

DNA N⁶ – 甲基腺嘌呤 (6mA) 在真核生物中的研究进展

李 锋 (西华师范大学生命科学学院, 四川南充 637009)

摘要 脊椎动物 DNA 上的甲基化修饰一直被认为只发生在胞嘧啶(C)位点上,最近的研究发现腺嘌呤(A)位点的甲基化也是存在的,即 DNA N⁶ – 甲基腺嘌呤(N⁶ – methyladenine, 6mA)。这是一种在高等真核生物中刚开始被人们认识的甲基化修饰碱基,它广泛而保守地存在于生物体中,其修饰水平在整个生命周期中是动态变化的,且这种表观遗传修饰承担着重要的生物学功能。主要对近年来 6mA 的研究现状进行综述,探讨其在进化上的保守性,并进一步探索 6mA 在真核生物中的生物学功能,讨论参与 6mA 形成及消除的酶,评估目前常用的检测 6mA 的几种方法,最后对 6mA 的研究做出展望。

关键词 N⁶ – 甲基腺嘌呤(6mA); 表观遗传学; 生物学功能; 甲基转移酶; 去甲基酶

中图分类号 S188⁺.1; Q953⁺.3 **文献标识码** A **文章编号** 0517 – 6611(2017)24 – 0137 – 03

Research Progress of DNA N⁶-methyladenine (6mA) in Eukaryotes

LI Feng (College of Life Sciences, China West Normal University, Nanchong, Sichuan 637009)

Abstract Methylation at cytosine of DNA has long been considered as the only modified bases in vertebrate, until the methylation at adenine site was discovered in recent studies. 6mA is a newly studied base in higher eukaryotes, this modification is in a wide prevalence and conserved among eukaryotic species. The level of 6mA is dynamically changing and it plays important biological functions in the whole life cycle. This paper was mainly to review researches of 6mA in recent years, explore its conservatism in evolution and the biological function in eukaryotes, elucidate the mechanism of enzymes, then sum up the common used methods in recent studies of detecting 6mA. Finally, put forward the prospect of 6mA research in the future.

Key words N⁶-methyladenine; Epigenetics; Biological function; Methyltransferase; Demethylase

DNA 作为生物体遗传信息载体,肩负着将遗传物质忠实地在世代中进行传递的使命。除了胞嘧啶、胸腺嘧啶、腺嘌呤、鸟嘌呤这 4 种主要碱基成分之外,近几年有学者将 5 – 甲基胞嘧啶(5 – methylcytosine, 5 mC)称为第 5 种碱基,5 – 羟甲基胞嘧啶(5 – hydroxymethyl cytosine, 5 hmC)称为第 6 种碱基。后来又相继发现了第 7、第 8 种 DNA 碱基:5 – 胞嘧啶甲酰(5 – formylcytosine, 5fC)和 5 – 胞嘧啶羧基(5 – carboxylcytosine, 5caC)^[1],这 4 种被经过修饰的碱基也被称为“新四大碱基”。最新的研究成果表明,在腺嘌呤碱基第 6 位 N 原子上存在甲基化修饰——N⁶ – 甲基腺嘌呤(N⁶ – methyladenine, 6mA),Holger 等^[2]提出这可能是第 9 种 DNA 碱基,它存在于藻类、线虫、果蝇等真核生物中,可以帮助决定表观基因组,因此 N⁶ – 甲基腺嘌呤对于细胞生命至关重要。对 6mA 的发现稍晚于 5mC,并且当时认为 6mA 只在原核生物中存在,因而不像 5mC 那样受到重视。早在 1978 年就有研究人员在单细胞绿藻莱茵衣藻的 DNA 中发现了 5mC 和 6mA 修饰,但对其生物学功能并不清楚。近年来 6mA 在衣藻、线虫、果蝇中相继被发现^[3–5],后来又在非洲爪蟾、小鼠及人胚胎干细胞^[1]以及最近研究报道的斑马鱼和猪^[6]当中发现了 6mA 的存在。由于这些标记存在于 DNA 上,可以在 DNA 复制过程中发生传递,甚至可能一代代传下去,因此推测这是一种具有重要生物学功能的碱基修饰。为了更好地理解 6mA 这种甲基化修饰的动态调节,首先要明白其在进化中的意义。笔者对 6mA 的研究进行了综述,讨论了它的生物学意义,探讨了甲基化、去甲基化酶对 6mA 动态变化的调节机

制,最后总结了该领域比较重要的研究方法,并对未来的研究方向进行展望。

1 N⁶ – 甲基腺嘌呤的发现

6mA 在原核生物中是一种存在比较广泛的修饰,它在调控 DNA 复制、修复、转座、转录以及细胞防御中起着重要作用^[7]。6mA 最初发现于大肠杆菌,随后又在几种细菌当中证实了它的存在^[8]。尽管 Unger 等^[9]于 1966 年报道了牛和人类精细胞中存在 6mA,但这一试验结果不能重复,在其他后生动物中也没有发现 6mA^[10]。由于检测技术的局限以及共生体的混淆、技术的多变、组织特异性、发育阶段特异性的变化以及环境因子对 6mA 的影响,因而最初在真核生物中报道其存在的可靠性受到质疑,6mA 只存在于原核生物中的观点继续盛行。后来通过斑点印迹杂交试验在果蝇、牛的胸腺组织、人的胎盘中发现了 6mA^[11]。其他几篇文章也有报道其在高等生物中被发现,但由于没有足够的证据,导致 6mA 在多细胞真核生物中的存在颇有争议,因此 6mA 被认为只存在于原核生物和单细胞真核生物当中^[12]。

直到最近随着甲基化分析新技术的开发,更加灵敏的检测手段不断涌现,才检测到 6mA 在多细胞真核生物如绿藻、线虫、果蝇中的存在^[3–5]。随后又通过免疫荧光染色检测到小鼠的心脏组织中有 6mA^[13]。Huang 等^[14]通过高效液相色谱 – 质谱(HPLC – ms/ms)在水稻、玉米、大鼠、人类细胞中检测到 6mA。Koziol 等^[1]通过结合斑点印迹杂交、HPLC、DNA 甲基化免疫沉淀反应以及免疫沉淀测序(MeDIPseq)等几种方法,在非洲爪蟾和小鼠的肾脏组织中发现 6mA 修饰;同时 Wu 等^[15]通过斑点印迹杂交、HPLC、MeDIPseq、SMRT – seq 在小鼠胚胎干细胞中也发现了 6mA。芝加哥大学的研究人员在 2016 年发表的文章中指出,6mA 在高等哺乳动物猪中也是存在的,且随着胚胎发育的进行其含量逐渐降低^[6]。

基金项目 西华师范大学 2017 年度基本科研业务费项目——青年教师资助项目(17D079)。

作者简介 李锋(1987—),男,四川泸州人,助教,硕士,从事保护生态学研究。

收稿日期 2017 – 06 – 28

2 N⁶-甲基腺嘌呤的生物学功能探索

6mA 是一种非常保守的 DNA 修饰,科学家们推测其可能与 5mC、mRNA 水平的 6mA 修饰以及原核生物的 6mA 有着相似的调节机制。由于 6mA 对 DNA 结构的影响及其在原核生物中的生物学功能研究得较为深入,而 6mA 在真核生物中是否也具有功能保守性还不知道,因此可以通过讨论 6mA 在原核生物中的作用来推导其在真核生物中的作用。

2.1 腺嘌呤甲基化对 DNA 结构的影响 腺嘌呤甲基化通过效应蛋白来改变 DNA 结构,6mA 可能改变了 DNA 的二级结构,通过改变配对碱基的稳定性来影响 DNA 双螺旋结构的形成,含有 GATC 序列的 6mA 会使 DNA 解旋,而 6mA 会降低螺旋结构的解链温度,减缓螺旋结构的形成^[16]。

2.2 6mA 在限制修饰系统中的作用 在原核生物中,DNA 的 6mA 通常作为限制修饰系统的一部分识别外源 DNA,细菌免疫系统通过噬菌体中的病原 DNA 被内切酶识别,通过选择性地切除特定限制性位点的未甲基化 DNA 来免受核酸限制内切酶的消化^[17]。

2.3 6mA 参与 DNA 损伤的调控 早期的研究表明 6mA 可以降低 DNA 损伤,后来又证明了 6mA 能帮助识别突变体中的母链和子链。大肠杆菌和其他阴性革兰氏菌中,DNA 腺嘌呤甲基化在 DNA 错配修复中有重要作用,这种链特异性修复途径依赖于 DNA 复制后的瞬态半甲基化。当 DNA 复制出错导致碱基错配时,DNA 修复机制会利用腺嘌呤甲基化来识别模板中甲基化链和新合成的未甲基化子链^[18]。

2.4 6mA 对转录的影响 6mA 甲基化在大麦的基因转录中增加了 2~5 倍,而 5mC 的 CpG 甲基化在大麦中对转录的影响很小^[19]。衣藻、线虫、果蝇中 6mA 是活跃转录与表达的标志,与 5mC 的位置及相关功能均有很大不同,6mA 促进基因转录的启动,而 5mC 对基因表达起抑制作用^[20]。

2.5 6mA 与核小体定位 在四膜虫和衣藻中,6mA 分布于核小体之间的连接区域^[3],这可能与指导核小体定位有关,或者 6mA 在连接区域的富集可能会使染色体开放区能更易接近甲基转移酶,而线虫里面的 6mA 富集并不在特定的基因组区域^[4]。

2.6 6mA 参与细胞周期调节 N⁶-腺嘌呤甲基化能标记原核生物中 DNA 复制起始区域,还能改变大肠杆菌中细胞周期速率,当 DNA 需要被复制时,复制起始位点 oriC 的腺嘌呤甲基化会降低 Tm 值,使得复制起始位点发生解链,6mA 还会通过影响碱基配对来减缓 DNA 聚合酶 I 的催化速率^[21]。

2.7 6mA 修饰的继代遗传 回文区的 DNA 甲基化能以最简洁的方式将表观信息进行跨代遗传,由于 DNA 的半保留复制母链的甲基化能够在新合成的子链中被复制。同位素标记试验证明大肠杆菌新合成的冈崎片段上 N⁶-腺嘌呤会迅速被甲基化^[22],这与亲代甲基化在 DNA 复制时传递到子代的观点是相吻合的。在一些细菌中,DNA 腺嘌呤甲基化与细胞分裂协同进行,使得亲代甲基化模式被遗传下去。对果蝇卵巢^[5]、斑马鱼及猪的卵母细胞和精细胞^[6]的 6mA 检测结果表明,早期胚胎尤其是生殖细胞中转座子及附近的 6mA

处于较高水平,缺乏组蛋白去甲基酶的线虫突变体 spr-5 后代不育,6mA 水平在后代逐渐积累,这些研究成果进一步拓宽了人们对 6mA 作为表观遗传修饰标志的认识。

3 DNA 甲基转移酶和去甲基酶

为了证明 6mA 发生了重要的生物学作用,应弄清楚使 6mA 发生动态变化的酶是如何发挥作用的。通过观察大多数生物(从细菌到人类)的 N⁶-腺嘌呤甲基转移酶中已知或假设的 MT-A70 家族发现,6mA 在真核生物基因组中是广泛存在并且有重要生物学作用的。基于甲基转移酶 MT-A70 家族的结构同源性,多细胞生物的 DNA 甲基转移酶可能起源于细菌的 M. MunI-like 6mA 甲基转移酶^[23]。MT-A70 家族包含 RNA、DNA 甲基转移酶,如酿酒酵母中的 IME4(inducer of meiosis 4)及 Kar4(karyogamy 4);线虫中的 DAMT-1(DNA methyltransferase-1);人中的 METTL(methyltransferase-like)家族成员 METTL3(RNA 甲基转移酶)、METTL14,而 METTL4 作为人里面与 DAMT-1 同源性最高的甲基转移酶,其功能还未得到证实^[3]。尽管在某种条件下同一种酶能使 RNA、DNA 都发生甲基化,且 MT-A70 家族成员的底物特异性(针对 RNA 还是 DNA,或两者均可)还没研究透彻,同一种酶是否催化不同生物的 RNA、DNA 甲基化还不得而知。

AlkB 是一种在进化上功能十分保守的去甲基酶,该家族的同源蛋白能催化多种生物的 DNA 及 RNA 去甲基化,如植物、大肠杆菌、线虫、果蝇、人等。如在衣藻中发挥作用的 TET/JBP,线虫中的 NMAD-1,果蝇中的 DMAD,TET1-3 作为 TET 蛋白家族一种保守的胞嘧啶去甲基酶,在人的甲基化腺嘌呤位点也可能发挥作用^[2]。最近发表在《Cell》的 2 篇研究报道指出,线虫和果蝇中的 NMAD 基因(*Alkb* 基因家族)编码了 6mA 去甲基酶,并验证了其去甲基功能^[3,5]。同时,在《Nature》杂志上报道了哺乳动物基因组中的 *Alkb1* 基因(*Alkb* 基因家族)编码了 6mA 去甲基酶,同样验证了其去甲基功能^[20]。通过比对不同物种蛋白序列发现,*Alkb1* 基因编码的蛋白含一个高度保守的 DSBH(double-stranded beta-helix)区域,属于具有催化作用的 2OG-Fe(II)加氧酶家族,因此该结构域很可能是高等真核生物 6mA 去甲基酶的候选基因。

4 N⁶-甲基腺嘌呤的检测方法

通过紫外吸收光谱、电泳、纸层析等方法于 1955 年首次检出了 6mA^[24]。但这些方法灵敏度相对较低,在哺乳动物中并没有检测到 6mA,后来科学家们利用限制性酶来鉴定^[25],这种方法的不足之处在于检测甲基化要依赖于酶对靶序列上未甲基化、半甲基化和全甲基化的特异性,因此并不是所有的基因组序列都能用限制性酶来处理。随着技术的发展,检测 6mA 的灵敏度和准确度也越来越高。2015 年在《Cell》上同时报道了不同方法检测 6mA 在果蝇、衣藻、线虫中的存在^[3-5]。如利用高灵敏度的 UHPLC-MRM-MS/MS 方法检测到果蝇的 6mA 水平(6mA/dA)为 0.001%~0.070%。Fu 等^[3]结合几种方法对衣藻全基因组 DNA 的 6mA 修饰进行了检测,如基于抗体的 6mA 免疫沉淀测序技

术(6mA-IPseq),照片交联与核酸外切酶消化结合的6mA-CLIP-exo技术,以及基于限制酶消化的6mA测序技术(6mA-REseq),他们成功地检测到14 000个基因含有6mA修饰,占衣藻基因组的84%。而基于限制酶消化并结合二代测序的SMRTseq能高效、灵敏地检测出单碱基分辨率的甲基化位点,利用这种方法成功地检测到线虫中6mA的含量为0.01%~0.40%。

虽然UHPLC-MRM-MS/MS是目前最高效、灵敏的手段,但这种方法不能体现出全基因组信息;而基于限制酶消化的测序方法即使能达到单碱基分辨率的效果,也不能检测出限制性识别位点外的6mA修饰;尽管SMRTseq可以得到准确的序列,检测出单碱基分辨率上的差异,但这项技术很难辨别相似的修饰类型(1mA & 6mA)。而将UHPLC-MRM-MS/MS(能区分1mA和6mA)与SMRT-seq结合就能解决这一难题,可以准确地鉴别出6mA在特定生物体中的丰度和基因组位置^[4]。此外,甲基化残基的定位还能通过限制酶的消化和q-PCR来鉴别,序列特异性探针也能选择性地结合序列中的6mA或未甲基化的腺嘌呤^[3]。为了更加准确地鉴定像6mA这样修饰水平很低的表观修饰,必须结合几种互补的方法。

5 展望

随着检测技术的发展,6mA在高等真核生物中不断被发现,6mA甲基转移酶和去甲基酶的保守性以及6mA在几种后生动物中的发现说明N⁶-腺嘌呤甲基化可能是一种比较保守的修饰。随着6mA在整个生命中的进化同时结合不断改进的检测技术是至关重要的。对于已经发现6mA修饰的真核动物来说,更重要的是探索6mA的生物学功能及其在不同发育时期、细胞类型中的基因组分布模式。另外一个重要问题是N⁶-腺嘌呤甲基化的DNA与甲基化的RNA是否一致。今后的研究应该围绕揭示生殖细胞中6mA不完全清除以及继代遗传开展。鉴于哺乳动物发育时期和细胞分化中5mC的动态变化性,未来可进一步探究6mA在哺乳动物发育过程中的动态变化和潜在功能。后续的研究还将揭示调节6mA水平的环境因素以及后生动物中的修饰酶系统。结合检测DNA中6mA的多种方法将能更全面、细致地了解不同物种6mA的存在、分布模式以及潜在的功能。

参考文献

- [1] KOZIOL M J, BRADSHAW C R, ALLEN G E, et al. Identification of methylated deoxyadenosines in vertebrates reveals diversity in DNA modifications[J]. Nature structural & molecular biology, 2016, 23(1): 24-30.
- [2] HOLGER H, MANEL E. An adenine code for DNA: A second life for N⁶-methyladenine[J]. Cell, 2015, 161(4): 710-713.
- [3] FU Y, LUO G Z, CHEN K, et al. N⁶-methyldeoxyadenosine marks active

transcription start sites in *Chlamydomonas* [J]. Cell, 2015, 161(4): 879-892.

- [4] GREER E L, BLANCO M A, GU L, et al. DNA methylation on N⁶-adenine in *C. elegans* [J]. Cell, 2015, 161(4): 868-878.
- [5] ZHANG G Q, HUANG H, LIU D, et al. N⁶-methyladenine DNA modification in *Drosophila* [J]. Cell, 2015, 161(4): 893-906.
- [6] LIU J Z, ZHU Y X, LUO G Z, et al. Abundant DNA 6mA methylation during early embryogenesis of zebrafish and pig [J]. Nature communications, 2016, 7: 1-7.
- [7] WION D, CASADES S J. N⁶-methyl-adenine: An epigenetic signal for DNA-protein interactions [J]. Nature reviews microbiology, 2006, 4(3): 183-192.
- [8] VANYUSHIN B F, BELOZERSKY A N, KOKURINA N A, et al. 5-Methylcytosine and 6-methylaminopurine in bacterial DNA [J]. Nature, 1968, 218(5146): 1066-1067.
- [9] UNGER G, VENNER H. Remarks on minor bases in spermatid desoxyribonucleic acid [J]. Hoppe-seyler's zeitschrift fur physiologische chemie, 1966, 344(4): 280-283.
- [10] VANYUSHIN B F, TKACHEVA S G, BELOZERSKY A N. Rare bases in animal DNA [J]. Nature, 1970, 225(5236): 948-949.
- [11] ACHWAL C W, IYER C A, CHANDRA H S. Immunochemical evidence for the presence of 5mC, 6mA and 7mG in human, *Drosophila* and mealybug DNA [J]. FEBS letters, 1983, 158(2): 353-358.
- [12] CASADES ÚS J, LOW D. Epigenetic gene regulation in the bacterial world [J]. Microbiology and molecular biology reviews, 2006, 70(3): 830-856.
- [13] SUN Q M, HUANG S, WANG X N, et al. N⁶-methyladenine functions as a potential epigenetic mark in eukaryotes [J]. BioEssays, 2015, 37(11): 1155-1162.
- [14] HUANG W, XIONG J, YANG Y, et al. Determination of DNA adenine methylation in genomes of mammals and plants by liquid chromatography/mass spectrometry [J]. Rsc advances, 2015, 5(79): 64046-64054.
- [15] WU T P, WANG T, SEETIN M G, et al. DNA methylation on N⁶-adenine in mammalian embryonic stem cells [J]. Nature, 2016, 532(7599): 329-333.
- [16] CHENG S C, HERMAN G, MODRICH P. Extent of equilibrium perturbation of the DNA helix upon enzymatic methylation of adenine residues [J]. Journal of biological chemistry, 1985, 260(1): 191-194.
- [17] LOW D A, WEYAND N J, MAHAN M J. Roles of DNA adenine methylation in regulating bacterial gene expression and virulence [J]. Infection and immunity, 2001, 69(12): 7197-7204.
- [18] GLICKMAN B W. Spontaneous mutagenesis in *Escherichia coli* strains lacking 6-methyladenine residues in their DNA an altered mutational spectrum in dam-mutants [J]. Mutation research/fundamental and molecular mechanisms of mutagenesis, 1979, 61(2): 153-162.
- [19] ROGERS J C, ROGERS S W. Comparison of the effects of N⁶-methyldeoxyadenosine and N⁵-methyldeoxycytosine on transcription from nuclear gene promoters in barley [J]. The plant journal, 1995, 7(2): 221-233.
- [20] PFEIFER G P. An elusive DNA base in mammals [J]. Nature, 2016, 532(7599): 319-321.
- [21] YAMAKI H, OHTSUBO E, NAGAI K, et al. The oriC unwinding by dam methylation in *Escherichia coli* [J]. Nucleic acids research, 1988, 16(11): 5067-5073.
- [22] MARINUS M G. Adenine methylation of Okazaki fragments in *Escherichia coli* [J]. Journal of bacteriology, 1976, 128(3): 853-854.
- [23] LUO G Z, BLANCO M A, GREER E L, et al. DNA N⁶-methyladenine: A new epigenetic mark in eukaryotes? [J]. Nature reviews molecular cell biology, 2015, 16(12): 705-710.
- [24] MASON S F. Purine studies. Part II. The ultra-violet absorption spectra of some mono- and poly-substituted purines [J]. Journal of the chemical society (Resumed), 1954, 0: 2071-2081.
- [25] GEIER G E, MODRICH P. Recognition sequence of the dam methylase of *Escherichia coli* K12 and mode of cleavage of Dpn I endonuclease [J]. Journal of biological chemistry, 1979, 254(4): 1408-1413.

(上接第133页)

- [31] 关海宁, 乔秀丽, 刁小琴. 玉米须黄酮超声波辅助提取工艺优化及其抑菌效果研究 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2016(6): 188-191, 287-288.
- [32] 林贺, 董金香, 邱智东, 等. 玉米须黄酮提取物对痛风性关节炎大鼠的影响 [J]. 现代食品科技, 2015, 31(4): 13-16, 7.
- [33] 王燕. 玉米须黄酮对四氯化碳诱使肝损伤的保护作用研究 [J]. 现

代中药研究与实践, 2015, 29(3): 33-36.

- [34] 景怡, 胡天惠. 玉米须黄酮对四氯化碳诱导大鼠慢性肝损伤的保护作用研究 [J]. 安徽农业科学, 2011, 39(28): 17148-17149.
- [35] 赵悦, 张永和, 钟琳琳. 玉米须黄酮对异丙肾上腺素心肌缺血动物模型心肌损伤的影响 [J]. 中国社区医师(医学专业), 2011, 35(13): 6-7.