小鼠	敲除METTL4导致新生小鼠整体发育不良和面部畸形	[36]
MTA1	MT-A70	Writer	尖毛虫	MTA1缺失导致全基因组6mA缺失, 阻碍核小体占位和染色体组装	[39]
DMAD	Tet	Eraser	果蝇	促进果蝇早期生殖细胞分化	[5]
NMAD-1	ALKB	Eraser	线虫	敲除NMAD-1的线虫基因组DNA的6mA含量显著上升	[4]
ALKBH1	ALKBH	Eraser	人	ALKBH1的沉默增加了人类基因组DNA中6mA的修饰水平	[16]
			小鼠	<i>Alkbh1</i> 基因缺失导致小鼠胚胎致死和产仔率下降80%	[45]
ALKBH4	ALKBH	Eraser	小鼠	<i>alkbh4</i> 纯合突变体小鼠出现早期胚胎死亡	[42]
OsALKBH1	ALKBH	Eraser	水稻	<i>OsALKBH1</i> 基因突变导致水稻基因组6mA腺嘌呤甲基化水平升高	[15]



动物和植物中已经鉴定的writer (上方矩形部分)、eraser (下方椭圆部分)和reader, 以及reader影响的mRNA生物学过程(右侧)。

图2 动物和植物中的m6A writer、eraser和reader^[54]

目前所知的 m6A reader 多为包含 YTH 结构域

的蛋白, 可以特异性识别转录本上的 m6A 甲基化

标记, 影响靶标 mRNA 的翻译、加工、胞内运输、

剪切和降解等^[54-57](图 2)。人类 YTH 蛋白包括定位

于细胞质的 YTHDF1^[54]、YTHDF2^[56]、YTHDF3^[57]

和主要定位于细胞核的 YTHDC1^[54]、YTHDC2^[55],

而拟南芥有 13 个 YTH 蛋白, 其中 ECT2、ECT3 或

ECT4 突变均造成叶片表皮毛发育异常^[58]。除此之

外, HNRNP 家族的 HNRNPC 和 HNRNPA2B1^[59],

以及人胰岛素样生长因子 2 结合蛋白 (IGF2 mRNA-

binding proteins, IGF2BPs)^[60]、真核起始因子 3 (eukaryotic

translation initiation factor 3, eIF3)^[61], 也被鉴定为

m6A reader, 其功能尚未完全明确。

3 m6A和m6A在植物中的功能

3.1 m6A在植物生长发育中的调控功能

研究发现, 原核生物中 6mA 主要调节 DNA

复制和修复、细胞防御及周期调控^[62], 在低等真

核生物例如嗜热四膜虫中, 6mA 是营养核中基因

转录激活所必需的^[44]。果蝇和线虫中的 6mA 修饰

与早期生殖细胞的分化、胚胎发育有关^[5], 人类

细胞 6mA 在癌症等疾病发生及干细胞命运决定中

具有重要功能^[16,63]。

尽管 6mA 在高等真核生物中的研究不断取得

进展, 但相对而言在高等植物中的研究还不足, 不

同植物中的 6mA 功能在很大程度上仍然未知。模

式植物拟南芥和水稻基因组中 6mA 修饰图谱的揭

示是植物 6mA 研究的重要突破^[14-15,64]: 研究发现,

6mA 位点广泛分布于整个拟南芥基因组中, 从营养

阶段到生殖阶段 6mA 丰度逐渐增强, 提示 6mA 甲

基化促进拟南芥由营养生长向生殖生长转变^[14]。同

时, 6mA 修饰, 特别是靠近 TSS 区域的修饰, 与

拟南芥中基因的转录表达呈正相关^[14], 因此不同发

育阶段 6mA 修饰的动态变化激活了不同群组的基

因, 可能潜在地调控例如拟南芥花序转变等生命过

程。但仅凭对拟南芥中 6mA 位点的了解还不足以

更加深刻地认识植物中 6mA 的功能、进化和调控

机制。

Zhou 等^[15]和 Zhang 等^[64]首次鉴定和分析了

水稻全基因组中的 6mA 甲基化位点, 发现约有 2%

的腺嘌呤被甲基化为 6mA, 与莱茵衣藻^[3]和线虫^[4]

相当, 略高于哺乳动物^[45]和黑腹果蝇^[5]。对衣藻

和水稻的研究提示, 6mA 可能通过调整 TSS 周围

的核小体定位来促进基因表达^[4,15]。GO 富集分析

发现, 水稻启动子区的 6mA 可促使基因沉默, 而

基因间区的 6mA 则参与基因激活^[15], 说明 6mA 的

功能有明显的位置效应。对 OsALKBH1 的研究发

现, 6mA 影响水稻的生殖发育^[15], 具体表现为敲

除突变体中 6mA 水平升高, 导致抽穗提前。另有

研究发现, 水稻 6mA 含量与耐寒性、耐盐性和耐

热性相关^[34]。

在其他植物中也陆续报道了 6mA 的功能。研

究发现, 6mA 可增加大麦、烟草、小麦原生质体和小麦组织中的基因表达^[65-66]。小麦中的 6mA 甲基转移酶 Wadmtase 参与调控线粒体复制^[27], 野生大豆和栽培大豆在核基因组和胞质基因组的 6mA 修饰分布上有很大的差异, 可能是造成基因表达谱不同的原因^[67]。烟草中 6mA 甲基化水平降低可导致叶片变小、茎节变短和花形态异常^[68]。综上所述, 6mA 是一种保守的 DNA 腺嘌呤甲基化修饰, 在不同物种的基因组中具有不同的分布特征, 靶标 DNA 上不同位置的 6mA 可能造成不同的影响, 调控不同的生物学过程。6mA 在不同的系统发生树分支中具有不同的表观转录调控功能, 在植物生长发育及逆境调控等过程中的研究才刚刚开始, 而了解 6mA 的分布和随环境及发育的变化仅仅是一个开端, 还有更多的问题需要去回答。

3.2 m6A在植物生长发育中的调控功能

现有证据表明, m6A 可以调控 mRNA 前体的选择性剪切、成熟 mRNA 的加工, 影响 mRNA 的稳定性及蛋白质的翻译, 从而造成不同表型^[69]。已有研究显示, m6A 在 DNA 损伤修复、细胞周期和干细胞分化等过程中发挥重要作用, 与胚胎发生、性别决定及癌症进程等密切相关^[31,54]。

目前的大量研究是以酵母、线虫、果蝇和人类细胞为模型, 以植物细胞或植物为原初材料的研究相对较少。研究表明, 植物中的 m6A 与哺乳动物有所不同, 不仅在 3' UTR 区和终止密码子附近富集, 在起始密码子附近也有富集^[33]。拟南芥甲基组分析显示, m6A 的独特分布和与叶绿体相关的一些植物特异性信号通路有关, 暗示 m6A 可能影响光合作用^[33]。根据蛋白质序列同源性, 目前可以找到的拟南芥 m6A writer、reader 和 eraser 同源蛋白分别有 5 个、13 个和 13 个, 分布在 5 条染色体的不同区域(图 3A)。破坏拟南芥中关键的 m6A 甲基转移酶 MTA 会导致胚胎致死^[70], 缺少其他 m6A writer 核心组分 MTB、FIP37 和 VIR 也是如此^[71-72]。m6A 的多少不仅影响胚胎发育, 还影响植物的营养生长和生殖生长。拟南芥 m6A writer 突变体表现出花器官和子叶异常, 茎顶端分生组织异常增殖, 毛状体分支增加, 侧根发育不良及晚花等缺陷^[73-74]。破坏拟南芥 m6A 去甲基化酶 ALKBH10B 可导致开花延迟, 营养生长受抑制^[53]; 另一个潜在的 m6A 去甲基酶 ALKBH6 的 T-DNA 突变体种子在冷胁迫、盐胁迫和脱落酸处理下发芽速度加快, 在盐、干旱或热胁迫下的存活率降低^[75]。拟南芥 m6A 识别蛋白包括 ECT1~

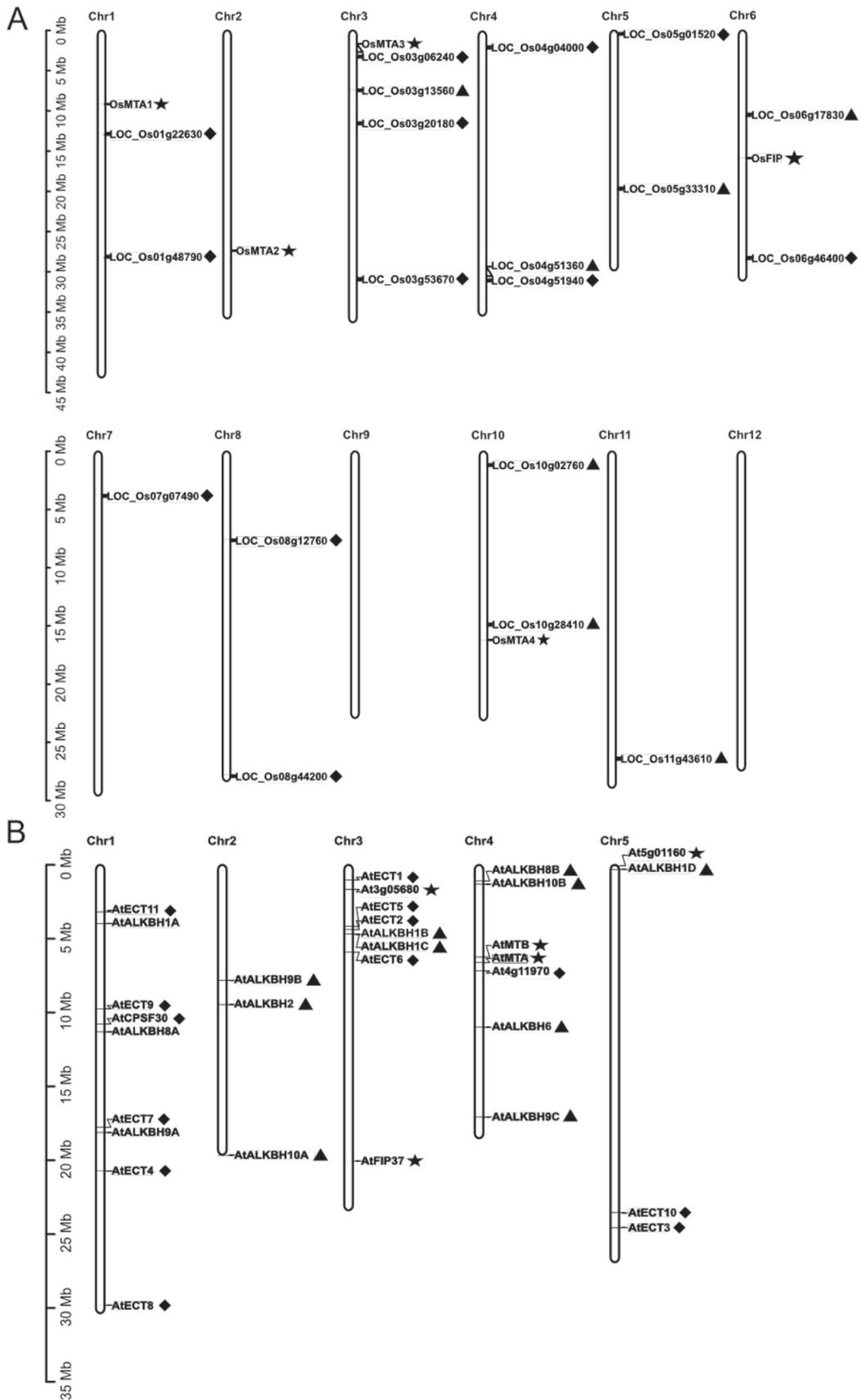
11、At4g11970 以及 CPSF30。其中, ECT2、ECT3 和 ECT4 在叶片形成中起重要作用^[58]。2021 年, 研究发现, 拟南芥 CPSF30 蛋白的长转录本 CPSF30-L 利用其在植物中独特的 YTH 结构域来控制 mRNA 3' 末端的选择性聚腺苷化 (alternative polyadenylation, APA), 影响硝酸盐信号相关途径和氮素代谢^[76]。同时, 研究人员发现, CPSF30-L 作为 m6A 的识别蛋白, 促进细胞核内核体形成过程中的相分离, 通过识别不同信号元件参与拟南芥开花调控和脱落酸响应^[77]。

在作物中, Li 等^[78]报道了水稻转录组范围内的 m6A 修饰谱, 奠定了功能研究的基础。根据序列同源及蛋白结构域特征, 水稻中 m6A writer、reader 和 eraser 候选基因及其在染色体上的分布如图 3B 所示, 其中仅 OsFIP 和 OsMTA2 有功能报道^[34]。Zhang 等^[34]利用 CRISPR 技术创建了水稻 m6A writer OsFIP 和 OsMTA2 的敲除突变体, 发现转录组中 m6A 的丰度降低, 影响了水稻小孢子发育, 并降低了结实率。其他植物例如玉米中的研究发现, m6A 甲基化与愈伤组织诱导的关键基因的表达相关, 揭示了 m6A 在愈伤诱导早期阶段的重要性^[35]。番茄中的研究也说明果实成熟伴随着 m6A 甲基化的动态变化^[79]。在海洋植物海草中发现 m6A 甲基化参与海草的生物钟调节^[80]。木本植物毛果杨的茎分化木质部中 m6A 修饰与基因表达呈负相关^[81]。

4 讨论与展望

近年来, 对 DNA-6mA 甲基化的全基因组定位和 RNA-m6A 甲基化的全转录组分析, 丰富了人们对这两种 N6- 甲基腺嘌呤修饰在不同生物体中的功能认知。尽管 6mA 和 m6A 通过不同的 writer, 以 AdoMet 为甲基供体, 将甲基基团添加到腺嘌呤的相同位置, 但由于发生标记的底物分子不同, 以及被甲基化的位点在 DNA 或 RNA 中的位置不同, 其造成的结果和生物学影响有很大区别。同时, 已有研究表明, 参与 6mA 和 m6A 的甲基组成员, 特别是 writer 和 eraser 类, 分别属于 MT-A70 和 ALKB 家族, 其催化底物包含 DNA 和 RNA, 同一个酶可能针对一种底物或者对两种底物均有活性, 因此有必要找出在底物重叠的情况下, 是否存在一定的生理条件或其他信号, 使得 6mA 和 m6A 甲基化之间发生关联及协同调控。

相较于 RNA m6A 来说, DNA 6mA 在真核生物特别是植物基因组中占比极低, 这就需要更加灵



A: 水稻m6A甲基组成员, 包括writer (★)、reader (◆)和eraser (▲)候选基因在12条染色体上的分布。染色体大小参考左侧标尺。B: 拟南芥甲基组成员在染色体组上的分布, 三类蛋白的标识方法和水稻相同。

图3 水稻和拟南芥m6A甲基组成员候选基因在染色体上的分布

敏的检测方法。值得注意的是,在采用例如 UPLC-MS/MS 这样高灵敏度的分析方法时,无论是动物还是植物来源的样本,都应当注意样本中可能潜在的支原体或细菌污染和因此带来的假阳性。在样品预处理和分析流程中,污染问题可影响 6mA 的准确检测,造成基因组中 6mA 含量被高估^[82-83]。此外,独立于上文总结的 Mettl4 等 MTase 修饰途径,6mA 还可以通过 DNA 聚合酶掺入到哺乳动物基因组中^[84]。这一有趣的发现部分解释了之前对动物 DNA 6mA 的实验偏差,也在分子层面开拓了 6mA 修饰的新起源。植物中是否存在 DNA 聚合酶介导的 6mA 掺入,以及如何从样品提取、前处理和分析过程中避免污染,鉴定真正内源的 6mA 位点和辅助功能验证,是未来值得突破的重点。

大多数物种中已被报道存在 m6A 或 6mA 的甲基化修饰,所以甲基化位点的检测已经基本突破了技术瓶颈。但是,鉴于还有近百种 DNA 修饰和上百种 RNA 修饰,在特定物种、组织和细胞中将它们准确地一一检测出来仍是一个巨大的挑战。同时,修饰位点鉴定之后的挑战是它们在细胞和个体中的生物学功能。从底物和修饰蛋白两个层面,都可以利用现有精准的 CRISPR-Cas 编辑系统,来研究位点对修饰的影响和带来的性状改变。Cas9 或以此为基础的 dCas9 系统的发展日新月异,未来或可用于动物或植物基因组或转录组中特定区域修饰谱的改变,从而实现对位点功能更深入的理解。

为了探究某种标记在某个物种中的功能,还是需要从 writer、eraser 以及 reader 入手,研究对靶标分子和其他细胞代谢或基因/蛋白质表达等过程的影响,实现与表型的关联。其中,writer 和 eraser 固然直接影响甲基化标记的多少,而 reader 最终决定了导致的结果。m6A 和 6mA 这 2 种腺苷甲基化修饰作为保守和重要的表观遗传标记,在植物中的研究比动物中还是落后很多,现有研究仍局限在拟南芥和水稻等少数物种,还需要更多地探索其他作物和林木等物种及具有进化意义的代表性物种的 m6A 功能,从而为更好地理解甲基修饰作用和使之成为农业生产服务提供新的方向。

[参 考 文 献]

- [1] Wu H, Zhang Y. Reversing DNA methylation: mechanisms, genomics, and biological functions. *Cell*, 2014, 156: 45-68
- [2] Ito S, Shen L, Dai Q, et al. Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine. *Science*, 2011, 333: 1300-3
- [3] Fu Y, Luo GZ, Chen K, et al. N6-methyldeoxyadenosine marks active transcription start sites in *Chlamydomonas*. *Cell*, 2015, 161: 879-92
- [4] Greer EL, Blanco MA, Gu L, et al. DNA methylation on N6-adenine in *C. elegans*. *Cell*, 2015, 161: 868-78
- [5] Zhang G, Huang H, Liu D, et al. N6-methyladenine DNA modification in *Drosophila*. *Cell*, 2015, 161: 893-906
- [6] Motorin Y, Helm M. RNA nucleotide methylation. *Wires RNA*, 2011, 2: 611-31
- [7] Dunn DB, Smith JD. Occurrence of a new base in the deoxyribonucleic acid of a strain of *Bacterium coli*. *Nature*, 1955, 175: 336-7
- [8] Liang Z, Riaz A, Chachar S, et al. Epigenetic modifications of mRNA and DNA in plants. *Mol Plant*, 2020, 13: 14-30
- [9] Wion D, Casadesús J. N6-methyl-adenine: an epigenetic signal for DNA-protein interactions. *Nat Rev Microbiol*, 2006, 4: 183-92
- [10] Luo GZ, Hao Z, Luo L, et al. N6-methyldeoxyadenosine directs nucleosome positioning in *Tetrahymena* DNA. *Genome Biol*, 2018, 19: 200
- [11] Wang Y, Chen X, Sheng Y, et al. N6-adenine DNA methylation is associated with the linker DNA of H2A.Z-containing well-positioned nucleosomes in Pol II-transcribed genes in *Tetrahymena*. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45: 11594-606
- [12] Mondo SJ, Dannebaum RO, Kuo RC, et al. Widespread adenine N6-methylation of active genes in fungi. *Nat Genet*, 2017, 49: 964-8
- [13] Shah K, Cao W, Ellison CE. Adenine methylation in *Drosophila* is associated with the tissue-specific expression of developmental and regulatory genes. *G3 (Bethesda)*, 2019, 9: 1893-900
- [14] Liang Z, Shen L, Cui X, et al. DNA N6-adenine methylation in *Arabidopsis thaliana*. *Dev Cell*, 2018, 45: 406-16
- [15] Zhou C, Wang C, Liu H, et al. Identification and analysis of adenine N6-methylation sites in the rice genome. *Nat Plants*, 2018, 4: 554-63
- [16] Xiao CL, Zhu S, He M, et al. N6-methyladenine DNA modification in the human genome. *Mol Cell*, 2018, 71: 306-18
- [17] Dominissini D, Moshitch MS, Schwartz S, et al. Topology of the human and mouse m6A RNA methylomes revealed by m6A-seq. *Nature*, 2012, 485: 201-6
- [18] Meyer KD, Saletore Y, Zumbo P, et al. Comprehensive analysis of mRNA methylation reveals enrichment in 3' UTRs and near stop codons. *Cell*, 2012, 149: 1635-46
- [19] Golovina AY, Sergiev PV, Golovin AV, et al. The *yfiC* gene of *E. coli* encodes an adenine-N6 methyltransferase that specifically modifies A37 of tRNA1Val(cmo5UAC). *RNA*, 2009, 15: 1134-41
- [20] O'Farrell HC, Scarsdale JN, Rife JP. Crystal structure of KsgA, a universally conserved rRNA adenine dimethyltransferase in *Escherichia coli*. *J Mol Biol*, 2004, 339: 337-53

- [21] Tran NV, Ernst FGM, Hawley BR, et al. The human 18S rRNA m6A methyltransferase METTL5 is stabilized by TRMT112. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47: 7719-33
- [22] Min KW, Zealy RW, Davila S, et al. Profiling of m6A RNA modifications identified an age-associated regulation of AGO2 mRNA stability. *Aging Cell*, 2018, 17: e12753
- [23] Patil DP, Chen CK, Pickering BF, et al. m6A RNA methylation promotes XIST-mediated transcriptional repression. *Nature*, 2016, 537: 369-73
- [24] Fang G, Munera D, Friedman DI, et al. Genome-wide mapping of methylated adenine residues in pathogenic *Escherichia coli* using single-molecule real-time sequencing. *Nat Biotechnol*, 2012, 30: 1232-9
- [25] Koziol MJ, Bradshaw CR, Allen GE, et al. Identification of methylated deoxyadenosines in vertebrates reveals diversity in DNA modifications. *Nat Struct Mol Biol*, 2016, 23: 24-30
- [26] Liu J, Zhu Y, Luo GZ, et al. Abundant DNA 6mA methylation during early embryogenesis of zebrafish and pig. *Nat Commun*, 2016, 7: 13052
- [27] Fedoreyeva LI, Vanyushin BF. N6-adenine DNA-methyltransferase in wheat seedlings. *FEBS Lett*, 2002, 514: 305-8
- [28] Deng X, Chen K, Luo GZ, et al. Widespread occurrence of N6-methyladenosine in bacterial mRNA. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43: 6557-67
- [29] Lichinchi G, Gao S, Saletore Y, et al. Dynamics of the human and viral m6A RNA methylomes during HIV-1 infection of T cells. *Nat Microbiol*, 2016, 1: 16011
- [30] Bodi Z, Button JD, Grierson D, et al. Yeast targets for mRNA methylation. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38: 5327-35
- [31] Lence T, Akhtar J, Bayer M, et al. m6A modulates neuronal functions and sex determination in *Drosophila*. *Nature*, 2016, 540: 242-7
- [32] Zhao BS, Wang X, Beadell AV, et al. m6A-dependent maternal mRNA clearance facilitates zebrafish maternal-to-zygotic transition. *Nature*, 2017, 542: 475-8
- [33] Luo GZ, MacQueen A, Zheng G, et al. Unique features of the m6A methylome in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Commun*, 2014, 5: 5630
- [34] Zhang F, Zhang YC, Liao JY, et al. The subunit of RNA N6-methyladenosine methyltransferase OsFIP regulates early degeneration of microspores in rice. *PLoS Genet*, 2019, 15: e1008120
- [35] Du X, Fang T, Liu Y, et al. Global profiling of N6-methyladenosine methylation in maize callus induction. *Plant Genome*, 2020, 13: e20018
- [36] Kweon SM, Chen Y, Moon E, et al. An adversarial DNA N6-methyladenine-sensor network preserves polycomb silencing. *Mol Cell*, 2019, 74: 1138-47
- [37] Iyer LM, Abhiman S, Aravind L. Natural history of eukaryotic DNA methylation systems. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2011, 101: 25-104
- [38] Luo GZ, Blanco MA, Greer EL, et al. DNA N6-methyladenine: a new epigenetic mark in eukaryotes. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2015, 16: 705-10
- [39] Beh LY, Debelouchina GT, Clay DM, et al. Identification of a DNA N6-adenine methyltransferase complex and its impact on chromatin organization. *Cell*, 2019, 177: 1781-96
- [40] Liu J, Yue Y, Han D, et al. A METTL3-METTL14 complex mediates mammalian nuclear RNA N6-adenosine methylation. *Nat Chem Biol*, 2014, 10: 93-5
- [41] Treweek SC, Henshaw TF, Hausinger RP, et al. Oxidative demethylation by *Escherichia coli* AlkB directly reverts DNA base damage. *Nature*, 2002, 419: 174-8
- [42] Li MM, Nilsen A, Shi Y, et al. ALKBH4-dependent demethylation of actin regulates actomyosin dynamics. *Nat Commun*, 2013, 4: 1832
- [43] Urieli SS, Gruenbaum Y, Razin A. Sequence and substrate specificity of isolated DNA methylases from *Escherichia coli* C. *J Bacteriol*, 1983, 153: 274-80
- [44] Wang Y, Sheng Y, Liu Y, et al. A distinct class of eukaryotic MT-A70 methyltransferases maintain symmetric DNA N6-adenine methylation at the ApT dinucleotides as an epigenetic mark associated with transcription. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47: 11771-89
- [45] Wu TP, Wang T, Seetin MG, et al. DNA methylation on N6-adenine in mammalian embryonic stem cells. *Nature*, 2016, 532: 329-33
- [46] Fraga MF, Ballestar E, Montoya G, et al. The affinity of different MBD proteins for a specific methylated locus depends on their intrinsic binding properties. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31: 1765-74
- [47] Wang X, Feng J, Xue Y, et al. Structural basis of N6-adenosine methylation by the METTL3-METTL14 complex. *Nature*, 2016, 534: 575-8
- [48] Mendel M, Chen KM, Homolka D, et al. Methylation of structured RNA by the m6A writer METTL16 is essential for mouse embryonic development. *Mol Cell*, 2018, 71: 986-1000
- [49] Schwartz S, Mumbach MR, Jovanovic M, et al. Perturbation of m6A writers reveals two distinct classes of mRNA methylation at internal and 5' sites. *Cell Rep*, 2014, 8: 284-96
- [50] Keller L, Xu W, Wang HX, et al. The obesity related gene, FTO, interacts with APOE, and is associated with Alzheimer's disease risk: a prospective cohort study. *J Alzheimers Dis*, 2011, 23: 461-9
- [51] Church C, Moir L, McMurray F, et al. Overexpression of Fto leads to increased food intake and results in obesity. *Nat Genet*, 2010, 42: 1086-92
- [52] Zheng G, Dahl JA, Niu Y, et al. ALKBH5 is a mammalian RNA demethylase that impacts RNA metabolism and mouse fertility. *Mol Cell*, 2013, 49: 18-29
- [53] Duan HC, Wei LH, Zhang C, et al. ALKBH10B is an RNA N6-methyladenosine demethylase affecting *Arabidopsis* floral transition. *Plant Cell*, 2017, 29: 2995-3011
- [54] Reichel M, Köster T, Staiger D. Marking RNA: m6A writers, readers, and functions in *Arabidopsis*. *J Mol Cell Biol*, 2019, 11: 899-910
- [55] Hsu PJ, Zhu Y, Ma H, et al. Ythdc2 is an N6-methyladenosine binding protein that regulates mammalian

- spermatogenesis. *Cell Res*, 2017, 27: 1115-27
- [56] Wang X, Zhao BS, Roundtree IA, et al. N6-methyladenosine modulates messenger RNA translation efficiency. *Cell*, 2015, 161: 1388-99
- [57] Shi H, Wang X, Lu Z, et al. YTHDF3 facilitates translation and decay of N6-methyladenosine-modified RNA. *Cell Res*, 2017, 27: 315-28
- [58] Arribas-Hernández L, Bressendorff S, Hansen MH, et al. An m6A-YTH module controls developmental timing and morphogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2018, 30: 952-67
- [59] Alarcón CR, Goodarzi H, Lee H, et al. HNRNPA2B1 is a mediator of m6A-dependent nuclear RNA processing events. *Cell*, 2015, 162: 1299-308
- [60] Huang H, Weng H, Sun W, et al. Recognition of RNA N6-methyladenosine by IGF2BP proteins enhances mRNA stability and translation. *Nat Cell Biol*, 2018, 20: 285-95
- [61] Choe J, Lin S, Zhang W, et al. mRNA circularization by METTL3-eIF3h enhances translation and promotes oncogenesis. *Nature*, 2018, 561: 556-60
- [62] Kweon SM, Chen Y, Moon E, et al. An adversarial DNA N6-methyladenine-sensor network preserves polycomb silencing. *Mol Cell*, 2019, 74: 1138-47
- [63] Li Z, Zhao S, Nelakanti RV, et al. N6-methyladenine in DNA antagonizes SATB1 in early development. *Nature*, 2020, 583: 625-30
- [64] Zhang Q, Liang Z, Cui X, et al. N6-methyladenine DNA methylation in *Japonica* and *Indica* rice genomes and its association with gene expression, plant development, and stress responses. *Mol Plant*, 2018, 11: 1492-508
- [65] Graham MW, Larkin PJ. Adenine methylation at dam sites increases transient gene expression in plant cells. *Transgenic Res*, 1995, 4: 324-31
- [66] Rogers JC, Rogers SW. Comparison of the effects of N6-methyldeoxyadenosine and N5-methyldeoxycytosine on transcription from nuclear gene promoters in barley. *Plant J*, 1995, 7: 221-33
- [67] Yuan DH, Xing JF, Luan MW, et al. DNA N6-methyladenine modification in wild and cultivated soybeans reveals different patterns in nucleus and cytoplasm. *Front Genet*, 2020, 11: 736
- [68] Nakano Y, Steward N, Sekine M, et al. A tobacco NtMET1 cDNA encoding a DNA methyltransferase: molecular characterization and abnormal phenotypes of transgenic tobacco plants. *Plant Cell Physiol*, 2000, 41: 448-57
- [69] Xu H, Dzhashiashvili Y, Shah A, et al. m6A mRNA methylation is essential for oligodendrocyte maturation and CNS myelination. *Neuron*, 2020, 105: 293-309
- [70] Zhong S, Li H, Bodi Z, et al. MTA is an *Arabidopsis* messenger RNA adenosine methylase and interacts with a homolog of a sex-specific splicing factor. *Plant Cell*, 2008, 20: 1278-88
- [71] Tzafirir I, Pena-Muralla R, Dickerman A, et al. Identification of genes required for embryo development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2004, 135: 1206-20
- [72] Vespa L, Vachon G, Berger F, et al. The immunophilin-interacting protein AtFIP37 from *Arabidopsis* is essential for plant development and is involved in trichome endoreduplication. *Plant Physiol*, 2004, 134: 1283-92
- [73] Bodi Z, Zhong S, Mehra S, et al. Adenosine methylation in *Arabidopsis* mRNA is associated with the 3' end and reduced levels cause developmental defects. *Front Plant Sci*, 2012, 3: 48
- [74] Růžička K, Zhang M, Campilho A, et al. Identification of factors required for m6A mRNA methylation in *Arabidopsis* reveals a role for the conserved E3 ubiquitin ligase HAKAI. *New Phytol*, 2017, 215: 157-72
- [75] Huong TT, Tieu Ngoc LN, Kang H. Functional characterization of a putative RNA demethylase ALKBH6 in *Arabidopsis* growth and abiotic stress responses. *Int J Mol Sci*, 2020, 21: 6707
- [76] Hou Y, Sun J, Wu B, et al. CPSF30-L-mediated recognition of mRNA m6A modification controls alternative polyadenylation of nitrate signaling-related gene transcripts in *Arabidopsis*. *Mol Plant*, 2021, 14: 688-99
- [77] Song P, Yang J, Wang C, et al. *Arabidopsis* N6-methyladenosine reader CPSF30-L recognizes FUE signal to control polyadenylation site choice in liquid-like nuclear body. *Mol Plant*, 2021, 14: 571-87
- [78] Li Y, Wang X, Li C, et al. Transcriptome-wide N6-methyladenosine profiling of rice callus and leaf reveals the presence of tissue-specific competitors involved in selective mRNA modification. *RNA Biol*, 2014, 11: 1180-8
- [79] Zhou L, Tian S, Qin G. RNA methylomes reveal the m6A-mediated regulation of DNA demethylase gene SIDML2 in tomato fruit ripening. *Genome Biol*, 2019, 20: 156
- [80] Ruocco M, Ambrosino L, Jahnke M, et al. m6A RNA methylation in marine plants: first insights and relevance for biological rhythms. *Int J Mol Sci*, 2020, 21: 7508
- [81] Gao Y, Liu X, Wu B, et al. Quantitative profiling of N6-methyladenosine at single-base resolution in stem-differentiating xylem of *Populus trichocarpa* using nanopore direct RNA sequencing. *Genome Biol*, 2021, 22: 22
- [82] Liu B, Liu X, Lai W, et al. Metabolically generated stable isotope-labeled deoxynucleoside code for tracing DNA N6-methyladenine in human cells. *Anal Chem*, 2017, 89: 6202-9
- [83] O'Brown ZK, Boulias K, Wang J, et al. Sources of artifact in measurements of 6mA and 4mC abundance in eukaryotic genomic DNA. *BMC Genom*, 2019, 20: 445
- [84] Liu X, Lai W, Li Y, et al. N6-methyladenine is incorporated into mammalian genome by DNA polymerase. *Cell Res*, 2021, 31: 94-7