综述与专论

动物中 DNA 甲基转移酶 2 研究进展

吕　丹，张连峰

(北京协和医学院，中国医学科学院医学实验动物研究所，卫生部人类疾病比较医学重点实验室，北京　100021)

【摘要】 哺乳动物中 DNA 甲基转移酶家族包括 DNA 甲基转移酶 1(DNA methyltransferase 1, Dnmt1)，DNA 甲基转移酶 2(DNA methyltransferase 2, Dnmt2，也叫做天冬氨酸 tRNA 甲基转移酶 1(tRNA aspartic acid methyltransferase 1, TRDMT1))和 DNA 甲基转移酶 3(DNA methyltransferase 3, Dnmt3)。Dnmt2 在进化史上比 Dnmt1 和 Dnmt3 更古老，存在于更多物种中，包括植物、真菌、寄生虫、昆虫、鱼类、两栖类、鸟类和哺乳动物，但其生化学机制和生物学功能仍不十分清楚，已有研究报道也存在许多矛盾之处。本文仅就 Dnmt2 在动物中的研究，包括其结构特点，对 RNA 甲基化的作用及相关生物学表型的研究进展作一总结。

【关键词】 Dnmt2；甲基化；RNA；功能

【中图分类号】R33　**【文献标识码】**A　**【文章编号】**1671-7856(2015) 02-0046-04

doi: 10.3969.j.issn.1671.7856. 2015.002.012

Research progress of DNA methyltransferase 2 in animals

LU Dan, ZHANG Lian-feng

(Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine, Ministry of Heath, Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences & Comparative Medical Center, Peking Union Medical College, Beijing 100021, China)

【Abstract】 There are three members in DNA methyltransferase family of mammals, DNA methyltransferase 1 (Dnmt1), DNA methyltransferase 2 (Dnmt2, also named tRNA aspartic acid methyltransferase 1, TRDMT1) and DNA methyltransferase 3 (Dnmt3). Dnmt2 is immemorial than Dnmt1 and Dnmt3, and it exists in plant, fungi, parasites, insects, fish, amphibians, aves and mammalia, however, its biological function is still unknown. The structure characteristics, RNA methylation, function analysis and scientific problems are discussed in this paper.

【Key words】 Dnmt2; Methylation; RNA; Function; Animals

DNA 甲基化是一种在原核和真核生物基因组中常见的复制后修饰，是基因组信息流调控的重要方式，参与染色体结构维持、基因调控、RNA 降解、基因印记和 X 染色体灭活等重要的生理生化过程，并通过基因组信息流的调控影响胚胎发育、组织维持、衰老和疾病发生。哺乳动物中有两类 DNA 甲基转移酶，第一类是 DNA 甲基转移酶 1(DNA methyltransferase 1, Dnmt1)负责 DNA 甲基化水平的维持。第二类包含 DNA 甲基转移酶 3A(DNA methyltransferase 3A, Dnmt3A)，DNA 甲基转移酶 3B (DNA methyltransferase 3B, Dnmt3B)和 DNA 甲基转移酶 3L(DNA methyltransferase 3L, Dnmt3L)，负责 DNA 的初始甲基化。

DNA 甲基转移酶家系中还有一个成员，即 DNA

[基金项目]北京市自然科学基金(7122111)；国家自然科学基金(31301932)。

[作者简介]吕丹(1980 -)，女，副研究员，研究方向：心肌病及高血压相关动物模型建立及相关调节基因功能研究。E-mail: lvd@cnilas.org。

[通讯作者]张连峰，E-mail: zhanglf@cnilas.org。

甲基转移酶 2(DNA methyltransferase 2，Dnmt2)，也叫做天冬氨酸 tRNA 甲基转移酶 1(tRNA aspartic acid methyltransferase 1，TRDMT1)。Dnmt2 在进化史上比 Dnmt1 和 Dnmt3s 更古老，存在的物种更广泛，包括植物、真菌、寄生虫、昆虫、鱼类、两栖类、鸟类和哺乳动物[1]，其生化学机制和生物学功能一直不十分清楚，已有研究报道也存在许多矛盾之处。

1998 年 Okano M 和 Yoder JA 两个研究小组发现，在小鼠和人的细胞中有一个包含大部分甲基化转移酶功能域的基因，与酵母(yeast Schizosaccharomyces)的 pombe 基因有很高的同源性，并命名为 Dnmt2[2-3]。同年 Van den Wyngaert 等用 Northen blot 技术研究了 Dnm2 组织表达谱，发现其表达广泛，但表达水平很低[4]，主要存在于肌肉、发育中的胚胎内脏、卵巢囊肿以及增殖中的睾丸细胞中[5]。Dnmt2 在斑马鱼中定位于细胞质中[6]，而在果蝇中则存在于胞浆和核内，细胞内定位显示大量的 Dnmt2 结合于核基质处，在有丝分裂前期进入细胞核内，呈现类纺锤体式定位，并在细胞分裂过程中可观察到与 DNA 结合[5]，这些研究结果预示着 Dnmt2 可能有多方面的功能。

1　Dnmt2 的结构特点

Dnmt2 与 Dnmt1 及 Dnmt3s 比较(图 1，见封三)，缺少 N 端的调节功能域，保留了由 10 个进化保守的基序(motifs)构成的催化功能域和靶结合域[4,7]。

本文综合了 NCBI 基因数据库(Gene)中人类(*Homo sapiens*)Dnmt2 蛋白序列(NP_004403. 1)，大鼠(*Rattus norvegicus*)Dnmt2 蛋白序列(NP_001026813. 1)，小鼠(*Mus musculus*)Dnmt2 蛋白序列(NP_034197. 3)和果蝇(*Drosophila melanogaster*)Dnmt2 蛋白序列(NP_477475. 1)以及 Reinhardt 等综述提供的有关信息[8]，列入图 2(见封三)中。通过对比分析可以看出，人类、大鼠及小鼠的 Dnmt2 蛋白在基序 VIII 和靶识别序列之间有一个 60 个氨基酸的序列，该序列在果蝇的 Dnmt2 蛋白中却不存在[9-10]。人类、大鼠、小鼠和果蝇的基序 IV、基序 VI 和靶识别序列中与催化活性以及底物结合相关的区域存在着 5 个高度相似区域。在基序 VIII-IX 区有 41 个保守的氨基酸，其中包含 Cys-Phe-Thr 三肽和 Asp-Ile 二肽，这个区域与原核生物 DNA 甲基转移酶的 TRD 结构域相一致[11]。人类、大鼠和小鼠的 Dnmt2 氨基酸序列高度相似，人类和大鼠的氨基酸残基数相同，而小鼠在 C 端比人类和大鼠多出了 25 个氨基酸残基。

2　DNMT2 与 DNA 甲基化无关

Dnmt2 蛋白有一个十分保守的 DNA(cytosine-5)甲基化转移酶催化功能域，X 射线结晶研究证实，人类的 Dnmt2 结构和细菌的高度相似，并且可以与 DNA 形成具有变性抗性的复合物[11]，纯化的重组人 Dnmt2 在体外可以使 DNA 序列中 0. 5% 的 C 碱基甲基化[12]。到目前为止，有几个研究报告证实 Dnmt2 在哺乳类细胞、果蝇和痢疾阿米巴(parasite *Entamoeba histolytica*)中有微弱的 DNA 甲基化活性[13-18]，但是，也有 Dnmt2 不参与 DNA 甲基化的研究报告，最早在一种线虫(*Pristionchus pacificus*)中发现，Dnmt2 没有 DNA 甲基化的活性[19]。Raddatz G 等利用全基因组甲基化分析技术分析了果蝇和曼氏血吸虫(*Schistosoma mansoni*)这两种只表达 Dnmt2 动物的全基因组甲基化水平，证实这类动物的全基因组没有明显的 DNA 甲基化谱。Dnmt2 敲除和未敲除的果蝇基因组甲基化水平没有明显的区别，而在小鼠的胚胎细胞中，敲除了 Dnmt1 和 Dnmt3，仅保留 Dnmt2 后不能维持 DNA 甲基化谱[20]。Zemach A 和 Takayama S 等分别在斑马鱼和果蝇中失活 Dnmt2，却不影响其基因组的甲基化[21-22]。所以 Dnmt2 不是一种 DNA 甲基化酶，已逐渐成为主流观点。

3　Dnmt2 对内源 RNA 甲基化

Dnmt2 不是一种 DNA 甲基化酶，而是一种 RNA 甲基化酶已被越来越多的实验所证实。第一个被发现的 Dnmt2 的功能性底物 RNA 分子是 tRNA(Asp)，Dnmt2 能够特异性甲基化 tRNA(Asp)反密码子环 38C[23]。随后证实除了 tRNA(Asp)之外，tRNA(Val) tRNA(Gly) 和 tRNA(Glu)也可被 Dnmt2 甲基化，并保护这几种 tRNA 不被 RNA 酶降解[24-25]。同时敲除 Dnmt2 和 NSun2 这两种 RNA 甲基化酶基因后，小鼠 tRNA 稳定性减低并导致蛋白合成受到抑制[26]。Dnmt2 的作用不仅局限于 tRNA 甲基化，还具有广泛的 RNA 甲基化活性。在小鼠中 Kit 基因能改变毛色，但在 Dnmt2 敲除的小鼠中，Kit 基因具有通过表观遗传方式改变毛色的作用不复存在。用 miR-124 microRNA 抑制 Sox9 基因

表 1 Dnmt2 基因修饰与表型

Tab. 1 Modification of Dnmt2 and their phenotypes

物种 Species	基因修饰的相关表型 Phenotypes	文献 Reference
果蝇 *Drosophila melanogaster*	基因突变无明显表型,可能影响果蝇寿命。	Goll MG, et al[23]
斑马鱼 *Danio rerio*	基因突变导致肝和脑等多个器官发育异常。	Rai K, et al[6]
小鼠 *Mus musculus*	基因突变发育正常,无明显表型。	Goll MG, et al[23]
人细胞 *Homo sapiens*	人肿瘤细胞(Hela)和人胚胎肾细胞(HEK293)中过表达引起细胞死亡。	Thiagarajan D, et al[31]

表达后小鼠会过度生长,但在 Dnmt2 敲除小鼠中,miR-124 microRNA 对 Sox9 基因的抑制作用也同时被消除,说明 Kit 和 miR-124 microRNA 介导的表观遗传表型需要 Dnmt2 活性[27]。综上,由于 RNA 甲基化分析技术局限性,目前发现的 Dnmt2 的 RNA 底物还十分有限,但是,研究已表明 Dnmt2 具有广泛的内源 RNA 甲基化活性,并且在表观遗传中的重要作用。

Dnmt2 在结构上不属于 DNA 甲基转移酶家系,与已经发现的 RNA 甲基转移酶在序列和结构上没有相似性,不是一种常规的 RNA 甲基转移酶。为了阐明 Dnmt2 酶的催化机制,Jurkowski 等突变了人 Dnmt2 的 C24、C140、C287 和 C292 等几个在 RNA 甲基转移酶中起作用的位点,结果不影响 Dnmt2 在 tRNA(ASP)的 C38 甲基化活性,但是突变了通常在 DNA 甲基化中起作用的一个谷氨酸残基(E119)后,Dnmt2 甲基化活性消失。说明 Dnmt2 是以 DNA 甲基化的方式催化 RNA 的甲基化[28]。他们进一步研究发现,Dnmt2 主要作用于 tRNA 反义密码的颈和环[29],RNA 的一段双链区,比如 tRNA 的双链“颈”,是不是 Dnmt2 与 RNA 结合所必需的结构仍有待实验证实。

4 Dnmt2 对病源 RNA 作用

Dnmt2 存在于原核生物和真核生物,包括植物、真菌、寄生虫、昆虫和哺乳动物的基因组中,可能是在长期进化筛选压力下保留下的基因之一[1]。Dnmt2 表达水平很低,但是在应激刺激时表达上调[30-31]。Durdevic 等最近的研究发现,在敲除 Dnmt2 的果蝇中,固有免疫代偿性的活化,而果蝇 C 病毒(*Drosophila* C virus, DCV)在敲除 Dnmt2 的果蝇中有堆积的现象。Dnmt2 可以结合 DCV 病毒 RNA 起到控制作用[32]。所以 Dnmt2 有可能是古老的病源防疫机制的因子之一[7]。

5 动物中 Dnmt2 相关生物学表型仍然不明确

Dnmt2 既然是在长期进化筛选压力下保留的基因,可以推测该基因具有十分重要的生物学功能。但是,目前在寄生虫、昆虫和哺乳动物的研究中,尤其在小鼠研究中尚未发现重要的 Dnmt2 相关生物学表型,然而,在人肿瘤细胞(Hela)和人胚胎肾细胞(HEK293)中 Dnmt2 过表达引起细胞死亡。表 1 总结了到目前为止,对 Dnmt2 基因生物功能的研究结果。

6 展望

Dnmt2,尤其是在哺乳动物和人类中的作用尚有很多不解之处:(1)目前仅发现了几种 Dnmt2 所引起的甲基化的 RNA,那么 Dnmt2 对 RNA 的作用是全面性的还是局限性的?这需要不断进步的 RNA 甲基化分析技术的支持。随着 Dnmt2 引起的甲基化的 RNA 谱数据的积累,可逐步了解 Dnmt2 在基因组到 RNA 再到蛋白质及整个信息流的调控中发挥的作用。另外,Dnmt2 以 DNA 甲基化转移酶的方式对 RNA 起作用, Dnmt2 与 RNA 的结合需要 RNA 双链“颈”的结构吗?仍需进一步证实。(2) Dnmt2 在小鼠和人类的组织中表达都很低,Dnmt2 是否在应急状态下才表达以及其表达调控的机制现在都不清楚,同时 Dnmt2 在应激和抵抗病原感染中的重要性也需要深入研究。(3)Dnmt2 在哺乳动物中的生物学功能,或者相关联的表型是什么?需要 Dnmt2 基因过表达和基因敲除的动物模型对比研究,也需要在应急状态下对比研究,仅一种 Dnmt2 基因敲除小鼠没有明显表型不能完全说明问题,此外,也需要 Dnmt2 基因过表达和基因敲除的其他物种,如大鼠等,来进一步确定其生物学功能。

参考文献:

[1] Schaefer M, Lyko F. Solving the Dnmt2 enigma [J]. Chromosoma, 2010, 119(1): 35-40.

[2] Okano M, Xie S, Li E. Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases [J]. Nat Genet., 1998, 19(3): 219-220.

[3] Yoder JA, Bestor TH. A candidate mammalian DNA methyltransferase related to pmt1p of fission yeast [J]. Hum Mol

Genet. 1998, 7(2): 279 – 284.

[4] Van den Wyngaert I, Sprengel J, Kass SU, et al. Cloning and analysis of a novel human putative DNA methyltransferase [J]. FEBS Lett. 1998, 426(2): 283 – 289.

[5] Schaefer M, Steringer JP, Lyko F. The Drosophila cytosine-5 methyltransferase Dnmt2 is associated with the nuclear matrix and can access DNA during mitosis [J]. PLoS ONE. 2008, 3 (1): e1414.

[6] Rai K, Chidester S, Zavala CV, et al. Dnmt2 functions in the cytoplasm to promote liver, brain, and retina development in zebrafish [J]. Genes Dev. 2007, 1(3): 261 – 266.

[7] Durdevic Z, Schaefer M. Dnmt2 methyltransferases and immunity: an ancient overlooked connection between nucleotide modification and host defense? [J] Bioessays. 2013, 35 (12): 1044 – 1049.

[8] Reinhardt N, Fischer J, Coppi R, et al. Substrate flexibility and reaction specificity of tropinone reductase-like short-chain dehydrogenases [J]. Bioorg Chem. 2014, 53: 37 – 49.

[9] Hung MS, Karthikeyan N, Huang B, et al. Drosophila proteins related to vertebrate DNA (5-cytosine) methyltransferases [J]. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999, 96(21): 11940 – 11945.

[10] Tweedie S, Ng HH, Barlow AL, et al. Vestiges of a DNA methylation system in Drosophila melanogaster? [J] Nat Genet. 1999, 23(4): 389 – 390.

[11] Dong A, Yoder JA, Zhang X, et al. Structure of human DNMT2, an enigmatic DNA methyltransferase homolog that displays denaturant-resistant binding to DNA [J]. Nucleic Acids Res. 2001, 29(2): 439 – 448.

[12] Hermann A, Schmitt S, Jeltsch A. The human Dnmt2 has residual DNA-(cytosine-C5) methyltransferase activity [J]. J Biol Chem. 2003, 278(34): 31717 – 21.

[13] Liu K, Wang YF, Cantemir C, et al. Endogenous assays of DNA methyltransferases: evidence for differential activities of DNMT1, DNMT2, and DNMT3 in mammalian cells in vivo [J]. Mol Cell Biol. 2003. (8);2709 – 2719.

[14] Tang LY, Reddy MN, Rasheva V, et al. The eukaryotic DNMT2 genes encode a new class of cytosine-5 DNA methyltransferases [J]. J Biol Chem. 2003, 278(36): 33613 – 33616.

[15] Kunert N, Marhold J, Stanke J, et al. A Dnmt2-like protein mediates DNA methylation in Drosophila [J]. Development. 2003, 130(21): 5083 – 5090.

[16] Fisher O, Siman-Tov R, Ankri S. Characterization of cytosine methylated regions and 5-cytosine DNA methyltransferase (Ehmeth) in the protozoan parasite Entamoeba histolytica [J]. Nucleic Acids Res. 2004, 32(1): 287 – 297.

[17] Kuhlmann M, Borisova BE, Kaller M, et al. Silencing of retrotransposons in Dictyostelium by DNA methylation and RNAi [J]. Nucleic Acids Res. 2005, 33(19): 6405 – 6417.

[18] Phalke S, Nickel O, Walluscheck D, et al. Retrotransposon silencing and telomere integrity in somatic cells of Drosophila depends on the cytosine-5methyltransferase DNMT2 [J]. Nat Genet. 2009, 41(6): 696 – 702.

[19] Gutierrez A, Sommer RJ. Evolution of dnmt-2 and mbd-2-like genes in the free-living nematodes Pristionchus pacificus, Caenorhabditis elegans and Caenorhabditis briggsae [J]. Nucleic Acids Res. 2004, 32(21): 6388 – 6396.

[20] Raddatz G, Guzzardo PM, Olova N, et al. Dnmt2-dependent methylomes lack defined DNA methylation patterns [J]. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013, 110(21): 8627 – 8631.

[21] Zemach A, McDaniel IE, Silva P, et al. Genome-wide evolutionary analysis of eukaryotic DNA methylation [J]. Science. 2010, 328(5980): 916 – 919.

[22] Takayama S, Dhahbi J, Roberts A, et al. Genome methylation in D. melanogaster is found at specific short motifs and is independent of DNMT2 activity [J]. Genome Res. 2014, 24 (5): 821 – 830.

[23] Goll MG, Kirpekar F, Maggert KA, et al. Methylation of tRNAAsp by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2 [J]. Science. 2006, 311(5759): 395 – 398.

[24] Schaefer M, Pollex T, Hanna K, et al. RNA methylation by Dnmt2 protects transfer RNAs against stress-induced cleavage [J]. Genes Dev. 2010, 24(15): 1590 – 1595.

[25] Müller S, Windhof IM, Maximov V, et al. Target recognition, RNA methylation activity and transcriptional regulation of the Dictyostelium discoideum Dnmt2-homologue (DnmA) [J]. Nucleic Acids Res. 2013, 41(18): 8615 – 8627.

[26] Tuorto F, Liebers R, Musch T, et al. RNA cytosine methylation by Dnmt2 and NSun2 promotes tRNA stability and protein synthesis [J]. Nat Struct Mol Biol. 2012, 19(9): 900 – 905.

[27] Kiani J, Grandjean V, Liebers R, et al. RNA-mediated epigenetic heredity requires the cytosine methyltransferase Dnmt2 [J]. PLoS Genet. 2013, 9(5): e1003498.

[28] Jurkowski TP, Meusburger M, Phalke S, et al. Human DNMT2 methylates tRNA(Asp) molecules using aDNA methyltransferase-like catalytic mechanism [J]. RNA. 2008, 14 (8): 1663 – 1670.

[29] Jurkowski TP, Shanmugam R, Helm M, et al. Mapping the tRNA binding site on the surface of human DNMT2 methyltransferase [J]. Biochemistry. 2012, 51 (22): 4438 – 4444.

[30] Schaefer M, Pollex T, Hanna K, et al. RNA methylation by Dnmt2 protects transfer RNAs against stress-induced cleavage [J]. Genes Dev. 2010, 24(15): 1590 – 1595.

[31] Thiagarajan D, Dev RR, Khosla S. The DNA methyltranferase Dnmt2 participates in RNA processing during cellular stress [J]. Epigenetics. 2011, 6(1): 103 – 113.

[32] Durdevic Z, Hanna K, Gold B, et al. Efficient RNA virus control in Drosophila requires the RNA methyltransferase Dnmt2 [J]. EMBO Rep. 2013, 14(3): 269 – 275.

〔修回日期〕2014 – 12 – 08