# 植物mRNA m6A甲基化精准编辑工具

遗传信息的表达经历了一个复杂的调控过程，RNA上发生的各种变化会影响mRNA的代谢与功能。在mRNA的生命周期中，细胞可以通过写入或者移除动态可逆的RNA化学修饰来高效调节基因表达，从而迅速响应外界环境变化。已知RNA存在超过160种以上的修饰方式。其中，N6-甲基腺苷（m6A）是真核生物mRNA最普遍的内部修饰，可能引起mRNA配对、热动力和折叠性能的改变，从而影响RNA的可变剪接、翻译、细胞定位、稳定性以及与蛋白的相互作用，在调节植物生长发育和抗逆性中起着重要作用。以往对植物中m6A功能分析的研究，多数是利用遗传扰动如敲除、超表达方式进行的。然而，直接增加或删除m6A系统的任何关键组分会导致植物中m6A修饰的总体水平发生变化，产生的影响无法预测。因此，开发新型m6A定点编辑工具来调节动态可逆的m6A修饰，通过转录后调控途径来调控基因表达，可以为理解植物表观遗传调控和改善植物农艺性状提供了新的遗传工具。

2024年9月4日，华中农业大学棉花遗传改良团队在Advanced Science杂志在线发表了题为"**CRISPR/dCas13(Rx) Derived RNA N6-methyladenosine (m6A) Dynamic Modification in Plant**"的研究论文，开发出基于CRISPR/dCas13(Rx)的新型植物RNA甲基化编辑工具。



作者将无RNA切割活性的dCas13(Rx)作为靶向RNA的锚定蛋白，分别与甲基转移酶 *GhMTA*（靶向RNA甲基化编辑器，TME）或去甲基转移酶*GhALKBH10*（靶向RNA去甲基化编辑器，TDE）结合起来，开发出了可编程的m6A编辑工具TME和TDE。亚细胞定位和Western 印迹分析显示，TDE，TME以及阳性对照dCas13(Rx)均在植物细胞中成功表达并定位在植物细胞的特定区域。



经遗传转化获得的编辑植株的蛋白组数据表明所有植株中dCas13d蛋白正常表达。在检测靶标基因*GhECA1*的蛋白表达水平时，发现目标基因*GhECA1*的蛋白在TDE编辑材料中出现不同程度的表达降低，而在多个TME编辑材料中出现不同程度的表达增加。因此，作者推测特定m6A位点修饰水平的改变与下游的蛋白表达之间可能存在因果关系。



研究结果进一步表明m6A编辑器TME和TDE能在棉花基因组中在内转录本*GhECA1*和*GhDi19*的目标位点有效增加或降低m6A修饰，在0至46nt的宽编辑窗口内均可以实现高效编辑。TDE编辑器明显降低了24%~76%的m6A水平，而TME编辑器则实现了m6A富集水平增加1.37倍~2.51倍。最重要的是，用TME编辑植物靶向*GhDi19*转录本会显著增加根长并增强抗旱性。作者通过对编辑*GhECA1*植株进行MeRIP-seq，RNA-seq以及ATAC-seq联合分析，进一步证明了该编辑工具有较好的编辑特异性和较低的脱靶效应。



基于以上研究作者提出了一个完整m6A编辑平台的工作模型，以研究与作物产量、品质和抗逆性相关的特定m6A修饰位点的功能。首先利用单碱基分辨率的高通量测序技术，确定可能在植物生长、发育或抗逆过程中具有关键生物学功能的特定m6A位点。随后，m6A编辑工具在设计的gRNA引导下增加或降低特定的m6A修饰水平。获得经m6A编辑的突变体，并通过多代鉴定其表型，筛选出具有更好农艺性状的“理想植物”。



据悉这是金双侠课题组在基因编辑工具开发和分子育种应用方面的又一新进展，前期该课题组开发了Cas9, Cas12a, Cas12b, CBE, ABE, ABE8e, dCas9-TV, Cas13等工具，能够在靶标位点进行敲除、敲入、敲高、敲低、SNP点突变等精准修饰，并利用这些工具创制了棉籽无棉酚、高油酸、除草剂抗性、抗虫、彩色棉花等优异新种质，为棉花功能基因组研究和分子设计育种提供了完备的工具箱和技术体系。

（Zhang et al., 2018, PBJ, Li et al., 2019, PBJ; Wang et al., 2020, PBJ; Qin et al., 2020, PBJ; Li et al., 2020, PBJ; Hakim et al., 2020, Advanced Science; Wang et al., 2022, BMC Biology; Yu et al., 2023, Plant Communications; Sun et al., 2023, Advanced Science; Wang et al., 2024, Genome Biology; Hui et al., 2024, iMeta; Wang et al., 2024, Plant Communications;）。