

m6A 甲基化修饰在植物生长发育中的功能研究进展

杨庆玲, 向小雪, 娄红梅 (重庆大学生物工程学院, 重庆 400044)

摘要 N6-甲基腺苷(m6A)是真核 mRNA 最丰富的内部修饰,在人类和其他哺乳动物的生长发育中发挥重要的生物功能,在植物中也发挥着至关重要的调控作用,其在植物中的功能和分子调控机制一直是研究的热点。概述了 m6A 甲基化的基本组成以及其在动植物中的相应组分,重点阐述了其在植物生长发育中的作用,探讨目前存在的问题,旨在为深入研究 m6A 甲基化在植物中的作用机制以及提高植物生产力、培育优良品种提供理论依据。

关键词 RNA 修饰;N6-甲基腺苷(m6A);甲基化;植物生长发育

中图分类号 Q943.2 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2022)05-0015-03

doi:10.3969/j.issn.0517-6611.2022.05.005



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Research Progress on Function of m6A Methylation Modification in Plant Growth and Development

YANG Qing-ling, XIANG Xiao-xue, LOU Hong-mei (School of Bioengineering, Chongqing University, Chongqing 400044)

Abstract N6-methyladenosine (m6A) is the most abundant internal modification of eukaryotic mRNAs and plays an important biological function in the growth and development of humans and other mammals. It also plays a crucial regulatory role in plants, and its function and molecular regulatory mechanisms in plants have been the focus of research. The basic composition of m6A methylation and its corresponding components in animals and plants are summarized, its role in plant growth and development is emphatically described, and the existing problems are discussed in order to study the mechanism of m6A methylation in plants and improve plant productivity and cultivate excellent varieties for theoretical basis.

Key words RNA modification; N6-methyladenosine (m6A); Methylation; Plant growth and development

真核生物中已经确定有超过 160 种 RNA 修饰,常见的修饰包括 N6-腺苷酸甲基化(m6A)、N1-腺苷酸甲基化(m1A)、胞嘧啶羟甲基化(m5C)等^[1],而 m6A 作为真核生物最丰富的内部修饰,广泛存在于 RNA、mRNA、tRNA、miRNA 和长的非编码 RNA 中^[2]。m6A 是一种动态可逆的修饰方式,在转录后调控中发挥作用,影响 RNA 代谢的各个方面,例如调控基因表达、RNA 编辑、控制 mRNA 寿命和降解等,具有重要的研究意义^[3]。

到目前为止,大多数 m6A 研究集中在人类和其他哺乳动物系统,而在植物中的研究则相对较少。该研究综述了 m6A 甲基化修饰在植物系统中的最新研究进展,探讨目前研究存在的问题,有助于更好地理解 m6A 修饰的作用,以期更加全面地理解 m6A 甲基化修饰在植物生长发育各阶段的复杂调控机制。

1 m6A 甲基化

1.1 m6A 甲基化概述 m6A 甲基化是指腺苷核糖核苷酸在 N-6 位置的甲基化,这是一个动态可逆的过程^[4]。m6A 修饰是非常保守的,在植物中,m6A 修饰是由特定的甲基化酶识别固定的基序来完成的,在植物中通常为基序 RRACH(R = G or A;H:U>A>C)^[5]。但是生物体中 m6A 修饰水平远低于 RRACH 丰度,表明并不是所有的 RRACH 基序都会进行甲基化修饰,也就意味着 M6A 修饰还有其他复杂的调控途径尚未研究透彻。

m6A 修饰系统由发挥甲基化功能的甲基化酶(writers),逆转甲基化的去甲基化酶(erasers),以及识别甲基化的识别蛋白(readers)组成。它们主要通过 RNA 上添加、去除和

结合 m6A 位点,来调节 RNA 的命运^[6]。

1.2 动物中的 m6A 组分 m6A 修饰首先在哺乳动物中被发现^[7]。METTL3 作为第 1 个甲基化酶在哺乳动物中被发现并克隆^[8]。第 2 种 m6A 甲基化组分 METTL14 与 METTL3 高度同源,二者可结合形成稳定复合物 METTL3-METTL14 实行 m6 甲基化修饰^[9-10]。第 3 种甲基化组分 WTAP 可以与这种复合物相互作用从而影响这种甲基化^[11]。KIAA1429 沉默后观察到细胞的 m6A 水平显著下降,因此被认定为甲基化复合物的第 4 种组分^[11]。性别影响因子 Virilizer 可以通过 m6A 修饰控制性别决定,被认为是第 5 种甲基化组分^[12]。

由于过去研究 m6A 修饰方法的局限性,一直以来人们都以为它是一种静态修饰,直到发现脂肪量和肥胖相关蛋白(FTO)可以逆转 RNA 上的 m6A 甲基化修饰时^[13],人们才意识到这种修饰是可逆的,因此更加激发了人们对 m6A 甲基化修饰的研究热情。值得注意的是,最近的一项研究表明,当底物为 N⁶,2-O-二甲基腺苷(m6Am)而不是 m6A 时,FTO 具有更高的催化速率^[14]。第 2 个 m6A 去甲基化酶 ALKBH5 (烷基化修复同源物 5)是 FTO 的同源物^[15],其 m6A 去甲基化活性影响哺乳动物细胞内的总 RNA 合成和 mRNA 输出。

m6A 识别蛋白用于识别 m6A 甲基化修饰,对于 mRNA 后续生命进程的控制有十分重要的作用。目前人类中鉴定出来的一组包含 YTH 结构域的识别蛋白主要有 YTHDF1、YTHDF2、YTHDF3、YTHDC1、YTHDC2^[16]。另一组 m6A 识别蛋白有共同的 RNA 结合结构域,包括 HNRNPC、HNRNPG 和 hnRNPA2B1,它们可以结合核转录本,促进初级 miRNA 加工,并介导 m6A 对初级 microRNA 加工和选择性剪接^[17-19]。另一类识别蛋白,胰岛素样生长因子 2mRNA 结合蛋白 1-3 (IGF2BP1-3),通过识别共有 GG(m6A)C 序列靶向数千个 mRNA 转录本,促进其靶 mRNA 的稳定性和储存,因此影响

作者简介 杨庆玲(1996—),女,重庆人,硕士研究生,研究方向:植物分子生物学。

收稿日期 2021-05-25

基因表达输出^[20]。

1.3 植物中的 m6A 组分 在植物中已经鉴定出了一些相应的 m6A 组分。以模式植物拟南芥为例,其甲基化酶包括 MTA (METTL3 人类同源蛋白), MTB (METTL14 人类同源蛋白), FIP37 (WTAP 人类同源蛋白), VIRILIZER (KIAA1429 人类同源蛋白) 和 E3 泛素连接酶 HAKAI (HAKAI 人类同源蛋白), 它们主要在植物的胚胎发育以及营养和生殖发育过程中起作用, 缺少甲基化组分会导致一些生长发育缺陷^[21]。

通过 α -酮戊二酸依赖性双加氧酶 (AlkB) 同系物 (ALK-BH) 蛋白可以去除 RNA 上的甲基化标记^[22]。拟南芥已经鉴定出的去甲基化组分有 ALKBH9B 和 ALKBH10B, 它们分别与病毒感染和植物的开花过程有关^[23-24]。拟南芥中有 13 个基因编码 ALKBH 家族成员, 它们都含有一个保守的 2-氧戊二酸-Fe(II)-Oxy-2 结构域^[22], 大多数 ALKBH 的功能尚未确定, 还有待进一步研究。

拟南芥中已经鉴定出的识别蛋白有 13 种^[25], 已经过单双突变体实验证实 ECT2、ECT3、ECT4 调节植物器官发生的时间和执行, 其中 ECT2 与毛状体的发育有关。根据该家族的高度保守性, 在水稻中鉴定出了 12 种同源蛋白^[25], 目前还未报道其相关作用。

2 m6A 在植物中的功能研究

2.1 甲基化酶 m6A RNA 甲基化在拟南芥中研究得相对较多, AtMTA (METTL3 的同源物) 的 T-DNA 插入突变体会产生白色的种子, 不能正常发育, 表现为胚胎致死, 表明 AtMTA 在拟南芥的胚胎发育中至关重要^[26]。随后, Bodi 等^[27] 为了进一步研究 AtMTA 的功能, 通过在胚胎特异性 ABI3 启动子的控制下表达 MTA 以绕过胚胎致死表型, 在成熟植株中叶片和花的 mRNA 上的 m6A 水平降低了 90% 以上, 产生的转基因植株表现出植株矮化、叶片皱缩、花序变短、顶端优势降低等生长缺陷, 表明 AtMTA 在拟南芥的生长发育中起着广泛的作用。

研究表明, AtMTB、AtVIR 突变体与 AtMTA 突变体具有相似的发育缺陷^[21], 都表现出发育延迟和顶端优势降低, 其幼苗还显示出根系生长减少和异常的重力反应, 并且都表现出原木质部发育缺陷, 与野生型相比, 检测到原木质部链中断和倍增的发生率增加。

另外, AtFIP37 (WTAP 同系物) 的纯合突变也会导致胚胎致死, 种子无法进一步发育^[25]。同样地通过 ABI3 启动子进行表型拯救后发现, AtFIP37 通过介导拟南芥上 WUS 和 STM 这 2 个转录本的 m6A 修饰, 调控拟南芥后期茎尖分生组织的发育。而 AtFIP37 的缺失导致 WUS 和 STM 这 2 个基因 m6A 整体修饰水平大大降低, 导致 mRNA 在茎尖分生组织中过度富集, 最终影响其发育^[28]。

在水稻中, OsFIP 对于水稻雄性配子形成至关重要。敲除 OsFIP 可导致小孢子在花粉液泡期的早期退化, 同时导致前期减数分裂异常。OsFIP 直接介导部分 mRNA 的 m6A 甲基化, 并且对它们的表达和/或剪接是必需的, 进而调节孢子发生的进程^[29]。

2.2 去甲基化酶 在拟南芥中, alkbh10b 突变体中 ALKBH10B 的缺失延缓开花并抑制营养生长。Duan 等^[24] 发现 ALKBH10B 通过介导花期相关基因的去甲基化修饰调控拟南芥成花转变过程, 同时通过 RNA 甲基化测序挖掘到 1 000 多个基因发生了差异甲基化修饰, 这些基因直接或间接受到了 ALKBH10B 的影响。另外, 拟南芥 atALKBH9B 积累在细胞质颗粒中, 其与 siRNA 共定位并与 P 小体结合, 表明 atALKBH9B m6A 去甲基化酶活性可能与 mRNA 沉默和/或 mRNA 衰变过程相关。atALKBH9B 的去甲基化活性影响苜蓿花叶病毒 (AMV) 的感染性。

在番茄中, SIALKBH2 可以结合番茄果实成熟所需的 DNA 去甲基化酶基因 SIDML2 的转录本, 并通过 m6A 去甲基化调节其稳定性, SIALKBH2 突变会降低 SIDML2 mRNA 的丰度并延迟果实成熟^[30]。

2.3 识别蛋白 目前对于识别蛋白的相关报道较少。相关研究表明, 拟南芥中 ECT2 与毛状体发育相关^[31-32]。Scutenaire 等^[31] 研究表明, ect2 m6A 阅读活性的丧失会导致 ect2 缺失突变体的毛状体出现分支缺陷。ECT2 定位于细胞质, 在热暴露时重新定位到应激颗粒, 表明它控制细胞质中 mRNA 的命运。Wei 等^[32] 通过测序分析发现 ECT2 结合位点在靶基因的 3' UTR 区强烈富集, 并导致了植物特异性 m6A 基序, 提示 ECT2 可能与 RNA 的 3' UTR 加工有关。此外, 有研究表明, ECT2 通过结合 m6A 位点影响 PTRE1 和 20S 蛋白酶体亚基的表达从而微调蛋白酶体活性^[33]。另一项研究表明, ECT2/3/4 在调控叶片形态发育中起关键作用^[34]。ECT2 和 ECT3 单突变不会影响转基因植株的叶片表型。但是当 ECT2 和 ECT3 同时被突变后, 突变植株表现出叶片发生延迟的现象, 而 ECT2、ECT3 和 ECT4 三突变植株表现出的叶片发生延迟的程度比 ect2/ect3 双突变植株更严重, 表明 ECT2、ECT3 和 ECT4 在控制发育时机方面起作用。

3 小结及展望

m6A 甲基化修饰影响植物细胞中 RNA 稳定性、翻译、二级结构和转运, 影响植物的胚胎发育及营养和生殖发育, 也有研究表明 m6A 甲基化修饰与非生物胁迫相关^[35]。近年来, 随着检测 m6A 修饰的技术进步, 例如利用免疫沉淀、化学标记和定点突变, 结合新一代测序, 在探索 m6A 修饰机制方面取得了重大进展。但仍有一些问题尚未解决: 针对生物体中 m6A 修饰水平远低于 RRACH 丰度的问题, 甲基化酶复合体如何选择靶基序进行甲基化; 各甲基化组分之间的具体作用机制; 甲基化修饰系统受什么信号调控整个过程; m6A 修饰系统如何根据植物生长和发育阶段的不同而实现动态调控。解决这些问题, 对于理解 m6A 甲基化修饰系统的复杂调控机制及其在植物生长发育过程中的分子作用机理, 进而利用 m6A 甲基化修饰提高植物生产力、提高植物在不利以及有利的环境条件下的生存和适合性至关重要。

参考文献

- [1] KADUMURI R V, JANGA S C. Epitranscriptomic code and its alterations in human disease[J]. Trends Mol Med, 2018, 24(10): 886-903.
- [2] LUO G Z, MACQUEEN A, ZHENG G Q, et al. Unique features of the m6A

- methylome in *Arabidopsis thaliana*[J]. Nat Commun,2014,5:1-17.
- [3] FU Y, DOMINISSINI D, RECHAVI G, et al. Gene expression regulation mediated through reversible m⁶A RNA methylation[J]. Nat Rev Genet, 2014, 15(5):293-306.
 - [4] WEI J B, HE C. Site-specific m⁶A editing[J]. Nat Chem Biol, 2019, 15(9):848-849.
 - [5] BHAT S S, BIELEWICZ D, GULANICZ T, et al. mRNA adenosine methylase (MTA) deposits m⁶A on pri-miRNAs to modulate miRNA biogenesis in *Arabidopsis thaliana*[J]. PNAS, 2020, 117(35):21785-21795.
 - [6] XIAO W, ADHIKARI S, DAHAL U, et al. Nuclear m⁶A reader YTHDC1 regulates mRNA splicing[J]. Mol Cell, 2016, 61(4):507-519.
 - [7] DESROSIERS R, FRIDERICI K, ROTTMAN F. Identification of methylated nucleosides in messenger RNA from Novikoff hepatoma cells[J]. PNAS, 1974, 71(10):3971-3975.
 - [8] BOKAR J A, SHAMBAUGH M E, POLAYES D, et al. Purification and cDNA cloning of the AdoMet-binding subunit of the human mRNA(N⁶-adenosine)-methyltransferase[J]. RNA, 1997, 3(11):1233-1247.
 - [9] LIU J Z, YUE Y N, HAN D L, et al. A METTL3-METTL14 complex mediates mammalian nuclear RNA N⁶-adenosine methylation[J]. Nat Chem Biol, 2014, 10(2):93-95.
 - [10] BUJNICKI J M, FEDER M, RADLINSKA M, et al. Structure prediction and phylogenetic analysis of a functionally diverse family of proteins homologous to the MT-A70 subunit of the human mRNA; m⁶A methyltransferase[J]. J Mol Evol, 2002, 55(4):431-444.
 - [11] SCHWARTZ S, MUMBACH M R, JOVANOVIC M, et al. Perturbation of m⁶A writers reveals two distinct classes of mRNA methylation at internal and 5' sites[J]. Cell Rep, 2014, 8(1):284-296.
 - [12] HILFIKER A, AMREIN H, DÜBENDORFER A, et al. The gene *virilizer* is required for female-specific splicing controlled by *Sxl*, the master gene for sexual development in *Drosophila*[J]. Development, 1995, 121(12):4017-4026.
 - [13] ZHAO X, YANG Y, SUN B F, et al. FTO-dependent demethylation of N⁶-methyladenosine regulates mRNA splicing and is required for adipogenesis[J]. Cell Res, 2014, 24(12):1403-1419.
 - [14] JIA G F, FU Y, ZHAO X, et al. N⁶-methyladenosine in nuclear RNA is a major substrate of the obesity-associated FTO[J]. Nat Chem Biol, 2011, 7(12):885-887.
 - [15] JIA G F, FU Y, HE C. Reversible RNA adenosine methylation in biological regulation[J]. Trends Genet, 2013, 29(2):108-115.
 - [16] YUE H, NIE X J, YAN Z G, et al. N⁶-methyladenosine regulatory machinery in plants: Composition, function and evolution[J]. Plant Biotechnol J, 2019, 17(7):1194-1208.
 - [17] ALARCÓN C R, GOODARZI H, LEE H, et al. HNRNPA2B1 is a mediator of m⁶A-dependent nuclear RNA processing events[J]. Cell, 2015, 162(6):1299-1308.
 - [18] LIU N, ZHOU K I, PARISIEN M, et al. N⁶-methyladenosine alters RNA structure to regulate binding of a low-complexity protein[J]. Nucleic Acids Res, 2017, 45(10):6051-6063.
 - [19] WU B X, SU S C, PATIL D P, et al. Molecular basis for the specific and multivalent recognitions of RNA substrates by human hnRNP A2/B1[J]. Nat Commun, 2018, 9(1):1-12.
 - [20] HUANG H L, WENG H Y, SUN W J, et al. Publisher Correction: Recognition of RNA N⁶-methyladenosine by IGF2BP proteins enhances mRNA stability and translation[J]. Nat Cell Biol, 2020, 22(10):1288.
 - [21] 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[J]. New Phytol, 2017, 215(1):157-172.
 - [22] FEDELES B I, SINGH V, DELANEY J C, et al. The AlkB family of Fe(II)/ α -ketoglutarate-dependent dioxygenases: Repairing nucleic acid alkylation damage and beyond[J]. J Biol Chem, 2015, 290(34):20734-20742.
 - [23] MARTÍNEZ-PÉREZ M, APARICIO F, LÓPEZ-GRESA M P, et al. *Arabidopsis* m⁶A demethylase activity modulates viral infection of a plant virus and the m⁶A abundance in its genomic RNAs[J]. PNAS, 2017, 114(40):10755-10760.
 - [24] DUAN H C, WEI L H, ZHANG C, et al. ALKBH10B is an RNA N⁶-methyladenosine demethylase affecting *Arabidopsis* floral transition[J]. Plant Cell, 2017, 29(12):2995-3011.
 - [25] HU J Z, MANDUZIO S, KANG H. Epitranscriptomic RNA methylation in plant development and abiotic stress responses[J]. Front Plant Sci, 2019, 10:1-11.
 - [26] ZHONG S L, LI H Y, BODI Z, et al. MTA is an *Arabidopsis* messenger RNA adenosine methylase and interacts with a homolog of a sex-specific splicing factor[J]. Plant Cell, 2008, 20(5):1278-1288.
 - [27] BODI Z, ZHONG S L, MEHRA S, et al. Adenosine methylation in *Arabidopsis* mRNA is associated with the 3' end and reduced levels cause developmental defects[J]. Front Plant Sci, 2012, 3:1-10.
 - [28] SHEN L S, LIANG Z, GU X F, et al. N⁶-methyladenosine RNA modification regulates shoot stem cell fate in *Arabidopsis*[J]. Dev Cell, 2016, 38(2):186-200.
 - [29] ZHANG F, ZHANG Y C, LIAO J Y, et al. The subunit of RNA N⁶-methyladenosine methyltransferase OsFIP regulates early degeneration of microspores in rice[J]. PLoS Genet, 2019, 15(5):1-19.
 - [30] ZHOU L L, TIAN S P, QIN G Z. RNA methylomes reveal the m⁶A-mediated regulation of DNA demethylase gene *SIDML2* in tomato fruit ripening[J]. Genome Biol, 2019, 20(1):1-23.
 - [31] SCUTENAIRE J, DERAGON J M, JEAN V, et al. The YTH domain protein ECT2 is an m⁶A reader required for normal trichome branching in *Arabidopsis*[J]. Plant Cell, 2018, 30(5):986-1005.
 - [32] WEI L H, SONG P Z, WANG Y, et al. The m⁶A reader ECT2 controls trichome morphology by affecting mRNA stability in *Arabidopsis*[J]. Plant Cell, 2018, 30(5):968-985.
 - [33] WU J, PELED-ZEHAZI H, GALILI G. The m⁶A reader ECT2 post-transcriptionally regulates proteasome activity in *Arabidopsis*[J]. New Phytol, 2020, 228(1):151-162.
 - [34] ARRIBAS-HERNÁNDEZ L, BRESSENDORFF S, HANSEN M H, et al. An m⁶A-YTH module controls developmental timing and morphogenesis in *Arabidopsis*[J]. Plant Cell, 2018, 30(5):952-967.
 - [35] HUONG T T, NGOC L N T, KANG H. Functional characterization of a putative RNA demethylase ALKBH6 in *Arabidopsis* growth and abiotic stress responses[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(18):1-14.