

N⁶-甲基腺嘌呤 RNA 修饰研究进展

刘畅^{1,2,3}, 陈洪艳^{1,2,3}, 张琦^{1,2,3}, 张心扬^{1,2,3}, 李辉^{1,2,3}, 程博涵^{1,2,3*}

- (1. 农业农村部鸡遗传育种重点实验室, 黑龙江哈尔滨 150030;
- 2. 黑龙江省普通高等学校动物遗传育种与繁殖重点实验室, 黑龙江哈尔滨 150030;
- 3. 东北农业大学动物科学技术学院, 黑龙江哈尔滨 150030)

摘要: N⁶-甲基腺嘌呤(N⁶-methyladenosine, m⁶A)作为一种重要的表观遗传修饰方式, 在干细胞命运决定、精子形成、肌肉发育、脂肪沉积及人类肿瘤发生中发挥重要作用。m⁶A 修饰最重要的作用是调控基因表达, 它是细胞中基因表达调控的表观遗传学机制之一。文章综述了m⁶A 调控基因表达的分子机制及m⁶A 介导的生物学功能的研究进展, 探讨了m⁶A RNA 甲基化的研究趋势和未来发展方向。

关键词: N⁶-甲基腺嘌呤(m⁶A); RNA 化学修饰; 基因表达调控; 生物学功能

中图分类号 S813.1; S813.2 文献标识码 A 文章编号 :1004-6364(2019)14-50-05

Research Progress of N⁶-methyladenosine RNA Modification

LIU Chang^{1, 2, 3}, CHEN Hongyan^{1, 2, 3}, ZHANG Qi^{1, 2, 3}, ZHANG Xinyang^{1, 2, 3},
LI Hui^{1, 2, 3}, CHENG Bohan^{1, 2, 3*}

- (1. Key Laboratory of Chicken Genetics and Breeding,
Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Harbin, Heilongjiang 150030;
- 2. Key Laboratory of Animal Genetics, Breeding and Reproduction,
Education Department of Heilongjiang Province, Harbin, Heilongjiang 150030;
- 3. College of Animal Science and Technology,
Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030)

Abstract: N⁶-methyladenosine (m⁶A) RNA modification is an important epigenetic modification and plays crucial roles in stem cell fate determination, spermatogenesis, muscle development, fat deposition and human tumorigenesis. The key role of m⁶A methylation is the regulation of gene expression, and m⁶A methylation is one of several epigenetic mechanisms that cells use to regulate gene expression. This review focuses on recent advances of the mechanisms of m⁶A regulating gene expression and biological function mediated by m⁶A, and discusses the ongoing trends and future research directions of m⁶A RNA methylation.

Key words: N⁶-methyladenosine (m⁶A); RNA chemical modification; regulation of gene expression; biological function

表观遗传修饰主要包括DNA甲基化和组蛋白修饰。除了DNA和蛋白上的修饰以外,近年来RNA修饰成为表观遗传学领域的一个研究热点。

目前已有超过100种RNA修饰被发现,这些修饰很大程度上丰富了RNA功能和遗传信息的多样性^[1,2]。在mRNA上发现的主要修饰包括N⁷-甲基

收稿日期:2019-06-01;修回日期:2019-07-09

基金项目:国家高技术研究发展计划(863计划)项目(2013AA102501);现代农业产业技术体系建设专项资金(CARS-41);黑龙江省高校青年创新人才培养基金项目(UNPYSCT-2018145)

作者简介:刘畅(1994-),女,硕士研究生,研究方向为动物遗传育种,E-mail:yeluo_lc@163.com

*通讯作者:程博涵(1988-),男,博士,讲师,主要从事动物遗传育种研究,E-mail:chengbohan1027@126.com



鸟嘌呤(N⁷-methylguanosine, m⁷G)、N⁶-甲基腺嘌呤(N⁶-methyladenosine, m⁶A)、5-甲基胞嘧啶(5-methylcytosine, m⁵C)、N¹-甲基腺嘌呤(N¹-methyladenosine, m¹A)、假尿嘧啶(pseudouridine, Ψ)和2'-O-甲基化修饰(2'-O-methylation, Nm)等^[2-4]。由于m⁶A修饰是真核细胞mRNA中丰度最高的修饰方式^[6],并且存在可逆的调节机制,故m⁶A的研究受到了重视。本文对近年来针对m⁶A RNA甲基化的研究进展做一综述。

1 m⁶A RNA甲基化概述

20世纪70年代首次发现m⁶A修饰的存在,但由于当时缺乏研究RNA修饰的技术,限制了人们对m⁶A的研究。2012年,两个课题组的研究人员通过m⁶A抗体亲和富集结合高通量测序方法(MeRIP-seq),从全转录组范围内明确了m⁶A的分布情况,发现m⁶A主要分布在mRNA终止密码子附近和3'UTR^[7]。另外,mRNA上m⁶A修饰位点附近的序列具有高度的保守性,即G[G>A]m⁶AC[U>A>C]^[8]。自2011年起,m⁶A相关蛋白的研究取得了重大进展:两个m⁶A去甲基化酶(m⁶A Erasers)

FTO、ALKBH5陆续被发现,FTO和ALKBH5均属于AlkB家族,以Fe(II)和α-酮戊二酸依赖的方式对m⁶A进行氧化去甲基化反应^[9,10];m⁶A甲基转移酶核心复合物(m⁶A Writers)被解析,其成份包括METTL3、METTL14和WTAP, METTL3和METTL14在WTAP的协助下形成异源二聚体催化m⁶A甲基化, METTL3是m⁶A甲基转移酶复合物的催化亚基,可以识别S-腺苷甲硫氨酸,具有m⁶A催化活性,而METTL14是复合物的非催化亚基,不具有单独m⁶A催化活性,但METTL14决定RNA底物(即靶基因)的识别,并且能够通过METTL3结合来稳定METTL3的结构,促进METTL3的催化活性^[11-13];目前已有多个m⁶A结合蛋白(m⁶A Readers)被报道,这些蛋白主要为YTH结构域家族蛋白^[14-16]。

2 m⁶A修饰对RNA代谢的影响及作用机制

m⁶A结合蛋白通过识别RNA上的m⁶A修饰来调控RNA代谢过程,包括调控细胞核内pre-mRNA的剪接、mRNA出核、pri-miRNA加工成熟以及细胞浆内mRNA的降解和翻译等(见图1)。

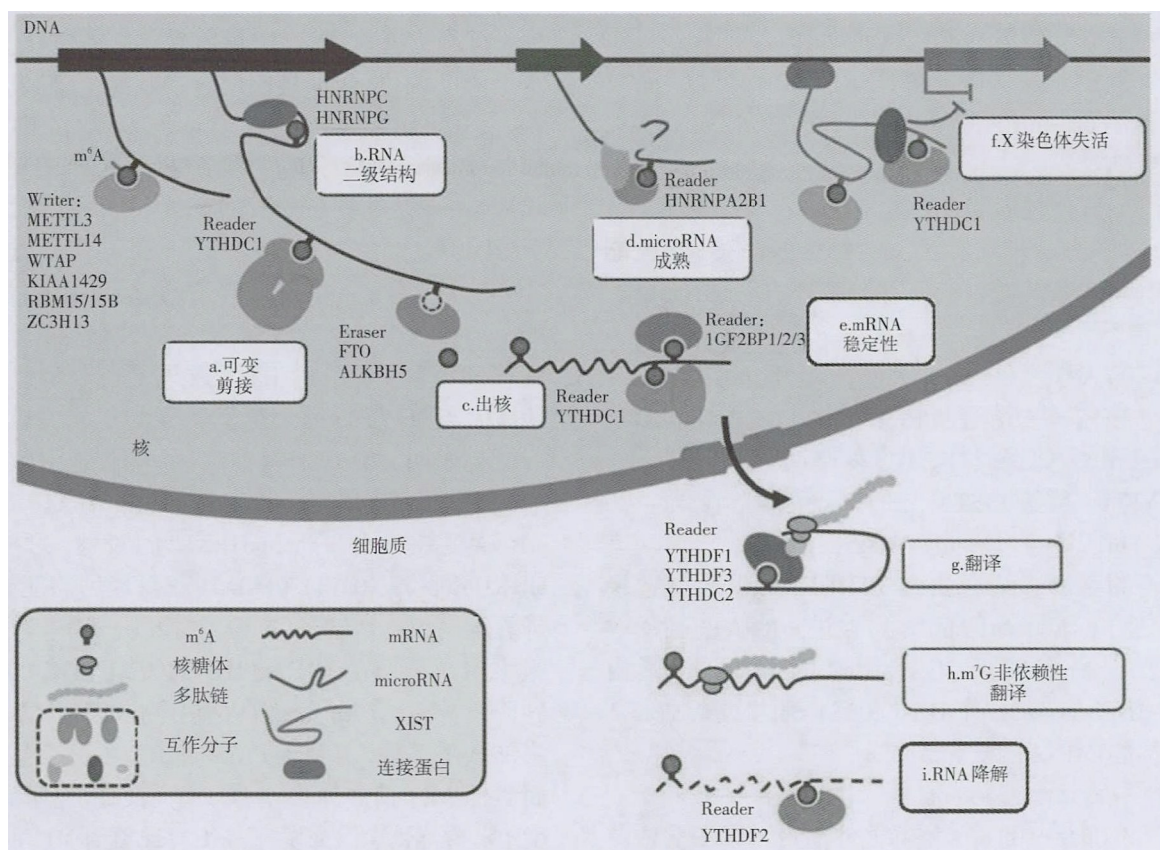


图1 m⁶A修饰调控RNA代谢的机制^[28]

2.1 m⁶A 修饰影响 pre-mRNA 可变剪接

RNA 剪接是 mRNA 成熟过程中的重要事件。研究发现, m⁶A 修饰在 pre-mRNA 中的丰度要高于成熟 mRNA, 并且许多内含子中含有 m⁶A 修饰位点^[17]。METTL3、METTL14、WTAP 以及 FTO、ALKBH5 都定位于富含剪切因子的核小斑区域。在小鼠胚胎干细胞中敲除 METTL3 后会导致外显子跳跃和内含子保留^[18]。FTO 可以通过移除剪切位点附近的 m⁶A 修饰影响剪切因子 SRSF2 与 pre-mRNA 的结合, 从而调节可变剪接过程^[19]。核内 m⁶A 结合蛋白 YTHDC1 可以通过招募剪切因子 SRSF3 影响 pre-mRNA 剪接过程^[20]。

2.2 m⁶A 修饰影响 RNA 结构

正常情况下, 很多 RNA 结合蛋白的结合序列埋在 RNA 结构化区域内, 这会抑制 RNA 与蛋白相互作用。研究发现, m⁶A 修饰能减弱 A 与 U 之间的氢键作用, 从而改变 RNA 结构, 诱导结合序列暴露, 进而促进 RNA 结合蛋白与 RNA 的结合^[21]。

2.3 m⁶A 修饰影响 mRNA 出核

敲除 METTL3 抑制核内 mRNA 向胞浆转运^[22], 提示 m⁶A 修饰能够促进 mRNA 的出核。

2.4 m⁶A 修饰影响 miRNA 成熟

核内 m⁶A 结合蛋白 HNRNPA2B1 可以与 m⁶A 修饰的 pri-miRNA 直接结合, 促进 pri-miRNA 加工成熟^[23]。

2.5 m⁶A 修饰影响 mRNA

稳定性: 研究发现, m⁶A 结合蛋白 IGF2BPs 能够与 m⁶A 修饰的 mRNA 直接结合, 使 mRNA 更加稳定^[24]。

2.6 m⁶A 修饰影响 X 染色体失活

核内 m⁶A 结合蛋白 YTHDC1 除了可以影响 pre-mRNA 剪接以外, 还可以通过识别 XIST 上的 m⁶A 修饰, 促进 XIST 介导的 X 染色体失活^[25]。

2.7 m⁶A 修饰影响 mRNA 翻译

胞浆 m⁶A 结合蛋白 YTHDF1 可以通过选择性结合 m⁶A 修饰的 mRNA, 促进 mRNA 的翻译效率^[14]。研究发现, 位于胞浆的 m⁶A 结合蛋白 YTHDF3 能够与 YTHDF1 相互作用协同促进 m⁶A 修饰的 mRNA 的翻译^[26]。

2.8 m⁶A 修饰影响 m⁷G 非依赖性翻译

5' UTR 上的 m⁶A 修饰能够通过 5' 帽子非依赖的方式促进翻译进程^[27]。

2.9 m⁶A 修饰影响 RNA 降解

胞浆 m⁶A 结合蛋白 YTHDF2 可以与 m⁶A 修饰的 mRNA 和 lncRNA 直接结合, 促进其降解^[16]。m⁶A 修饰通过调节 RNA 代谢参与多种生物学过程, 如癌症、干细胞命运决定、精子形成、脂肪沉积等。

3 m⁶A 修饰介导的生物学功能

3.1 m⁶A 修饰在癌症中的作用

许多研究表明 m⁶A 参与癌症的发展。Zhang 等^[28]发现, 低氧条件可以促进 HIF1 α 和 HIF2 α 依赖的 ALKBH5 上调, 导致整体 RNA m⁶A 水平的下调, 降低 NANOG mRNA 的 m⁶A 水平, 增加 NANOG mRNA 的表达水平, 促进乳腺癌干细胞维持干性特征, 抑制其分化能力^[29]。研究发现 ALKBH5 在胶质母细胞瘤样干细胞中高表达, 此外, ALKBH5 能够通过与 *FOXMI* 基因 3' UTR 的 m⁶A 位点结合下调其 m⁶A 水平, 上调 *FOXMI* 的表达, 从而促进胶质母细胞瘤样干细胞的致瘤性^[30]。Li 等^[31]发现, FTO 在特定亚型的急性髓系白血病中高表达, 导致整体 RNA m⁶A 水平的下调, 并作为 m⁶A 去甲基化酶抑制 *ASB2*、*RARA* 的表达, 从而促进急性髓系白血病细胞的生长。Cui 等^[32]发现, 在胶质母细胞瘤干细胞中沉默 METTL3 能够导致整体 RNA m⁶A 水平的下调, 从而促进胶质母细胞瘤干细胞的生长、自我更新和肿瘤发生。Vu 等^[33]发现, METTL3 通过上调 *c-MYC*、*BCL2* 和 *PTEN* 基因 mRNA 的 m⁶A 水平, 促进其 mRNA 的翻译, 从而抑制造血干/祖细胞分化并促进其增殖。Chen 等^[34]发现, METTL3 作为 m⁶A 甲基转移酶通过 YTHDF2 依赖的 *SOCS2* 基因转录后沉默, 促进肝癌细胞的增殖、迁移和集落形成。Cai 等^[35]发现, 乳腺癌细胞中 *HBXIP* 与 *METTL3* 的表达呈明显的正相关, 进一步研究表明 *HBXIP* 通过抑制 let-7g 促进 *METTL3* 的表达, 且 *METTL3* 可以通过增加 *HBXIP* 基因 mRNA 的 m⁶A 水平促进 *HBXIP* 的表达, 形成的 *HBXIP*/let-7g/*METTL3*/*HBXIP* 正反馈回路能够促进乳腺癌细胞增殖。Liu 等^[36]发现, 子宫内膜癌细胞中甲基转移酶复合物 *METTL3*/*METTL14* 的活性降低, 导致 *PRR5*、*MTOR* 基因 mRNA 上的 m⁶A 修饰水平下降, 上调了 *PRR5* 和 *MTOR* 的表达, 从而激活 AKT 信号途径增强了子宫内膜癌细胞的增殖和致瘤性。研究发现, miR-126 受到 *METTL14* 介导的 m⁶A 修饰调控, m⁶A 修饰能够增强 *DGCR8*

对 pri-miR-126 的识别,促进成熟 miR-126 的产生,进而抑制肝癌的转移^[37]。Weng 等^[38]发现, METTL14 通过增加 MYB 和 MYC 的 m⁶A 水平,上调 MYB 与 MYC 的表达水平,从而抑制正常造血干细胞和急性髓系白血病细胞的终末髓样分化,并促进急性髓系白血病细胞的增殖^[38]。最新研究表明,吸烟引起 METTL3 基因启动子低甲基化,导致 METTL3 表达水平增加,使致癌 miRNA-miR-25 初级转录本的 m⁶A 修饰增加,导致 miR-25-3p 过度成熟,从而促进胰腺癌的发展^[39]。Wu 等^[40]发现,过表达 METTL14 或敲低 ALKBH5 能够上调乳腺癌细胞的整体 m⁶A 水平,并抑制细胞增殖、迁移和克隆形成,从而抑制乳腺癌的发展。

综上所述, m⁶A 修饰在癌症发展中发挥重要作用,且 m⁶A 相关酶的关键下游靶基因(RNA 底物)在不同种类的癌症中各有不同,提示 m⁶A 调控癌症发生发展的分子机理十分复杂。

3.2 m⁶A 修饰在干细胞命运决定中的作用

哺乳动物受精卵在子宫着床前后,胚胎处于两个不同的状态,称为植入前胚胎和植入后胚胎。胚胎干细胞来源于植入前胚胎的内细胞群,处于初始多能性状态,能够发育成为外胚层、中胚层及内胚层 3 种胚层的细胞组织^[41]。外胚层干细胞来源于植入后胚胎外胚层,处于活化多能性状态,与胚胎干细胞相比更易于分化^[18]。对小鼠和人类胚胎干细胞进行 m⁶A 全转录组分析,发现许多核心多能性基因和发育调控因子的转录本上都含有 m⁶A 修饰,并且为 METTL3 结合的底物^[42]。进一步研究表明, m⁶A 在小鼠胚胎干细胞初始多能性状态和活化多能性状态间的转化中具有重要调控作用^[18]。研究发现, SMAD2/3 可以促进 RNA 甲基化酶复合物与早期细胞命运决定基因的 mRNA 结合,改变这些基因的表达水平,从而影响多能干细胞的干性特征^[43]。有研究表明,在小鼠胚胎干细胞中下调 METTL14 会导致整体 m⁶A RNA 甲基化水平降低,进而减弱干细胞的自我更新能力^[44]。

3.3 m⁶A 修饰在精子形成中的作用

许多繁殖相关基因的转录本含有 m⁶A 修饰^[45]。在小鼠生殖细胞中特异性敲除 METTL3 能够降低精子发生相关基因 mRNA 的 m⁶A 水平,影响这些基因的表达水平和 mRNA 剪接,从而抑制精原细

胞分化并阻断减数分裂的起始^[45]。类似的,在小鼠生殖细胞中特异性失活 METTL3 或 METTL14 会降低精原干细胞增殖、分化相关基因转录本的 m⁶A 水平,从而抑制其翻译;进一步研究发现,在晚期生殖细胞中同时敲除 METTL3 和 METTL14 的小鼠表现出单倍体特异性基因翻译障碍,从而破坏精子发生,而单独敲除 METTL3 或 METTL14 的小鼠却表现出正常的精子发生^[46]。

3.4 m⁶A 修饰在肌肉发育中的作用

研究表明, m⁶A 在肌肉发育过程中也发挥重要作用。Kudou 等研究发现, METTL3 通过增加成肌因子 MyoD 基因的 m⁶A 水平,促进 MyoD 基因的表达,从而调节小鼠 C2C12 成肌细胞分化^[47]。Wang 等^[48]发现,敲低 FTO 能够抑制小鼠 C2C12 成肌细胞分化,且这种作用依赖 FTO 的 m⁶A 去甲基化酶活性,进一步研究表明, FTO 通过激活 mTOR-PGC-1 α 通路促进线粒体的生物合成,从而促进成肌细胞分化。

3.5 m⁶A 修饰在脂肪沉积中的作用

研究表明, m⁶A 修饰在哺乳动物前脂肪细胞分化和肝脏脂类代谢中发挥重要的调控作用^[49-52]。Zhao 等^[19]发现,在小鼠 3T3-L1 前脂肪细胞分化过程中, FTO 的表达水平逐渐下降,而整体 m⁶A RNA 甲基化水平逐渐上升,且干扰 FTO 可以抑制前脂肪细胞分化。进一步研究发现, FTO 通过改变成脂调控基因 RUNX1T1 pre-mRNA 剪接位点附近的 m⁶A 水平,影响 RUNX1T1 的外显子剪接,从而影响前脂肪细胞分化。Zhang 等^[53]发现,过表达野生型 FTO 可以下调整体 m⁶A 水平并促进 3T3-L1 前脂肪细胞分化,过表达 FTO 的突变体 R96Q(缺乏 m⁶A 去甲基化酶活性)对整体 m⁶A 水平没有影响但抑制前脂肪细胞分化,进一步研究发现,添加罗格列酮能够拯救 FTO 突变体对前脂肪细胞分化的抑制作用,暗示 FTO 可能通过 PPAR γ 调控脂肪生成。

Zhang 等^[54]发现,给鸡腹腔注射 LPS 可以导致肝脏甘油三酯的积累,进一步研究表明,注射 LPS 引起肝脏中 FTO 表达的升高,降低了脂肪酸代谢基因 CPT1 翻译起始位点和翻译终止位点附近的 m⁶A 水平,抑制了 CPT1 的表达,从而导致肝脏中甘油三酯的积累。Wu 等^[55]发现,猪肌肉细胞中 AMPK 通过抑制 FTO 的表达导致整体 m⁶A 水平升

高,从而抑制肌肉细胞中的脂滴沉积。Wu等^[56]发现,FTO以m⁶A-YTHDF2的方式调节脂肪生成早期阶段的细胞周期进程,从而影响小鼠3T3-L1前脂肪细胞分化。类似的研究表明,儿茶素EGCG通过抑制3T3-L1前脂肪细胞中FTO的表达水平,上调CCNA2、CDK2基因mRNA的m⁶A水平,引起YTHDF2介导的CCNA2和CDK2 mRNA降解,抑制有丝分裂克隆扩增,从而抑制脂肪生成^[57]。近期研究表明,FTO能够下调猪HepG2肝细胞中整体m⁶A水平和线粒体含量,并促进甘油三酯沉积^[58]。Jiang等^[59]研究发现,MTCH2以m⁶A-YTHDF1依赖的机制促进猪肌内脂肪生成,而FAM134B以m⁶A-YTHDF2依赖的机制促进猪前脂肪细胞分化^[60]。研究表明,METTL3、METTL14、WTAP通过促进有丝分裂克隆增殖中的细胞周期转换来促进小鼠3T3-L1前脂肪细胞分化^[61],提示细胞中整体m⁶A水平影响脂肪生成。Zong等^[62]研究发现,在猪小肠上皮细胞中敲低METTL3能够下调Traf6 mRNA的m⁶A水平,进而抑制了Traf6 mRNA的出核,降低了Traf6的蛋白表达水平,抑制了NF-κB和MAPK信号通路介导的炎症反应,从而使细胞持续摄入长链脂肪酸,促进脂滴沉积。综上所述,整体m⁶A水平升高会抑制前脂肪细胞分化以及肝细胞和肌肉细胞中甘油三酯的沉积。

目前,有关m⁶A修饰在脂肪沉积中的作用及分子机制主要集中于对m⁶A去甲基化酶FTO的研究。其它m⁶A相关酶是否参与脂肪沉积? 其中的分子机理是怎样的? 这些问题尚不清楚。

4 展 望

m⁶A RNA甲基化作为一种重要的、可逆的表观遗传修饰方式,参与调控多种生物学过程。对m⁶A修饰进行系统和深入地研究对于了解生物的生长发育和人类疾病等生命现象具有重大意义。目前,m⁶A RNA甲基化与其它表观遗传修饰的关系尚不清楚,揭示它们之间的关系对于了解基因表达的表观遗传调控机制具有重要意义,这将是未来重要的研究方向。另外,当前对于m⁶A修饰的研究主要集中于人和小鼠,而针对重要农业经济动物(如猪、牛、羊、家禽)m⁶A修饰的研究却不多。农业动物具有独特的生物学特性和经济价值,开展这些动物的m⁶A修饰研究,将m⁶A RNA甲基化与

特定的经济性状联系起来,不仅将有助于揭示农业动物重要经济性状形成的表观遗传调控机制,而且将为动物品种的分子改良提供理论依据。此外,目前还没有针对m⁶A修饰的表观遗传药物,随着m⁶A RNA甲基化研究的不断深入,相信必将为相关疾病的诊断、预防和治疗提供新的方向。

参考文献:

- [1] MADEN B E. The numerous modified nucleotides in eukaryotic ribosomal RNA[J]. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, 1990(39): 241-303.
- [2] WANG X, LU Z, GOMEZ A, et al. N⁶-methyladenosine-dependent regulation of messenger RNA stability[J]. *Nature*, 2014, 505(7481): 117-120.
- [3] YANG X, YANG Y, SUN B F, et al. 5-methylcytosine promotes mRNA export-NSUN2 as the methyltransferase and ALYREF as an m(5)C reader[J]. *Cell Res*, 2017, 27(5): 606-625.
- [4] DOMINISSINI D, NACHTERGAELE S, MOSHITCH-MOSHKOVITZ S, et al. The dynamic N(1)-methyladenosine methylome in eukaryotic messenger RNA[J]. *Nature*, 2016, 530(7591): 441-446.
- [5] LI X, ZHU P, MA S, et al. Chemical pulldown reveals dynamic pseudouridylation of the mammalian transcriptome[J]. *Nat Chem Biol*, 2015, 11(8): 592-597.
- [6] YUE Y, LIU J, HE C. RNA N⁶-methyladenosine methylation in post-transcriptional gene expression regulation[J]. *Genes Dev*, 2015, 29(13): 1343-1355.
- [7] DOMINISSINI D, MOSHITCH-MOSHKOVITZ S, SCHWARTZ S, et al. Topology of the human and mouse m⁶A RNA methylomes revealed by m⁶A-seq[J]. *Nature*, 2012, 485(7397): 201-206.
- [8] MEYER K D, SALETORRE Y, ZUMBO P, et al. Comprehensive analysis of mRNA methylation reveals enrichment in 3'UTRs and near stop codons[J]. *Cell*, 2012, 149(7): 1635-1646.
- [9] JIA G, FU Y, ZHAO X, et al. N⁶-methyladenosine in nuclear RNA is a major substrate of the obesity-associated FTO[J]. *Nat Chem Biol*, 2011, 7(12): 885-887.
- [10] ZHENG G, DAHL J A, NIU Y, et al. ALKBH5 is a mammalian RNA demethylase that impacts RNA metabolism and mouse fertility[J]. *Mol Cell*, 2013, 49(1): 18-29.

(11-62略,需要者请扫描文章首页二维码或与编辑部联系索取。) 