



m⁶A修饰与植物RNA病毒侵染

葛林豪¹, 潘福安¹, 何浩¹, 贾明轩¹, 李方方^{1*}, 周雪平^{1,2*}

1. 中国农业科学院植物保护研究所, 植物病虫害综合治理全国重点实验室, 北京 100193;

2. 浙江大学生物技术研究所, 水稻生物学国家重点实验室, 杭州 310058

* 联系人, E-mail: lifangfang@caas.cn; zzhou@zju.edu.cn

收稿日期: 2023-09-12; 接受日期: 2023-10-22; 网络版发表日期: 2023-12-29

国家自然科学基金(批准号: 31930089, 31972244)资助

摘要 N⁶-甲基腺嘌呤(N⁶-methyladenosine, m⁶A)是真核生物mRNA中丰度最高的RNA转录后化学修饰。RNA的m⁶A修饰主要由甲基化转移酶(writers)、去甲基化酶(erasers)以及阅读蛋白(reader proteins)共同调控。近年的研究表明, m⁶A修饰在植物病毒侵染中发挥了重要作用, 相关调控机制成为植物病毒领域的研究热点。本文概述了植物RNA m⁶A修饰相关蛋白的基本组成和m⁶A修饰的检测技术, 重点阐述了m⁶A修饰在植物与RNA病毒互作中的作用, 并提出了今后植物RNA病毒m⁶A修饰功能研究的方向。

关键词 m⁶A修饰, 植物, 植物RNA病毒

分子生物学的中心法则指出, 遗传信息从DNA转录为RNA, 再经由RNA翻译为功能性蛋白质。研究表明, 遗传信息传递的各个环节都存在精密的调控方式。已发现DNA甲基化等核苷酸化学修饰、组蛋白甲基化等蛋白质翻译后修饰等表观遗传在生命活动的各个环节发挥着重要调控作用。生物体内RNA上也存在多种表观修饰。自20世纪50年代起, 在RNA上已经发现了超过160种不同类型的化学修饰, 这些修饰广泛存在于tRNA, rRNA, mRNA, snRNA和ncRNA, 并在多种生物学过程中发挥重要功能^[1]。在植物中, mRNA的N⁶-甲基腺嘌呤(N⁶-methyladenosine, m⁶A)修饰占所有腺嘌呤的比例约为0.45%~0.65%, 高于哺乳动物中的0.1%~0.4%^[2]。拟南芥的信使RNA(messenger RNA, mRNA)超过60%存在m⁶A修饰, 且修饰位点在不同拟南芥品种中高度保守, 这暗示了m⁶A修饰在植物RNA

调控中发挥重要作用。作为一种可逆的化学修饰, 植物RNA的m⁶A修饰时刻处于甲基转移酶(writers)和去甲基化酶(erasers)的动态调控中。m⁶A修饰的阅读蛋白(readers)在识别修饰RNA及相应生物学反应中发挥作用。近十年来, 随着生命科学研究特别是酶生物学和高通量测序技术的发展, 研究人员发现m⁶A修饰在基因的表达和调控方面发挥着不可忽视的作用^[3-5]。

1 植物m⁶A修饰相关的蛋白

1.1 植物m⁶A甲基转移酶复合体

m⁶A修饰是最普遍存在的一种mRNA化学修饰。早在20世纪, 研究人员就在哺乳动物细胞、病毒以及植物中发现了m⁶A修饰^[6-9]。生物体内RNA的m⁶A修饰是由一个进化上保守的多组分甲基转移酶复合体协

引用格式: 葛林豪, 潘福安, 何浩, 等. m⁶A修饰与植物RNA病毒侵染. 中国科学: 生命科学, 2024, 54: 447-458

Ge L H, Pan F A, He H, et al. m⁶A modification and plant RNA virus infection (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2024, 54: 447-458, doi: 10.1360/SSV-2023-0213

作完成的. 对哺乳动物的研究表明, m⁶A甲基转移酶复合体可分为两个亚基, 分别为m⁶A-METTL亚基(m⁶A-METTL complex, MAC)和METTL-associated亚基(m⁶A METTL A associated complex, MACOM). 以MTA和MTB为核心的MAC亚基是该复合体的催化核心, 而包含WTAP, VIRMA和HAKAI等辅助蛋白的MACOM亚基是整个甲基转移酶复合体释放全部催化活性所必需的^[10~13].

与动物中的催化过程类似, 植物中m⁶A修饰的催化过程也是由蛋白复合体介导的. 目前, 已经在植物中鉴定到m⁶A甲基转移酶复合体成员包括MTA(mRNA adenosine methylase A, METTL3同源蛋白)、MTB(mRNA adenosine methylase B, METTL14同源蛋白)、FIP37(FKBP12 interacting protein 37 kD, WTAP同源蛋白)、VIR(VIRILIZER, VIRMA同源蛋白)、HAKAI和HIZ2(HAKAI-interacting zinc finger protein)等(图1)^[11,14,15]. 在拟南芥中, MTA在生殖器官、分生组织和新生侧根等分裂旺盛组织中表达较高. MTA突变会导致植物胚胎无法正常发育^[16]. 通过胚胎特异性基因*ABI3*启动子驱动MTA表达, 能够实现*mta*突变体在胚胎发育阶段的存活. 对该存活植株叶片和花器官组织进行m⁶A修饰水平检测, 突变体m⁶A修饰水平与野生型植物相比降低了90%以上, 说明MTA在植物m⁶A修饰中发挥至关重要的功能^[17]. 通过对MTA互作蛋白

的筛选, 鉴定到植物m⁶A甲基转移酶复合体的另一个核心成员FIP37^[16]. FIP37的表达模式与MTA类似, 通过T-DNA插入破坏FIP37也会导致植物胚胎死亡. *fip37*突变的拟南芥芽尖呈过度增殖状态, 自花授粉产生种子在成熟前就表现出异常白化现象. 使用胚胎发育期间在种子中表达较高的NF-Y转录因子*LEAFY COTYLEDON1(LEC1)*基因启动子驱动FIP37在*fip37*突变体中进行回补, 能够获得存活后代. 在*LEC1:FIP37*回补株系中, 植物m⁶A水平显著下降到野生型的20%左右^[18]. 水稻FIP37功能与拟南芥相似, 主要体现在影响水稻花粉母细胞减数分裂和花药发育. 通过生化实验证明, 水稻FIP37在花器官中通过与RNA结合蛋白OsFAP1互作, 进而对生长素合成基因进行特异性m⁶A修饰, 促进花粉母细胞中生长素合成, 调控水稻雄性减数分裂^[19]. VIR蛋白的缺失或突变也能造成拟南芥胚胎发育异常^[15]. 因此, 除HAKAI外, m⁶A甲基转移酶复合体相关蛋白的缺失均能导致植物胚胎发育不完整, 进而影响种子的产生. 这表明m⁶A修饰在植物正常生命活动中发挥着重要作用.

近期的研究表明, AtFIONA1(FIO1)作为动物METTL16同源蛋白, 在拟南芥中发挥U6 m⁶A甲基转移酶的作用^[20~22]. 虽然*fio1*突变体中mRNA整体修饰水平下降到野生型的85%~90%, 但目前还没有其具体底物和修饰位点的定论.

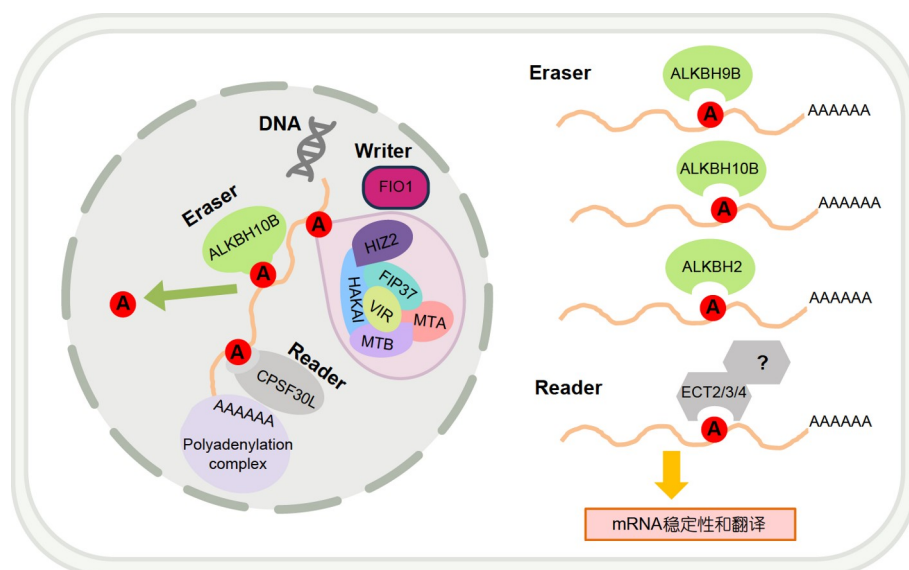


图1 植物m⁶A修饰生物学功能示意图

Figure 1 The biological process of plant m⁶A methylation

与哺乳动物中的研究结论一致, 拟南芥MTA与MTB形成异源二聚体^[12]. 除了MTA-MTB的相互作用以外, 植物FIP37也能够与MTB互作形成同源或者异源聚集体. 此外, HAKAI作为E3泛素连接酶, 也能够通过与MTB互作的形式参与植物m⁶A修饰过程^[15]. 在动物中, METTL3与METTL14以1:1的比例通过蛋白核心结构域形成异源二聚体, 从而增强METTL3的催化活性^[23]. 对一系列甲基转移酶突变体植物的基因表达水平检测表明, 这些植物m⁶A修饰蛋白之间在基因转录水平上没有相互影响, 但存在蛋白稳定性的调控关系. MTA的缺失, 会导致MTB的蛋白稳定性下降. 并且, 在*mta*突变体中, MTB的亚细胞定位也由细胞核定位改变为核质定位. FIP37和VIR能够稳定MTA和MTB蛋白表达水平, 促进m⁶A甲基转移酶复合物的功能发挥. 同时, VIR有利于FIP37和HAKAI蛋白稳定性^[24]. 这些研究表明, 植物甲基转移酶各成员蛋白比例对于它们的生物学功能具有重要意义. 植物中m⁶A相关蛋白的进一步研究将有助于揭示MAC和MACOM两个甲基转移酶复合体之间协同作用以及维持蛋白质平衡的复杂调控网络.

1.2 植物m⁶A去甲基化酶

由于研究技术和方法限制, 对于RNA上的表观修饰是否具有功能长期存在争议. 2011年, 研究人员在肥胖相关基因FTO(fat mass and obesity associated gene)沉默的细胞系中检测到mRNA中m⁶A修饰丰度增加, 而过表达FTO则导致修饰水平降低. 随后, 利用重组的FTO蛋白在体外实现了对m⁶A修饰核酸的去甲基化^[3]. 该研究首次发现了能够擦除m⁶A修饰的去甲基化酶, 直接证明了m⁶A修饰在生物体内存在动态调节能力. 此后, 研究人员还发现, FTO能够优先催化mRNA 5'端帽子m⁶Am的去甲基化^[25]. FTO是大肠杆菌二价铁和 α -酮戊二酸依赖的双加氧酶ALKB家族蛋白. 在人类中已经发现了9个ALKB同源蛋白(前面8个命名为ALKBH1~8, 第9个命名为FTO). 其中, ALKBH5是另一个被证明存在去甲基化酶活性的蛋白^[26]. 这些研究表明, RNA上存在的化学修饰是一类动态、可逆的表观转录组学修饰.

虽然在植物中尚未发现FTO同源蛋白, 但通过对蛋白质序列数据库的生物信息学分析确定了拟南芥中存在13个ALKBH5家族同源蛋白. 亚细胞定位分析显

示, 这些ALKB蛋白在植物细胞中存在不同类型的定位模式, 表明植物中去甲基化酶可能存在较为明确的功能分工^[27]. 目前, 在拟南芥和番茄中已经发现了三个具备体内和体外去甲基化酶活性的ALKB蛋白, 分别是AtALKBH10B, AtALKBH9B和SlALKBH2(图1)^[13-15]. *AtALKBH10B*是拟南芥中表达量最高的ALKB家族基因, 亚细胞定位于细胞核, 能够在体内和体外催化m⁶A去甲基化; *alkbh10b*突变体呈现延迟开花表型, 而过量表达ALKBH10B则使植物出现早花现象; 对*alkbh10b*进行MeRIP高通量测序发现, 拟南芥中约有1190个mRNA的m⁶A修饰水平发生上调, 说明ALKBH蛋白通过调控下游基因m⁶A修饰在植物成花转变过程中发挥了作用^[28]. 细胞质定位的AtALKBH9B是拟南芥中表达水平仅次于AtALKBH10B的去甲基化酶, 但质谱技术没有鉴定到*alkbh9b*突变体中整体m⁶A丰度发生变化^[29]. 番茄SlALKBH2蛋白也被报道具备m⁶A去甲基化酶活性, SlALKBH2虽然是拟南芥AtALKBH9B的同源蛋白, 但其亚细胞定位在内质网中, SlALKBH2通过特异性擦除DNA去甲基化酶基因SIDML2的m⁶A修饰并增加SIDML2 mRNA稳定性, 促进番茄果实成熟^[30].

1.3 植物m⁶A阅读蛋白

m⁶A修饰对RNA代谢过程的影响主要取决于阅读蛋白的功能. 在动物中的研究已经发现了多种类型的m⁶A修饰识别和结合蛋白, 包括含有YTH(YT521-B)结构域的YTHDFs和YTHDCs蛋白^[31,32], RNA结合蛋白HNRPNPA2B1^[33,34], 类胰岛素生长因子蛋白IGF2BPs^[35], 真核生物起始因子eIF3^[36]以及核糖核酸蛋白C(HNRNPC)^[37]等. 这些m⁶A修饰蛋白通过识别和结合相应修饰的RNA底物, 在RNA剪切、稳定性、翻译、出核以及小RNA的成熟等方面发挥重要功能^[11,14].

目前, 在植物中已经确定具备m⁶A识别功能的阅读蛋白较少且均属于YTH蛋白家族. 通过对拟南芥和水稻进行同源序列比对, 分别鉴定到13和12个YTH蛋白, 命名为ECT(evolutionarily conserved C-terminal region)蛋白家族^[38]. 由于识别m⁶A修饰的芳香口袋形YTH结构域在动植物中高度保守, 因此ECT蛋白在植物中可能具有识别m⁶A修饰的功能. ECT蛋白在植物各发育阶段和组织器官中呈现不同的表达模式, 表明

m⁶A修饰在植物中存在功能多样性。研究表明,拟南芥ECT2、ECT3和ECT4三个蛋白功能冗余,能够识别m⁶A修饰的mRNA并介导叶片毛状体发育(图1)^[39-41]。ECT2蛋白还能够通过识别20S蛋白酶体亚基mRNA的m⁶A修饰以平衡幼苗和成熟生长阶段植物20S和26S蛋白酶体活性差异^[42]。两项独立的研究表明,CPSF30较长剪切形式CPSF-L包含一个YTH结构域,是动物YTHDC1的同源蛋白,能够在体外与m⁶A修饰的RNA结合。CPSF-L作为m⁶A阅读蛋白在细胞核内形成相分离液滴,并参与拟南芥mRNA的poly(A)位点选择^[43]。CPSF30L功能缺陷植株产生大量异常mRNA嵌合体,表明m⁶A修饰在确保植物转录组的正确性和完整性中发挥作用^[44,45]。

动物中的研究表明,具备YTH结构的m⁶A阅读蛋白存在功能冗余^[46]。植物m⁶A阅读蛋白ECT2/3/4也被报道存在功能冗余现象。植物中含有YTH结构域蛋白数量较动物中更为丰富,但目前尚不清楚植物其他YTH类型蛋白的m⁶A识别功能。早年研究发现,ECT蛋白保守的C端结构域能够与蛋白激酶CIPK蛋白互作,表明ECT蛋白可能具备潜在的磷酸化修饰位点,这也为钙离子信号传递链通过表观修饰调控生命进程提供了理论依据^[47]。此外,也有研究发现,ECT蛋白的过量表达可以提高植物对病害的抗性,表明植物m⁶A修饰在植物与病原微生物的相互作用中发挥重要功能^[48,49]。未来对植物m⁶A阅读蛋白的鉴定和功能研究将有助于解析m⁶A修饰在植物生长发育和逆境胁迫防卫反应中精细化调控功能。

2 植物m⁶A检测技术

m⁶A修饰检测技术是研究m⁶A功能的基础。新技术在过去十年中不断涌现,极大推动了RNA表观遗传学领域的研究。目前,用于m⁶A修饰的分析方法主要包括毛细管电泳(capillary electrophoresis, CE)、液相色谱(liquid chromatography, LC)、液相色谱-质谱联用(liquid chromatography/mass spectrometry, LC-MS)、m⁶A抗体点杂交(Dot-blot)等方法,以及基于碱基测序技术鉴定修饰位点的方法^[11]。高通量测序技术的发展,使得RNA上化学修饰分布位点的确认成为可能。目前,全转录图谱范围的RNA修饰位点检测技术大致分为抗体依赖和非抗体依赖两种类型。

2.1 抗体依赖型m⁶A修饰检测

2012年,两个独立实验室先后报道了全基因组m⁶A修饰检测技术^[4,5]。这一技术基于m⁶A特异性抗体免疫富集被修饰的RNA片段,随后通过高通量测序以确认含有m⁶A修饰的RNA序列。基于这种被称之为甲基化RNA免疫沉淀测序法(methylated RNA immunoprecipitation sequencing, MeRIP-Seq),研究人员首次实现对生物体内m⁶A修饰位点分布的全局检测。在动物细胞中,m⁶A修饰在内含子以及终止密码子附近有较高的富集,而植物中可能不同^[2,4]。在这一方法的基础上,研究人员将MeRIP-Seq进行升级,对不同样本RNA进行标记后混合建库测序^[50]。在增加富集产量的同时,降低了抗体使用成本,也减少了各样品组间技术性差异。目前,MeRIP-Seq是植物领域m⁶A修饰研究的主流检测方法。

使用MeRIP-Seq检测m⁶A修饰的分布也具有一定的局限性。其检测分辨率高度依赖片段化RNA质量。一般来说,使用化学方法将RNA打断到为100~200 nt片段,会在高通量测序时出现宽峰现象。由于分辨率较低,通常很难确认目标RNA上被m⁶A修饰的确切位点^[51]。研究人员发现,使用m⁶A抗体经254 nm紫外光与含有m⁶A修饰的RNA进行交联,随后通过酶解消化后进行RNA反转录,会在cDNA+1位置产生突变;通过比对分析,最终得以单碱基分辨率获得m⁶A修饰位点信息;基于这一现象研发了一种单核苷酸分辨率的m⁶A检测技术(m⁶A individual-nucleotide-resolution crosslinking and immunoprecipitation, miCLIP)^[52]。miCLIP以及其他单碱基分辨率的检测技术的发明是m⁶A修饰检测领域的重要进展。这些技术还没有在植物领域广泛应用,但以此带来的哺乳动物精细m⁶A修饰基因组为后期植物相关功能的研究提供了重要依据。

最近,通过优化了MeRIP-Seq的关键步骤建立了picoMeRIP-seq检测技术,大幅度提高了m⁶A修饰检测灵敏度。该研究将细胞裂解产物的基因组DNA与核糖体RNA进行去除、优化RNA片段化策略、改良m⁶A抗体使用及洗涤条件,通过定制的新型测序文库构建,达到了皮克级别的m⁶A修饰检测精度^[53]。这种新型修饰检测方法将有助于在单细胞层面对m⁶A修饰动态调控的研究。

2.2 非抗体依赖型m⁶A修饰检测

由于m⁶A抗体批次间富集效果差异较大, 且价格较高, 抗体依赖型m⁶A高通量检测的应用无法在较大范围内普及. 因此, 研究人员也致力于开发非抗体依赖型的m⁶A修饰检测技术. 例如MAZTER-seq使用RNA内切酶MazF在转录产物上绘制单碱基分辨率的修饰图谱. 该技术的修饰检测覆盖率可达16%~25%^[54]. 还有研究报道了一种名为DART-seq的检测方法, 该方法利用动物m⁶A阅读蛋白YTH结构域与脱氨酶融合表达, 将m⁶A修饰的碱基进行脱氨替换, 再进行高通量测序以确定修饰位点^[55]. 这种方法无法在体外实现, 并且高度依赖动物细胞的转染效率, 目前在植物中还未得到应用.

基于FTO亲和辅助化学标记的方法, 在植物中开发了m⁶A-SEAL(FTO-assisted m⁶A selective chemical labeling method)技术. 该方法利用m⁶A去甲基酶FTO作为辅助, 将mRNA上m⁶A修饰转化为高反应活性中间产物N⁶-羟甲基腺嘌呤(N⁶-hydroxymethyladenosine, hm⁶A), 然后利用二硫苏糖醇与hm⁶A发生化学反应, 将hm⁶A转化为稳定的巯基加成产物dm⁶A. 通过dm⁶A上的自由巯基进行下一步化学反应, 最终将生物素标记在mRNA m⁶A修饰的位点. 而生物素标记的RNA又可以被链霉素亲和凝胶富集, 从而实现对总RNA中被m⁶A修饰组分的分离纯化及测序分析^[56].

另外, 单分子纳米孔测序技术也能够实现对RNA修饰的检测. 纳米孔技术的原理是利用电压驱动核酸穿过固相纳米孔. 不同的核苷酸通过纳米孔时, 会产生相应可检测的阻断电流, 最后根据电流变化特点可以确认核苷酸的修饰类型^[57,58]. 目前, 针对不同修饰产生的电流变化特点, 已经可以做到多种RNA修饰类型的检测. 由于RNA降解速度快, 易发生结构分子内结构折叠等特点, RNA单分子测序技术成本高、准确性低、对RNA质量和初始量要求较高, 因此没有得到大规模应用.

m⁶A-SAC-Seq(selective allyl chemical labeling and sequencing)可以直接对m⁶A修饰进行化学标记, 实现在单碱基分辨率上对m⁶A位点的精准定位. 该方法主要原理是使用一种特定的酶在m⁶A上添加一个烯丙基化学基团, 形成a⁶m⁶A, 随后进行化学试剂处理环化. 环化后的a⁶m⁶A在反转录过程中形成突变形式, 最后

基于测序信息获得m⁶A修饰位点^[59]. 这种方法不仅不依赖抗体, 并且对RNA样品量要求极低(30 ng mRNA或去核糖体RNA). m⁶A-SAC-Seq技术在体外进行操作, 因此理论上可以广泛应用于不同物种RNA的m⁶A修饰检测. 在实际操作过程中, 由于m⁶A-SAC-Seq基于酶催化反应进行RNA的修饰检测, 往往因酶的选择偏好性导致修饰信号的差异性富集. 与DNA甲基化亚硫酸氢盐测序的原理类似, 在RNA m⁶A修饰检测中也发现了通过化学试剂处理产生突变的方法, 对修饰位点进行精准定位. 乙二醛和亚硝酸盐处理RNA后, 未甲基化腺苷会发生脱氨作用突变为肌苷, 而m⁶A修饰的腺苷酸则不发生突变. 肌苷在反转录过程中与胞嘧啶配对, 最终互补产生鸟苷, 产生A-G转化. 这项技术被命名为GLORI(glyoxal and nitrite-mediated deamination of unmethylated adenosines). 基于这一技术, 实现了小鼠和人类细胞的m⁶A修饰的定量检测^[60]. 由于这项技术基于化学试剂处理, 没有偏好性差异, 并且能够在体外对RNA进行操作, 未来在植物m⁶A修饰的研究中较大的应用前景.

m⁶A修饰检测技术发展日新月异. 与GLORI技术同期发表的eTAM-seq(evolved TadA-assisted N⁶-methyladenosine sequencing)技术采用酶催化的脱氨反应对转录组范围内的m⁶A位点进行无偏好性定量检测. 与GLORI不同的是使用了脱氨酶进行生化反应, 将样品中未被修饰的腺嘌呤转化为肌苷. 该技术通过酶催化介导腺苷突变, 操作条件温和, 能最大程度保留RNA的完整性. 更为重要的是, 该方法能实现对极少量RNA m⁶A修饰定量检测^[61]. 这项技术的开发将有助于对微量RNA的修饰检测, 并具备发展成单细胞水平的m⁶A定量测序方法的潜力. 未来, 结合植物单细胞转录组学以及空间转录组学的发展, 微量m⁶A修饰检测技术将有助于植物RNA转录调控功能的精细化研究.

3 m⁶A修饰在植物与RNA病毒互作中的作用

3.1 m⁶A修饰在动物病毒侵染中的作用

从1975年至今, 病毒转录本上的m⁶A修饰的现象被陆续发现^[62]. 病毒在体内侵染复制的过程中, 通过利用宿主细胞内甲基转移酶和去甲基化酶完成对转录本的修饰. 研究发现, m⁶A作为一种表观遗传学修饰, 对不同病毒生命周期的调节功能并不完全相同. 使用

MeRIP-seq测序发现,寨卡病毒(Zika virus, ZIKV)转录本上存在12个m⁶A修饰位点,其复制能力受寄主m⁶A相关蛋白调控^[63]。同属于黄病毒科(Flaviviridae)的丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)也被报道存在m⁶A修饰。虽然甲基转移酶METTL3和METTL14表达水平对于HCV RNA的复制和翻译没有显著影响,但m⁶A修饰水平与HCV病毒粒子的产生和释放存在关联^[64,65]。乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)前基因组RNA(pregenome RNA, pgRNA)5'端ε茎环和3'端都存在m⁶A修饰。敲低寄主甲基转移酶METTL3和METTL14有利于HBV复制,而敲低去甲基化酶ALKBH5和FTO,会降低病毒蛋白的表达。5'端ε茎环上的m⁶A修饰有助于pgRNA的逆转录,而3'端的m⁶A修饰负调控HBV RNA的稳定性。

随着对m⁶A修饰机制研究的深入,发现其对RNA的调控作用复杂多样。RNA的转录后修饰是宿主细胞区分自身和外源核酸的重要分子标记。研究表明,部分病毒已经进化出利用m⁶A修饰系统躲避宿主对外源核酸的监控功能。部分病毒RNA被m⁶A修饰后,更有利于逃脱寄主的识别。有研究表明,卡波氏肉瘤相关疱疹病毒(Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus, KSHV)进化出一种操纵寄主m⁶A修饰功能从而促进其裂解复制的能力^[66,67]。猴空泡病毒40(simian vacuolating virus 40, SV40)转录产物上的m⁶A修饰有利于病毒的复制^[68]。m⁶A修饰在人类呼吸道合胞病毒(respiratory syncytial virus, RSV)复制周期和病毒发病起到促进作用^[69]。人类偏肺病毒(human metapneumovirus, HMPV)被m⁶A修饰后有利于其复制和基因表达。m⁶A位点突变型的HMPV能够诱导更高表达水平的RIG-I并促进其构象变化,从而导致干扰素表达增强^[70,71]。

3.2 m⁶A修饰在植物与病毒互作中的作用

m⁶A表观修饰不仅存在于动物病毒,在植物病毒中也被发现。MeRIP-seq测序发现,苜蓿花叶病毒(alfalfa mosaic virus, AMV)转录本中存在潜在的m⁶A修饰位点;以AMV外壳蛋白(coat protein, CP)为诱饵通过酵母双杂交筛选拟南芥文库,发现CP能够与去甲基化酶家族成员AtALKBH9B发生特异性互作;AtALKBH9B在细胞中可以与加工小体(processing-body, P-body)的标记蛋白DCP1以及小RNA body的标记蛋白SGS3均存在共定位;在alkbh9b突变体拟南芥中,AMV转录本

中m⁶A修饰上调约35%^[29];因此,AMV编码的CP蛋白可能是通过蛋白相互作用的方式招募植物去甲基化酶,介导自身被m⁶A修饰RNA的去甲基化,进而有利于病毒感染(图2)。与AMV同属于雀麦花叶病毒科(Bromoviridae)的黄瓜花叶病毒(cucumber mosaic virus, CMV)转录本也存在m⁶A修饰,但CMV侵染效率在alkbh9b突变体中却不受影响;进一步实验表明,与AMV不同的是,CMV的CP蛋白并不能与AtALKBH9B发生互作^[29]。马铃薯Y病毒(potato Y virus, PVY)RNA转录本上存在2~4个潜在的m⁶A修饰位点,沉默植物去甲基化酶基因,有利于病毒感染^[72]。研究发现,沉默灰飞虱的m⁶A甲基转移酶基因LsMETTL3和LsMETTL14后,水稻黑条矮缩病毒(rice black-stripe dwarf virus, RBSDV)在昆虫介体中肠细胞中的病毒滴度显著增加。因此,m⁶A修饰对灰飞虱体内RBSDV复制有负调控作用^[73]。通过对凤果花叶病毒(pepino mosaic virus, PepMV)侵染番茄和本氏烟样品进行MeRIP测序后,发现PepMV病毒RNA上也存在明显的m⁶A修饰信号;提纯PepMV侵染植物的病毒粒子并萃取RNA进行m⁶A抗体的Dot-blot实验,进一步验证了病毒RNA上存在m⁶A修饰;m⁶A甲基转移酶MTA和HAKAI的表达能够显著增加病毒RNA的m⁶A修饰,并抑制PepMV侵染;随后发现本氏烟m⁶A阅读蛋白ECT2A/2B/2C能够识别病毒的m⁶A修饰并通过与RNA降解相关蛋白UPF3和SMG7互作从而介导对病毒RNA的降解(图2)^[49]。由于ECT蛋白与UPF3和SMG7的互作发生在P-body,与此前拟南芥ALKBH9B作用于AMV的亚细胞定位一致^[29]。与这个结果类似的是,在动物中的研究也发现阅读蛋白YTHDF1识别m⁶A修饰的爱泼斯坦-巴尔病毒(Epstein-Barr virus, EBV)转录本,募集DCP2对EBV的RNA进行去帽,加速病毒RNA降解^[74]。这一系列研究结果表明,作为RNA加工场所的P-body同时发生着病毒转录本m⁶A的修饰与擦除。

病毒感染也会扰乱植物内源RNA的m⁶A修饰水平。通过高分辨率质谱分析发现,烟草花叶病毒(tobacco mosaic virus, TMV)侵染后,烟草内源m⁶A去甲基化酶基因表达水平升高,而甲基转移酶基因表达水平降低。m⁶A相关基因的差异性表达也导致植物整体m⁶A修饰水平的下降。据统计,在TMV感染烟草的第21天,内源基因m⁶A修饰水平下降了40%^[75]。同属烟草花叶病毒科的黄瓜绿斑驳花叶病毒(cucumber green mottle

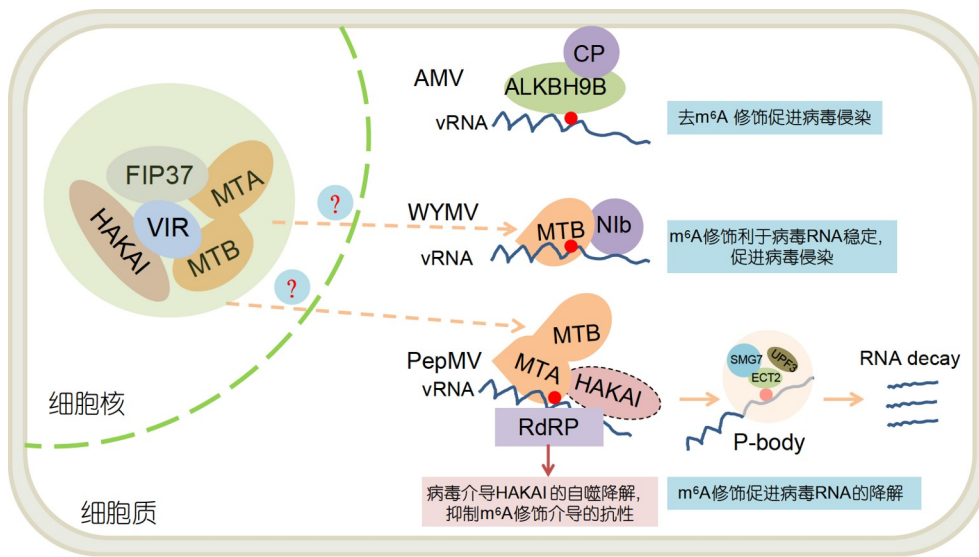


图 2 m^6A 修饰在植物病毒侵染中的机制研究

Figure 2 Mechanistic studies of m^6A methylation in plant virus infection

mosaic virus, CGMMV) 侵染西瓜后, 造成植物整体 m^6A 修饰水平下降。随后的基因表达水平检测发现, 西瓜 m^6A 去甲基化酶 ALKBH4B 的表达显著增加^[76]。PePMV 侵染造成番茄和本氏烟内源基因整体表达水平升高, 而 m^6A 修饰水平下降^[49]。通过对 m^6A 去甲基化酶关键结构域进行比对分析, 在 PVY 编码的 P1 蛋白上发现了保守的 ALKB 结构域。这表明, 病毒编码蛋白很可能在植物中起到去甲基化酶的功能, 并以此操控寄主体内整体 m^6A 修饰水平^[72]。通过定量检测和免疫荧光标记等方法, 发现携带 RBSDV 的灰飞虱体内 m^6A 量下降了 21.42%, 其肠道中 m^6A 荧光强度仅为无毒灰飞虱的 55.8%, 说明携带 RBSDV 影响灰飞虱 m^6A 甲基化修饰^[73]。另外, 在单子叶植物病毒——水稻条纹病毒 (rice stripe virus, RSV) 或 RBSDV 侵染水稻后, 通过 MeRIP 高通量测序技术发现 m^6A 修饰峰值增加。虽然这些增加的 m^6A 修饰信号几乎覆盖了整个植物生命过程相关基因, 但主要集中在 RNA 沉默、抗病性以及抗病毒激素相关通路^[77]。小麦黄花叶病毒 (wheat yellow mosaic virus, WYMV) 侵染抗感品种小麦后, m^6A 修饰差异峰值也富集到了植物防御反应和植物-病原体相互作用相关基因^[78]。以上的研究从整体上明确了病毒侵染后能够对植物内源基因的 m^6A 修饰水平进行操控, 然而内源基因 m^6A 整体水平的升高或降低对于病毒侵染过程中的具体作用机理还需进一步研究。

随着对植物病毒 m^6A 修饰作用机制研究的深入, 发现其对病毒侵染的调控机制具有复杂多样性。通过甲基转移酶与去甲基化酶的动态调节, RNA 上的 m^6A 修饰最终被阅读蛋白识别并发挥相应的功能。阅读蛋白通过招募 RNA 降解相关蛋白, 影响病毒 RNA 的稳定性^[49]。而病毒为了抵御 m^6A 修饰对其基因组 RNA 的影响, 也进化出多种类型的反防御机制。研究发现, PepMV 编码的 RdRP 蛋白能够与植物 m^6A 甲基转移酶 HAKAI 互作, 并激活自噬途径以降解除 HAKAI 蛋白, 从而破坏植物 m^6A 修饰复合体功能 (图 2)^[79]。不同病毒的复制酶在与 m^6A 相关蛋白相互作用产生的功能可能不同。部分植物病毒进化出在特定位点进行 m^6A 修饰以逃脱寄主对外源核酸的识别功能。WYMV 编码的复制酶 Nib 能够诱导小麦甲基转移酶 TaMTB 出核, 对病毒 RNA 1 特定位点进行 m^6A 修饰, 该修饰有利于病毒 RNA 稳定性 (图 2)^[80]。由于动物病毒 HBV 编码 RNA 上 5' 端和 3' 端 m^6A 修饰分别影响逆转录功能和 RNA 稳定性。因此, 无论是植物病毒还是动物病毒中的研究都表明, m^6A 修饰在病毒转录本上的不同位置可能发挥不同功能。

一系列研究表明, 植物病毒侵染寄主后, 能够被甲基转移酶复合体进行 m^6A 修饰。并且, 病毒的侵染也导致了植物内源基因 m^6A 修饰的紊乱。目前, 已经有一些研究报道了甲基转移酶和去甲基化酶对于病毒侵染能

力的影响, 但对于m⁶A阅读蛋白对修饰的病毒RNA的影响还没有得到深入的挖掘. 总之, m⁶A作为病毒转录本上普遍存在的化学修饰, 在病毒与寄主的互作关系上的功能机理仍不清晰. 关于病毒转录本甲基化水平与寄主识别能力的动态关系可能是未来病毒感染机理研究的一个方向.

4 展望

得益于m⁶A修饰检测技术和动物相关研究的快速发展, m⁶A修饰在植物中的功能研究也取得了一定进展. 这些成果主要表现在鉴定了m⁶A甲基转移酶复合体成员^[15,18,24], 去甲基化酶^[28]以及部分阅读蛋白^[40,41,44,45]. 研究发现, m⁶A修饰对植物整个生命周期以及在逆境胁迫下的基因表达调控都具有重要意义. 如何将m⁶A修饰功能应用到作物品质改良及遗传育种是研究人员需要关注的问题. 最近的研究发现, m⁶A甲基转移酶和去甲基化酶能够调节草莓和番果实成熟^[30,81]. 由于植物中没有动物去甲基化酶FTO的同源基因, 科学家尝试通过转基因技术将人类FTO蛋白引入到水稻和马铃薯中. 实验表明, FTO在植物中发挥对特定内源基因m⁶A修饰的擦除功能. 同时, 过表达FTO大幅提高作物产量和生物量, 使水稻和马铃薯增产约50%. 这种通过异源表达m⁶A相关基因改良农作物品质的方式有望成为未来农业粮食生产安全的重要保障^[82].

尽管植物m⁶A修饰在物种间高度保守, 但与动物相比, 在植物中也存在特有作用机制(如植物特异性m⁶A阅读蛋白CPSF30-L)^[44,45]. 对植物中相应调控机制的研究将会拓宽对m⁶A修饰功能的认知. 然而, 与动物相比, 目前植物中鉴定的相关功能蛋白数量较少, 植物中是否存在其他特异性m⁶A修饰相关蛋白有待进一步探索. 深入研究m⁶A修饰的位点和转录本特异性选择

的机制也是未来值得关注的研究方向.

在过去的十年中, 通过RNA修饰检测技术的开发和应用提高了对m⁶A表观修饰的功能性认识. 尽管越来越多的证据表明m⁶A修饰在植物应对胁迫反应中发挥功能, 对植物应对胁迫反应中mRNA修饰的研究仍处于初级阶段. 例如, m⁶A如何在不同的胁迫条件下特异性调控特定转录产物丰度等问题仍未得到解决. 未来的研究重点是解析mRNA修饰如何动态调节植物不同发育过程和对环境胁迫的反应. 虽然m⁶A是真核生物mRNA中最丰富的修饰, 但其绝对含量很低, 并且细胞中大量存在的rRNA和tRNA严重干扰检测效率. 因此, 通过高特异性的方法来富集含有m⁶A修饰的RNA成为植物领域相关功能研究的关键. 目前新型测序技术的发展极大促进了m⁶A的功能研究. 然而, 目前建立的这些新型检测还没有在植物系统上进行过测试. 迄今为止报道的大多数m⁶A修饰图谱都是使用基于抗体的MeRIP-seq高通量测序数据获得的, 这些数据目前还无法准确定位到转录本中m⁶A修饰位点. 因此, 开发新的实验技术, 如纳米孔测序, 以单碱基分辨率绘制mRNA修饰图谱, 将有助于突破目前植物m⁶A修饰功能研究的瓶颈. 开发或改进针对植物m⁶A修饰研究的新型检测技术将加速植物系统中m⁶A研究的发展. 在解析了mRNA特定位点修饰的生物学功能后, 再基于CRISPR基因编辑技术定向改变基因组位点将有助于对植物相应性状的人工定向改造^[83,84].

在植物病毒进化过程中, 为了适应寄主环境, 部分病毒也演化出了包含去甲基化酶关键结构的蛋白^[72]. 然而, 目前尚无研究表明这些病毒蛋白是否具备了体内m⁶A修饰的擦除功能, 以及这些病毒蛋白的表达能否对植物生长发育以及抗逆防卫反应产生影响. 但可以预见的是, 未来通过植物基因组工程或病毒载体递送异源的m⁶A修饰调控蛋白, 有望成为植物抗病毒或作物性状表观遗传重编程的新策略.

参考文献

- 1 Dunin-Horkawicz S, Czerwoniec A, Gajda M J, et al. MODOMICS: a database of RNA modification pathways. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34: D145–D149
- 2 Luo G Z, MacQueen A, Zheng G, et al. Unique features of the m⁶A methylome in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Commun*, 2014, 5: 5630
- 3 Jia G, Fu Y, Zhao X, et al. N⁶-methyladenosine in nuclear RNA is a major substrate of the obesity-associated FTO. *Nat Chem Biol*, 2011, 7: 885–887

- 4 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: 201–206
- 5 Meyer K D, Saletore Y, Zumbo P, et al. Comprehensive analysis of mRNA methylation reveals enrichment in 3' UTRs and near stop codons. *Cell*, 2012, 149: 1635–1646
- 6 Desrosiers R, Friderici K, Rottman F. Identification of methylated nucleosides in messenger RNA from Novikoff hepatoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1974, 71: 3971–3975
- 7 Wei C M, Moss B. Nucleotide sequences at the N⁶-methyladenosine sites of HeLa cell messenger ribonucleic acid. *Biochemistry*, 1977, 16: 1672–1676
- 8 Canaani D, Kahana C, Lavi S, et al. Identification and mapping of N⁶-methyladenosine containing sequences in Simian virus 40 RNA. *Nucl Acids Res*, 1979, 6: 2879–2899
- 9 Nichols J L, Welder L. Nucleotides adjacent to N⁶-methyladenosine in maize poly(A)-containing RNA. *Plant Sci Lett*, 1981, 21: 75–81
- 10 Knuckles P, Lence T, Haussmann I U, et al. Zc3h13/Flacc is required for adenosine methylation by bridging the mRNA-binding factor Rbm15/ Spenito to the m⁶A machinery component Wtap/Fl(2)d. *Genes Dev*, 2018, 32: 415–429
- 11 Shen L, Ma J, Li P, et al. Recent advances in the plant epitranscriptome. *Genome Biol*, 2023, 24: 43
- 12 Liu J, Yue Y, Han D, et al. A METTL3-METTL14 complex mediates mammalian nuclear RNA N⁶-adenosine methylation. *Nat Chem Biol*, 2014, 10: 93–95
- 13 Ping X L, Sun B F, Wang L, et al. Mammalian WTAP is a regulatory subunit of the RNA N⁶-methyladenosine methyltransferase. *Cell Res*, 2014, 24: 177–189
- 14 Tang J, Chen S, Jia G. Detection, regulation, and functions of RNA N⁶-methyladenosine modification in plants. *Plant Commun*, 2023, 4: 100546
- 15 Růžicka 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: 157–172
- 16 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: 1278–1288
- 17 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
- 18 Shen L, Liang Z, Gu X, et al. N⁶-methyladenosine RNA modification regulates shoot stem cell fate in *Arabidopsis*. *Dev Cell*, 2016, 38: 186–200
- 19 Cheng P, Bao S, Li C, et al. RNA N⁶-methyladenosine modification promotes auxin biosynthesis required for male meiosis in rice. *Dev Cell*, 2022, 57: 246–259.e4
- 20 Xu T, Wu X, Wong C E, et al. FIONA1-mediated m⁶A modification regulates the floral transition in *Arabidopsis*. *Adv Sci*, 2022, 9: e2103628
- 21 Wang C, Yang J, Song P, et al. FIONA1 is an RNA N⁶-methyladenosine methyltransferase affecting *Arabidopsis* photomorphogenesis and flowering. *Genome Biol*, 2022, 23: 40
- 22 Pendleton K E, Chen B, Liu K, et al. The U6 snRNA m⁶A methyltransferase METTL16 regulates SAM synthetase intron retention. *Cell*, 2017, 169: 824–835.e14
- 23 Schöller E, Weichmann F, Treiber T, et al. Interactions, localization, and phosphorylation of the m⁶A generating METTL3-METTL14-WTAP complex. *RNA*, 2018, 24: 499–512
- 24 Shen L. Functional interdependence of N⁶-methyladenosine methyltransferase complex subunits in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2023, 35: 1901–1916
- 25 Mauer J, Luo X, Blanjoie A, et al. Reversible methylation of m⁶Am in the 5' cap controls mRNA stability. *Nature*, 2017, 541: 371–375
- 26 Zheng G, Dahl J A, Niu Y, et al. ALKBH5 is a mammalian RNA demethylase that impacts RNA metabolism and mouse fertility. *Mol Cell*, 2013, 49: 18–29
- 27 Mielecki D, Zugaj D L, Muszewska A, et al. Novel AlkB dioxygenases—alternative models for *in silico* and *in vivo* studies. *PLoS ONE*, 2012, 7: e30588
- 28 Duan H C, Wei L H, Zhang C, et al. ALKBH10B is an RNA N⁶-methyladenosine demethylase affecting *Arabidopsis* floral transition. *Plant Cell*, 2017, 29: 2995–3011
- 29 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. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114: 10755–10760
- 30 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
- 31 Wang X, Zhao B S, Roundtree I A, et al. N⁶-methyladenosine modulates messenger RNA translation efficiency. *Cell*, 2015, 161: 1388–1399
- 32 Xu C, Wang X, Liu K, et al. Structural basis for selective binding of m⁶A RNA by the YTHDC1 YTH domain. *Nat Chem Biol*, 2014, 10: 927–929
- 33 Zhou K I, Shi H, Lyu R, et al. Regulation of co-transcriptional pre-mRNA splicing by m⁶A through the low-complexity protein hnRNP G. *Mol Cell*, 2019, 76: 70–81.e9
- 34 Alarcón C R, Goodarzi H, Lee H, et al. HNRNPA2B1 is a mediator of m⁶A-dependent nuclear RNA processing events. *Cell*, 2015, 162: 1299–1308
- 35 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: 285–295
- 36 Meyer K D, Patil D P, Zhou J, et al. 5' UTR m⁶A promotes cap-independent translation. *Cell*, 2015, 163: 999–1010
- 37 Liu N, Dai Q, Zheng G, et al. N⁶-methyladenosine-dependent RNA structural switches regulate RNA-protein interactions. *Nature*, 2015, 518: 560–564
- 38 Li D, Zhang H, Hong Y, et al. Genome-wide identification, biochemical characterization, and expression analyses of the YTH domain-containing RNA-binding protein family in *Arabidopsis* and rice. *Plant Mol Biol Rep*, 2014, 32: 1169–1186
- 39 Arribas-Hernández L, Bressendorff S, Hansen M H, et al. An m⁶A-YTH module controls developmental timing and morphogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2018, 30: 952–967
- 40 Wei L H, Song P, Wang Y, et al. The m⁶A reader ECT2 controls trichome morphology by affecting mRNA stability in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2018, 30: 968–985
- 41 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*. *Plant Cell*, 2018, 30: 986–1005
- 42 Wu J, Peled-Zehavi H, Galili G. The m⁶A reader ECT2 post-transcriptionally regulates proteasome activity in *Arabidopsis*. *New Phytol*, 2020, 228: 151–162
- 43 Yu Z, Lin J, Li Q Q. Transcriptome analyses of FY mutants reveal its role in mRNA alternative polyadenylation. *Plant Cell*, 2019, 31: 2332–2352
- 44 Song P, Yang J, Wang C, et al. *Arabidopsis* N⁶-methyladenosine reader CPSF30-L recognizes FUE signals to control polyadenylation site choice in liquid-like nuclear bodies. *Mol Plant*, 2021, 14: 571–587
- 45 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: 688–699
- 46 Zaccara S, Jaffrey S R. A unified model for the function of YTHDF proteins in regulating m⁶A-modified mRNA. *Cell*, 2020, 181: 1582–1595.e18
- 47 Ok S H, Jeong H J, Bae J M, et al. Novel CIPK1-associated proteins in *Arabidopsis* contain an evolutionarily conserved C-terminal region that mediates nuclear localization. *Plant Physiol*, 2005, 139: 138–150
- 48 Guo T, Liu C, Meng F, et al. The m⁶A reader MhYTP2 regulates *MdMLO19* mRNA stability and antioxidant genes translation efficiency conferring powdery mildew resistance in apple. *Plant Biotechnol J*, 2022, 20: 511–525
- 49 He H, Ge L, Chen Y, et al. m⁶A modification of plant virus enables host recognition by NMD factors in plants. *Sci China Life Sci*, 2023, doi: 10.1007/s11427-022-2377-1
- 50 Dierks D, Garcia-Campos M A, Uzonyi A, et al. Multiplexed profiling facilitates robust m⁶A quantification at site, gene and sample resolution. *Nat Methods*, 2021, 18: 1060–1067
- 51 Meyer K D, Jaffrey S R. Rethinking m⁶A readers, writers, and erasers. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2017, 33: 319–342
- 52 Linder B, Grozhik A V, Orlarier-George A O, et al. Single-nucleotide-resolution mapping of m⁶A and m⁶Am throughout the transcriptome. *Nat Methods*, 2015, 12: 767–772
- 53 Li Y, Wang Y, Vera-Rodriguez M, et al. Single-cell m⁶A mapping *in vivo* using picoMeRIP-seq. *Nat Biotechnol*, 2023, doi: 10.1038/s41587-023-01831-7
- 54 Garcia-Campos M A, Edelheit S, Toth U, et al. Deciphering the “m⁶A code” via antibody-independent quantitative profiling. *Cell*, 2019, 178: 731–747.e16
- 55 Meyer K D. DART-seq: an antibody-free method for global m⁶A detection. *Nat Methods*, 2019, 16: 1275–1280
- 56 Wang Y, Xiao Y, Dong S, et al. Antibody-free enzyme-assisted chemical approach for detection of N⁶-methyladenosine. *Nat Chem Biol*, 2020,

16: 896–903

- 57 Gao Y, Liu X, Wu B, et al. Quantitative profiling of N^6 -methyladenosine at single-base resolution in stem-differentiating xylem of *Populus trichocarpa* using Nanopore direct RNA sequencing. *Genome Biol*, 2021, 22: 22
- 58 Leger A, Amaral P P, Pandolfini L, et al. RNA modifications detection by comparative Nanopore direct RNA sequencing. *Nat Commun*, 2021, 12: 7198
- 59 Hu L, Liu S, Peng Y, et al. m^6A RNA modifications are measured at single-base resolution across the mammalian transcriptome. *Nat Biotechnol*, 2022, 40: 1210–1219
- 60 Liu C, Sun H, Yi Y, et al. Absolute quantification of single-base m^6A methylation in the mammalian transcriptome using GLORI. *Nat Biotechnol*, 2023, 41: 355–366
- 61 Xiao Y L, Liu S, Ge R, et al. Transcriptome-wide profiling and quantification of N^6 -methyladenosine by enzyme-assisted adenosine deamination. *Nat Biotechnol*, 2023, 41: 993–1003
- 62 Desrosiers R C, Friderici K H, Rottman F M. Characterization of Novikoff hepatoma mRNA methylation and heterogeneity in the methylated 5' terminus. *Biochemistry*, 1975, 14: 4367–4374
- 63 Lichinchi G, Zhao B S, Wu Y, et al. Dynamics of human and viral RNA methylation during Zika virus infection. *Cell Host Microbe*, 2016, 20: 666–673
- 64 Gokhale N S, McIntyre A B R, McFadden M J, et al. N^6 -methyladenosine in flaviviridae viral RNA genomes regulates infection. *Cell Host Microbe*, 2016, 20: 654–665
- 65 Gokhale N S, McIntyre A B R, Mattocks M D, et al. Altered m^6A modification of specific cellular transcripts affects flaviviridae infection. *Mol Cell*, 2020, 77: 542–555.e8
- 66 Ye F, Chen E R, Nilsen T W. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus utilizes and manipulates RNA N-adenosine methylation to promote lytic replication. *J Virol*, 2017, 91: e00466-17
- 67 Hesser C R, Karijolich J, Dominissini D, et al. N^6 -methyladenosine modification and the YTHDF2 reader protein play cell type specific roles in lytic viral gene expression during Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection. *PLoS Pathog*, 2018, 14: e1006995
- 68 Tsai K, Courtney D G, Cullen B R. Addition of m^6A to SV40 late mRNAs enhances viral structural gene expression and replication. *PLoS Pathog*, 2018, 14: e1006919
- 69 Xue M, Zhao B S, Zhang Z, et al. Viral N^6 -methyladenosine upregulates replication and pathogenesis of human respiratory syncytial virus. *Nat Commun*, 2019, 10: 4595
- 70 Lu M, Zhang Z, Xue M, et al. N^6 -methyladenosine modification enables viral RNA to escape recognition by RNA sensor RIG-I. *Nat Microbiol*, 2020, 5: 584–598
- 71 Lu M, Xue M, Wang H T, et al. Non-segmented negative-sense RNA viruses utilize m^6A as a common strategy to evade host innate immunity. *J Virol*, 2021, 95: e01939-20
- 72 Yue J, Wei Y, Sun Z, et al. AlkB RNA demethylase homologues and N^6 -methyladenosine are involved in *Potyvirus* infection. *Mol Plant Pathol*, 2022, 23: 1555–1564
- 73 Tian S, Wu N, Zhang L, et al. RNA N^6 -methyladenosine modification suppresses replication of rice black streaked dwarf virus and is associated with virus persistence in its insect vector. *Mol Plant Pathol*, 2021, 22: 1070–1081
- 74 Xia T L, Li X, Wang X, et al. $N(6)$ -methyladenosine-binding protein YTHDF1 suppresses EBV replication and promotes EBV RNA decay. *EMBO Rep*, 2021, 22: e50128
- 75 Li Z, Shi J, Yu L, et al. N^6 -methyl-adenosine level in *Nicotiana tabacum* is associated with tobacco mosaic virus. *Virol J*, 2018, 15: 87
- 76 He Y, Li L, Yao Y, et al. Transcriptome-wide N^6 -methyladenosine (m^6A) methylation in watermelon under CGMMV infection. *BMC Plant Biol*, 2021, 21: 516
- 77 Zhang K, Zhuang X, Dong Z, et al. The dynamics of N^6 -methyladenine RNA modification in interactions between rice and plant viruses. *Genome Biol*, 2021, 22: 189
- 78 Zhang T, Wang Z, Hu H, et al. Transcriptome-wide N^6 -methyladenosine (m^6A) profiling of susceptible and resistant wheat varieties reveals the involvement of variety-specific m^6A modification involved in virus-host interaction pathways. *Front Microbiol*, 2021, 12: 656302
- 79 He H, Ge L, Li Z, et al. Pepino mosaic virus antagonizes plant m^6A modification by promoting the autophagic degradation of the m^6A writer HAKAI. *ABIOTECH*, 2023, 4: 83–96

- 80 Zhang T, Shi C, Hu H, et al. N⁶-methyladenosine RNA modification promotes viral genomic RNA stability and infection. *Nat Commun*, 2022, 13: 6576
- 81 Zhou L, Tang R, Li X, et al. N⁶-methyladenosine RNA modification regulates strawberry fruit ripening in an ABA-dependent manner. *Genome Biol*, 2021, 22: 168
- 82 Yu Q, Liu S, Yu L, et al. RNA demethylation increases the yield and biomass of rice and potato plants in field trials. *Nat Biotechnol*, 2021, 39: 1581–1588
- 83 Li J, Chen Z, Chen F, et al. Targeted mRNA demethylation using an engineered dCas13b-ALKBH5 fusion protein. *Nucleic Acids Res*, 2020, 48: 5684–5694
- 84 Wilson C, Chen P J, Miao Z, et al. Programmable m⁶A modification of cellular RNAs with a Cas13-directed methyltransferase. *Nat Biotechnol*, 2020, 38: 1431–1440

m⁶A modification and plant RNA virus infection

GE LinHao¹, PAN FuAn¹, HE Hao¹, JIA MingXuan¹, LI FangFang¹ & ZHOU XuePing^{1,2}

1 State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China;

2 State Key Laboratory of Rice Biology, Institute of Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China

N⁶-methyladenosine (m⁶A) is the most abundant form of post-transcriptional chemical modification of RNA in eukaryotic mRNA. The m⁶A-modified RNAs are mainly regulated by the m⁶A methyltransferases (writers), demethyltransferases (erasers) and reader proteins (readers). In recent years, m⁶A methylation has been found to play diverse roles in plant virus infection, and the related regulatory mechanisms are being investigated. This review outlines the basic components of m⁶A modification-related proteins in plants, the development of m⁶A detection technology, and the current progress of m⁶A methylation in the interactions between plants and viruses. A new perspective of the m⁶A methylation-dependent research in plants and plant RNA viruses is also provided.

m⁶A modification, plants, plant RNA viruses

doi: [10.1360/SSV-2023-0213](https://doi.org/10.1360/SSV-2023-0213)