RNA化学修饰m⁶A在植物中的研究进展

刘华玥, 田丹阳, 宋璟, 王慧, 张蕴薇*

中国农业大学草业科学与技术学院, 北京 100193

* 联系人, E-mail: zywei@cau.edu.cn

2020-12-16 收稿, 2021-03-02 修回, 2021-03-08 接受, 2021-03-09 网络版发表

国家自然科学基金(31672478, 32071870)资助

摘要 N⁶-甲基腺嘌呤(N⁶-methyladenosine, m⁶A)是真核生物mRNA中丰度最高的甲基化修饰形式. m⁶A修饰是由m⁶A甲基转移酶复合物催化形成,并由去甲基化酶脱去甲基修饰,而m⁶A修饰的生物学功能则是由结合蛋白进行调控.随着m⁶A检测和测序技术的发展,多种m⁶A修饰相关蛋白在植物中鉴定出来,其调控的生物学功能越来越受到人们的关注.本文针对植物m⁶A修饰相关调控蛋白及其功能、m⁶A修饰位置分布及基序特征和m⁶A调控的分子机制综述研究进展,展望m⁶A在植物中的研究重点和方向.

关键词 N⁶-甲基腺嘌呤, RNA修饰, mRNA稳定性, 植物

中心法则指出遗传信息的表达通过DNA转录到RNA,再由RNA翻译传递到蛋白质实现.在这个过程中DNA会受到多种调控方式,其中DNA甲基化和组蛋白修饰是表观遗传学的重要研究内容,影响染色质结构、基因表达与沉默及转座子活性等.同样, RNA上也存在多种化学修饰,决定RNA命运,影响基因表达,丰富了RNA功能和遗传信息的多样性.目前在mRNA上发现的化学修饰包括6-甲基腺嘌呤(N⁶-methyladenosine, m⁶A)、5-甲基胞嘧啶(5-methylcytosine, m⁵C)、7-甲基鸟嘌呤(7-methylguanosine, m⁷G)、1-甲基腺嘌呤(1-methyladenosine, m¹A)、假尿苷(Ψ)、4-乙酰胞嘧啶(N⁴-Acetylcytidine, Ac4C)和2'-O-甲基化(Nm)等,其中m⁶A是真核生物mRNA中丰度最高的可逆甲基化修饰形式.

植物中m⁶A的研究始于1979年, Kennedy和Lane^[1]发现,小麦中存在m⁶A修饰.随后陆续发现燕麦^[2]和玉米^[3]中有m⁶A修饰,但是由于技术的限制, m⁶A的研究并未取得很大进展.2011年, FTO被鉴定为是m⁶A去甲基化酶^[4],证明m⁶A在动物体内为可逆化修饰,其存在

与DNA甲基化和组蛋白甲基化类似,可能存在重要的生物学功能,因此关于m⁶A的研究热门起来.2012年,有研究通过m⁶A抗体亲和富集结合高通量测序方法提出m⁶A-seq^[5,6],极大地加快了m⁶A在动物中功能和理论研究,随后对植物m⁶A的相关报道也逐渐增多.

m⁶A在植物中主要富集在mRNA的3'UTR区域内以及终止密码子和起始密码子附近^[7~11].其修饰位点序列主要分为两类:一类为RR[A]CH(R=G/A, H=A/C/U, [A]=m⁶A),与动物中已有研究一致^[12~14];另一类可能为植物特有的识别序列URU[A]Y(R=G/A, Y=C/U)及其相似序列^[11,15~17].以拟南芥为例, m⁶A修饰由包括MTA(methyltransferase A)、MTB(methyltransferase B)、FIP37(FKBP12 interacting protein)、VIR(virilizer)和HAKAI在内的甲基转移酶复合物将甲基添加到RNA上,由去甲基化酶ALKBH9B和ALKBH10B脱去甲基修饰. m⁶A的生物学功能主要是通过YTH结构域蛋白ECT2、ECT3、ECT4和CPSF30L结合有m⁶A修饰的mRNA,进而影响其3'UTR的加工、稳定性和翻译效率等(图1).

引用格式: 刘华玥, 田丹阳, 宋璟, 等. RNA化学修饰m⁶A在植物中的研究进展. 科学通报, 2021, 66: 2958–2970

Liu H Y, Tian D Y, Song J, et al. RNA chemical modification of m⁶A in plants (in Chinese). Chin Sci Bull, 2021, 66: 2958–2970, doi: 10.1360/TB-2020-1192

图1 (网络版彩色)m⁶A修饰的生物学过程

Figure 1 (Color online) The biological process of m⁶A modification

1 m⁶A修饰相关蛋白及其功能

1.1 m⁶A甲基转移酶复合物

植物中甲基转移酶复合物的核心元件是MTA，是动物METTL3的直系同源蛋白。其功能是结合甲基供体SAM(S-adenosyl methionine)，将甲基转移到要修饰的腺苷酸上。植物中m⁶A修饰相关蛋白的首项研究为鉴定获得拟南芥中甲基转移酶关键组分MTA。研究发现，*mta*纯合突变体导致胚胎致死现象，说明MTA对植物发育至关重要^[18]。后续研究通过在胚胎发育阶段特异性表达MTA或植物整个生命周期降低MTA表达，得到m⁶A修饰水平下降的拟南芥，发现其出现根系发育及向地性表现异常；茎尖分生组织过度增殖，莲座叶小而浓密；花序节间长度缩短，花器官大小、数量和形态改变等表型，进一步证明了MTA以及m⁶A对植物生长发育的重要性^[8,19,20]。*mta-ABI3:MTA*转录组分析表明，大量下调的基因参与转运或靶向转运，而大多数上调的基因参与胁迫和刺激的响应过程。在水稻中，OsMTA2属于水稻甲基转移酶的一部分，会通过影响m⁶A甲基化，进而影响水稻穗长、授粉率和有效种子数^[21]。Lu等人^[22]鉴定获得杨树PtrMTA并将其过表达，发现植物表皮毛密度和根系发达程度增加，同时表现出更强的干旱胁迫耐受性。

在动物中，METTL3与METTL14以1:1比例通过甲基转移结构域MTD形成异源二聚体^[23]，从而增强METTL3的催化活性。METTL3中残基D377、D395、N539和E532对其催化m⁶A产生至关重要。在METTL14

中仅残基D377是保守的，因此单独的METTL14不具有催化活性^[24]。而在植物中，MTB(METTL14同系物)的4个残基均是保守的，可能具有单独催化m⁶A的活性^[25]。研究发现，拟南芥*mtb*纯合突变体表现出胚胎致死的表型，而干扰MTB会导致拟南芥m⁶A修饰水平下降，表现出根系生长、向地性和维管组织发育异常，以及生长延迟和顶端优势下降的表型，说明MTB对拟南芥生长发育同样至关重要^[20]，但其是否单独具有甲基转移酶活性及具体的分子机制还需进一步研究。

动物中第3个m⁶A甲基转移酶复合物组分是WTAP，其功能是与METTL3-METTL14相互作用将异源二聚体定位到核斑点。WTAP在拟南芥中的同源蛋白为FIP37，是最早发现与甲基转移酶复合物组分MTA存在相互作用的蛋白^[18]。植物中，Vespa等人^[26]鉴定并研究了FIP37基因的功能，发现FIP37定位于细胞核中，呈斑点状分布；FIP37在不同分化程度的细胞以及整个植物生长发育过程中均有表达，而FIP37基因缺失突变体显示出胚胎致死表型。FIP37过表达株系会产生最多6个分支的大型表皮毛，而表皮毛分支是植物核内复制的指示性状，说明FIP37可能参与调控DNA的复制。Zhong等人^[18]的研究表明FIP37直接与MTA互作。Růžicka等人^[20]研究发现，*fip37-4*同样表现出根系生长、根的向地性和维管组织发育的异常及延迟生长和顶端优势下降的表型。Shen等人^[8]的研究证明，FIP37是拟南芥m⁶A甲基转移酶的核心成分，调控其茎尖干细胞的分化，FIP37突变体表现出m⁶A修饰水平降低和茎尖分生组织的大规模过度增殖。Pontier等人^[27]研究发现，

*fip37-L*出现了转录通读和形成嵌合体mRNA的现象,说明FIP37对mRNA转录和加工过程至关重要.在禾本科植物中,OsFIP是水稻甲基转移酶复合物的关键组分,将其敲除会导致小孢子退化和细胞减数分裂前期I的异常^[21].以上结果说明,FIP37对植物的正常生长发育过程至关重要,其调控机理是通过影响m⁶A修饰水平实现的.

植物中已鉴定的m⁶A甲基转移酶复合物的其他组分还有VIR和HAKAI,它们都直接与FIP37互做.VIR的功能缺失突变体表现出胚胎致死的表型,而下调VIR会产生与*mtb*和*fip37-4*一样的表型.HAKAI功能缺失突变体可以存活,并且表型与野生型相似^[20].Parker等人^[13]对拟南芥突变体*vir-1*进行测序研究发现,VIR影响植物的昼夜节律、开花时间和多聚腺苷酸化位点的选择.

MTA、MTB、FIP37和VIR的纯合突变体都表现为胚胎致死的表型,下调或者胚胎发育阶段特异表达这些基因的植株表现生长延迟、花器官异常、茎尖分生组织过度增殖、根系发育和向地性异常等表型.虽然MTA、FIP37和VIR都有相当的研究,但是还不足以充分地解释m⁶A的作用机理和功能.同时,HAKAI突变体虽能影响m⁶A的修饰水平,但其表型与野生型相近,故仍需进一步的研究.此外,在动物甲基转移酶的相关研究中,RBM15、ZC3H13和METTL16等也会参与m⁶A修饰的形成过程,但是在植物中对相关组分还没有研究.对植物中相应甲基转移酶组分和蛋白进行鉴定及功能分析,有助于进一步了解m⁶A在植物中的功能和作用.

1.2 m⁶A去甲基化酶研究进展

m⁶A修饰具有动态性和可逆性.人和动物细胞的去甲基化过程是通过去甲基化酶FTO或ALKBH5催化实现的.FTO和ALKBH5同属依赖Fe²⁺和 α -酮戊二酸的AlkB双加氧酶家族.FTO是动物中最早发现的m⁶A去甲基化酶,其催化m⁶A的去甲基化过程经历两步反应,产生hm⁶A和f⁶A两种中间产物^[28].而ALKBH5与FTO不同,直接催化m⁶A去甲基化,不产生中间产物^[29].目前,植物中尚未找到FTO的同源蛋白,已鉴定出的植物去甲基化酶仅有拟南芥中的ALKBH9B、ALKBH10B和番茄中的ALKBH2,它们均为ALKBH5的同源蛋白.

ALKBH9B是定位在细胞质的ALKBH5同源蛋白,可在体外去除单链RNA上的m⁶A修饰.研究发现,苜蓿花叶病毒(alfalfa mosaic virus, AMV)基因组中也存在

m⁶A,且ALKBH9B的活性影响AMV的侵染能力.抑制ALKBH9B的表达后AMV基因组中m⁶A的相对丰度增加,进而减弱了病毒对植物的侵染能力^[30].Li等人^[31]的研究发现,烟草花叶病毒(tobacco mosaic virus, TMV)侵染过程中烟草的m⁶A水平下降,尤其是第21天m⁶A水平下降了40%.该研究还同时发现,潜在脱甲基酶基因的表达水平提高,而所有潜在甲基化酶基因表达水平均降低.m⁶A已经在多个哺乳动物的病毒RNA中被鉴定出来,并且发现病毒RNA中m⁶A的修饰程度高低与病毒的侵染能力直接相关^[32,33].现有植物中的研究同样揭示了m⁶A与植物病毒的侵染过程密切相关.

ALKBH10B是定位于拟南芥细胞核的去甲基化酶,具有去除转录组范围内m⁶A修饰的功能.*alkbh10b*功能缺失突变体营养生长受到抑制、开花出现延迟.进一步研究发现,ALKBH10B是通过去除FT、SPL3和SPL9的m⁶A修饰来增强这些转录本的稳定性^[10].Zhou等人^[16]发现,SIALKBH2是番茄中定位于内质网的m⁶A去甲基化酶,SIALKBH2能够结合DNA去甲基化酶基因*SIDML2*的mRNA,调节其m⁶A修饰及稳定性.*SIALKBH2*基因突变后*SIDML2*的转录本m⁶A水平升高,mRNA含量降低,表现出番茄果实成熟延迟的表型.

植物中有关m⁶A去甲基化酶的功能及机理的研究还处于起步阶段.植物发生去m⁶A甲基化是否出现在特定生长发育阶段、特定胁迫类型及特定位置;现有的去甲基化酶分别存在于细胞核、细胞质和内质网三处,其定位差异是否会对m⁶A的功能产生影响;去m⁶A甲基化后,植物生理生化途径发生何种改变等关键性问题仍需进一步研究.

1.3 m⁶A结合蛋白研究进展

m⁶A广泛存在于生物体内,其修饰水平受甲基转移酶和去甲基化酶的动态调控.植物缺乏m⁶A会表现出严重的生长发育缺陷,表明其对植物具有重要作用,但其作用机理仍不清楚.现有研究表明m⁶A至少存在两个发挥生物学功能的途径.第一,m⁶A修饰通过与特异性结合蛋白相结合发挥功能;第二,m⁶A修饰的存在会改变mRNA的空间结构,使m⁶A附近的序列更易被RNA结合蛋白(RNA bind protein, RBP)识别,进而发挥m⁶A的生物学功能.

目前已知的动物m⁶A结合蛋白中,有关YTH基因家族的研究成果最多.其中,YTHDF1、YTHDF2、YTHDF3和YTHDC2主要定位于细胞质中,而YTHDC1

定位在细胞核中. YTHDF1通过与翻译起始因子互作提高有 m^6A 修饰mRNA的翻译效率^[34]. YTHDF2通过将有 m^6A 修饰的转录本转运至p-bodies促进mRNA的降解^[35]. YTHDF3可以与YTHDF1相结合促进mRNA的翻译, 并且与YTHDF2互作影响mRNA的降解, 具有双向功能^[36]. YTHDC2同样具有促进mRNA翻译和降解的双重效应, 即促进有 m^6A 修饰的mRNA翻译和招募核酸外切酶影响mRNA的降解^[37,38]. 而主要定位在细胞核中的YTHDC1则通过与剪切因子互作影响mRNA的可变剪切促进XIST介导的染色体沉默、与RNA出核因子互作促进mRNA的出核发挥作用. 最新研究表明,

YTHDC1可以促进组蛋白甲基化进而调控转录过程^[39-42].

植物中结合蛋白的研究主要集中于YTH结构域蛋白(表1). 该蛋白在拟南芥中有13个成员, 分别为ECT1~ECT12和CPSF30^[46]. Arribas-Hernández等人^[43,44]研究表明, 拟南芥YTH结构域蛋白ECT2、ECT3和ECT4是保证叶片正确形成时间和形态所必需的, 且这些功能依赖于完整的 m^6A 结合位点. 在后续的研究中发现, *ect2/ect3*和*ect2/ect3/ect4*根和茎生长缓慢及根生长方向性缺陷、花形成延缓、花朵和果实形态异常. Scutenaire等人^[45]的研究表明, ECT2弥散分布在细胞质中, 受热后会聚集于应激颗粒(stress granules, SG), 表明其

表1 m^6A 修饰相关蛋白及其功能^{a)}

Table 1 m^6A modification related proteins and their functions

物种信息	植物基因	动物中同源基因	实验材料	m ⁶ A变化情况	表型	文献	
甲基转移酶复合物	拟南芥	<i>AtMTA</i> (纯合突变致死)	<i>mta-ABI3:MTA</i>	下降90%	花序节间长度缩短, 莲座叶小而浓密的, 顶端优势下降根系发育以及向地性的异常, 生长延迟	[19, 20]	
			AmiR-MTA	下降	茎尖分生组织过度增殖	[8]	
	水稻	OsMTA2	<i>mta2</i>	下降	影响水稻的穗长、授粉率和有效种子数	[21]	
	杨树	PtrMTA	OE-PtrMTA	上升	杨树表皮毛密度增加, 根系发达, 抗旱性提高	[22]	
	拟南芥	<i>AtMTB</i> (纯合突变致死)	METTL14	RNAi-MTB	下降50%	根系生长、根的向地性和维管组织发育异常; 生长延迟和顶端优势下降	[20]
			OE-FIP37	上升	表皮毛分支增多, 核内DNA经历额外复制过程	[26]	
	拟南芥	<i>AtFIP37</i> (纯合突变致死)	WTAP	<i>fip37-LEC1:FIP37</i>	下降80%	茎尖分生组织大规模过度增殖	[8]
			<i>fip37-4</i>	下降85%~95%	根系生长、根的向地性和维管组织发育异常; 生长延迟和顶端优势下降	[20]	
			<i>fip37L</i>	下降	发生转录通读, 形成嵌合体mRNA	[27]	
	水稻	OsFIP	<i>fip</i>	下降	导致水稻小孢子退化, 以及减数分裂前期I的异常	[21]	
去甲基化酶	拟南芥	<i>AtVIR</i> (纯合突变致死)	VIRMA/KIAA1429	<i>vir-1</i>	下降85%~95%	根系生长、根的向地性和维管组织发育异常; 生长延迟和顶端优势下降	[20]
					影响昼夜节律、开花时间和多聚腺苷酸化位点的选择	[13]	
		AtHAKAI	HAKAI/CBLL1	<i>hakai</i>	下降35%	与野生型相似	[20]
	拟南芥	AtALKBH9B	ALKBH5	<i>alkbh9b</i>	不影响基因组m ⁶ A, 影响外源病毒RNA修饰	增强拟南芥对苜蓿花叶病毒的抗性	[30]
		AtALKBH10-B		<i>alkbh10b</i>	上升	开花延迟且营养生长受到抑制	[10]
	番茄	SlALKBH2	<i>alkbh2</i>	上升	番茄果实成熟延迟	[16]	
结合蛋白	拟南芥	AtECT2/ECT3/ECT4	YTHDF1-3	<i>ect2/ect3/ect4</i>	—	延迟叶片形成的时间以及异常的叶片形态; 影响表皮毛分枝和倍性; 植物生长缓慢, 花朵和果实异常	[15,43~45]

可能决定胁迫条件下细胞质中mRNA的命运。ECT2能识别表皮毛中的m⁶A, 维持表皮毛的正常分支。Wei等人^[15]的研究表明, ECT2在细胞核中调节3'UTR加工, 在细胞质中促进mRNA稳定。ECT2功能缺失加速了与表皮毛形态发生相关的3个ECT2结合转录本的降解, 从而影响毛状体分支。Wu等人^[47]研究发现, 拟南芥ECT2蛋白调节PTRE1和20S蛋白酶体亚基的mRNA水平, 从而增强26S蛋白酶体活性。过表达ECT2的拟南芥植株矮小、叶片变小且角果变短。另一个与YTH结构域相关的研究是拟南芥中的CPSF30, 包括CPSF30S和CPSF30L两个亚型, 其中CPSF30L含有YTH结构域。CPSF30L功能缺陷植株表现出转录通读和mRNA嵌合体的形成, 表明选择性识别3'UTR的m⁶A是一种保护机制, 可确保植物基因组重排后转录组的完整性^[27]。

动物中除YTH基因家族作为结合蛋白识别m⁶A外, 还有其他的结合蛋白参与m⁶A生物学功能的实现过程。如HNRNP家族成员HNRNPA2B1、HNRNPC和HNRNPG蛋白依赖于m⁶A改变mRNA的结构, 使m⁶A甲基化附近位点区域更易被HNRNP蛋白结合, 进而调控pri-miRNA的加工以及mRNA的可变剪切^[48-51]。脆性X智力低下蛋白(fragile X mental retardation 1, FMR1)更偏向于识别有m⁶A修饰的mRNA, 进而通过与YTHDF2的互作影响mRNA的稳定性^[52]。人胰岛素样生长因子2 mRNA结合蛋白(IGF2 mRNA-binding protein, IGF2BP1/2/3)可以识别m⁶A并提高相应转录本的稳定性^[53]。METTL3与3'UTR区域的m⁶A结合后通过与转录起始因子亚基eIF3h互作, 环化mRNA促进翻译^[54]。最新研究表明, Prrc2a也可以识别m⁶A序列, 提高mRNA的稳定性^[55]。

植物中YTH结构域蛋白数量较动物丰富, 反映了植物相较于动物因不能自由移动而体现出更加复杂多变的功能需求。其他m⁶A结合蛋白在植物中的研究还未见报道, 故仍需进一步加强植物中m⁶A相关结合蛋白的鉴定与功能研究, 推动m⁶A在植物生长发育和逆境胁迫响应中的作用机理研究。

2 m⁶A检测技术的发展

在RNA甲基化早期的研究中, 主要采用同位素标记结合不同色谱方法如: 纤维素色谱、纸色谱和薄层色谱等进行甲基化修饰研究, 发现在人^[56]、小鼠^[57]和小麦^[1]的mRNA中存在m⁶A甲基化修饰。随后对m⁶A甲基化修饰进行了专项研究发现, m⁶A存在的序列从[A]

C、G[A]C^[58]和A[A]C^[59]发展为G[A]CU^[60]、RR[A]CH^[61]。

有关m⁶A功能的研究受于技术限制少有报道。m⁶A的研究也因此沉寂了一段时间, 直到2011年FTO被鉴定为是m⁶A去甲基化酶^[4], 证明m⁶A在动物体内为可逆化修饰, 其存在与DNA甲基化和组蛋白甲基化类似, 可能存在重要的生物学功能, 因此关于m⁶A的研究重新开始热门起来, 检测技术也有了迅猛的发展。根据检测原理不同, m⁶A的检测技术主要分为基于核酸酶检测技术、抗体亲和富集沉淀技术以及其他检测技术。

基于核酸酶检测技术, 主要包括2D-TLC、LC-MS/MS和m⁶A-REF-seq三种方法。2D-TLC^[62]的基本原理是先用核酸酶T1(RNase T1)对mRNA进行处理, 会导致其在GAC序列G后面磷酸二酯键发生断裂, 随后用³²P对G后面的多聚核苷酸进行标记, 将多聚核苷酸降解为单磷酸核苷酸后进行二维色谱分析。核酸酶T1有碱基偏好性, 并且³²P对不同修饰标记效率也有所差异, 而LC-MS/MS则是在提取RNA后使用核酸酶P1(nuclease P1)将RNA消化成单个碱基, 随后使用串联质谱来检测m⁶A, 可以更加精确地定量m⁶A修饰水平^[4]。2017年, Imanishi等人^[63]发现, MazF是一种特异性切割RNA上ACA序列的5'端, 不能够酶切带有m⁶A修饰[A]CA序列的RNA内切核酸酶。在此基础上, Zhang等人^[64]开发了m⁶A-REF-seq检测技术, 在MazF处理后, 对酶切的mRNA片段进行处理后测序, 以m⁶A去甲基化酶FTO处理的mRNA作为负对照, 精确检测m⁶A修饰发生的位点。但MazF酶只能识别ACA基序, 而该基序只占m⁶A经典RR[A]CH基序的16%左右。

抗体亲和富集沉淀技术主要包括m⁶A-seq、PA-m⁶A-seq和miCLIP等, 其中m⁶A-seq^[5]首先出现并极大推动了m⁶A的研究。其基本原理是将mRNA片段化为100 nt左右, 使用m⁶A抗体对RNA进行免疫共沉淀, 洗脱后构建cDNA文库进行高通量测序。由于对m⁶A高精度定位的研究需要, 随后Chen等人^[65]受到PAR-CLIP的启发开发了PA-m⁶A-seq技术, 先用具有光活性的核苷酸类似物4-硫尿苷(4-thiouridine, 4sU)对细胞进行处理使得新生的mRNA掺入4sU, 进行免疫沉淀后经过紫外光照射发生交联, 使得抗体结合位置(RR[A]C4sU)附近的4sU突变为C, 然后用核酸酶T1(RNase T1)消化为30 nt左右的片段, 最后进行测序检测T→C突变的位点, 将m⁶A测序的精度提升到了23 nt左右的碱基范围。同年, Linder等人^[66]开发的miCLIP技术, 并未使用具有光

活性的核苷酸类似物,而是在紫外交联后回收抗体-RNA复合物,随后连接接头用蛋白酶K(proteinase k)释放RNA, RNA在反转录过程中由于氨基酸残基的存在会使得RR[A]CH发生C→T的突变或截断来达到精确定位m⁶A修饰位点,将m⁶A测序的精度提升到了单碱基范围。

除了上述两大类外, Meyer^[67]开发了DART-seq (deamination adjacent to RNA modification targets)检测技术。主要原理是将识别m⁶A的YTH结构与胞嘧啶脱氨酶(APOBEC1)组成APOBEC1-YTH融合蛋白,将APOBEC1招募到m⁶A位点,使胞嘧啶脱去氨基变成尿嘧啶后提取RNA并进行测序,通过比对基因组信息,当A碱基后发生C→U的编辑,从而定位m⁶A修饰。Wang等人^[68]开发了m⁶A-SEAL(FTO-assisted m⁶A selective chemical labeling method)检测技术,利用去m⁶A去甲基化酶FTO将m⁶A催化为hm⁶A,再利用二巯苏糖醇(DTT)将hm⁶A转化为更稳定的dm⁶A。而dm⁶A可以加上生物素标记,最终被链霉亲和素珠捕获,对RNA片段进行高通量测序定位m⁶A修饰。以及基于三代测序的方式通过纳米孔测序技术直接检测m⁶A修饰^[13,69]。

m⁶A高通量测序技术和m⁶A高精度检测技术极大推动了m⁶A的功能研究。而发展更加快捷方便且高精度的m⁶A检测技术仍是一个挑战。

3 m⁶A在植物中的位置分布和基序特征

2014年, Luo等人^[7]率先完成了拟南芥全转录组m⁶A修饰位点的检测。研究发现, m⁶A在不同生态型拟南芥中的分布十分保守,除在终止密码子和3'UTR附近富集,还富集在起始密码子附近。这些在起始密码子附近富集m⁶A的基因多为一些叶绿体相关蛋白基因。并且基序为RR[A]CH与哺乳动物中一致。Wan等人^[14]对拟南芥根、叶和花不同器官进行了m⁶A分布研究,发现m⁶A主要分布在终止密码子和3'UTR处,基序为RR[A]CH。且高度甲基化的转录本主要与转运蛋白、应激反应、氧化还原反应、调节因子和一些非编码RNA相关。差异m⁶A修饰甲基化转录本与相应器官的独特生物学过程相关,表明m⁶A在拟南芥的器官分化中具有重要作用。Parker等人^[13]则首次使用纳米孔测序技术对拟南芥基因组m⁶A分布进行了研究,发现m⁶A在拟南芥中的基序为DR[A]YH(D=G/U/A, R=G/A, Y=C/U, H=A/C/U),与RR[A]CH很相似,且分布位置集中在3'UTR处。

Wang等人^[70]对拟南芥的线粒体和叶绿体基因组

进行了m⁶A分布研究,发现在叶绿体和线粒体基因组中,超过86%的转录本发生m⁶A甲基化,平均每个转录本分别约有6个和5个m⁶A修饰位点。在叶绿体和线粒体中广泛甲基化的转录本主要与核糖体RNA、核糖体蛋白、光系统反应蛋白和NADH脱氢酶与氧化还原酶相关,且叶绿体和线粒体分别有64%和79%的转录本在叶、花和根3种器官中表现出差异m⁶A甲基化,其中m⁶A基序也为RR[A]CH。Murik等人^[9]进一步研究了植物线粒体基因组中的m⁶A修饰,发现m⁶A修饰位点主要在起始密码子附近,且转录本中平均每1000个核苷酸就存在4~5个m⁶A修饰位点。m⁶A的motif有4种,其核心序列都是R[A]Y(Y=C/U),这与RR[A]CH中的R[A]C相似。

在其他植物中也进行了相应研究。Li等人^[11]通过对水稻愈伤组织和叶片进行全转录组m⁶A修饰检测的研究发现, m⁶A偏向分布在起始密码子和终止密码子附近。不同水稻组织中差异m⁶A修饰的基因表达量也存在差异,且表现出组织特异性:在愈伤组织中这些基因主要涉及转录因子,在叶片中主要涉及质体和类囊体。m⁶A在愈伤组织的基序为RAGRAG(R=G/A),在叶片中的基序为UGU[A]MM(M=A/C)。Luo等人^[17]研究两种自交系玉米中m⁶A的分布状况,发现m⁶A主要富集在3'UTR,其次是终止密码子。m⁶A在玉米中的基序为UGUAMM(M=A/C),与水稻叶片中相同,与URU[A]Y(R=G/A; Y=C/U)ECT2蛋白识别的基序相似。Miao等人^[71]研究玉米在基因组加倍过程中m⁶A的分布状况,发现m⁶A主要富集在3'UTR,其次是终止密码子, m⁶A基序为RR[A]CH,玉米两项研究中基序出现差异可能与其取样部位和时间有关。

将现有的m⁶A测序相关结果(表2)进行汇总分析后发现, m⁶A在植物中的分布与动物中一致,即主要富集在终止密码子和3'UTR处。而m⁶A在植物起始密码子附近的富集,可能与植物中叶绿体和线粒体相关的蛋白基因的丰富度高有关,因为这些基因都具有较高的m⁶A修饰水平。m⁶A在植物中的基序一般为RR[A]CH,是普遍存在于不同组织中的共有基序,而在番茄果皮、水稻叶片、花序中及拟南芥ECT2识别的m⁶A序列均为U-rich的基序URU[A]Y或其相似序列,这可能是由于这些组织具有高度分化的特异性, m⁶A使得相同基因发挥差异功能并且主要由结合蛋白来调控。

目前植物中使用的m⁶A测序方法普遍为m⁶A-seq,但这种方法存在一定的局限性,如样本需求量大,对抗

表 2 m⁶A 测序结果^{a)}Table 2 m⁶A sequencing results

实验材料	m ⁶ A 富集位置	m ⁶ A 与转录本的关系		基序	材料类型	文献
		总趋势	特定基因			
拟南芥两个生态型 (Can-0 和 Hen-16)	终止密码子附近、起始密码子附近和 3'UTR	m ⁶ A 修饰与 mRNA 丰度之间呈正相关	—	RR[A]CH	21 d 拟南芥的地上部分	[7]
拟南芥 <i>fip37-LEC1:FIP37</i>	终止密码子附近、3'UTR 和起始密码子附近	m ⁶ A 修饰与 mRNA 丰度之间呈正相关	<i>WUS</i> 和 <i>STM</i> 基因 mRNA 增加 (重新提取茎尖 RNA)	RR[A]CH	5 d 拟南芥全株	[8]
拟南芥 <i>mta-ABI3:MTA</i>	3'UTR 和终止密码子附近	m ⁶ A 修饰与 mRNA 丰度之间呈正相关	—	RR[A]CH	28 d 拟南芥莲座叶	[12]
拟南芥野生型和 <i>vir-1</i>	3'UTR	m ⁶ A 修饰与 mRNA 丰度之间呈正相关	—	DR[A]YH	14 d 拟南芥全株	[13]
拟南芥 <i>ect2</i>	3'UTR	m ⁶ A 修饰与 mRNA 丰度之间呈正相关	<i>TTG1</i> 、 <i>ITB1</i> 和 <i>DIS2</i> 基因 mRNA 减少	URU[A]Y	14 d 拟南芥全株	[15]
拟南芥根、叶和花	终止密码子附近和 3'UTR	m ⁶ A 修饰与 mRNA 的丰度呈负相关	—	RR[A]CH	35 d 拟南芥的根、莲座叶和花	[14]
拟南芥线粒体和叶绿体	—	m ⁶ A 修饰与 mRNA 的丰度呈负相关	—	RR[A]CH	35 d 拟南芥的根、莲座叶和花	[70]
拟南芥和花椰菜的线粒体	起始密码子附近	m ⁶ A 修饰与 mRNA 的丰度呈负相关 起始密码的 m ⁶ A 修饰促进翻译 其他位置的 m ⁶ A 修饰与翻译效率呈负相关	<i>ATP1</i> 、 <i>MATR</i> 和 <i>NAD4</i> 基因 mRNA 减少	VDHR[A]YDBY(CDS) BVWR[A]YDWS(mtORFs) NRDR[A]YBHB (group II intron) NNHR[A]YSNN (non-coding transcripts)	21 天拟南芥全株	[9]
拟南芥 <i>alkbh10b</i>	起始密码子和终止密码子附近	m ⁶ A 修饰与 mRNA 的丰度呈负相关	<i>FT</i> 、 <i>SPL3</i> 和 <i>SPL9</i> 基因 mRNA 减少	RR[A]CH	14 d 拟南芥全株	[10]
水稻叶片组织	终止密码子和起始密码子附近	m ⁶ A 修饰与 mRNA 的丰度呈负相关	—	UGU[A]MM	6 叶期水稻叶片	[11]
水稻 <i>fip</i>	3'UTR	m ⁶ A 修饰与 mRNA 的丰度呈负相关	苏氨酸蛋白酶和核苷水解酶 mRNA 增加	UGW[A]MH	水稻圆锥花序	[21]
玉米两个自交系 (B73 和 Mo17)	3'UTR 和终止密码子附近	起始密码的 m ⁶ A 修饰促进翻译 3'UTR 的 m ⁶ A 修饰与翻译效率呈负相关	—	UGU[A]MM	14 d 玉米地上部分	[17]
玉米基因加倍株系	3'UTR 和终止密码子附近	m ⁶ A 影响复制后基因的保留与表达	—	RR[A]CH	玉米三叶期叶片	[71]
番茄 <i>alkbh2</i>	终止密码子附近和 3'UTR	m ⁶ A 修饰与 mRNA 的丰度呈负相关	<i>DML2</i> 基因 mRNA 减少	UGU[A]YY	番茄果皮	[16]

a) “—”表示文献中没有提到相关研究

体质量要求高和 m⁶A 不能精确定位等缺点。且现有研究大多采用的是整株植物或者分化程度较高的组织器官，这些材料均为多种细胞的混合物，如叶片就包含表皮、叶肉和叶脉 3 种结构，每种结构中又包含多种细胞，因此会造成研究和测序结果与动物存在差异。此外，实验材料的生理特征对研究结果也有较大的影响。

m⁶A 发生剧烈改变的植株一般都表现出严重的发育异常表型，会对后面的研究产生影响。因此，在植物中进行 m⁶A 测序时应更加注意材料的选择。

4 m⁶A 修饰对植物 RNA 的影响

在动物中，m⁶A 主要通过影响 mRNA 的命运来实现

调控作用, 其在RNA可变剪切^[39,72,73]、3'UTR加工^[74,75]、出核^[41,76]、稳定性^[35,77]、翻译^[34,78,79]及miRNA加工^[80,81]等过程均发挥重要作用。然而植物中m⁶A对RNA作用的研究报道较少。现有研究主要集中在3'UTR加工、稳定性以及翻译效率中, 在其他方面如miRNA的加工中也有涉及, 但关于RNA的出核和可变剪切目前还未见报道。此外, m⁶A在植物中的报道多为基因修饰和表达模式的相关性研究, 如几个基因m⁶A修饰的变化引起表达模式的改变。而全转录组范围m⁶A对RNA的精确调控作用还少有报道。

4.1 m⁶A对mRNA丰富度的影响

已有关于m⁶A与转录本丰度关系的结论并不一致(表2), 部分研究结果显示m⁶A与mRNA的丰度呈正相关, 如表中前5项研究中甲基转移酶复合物突变体的测序结果表现出m⁶A的减少导致mRNA丰度降低, 可能是因为在这些植物生长发育相关的关键基因中, m⁶A的有无起关键性作用。即缺乏m⁶A后, 生长发育关键基因无法发生正确的时空表达, 故突变体植物表现出严重的生长发育缺陷, 亦或是由于生长发育的严重缺陷导致的某些基因的异常表达。因此得出m⁶A与转录本稳定性正相关的结论。Anderson等人^[12]通过研究野生型和MTA突变体转录本的降解组测序发现, 有m⁶A修饰的mRNA在缺少m⁶A修饰后m⁶A位点上游4或5 nt处会发生裂解造成mRNA丰富度下降, 由此推断m⁶A通常作为植物转录体中特定部位的稳定标记。ECT2作为m⁶A的结合蛋白在细胞核中也可以稳定mRNA^[15]。以上结果均说明了m⁶A的有无对mRNA的稳定性至关重要。

而表2中后7项研究结果的总趋势是m⁶A与mRNA的丰富度呈负相关。产生该相关性的原因可能是在这些植物基因中m⁶A修饰水平的高低是关键, 即低修饰水平的m⁶A促进mRNA的稳定性, 而随着m⁶A修饰水平的升高, mRNA的稳定性下降、丰富度降低。在6项对特定基因m⁶A与其稳定性的研究中, 也发现m⁶A与mRNA丰度呈负相关关系, 说明在正常生长发育条件下, m⁶A修饰水平的高低对植物发挥调控作用至关重要。在对动物YTH结构域蛋白DF1/DF2/DF3的研究中发现三者都存在低复杂结构域(low-complexity domain), mRNA上m⁶A存在越多, 结合的YTH结构域蛋白就越多, 相分离(phase separation)就越容易发生。随后mRNA-YTHDF复合物会分配到不同的相分离区室中, 例如P-小体(P-bodies)、应激颗粒或神经元RNA颗粒

等, 进而影响mRNA的稳定和翻译^[82], 说明m⁶A修饰水平的高低对于mRNA的调控作用至关重要。

因此, m⁶A在植物中对mRNA的影响应与动物中相一致, 即在低修饰水平下促进mRNA的稳定, 高修饰水平下促进mRNA的降解。

4.2 m⁶A对mRNA加工的影响

Wei等人^[15]的研究表明, ECT2在细胞核中可能参与3'UTR的加工过程。Pontier等人^[27]的研究表明在基因复制过程中, m⁶A会辅助多聚腺苷酸化途径确保拟南芥转录组的完整性, m⁶A下调的植物中表现出转录通读和嵌合体mRNA的形成。Parker等人^[13]研究发现, 依赖VIR的m⁶A影响poly(A)位点的选择和poly(A)长度组合的多样性, 且3'UTR处m⁶A的缺失会导致mRNA 3'末端缺陷的形成。Luo等人^[17]研究玉米m⁶A分布状况时发现, m⁶A修饰调节可变多聚腺苷酸化位点的选择。因此, 选择性识别3'UTR位置的m⁶A可能是一种保护机制, 用以确保植物中基因组重排的正确性、转录组的完整性和mRNA的完整性。

4.3 m⁶A对mRNA翻译效率的影响

Murik等人^[9]在研究植物线粒体基因组m⁶A修饰时发现, 线粒体RNA中存在多位点的m⁶A修饰对翻译是不利的, 而AUG起始密码子位点的甲基化可能会促进转录本的翻译。同样, Luo等人^[17]在研究玉米m⁶A分布状况时发现, m⁶A含量和位置的不同影响翻译水平, 过度的m⁶A修饰使mRNA的翻译水平下降, 而在起始密码子附近的m⁶A会促进翻译。

4.4 m⁶A对miRNA加工的影响

Bhat等人^[83]的研究表明, 植物中m⁶A水平的显著降低导致miRNA的积累减少, 而pri-miRNA的水平在拟南芥突变体中往往更高。进而通过m⁶A-IP-Seq和MTA-GFP-RIP发现, 许多pri-miRNA被m⁶A甲基化并被MTA结合, 进一步证明pri-miRNA也是MTA进行m⁶A甲基化的底物, 说明m⁶A在拟南芥miRNA生物发生过程中起作用。

5 结论与展望

目前对植物中m⁶A研究多集中于相关蛋白的功能鉴定及不同材料的测序研究, 较在动物中的研究相对滞后, 在以下几个方面有待深入研究。

5.1 m⁶A相关调控蛋白在植物中的鉴定以及功能研究

在植物中已鉴定的m⁶A相关蛋白数量相对较少且与动物中已有研究结论存在一定差异,如FIP37与WTAP的细胞定位不一样,MTB和METTL14氨基酸保守区域残基存在差异,FTO在植物中未找到同源蛋白等.鉴定和研究m⁶A相关蛋白的功能对理解m⁶A的生物学功能至关重要.对甲基转移酶复合物各组分功能的研究有利于揭示转录过程中m⁶A修饰对转录本及修饰位点的选择;对去甲基化酶的研究有利于揭示植物在何种条件下、何处发生去甲基化及去甲基化发生的意义;而对m⁶A结合蛋白的鉴定与研究,有利于揭示m⁶A如何影响mRNA的可变剪切、3'UTR加工和稳定性等功能.

5.2 胁迫条件下m⁶A的动态变化研究

目前,m⁶A研究多是揭示m⁶A对植物生长发育的影响,而胁迫条件下m⁶A的动态变化却少有研究.相较于

动物而言植物不能自由移动,面临着更多的胁迫,这就要求植物用更加灵敏、快捷的调控机制,来帮助其应对逆境.因此植物中有更多的YTH结构域蛋白,以及更多待鉴定的m⁶A结合蛋白进行关键调节作用.而在应对生物胁迫中,现有研究表明,m⁶A涉及植物对病毒侵染的调控能力,但是否同样可以调控其他的病虫害响应,还需进一步研究.

5.3 m⁶A功能研究新方法

甲基转移酶的缺失会造成全转录组m⁶A的剧烈变化,植物生理状态会发生较大改变,对后续研究会造成严重影响.Liu等人^[84]将m⁶A甲基转移酶核心原件METTL3-METTL14或去甲基化酶FTO/ALKBH5与Cas9蛋白融合,并在sgRNA的指导下编辑细胞中特定mRNA上的m⁶A修饰,实现了精确调节单一转录本上的m⁶A修饰,这一技术也为今后研究m⁶A的功能提供了便利.因此m⁶A功能研究的新方法需要更多的开发与利用,以进一步探明m⁶A的生理功能与作用机理.

参考文献

- Kennedy T D, Lane B G. Wheat embryo ribonucleates. XIII. Methyl-substituted nucleoside constituents and 5'-terminal dinucleotide sequences in bulk poly(A)-rich RNA from imbibing wheat embryos. *Can J Biochem*, 1979, 57: 927-931
- Haugland R A, Cline M G. Post-transcriptional modifications of oat coleoptile ribonucleic acids. 5'-Terminal capping and methylation of internal nucleosides in poly(A)-rich RNA. *Eur J Biochem*, 1980, 104: 271-277
- Nichols J L, Welder L. Nucleotides adjacent to N⁶-methyladenosine in maize poly(A)-containing RNA. *Plant Sci Lett*, 1981, 21: 75-81
- 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
- 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
- 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
- Luo G Z, MacQueen A, Zheng G, et al. Unique features of the m⁶A methylome in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Commun*, 2014, 5: 5630
- 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
- Murik O, Chandran S A, Nevo-Dinur K, et al. Topologies of N⁶-adenosine methylation (m⁶A) in land plant mitochondria and their putative effects on organellar gene expression. *Plant J*, 2020, 101: 1269-1286
- 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
- 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: 1180-1188
- Anderson S J, Kramer M C, Gosai S J, et al. N⁶-methyladenosine inhibits local ribonucleolytic cleavage to stabilize mRNAs in *Arabidopsis*. *Cell Rep*, 2018, 25: 1146-1157.e3
- Parker M T, Knop K, Sherwood A V, et al. Nanopore direct RNA sequencing maps the complexity of *Arabidopsis* mRNA processing and m⁶A modification. *eLife*, 2020, 9: e49658
- Wan Y, Tang K, Zhang D, et al. Transcriptome-wide high-throughput deep m⁶A-seq reveals unique differential m⁶A methylation patterns between three organs in *Arabidopsis thaliana*. *Genome Biol*, 2015, 16: 272

- 15 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
- 16 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
- 17 Luo J H, Wang Y, Wang M, et al. Natural variation in RNA m⁶A methylation and its relationship with translational status. *Plant Physiol*, 2020, 182: 332–344
- 18 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
- 19 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
- 20 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
- 21 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. *PLoS Genet*, 2019, 15: e1008120
- 22 Lu L, Zhang Y, He Q, et al. MTA, an RNA m⁶A methyltransferase, enhances drought tolerance by regulating the development of trichomes and roots in poplar. *Int J Mol Sci*, 2020, 21: 2462
- 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 Wang P, Doxtader K A, Nam Y. Structural basis for cooperative function of Mettl3 and Mettl14 methyltransferases. *Mol Cell*, 2016, 63: 306–317
- 25 Balacco D L, Soller M. The m⁶A writer: Rise of a machine for growing tasks. *Biochemistry*, 2019, 58: 363–378
- 26 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: 1283–1292
- 27 Pontier D, Picart C, El Baidouri M, et al. The m⁶A pathway protects the transcriptome integrity by restricting RNA chimera formation in plants. *Life Sci Alliance*, 2019, 2: e201900393
- 28 Fu Y, Jia G, Pang X, et al. FTO-mediated formation of N⁶-hydroxymethyladenosine and N⁶-formyladenosine in mammalian RNA. *Nat Commun*, 2013, 4: 1798
- 29 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
- 30 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
- 31 Li Z, Shi J, Yu L, et al. N⁶-methyl-adenosine level in *Nicotiana tabacum* is associated with tobacco mosaic virus. *Virology*, 2018, 15: 87
- 32 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
- 33 Liu Y, You Y, Lu Z, et al. N⁶-methyladenosine RNA modification-mediated cellular metabolism rewiring inhibits viral replication. *Science*, 2019, 365: 1171–1176
- 34 Wang X, Zhao B S, Roundtree I A, et al. N⁶-methyladenosine modulates messenger RNA translation efficiency. *Cell*, 2015, 161: 1388–1399
- 35 Wang X, Lu Z, Gomez A, et al. N⁶-methyladenosine-dependent regulation of messenger RNA stability. *Nature*, 2014, 505: 117–120
- 36 Shi H, Wang X, Lu Z, et al. YTHDF3 facilitates translation and decay of N⁶-methyladenosine-modified RNA. *Cell Res*, 2017, 27: 315–328
- 37 Hsu P J, Zhu Y, Ma H, et al. Ythdc2 is an N⁶-methyladenosine binding protein that regulates mammalian spermatogenesis. *Cell Res*, 2017, 27: 1115–1127
- 38 Kretschmer J, Rao H, Hackert P, et al. The m⁶A reader protein YTHDC2 interacts with the small ribosomal subunit and the 5'–3' exoribonuclease XRN1. *RNA*, 2018, 24: 1339–1350
- 39 Xiao W, Adhikari S, Dahal U, et al. Nuclear m⁶A reader YTHDC1 regulates mRNA splicing. *Mol Cell*, 2016, 61: 507–519
- 40 Patil D P, Chen C K, Pickering B F, et al. m⁶A RNA methylation promotes XIST-mediated transcriptional repression. *Nature*, 2016, 537: 369–373
- 41 Roundtree I A, Luo G Z, Zhang Z, et al. YTHDC1 mediates nuclear export of N⁶-methyladenosine methylated mRNAs. *eLife*, 2017, 6: e31311
- 42 Li Y, Xia L, Tan K, et al. N⁶-methyladenosine co-transcriptionally directs the demethylation of histone H3K9me2. *Nat Genet*, 2020, 52: 870–877
- 43 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
- 44 Arribas-Hernández L, Simonini S, Hansen M H, et al. Recurrent requirement for the m⁶A-ECT2/ECT3/ECT4 axis in the control of cell proliferation during plant organogenesis. *Development*, 2020, 147: dev189134
- 45 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
- 46 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
- 47 Wu J, Peled-zehavi H, Galili G. The m⁶A reader ECT2 post-transcriptionally regulates proteasome activity in *Arabidopsis*. *New Phytol*, 2020, 228: 151–162
- 48 Liu N, Dai Q, Zheng G, et al. N⁶-methyladenosine-dependent RNA structural switches regulate RNA-protein interactions. *Nature*, 2015, 518: 560–564
- 49 Wu B, Su S, Patil D P, et al. Molecular basis for the specific and multivariant recognitions of RNA substrates by human hnRNP A2/B1. *Nat Commun*, 2018, 9: 420
- 50 Liu N, Zhou K I, Parisien M, et al. N⁶-methyladenosine alters RNA structure to regulate binding of a low-complexity protein. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45: 6051–6063
- 51 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
- 52 Zhang F, Kang Y, Wang M, et al. Fragile X mental retardation protein modulates the stability of its m⁶A-marked messenger RNA targets. *Hum Mol Genet*, 2018, 27: 3936–3950
- 53 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
- 54 Choe J, Lin S, Zhang W, et al. mRNA circularization by METTL3-eIF3h enhances translation and promotes oncogenesis. *Nature*, 2018, 561: 556–560
- 55 Wu R, Li A, Sun B, et al. A novel m⁶A reader Prrc2a controls oligodendroglial specification and myelination. *Cell Res*, 2019, 29: 23–41
- 56 Desrosiers R, Friderici K, Rottman F. Identification of methylated nucleosides in messenger RNA from *Novikoff hepatoma* cells. *Biochemistry*, 1974, 13: 3971–3975
- 57 Adams J M, Cory S. Modified nucleosides and bizarre 5'-termini in mouse myeloma mRNA. *Nature*, 1975, 255: 28–33
- 58 Wei C M, Gershowitz A, Moss B. 5'-Terminal and internal methylated nucleotide sequences in HeLa cell mRNA. *Biochemistry*, 1976, 15: 397–401
- 59 Canaani D, Kahana C, Lavi S, et al. Identification and mapping of N⁶-methyladenosine containing sequences in simian virus 40 RNA. *Nucleic Acids Res*, 1979, 6: 2879–2899
- 60 Kane S E, Beemon K. Precise localization of m⁶A in Rous sarcoma virus RNA reveals clustering of methylation sites: Implications for RNA processing. *Mol Cell Biol*, 1985, 5: 2298–2306
- 61 Harper J E, Miceli S M, Roberts R J, et al. Sequence specificity of the human mRNA N⁶-adenosine methylase *in vitro*. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18: 5735–5741
- 62 Keith G. Mobilities of modified ribonucleotides on two-dimensional cellulose thin-layer chromatography. *Biochimie*, 1995, 77: 142–144
- 63 Imanishi M, Tsuji S, Suda A, et al. Detection of N⁶-methyladenosine based on the methyl-sensitivity of MazF RNA endonuclease. *Chem Commun*, 2017, 53: 12930–12933
- 64 Zhang Z, Chen L Q, Zhao Y L, et al. Single-base mapping of m⁶A by an antibody-independent method. *Sci Adv*, 2019, 5: eaax0250
- 65 Chen K, Lu Z, Wang X, et al. High-resolution N⁶-methyladenosine (m⁶A) map using photo-crosslinking-assisted m⁶A sequencing. *Angew Chem Int Ed*, 2015, 54: 1587–1590
- 66 Linder B, Grozhik A V, Olarerin-George A O, et al. Single-nucleotide-resolution mapping of m⁶A and m⁶Am throughout the transcriptome. *Nat Methods*, 2015, 12: 767–772
- 67 Meyer K D. DART-seq: An antibody-free method for global m⁶A detection. *Nat Methods*, 2019, 16: 1275–1280
- 68 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
- 69 Garalde D R, Snell E A, Jachimowicz D, et al. Highly parallel direct RNA sequencing on an array of nanopores. *Nat Methods*, 2018, 15: 201–206
- 70 Wang Z, Tang K, Zhang D, et al. High-throughput m⁶A-seq reveals RNA m⁶A methylation patterns in the chloroplast and mitochondria transcriptomes of *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One*, 2017, 12: e0185612
- 71 Miao Z, Zhang T, Qi Y, et al. Evolution of the RNA N⁶-methyladenosine methylome mediated by genomic duplication. *Plant Physiol*, 2020, 182: 345–360
- 72 Bartosovic M, Molares H C, Gregorova P, et al. N⁶-methyladenosine demethylase FTO targets pre-mRNAs and regulates alternative splicing and 3'-end processing. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45: 11356–11370
- 73 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
- 74 Ke S, Alemu E A, Mertens C, et al. A majority of m⁶A residues are in the last exons, allowing the potential for 3'UTR regulation. *Genes Dev*, 2015,

29: 2037–2053

- 75 Yue Y, Liu J, Cui X, et al. VIRMA mediates preferential m⁶A mRNA methylation in 3'UTR and near stop codon and associates with alternative polyadenylation. *Cell Discov*, 2018, 4: 10
- 76 Lesbirel S, Viphakone N, Parker M, et al. The m⁶A-methylase complex recruits TREX and regulates mRNA export. *Sci Rep*, 2018, 8: 13827
- 77 Du H, Zhao Y, He J, et al. YTHDF2 destabilizes m⁶A-containing RNA through direct recruitment of the CCR4-NOT deadenylase complex. *Nat Commun*, 2016, 7: 12626
- 78 Meyer K D, Patil D P, Zhou J, et al. 5'UTR m⁶A promotes cap-independent translation. *Cell*, 2015, 163: 999–1010
- 79 Lin S, Choe J, Du P, et al. The m⁶A methyltransferase METTL3 promotes translation in human cancer cells. *Mol Cell*, 2016, 62: 335–345
- 80 Alarcón C R, Lee H, Goodarzi H, et al. N⁶-methyladenosine marks primary microRNAs for processing. *Nature*, 2015, 519: 482–485
- 81 Berulava T, Rahmann S, Rademacher K, et al. N⁶-adenosine methylation in MiRNAs. *PLoS One*, 2015, 10: e0118438
- 82 Ries R J, Zaccara S, Klein P, et al. m⁶A enhances the phase separation potential of mRNA. *Nature*, 2019, 571: 424–428
- 83 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*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2020, 117: 21785–21795
- 84 Liu X M, Zhou J, Mao Y, et al. Programmable RNA N⁶-methyladenosine editing by CRISPR-Cas9 conjugates. *Nat Chem Biol*, 2019, 15: 865–871

Summary for “RNA化学修饰m⁶A在植物中的研究进展”

RNA chemical modification of m⁶A in plants

Huayue Liu, Danyang Tian, Jing Song, Hui Wang & Yunwei Zhang*

College of Grassland Science and Technology, China Agricultural University, Beijing 100193, China

* Corresponding author, E-mail: zywei@cau.edu.cn

N⁶-methyladenosine (m⁶A) is the most prevalent methylation modification form of eukaryotic messenger RNAs (mRNA). In plants, m⁶A participates in a variety of biological processes by affecting mRNA alternative polyadenylation, stability, and translation. In existing research, the absence of some methyltransferase complexes, such as methyltransferase A (MTA), methyltransferase B (MTB), FKBP12 interacting protein (FIP37), and virilizer (VIR), in plants causes embryonic lethality. Lowering gene expression levels of different methyltransferase components will cause severely hindered growth and development, such as growth retardation, over-proliferation of shoot apical meristem, aberrant gravity response, abnormal vascular tissue development, etc. Loss of demethylase AlkB homolog 10B (ALKBH10B) increases m⁶A modification levels of FLOWERING LOCUS T (*FT*), SQUAMOSA PROMOTER-BINDING PROTEIN-LIKE 3 (*SPL3*), and *SPL9*, lowering their stability, which leads to delayed flowering. The absence of AlkB homolog 9B (ALKBH9B) can increase the genomic m⁶A modification level of the alfalfa mosaic virus (AMV), weakening its infection capacity to plants. RNA binding proteins are mainly proteins with the YTH-domain. The evolutionarily conserved c-terminal region (ECT) represents main RNA binding proteins in plants. ECT2, ECT3, and ECT4, three kinds of ECTs, affect trichome branch numbers, precise leaf formation timing, and leaf morphology. Furthermore, the longer isoform of CLEAVAGE AND POLYADENYLATION SPECIFICITY FACTOR 30 (CPSF30-L) which has mRNA binding function influences processes of polyadenylation site selection and phase separation. In addition to these features, these binding proteins are quite likely to be involved in plant response processes to adversity stress. Through the comprehensive analysis of existing studies, we considered that m⁶A is mainly enriched in the 3' untranslated regions (3'UTR) region nearby the stop codon of plant mRNAs. As for the m⁶A modification enriched in the 5' untranslated regions (5'UTR) region may be relevant to the higher abundance of chloroplast-related genes. The whole plant m⁶A-seq results show that RR[A]CH is a main m⁶A motif of plants. Sequencing of m⁶A at specific tissue sites or the sequence recognized by the binding protein indicated that UGU[A]Y is a plant-specific motif. As for the divergences in existing research about how m⁶A influences plant mRNA stability, we supposed that the existence of m⁶A is positively correlated with mRNA stability. However, there would be a negative correlation between m⁶A level and mRNA stability when m⁶A exists. In this article, we reviewed the research progress of plant m⁶A on three aspects, including m⁶A modification-related regulatory proteins and their functions, m⁶A position distribution and its motif characteristics, and the molecular mechanism of m⁶A regulation. Finally, we summarized the high-valued research emphasis and directions of m⁶A in plants.

N⁶-methyladenine (m⁶A), RNA modification, mRNA stability, plantdoi: [10.1360/TB-2020-1192](https://doi.org/10.1360/TB-2020-1192)