



m⁶A RNA甲基化修饰在植物中的研究进展

汤仁坤^{1,2}, 周磊磊^{1,2}, 高广通^{1,2}, 秦国政^{1,2,*}

¹中国科学院植物研究所, 北方资源植物重点实验室, 北京100093

²中国科学院大学, 北京100049

*通信作者(gzqin@ibcas.ac.cn)

摘要: *N*⁶-甲基腺苷(*N*⁶-methyladenosine, m⁶A)修饰是发生在RNA分子上最广泛的化学修饰之一, 在转录后调控中发挥着重要作用。m⁶A甲基转移酶和去甲基化酶协同调控m⁶A修饰的动态变化, 而识别酶特异性地结合m⁶A修饰位点, 影响RNA的代谢和加工, 从而产生不同的生物学功能。本文对植物中m⁶A甲基化元件、m⁶A修饰对mRNA的影响, 以及检测技术进行了综述, 并着重总结了m⁶A修饰在调控植物生长发育和逆境应答等方面的研究进展, 以期为深入开展植物m⁶A相关研究提供理论参考。

关键词: m⁶A; RNA修饰; 甲基转移酶; 去甲基化酶; 甲基识别酶

Research progress of m⁶A RNA methylation in plants

TANG Renkun^{1,2}, ZHOU Leilei^{1,2}, GAO Guangtong^{1,2}, QIN Guozheng^{1,2,*}

¹Key Laboratory of Plant Resources, Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China

²University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

*Corresponding author (gzqin@ibcas.ac.cn)

Abstract: As one of the most abundant chemical modifications on RNA, *N*⁶-methyladenosine (m⁶A) plays a variety of important roles in post-transcriptional regulation. The m⁶A methyltransferases and demethylases coordinately regulate the dynamic changes of m⁶A modification, while the m⁶A readers specifically binds to the modification site of m⁶A and affects the metabolisms and processing of RNA, thereby producing different biological functions. In this review, we summarized the composition of m⁶A methylation machinery, the effect of m⁶A on mRNA, and the detection technologies of m⁶A in plants, focusing on recent advances in understanding the biological functions of m⁶A on plant growth, development, and stress response. This may provide useful information for in-depth research on plant m⁶A.

Key words: m⁶A; RNA modification; methyltransferase; demethylase; reader protein

遗传信息从DNA到RNA再到蛋白的传递过程受到来自不同水平化学修饰的精细调控(Uy和Wold 1977; Zhao等2020)。在古生菌、细菌和真核生物的RNA分子中发现了超过160种化学修饰, 包括m⁷G、m¹A、m⁶A、m⁶A_m、m⁵C、hm⁵C、N_m、I、Ψ、ac4C等(Liang等2020)。这些修饰影响了RNA的代谢, 并对RNA的最终命运至关重要(Shi等2019; Yue等2019)。其中, 广泛分布于mRNA、tRNA、

rRNA及和非编码RNA分子上的*N*⁶-甲基腺苷(*N*⁶-methyladenosine, m⁶A)修饰是含量最丰富的修饰之一(Wei等2017)。

m⁶A是RNA分子中腺嘌呤核苷(Adenosine, A)

收稿 2021-11-05 修定 2023-03-07

资助 国家自然科学基金(31925035)及国家重点研发计划(2018-YFD1000200)。

N⁶位置氢原子(H)被甲基(CH₃)取代后形成的一种十分保守的化学修饰(Motorin和Helm 2011)。该修饰于1974年在Novikoff肝癌细胞中首次发现(Desrosiers等1974)。随后, m⁶A RNA甲基化修饰在病毒(Courtney等2017; Martinez-Pere等2017)、细菌(Deng等2015)、酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) (Bodi等2010)、果蝇(*Drosophila melanogaster*) (Levis和Penman 1978)、小鼠(*Mus musculus*) (Schibler等1977)、小麦(*Triticum aestivum*) (Kennedy和Lane 1979)、燕麦(*Avena sativa*) (Haugland等1980)、玉米(*Zea mays*) (Nichols和Welder 1981)等物种中被相继报道。因此, 它广泛存在于病毒、原核及真核生物中。m⁶A修饰占有RNA甲基化修饰的80%以上(Kierzek和Kierzek 2003)。在酵母细胞中, m⁶A的相对含量[(m⁶A)/A]为0.7%~0.9% (Bodi等2010), 而在动物和拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中, m⁶A的相对含量分别为0.1%~0.4% (Wei等1976; Shi等2019)和0.4%~1.5% (Zhong等2008)。m⁶A修饰在哺乳动物中主要发生在RRACH保守基序[R代表腺嘌呤核苷(A)或鸟嘌呤核苷(guanosine, G), H代表A、胞嘧啶核苷(cytidine, C)或尿嘧啶核苷(uridine, U)] (Schibler等1977; Shen等2016)。在拟南芥、玉米等高等植物中, 除了RRACH基序外, m⁶A也分布于植物特有的UGUA基序中(Luo等2014; Wei等2018; Miao

等2019)。m⁶A修饰在mRNA的各个区域内均有分布, 包括5' UTR (untranslated region)、CDS (coding sequence)、3' UTR、终止密码子和转录起始位点(transcription start site, TSS)附近, 并高度富集在终止密码子附近和3' UTR内(Dominissini等2012; Meyer等2012; Zhou等2021)。

m⁶A修饰具有可逆性, 在细胞内受各种作用元件的协同调控从而保持动态平衡(Shi等2019)。m⁶A甲基转移酶和去甲基化酶分别负责m⁶A的添加和去除; m⁶A识别酶则通过与m⁶A特异性结合进而影响RNA加工和代谢过程(Yue等2015; Shi等2019; Arribas-Hernández和Brodersen 2020) (图1)。大量研究表明, m⁶A修饰在各种生物学过程中发挥重要作用。在动物中, m⁶A影响皮质神经发生、抗肿瘤免疫反应、胚胎发育及多能干细胞分化等(Batista等2014; Yoon等2017; Bertero等2018; Han等2019)。在植物中, m⁶A修饰参与调控根(Růžicka等2017)、茎(Shen等2016)、叶(Arribas-Hernández等2018; Lockhart等2018)、花(Duan等2017; Zhang等2019a)、果(Zhou等2019, 2021)和种子(Vespa等2004; Zhong等2008)的发育过程以及生物或非生物胁迫响应。基于m⁶A修饰的广泛性和重要性, 研究人员提出m⁶A可以作为一种表观遗传修饰的观点(He 2010; Jia等2011)。m⁶A RNA甲基化与DNA甲基化存在一定的相似性,

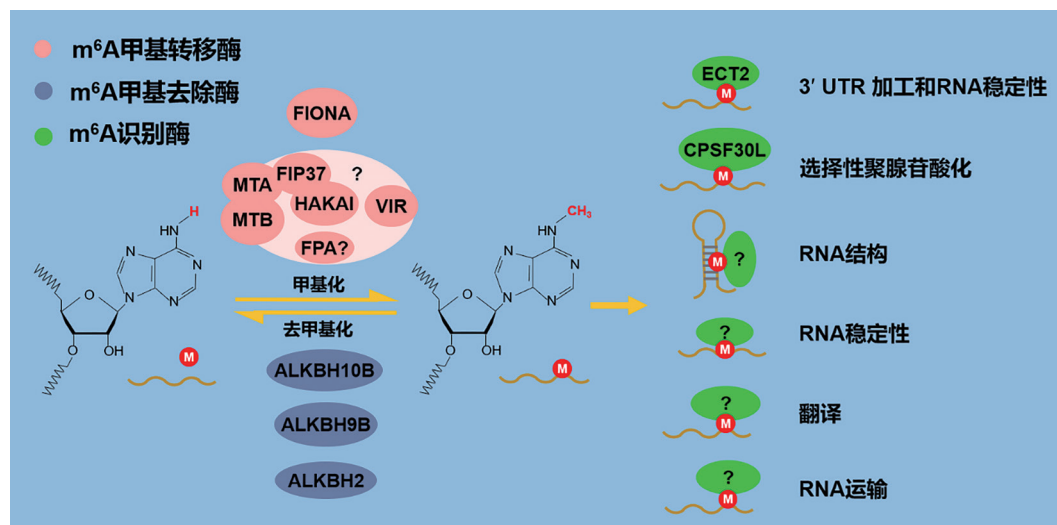

 图1 m⁶A通路及其组分功能

 Fig. 1 The m⁶A pathway and the functions of its components

但也有根本区别。DNA甲基化发生在DNA分子中胞嘧啶第5位碳原子上,由DNA甲基转移酶催化产生,并由主动和被动两种形式去甲基化去除(Morales-Ruiz等2006)。DNA甲基化可参与亲本印记、转座子和其他重复DNA序列沉默、基因表达调控等(Mirouze和Paszkowski 2011)。

1 m⁶A甲基转移酶复合物

m⁶A甲基转移酶主要以复合体的形式发挥作用(Shi等2019)。在哺乳动物中,m⁶A甲基转移酶METTL3 (methyltransferase-like 3)、METTL14 (Methyltransferase-like 14)、WTAP (Wilms tumor 1-associating protein)通过蛋白质互作形成聚合物METTL3-METTL14-WTAP,组成m⁶A甲基转移酶复合体核心组分(Bokar等1997; Liu等2014; Ping等2014; Wang等2016a, b)。METTL3具有m⁶A甲基转移酶活性,作为催化亚基行使功能;METTL14主要负责复合体与靶标RNA的结合;WTAP在复合体细胞定位和底物选择方面发挥作用(Shi等2019)。此外,其他亚基对复合体生理功能的行使也具有重要的辅助作用。例如,VIRMA (Vir-like m⁶A methyltransferase associated)可引导m⁶A修饰在终止密码子附近和3' UTR内富集(Yue等2018);ZC3H13 (Zinc finger CCCH-type containing 13)辅助复合体进入细胞核内发挥作用(Wen等2018);RBM15/15B (RNA binding motif protein 15/15B)通过结合尿嘧啶核苷(U)富集的RNA区域促进复合体对特定mRNA的修饰(Patil等2016)。

在植物中,METTL3同源蛋白MTA (adenosine methylase)和METTL14同源蛋白MTB (methyltransferase B)是植物m⁶A甲基转移酶复合物中的核心亚基,均含有MT-A70保守结构域(表1)。它们均定位于细胞核,可形成异源二聚体(Liu等2014; Růžicka等2017)。MTA和MTB与m⁶A的形成密切相关。Zhong等(2008)利用二维薄层色谱法(two-dimensional thin layer chromatography, TLC)在*mta*缺陷型种子中即检测不到m⁶A修饰的存在。拟南芥*MTB*的RNAi株系与野生型相比,m⁶A修饰水平减少了约50% (Růžicka等2017)。水稻(*Oryza sativa*)中含有4个与拟南芥*MTA*同源的基因,其中仅*MTA2*突变可导致

m⁶A水平显著降低,其余三个基因均不影响m⁶A整体水平(Zhang等2019a)。近期,研究人员在草莓(*Fragaria vesca*)中鉴定到MTA和MTB的同源蛋白,并发现它们同样具有m⁶A甲基转移酶的功能(Zhou等2021)。

植物中其他m⁶A甲基转移酶复合物成员也影响着m⁶A的产生。通过串联亲和纯化及酵母双杂交实验,研究者确定除了MTA和MTB之外,FIP37 (FKBP12 Interacting Protein 37)、HAKAI、VIR (VIRILIZER)也是植物m⁶A甲基转移酶复合物的重要成员(表1),它们也定位于细胞核中,在动物中的同源蛋白分别为WTAP、CBLL1、KIAA1429 (Růžicka等2017; Arribas-Hernández和Brodersen 2020)。在*fip37*突变株中,m⁶A整体水平较野生型减少约20%,这些差异化的m⁶A主要发生在3' UTR及终止密码子附近,而在5' UTR却变化不大(Shen等2016)。*hakai*突变株的m⁶A整体水平减少35%左右,而*vir*植株中m⁶A整体水平较野生型降低5%~15% (Růžicka等2017)。此外,在植物中也鉴定到以单体形式发挥功能的m⁶A甲基转移酶FIONA1 (FIO1) (表1),*FIO1*缺失可导致拟南芥整体m⁶A水平下降,并呈现出早花表型(Xu等2022)。

2 m⁶A去甲基化酶

m⁶A去甲基化酶的主要功能是识别m⁶A修饰并将其从RNA分子上去除(Shi等2019)。m⁶A去甲基化酶与甲基转移酶协同作用,共同调控m⁶A的动态可逆变化。哺乳动物中研究较为深入的m⁶A去甲基化酶包括肥胖相关蛋白FTO (fat mass and obesity-associated protein)和ALKBH5 (AlkB homolog 5),它们都属于 α -酮戊二酸和Fe(II)依赖的双加氧酶家族蛋白,含有保守的AlkB功能结构域(Fedeles等2015; Sanchez-Pulido和Andrade-Navarro 2007)。FTO和ALKBH5重组蛋白在体外可以单独将RNA分子上的m⁶A修饰去除,表明它们能以单一蛋白的形式发挥作用(Jia等2011; Zheng等2013)。FTO的N端序列中存在核定位信号肽,使其定位于细胞核,并且部分富集于核斑点(Jia等2011)。研究发现,除了作用于m⁶A以外,FTO也催化去除m⁶A_m,且催化效率更显著(Mauer等2017),偏好性也更强(Meyer等

2017; Shi等2019)。ALKBH5定位于核斑点, 主要催化mRNA上m⁶A的去除, 可介导特定转录本上3' UTR区的m⁶A去除(Zhang等2016, 2017; Tang等2018)。

在模式植物拟南芥中, 科研人员鉴定到多个ALKBH5的同源蛋白, 包括AtALKBH9A/9B/9C和AtALKBH10A/10B (表1), 它们均含有保守的AlkB功能结构域(Mielecki等2012; Duan等2017; Martinez-Perez等2017)。ALKBH10B能够在体内、体外行使去甲基酶功能; ALKBH9B可在体外去除m⁶A修饰, 且ALKBH9B的缺失将导致拟南芥m⁶A水平显著升高(Duan等2017; Martinez-Pere等2017)。亚细胞定位分析显示, 拟南芥ALKBHs蛋白在细胞内的定位呈现多样化, 主要定位于细胞核和细胞质(Mielecki等2012)。近期, 研究人员在番茄(*Solanum lycopersicum*)中鉴定到8个ALKBHs蛋白(Zhou等2019)。其中, SlALKBH2定位于内质网并具有催化去除m⁶A的活力(表1)。

3 m⁶A甲基识别酶

m⁶A在甲基转移酶及去甲基化酶的作用下实现m⁶A修饰的动态变化。然而, m⁶A介导的转录后调控功能的发挥在很大程度上依赖于m⁶A甲基识别酶。对m⁶A甲基识别酶的研究有利于深入解析m⁶A的生理功能和作用机制。m⁶A甲基识别酶能够结合发生m⁶A修饰的转录本, 并招募多种功能性调控蛋白, 从而对转录本的代谢过程产生影响(Shi等2019)。目前, 主要通过甲基化探针富集结合蛋白质质谱分析技术对m⁶A甲基识别酶进行鉴定(Edu-puganti等2017)。在哺乳动物中, 一类重要的m⁶A甲基识别酶是含有YTH功能结构域的蛋白, 包括YTHDF1/2/3 (YTH domain family 1/2/3)和YTHDC1/2 (YTH domain containing 1/2) (Shi等2019)。YTHDF1/2/3定位于细胞质, 而YTHDC1/2主要在细胞核中发挥作用(Wang等2014, 2015; Du等2016; Xiao等2016)。YTH家族成员所含有的YTH结构域由高度保守的芳香族氨基酸形成芳香环, 该芳香环能够特异性地识别m⁶A, 并对其具有较高亲和力(Luo和Tong 2014)。除了YTH家族蛋白以外, 很多RNA结合蛋白也具有潜在的m⁶A识别功能, 并被当作一

类特殊的m⁶A甲基识别酶。它们通过KH (K homology)、RRM (RNA recognition motif)、RGG (Arginine/glycine-rich)等RNA结合功能域识别m⁶A位点, 进而对转录本进行调控(Liu等2015; Huang等2018; Wu等2018)。m⁶A甲基识别酶对RNA的特异性识别可能受招募蛋白的类型、m⁶A基序、亚细胞定位等影响, 具体结合机制尚有待深入探索(Shi等2019)。

拟南芥基因组编码13个含有YTH保守结构域的ECT (evolutionarily conserved C-terminal region) 蛋白(ECT1-13) (Li等2014a)。其中, ECT1和ECT2可与CIPK (calcineurin B-like-interacting protein kinase1)互作, 并通过CBL1-CIPK1膜结合复合体将外界胁迫信息传递到细胞核(Ok等2005)。ECT2可通过YTH结构域特异性地结合m⁶A, 其结合位点大量富集在含有m⁶A修饰的3' UTR区域。ECT2既可在细胞核中调控3' UTR的加工, 又可在细胞质中增强mRNA的稳定性(表1) (Wei等2018)。ECT2功能的实现可能是通过控制PTRE1和几个20S蛋白酶亚基的mRNA水平, 从而导致26S蛋白酶体活性增强(Wu等2020)。植物中另外一种含有YTH结构域的蛋白为CPSF30L, 它与m⁶A的结合能够促进mRNA 3' UTR的切割和选择性聚腺苷酸化(表1)。CPSF30L突变导致转录通读和mRNA嵌合体的形成(Hou等2021; Song等2021)。除以上功能, m⁶A甲基识别酶还参与RNA剪切、翻译、运输等, 并调节RNA结构(图1), 但植物中相关研究尚有待深入。

4 m⁶A修饰对mRNA的影响

m⁶A修饰调控mRNA加工和代谢过程, 包括mRNA翻译、降解、剪切、运输等(Shi等2019), 从而参与调控多种生物学过程。首先, m⁶A修饰参与调控mRNA稳定性。通过YTH结构域, 小鼠m⁶A甲基识别酶YTHDF2识别含有m⁶A修饰的mRNA, 并通过P/Q/N结构域将结合的mRNA从细胞质翻译区转运到P小体降解位点内, 从而促进mRNA降解(Wang等2014), 表明m⁶A修饰负调控mRNA稳定性。然而, 在人类急性髓性白血病细胞中, FTO介导的m⁶A去甲基化致使大量mRNA稳定性降低, 降解速率加快, 预示着m⁶A修饰也具有促进mRNA稳定性

表1 植物中m⁶A相关蛋白及其生物学功能

Table 1 m⁶A associated protein and its biological functions in plant

m ⁶ A相关蛋白	蛋白名称	基因ID	物种	同源蛋白	亚细胞定位	突变体/转基因株系	功能和表型	参考文献
m ⁶ A甲基转移酶及其复合物	MTA	At4g10760	拟南芥	METTLL3	细胞核	<i>mta</i> (<i>SALK_074069</i>) <i>mta.ABI3.MTA</i>	胚胎致死 顶端优势降低、花器官畸形、毛状体分枝数增加、根系生长缩短、根原生木质部发育及向重力性缺陷等	Zhong等2008 Bodi等2012; Ružićka等2017
						<i>AmiR-mta</i>	顶端分生组织过度增殖、生长缓慢、叶片形状异常	Shen等2016
	OsMTA2	LOC_Os02g45110	水稻	METTLL3	细胞核	<i>mta2</i> <i>OXMTA2</i>	穗长、结实率、有效籽粒数降低	Zhang等2019a
	MTA	gene01911	草莓	METTLL3	细胞核、细胞质	<i>MTA-RNAi</i> <i>MTA-OE</i>	延迟果实成熟 加速果实成熟	Zhou等2021
	MTB	At4g09980	拟南芥	METTLL14	细胞核	<i>MTB-RNAi</i>	生长发育延迟、顶端优势减弱、根原生木质部发育及重力反应缺陷;	Ružićka等2017
	MTB	gene31441	草莓	METTLL14	细胞核	<i>MTB-RNAi</i> <i>MTB-OE</i>	胚胎致死 延迟果实成熟 加速果实成熟	Zhou等2021
	FIP37	At3g54170	拟南芥	WTAP	细胞核	<i>fip37</i> (<i>SALK_029377</i>) <i>35S:FIP37</i> <i>fip37</i> (<i>LEC1:FIP37</i>)	胚乳和胚胎发育停滞 毛囊体分枝数增加 茎尖分生组织增殖、叶形异常、生长缓慢	Vespa等2004 Shen等2016
						<i>fip37</i> (<i>SALK_018636</i>)	顶端优势、向重力性、根原生木质部发育缺陷	Ružićka等2017
	OsFIP3	LOC_Os06g27970	水稻	WTAP	—	<i>fip37</i> (<i>LEC1:FIP37</i>) <i>fip</i>	转录通读及mRNA嵌合体 分蘖数减少、几乎完全不育、穗数减少、花序和花药缩短、孢子发生受限	Pontier等2019 Zhang等2019a
	VIR	At3g05680	拟南芥	KIAA14129	细胞核	<i>vir</i> <i>OXFIP</i>	穗数增多、花序和花药增长、种子数量增加、结实率升高 重力响应异常、侧根及子叶发育异常; 盐胁迫敏感	Ružićka等2017; Hu等2021

表1 (续)

m ⁶ A相关蛋白	蛋白名称	基因ID	物种	同源蛋白	亚细胞定位	突变体/转基因株系	功能和表型	参考文献
m ⁶ A甲基转移酶及其复合物	HAKAI	At5g01160	拟南芥	CBLL1	细胞核	<i>hakai</i>	根维管发育相关的原生木质部缺陷	Růžicka等2017
	FPA	At2g43410	拟南芥	RBM15	—	<i>fpa</i> 35S:: <i>FPA</i>	开花延迟 开花提前	Schomburg等2001
m ⁶ A去甲基化酶	FIO1	At2g21070	拟南芥	METTL16	细胞核	<i>fio1</i>	叶片自由运动的昼夜节律周期延长	Kim等2008
	ALKBH10B	At4g02940	拟南芥	ALKBH5	—	<i>alkbh10b</i> 35S::ALKBH10B	开花延迟 开花提前	Duan等2017
	ALKBH9B	At2g17970	拟南芥	ALKBH5	细胞质	<i>alkbh9b</i>	抵御AMV病毒侵染能力增强	Martinez-Perez等2017
m ⁶ A识别酶	SIALKBH2	solyc01g104130	番茄	ALKBH5	内质网	<i>slalkbh2</i>	果实成熟时期延迟	Zhou等2019
	ECT1	At3g03950	拟南芥	YTHDF1-3	细胞核、细胞质	—	将外界的胁迫信号传递到细胞核	Ok等2005
	ECT2	At3g13460	拟南芥	YTHDF1-3	细胞核、细胞质	<i>ect2</i> ; 35S:: <i>ECT2-mCherry</i>	毛囊体分支异常; 植株矮小、叶片变小且角果变短	Scutenaire等2018; Wei等2018; Wu等2020
	ECT3	At5g61020	拟南芥	YTHDF1-3	细胞质	<i>ect3</i> ; <i>ect2/ect3</i>	毛囊体分支异常等	Lockhart等2018; Arribas-Hernández等2018
	ECT4	At1g55500	拟南芥	YTHDF1-3	细胞质	<i>ect4</i> ; <i>ect2/ect3/ect4</i>	叶片形成延迟、叶片形态异常等	Arribas-Hernández等2018, 2020; Lockhart等2018
	CPSF30	At1g30460	拟南芥	YTHDF1-3	细胞质	<i>cpsf30</i>	转录通读和mRNA嵌合体	Hou等2021; Song等2021

的功能(Li等2017a)。另外,含有KH结构域的RNA结合蛋白IGF2BP1/2/3 [insulin-like growth factor-2 (IGF2) mRNA-binding proteins 1/2/3]可识别m⁶A修饰的转录本,并减弱mRNA的降解速率,表明IGF2BP1/2/3在调控mRNA稳定性方面与YTHDF2功能相反(Huang等2018)。随后的研究显示,m⁶A识别酶对mRNA稳定性的调控作用可能受转录本内序列特征的影响:YTHDF2主要识别CDS区域的m⁶A位点,而IGF2BP1/2/3倾向结合3' UTR内的m⁶A修饰(Wang等2014; Huang等2018; Shi等2019)。在拟南芥中,m⁶A甲基转移酶复合体介导的m⁶A修饰有利于相关转录本的稳定(Shen等2016); m⁶A去甲基化酶AtALKBH10B介导的m⁶A去甲基化可减弱mRNA降解速率,说明m⁶A修饰对mRNA稳定性发挥负调控作用(Duan等2017); m⁶A识别酶ECT2可通过影响转录本3' UTR加工,从而促进mRNA稳定性(Wei等2018)。与拟南芥类似,草莓m⁶A甲基转移酶MTA介导的m⁶A修饰同样促进mRNA稳定性(Zhou等2021),而番茄m⁶A去甲基化酶SlALKBH2介导的m⁶A去甲基化也同样降低mRNA降解速率,促进mRNA稳定性(Zhou等2019)。因此,植物中m⁶A修饰对mRNA稳定性的影响也具有不同的调控功能。

其次,m⁶A修饰可影响mRNA翻译效率。在哺乳动物中,m⁶A甲基识别酶YTHDF1识别3' UTR内的m⁶A位点,并与翻译起始因子复合体结合,促使mRNA形成环状结构,进而增强其翻译效率(Wang等2015)。YTHDF3与YTHDF1协同作用,增强YTHDF1对mRNA翻译效率的促进作用(Li等2017b; Shi等2017)。此外,m⁶A甲基识别酶IGF2BP对部分转录本的翻译过程也具有促进作用(Huang等2018)。在神经细胞中,FTO蛋白通过去甲基化作用正调控轴突基因*GAP-43* (*Growth-associated protein-43*)的翻译(Yu等2018)。值得注意的是,m⁶A甲基转移酶METTL3也可在细胞质中发挥甲基识别功能,并通过与YTHDF1类似的机制促进mRNA翻译(Wang等2015; Lin等2016)。这些研究结果表明m⁶A修饰对mRNA的翻译具有复杂的调控作用。在植物中,关于m⁶A修饰与翻译调控之间的相关性报道较少。

最近,科研人员利用m⁶A-seq结合核糖体印记测序技术,在整体水平上分析了玉米中m⁶A修饰与翻译水平之间的关系,并发现起始密码子附近的m⁶A修饰可促进mRNA与核糖体的结合,进而正调控mRNA翻译效率(Luo等2020)。在草莓中,研究人员也发现m⁶A修饰可影响翻译起始因子和延伸因子的表达,并正调控ABA信号途径中某些基因的翻译效率(Zhou等2021)。

再次,m⁶A修饰能够调节mRNA剪切过程。在哺乳动物中,m⁶A甲基识别酶YTHDC1参与调节前体mRNA的剪切(Shi等2019)。YTHDC1蛋白可在细胞核内识别前体mRNA上的m⁶A修饰,随后招募剪切因子SRSF3 (Pre-mRNA splicing factor),并阻止SRSF10与mRNA结合,从而致使前体mRNA产生合适的外显子保留(Xiao等2016)。某些定位于细胞核的核糖核蛋白HNRNPs (heterogeneous nuclear ribonucleoproteins),如HNRNPC、HNRNPG、HNRNPA2B1等,具有m⁶A甲基识别酶功能,也参与调控转录本的剪切和加工过程(Alarcón等2015; Liu等2015; Wu等2018)。此外,m⁶A甲基转移酶METTL16通过甲基化SAM (*S*-adenosylmethionine)合成酶基因MAT2A的3' UTR内发夹结构序列,诱导其发生有效的可变剪切并形成特定的内含子保留,从而增强MAT2A的表达水平(Pendleton等2017)。在拟南芥中,m⁶A甲基转移酶复合体核心成员FIP37 (FKBP12 interacting protein 37 KD)与果蝇性别相关剪切因子FL(2)D (FEMALE LETHAL2D)高度同源,暗示其介导的m⁶A修饰可能参与调控mRNA剪切过程(Vespa等2004; Zhong等2008)。此外,m⁶A甲基转移酶复合体及ECT2识别酶可通过m⁶A修饰影响mRNA多聚腺苷酸化剪切过程,从而调节相关转录本的3' UTR长度(Wei等2018; Hu等2021)。

除了以上作用方式,m⁶A修饰还具有其他调控功能。例如,m⁶A甲基识别酶YTHDC1可与核输出调控蛋白SRSF3互作,促进mRNA从细胞核转运至细胞质(Roundtree等2017);拟南芥m⁶A甲基转移酶MTA通过m⁶A修饰作用调节miRNA合成过程(Bhat等2020)。鉴于m⁶A对mRNA代谢和加工的重要影响,相关生理功能和作用机制需要进一步深入探索。

5 m⁶A检测技术

在m⁶A修饰研究的早期阶段,主要通过同位素标记(Canaani等1979)、薄层色谱(thin-layer chromatography) (Keith 1995)、点杂交(Nagarajan等2019)等方法检测m⁶A (表2)。m⁶A高通量测序技术于2012年由2个研究团队独立开发完成,分别称为m⁶A-seq (Dominissini等2012)和MeRIP-seq (m⁶A-specific methylated RNA immunoprecipitation with next-generation sequencing) (Meyer等2012),用于检测哺乳动物中的m⁶A修饰。它们均是利用特异的m⁶A抗体对甲基化的mRNA片段进行免疫富集,随后结合高通量测序技术鉴定发生m⁶A修饰的转录本。m⁶A-seq和MeRIP-seq的应用使得科研人员能够在全转录组水平上对m⁶A修饰进行分析(表2),极大地推动了m⁶A研究领域的发展(Meyer和Jaffrey 2017)。利用该技术,研究人员已经在拟南芥(Luo等2014; Wang等2015; Shen等2016)、水稻(Li等2014b; Zhang等2019a)、番茄(Zhou等2019)、草莓(Zhou等2021)、玉米(Luo等2020)等植物中研究了m⁶A的修饰特征。在m⁶A-seq和MeRIP-seq技术的基础上,研究人员将m⁶A免疫沉淀与RT-qPCR结合,开发出m⁶A-IP-qPCR (m⁶A immunoprecipitation followed by qPCR),用于单个转录本的m⁶A检测(Xu等2017)。

虽然m⁶A-seq和MeRIP-seq技术得到了广泛应用,但是它的分辨率较低,仅能将m⁶A修饰定位到长度为100~200个核苷酸的序列中(Dominissini等2012; Meyer等2012)。因此,对于m⁶A精准定位存在很大局限性。为了提高m⁶A高通量测序的精确度,研究人员开发出多种基于免疫沉淀的优化方法,用于m⁶A修饰的单碱基分辨率检测,包括基于第二代高通量测序的PA-m⁶A-seq (photo-crosslinking-assisted m⁶A-sequencing) (Chen等2015)、miCLIP (m⁶A individual-nucleotide-resolution crosslinking and immunoprecipitation) (Linder等2015)、m⁶A-CLIP (m⁶A cross-linking immunoprecipitation) (Ke等2015) (表2)。PA-m⁶A-seq技术通过紫外交联和插入硫尿核苷的方法,在m⁶A位点附近引入T-C突变,然后采用高通量测序技术对m⁶A修饰进行分析(Chen等2015)。该技术虽然比普通m⁶A-seq的分辨率高,但是操作

步骤较为复杂,且不适用于植物研究。miCLIP和m⁶A-CLIP具有相同的技术原理:首先,通过m⁶A抗体对发生m⁶A修饰的mRNA片段进行免疫富集;然后,利用紫外交联对样品进行处理;随后,通过蛋白酶将部分抗体去除,而残留的抗体在随后的反转录过程中导致m⁶A的+1位置核苷酸位点发生突变;最后,通过高通量测序即可检测m⁶A修饰位置(Linder等2015; Ke等2015)。鉴于抗体依赖的m⁶A检测技术存在诸多缺陷,2个科研团队于2019年先后报道了一种不依赖于抗体并可在单碱基分辨率检测m⁶A的方法:m⁶A-REF-seq (m⁶A-sensitive RNA-endoribonuclease-facilitated sequencing) (Zhang等2019b)和MAZTER-seq (Garcia-campos等2019) (表2)。这两种方法均依赖RNA序列敏感性核酸内切酶,所使用的MazF核酸内切酶可在“ACA”序列的上游进行特异性切割,但是不能切割“m⁶ACA”的上游序列,从而将m⁶A与A进行区分。MazF识别的ACA位点仅占经典的RRACH基序的1/3,因此不能覆盖所有的m⁶A修饰位点。此外,以上几种单碱基水平m⁶A测序技术只能用于鉴定RRACH基序中的m⁶A位点,对植物特异性基序UGUA中的m⁶A修饰不适用。DART-seq (deamination adjacent to RNA modification targets)是另一种不需抗体的m⁶A检测方法(表2)。它通过APOBEC1 (apolipoprotein B-editing enzyme, catalytic polypeptide-1)与结合m⁶A的YTH结构域融合,使m⁶A相邻位点的胞嘧啶(C)诱导脱氨成为尿嘧啶(U),然后通过RNA-seq检测m⁶A位点。该技术仅需纳克级总RNA即可进行m⁶A分析。但是,该技术依赖于细胞转染效率,受转染样品材料的限制(Meyer等2019)。最近,报道了2种基于化学标记的m⁶A检测技术:m⁶A-label-seq (Shu等2020)和m⁶A-SEAL (Wang等2020) (表2)。但是,目前这些技术仅在动物细胞中得以验证,未曾在植物中应用。

随着测序技术的发展,第三代测序技术无需样品扩增且能够进行快速的、高通量的单分子测序,可直接对m⁶A修饰进行分析。相关技术包括单分子实时测序(single-molecule, real-time, SMART) (Vilfan等2013)和单分子纳米孔测序(Ayub和Bayley 2012; Garalde等2018)等(表2)。在单分子实时测序

表2 m⁶A检测技术及其特点
Table 2 m⁶A detection technology and its characteristics

m ⁶ A检测技术	特点
同位素标记	可用于定量研究, 涉及放射性标记
薄层色谱	成本低、装置简单, 用于定性研究, 涉及放射性标记, 准确性有限
点杂交	基于免疫技术, 样品需要量大, 操作简单, 存在抗体特异性问题
m ⁶ A-seq	基于免疫技术, 样品需要量大, 可在全转录组范围确定m ⁶ A修饰的mRNA, 分辨率较低, 存在抗体特异性问题
MeRIP-seq	基于免疫技术, 样品需要量大, 可在全转录组范围确定m ⁶ A修饰的mRNA, 分辨率较低, 存在抗体特异性问题
PA-m ⁶ A-seq	基于免疫技术, 通过紫外光进行交联, 分辨率高, 操作步骤复杂, 存在抗体特异性问题
miCLIP	基于免疫技术, 样品需要量大, 可实现单核苷酸分辨率检测, 存在交联效率低及抗体特异性问题
m ⁶ A-CLIP	基于免疫技术, 样品需要量大, 可实现单核苷酸分辨率检测, 存在交联效率低及抗体特异性问题
m ⁶ A-REF-seq	依赖MazF核酸内切酶, 可实现单核苷酸分辨率检测, 不能覆盖所有的m ⁶ A修饰位点
MAZTER-seq	依赖MazF核酸内切酶, 可实现单核苷酸分辨率检测, 不能覆盖所有的m ⁶ A修饰位点
DART-seq	样品需要量少, 假阳性高, 可实现单核苷酸分辨率检测, 受限于样品材料, 仅应用于动物细胞
m ⁶ A-label-seq	基于代谢中间物标记, 可实现单核苷酸分辨率检测
m ⁶ A-SEAL	基于化学标记, 具有良好的敏感性、特异性和可靠性
SMART	三代测序, 依赖逆转录和单分子直测, 样品需要量少, 读长长, 可实现单核苷酸分辨率检测, 价格高
DRS	三代测序, 基于纳米孔和单分子直测, 样品需要量少, 读长长, 可实现单核苷酸分辨率检测, 价格高
SCARLET	针对特定转录本进行单核苷酸分辨率检测, 精准度高, 操作简单, 涉及放射性标记
SELECT	针对特定转录本进行单核苷酸分辨率检测, 精准度高, 操作简单, 成本低

分析中, 逆转录酶通过m⁶A时的动力学信号明显不同于腺苷酸(A)信号, 因此可用于m⁶A检测。此外, 该方法也适用于发生在核酸序列上的其他修饰的定位分析(Korlach等2010)。单分子纳米孔测序则利用电压驱动RNA分子穿过纳米孔。不同的核苷酸通过纳米孔时产生不同的电流信号强度, 可根据电流的变化区分正常核苷酸和被修饰的核苷酸(Ayub和Bayley 2012; Garalde等2018)。单分子纳米孔测序不受保守基序的影响, 目前已在多种动物细胞中得到应用(Pratanwanich等2021)。在植物中, 研究人员利用纳米孔DRS (direct RNA sequencing) 技术检测了拟南芥全转录组范围内的m⁶A分布情况(Parker等2020)。纳米孔DRS技术具有样品需要量少、读长长、无需扩增直接测序以及单碱基分辨率等特点, 将极大地促进植物m⁶A修饰相关研究的发展。

除了m⁶A高通量测序外, 科研人员还开发出2种可准确测定单个m⁶A位点的方法, 分别为SCARLET (site-specific cleavage and radioactive-labeling

followed by ligation-assisted extraction and thin-layer chromatography) (Liu等2013)和SELECT (single-base elongation- and ligation-based PCR amplification method) (Xiao等2018) (表2)。这两种技术精准度高且操作简单, 已被广泛应用于特定转录本m⁶A修饰位点的鉴定及功能分析。

6 m⁶A在植物中的生物学功能

6.1 m⁶A在植物生长发育中的作用

近年来, 通过对m⁶A整体水平进行分析, 研究人员发现m⁶A修饰广泛存在于植物mRNA中, 并在植物生长发育过程中呈现动态变化(Anderson等2018; Shao等2021)。拟南芥根、叶、花等组织中超过35%的转录本存在m⁶A修饰(Luo等2014; Wan等2015)。在不同发育时期的叶片中, 多达几千个基因的m⁶A修饰存在差异(Anderson等2018)。随着对植物中m⁶A功能的深入解析, 目前已知m⁶A修饰广泛参与调控植物生长发育的各个过程(Liang等2020)。

在模式植物拟南芥中, 研究人员克隆了哺乳动物m⁶A甲基转移酶METTL3的同源基因MTA (Zhong等2008)。MTA基因的缺失导致拟南芥胚胎发育受阻, 胚发育停滞在球形胚时期, 产生胚致死的表型(Zhong等2008)。在胚发育期特异表达MTA的回补突变株(*mta-ABI3prom:MTA*)则表现为顶端优势降低、花器官畸形、表皮毛分枝数增加、根系生长缩短、根原生木质部发育及向重力性缺陷等表型(Bodi等2012; Růžicka等2017)。通过人工小RNA (AmiR)干扰下调MTA表达, 植株出现顶端分生组织过度增殖、生长缓慢、叶片形状异常等现象(Shen等2016)。水稻*mta2*突变株及OXMTA2超表达植株均表现为植株穗长短于野生型, 结实率和有效籽粒数低于野生型(Zhang等2019a)。在草莓中, MTA沉默以后果实成熟时间显著推迟, 而过表达MTA则加速果实成熟(Zhou等2021)。MTA介导的m⁶A修饰可调控ABA合成及信号途径中关键基因的mRNA降解或翻译效率, 从而影响草莓果实成熟(Zhou等2021)。

拟南芥m⁶A甲基转移酶复合体的其他核心成员同样具有调控胚胎发育的功能, 包括MTB、FIP37和VIR (Shen等2016; Růžicka等2017)。MTB的RNAi植株表现为生长发育延迟、顶端优势减弱、根原生木质部发育及重力反应缺陷等表型(Růžicka等2017)。FIP37突变可导致拟南芥胚乳和胚发育停滞, 产生致死表型; 过表达FIP37则显著增加表皮毛的分枝数(Vespa等2004)。随后的研究发现, FIP37控制拟南芥芽干细胞命运, 下调FIP37表达可造成茎尖分生组织大量增殖、叶形异常、生长缓慢等(Shen等2016)。FIP37介导的m⁶A修饰可促进顶端分生组织关键调控基因*WUS* (*Wuschel*)和*STM* (*Shoot meristemless*)的mRNA降解(Shen等2016)。FIP37突变使得*WUS*和*STM*的mRNA更加稳定, 进而致使顶端分生组织过度增殖(Shen等2016)。此外, Ruzicka等(2017)研究发现*fip37*突变体表现出顶端优势、向重力性异常及根原生木质部发育缺陷。Pontier等(2019)报道了*fip37*可导致转录通读及mRNA嵌合体的出现。在水稻中, *fip*植株的营养生长阶段仅表现为植株分蘖数减少, 但在生殖发育后期则表现为穗数减少、花序和花药缩短, 几乎完全不育, 与过

表达植株相反(Zhang等2019a)。此外, FIP对于水稻雄性配子发生至关重要(Zhang等2019a)。FIP可直接调控苏氨酸蛋白酶(Threonine protease)和核苷三磷酸水解酶(NTPase)转录本的m⁶A水平, 影响它们的表达和剪切, 从而调节小孢子发生(Zhang等2019a)。*vir*株系表现为植株矮小, 且重力响应及根冠、侧根和子叶发育异常(Růžicka等2017)。令人惊讶的是, 虽然*hakai*突变株中m⁶A整体水平减少35%, 但是该突变体仅表现出与根维管束发育有关的原生木质部发育缺陷(Růžicka等2017)。在*mta-ABI3prom:MTA*株系的基础上进行*hakai*突变, 则造成更为严重的发育缺陷, 植株在发育早期致死(Růžicka等2017)。RBM15B在植物中的同源物FPA (FLOWERING LOCUS PA)控制着开花时间, 突变株*fpa*表现出明显的开花延迟现象; 超表达植株35S::*FPA*开花时间则早于野生型(Schomburg等2001)。此外, METTL16在植物中的同源蛋白FIONA1 (FIO1)调控拟南芥生物钟周期长度, 其突变后导致叶片自由运动的昼夜节律周期延长(Kim等2008)。

m⁶A去甲基化酶AtALKBH10B可通过去甲基化作用增强开花时间控制基因*FT* (*flowering locus T*)、*SPL3* (*squamosa promoter binding protein-like 3*)和*SPL9*的mRNA稳定性(Duan等2017)。当*AtALKBH10B*基因突变后, 拟南芥开花时间明显延迟(Duan等2017)。在番茄中, m⁶A去甲基化酶SlALKBH2调控果实成熟(Zhou等2019)。SlALKBH2可结合果实成熟关键调控因子DNA去甲基化酶SIDML2的mRNA, 并调控其m⁶A修饰及稳定性, 进而影响果实成熟(Zhou等2019)。最新研究表明, 在水稻和马铃薯中异源表达人类m⁶A去甲基化酶基因*FTO*可使产量和生物量增加50%以上(Yu等2021)。

另外, 研究发现m⁶A甲基识别酶ECT2的功能缺失可引起拟南芥叶片毛囊体分枝个数显著增加(Scutenaire等2018; Wei等2018)。进一步研究显示, ECT2可结合毛囊体个数调控基因*TTG1* (*transparent testa glabra 1*)、*ITB1* (*irregular trichome branch 1*)和*DIS2* (*distorted trichome 2*)的3' UTR区域的m⁶A位点, 促进它们的mRNA稳定性(Wei等2018)。此外, ECT2以及它的同源基因*ETC3*和*ETC4*在拟南芥叶片发育早期具有较高的表达水平, 它们能够协

同调控叶片早期形态发育(Arribas-Hernandez等2018)。*ect2/ect3*、*ect2/ect3/ect4*表现出根生长速率慢、向重力性异常、维管干细胞及叶原基细胞生长异常、茎弯曲生长、叶片生长延迟、叶面凹陷、开花延迟、花形态缺陷、果荚形态异常、种子呈不规则分布等多效表型(Arribas-Hernández等2018, 2020; Lockhart等2018)。以上研究结果表明, m⁶A修饰对植物生长发育过程具有广泛的调控作用。

6.2 m⁶A在胁迫响应中的作用

除了调控植物生长发育, m⁶A修饰也参与调节植物胁迫应答过程(Hu等2019; Liang等2020)。研究显示, 拟南芥m⁶A甲基转移酶复合体成员VIR可调节多聚腺苷酸化位点的剪切过程, 从而降低盐胁迫负调控基因*ATAF1* (*NAC transcription factor*)、*GI* (*Gigantea*)和*GSTU17* (*glutathione S-transferase U17*)的mRNA稳定性, 增强拟南芥幼苗对高盐胁迫的适应能力(Hu等2021)。m⁶A修饰也可调控玉米和甜高粱中盐胁迫应答相关基因的表达水平, 进而调节它们的盐胁迫应答反应(Miao等2020; Zheng等2021)。此外, m⁶A甲基识别酶ECT1和ECT2可与CIPK1 (*calcineurin B-like-interacting protein kinase1*)蛋白互作, 并在外源添加Ca²⁺的情况下从细胞质向细胞核移动(Ok等2005)。钙传感器CBL (*calcineurin B-like*)结合Ca²⁺后与CIPK蛋白互作, 将盐、干旱、冷等胁迫信号传递到细胞核, 表明ECT蛋白可能通过CBL-CIPK复合体将外界胁迫信号传递到细胞核中(Cheong等2003)。Scutenaire等(2018)研究发现, 正常条件下ECT2主要以弥散形式在细胞质中聚集, 而在热激后会重新定位到细胞质, 且呈现颗粒状分布。在PEG6000的渗透胁迫下, ECT2和ECT4可在细胞质中呈现颗粒状分布, 而这些颗粒状斑点的形成可能与干旱胁迫有关(Arribas-Hernández等2018)。

在生物胁迫方面, Martinez-Perez等(2017)发现拟南芥m⁶A去甲基化酶AtALKBH9B可以和苜蓿花叶病毒(*Alfalfa mosaic virus*, AMV)的衣壳蛋白发生互作, 并通过去甲基化作用影响该病毒对植物的入侵。进一步的研究揭示, AtALKBH9B在细胞质中与siRNA (*small interference RNA*)小体和P小体共定位, 表明它可能参与调控mRNA稳定性,

并通过这种方式调节植物对AMV的抗性应答反应(Martinez-Perez等2017)。Li等(2018)测定发现烟草花叶病毒感染后烟草中m⁶A整体水平降低, 并推断这可能与m⁶A甲基转移酶上调或去甲基化酶下调有关。在最近一项研究中, 研究人员发现水稻在应对病毒感染过程中m⁶A整体水平升高, 而病毒防御途径中多个基因的转录水平与m⁶A修饰密切相关(Zhang等2021a)。此外, 通过m⁶A甲基组分析, Zhang等(2021b)发现在抵抗小麦黄花叶病毒(WYMV)感染的过程中, 抗WYMV品种与敏感型品种存在m⁶A修饰差异, 推测m⁶A修饰可能与小麦对WYMV的抗性应答有关。这些研究表明, m⁶A修饰在植物抵御生物和非生物胁迫中均发挥调控作用。

7 展望

m⁶A修饰在植物学中的研究虽然取得了一些进展, 鉴定到多个m⁶A甲基转移酶、去甲基化酶和甲基识别酶, 并揭示m⁶A修饰参与调控植物发育过程和逆境应答。但是, 相较于动物领域的研究而言, 仍有大量未知的科学问题亟待探究。例如, 除了已经报道的m⁶A甲基转移酶、去甲基化酶和甲基识别酶, 植物中是否还存在其他成员? 它们是否调控植物发育和抗逆反应或其他生物学过程? m⁶A修饰与组蛋白修饰、DNA甲基化等其他表观遗传修饰之间存在怎样的关系? m⁶A修饰是否受光照、温度等环境条件和其他因素影响? 对这些问题的阐释, 将为全面揭示m⁶A修饰在植物生物学过程中的功能和作用机制提供依据。基于m⁶A研究的不断深入, 研究人员提出可结合纳米孔测序与基因编辑技术对m⁶A修饰进行选择性地编辑, 从而实现作物改良(Zheng等2020)。如果这一构想能够实现, 势必极大地推动m⁶A修饰研究的发展, 同时也为作物遗传改良提供新的思路。

参考文献(References)

- Alarcón CR, Goodarzi H, Lee H, et al (2015). HNRNPA2B1 is a mediator of m⁶A-dependent nuclear RNA processing events. *Cell*, 162: 1299–1308
- Anderson SJ, Kramer MC, Gosai SJ, et al (2018). N⁶-methyladenosine inhibits local ribonucleolytic cleavage to stabilize mRNAs in *Arabidopsis*. *Cell Rep*, 25: 1146–1157

- Arribas-Hernández L, Brodersen P (2020). Occurrence and functions of m⁶A and other covalent modifications in plant mRNA. *Plant Physiol*, 182: 79–96
- Arribas-Hernández L, Bressendorff S, Hansen MH, et al (2018). An m⁶A-YTH module controls developmental timing and morphogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 30: 952–967
- Arribas-Hernández L, Simonini S, Hansen MH, et al (2020). Recurrent requirement for the m⁶A-ECT2/ECT3/ECT4 axis in the control of cell proliferation during plant organogenesis. *Development*, 147: dev189134
- Ayub M, Bayley H (2012). Individual RNA base recognition in immobilized oligonucleotides using a protein nanopore. *Nano Lett*, 12: 5637–5643
- Batista PJ, Molinie B, Wang JK, et al (2014). m⁶A RNA modification controls cell fate transition in mammalian embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*, 15: 707–719
- Bertero A, Brown S, madrigal P, et al (2018). The SMAD2/3 interactome reveals that TGFβ controls m⁶A mRNA methylation in pluripotency. *Nature*, 555: 256–259
- Bhat SS, Bielewicz D, Gulanicz T, et al (2020). mRNA adenosine methylase (MTA) deposits m⁶A on pri-miRNAs to modulate miRNA biogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 117: 21785–21795
- Bodi Z, Button JD, Grierson D, et al (2010). Yeast targets for mRNA methylation. *Nucleic Acids Res*, 38: 5327–5335
- Bodi Z, Zhong S, Mehra S, et al (2012). Adenosine methylation in *Arabidopsis* mRNA is associated with the 3' end and reduced levels cause developmental defects. *Front Plant Sci*, 3: 48
- Bokar JA, Shambaugh ME, Polayes D, et al (1997). Purification and cDNA cloning of the AdoMet-binding subunit of the human mRNA (N⁶-adenosine)-methyltransferase. *RNA*, 3: 1233–1247
- Canaani D, Kahana C, Lavi S, et al (1979). Identification and mapping of N⁶-methyladenosine containing sequences in simian virus 40 RNA. *Nucleic Acids Res*, 6: 2879–2899
- Chen K, Luo GZ, He C (2015). High-resolution mapping of N⁶-methyladenosine in transcriptome and genome using a photo-crosslinking-assisted strategy. *Methods Enzymol*, 560: 161–185
- Cheong YH, Kim KN, Pandey GK, et al (2003). CBL1, a calcium sensor that differentially regulates salt, drought, and cold responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 15: 1833–1845
- Courtney DG, Kennedy EM, Dumm RE, et al (2017). Epitranscriptomic enhancement of influenza A virus gene expression and replication. *Cell Host Microbe*, 22: 377–386.e5
- Dali H, Jun L, Chen C, et al (2019). Anti-tumour immunity controlled through mRNA m⁶A methylation and YTHDF1 in dendritic cells. *Nature*, 566: 270–274
- Deng X, Chen K, Luo GZ, et al (2015). Widespread occurrence of N⁶-methyladenosine in bacterial mRNA. *Nucleic Acids Res*, 43: 6557–6567
- Desrosiers R, Friderici K, Rottman F (1974). Identification of methylated nucleosides in messenger RNA from Novikoff hepatoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 71: 3971–3975
- Dominissini D, Moshitch-Moshkovitz S, Schwartz S, et al (2012). Topology of the human and mouse m⁶A RNA methylomes revealed by m⁶A-seq. *Nature*, 485: 201–206
- Du H, Zhao Y, He J, et al (2016). YTHDF2 destabilizes m⁶A-containing RNA through direct recruitment of the CCR4-NOT deadenylase complex. *Nat Commun*, 7: 12626
- Duan HC, Wei LH, Zhang Y, et al (2017). ALKBH10B is an RNA N⁶-methyladenosine demethylase affecting *Arabidopsis* floral transition. *Plant Cell*, 29: 2995–3011
- Edupaganti RR, Geiger S, Lindeboom RG, et al (2017). N⁶-methyladenosine (m⁶A) recruits and repels proteins to regulate mRNA homeostasis. *Nat Struct Mol Biol*, 24: 870–878
- Fedeles BI, Singh V, Delaney JC, et al (2015). The AlkB family of Fe(II)/α-ketoglutarate-dependent dioxygenases: repairing nucleic acid alkylation damage and beyond. *J Biol Chem*, 290: 20734–20742
- Garalde DR, Snell EA, Jachimowicz D, et al (2018). Highly parallel direct RNA sequencing on an array of nanopores. *Nat Methods*, 15: 201–206
- Garcia-campos MA, Edelheit S, Toth U, et al (2019). Deciphering the “m⁶A Code” via antibody-independent quantitative profiling. *Cell*, 178: 731–747
- Haugland RF, Cline MG, Cline MG (1980). Post-transcriptional modifications of oat coleoptile ribonucleic acids: 5'-Terminal capping and methylation of internal nucleosides in poly(A)-rich RNA. *Eur J Biochem*, 104: 271–277
- He C (2010). Grand challenge commentary: RNA epigenetics? *Nat Chem Biol*, 6 (12): 863–865
- Hou Y, Sun J, Wu B, et al (2021). CPSF30-L-mediated recognition of mRNA m⁶A modification controls alternative polyadenylation of nitrate signaling-related gene transcripts in *Arabidopsis*. *Mol Plant*, 14: 688–699
- Hu J, Cai J, Park SJ, et al (2021). N⁶-methyladenosine mRNA methylation is important for salt stress tolerance in *Arabidopsis*. *Plant J*, 106: 1759–1775
- Hu J, Manduzio S, Kang H (2019). Epitranscriptomic RNA methylation in plant development and abiotic stress responses. *Front Plant Sci*, 10: 500
- Huang H, Weng H, Sun W, et al (2018). Recognition of RNA N⁶-methyladenosine by IGF2BP proteins enhances mRNA stability and translation. *Nat Cell Biol*, 20: 285–295

- Jia G, Fu Y, Zhao X, et al (2011). N⁶-methyladenosine in nuclear RNA is a major substrate of the obesity-associated FTO. *Nat Chem Biol*, 7: 885–887
- Kane SE, Beemon K (1985). Precise localization of m⁶A in Rous sarcoma virus RNA reveals clustering of methylation sites: implications for RNA processing. *Mol Cell Biol*, 5: 2298–2306
- Ke S, Alemu EA, Mertens C, et al (2015). A majority of m⁶A residues are in the last exons, allowing the potential for 3' UTR regulation. *Genes Dev*, 29: 2037–2053
- Keith G (1995). Mobilities of modified ribonucleotides on two-dimensional cellulose thin-layer chromatography. *Biochimie*, 77: 142–144
- Kennedy TD, Lane BG (1979). Wheat embryo ribonucleates. XIII. Methyl-substituted nucleoside constituents and 5'-terminal dinucleotide sequences in bulk poly(AR)-rich RNA from imbibing wheat embryos. *Can J Biochem*, 57: 927–931
- Kierzek E, Kierzek R (2003). The thermodynamic stability of RNA duplexes and hairpins containing N⁶-alkyladenosines and 2-methylthio-N⁶-alkyladenosines. *Nucleic Acids Res*, 31: 4472–4480
- Kim J, Kim Y, Yeom M, et al (2008). FIONA1 is essential for regulating period length in the *Arabidopsis* circadian clock. *Plant Cell*, 20: 307–319
- Korlach J, Bjornson KP, Chaudhuri BP, et al (2010). Real-time DNA sequencing from single polymerase molecules. *Methods Enzymol*, 472: 431–455
- Levis R, Penman S (1978). 5'-Terminal structures of poly(A)⁺ cytoplasmic messenger RNA and of poly(A)⁺ and poly(A)[−] heterogeneous nuclear RNA of cells of the dipteran *Drosophila melanogaster*. *J Mol Biol*, 120: 487–515
- Li A, Chen YS, Ping XL, et al (2017b). Cytoplasmic m⁶A reader YTHDF3 promotes mRNA translation. *Cell Res*, 27: 444–447
- Li D, Zhang H, Hong Y, et al (2014a). 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*, 32: 1169–1186
- Li Y, Wang X, Li C, et al (2014b). Transcriptome-wide N⁶-methyladenosine profiling of rice callus and leaf reveals the presence of tissue-specific competitors involved in selective mRNA modification. *RNA Biol*, 11: 1180–1188
- Li Z, Shi J, Zhao X, et al (2018). N⁶-methyl-adenosine level in *Nicotiana tabacum* is associated with tobacco mosaic virus. *Virol J*, 15: 87
- Li Z, Weng H, Su R, et al (2017a). FTO plays an oncogenic role in acute myeloid leukemia as a N⁶-methyladenosine rna demethylase. *Cancer Cell*, 31: 127–141
- Liang Z, Riaz A, Chachar S, et al (2020). Epigenetic modifications of mRNA and DNA in plants. *Mol Plant*, 13: 14–30
- Lin S, Choe J, Du P, et al (2016). The m⁶A methyltransferase METTL3 promotes translation in human cancer cells. *Mol Cell*, 62: 335–345
- Linder B, Grozhik AV, Olarerin-George AO, et al (2015). Single-nucleotide-resolution mapping of m6A and m6Am throughout the transcriptome. *Nat Methods*, 12: 767–772
- Liu JZ, Yue Y, Han D, et al (2014). A METTL3-METTL14 complex mediates mammalian nuclear RNA N6-adenosine methylation. *Nat Chem Biol*, 10: 93–95
- Liu N, Parisien M, Dai Q, et al (2013). Probing N⁶-methyladenosine RNA modification status at single nucleotide resolution in mRNA and long noncoding RNA. *RNA*, 19: 1848–1856
- Liu N, Yue Y, Han D, et al (2015). N⁶-methyladenosine-dependent RNA structural switches regulate RNA-protein interactions. *Nature*, 518: 560–564
- Lockhart J (2018). A tale of three studies: uncovering the crucial roles of m⁶A readers. *Plant Cell*, 30: 947
- Luo GZ, MacQueen A, Zheng G, et al (2014). Unique features of the m⁶A methylome in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Commun*, 5: 5630
- Luo JH, Wang Y, Wang M, et al (2020). Natural variation in RNA m⁶A methylation and its relationship with translational status. *Plant Physiol*, 182: 332–344
- Luo S, Tong L (2014). Molecular basis for the recognition of methylated adenines in RNA by the eukaryotic YTH domain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 111: 13834–13839
- Martinez-Perez M, Aparicio F, Lopez-Gresa MP, et al (2017). *Arabidopsis* m⁶A demethylase activity modulates viral infection of a plant virus and the m⁶A abundance in its genomic RNAs. *Proc Natl Acad Sci USA*, 114: 10755–10760
- Mauer J, Luo X, Blanjoie A, et al (2017). Reversible methylation of m⁶A_m in the 5' cap controls mRNA stability. *Nature*, 541: 371–375
- Meyer KD (2019). DART-seq: an antibody-free method for global m⁶A detection. *Nat Methods*, 16: 1275–1280
- Meyer KD, Jaffrey SR (2017). Rethinking m⁶A readers, writers, and erasers. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 33: 319–342
- Meyer KD, Saletore Y, Zumbo P, et al (2012). Comprehensive analysis of mRNA methylation reveals enrichment in 3' UTRs and near stop codons. *Cell*, 149: 1635–1646
- Miao Z, Zhang T, Qi Y, et al (2020). Evolution of the RNA N⁶-methyladenosine methylome mediated by genomic duplication. *Plant Physiol*, 182: 345–360
- Mielecki D, Zugaj DL, Muszewska A, et al (2012). Novel

- AlkB dioxygenases—alternative models for in silico and in vivo studies. *PLOS One*, 7: e30588
- Mirouze M, Paszkowski J (2011). Epigenetic contribution to stress adaptation in plants. *Curr Opin Plant Biol*, 14: 267–274
- Morales-Ruiz T, Ortega-Galisteo AP, Ponferrada-Marin MI, et al (2006). DEMETER and REPRESSOR OF SILENCING 1 encode 5-methylcytosine DNA glycosylases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103: 6853–6858
- Motorin Y, Helm M (2011). RNA nucleotide methylation. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 2: 611–631
- Nagarajan A, Janostiak R, Wajapeyee N (2019). Dot blot analysis for measuring global N⁶-methyladenosine modification of RNA. *Methods Mol Biol*, 1870: 263–271
- Nichols JL, Welder L (1981). Nucleotides adjacent to N⁶-methyladenosine in maize Poly(A)-containing RNA. *Plant Sci Lett*, 21: 75–81
- Ok SH, Jeong HJ, Bae JM, et al (2005). Novel CIPK1-associated proteins in *Arabidopsis* contain an evolutionarily conserved C-terminal region that mediates nuclear localization. *Plant Physiol*, 139: 138–150
- Parker MT, Knop K, Sherwood AV, et al (2020). Nanopore direct RNA sequencing maps the complexity of *Arabidopsis* mRNA processing and m⁶A modification. *eLife*, 9: e49658
- Patil DP, Chen CK, Pickering BF, et al (2016). m⁶A RNA methylation promotes *XIST*-mediated transcriptional repression. *Nature*, 537: 369–373
- Pendleton KE, Chen B, Liu K, et al (2017). The U6 snRNA m⁶A methyltransferase METTL16 regulates SAM synthetase intron retention. *Cell*, 169: 824–835.e14
- Ping XL, Sun BF, Wang L, et al (2014). Mammalian WTAP is a regulatory subunit of the RNA N⁶-methyladenosine methyltransferase. *Cell Res*, 24: 177–189
- Pontier D, Picart C, Baidouri ME, et al (2019). The m⁶A pathway protects the transcriptome integrity by restricting RNA chimera formation in plants. *Life Sci Alliance*, 2: e201900393
- Pratanwanich PN, Yao F, Chen Y, et al (2021). Identification of differential RNA modifications from nanopore direct RNA sequencing with xPore. *Nat Biotechnol*, doi: 10.1038/s41587-021-00949-w
- Roundtree IA, Luo GZ, Zhang Z, et al (2017). YTHDC1 mediates nuclear export of N⁶-methyladenosine methylated mRNAs. *eLife*, 6: e31311
- Růžicka K ZM, Campilho A, Bodi Z, et al (2017). Identification of factors required for m⁶A mRNA methylation in *Arabidopsis* reveals a role for the conserved E3 ubiquitin ligase HAKAI. *New Phytol*, 215: 157–172
- Sanchez-Pulido L, Andrade-Navarro MA (2007). The FTO (Fat mass and obesity associated) gene codes for a novel member of the non-heme dioxygenase superfamily. *BMC Biochem*, 8: 23
- Schibler U, Kelley DE, Perry RP (1977). Comparison of methylated sequences in messenger RNA and heterogeneous nuclear RNA from mouse L cells. *J Mol Biol*, 115: 695–714
- Schomburg FM, Patton DA, Meinke DW, et al (2001). FPA, a gene involved in floral induction in *Arabidopsis*, encodes a protein containing RNA-recognition motifs. *Plant Cell*, 13: 1427–1436
- Scutenaire J, Deragon JM, Jean V, et al (2018). The YTH domain protein ECT2 is an m⁶A reader required for normal trichome branching in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 30: 986–1005
- Shao Y, Wong CE, Shen L, et al (2021). N⁶-methyladenosine modification underlines messenger RNA metabolism and plant development. *Curr Opin plant Biol*, 63: 102047
- Shen LS, Liang Z, Yu H et al (2016). N⁶-methyladenosine RNA modification regulates shoot stem cell fate in *Arabidopsis*. *Dev Cell*, 38: 186–200
- Shi H, Wang X, Lu Z, et al (2017). YTHDF3 facilitates translation and decay of N⁶-methyladenosine-modified RNA. *Cell Res*, 27: 315–328
- Shi H, Wei J, He C (2019). Where, when, and how: context-dependent functions of RNA methylation writers, readers, and erasers. *Mol Cell*, 74: 640–650
- Shu X, Cao J, Cheng M, et al (2020). A metabolic labeling method detects m⁶A transcriptome-wide at single base resolution. *Nat Chem Biol*, 16: 887–895
- Song P, Yang J, Wang C, et al (2021). *Arabidopsis* N⁶-methyladenosine reader CPSF30-L recognizes FUE signals to control polyadenylation site choice in liquid-like nuclear bodies. *Mol Plant*, 14: 571–587
- Tang C, Klukovich R, Peng H, et al (2018). ALKBH5-dependent m⁶A demethylation controls splicing and stability of long 3'-UTR mRNAs in male germ cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 115: E325–E333
- Uy R, Wold F (1977). Posttranslational covalent modification of proteins. *Science*, 198: 890–896
- Vespa L, Vachon G, Berger F, et al (2004). The immunophilin-interacting protein AtFIP37 from *Arabidopsis* is essential for plant development and is involved in trichome endoreduplication. *Plant Physiol*, 134: 1283–1292
- Vilfan ID, Tsai YC, Clark TA, et al (2013). Analysis of RNA base modification and structural rearrangement by single-molecule real-time detection of reverse transcription. *J Nanobiotechnol*, 11: 8
- Wan Y, Tang K, Zhang D, et al (2015). Transcriptome-wide high-throughput deep m⁶A-seq reveals unique differential

- m⁶A methylation patterns between three organs in *Arabidopsis thaliana*. *Genome Biol*, 16: 272
- Wang P, Duxtader KA, Nam Y (2016b). Structural basis for cooperative function of METTL3 and METTL14 methyltransferases. *Mol Cell*, 63: 306–317
- Wang X, Feng J, Xue Y, et al (2016a). Structural basis of N⁶-adenosine methylation by the METTL3-METTL14 complex. *Nature*, 534: 575–578
- Wang X, Lu Z, Gomez A, et al (2014). N⁶-methyladenosine-dependent regulation of messenger RNA stability. *Nature*, 505: 117–120
- Wang X, Zhao BS, Roundtree IA, et al (2015). N⁶-methyladenosine modulates messenger RNA translation efficiency. *Cell*, 161: 1388–1399
- Wang Y, Xiao Y, Dong S, et al (2020). Antibody-free enzyme-assisted chemical approach for detection of N⁶-methyladenosine. *Nat Chem Biol*, 16: 896–903
- Wei CM, Gershowitz A, Moss B (1976). 5'-Terminal and internal methylated nucleotide sequences in HeLa cell mRNA. *Biochemistry*, 15: 397–401
- Wei LH, Song P, Wang Y, et al (2018). The m⁶A reader ECT2 controls trichome morphology by affecting mRNA stability in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 30: 968–985
- Wei W, Ji X, Guo X, et al (2017). Regulatory role of N⁶-methyladenosine (m⁶A) methylation in RNA processing and human diseases. *J Cell Biochem*, 118: 2534–2543
- Wen J, Lv R, Ma H, et al (2018). Zc3h13 regulates nuclear RNA m⁶A methylation and mouse embryonic stem cell self-renewal. *Mol Cell*, 69: 1028–1038
- Wu B, Su S, Patil DP, et al (2018). Molecular basis for the specific and multivalent recognitions of RNA substrates by human hnRNP A2/B1. *Nature Commun*, 9: 420
- Wu J, Peled-Zehavi H, Galili G (2020). The m⁶A reader ECT2 post-transcriptionally regulates proteasome activity in *Arabidopsis*. *New Phytol*, 228: 151–162
- Xiao W, Adhikari S, Dahal U, et al (2016). Nuclear m⁶A Reader YTHDC1 regulates mRNA splicing. *Mol Cell*, 61: 507–519
- Xiao Y, Wang Y, Tang Q, et al (2018). An elongation- and ligation-based qPCR amplification method for the radiolabeling-free detection of locus-specific N⁶-methyladenosine modification. *Angew Chem Int Ed Engl*, 57: 15995–16000
- Xu K, Yang Y, Feng GH, et al (2017). METTL3-mediated m⁶A regulates spermatogonial differentiation and meiosis initiation. *Cell Res*, 27: 1100–1114
- Xu T, Wu X, Wong CE, et al (2022). FIONA1-mediated m⁶A modification regulates the floral transition in *Arabidopsis*. *Adv Sci*, 5: e2103628
- Yoon KJ, Ringeling FR, Vissers C, et al (2017). Temporal control of mammalian cortical neurogenesis by m⁶A methylation. *Cell*, 171: 877–889.e17
- Yu Q, Liu S, Yu L, et al (2021). RNA demethylation increases the yield and biomass of rice and potato plants in field trials. *Nat Biotechnol*, doi: 10.1038/s41587-021-00982-9
- Yu J, Chen M, Huang H, et al (2018). Dynamic m⁶A modification regulates local translation of mRNA in axons. *Nucleic Acids Res*, 46: 1412–1423
- Yue H, Nie X, Yan Z, et al (2019). N6-methyladenosine regulatory machinery in plants: composition, function and evolution. *Plant Biotechnol J*, 17 (7): 1194–1208
- Yue Y, Liu J, Cui X, et al (2018). VIRMA mediates preferential m⁶A mRNA methylation in 3' UTR and near stop codon and associates with alternative polyadenylation. *Cell Discov*, 4: 10
- Yue Y, Liu J, He C (2015). RNA N⁶-methyladenosine methylation in post-transcriptional gene expression regulation. *Genes Dev*, 29: 1343–1355
- Zhang C, Samanta D, Lu H, et al (2016). Hypoxia induces the breast cancer stem cell phenotype by HIF-dependent and ALKBH5-mediated m⁶A-demethylation of NANOG mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 113: E2047–E2056
- Zhang F, Zhang YC, Liao JY, et al (2019a). The subunit of RNA N6-methyladenosine methyltransferase OsFIP regulates early degeneration of microspores in rice. *PLOS Genet*, 15: e1008120
- Zhang K, Zhuang X, Dong Z, et al (2021a). The dynamics of N⁶-methyladenine RNA modification in interactions between rice and plant viruses. *Genome Biol*, 22: 189
- Zhang S, Zhao BS, Zhou A, et al (2017). m⁶A demethylase ALKBH5 maintains tumorigenicity of glioblastoma stem-like cells by sustaining FOXM1 expression and cell proliferation program. *Cancer Cell*, 31: 591–606.e6
- Zhang TY, Wang ZQ, Hu HC, et al (2021b). Transcriptome-wide N⁶-methyladenosine (m⁶A) profiling of susceptible and resistant wheat varieties reveals the involvement of variety-specific m⁶A modification involved in virus-host interaction pathways. *Front Microbiol*, 12: 656302
- Zhang Z, Chen LQ, Zhao YL, et al (2019b). Single-base mapping of m⁶A by an antibody-independent method. *Sci Adv*, 5: eaax0250
- Zhao LY, Song J, Liu Y, et al (2020). Mapping the epigenetic modifications of DNA and RNA. *Protein Cell*, 11: 792–808
- Zheng G, Dahl JA, Niu Y, et al (2013). ALKBH5 is a mammalian RNA demethylase that impacts RNA metabolism and mouse fertility. *Mol Cell*, 49: 18–29
- Zheng H, Sun X, Li J, et al (2021). Analysis of N⁶-methyladenosine reveals a new important mechanism regulating the

-
- salt tolerance of sweet sorghum. *Plant Sci*, 304: 110801
- Zheng HX, Sun X, Zhang XS, et al (2020). m⁶A editing: new tool to improve crop quality? *Trends Plant Sci*, 25: 859–867
- Zhong S, Li H, Bodi Z, et al (2008). MTA is an *Arabidopsis* messenger RNA adenosine methylase and interacts with a homolog of a sex-specific splicing factor. *Plant Cell*, 20: 1278–1288
- Zhou L, Tang R, Li X, et al (2021). N⁶-methyladenosine RNA modification regulates strawberry fruit ripening in an ABA-dependent manner. *Genome Biol*, 22: 168
- Zhou L, Tian S, Qin G (2019). RNA methylomes reveal the m⁶A-mediated regulation of DNA demethylase gene SID-ML2 in tomato fruit ripening. *Genome Biol*, 20: 156