



## m<sup>6</sup>A 甲基转移酶家族 Fiona/METT-10/ METTL16 的功能

龚娟<sup>1,3)</sup> 黄武强<sup>2,3)\*</sup> 容益康<sup>3)\*</sup><sup>(1)</sup> 南华大学衡阳医学院药学院, 衡阳 421001; <sup>(2)</sup> 南华大学衡阳医学院附属第二医院, 衡阳 421001;<sup>(3)</sup> 南华大学衡阳医学院基础医学院, 衡阳 421001)

**摘要** RNA 碱基上的化学修饰在其功能的精准调节中发挥关键作用, 其中 m<sup>6</sup>A 是自然界中最普遍的 RNA 修饰之一, 且该修饰在调控 RNA 稳定性、pre-mRNA 剪接、翻译等方面具有重要功能。在真核生物中, m<sup>6</sup>A 修饰主要由两种甲基转移酶完成, 其在哺乳动物中分别命名为 METTL3 和 METTL16。与 METTL3 相似, METTL16 的底物多种多样, 包括 pre-mRNA、rRNA、snRNA 和 lncRNA 等, 因此似乎难以用一种分子机理解释 METTL16 对不同 RNA 底物进行 m<sup>6</sup>A 修饰的功能。此外, METTL16 还在翻译调控中发挥重要作用, 但此过程不依赖其甲基转移酶活性, 这进一步增加了高度保守的 METTL16 的功能复杂性。本综述总结了 METTL16 及其同源蛋白质的结构域、甲基化底物以及它们的潜在功能, 着重阐述了在不同物种中关于 METTL16 研究结果的矛盾之处, 并推测 METTL16 调控 S-腺苷基甲硫氨酸 (SAM) 代谢的功能是趋同进化的一个潜在案例。

**关键词** METTL16, m<sup>6</sup>A 修饰, U6 小核 RNA, S-腺苷基甲硫氨酸合成酶

**中图分类号** Q51, R34

**DOI:** 10.16476/j.pibb.2022.0388

化学修饰是调控生命活动的重要手段, 广泛见于 DNA、RNA 和蛋白质中, 其中 RNA 上的化学修饰最为丰富, 迄今为止人们已经发现了上百种不同类型的 RNA 修饰, 包括脱氨基、异构化、糖基化和甲基化等<sup>[1]</sup>。其中甲基化修饰几乎占据 2/3<sup>[2]</sup>, 尤其是腺苷上第 6 位氮原子的甲基化修饰 N<sup>6</sup>-甲基腺苷化 (N<sup>6</sup>-methyladenosine, m<sup>6</sup>A) 是目前数量最多且研究最充分的修饰之一, 它几乎存在于所有类型的 RNA 中。1970 年就已经发现 m<sup>6</sup>A 是 mRNA 上最丰富的内部修饰, 而且几乎每个 mRNA 中都有 2~3 个 m<sup>6</sup>A 修饰位点<sup>[3]</sup>, 主要靠近终止密码子和 3'非翻译区 (UTR) 区域<sup>[4]</sup>。

转录后的 m<sup>6</sup>A 修饰能从多方面调控 RNA 的功能, 它对 RNA 的二级结构会产生不同的影响, 在双链中会降低其稳定性, 而未配对腺嘌呤上的 m<sup>6</sup>A 修饰会增加临近螺旋的稳定性<sup>[5]</sup>。m<sup>6</sup>A 会被某些 m<sup>6</sup>A 识别蛋白识别, 在 pre-mRNA 的剪接<sup>[6]</sup>、降解<sup>[7]</sup>和翻译<sup>[8]</sup>等过程中起关键作用。此外, m<sup>6</sup>A 的修饰是一个动态过程, 它可以被 m<sup>6</sup>A 去甲基转移酶如 FTO<sup>[9]</sup>和 ALKBH5<sup>[10]</sup>去除, 调控 RNA 代谢

的这种动态变化会影响哺乳动物的昼夜节律<sup>[11]</sup>、干细胞发育分化<sup>[12]</sup>以及肿瘤的发生<sup>[13]</sup>等。

METTL3/METTL14 是最早被鉴定出来的 m<sup>6</sup>A 甲基转移酶复合物, 它们负责真核生物 mRNA 中大部分的 m<sup>6</sup>A 修饰<sup>[14-15]</sup>。METTL3 在该复合物中起着核心作用, 它能利用 S-腺苷基甲硫氨酸 (S-adenosylmethionine, SAM) 甲基化腺苷酸<sup>[16]</sup>, 而 METTL14 主要是在维持复合物稳定性和识别 RNA 底物方面起作用<sup>[17]</sup>。一系列研究表明, WTAP、RBM15/15B 和 KIAA1429 等蛋白质和 METTL3/14 复合物一起发挥作用<sup>[18]</sup>, 而且这些蛋白质的缺失都会造成 m<sup>6</sup>A 水平的降低<sup>[19]</sup>。

近年来发现的另外一种甲基转移酶 METTL16, 是一种从低等生物到高等生物均高度保守的蛋白质<sup>[20]</sup>, METTL16 和 METTL3/14 复合物虽然都是 m<sup>6</sup>A 甲基转移酶, 但它们之间的结构以及识别底物

\* 通讯联系人。

容益康 Tel: 13762472977, E-mail: nhoffbus@outlook.com

黄武强 Tel: 15920821198, E-mail: johntozs@126.com

收稿日期: 2022-08-17, 接受日期: 2023-01-19

的特异性有较大的差异。与METTL3/14复合物相比，METTL16蛋白可以独立发挥其甲基化功能。METTL3/14倾向于甲基化单链RNA，而METTL16更倾向于识别共识序列附近包含双链的RNA底物<sup>[21-22]</sup>。作为SAM依赖的甲基转移酶METTL16和METTL3/14复合物都属于I类甲基转移酶，并带有保守的由 $\beta$ 折叠和 $\alpha$ 螺旋组成的罗斯曼折叠，它们之间的整体三维空间结构类似，但其 $\beta$ 折叠明显不同，这可能就是它们之间底物序列偏好性不同的原因<sup>[23]</sup>。

目前已知METTL16是SAM合成酶MAT2A

(methionine adenosyltransferase 2)的pre-mRNA和小核RNA (small nuclear RNA, snRNA) U6的甲基转移酶<sup>[22, 24]</sup>，也发现METTL16可以特异性识别肺癌转移相关转录本1 (metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1, MALAT1) lncRNA的三螺旋结构<sup>[25]</sup>，但其甲基化作用并未被证实，猜测METTL16除了甲基转移酶活性外可能还有别的作用，最新研究发现METTL16以不依赖其甲基酶活性的方式促进翻译也说明了这一点<sup>[26]</sup>。本综述除了主要讨论m<sup>6</sup>A甲基转移酶——METTL16，还简单介绍了其他的m<sup>6</sup>A甲基转移酶(表1)。

Table 1 m<sup>6</sup>A Methyltransferases

表1 m<sup>6</sup>A甲基转移酶

m <sup>6</sup> A甲基转移酶	底物
METTL3/14	大部分m <sup>6</sup> A修饰，其中包括mRNA <sup>[27]</sup> 、ABHD11-AS1 lncRNA <sup>[28]</sup> 和has-mir-186 miRNA <sup>[29]</sup> 等
METTL16	U6 snRNA、哺乳动物MAT2A和线虫sams的pre-mRNA以及拟南芥中若干mRNA <sup>[21, 30]</sup>
METTL5	18S rRNA <sup>[31]</sup>
ZCCHC4	28S rRNA <sup>[32]</sup>

## 1 METTL16及其同源蛋白的结构

METTL16是一个保守蛋白质，在哺乳动物中有562个氨基酸，可以分为N端RNA结合域(RBD)、甲基转移酶结构域和脊椎动物保守区(VCR)(图1)<sup>[24]</sup>，而在大肠杆菌、线虫和果蝇等低等生物中只有N端的两个结构域，没有VCR区域<sup>[20]</sup>。不同于METTL3/14复合物的异源二聚体，

全长的METTL16是以同源二聚体形式存在<sup>[33]</sup>，而且METTL16在没有VCR域的情况下是单体，并且其甲基化活性也不会消除。

### 1.1 甲基转移酶结构域

METTL16蛋白N端残基1~291一直以来都被认为是甲基转移酶结构域，直到2018年Ruszkowska等<sup>[23]</sup>才发现它是由残基40~291组成。该结构域高度保守(图2)，其结构中有一个由正电荷簇形成的宽沟槽<sup>[24]</sup>，该沟槽主要是与RNA中带负电的磷酸主链相互作用。SAM的腺苷部分由Thr164残基识别，结合在甲基转移酶结构域的疏水袋中，通过氢键与其残基相互作用<sup>[24]</sup>。METTL16中残基184~187 NPPF是活性位点，在所有生物体中都保守，位于SAM结合位点和正电荷沟槽之间，将这些残基进行突变(如PP185/186AA和F187G)则会破坏METTL16的甲基化活性<sup>[22]</sup>。METTL16中的Arg200是组成构象的关键残基，它能和RNA直接接触，在大肠癌患者中该氨基酸突变为谷氨酰胺，Doxtader等<sup>[33]</sup>发现，R200Q突变会显著提高其甲基化活性，但不影响其与RNA的亲合力。在这段区域中还包含一段由190~218残基组成的无序环，将其删除会破坏其甲基化活性，而突变3个氨基酸(即RRR-200-203-204-EEE)就可以恢复其甲基化作用<sup>[22]</sup>。

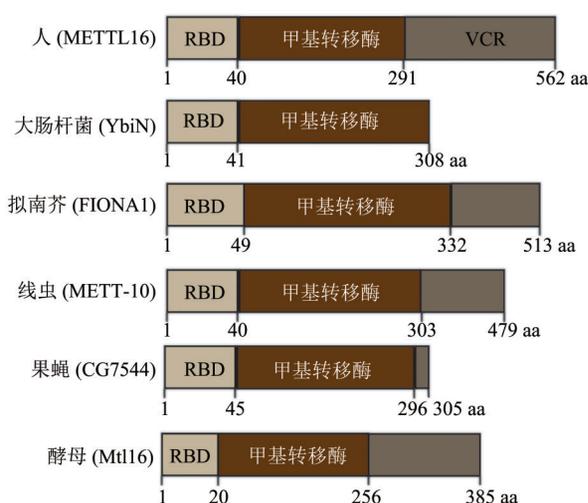


Fig. 1 METTL16 homolog domain

图1 METTL16同源蛋白结构域

不同物种中METTL16的结构域: RNA结合域(RBD)、甲基转移酶域和脊椎动物保守域(VCR)域。



METTL16的甲基转移酶结构域中一个比较特别的方面是残基163~167会形成一个有序多肽环(K-Loop), METTL16可以通过K-Loop阻断SAM进入疏水袋从而降低甲基化效率。当没有结合RNA时Lys163暴露在外, 其他的疏水侧链如Met167也远离SAM结合位点, 而结合RNA后会通过疏水作用将K-Loop靶向至甲基转移酶结构域, 导致Lys163的侧链占据SAM催化袋从而封闭SAM结合位, 所以在不同SAM浓度下METTL16会通过调节K-Loop构象从而调节其甲基化效率。用丙氨酸取代K-Loop的氨基酸会显著增加其甲基化活性, 即使在较低浓度的SAM条件下也能表现较高的甲基化水平, 而对RNA的亲合力影响微乎其微<sup>[33]</sup>。

### 1.2 N端RNA结合域

Mendel等<sup>[22]</sup>把N端前40个残基归为RNA结合域, 因为他们发现敲除METTL16前40个残基后无法与RNA相互作用从而进行甲基化。METTL16的N端结构域中存在几个高度保守的极性正电荷残基, 这些残基形成了一个足以容纳双链RNA的沟槽, 该沟槽可以和RNA带负电的磷酸主链相互作用。即使甲基转移酶结构域中也包含一个正电荷沟槽, 沟槽内排列着能够吸引带负电荷RNA的氨基酸, 但它本身并不足以将RNA保留在沟槽内, 所以N端的RNA结合域对于METTL16的甲基化作用至关重要, 将该结构域的带电残基突变会影响与RNA的结合, 进而破坏对RNA的甲基化<sup>[22-23]</sup>。

### 1.3 高等生物特有的VCR结构域

VCR结构域是高等生物中特有的一段区域, 位于人METTL16蛋白C端的310~562残基, 该区域包括VCR1(残基310~400)、VCR2(残基514~562)以及两者连接区域(残基401~513)。由于VCR之间跨越了残基514~562这一段长的无序区域, 所以直到2020年才通过去除两个VCR之间的连接区域确定了该区域的晶体结构<sup>[21]</sup>。Aoyama等<sup>[21]</sup>发现, METTL16的N端残基1~291的蛋白质就具有甲基化活性, 而C端VCR结构域能够进一步提高N端片段对底物的亲合力从而增强甲基化效率。METTL16富含精氨酸的“RRR”区域(残基382~388)缺失会影响METTL16与RNA的结合活性从而使其甲基化活性降低, VCR在拓扑结构上与U6特异性末端尿苷酰转移酶(TUT1)的激酶相关1(KA1)结构域同源, 它主要是通过通过与RNA结合发挥作用<sup>[34-35]</sup>。Aoyama等<sup>[21]</sup>在体外纯化了N

端结构域和KA1的重组蛋白, 发现这个蛋白质的甲基化效率比单独的N端蛋白质高, 而且突变KA1的RNA结合位点明显降低了其甲基化效率, 所以他们认为在METTL16中VCR域作为一个钳子结合双链RNA。虽然这些结构域在结构上有高度同源性, 但是在序列上并没有很高的相似性<sup>[36]</sup>。目前关于METTL16的VCR靶向RNA的序列特异性并不清楚。

## 2 METTL16的甲基化功能

目前为止已经证实了METTL16的底物, 包括哺乳动物MAT2A、线虫sams的pre-mRNA、U6 snRNA以及拟南芥中若干mRNA, 其中SAM合成酶的pre-mRNA和U6底物中都包含保守的UACAGAGAA序列(下划线处是甲基化位点), 但是在人类中具有这个序列的mRNA大部分都没有被甲基化<sup>[20]</sup>。为了寻找底物特征, 研究者们针对U6和MAT2A pre-mRNA构建了一系列的突变, 发现它们都需要这9个保守碱基和茎环结构才能被甲基化<sup>[22, 33]</sup>, 但最新的研究却发现, 在拟南芥中METTL16同源蛋白FIONA1的甲基化作用既不需要这9个保守碱基也不需要二级结构<sup>[30]</sup>, 目前发现的METTL16的靶点还十分有限, 其底物共性尚不明确。

### 2.1 U6 snRNA

U6是一个非编码的snRNA, 它与其他snRNA和蛋白质组装成一个剪接体复合物参与pre-mRNA的剪接过程。大约40年前就发现U6的A43处有一个m<sup>6</sup>A修饰, 并位于发夹结构的茎突处<sup>[37]</sup>, 在酵母中突变该位点会导致死亡<sup>[38]</sup>。直到2017年才证明了METTL16是其甲基转移酶<sup>[24]</sup>, Warda等<sup>[39]</sup>认为METTL16很有可能是在U6与其他部分结合之前发挥其甲基化作用。

除了酿酒酵母的U6上没有该修饰外, 裂殖酵母以及更高级的生物中均有该修饰, 尽管U6中m<sup>6</sup>A附近区域对于指导剪接是很有必要的, 但其m<sup>6</sup>A修饰的具体作用仍然不明确<sup>[40]</sup>。Warda等<sup>[39]</sup>发现, 在细胞中敲低METTL16并不会影响U6的整体表达水平, 而U6上的m<sup>6</sup>A水平明显降低了。在小鼠、细胞和拟南芥中发现敲除METTL16后并没有发现明显的整体剪接变化, 但最近在裂殖酵母中发现U6上的m<sup>6</sup>A修饰对5'端剪接位点为非“AAG”且第4位内含子为“A”碱基的剪接有促

进作用<sup>[40]</sup>。这是目前唯一关于U6上m<sup>6</sup>A修饰作用的研究,而在其他生物中的作用目前尚不可知。

## 2.2 MAT2A pre-mRNA 3'UTR

SAM作为细胞内一种重要代谢物,是DNA、RNA和蛋白质大多数甲基化反应的甲基供体,对基因的正常调控至关重要。细胞内SAM的水平受到严格调控,这与细胞增殖、免疫和衰老有关。MAT2A是催化甲硫氨酸和三磷酸腺苷(ATP)生成SAM的关键酶<sup>[41]</sup>。2017年的研究发现在细胞中METTL16通过负反馈机制调节MAT2A pre-mRNA的剪接以调控细胞内的SAM稳态<sup>[24]</sup>(图3)。而且敲除METTL16的小鼠能发育到囊胚时期,但在着床后会停止发育死亡,转录组测序发现在该小鼠中MAT2A含量显著降低,并且着床前清除了基因的大量甲基化,而着床后要恢复其正常水平,所以作者认为MAT2A的降低造成了小鼠的死亡<sup>[22]</sup>。MAT2A的3'UTR处包含6个发夹结构(hp1~6),其序列、结构和位置都很相似<sup>[42]</sup>,环中都有近乎不变的“UACAGAGAA”序列,这些发夹结构通过不同的机制参与METTL16介导的细胞调控。在体外METTL16能分别对这6个发夹结构进行甲基化,但其效率不同,其中hp5的效率最高<sup>[33]</sup>。METTL16能够直接结合hp1,根据细胞内SAM浓度调控MAT2A的剪接。当SAM浓度较高时,METTL16会结合hp1并进行甲基化,然后快速解离以保留有内含子的亚型,随后该亚型被YTHDC1识别并降解<sup>[43]</sup>,可能m<sup>6</sup>A修饰会降低METTL16与RNA的结合能力从而引发了这一现象。而当SAM浓度较低时,METTL16虽然无法对hp1进行甲基化,但会增加在pre-mRNA的滞留时间导致内含子剪接变多,从而表达更多成熟的mRNA用来翻译MAT2A蛋白。METTL16酶活位点突变不影响成熟mRNA的形成,而RNA结合位点突变则会对它产生影响,这就说明了METTL16的结合作用对于诱导MAT2A pre-mRNA的剪接至关重要<sup>[24]</sup>。蛋白质结构分析叙述了METTL16的VCR结构域是通过促进蛋白质与RNA结合发挥作用,而这段区域只存在脊椎动物中,这可能是METTL16只在高等动物中才能驱动剪接,而在低等动物中目前还没发现这个作用的原因。

## 2.3 线虫sams pre-mRNA

线虫METT-10是METTL16的同源蛋白质,都

是SAM合成酶pre-mRNA的甲基转移酶。但与哺乳动物不同的是,在线虫sams pre-mRNA的内含子2和外显子3连接处发现有一个m<sup>6</sup>A修饰,并且将METT-10敲除后就检测不到该修饰了,体外实验也证实了METT-10能对该位点进行甲基化(图3)。与METTL16甲基化底物中都包含的保守序列UACm<sup>6</sup>AGAGAA相比,sams的m<sup>6</sup>A位点附近UACm<sup>6</sup>AGAAAC序列有一个碱基的差别,这个修饰位于剪接位点而且在低等生物中这段区域比较保守。在线虫的剪接过程中,U2辅助因子35(U2 auxiliary factor 35,U2AF35)需要结合3'端的AG二核苷酸以招募U2AF复合体从而剪接出成熟的mRNA。当SAM含量不足时,METT-10无法对sams的pre-mRNA进行m<sup>6</sup>A甲基化从而能合成编码蛋白质的mRNA,而SAM含量较高时,METT-10会对sams pre-mRNA的3'剪接位点AG的腺嘌呤上进行m<sup>6</sup>A甲基化,U2AF35与有m<sup>6</sup>A修饰位点的亲和力降低从而会影响其正确剪接,进而导致它的降解,以此调控机体内SAM的稳态<sup>[44-45]</sup>。目前针对线虫中sams的降解机制有两种,其中一种机制是U2AF35虽然无法结合到正确的剪接位点进行剪接,但是它会结合另一个近3'端剪接位点进行剪接产生无意义的mRNA亚型,从而被降解(图3),另一种则是没有剪接过程而是pre-mRNA直接进行降解,这两种降解机制虽然有些许差异,但其生物学意义一致。其他无脊椎动物的SAM合成酶是否符合上述的剪接调控机制需要进一步证实<sup>[44]</sup>。在拟南芥中METTL16同源蛋白FIONA1无论是在低或者高SAM条件下,都不会对SAM合成酶的pre-mRNA进行甲基化,也不会影响它的转录水平<sup>[30]</sup>。

虽然在哺乳动物和线虫中METTL16及其同源蛋白质调控SAM的机制不一样,但调控的生物学功能一样(图3)。在哺乳动物中发现METTL16还有帮助MAT2A pre-mRNA剪接的功能,所以METTL16的敲除会使机体中的SAM含量减少,研究者们猜测VCR结构域对METTL16的剪接功能至关重要。线虫中并无这一结构域,敲除METT-10远3'端剪接位点缺少甲基化修饰,从而能正确剪接合成成熟的mRNA使SAM含量增多<sup>[44]</sup>,关于这一现象目前并没有一个合理的解释,猜测可能是因为物种进化导致的。

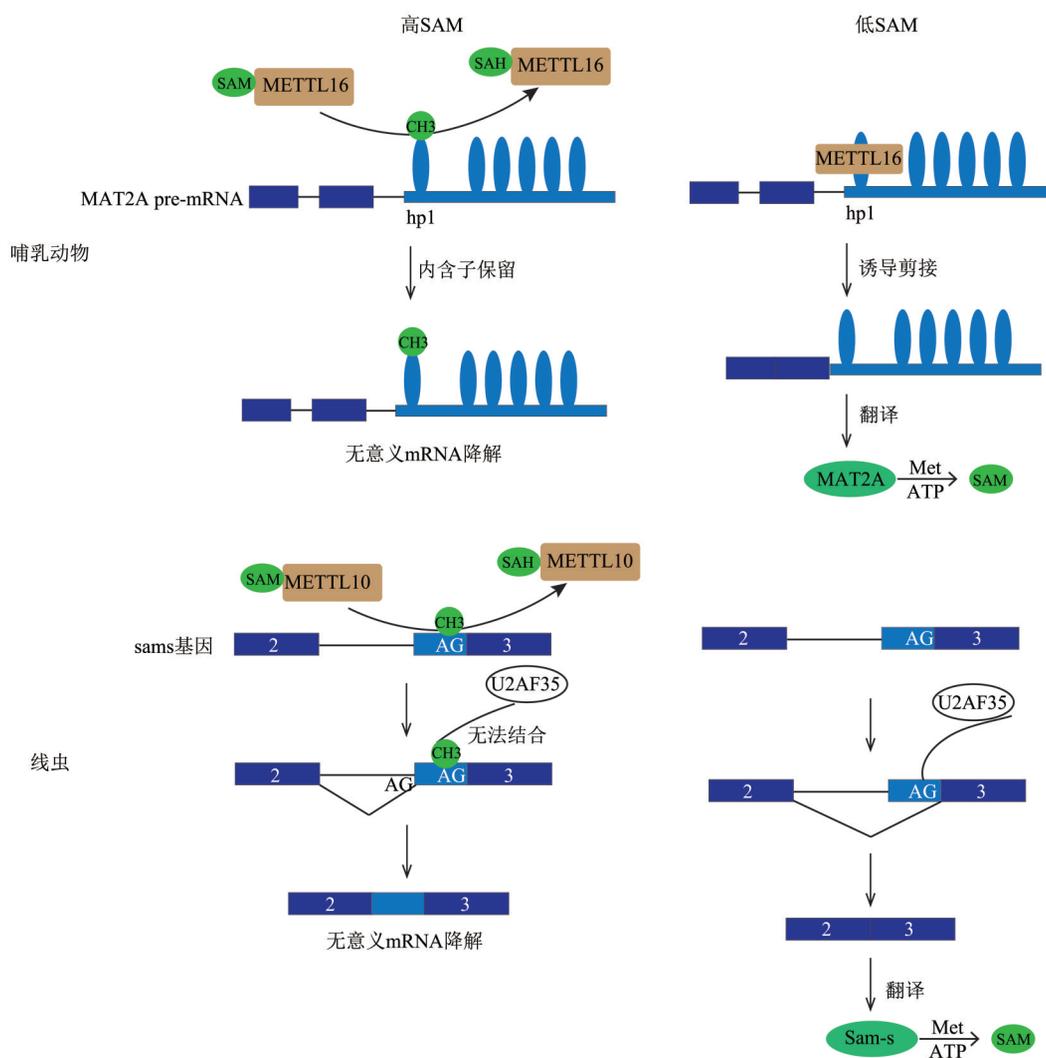


Fig. 3 The mechanisms of SAM biogenesis in mammals and *C. elegans*

图3 哺乳动物和线虫调控SAM机制

### 3 METTL16非酶活功能

METTL16的甲基转移酶和非酶活功能一直以来备受关注。与MALAT1 lncRNA之间的相互作用很早就发现了，但其是否依赖甲基转移酶活性尚不明确。另外还发现，METTL16以一种不依赖甲基转移酶功能促进翻译，这都说明METTL16拥有了除了甲基转移酶功能以外的其他作用。

#### 3.1 MALAT1 lncRNA

MALAT1是一种在哺乳动物中常见的高度保守的核保留lncRNA，2003年首次发现于非小细胞肺癌中，它在多种肿瘤中高表达，能促进肿瘤细胞的增殖、转移和侵袭等。研究发现，MALAT1 3'端

形成的三螺旋结构可以保护MALAT1免受3'→5'核酸外切酶的剪切，从而维持MALAT1的完整性，并使其在细胞中积累<sup>[46-47]</sup>。体内外实验均证明METTL16能特异性识别MALAT1的3'端三螺旋结构<sup>[25]</sup>，而且MALAT1与METTL16同源二聚体相互作用，而不与无VCR结构域的METTL16相互作用。虽然发现MALAT1与METTL16相互作用的位点附近有一个m<sup>6</sup>A修饰的腺苷<sup>[48]</sup>，但它们之间的结合是否涉及甲基化尚不清楚<sup>[23]</sup>。

#### 3.2 METTL16促进蛋白质翻译

METTL16在细胞核和细胞质中皆存在，且其定位不依赖甲基转移酶活性，其甲基化修饰作用在细胞核中完成，而在胞质中它可能发挥其他功能。

在人细胞中观察发现, 敲除 METTLL16 会显著降低翻译效率, 进一步研究也表明 METTLL16 促进翻译的功能不依赖于其甲基转移酶功能。mRNA 的 5'端 m<sup>7</sup>G 帽子和真核翻译起始因子 3 (eukaryotic translation initiation factor 3 subunit, eIF3) 在翻译起始过程中发挥着至关重要的作用, METTLL16 以不依赖 RNA 的方式与 eIF3a/b 和 m<sup>7</sup>G 特异性结合, 表明 METTLL16 可能参与翻译起始。对 METTLL16 的结构进行突变后发现, 其甲基转移酶结构域对于与 eIF3a/b 和 5'帽区的相互作用以及促进翻译起始是必需的, 同时研究也发现 METTLL16 与核糖体 RNA 相互作用, 且有助于翻译起始复合物的组装并促进 4 000 多个 mRNA 转录本的翻译<sup>[26]</sup>。

#### 4 METTLL16其他功能

MAT2A pre-mRNA、U6 snRNA 和 MALAT1 lncRNA 是目前比较明确的与 METTLL16 有相互作用的 RNA, 还有其他几种类型的 RNA 也认为是 METTLL16 潜在的相互作用者, 其中 rRNA 在 METTLL16 的免疫沉淀中大量富集, 但敲除 METTLL16 并不会导致 rRNA 总体表达出现差异, 猜测可能是 rRNA 在细胞中含量太多而导致的非特异结合<sup>[39]</sup>。在大肠杆菌中发现 METTLL16 的同源基因编码的 RlmF 和 RlmJ 蛋白对 23S rRNA 进行 m<sup>6</sup>A 甲基化<sup>[49]</sup>, 然而在脊椎动物中却发现 rRNA 上的 m<sup>6</sup>A 修饰是由另外两种甲基转移酶介导的<sup>[32, 50]</sup>, 所以目前 METTLL16 与 rRNA 的关系还不明确。MAT2A 是 METTLL16 在 mRNA 中研究较多的一个靶点, 在老鼠和拟南芥中也发现 METTLL16 能甲基化几种 mRNA, 但其共性和具体功能尚不明确, 同时还发现了一些其他潜在的 mRNA 结合靶点, 包括 RBM3、STUB1 和 NT5DC2 以及 β2M、HIF-1α 和 MYC 等, 但需要进一步研究明确<sup>[39]</sup>。

#### 5 METTLL16在癌症中的作用

m<sup>6</sup>A 修饰影响许多生物学过程, 越来越多的研究表明与 m<sup>6</sup>A 相关的蛋白质在肿瘤的发生发展中起着重要作用, 如宫颈癌<sup>[51]</sup>、前列腺癌<sup>[52]</sup>、乳腺癌<sup>[53]</sup>等。METTLL3 已成为肝癌预后的潜在生物标志物<sup>[54]</sup>, 并且针对 METTLL3 开发出了能有效缓解急性髓系白血病的小分子抑制剂<sup>[55]</sup>。一些报告表明 METTLL16 也与癌症有关, 如在肝癌和乳腺癌中 METTLL16 异常过表达, 而且其表达的增加与不良预后相关<sup>[26, 56-57]</sup>; 在大肠癌中存在 METTLL16 重要残基的突变<sup>[58]</sup>; 在胃癌中 METTLL16 表达水平升高, 并通过增强 cyclin D1 mRNA 的稳定性促进胃癌细胞的增殖<sup>[59]</sup>。与 METTLL16 相互作用的 MALAT1 能特异性识别致癌基因, 但目前关于这一方面的作用是未知的, 有推测认为这与肿瘤发生相关<sup>[25]</sup>。

#### 6 结语与展望

综上所述, METTLL16 的功能总结如表 2, 但依然还有很多未知, 目前针对它甲基化 SAM 合成酶的 pre-mRNA 和 U6 snRNA 研究较多, 其是否存在其他的底物以及底物特异性和共性是什么, 都需要进一步的研究。U6 是剪接复合体的酶活中心, 其 m<sup>6</sup>A 位点处高度保守, 但仅在酵母中发现其影响某一类 RNA 的剪接, 在其他模式生物中是否也适用这一机制或者有别的具体调控机制还需要探索。METTLL16 可能也直接参与 MAT2A pre-mRNA 剪接过程, 但具体机制尚不明确。最新研究发现, METTLL16 缺失显著抑制了人肝癌细胞的生长、迁移和侵袭, 而且 METTLL16 的甲基转移酶结构域对其甲基化依赖和非甲基化活性都至关重要, 开发针对该结构域的有效抑制剂在癌症治疗中具有巨大的治疗潜力<sup>[26]</sup>。

Table 2 Biological functions of METTLL16

表2 METTLL16的生物学功能

分类	功能
甲基化功能	a. 通过甲基化修饰U6 snRNA调控某一类pre-mRNA的剪接m <sup>6</sup> A b. METTLL16调节MAT2A/sams的剪接以调控细胞内SAM的稳态
非m <sup>6</sup> A甲基化功能	a. METTLL16与MALAT1 lncRNA相互作用不依赖甲基化活性, 功能未知 b. METTLL16能够促进翻译且不依赖于甲基化活性

## 参 考 文 献

- [1] Roundtree I A, Evans M E, Pan T, *et al.* Dynamic RNA modifications in gene expression regulation. *Cell*, 2017, **169**(7): 1187-1200
- [2] Motorin Y, Helm M. RNA nucleotide methylation. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 2011, **2**(5): 611-631
- [3] Lee M, Kim B, Kim V N. Emerging roles of RNA modification: m(6)A and U-tail. *Cell*, 2014, **158**(5): 980-987
- [4] 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**(7): 1635-1646
- [5] Roost C, Lynch S R, Batista P J, *et al.* Structure and thermodynamics of N6-methyladenosine in RNA: a spring-loaded base modification. *J Am Chem Soc*, 2015, **137**(5): 2107-2115
- [6] Xiao W, Adhikari S, Dahal U, *et al.* Nuclear m(6)A reader YTHDC1 regulates mRNA splicing. *Mol Cell*, 2016, **61**(4): 507-519
- [7] Wang X, Lu Z, Gomez A, *et al.* N6-methyladenosine-dependent regulation of messenger RNA stability. *Nature*, 2014, **505**(7481): 117-120
- [8] Wang X, Zhao B S, Roundtree I A, *et al.* N(6)-methyladenosine modulates messenger RNA translation efficiency. *Cell*, 2015, **161**(6): 1388-1399
- [9] 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**(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. *Mol Cell*, 2013, **49**(1): 18-29
- [11] Fustin J M, Doi M, Yamaguchi Y, *et al.* RNA-methylation-dependent RNA processing controls the speed of the circadian clock. *Cell*, 2013, **155**(4): 793-806
- [12] Batista P J, Molinie B, Wang J, *et al.* M(6)A RNA modification controls cell fate transition in mammalian embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*, 2014, **15**(6): 707-719
- [13] Geula S, Moshitch-Moshkovitz S, Dominissini D, *et al.* Stem cells. m6A mRNA methylation facilitates resolution of naive pluripotency toward differentiation. *Science*, 2015, **347**(6225): 1002-1006
- [14] Bokar J A, Rath-Shambaugh M E, Ludwiczak R, *et al.* Characterization and partial purification of mRNA N6-adenosine methyltransferase from HeLa cell nuclei. Internal mRNA methylation requires a multisubunit complex. *J Biol Chem*, 1994, **269**(26): 17697-17704
- [15] Bokar J, Shambaugh M, Polayes D, *et al.* Purification and cDNA cloning of the AdoMet-binding subunit of the human mRNA (N6-adenosine)-methyltransferase. *RNA*, 1997, **3**(11): 1233-1247
- [16] Huang J, Dong X, Gong Z, *et al.* Solution structure of the RNA recognition domain of METTL3-METTL14 N6-methyladenosine methyltransferase. *Protein Cell*, 2019, **10**(4): 272-284
- [17] Śledź P, Jinek M J E. Structural insights into the molecular mechanism of the m6A writer complex. *Elife*, 2016, **5**: e18434
- [18] Liu J, Yue Y, Han D, *et al.* A METTL3-METTL14 complex mediates mammalian nuclear RNA N6-adenosine methylation. *Nat Chem Biol*, 2014, **10**(2): 93-95
- [19] Schwartz S, Mumbach M R, Jovanovic M, *et al.* Perturbation of m6A writers reveals two distinct classes of mRNA methylation at internal and 5' sites. *Cell Rep*, 2014, **8**(1): 284-296
- [20] Satterwhite E R, Mansfield K D. RNA methyltransferase METTL16: targets and function. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 2021, **13**(2): e1681
- [21] Aoyama T, Yamashita S, Tomita K. Mechanistic insights into m6A modification of U6 snRNA by human METTL16. *Nucleic Acids Res*, 2020, **48**(9): 5157-5168
- [22] Mendel M, Chen K M, Homolka D, *et al.* Methylation of structured RNA by the m6A writer METTL16 is essential for mouse embryonic development. *Mol Cell*, 2018, **71**(6): 986-1000
- [23] Ruzskowska A, Ruzskowski M, Dauter Z, *et al.* Structural insights into the RNA methyltransferase domain of METTL16. *Sci Rep*, 2018, **8**(1): 5311
- [24] Pendleton K E, Chen B, Liu K, *et al.* The U6 snRNA m6A methyltransferase METTL16 regulates SAM synthetase intron retention. *Cell*, 2017, **169**(5): 824-835.e4
- [25] Brown J A, Kinzig C G, Degregorio S J, *et al.* Methyltransferase-like protein 16 binds the 3'-terminal triple helix of MALAT1 long noncoding RNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, **113**(49): 14013-14018
- [26] Su R, Dong L, Li Y, *et al.* METTL16 exerts an m(6)A-independent function to facilitate translation and tumorigenesis. *Nat Cell Biol*, 2022, **24**(2): 205-216
- [27] Liu S, Zhuo L, Wang J, *et al.* METTL3 plays multiple functions in biological processes. *Am J Cancer Res*, 2020, **10**(6): 1631-1646
- [28] Xue L, Li J, Lin Y, *et al.* M(6)A transferase METTL3-induced lncRNA ABHD11-AS1 promotes the Warburg effect of non-small-cell lung cancer. *J Cell Physiol*, 2021, **236**(4): 2649-2658
- [29] Alarcon C R, Lee H, Goodarzi H, *et al.* N6-methyladenosine marks primary microRNAs for processing. *Nature*, 2015, **519**(7544): 482-485
- [30] Wang C, Yang J, Song P, *et al.* FIONA1 is an RNA N(6)-methyladenosine methyltransferase affecting *Arabidopsis* photomorphogenesis and flowering. *Genome Biol*, 2022, **23**(1): 40
- [31] Rong B, Zhang Q, Wan J, *et al.* Ribosome 18S m(6)A methyltransferase METTL5 promotes translation initiation and breast cancer cell growth. *Cell Rep*, 2020, **33**(12): 108544
- [32] Ma H, Wang X, Cai J, *et al.* N(6)-Methyladenosine methyltransferase ZCCHC4 mediates ribosomal RNA methylation. *Nat Chem Biol*, 2019, **15**(1): 88-94
- [33] Doxtader K A, Wang P, Scarborough A M, *et al.* Structural basis for regulation of METTL16, an S-adenosylmethionine homeostasis factor. *Mol Cell*, 2018, **71**(6): 1001-1011
- [34] Yamashita S, Takagi Y, Nagaike T, *et al.* Crystal structures of U6 snRNA-specific terminal uridylyltransferase. *Nat Commun*, 2017, **8**: 15788

- [35] Moravcevic K, Mendrola J M, Schmitz K R, *et al.* Kinase associated-1 domains drive MARK/PAR1 kinases to membrane targets by binding acidic phospholipids. *Cell*, 2010, **143**(6): 966-977
- [36] Paung Y, Seeliger M A. KA1 domains: unity in mechanistic diversity. *Structure*, 2018, **26**(8): 1045-1047
- [37] Epstein P, Reddy R, Henning D, *et al.* The nucleotide sequence of nuclear U6(4.7S) RNA. *J Biol Chem*, 1980, **255**(18): 8901-8906
- [38] Madhani H D, Bordonne R, Guthrie C. Multiple roles for U6 snRNA in the splicing pathway. *Genes Dev*, 1990, **4**(12B): 2264-2277
- [39] Warda A S, Kretschmer J, Hackert P, *et al.* Human METTL16 is a N(6)-methyladenosine (m(6)A) methyltransferase that targets pre-mRNAs and various non-coding RNAs. *EMBO Rep*, 2017, **18**(11): 2004-2014
- [40] Ishigami Y, Ohira T, Isokawa Y, *et al.* A single m(6)A modification in U6 snRNA diversifies exon sequence at the 5' splice site. *Nat Commun*, 2021, **12**(1): 3244
- [41] Li C, Gui G, Zhang L, *et al.* Overview of methionine adenosyltransferase 2A (MAT2A) as an anticancer target: structure, function, and inhibitors. *J Med Chem*, 2022, **65**(14): 9531-9547
- [42] Parker B J, Moltke I, Roth A, *et al.* New families of human regulatory RNA structures identified by comparative analysis of vertebrate genomes. *Genome Res*, 2011, **21**(11): 1929-1943
- [43] Shima H, Matsumoto M, Ishigami Y, *et al.* S-adenosylmethionine synthesis is regulated by selective N(6)-adenosine methylation and mRNA degradation involving METTL16 and YTHDC1. *Cell Rep*, 2017, **21**(12): 3354-3363
- [44] Mendel M, Delaney K, Pandey R R, *et al.* Splice site m6A methylation prevents binding of U2AF35 to inhibit RNA splicing. *Cell*, 2021, **184**(12): 3125-3142.e25
- [45] Watabe E, Togo-Ohno M, Ishigami Y, *et al.* M(6)A-mediated alternative splicing coupled with nonsense-mediated mRNA decay regulates SAM synthetase homeostasis. *EMBO J*, 2021, **40**(14): e106434
- [46] Brown J A, Bulkley D, Wang J, *et al.* Structural insights into the stabilization of MALAT1 noncoding RNA by a bipartite triple helix. *Nat Struct Mol Biol*, 2014, **21**(7): 633-640
- [47] Wilusz J E, Jnbaptiste C K, Lu L Y, *et al.* A triple helix stabilizes the 3' ends of long noncoding RNAs that lack poly(A) tails. *Genes Dev*, 2012, **26**(21): 2392-2407
- [48] Jin D, Guo J, Wu Y, *et al.* M6A mRNA methylation initiated by METTL3 directly promotes YAP translation and increases YAP activity by regulating the MALAT1-miR-1914-3p-YAP axis to induce NSCLC drug resistance and metastasis. *J Hematol Oncol*, 2019, **12**(1): 135
- [49] Sergiev P V, Serebryakova M V, Bogdanov A A, *et al.* The ybiN gene of *Escherichia coli* encodes adenine-N6 methyltransferase specific for modification of A1618 of 23S ribosomal RNA, a methylated residue located close to the ribosomal exit tunnel. *J Mol Biol*, 2008, **375**(1): 291-300
- [50] Xing M, Liu Q, Mao C, *et al.* The 18S rRNA m6A methyltransferase METTL5 promotes mouse embryonic stem cell differentiation. *EMBO Rep*, 2020, **21**(10): e49863
- [51] Zhou S, Bai Z L, Xia D, *et al.* FTO regulates the chemoradiotherapy resistance of cervical squamous cell carcinoma (CSCC) by targeting  $\beta$ -catenin through mRNA demethylation. *Mol Carcinog*, 2018, **57**(5): 590-597
- [52] Liu Z X, Li L M, Sun H L, *et al.* Link between m6A modification and cancers. *Front Bioeng Biotechnol*, 2018, **6**: 89
- [53] Cai X, Wang X, Cao C, *et al.* HBXIP-elevated methyltransferase METTL3 promotes the progression of breast cancer *via* inhibiting tumor suppressor let-7g. *Cancer Lett*, 2018, **415**: 11-19
- [54] Liu G M, Zeng H D, Zhang C Y, *et al.* Identification of METTL3 as an adverse prognostic biomarker in hepatocellular carcinoma. *Dig Dis Sci*, 2021, **66**(4): 1110-1126
- [55] Yankova E, Blackaby W, Albertella M, *et al.* Small-molecule inhibition of METTL3 as a strategy against myeloid leukaemia. *Nature*, 2021, **593**(7860): 597-601
- [56] Wang P, Wang X, Zheng L, *et al.* Gene signatures and prognostic values of m6A regulators in hepatocellular carcinoma. *Front Genet*, 2020, **11**: 540186
- [57] Zhang B, Gu Y, Jiang G. Expression and prognostic characteristics of m(6) A RNA methylation regulators in breast cancer. *Front Genet*, 2020, **11**: 604597
- [58] Giannakis M, Mu X J, Shukla S A, *et al.* Genomic correlates of immune-cell infiltrates in colorectal carcinoma. *Cell Rep*, 2016, **17**(4): 1206
- [59] Wang X K, Zhang Y W, Wang C M, *et al.* METTL16 promotes cell proliferation by up-regulating cyclin D1 expression in gastric cancer. *J Cell Mol Med*, 2021, **25**(14): 6602-6617

## The Functions of Fiona/Mett10/Mettl16 Family of m<sup>6</sup>A Methyltransferases

GONG Juan<sup>1,3</sup>), HUANG Wu-Qiang<sup>2,3</sup>)\*, RONG Yi-Kang<sup>3</sup>)\*

<sup>1</sup>College of Pharmacy, School of Medicine, University of South China, Hengyang 421001, China;

<sup>2</sup>The Second Hospital, School of Medicine, University of South China, Hengyang 421001, China;

<sup>3</sup>School of Basic Medical Sciences, University of South China, Hengyang 421001, China)

**Abstract** Chemical modifications of RNA bases play essential roles in finetuning the functions of the modified RNA species. The m<sup>6</sup>A modification is one of the most prevalent RNA modifications in nature with important functions in RNA stability, pre-mRNA splicing, translational regulations and likely others. m<sup>6</sup>A modifications in eukaryotes are believed to be mainly carried out by two related methyltransferases, METTL3 and METTL16 based on mammalian nomenclature. METTL16, similar to METTL3, has a large variety of RNA substrates, including pre-mRNA, rRNA, snRNA and lncRNA. Therefore, a unifying molecular function seems farfetched for the METTL16-installed m<sup>6</sup>A modification. In addition, METTL16 carries out important function in translational regulation independent of its methyltransferase activity, adding another layer of functional complexity to this highly conserved enzyme. In this review, we summarize the domain architecture of METTL16 and homologous proteins, indicating the conserved functional domains as well as the mammalian specific VCR domain suggestive of additional function of the higher enzymes. We summarize the confirmed METTL16-methylated RNA substrates as the pre-mRNA for SAM synthetase (MAT) in men and worms, and the U6 small nuclear RNA (snRNA) in yeast, plants, worms and men. Although the role of m<sup>6</sup>A modification in regulating SAM levels by alternative splicing might represent a case of convergent evolution, this proposition lacks support from plant studies of METTL16. The lack of m<sup>6</sup>A modification on U6 snRNA, an essential component of the spliceosome, has been identified in genome-wide studies as the cause for the splicing defects of specific introns in yeast and plants. How much of this function of U6 modification is conserved remains unclear. Mammalian METTL16 has been shown to carry out methylation-independent function by interacting with the machinery for protein synthesis. In addition, METTL16 was originally identified as the interacting protein of the triple-helix forming MALAT1, a long non-coding RNA highly expressed in certain tumors. However, whether MALAT1 is a methylation substrate of METTL16 and what underlies the biological significance of the METTL16-MALAT1 interaction remain under characterized. While knock-out mutants of METTL3 proteins suffer mild organismal consequences, those of METTL16 cause much more severe physiological abnormalities. How the conserved METTL16 enzymes fulfill an array of diverse and essential functions promises to be one of the fascinating directions in RNA biology.

**Key words** METTL16, m<sup>6</sup>A modification, U6 snRNA, Sam-synthetase

**DOI:** 10.16476/j.pibb.2022.0388

\* Corresponding author.

RONG Yi-Kang. Tel: 86-13762472977, E-mail: nhoffbus@outlook.com

HUANG Wu-Qiang. Tel: 86-15920821198, E-mail: johntozs@126.com

Received: August 17, 2022 Accepted: January 19, 2023