

DOI:10.12113/202108010

网络首发地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/23.1513.Q.20220321.1931.006.html>

m⁶A 修饰在植物生长发育和抗逆境胁迫中的功能

李鑫, 杨佳欣, 张慧, 何崇圣, 赵小英*

(湖南大学 生物学院 植物功能基因组学与发育调控湖南省重点实验室 湖南省杂交油菜工程技术研究中心, 长沙 410082)

摘要: 真核生物 mRNA 存在多种甲基化修饰, 其中 N⁶-腺苷酸甲基化 (N⁶-methyladenosine, m⁶A) 修饰是最为常见的一种动态内部修饰。m⁶A 是指 RNA 腺嘌呤的第 6 位氮原子上发生甲基化修饰, 它能够动态的被甲基转移酶添加, 被去甲基化酶去除, 以及被甲基化阅读蛋白识别。近年来, 植物 m⁶A 修饰相关的酶被陆续鉴定, 研究发现 m⁶A 修饰调控植物胚胎发育、茎尖分生组织分化、开花等生长发育过程, 在植物抗逆境胁迫响应中也具有重要调控作用。本文就 m⁶A 修饰相关酶的组成及其在植物生长发育和植物抗逆境胁迫过程中的功能相关研究进展进行综述, 并对甘蓝型油菜中 m⁶A 修饰相关的酶进行了生物信息学分析。

关键词: m⁶A 甲基化; 甲基转移酶; 去甲基化酶; 甲基化阅读蛋白; 植物生长发育; 抗逆境胁迫

中图分类号: Q756 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-5565(2023)01-029-08

Function of N⁶-methyladenosine in plant growth and development and stress resistance

LI Xin, YANG Jiaxin, ZHANG Hui, HE Chongsheng, ZHAO Xiaoying*

(Hunan Province Key Laboratory of Plant Functional Genomics and Developmental Regulation, Hunan Engineering and Technology Research Center of Hybrid Rapeseed, College of Biology, Hunan University, Changsha 410082, China,)

Abstract: There are multiple methylation modifications in eukaryotic mRNA, among which the N⁶-adenotide methylation (N⁶-methyladenosine, m⁶A) modification is one of the most common dynamical internal modifications. m⁶A is the methylation modification that occurs on the sixth nitrogen atom of RNA adenine, which is able to be dynamically added by methyltransferases, removed by demethylases, and recognized by reading proteins. Recently, m⁶A methylase components in plant have been identified and found to play important roles in plant embryo development, shoot apical meristem proliferation, flowering, as well as stress resistance. This paper reviews the plant m⁶A methylase compositions and research progress of function of m⁶A in plant growth and development and stress resistance, and provides a bioinformatics analysis of m⁶A enzymes in *Brassica napus*.

Keywords: N⁶-methyladenosine; Methyltransferases; Demethylases; Reading proteins; Plant growth and development; Stress resistance

真核生物 RNA 中存在多种甲基化修饰。在过去, 大部分的修饰被发现存于高丰度的非编码 RNA 中。随着生物技术水平的提高, 测序手段的改进, 相对低丰度的信使 RNA (Message RNA, mRNA) 上的甲基化修饰也被陆续发现。m⁶A 修饰是最为常见的一种动态甲基化修饰, 在真核细胞中, 其含量占 mRNA 甲基化相关修饰含量的 80%^[1]。m⁶A 修饰是指通过甲基化相关酶的作用, 在 RNA 腺嘌呤的第

6 位氮原子上发生甲基化修饰, 进而调控 RNA 代谢, 包括 mRNA 前体的剪接、mRNA 的核输出、3' 非翻译区域序列 (3'untranslated region, 3'UTR) 加工、mRNA 翻译、mRNA 的稳定性等过程^[2-4]。在模式植物拟南芥中, 70% 以上的 mRNA 存在 m⁶A 修饰, 主要分布在 mRNA 终止密码子附近和 3'UTR 序列区域^[5]。近年来, 科学家们陆续对植物 m⁶A 修饰相关的酶进行了鉴定, 并对 m⁶A 修饰在植物生长发育

收稿日期: 2021-08-17; 修回日期: 2021-12-27; 网络首发日期: 2022-03-22.

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No. U20A2029); 长沙市科技计划项目 (kq1901028).

作者简介: 李鑫, 男, 硕士研究生. 研究方向: 油菜功能基因组学. E-mail: 2231799025@qq.com.

* 通信作者: 赵小英, 女, 教授, 博士生导师. 研究方向: 植物光形态建成; 油菜功能基因组学与应用. E-mail: xiaoyzhao@hnu.edu.cn.

和植物抗逆境胁迫中的功能进行了研究^[2,4]。本文就 m⁶A 修饰相关酶的组成及其在植物生长发育和抗生物胁迫和非生物胁迫过程中的功能相关研究进展进行综述,同时对甘蓝型油菜 m⁶A 修饰相关的酶进行生物信息学分析。

1 m⁶A 修饰相关酶的组成

m⁶A 修饰相关的酶分为“writer”,“eraser”和“reader”三类。“writer”即 m⁶A 甲基转移酶,它以一个复合体的形式识别靶 mRNA 并进行甲基化。在动物体中该复合体由 METTL3、METTL14、WTAP、KIAA1429 和 VIRILIZER 等组分构成^[6-11]。在模式植物拟南芥中 m⁶A 甲基转移酶包括 MTA (METTL3 人类同源蛋白)、MTB (METTL14 人类同源蛋白)、FIP37 (WTAP 人类同源蛋白)、VIRILIZER (KIAA1429 人类同源蛋白) 和 E3 泛素连接酶 HAKAI 等组分^[12-14](见图 1)。“eraser”即 m⁶A 去甲基化酶。去甲基化酶 FTO 和 ALKBH5 都属于 ALKBH 家族,二者在动物体中先后被发现^[15-17]。在模式植物拟南芥中与 ALKBH5 同源的去甲基化酶 ALKBH9B 和 ALKBH10B 已被证明能够去除 m⁶A 甲基化修饰^[18-19](见图 1)。“reader”即 m⁶A 甲基化阅读蛋白,带有能够特异识别并绑定底物 RNA 的 RNA 绑定结构域。目前发现的阅读蛋白大部分都带有保守的 YTH 结构域,例如 YTHDF1、YTHDF2 和 YTFDC1 等^[10,20-21]。在拟南芥和水稻中分别鉴定到了 13 个和 12 个 YTH 结构域蛋白编码基因^[22],其中拟南芥 ETC2、ETC3、ETC4 和 CPSF30-L 已被证明具有识别 m⁶A 甲基化修饰的功能^[23-27](见图 1)。最近,科学家通过 BLASTP 和 HMMER 搜索,从 22 种代表性植物中鉴定到了 159 个 m⁶A 甲基转移酶组分,293 个 ALKB 去甲基化酶同源蛋白家族成员,278 个 m⁶A 阅读蛋白家族成员^[2]。

2 m⁶A 修饰在植物生长发育中的功能

2.1 m⁶A 修饰调控植物胚胎和小孢子发育

胚胎发生是高等植物发育过程中的一个重要环节。m⁶A 修饰调控植物胚胎发育。拟南芥 m⁶A 甲基转移酶复合体组分 FIP37 敲除突变导致 m⁶A 修饰整体水平降低,胚乳和胚胎发育延迟, *fip37-4* 突变体表现出胚胎致死的表型^[12, 28]。甲基转移酶复合体组分 MTA 突变也导致胚胎致死,使胚胎发育停滞在球形期^[13, 29]。MTA 在顶端分生组织、胚珠、花药和种子等组织器官中高效表达, *mta* 突变体种子的

mRNA m⁶A 修饰整体水平降低^[13]。MTA 被证明在体外和体内都能够与 FIP37 互作^[13],说明 FIP37 和 MTA 共同调控拟南芥的胚胎发育。拟南芥甲基转移酶复合体组分的另一成员 VIR 突变也导致胚胎表现出致死表型^[14, 30]。最近的研究报道表明,水稻 m⁶A 甲基转移酶复合体的组分 OsFIP 和 OsMTA2 对孢子早期发生至关重要^[31]。OsFIP 能够介导一组苏氨酸蛋白酶和 NTPase mRNA 的 m⁶A 甲基化,并且在它们的表达和/或剪接过程中发挥重要作用。OsFIP 敲除导致小孢子早期退化,前期 I 的减数分裂异常,进而影响育性^[31]。以上这些研究表明, m⁶A 修饰对胚胎和小孢子发育是必需的。

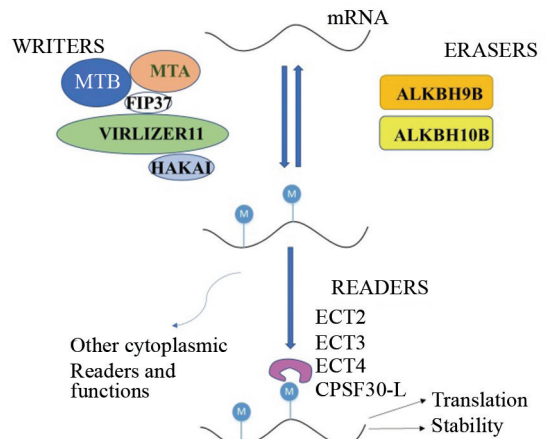


图 1 拟南芥 mRNA m⁶A 甲基化修饰模式图

Fig.1 m⁶A methylation modification pattern of mRNA in Arabidopsis

2.2 m⁶A 修饰调控植物茎尖分生组织的分化及叶片的发生

m⁶A 修饰对顶端分生组织的分化具有重要调控作用。FIP37 在茎尖、幼叶、花器官和种子等增殖活跃的组织器官以及茎尖分生组织中高效表达^[12]。 *fip37-4* 突变体茎尖分生组织关键调控基因 *WUSCHEL* (*WUS*) 和 *SHOOTMERISTEMLESS* (*STM*) mRNA 的 m⁶A 甲基化修饰水平降低, mRNA 的丰度升高,因而幼苗茎尖分生组织过度增殖,叶片生成延迟。FIP37 能够与 *STM* 和 *WUS* 的转录本直接结合,使它们的终止密码子和 3'UTR 区域序列发生 m⁶A 甲基化,从而加速转录本的降解; FIP37 突变则导致 *STM* 和 *WUS* mRNA 的稳定性增强^[12]。这说明 FIP37 可通过添加 m⁶A 修饰调控 *WUS* 和 *STM* 的 mRNA 稳定性,进而抑制顶端分生组织过度增殖。MTA 也介导 *STM* 和 *WUS* mRNA 的 m⁶A 甲基化修饰,调控茎尖分生组织的增殖和发育^[12]。这表明 m⁶A 甲基转移酶介导的 m⁶A 修饰对拟南芥茎尖分生组织的正常分化也是必需的。Li 等分析水稻愈伤

组织和叶片的 RNA 甲基化组,在愈伤组织和叶片中分别确定了1 792 个和6 508 个组织特异性的含 m^6A 的基因^[32]。

此外, m^6A 甲基化阅读蛋白 ECT2、ECT3 和 ECT4 被证明控制根、茎、叶及花组织的发生时间和叶片的形态^[23, 33]。ECTs 在茎尖、根尖以及叶片等组织器官原基中有特别高的表达,*ect2-1 ect3-1* 和 *ect2-3 ect3-2* 突变体产生第一片真叶的时间推迟^[23],根茎的生长以及花器官的形成也延迟^[33]。*ect2/3/4* 突变体叶片和维管原基细胞分裂速率降低^[33]。因此, m^6A 修饰对细胞分化、植物器官形成具有重要促进作用。

2.3 m^6A 修饰调控毛状体分支

m^6A 修饰参与调控毛状体发育^[23-24]。 m^6A 甲基化阅读蛋白 ECT2 和 ECT3 在幼嫩的毛状体中高表达,ECT2 或者 ECT3 突变导致毛状体分支数量显著增加,*ect2 ect3* 双突变体毛状体的多分支表型更加明显,ECT4 在此过程中则无明显调控作用^[23]。拟南芥 ECT2 蛋白能够通过其 YTH 结构域与带有 m^6A 修饰的 mRNA 结合^[25]。ECT2 结合靶 mRNA 的位点主要集中在 3'UTR,调控 mRNA 3' 端加工和 mRNA 在细胞质中的稳定性^[24]。ECT2 缺失导致毛状体形态相关基因 *TTG1* (*TRANSPARENTTESTA GLABRA1*)、*ITB1* (*IRREGULAR TRICHOMEBRANCH1*) 和 *DIS2* (*DISTORTED TRICHOME 2*) 的转录本降解加速,丰度降低,从而使毛状体分支数量增加^[24]。这表明 ECT2 通过识别 m^6A 甲基化修饰,调节毛状体形态相关基因 mRNA 的稳定性,从而调控毛状体的形态结构。

MTA 表达量下调或者 *FIP37* 过量表达也导致毛状体形态结构异常,致使毛状体分支数量增加到 4-6 个^[28-29]。毛状体分支数与 DNA 倍性水平直接相关^[28]。*ect2* 突变体毛状体细胞中的 DNA 含量增加^[25]。因此, m^6A 修饰还可通过控制毛状体细胞内 DNA 含量和倍性水平来影响毛状体分支。

2.4 m^6A 修饰调控植物开花

m^6A 修饰参与调控植物开花。 m^6A 去甲基化酶 ALKBH10B 突变导致拟南芥 mRNA 的 m^6A 整体水平增加,开花推迟;相反,*ALKBH10B* 过量表达植物中 mRNA 的 m^6A 整体水平则下降,植物开花提早^[18]。*alkbh10b-1* 突变体中开花关键基因 *FT* (*FLOWERING LOCUS T*), *SPL3* (*SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE 3*) 和 *SPL9* mRNA 的 m^6A 修饰增加,稳定性下降,丰度降低,因而突变体开花时间推迟。 m^6A 甲基化阅读蛋白 ECT2、ECT3 和 ECT4 也调控植物的开花时间^[33]。

ect2 ect3 双突变体,*ect2 ect3 ect4* 三突变体的开花时间推迟,但其调控机制尚不明确。

最近,CPSF30-L (Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor 30)被证明属于拟南芥 m^6A 甲基化阅读蛋白^[26-27] (见图 1)。CPSF30-L 由 CPSF30-S 和 m^6A 结合结构域 YTH 组成,主要通过 YTH 结构域识别 mRNA 上 poly(A) 位点信号序列 FUE 元件中的 m^6A 修饰,招募聚腺苷酸化复合物,从而控制聚腺苷酸化位点的选择和 3' 端加工。*CPSF30-L* 突变导致开花关键基因 *SOC1* (*SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS1*),以及 ABA 信号相关基因 *RPN10* (*REGULATORY PARTICLE NON-ATPASE 10*) 和 *FYVE13* (*FYVE-domain protein required for endosomal sorting 1*) mRNA 的聚腺苷酸化位点选择发生变化,致使 3'UTR 延长,转录本降解加速,因而 *cpsf30-l* 突变体的开花时间延迟,突变体的种子萌发和幼苗生长对 ABA 超敏性^[27]。

此外, m^6A 修饰对维持植物昼夜节律具有重要作用^[34]。 m^6A 甲基转移酶 *vir-1* 突变体的昼夜节律周期延长,昼夜节律关键调节基因 *CCA1* (*CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED1*) 的表达量增加,但具体调控机制并不清楚。

2.5 m^6A 修饰调控维管发育

拟南芥 m^6A 甲基转移酶复合体组分 *MTA*、*MTB*、*FIP37*、*VIRILIZER* 和 E3 泛素连接酶 *HAKAI* 都参与调控维管形成^[14]。*Vir-1*、*fip37-4*、*mtaABI3*、*MTA*、*MTB RNAi* 和 *hakai-1* 突变体都表现出维管发育缺陷,与野生型相比,突变体主根原生木质部的维管出现中断或者加倍的频率增加。因此, m^6A 整体水平降低会影响维管的正常发育,但具体调控机制尚不清楚。

2.6 m^6A 修饰调控果实成熟

mRNA m^6A 甲基化状态调控典型呼吸跃变型番茄果实的成熟^[35]。 m^6A 是番茄果实 mRNA 的一个比较普遍的甲基化修饰,在终止密码子和 3'UTR 序列区域富集。番茄果实成熟缺陷突变体 *Colorless non-ripening* (*Cnr*) 果实中, m^6A 去甲基化酶 *SIALKBH2* 的表达水平降低,果实 mRNA 的 m^6A 整体水平升高。*SIALKBH2* 能够与番茄成熟所必需的 DNA 去甲基化酶 *SIDML2* 的转录本结合。*SIALKBH2* 突变导致 *SIDML2* mRNA 的 m^6A 水平增加,稳定性下降,丰度降低,因而果实成熟推迟。

典型的非呼吸跃变型草莓果实的成熟也受到 m^6A 甲基化修饰的调节^[36]。在草莓果实成熟初期,脱落酸 (ABA) 生物合成和信号通路相关的基因,包括 *NCED5* (9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase 5)、

ABAR (putative ABA receptor) 和 *AREB1* (ABA-responsive element-binding protein 1) 等的 mRNA 编码序列区域发生 m⁶A 超甲基化。m⁶A 甲基转移酶 MTA 和 MTB 在果实成熟初期被诱导表达。MTA RNAi 和 MTB RNAi 干扰突变体的果实成熟延迟, 相反 MTA 和 MTB 过量表达果实成熟提早。MTA 可直接与 *NCED5*、*ABAR* 和 *AREB1* 的转录本结合, MTA RNAi 突变体中 *NCED5* 和 *AREB1* 转录本的降解加速, *ABAR* 转录本的翻译效率降低。因此, MTA 可通过对靶基因 mRNA 编码序列区域进行 m⁶A 修饰, 增加 mRNA 的稳定性或者翻译效率, 来促进果实成熟。

3 m⁶A 修饰在植物抗逆境胁迫中的功能

3.1 m⁶A 修饰调控生物胁迫响应

m⁶A 修饰参与调控病毒感染防御过程。研究报道, ALKBH9B 与 siRNA 小体及 P-小体 (Cytoplasmic processing bodies, P-bodies) 共定位, 在胞质中聚集形成颗粒和细丝, 表明 ALKBH9B 可能作为 siRNA 小体和 P 小体的新成员介导 mRNA 沉默或衰变过程^[19]。ALKBH9B 能够与苜蓿花叶病毒 (AMV) 外壳蛋白在细胞质中相互作用。ALKBH9B 缺失可增加 AMV RNA 的 m⁶A 修饰丰度, 降低病毒 RNA 水平, 从而限制病毒 RNA 在植物各器官之间转移, 进而减弱其对植物的系统侵染能力。这表明植物可通过去甲基化酶调控病毒 m⁶A 修饰水平, 影响病毒的侵染能力。因此, m⁶A 修饰可能是植物控制 RNA 病毒在胞质中繁殖的策略之一。

烟草花叶病毒 (TMV) 感染烟草叶片后, 烟草叶片中 m⁶A/G 比值降低, m⁶A 甲基转移酶组分如 XM_009766347、XM_009766348 和 XM_009775897 的表达量降低, 与人 ALKBH5 同源的去甲基化酶 XM_009801708 的 mRNA 水平则升高^[37]。这种 m⁶A 修饰的变化是由于病毒促进感染引起, 还是由于宿主限制感染所致, 或者是与宿主-病毒的相互作用有关? 尚不明确。

3.2 m⁶A 修饰调控非生物胁迫响应

近来研究表明, 大量盐、干旱或冷胁迫响应基因的 mRNA 被高度甲基化^[12, 38-40]。Anderson 等^[38] 研究表明, m⁶A 修饰与盐胁迫响应紧密相关。与野生型相比, *mta* 突变体中 m⁶A 修饰差异丰富的转录本主要编码盐胁迫响应相关蛋白。盐胁迫条件下, 干旱、渗透和盐胁迫响应相关基因的转录本出现盐特异性的 m⁶A 修饰, mRNA 丰度升高。研究人员还发

现, 没有被 m⁶A 修饰的靶位点上游 4 或 5 碱基处通常被剪切, 从而导致转录本的稳定性降低。因此, 研究人员提出 MTA 介导的盐胁迫特异性 m⁶A 修饰, 可能抑制了修饰位点的剪切, 使盐胁迫响应相关基因的转录本更加稳定, 进而提高植物的抗盐胁迫能力。另有研究报道, m⁶A 甲基转移酶 MTA、MTB、VIR 和 FIP37 的表达均受盐诱导, 盐处理拟南芥幼苗 mRNA 的 m⁶A 整体水平升高^[41]。*vir-1*、*MTB* RNAi 和 *hakai* 突变体幼苗对盐胁迫敏感, 幼苗和根的生长受抑制, 幼苗的叶绿素含量、鲜重及存活率降低。*VIR* 突变导致盐胁迫响应负调节子 ATAF1、GI 和 GSTU17 转录本的选择性多聚腺苷酸化发生变化, 3' UTR 变长, mRNA 的稳定性增强, 丰度升高。因此, m⁶A 修饰可通过调节选择性多聚腺苷酸化和 3' UTR 的长度, 从而调控盐胁迫负调节子转录本的降解和植物的抗盐胁迫能力。此外, m⁶A 甲基化阅读蛋白 ECT2 在热应激下定位到细胞质应激颗粒 (Stress Granules, SGs) 中^[25]。干旱和渗透胁迫应激下, ECT2 和 ECT4 在细胞质中聚集, ECT3 则较少发生聚集现象^[23]。这种应激反应是否与植物的适应性相关, 尚不清楚。

最近, 科学家们对两种基因型甜高粱的耐盐性与 m⁶A 甲基化修饰之间的相关性进行了分析, 发现 m⁶A 甲基化修饰在耐盐品种 M-81E 与盐敏感品种 Roma 之间存在显著差异, 耐盐品种 M-81E 中 5' UTR 序列区域的 m⁶A 修饰高于 Roma^[39]。盐胁迫下, 两种基因型甜高粱的 m⁶A 修饰都发生变化, 尤其是盐敏感品种 Roma 耐盐基因转录本的 m⁶A 修饰增加, mRNA 的稳定性增强, 丰度增加。因此, m⁶A 修饰的数量和程度可能是确定和评估农作物抗胁迫能力的重要因素。此外, 干旱胁迫处理两个玉米近等基因系 (耐旱 Han21 和干旱敏感 B73) 的转录组分析结果表明, 干旱敏感近等基因系 B73 的 m⁶A 去甲基化酶 ZmALKBH10a/ZmALKBH10b 和 m⁶A 甲基化阅读蛋白 ZmECTa/ZmECTb 编码基因的表达受干旱诱导, 干旱胁迫下 m⁶A 修饰整体水平降低^[40]。因此, m⁶A 低度甲基化在干旱胁迫响应中可能起正调控作用。

4 甘蓝型油菜 m⁶A 修饰相关酶的鉴定分析

油菜是世界主要油料作物。油菜中 m⁶A 修饰相关酶及其功能尚未报道。采用 BLAST 方法 (<http://plants.ensembl.org/Multi/Tools/Blast>), 利用拟南芥 m⁶A 修饰相关酶的氨基酸序列在油菜数据库 (The

Brassicaceae Database (BRAD): <http://brassicadb.cn> 中进行比对,搜索甘蓝型油菜同源蛋白。通过序列比对,鉴定了甘蓝型油菜中 FIP37、MTA、MTB、

HAKAI、ALKBH9、ALKBH10和 ECT 蛋白家族(见表 1),并发现它们与拟南芥中的蛋白在进化上高度保守(见图 2)。

表 1 甘蓝型油菜和拟南芥中m⁶A甲基转移酶、去甲基化酶和甲基化阅读蛋白
Table 1 m⁶A writers, erasers, and readers in *Brassica napus* and *Arabidopsis thaliana*

物种	M ⁶ A 甲基转移酶	M ⁶ A 去甲基化酶	M ⁶ A 甲基化阅读蛋白
<i>Arabidopsis thaliana</i>	AtMTA		AtECT2
	AtMTB		AtECT3
	AtFIP37	AtALKBH9B AtALKBH10B	AtECT4
	AtVIR		AtCPSF30-L
	AtHAKAI		
<i>Brassica napus</i>	BnFIPa (BnaC08g25020D)		BnECT2a (BnaCnng01040D)
	BnFIPb (BnaA07g16320D)		BnECT2b (BnaA03g32830D)
	BnFIPc (BnaC06g15100D)	BnALKBH10B (BnaA09g01150D)	BnECT3 (BnaA05g25840D)
	BnFIPd (BnaA09g34090D)	BnALKBH9B1 (BnaA07g02380D)	BnECT4 (BnaC03g37950D)
	BnMTA1 (BnaCnng25310D)	BnALKBH9B2 (BnaC07g06970D)	BnECT4 (BnaC03g37950D)
	BnMTA2 (BnaA09g22350D)		BnECT4 (BnaC03g37950D)
	BnMTB1 (BnaA09g22720D)		BnECT4 (BnaC03g37950D)
	BnMTB2 (BnaC09g24750D)		BnECT4 (BnaC03g37950D)
	BnVIR (BnaA03g29130D)		BnECT4 (BnaC03g37950D)
	BnHAKAI (BnaCnng03840D)		BnECT4 (BnaC03g37950D)

在甘蓝型油菜中存在 10 个甲基转移酶组分,包括 4 个与 AtFIP37 同源的 BnFIPa (BnaC08g25020D)、BnFIPb (BnaC06g15100D)、BnFIPc (BnaA09g34090D) 和 BnFIPd (BnaA07g16320D) (氨基酸序列一致性分别为 90%, 89.6%, 88.8% 和 88.7%), 2 个与 AtMTA 同源的 BnMTA1 (BnaCnng25310D) 和 BnMTA2 (BnaA09g22350D) (氨基酸序列一致性分别为95.8%和95.5%), 2 个与 AtMTB 同源的 BnMTB1 (BnaA09g22720D) 和 BnMTB2 (BnaC09g24750D) (氨基酸序列一致性分别为97.1%和 96.8%), 1 个与 AtVIR 同源的 BnVIR (BnaA03g29130D) (氨基酸序列一致性为 100%), 1 个与 AtHAKAI 同源的 BnHAKAI (BnaCnng03840D) (氨基酸序列一致性为 91.5%) (见图 2)。在甘蓝型油菜中含有 3 个 m⁶A 去甲基化酶,包括 2 个与 AtALKBH9B 同源的 BnALKBH9B1 (BnaA07g02380D) 和 BnALKBH9B2 (BnaC07g06970D) (氨基酸序列一致性分别为 88.1% 和 88.2%), 1 个与 AtALKBH10B 同源的 BnALKBH10B (BnaA09g01150D) (氨基酸序列一致性为 92.1%) (见图 2)。在甘蓝型油菜中含有 4 个和 1 个分别与 AtECT2/3/4 和 AtCPSF30-L 同源的m⁶A 甲基化阅读蛋白(见图 2)。这为进一步研究m⁶A 修饰在油菜生长发育中的功能奠定了基础。

5 m⁶A 修饰相关的数据库及分析方法

随着 m⁶A 测序技术的发展,越来越多的包含 m⁶A 修饰信息转录组数据在各项研究中被公开发表。而对于这些数据的整合与分析的需求促使各种类型的 m⁶A 数据库随之出现,为科研人员提供了便利的工具。

m⁶A 数据库有许多种类,其中一部分是针对转录组 m⁶A 修饰位点的数据库,还有一部分数据库包含 m⁶A 修饰相关的其他信息。m⁶A-Atlas 是一个用于解开 m⁶A 表观转录组的综合数据库。与现有其他数据库相比,m⁶A-Atlas 具有高可信度的 m⁶A 位点集合,支持 m⁶A 的查询、可视化、共享以及下游过程 (TF 结合、RBP 结合、微小 RNA 相互作用和剪接位点) 和其他已知 RNA 修饰的注释信息^[42]。m⁶A WER 靶基因数据库 (m⁶A2Target) 是一个获取有关 WER 及其靶标的相关信息的全面、便捷的平台。它集成了 WER 及其目标的基本信息还有来自权威站点的基因注释信息。此外,m⁶A2Target 还提供了有关 WER 与其靶标之间关联的信息,例如蛋白质-DNA、蛋白质-RNA、蛋白质-蛋白质相互作用、基因表达水平的变化、m⁶A 修饰水平或翻译效率和可变剪接事件以及 WER 的扰动^[43]。该数据库对 m⁶A 研究领域的功能和机制研究起着积极的促进作用。

m^6 AVar (<http://m6avar.renlab.org>) 是一个综合数据库,其中包含可能影响 m^6 A 修饰的 m^6 A 相关的变异。该数据库搜集了多种来源的人类和小鼠的 m^6 A 相关变异,通过检查它们是否位于具有 RBP 结合位点以及 miRNA 靶点和剪接位点来进一步确认其 m^6 A 修饰位点并进行注释、可视化和探索^[44]。此外,来自 GWAS 和 ClinVar 数据库的疾病相关数据也被集成到 m^6 AVar 中,这使得用户可以利用此数据库探索 m^6 A 机制与疾病之间的潜在关系。 m^6 Avar

现在已经更名为 RMVar (<http://rmvar.renlab.org>),相比原来增加了更多种类的 RNA 修饰变异的信息^[45],更方便研究者使用其探究表观遗传学与疾病的关系。与此类似的还有 RMBase v2.0 (<http://rna.sysu.edu.cn/rmbase>)。这是一个整合了表观转录组测序数据的综合数据库,用于探索 RNA 的转录后修饰及其与 miRNA 结合、疾病相关的单核苷酸多态性 (SNP) 以及 RNA 结合蛋白 (RBP) 的关系^[46]。



图2 甘蓝型油菜和拟南芥 m^6 A 甲基转移酶、去甲基化酶及甲基化阅读蛋白进化分析

Fig. 2 Phylogenetic relationship of m^6 A writers, erasers, and readers between *Brassica napus* and *Arabidopsis thaliana*

6 展望

迄今为止,科学家们陆续发现 m^6 A 修饰参与调控植物胚胎发生、茎尖分生组织分化、毛状体以及维管的正常发育。同时,在调控植物开花时间,应对病毒感染以及抗非生物胁迫方面也发挥重要作用。这些研究大多数都是表明 m^6 A 修饰影响植物自身的生长发育,但是关于 m^6 A 修饰如何对外界环境的变化做出响应,从而去调控植物的生长发育过程,目前的研究还较少,因此,研究 m^6 A 修饰

水平与植物响应外界环境信号如光、温度等之间的联系是未来的一个研究方向。此外, m^6 A 修饰编辑作为一种改变植物表观遗传的主要方式在作物育种方面的潜力也逐渐受到人们的重视^[3]。因此,进一步鉴定重要农作物的 m^6 A 修饰相关酶,可为 m^6 A 修饰编辑提供新的特异靶点。

参考文献 (References)

- [1] KIERZEK E, KIERZEK R. The thermodynamic stability of RNA duplexes and hairpins containing N^6 -alkyladenosines and 2-methylthio- N^6 -alkyladenosines [J]. Nucleic Acids

- Research, 2003, 31 (15) : 4472–4480. DOI: 10.1093/nar/gkg633.
- [2] YUE H, NIE X, YAN Z, et al. N⁶-methyladenosine regulatory machinery in plants: composition, function and evolution[J]. Plant Biotechnology Journal, 2019, 17(7) : 1194–1208. DOI: 10.1111/pbi.13149.
- [3] ZHENG H, SUN X, ZHANG X, et al. m⁶A editing: new tool to improve crop quality? [J]. Trends in Plant Science, 2020, 25(9) : 859–867. DOI: 10.1016/j.tplants.2020.04.005.
- [4] ARRIBAS–HERNÁNDEZ L, BRODERSEN P. Occurrence and functions of m⁶A and other covalent modifications in plant mRNA[J]. Plant Physiology, 2020, 182(1) : 79–96. DOI: 10.1104/pp.19.01156
- [5] 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[J]. Genome Biology, 2015, 16(1) : 272. DOI: 10.1186/s13059-015-0839-2.
- [6] BOKAR J A, SHAMBAUGH M E, POLAYES D, et al. Purification and cDNA cloning of the AdoMet-binding subunit of the human mRNA (N⁶-adenosine)-methyltransferase[J]. RNA, 1997, 3(11) : 1233–1247. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0134(199711)29:3<391::AID-PROT12>3.0.CO;2-I.
- [7] LIU J, YUE Y, HAN D, et al. A METTL3-METTL14 complex mediates mammalian nuclear RNA N⁶-adenosine methylation[J]. Nature Chemical Biology, 2014, 10(2) : 93–95. DOI: 10.1038/nchembio.
- [8] PING X, SUN B, WANG L, et al. Mammalian WTAP is a regulatory subunit of the RNA N⁶-methyladenosine methyltransferase[J]. Cell Research, 2014, 24 (2) : 177–189. DOI: 10.1038/cr.2014.3.
- [9] SCHWARTZ S, MUMBACH M R, JOVANOVIĆ M, et al. Perturbation of m⁶A writers reveals two distinct classes of mRNA methylation at internal and 5' sites [J]. Cell Reports, 2014, 8(1) : 284–296. DOI: 10.1016/j.celrep.2014.05.048.
- [10] KAN L, GROZHIK A V, VEDANAYAGAM J, et al. The m⁶A pathway facilitates sex determination in Drosophila [J]. Nature Communications, 2017, 8 : 15737. DOI: 10.1038/ncomms15737.
- [11] HILFIKER A, AMREIN H, DUBENDORFER A, et al. The gene virilizer is required for female-specific splicing controlled by Sxl, the master gene for sexual development in Drosophila[J]. Development (Cambridge, England), 1995, 121(2) : 4017–4026. DOI: 10.1111/j.1365-2303.1995.tb00491.x.
- [12] SHEN L, LIANG Z, GU X, et al. N⁶-Methyladenosine RNA modification regulates shoot stem cell fate in Arabidopsis[J]. Developmental Cell, 2016, 38(2) : 186–200. DOI: 10.1016/j.devcel.2016.06.008.
- [13] 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 [J]. The Plant Cell, 2008, 20(5) : 1278–1288. DOI: 10.1105/tpc.108.058883.
- [14] RUZICKA K, ZHANG M, CAMPILHO A, et al. Identification of factors required for m⁶A mRNA methylation in Arabidopsis reveals a role for the conserved E3 ubiquitin ligase HAKAI [J]. New Phytologist, 2017, 215(1) : 157–172. DOI: 10.1111/nph.14586.
- [15] JIA G, FU Y, ZHAO X, et al. N⁶-Methyladenosine in nuclear RNA is a major substrate of the obesity-associated FTO[J]. Nature Chemical Biology, 2011, 7(12) : 885–887. DOI: 10.1038/nchembio.687.
- [16] ZHENG G, DAHL J A, NIU Y, et al. ALKBH5 is a mammalian RNA demethylase that impacts RNA metabolism and mouse fertility [J]. Molecular Cell, 2013, 49(1) : 18–29. DOI: 10.1016/j.molcel.2012.10.015.
- [17] JIA G, FU Y, HE C. Reversible RNA adenosine methylation in biological regulation[J]. Trends in Genetics, 2013, 29(2) : 108–115. DOI: 10.1016/j.tig.2012.11.003.
- [18] DUAN H, WEI L, ZHANG C, et al. ALKBH10B is an RNA N⁶-Methyladenosine demethylase affecting Arabidopsis floral transition [J]. The Plant Cell, 2018, 29(2) : 2995–3011. DOI: 10.1016/j.tig.2012.11.003.
- [19] MARTÍNEZ-PÉREZ M, APARICIO F, LÓPEZ-GRESA M P, et al. Arabidopsis m⁶A demethylase activity modulates viral infection of a plant virus and the m⁶A abundance in its genomic RNAs [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2017, 114(40) : 10755–10760. DOI: 10.1073/pnas.1703139114.
- [20] WANG X, ZHAO B S, ROUNDTREE I A, et al. N⁶-methyladenosine modulates messenger RNA translation efficiency [J]. Cell, 2015, 161(6) : 1388–1399. DOI: 10.1016/j.cell.2015.05.014.
- [21] XIAO W, ADHIKARI S, DAHAL U, et al. Nuclear m⁶A Reader YTHDC1 regulates mRNA splicing [J]. Molecular Cell, 2016, 61(4) : 507–519. DOI: 10.1016/j.tig.2016.03.006.
- [22] 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 [J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2014, 32(6) : 1169–1186. DOI: 10.1007/s11105-014-0724-2.
- [23] ARRIBAS–HERNÁNDEZ L, BRESSENDORFF S, HANSEN M H, et al. An m⁶A-YTH module controls developmental timing and morphogenesis in Arabidopsis [J]. The Plant Cell, 2018, 30(5) : 952–967. DOI: 10.1105/tpc.17.00833.
- [24] WEI L, SONG P, WANG Y, et al. The m⁶A reader ECT2 controls trichome morphology by affecting mRNA stability in Arabidopsis [J]. The Plant Cell, 2018, 30(5) : 968–985. DOI: 10.1105/tpc.17.00934.
- [25] SCUTENAIRE J, DERAGON J, JEAN V, et al. The YTH domain protein ECT2 is an m⁶A reader required for normal

- trichome branching in *Arabidopsis* [J]. *The Plant Cell*, 2018, 30(5) : 986–1005. DOI: 10.1105/tpc.17.00854.
- [26] 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* [J]. *Molecular Plant*, 2021, 14 (4) : 688–699. DOI: 10.1016/j.molp.2021.01.013.
- [27] 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 [J]. *Molecular Plant*, 2021, 14 (4) : 571–587. DOI: 10.1016/j.molp.2021.01.014.
- [28] 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 [J]. *Plant Physiology*, 2004, 134 (4) : 1283–1292. DOI: 10.1104/pp.103.028050.
- [29] 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 [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2012, 3 (48) : 1–10. DOI: 10.3389/fpls.2012.00048.
- [30] TZAFRIR I, PENA –MURALLA R, DICKERMAN A, et al. Identification of genes required for embryo development in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiology*, 2004, 135 (3) : 206–1220. DOI: 10.1104/pp.104.045179.
- [31] ZHANG F, ZHANG Y, LIAO J, et al. The subunit of RNA N⁶-methyladenosine methyltransferase OsFIP regulates early degeneration of microspores in rice [J]. *PLOS Genetics*, 2019, 15 (5) : e1008120. DOI: 10.1371/journal.pgen.1008120.
- [32] 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 [J]. *RNA Biology*, 2014, 11 (9) : 1180–1188. DOI: 10.4161/rna.36281.
- [33] 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 [J]. *Development*, 2020, 147 (14) : dev189134. DOI: 10.1242/dev.189134.
- [34] SIMPSON G G, BARTON G J, PARKER M T, et al. Nanopore direct RNA sequencing maps an *Arabidopsis* N⁶-methyladenosine epitranscriptome [J]. *bioRxiv*, 2019, DOI 10.1101/706002.
- [35] ZHOU L, TIAN S, QIN G. RNA methylomes reveal the m⁶A-mediated regulation of DNA demethylase gene SIDML2 in tomato fruit ripening [J]. *Genome Biology*, 2019, 20(156) : 1–23. DOI: 10.1186/s13059-019-1771-7.
- [36] ZHOU L, TANG R, LI X, et al. N⁶-methyladenosine RNA modification regulates strawberry fruit ripening in an ABA-dependent manner [J]. *Genome Biology*, 2021, 22(186) : 1–32. DOI: 10.1101/2021.03.04.433875.
- [37] LI Z, SHI J, YU L, et al. N⁶-methyl-adenosine level in *Nicotiana tabacum* is associated with tobacco mosaic virus [J]. *Virology Journal*, 2018, 15 (87) : 1–10. DOI: 10.1186/s12985-018-0997-4.
- [38] ANDERSON S J, KRAMER M C, GOSAI S J, et al. N⁶-Methyladenosine inhibits local ribonucleolytic cleavage to stabilize mRNAs in *Arabidopsis* [J]. *Cell Reports*, 2018, 25 (1) : 1146–1157. DOI: 10.1186/s12985-018-0997-4.
- [39] ZHENG H, SUN X, LI J, et al. Analysis of N⁶-methyladenosine reveals a new important mechanism regulating the salt tolerance of sweet sorghum [J]. *Plant Science*, 2021, 304 (110801) : 1–14. DOI: 10.1016/j.plantsci.2020.110801.
- [40] MIAO Z, ZHANG T, QI Y, et al. Evolution of the RNA N⁶-methyladenosine methylome mediated by genomic duplication [J]. *Plant Physiology*, 2020, 182(1) : 345–360. DOI: 10.1104/pp.19.00323.
- [41] HU J, CAI J, PARK S J, et al. N⁶-Methyladenosine mRNA methylation is important for salt stress tolerance in *Arabidopsis* [J]. *The Plant Journal*, 2021, 106(6) : 1759–1775. DOI: 10.1111/tj.15270.
- [42] TANG Y, CHEN K, SONG B, et al. m6A-Atlas: a comprehensive knowledgebase for unraveling the N⁶-methyladenosine (m6A) epitranscriptome [J]. *Nucleic Acids Research*, 2021, 49: D134–D143. DOI: 10.1093/nar/gkaa692.
- [43] DENG S, ZHNAG H, ZHU K, et al. M6A2Target: a comprehensive database for targets of m6A writers, erasers and readers [J]. *Briefings in Bioinformatics*, 2020, 22(3) : 1–11. DOI: 10.1093/bib/bbaa055.
- [44] ZHENG Y, NIE P, PENG D, et al. m6AVar: a database of functional variants involved in m6A modification [J]. *Nucleic Acids Research*, 2017, 46: D139–D145. DOI: 10.1093/nar/gkx895.
- [45] LUO X, LI H, LIANG J, et al. RMVar: an updated database of functional variants involved in RNA modifications [J]. *Nucleic Acids Research*, 2020, 49: D1405–D1412. DOI: 10.1093/nar/gkaa811.
- [46] XUAN J, SUN W, LIN P, et al. RMBase v2.0: deciphering the map of RNA modifications from epitranscriptome sequencing data [J]. *Nucleic Acids Research*, 2017, 46: D327–D334. DOI: 10.1093/nar/gkx934.