

欧宇达, 李晓晗, 陈婧, 等. 日本脑炎病毒感染宿主后 m⁶A 甲基化相关蛋白的表达和定位研究 [J]. 畜牧与兽医, 2024, 56 (2): 62-68.
OU Y D, LI X H, CHEN J, et al. Expression and localization of m⁶A methylation related proteins in Japanese encephalitis virus infected hosts [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2024, 56 (2): 62-68.

日本脑炎病毒感染宿主后 m⁶A 甲基化相关蛋白的表达和定位研究

欧宇达, 李晓晗, 陈婧, 赵炳枢, 陈健芄, 毛玎懿, 周江飞, 周斌*

(南京农业大学动物医学院, 江苏 南京 210095)

摘要: 为了研究日本脑炎病毒 (JEV) 感染宿主后在体内外对 m⁶A 甲基化相关蛋白表达和定位的影响, 本试验建立了 JEV 感染的 C57BL/6 小鼠模型及乳仓鼠肾细胞 (BHK-21) 模型, 检测 JEV 感染后小鼠的脑、肾及 BHK-21 细胞的 m⁶A 修饰水平, 通过蛋白免疫印迹检测小鼠脑、肾以及 JEV 感染不同时间点的细胞中 m⁶A 相关蛋白的表达水平, 共聚焦显微镜观察 JEV 感染细胞的 m⁶A 相关蛋白的亚细胞定位变化。结果显示: 与对照组相比, 感染 JEV 后 m⁶A 修饰水平极显著上升 ($P < 0.01$); 感染 JEV 的小鼠脑、肾中 m⁶A 甲基转移酶样蛋白 (METTL) 3 表达量大幅上升, 细胞中 METTL3 表达量随感染时间推移而逐渐增加; METTL3 和 METTL14 的亚细胞定位发生改变, 大量由细胞核转移至细胞质。综上所述, JEV 可使体内的 m⁶A 水平和 METTL3 的表达水平上升, 细胞中 METTL3 和 METTL14 的亚细胞定位改变, 表明 JEV 的感染与 m⁶A 修饰具有较强的关联性, 为进一步研究 m⁶A 及其相关蛋白调控 JEV 复制的机制奠定了基础。

关键词: 日本脑炎病毒; m⁶A 甲基化; 甲基转移酶样蛋白 3; 亚细胞定位

中图分类号: S852.6 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2024)02-0062-07

Expression and localization of m⁶A methylation related proteins in Japanese encephalitis virus infected hosts

OU Yuda, LI Xiaohan, CHEN Jing, ZHAO Bingshu, CHEN Jianpeng, MAO Dingyi, ZHOU Jiangfei, ZHOU Bin*

(College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: To investigate the effects of Japanese encephalitis virus (JEV) infection on the expression and localization of m⁶A methylation related proteins *in vivo* and *in vitro*, this experiment established a C57BL/6 mouse model infected with JEV. JEV was infected with baby hamster kidney cells (BHK-21), and the m⁶A modification levels in the brain, kidneys, and BHK-21 cells of mice infected with JEV were detected. Western blot was used to detect the expression levels of m⁶A related proteins in the brain and kidneys of the mice, and in the cells at different time points. JEV infection was observed under confocal microscopy, and the subcellular localization changes of m⁶A related proteins in the JEV infected cells were observed. The results showed that, compared with the control group, the m⁶A modification level significantly increased after JEV infection in the treated mice ($P < 0.01$); the expression level of m⁶A methyltransferase like protein (METTL) 3 in the brain and kidneys of the JEV infected mice rose substantially; the expression level of METTL3 in cells gradually increased with the passage of infection time; and the subcellular localization of METTL3 and METTL14 has changed, with a significant amount of transfer from the nucleus to the cytoplasm. In summary, infection of JEV promoted the expression of m⁶A and METTL3 *in vitro* and *in vivo*, and changed the subcellular localization of METTL3 and METTL14 in cells. All this indicated a strong correlation between JEV infection and m⁶A modification, which laid a foundation for further research on the mechanism of m⁶A and its related proteins regulating JEV replication.

Keywords: Japanese encephalitis virus; m⁶A methylation; METTL3; subcellular localization

日本脑炎病毒 (Japanese encephalitis virus, JEV) 属于黄病毒科 (Flaviviridae) 黄病毒属 (Flavivirus),

是一种单股正链 RNA 病毒^[1-2]。由 JEV 感染引起的日本脑炎是一种蚊媒嗜神经性人兽共患病毒性传染病, 严重危害畜牧养殖业和公共卫生安全^[3]。研究 JEV 与宿主的互作, 有助于发掘新的抗病毒靶点, 为研发有效的抗病毒药物提供理论基础。m⁶A 甲基化 (N⁶-methyladenosine) 是 RNA 中腺嘌呤 6 号碳原子发生甲基化修饰, 是真核生物 mRNA 上最重要的表观遗传修饰方式之一, 参与调控 mRNA 的转录、剪

收稿日期: 2023-04-24; 修回日期: 2023-12-09

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2022YFD1800100)

第一作者: 欧宇达, 男, 硕士研究生

* 通信作者: 周斌, 教授, 研究方向为动物分子病毒学与免疫学、动物疫病诊断与防控, E-mail: zhoubin@njau.edu.cn。

接、翻译、降解等过程,在真核生物的生长、代谢、生殖、疾病发生发展等多种生理或病理过程中起着重要的作用^[4]。 m^6A 甲基化修饰是个动态可逆的过程,主要由其相关蛋白家族如甲基转移酶样蛋白3 (methyltransferase-like protein 3, METTL3), 甲基转移酶样蛋白14 (methyltransferase-like protein 14, METTL14), 去甲基化酶肥胖和脂肪相关蛋白 (fat mass and obesity-associated, FTO), 结合蛋白如 YTH 家族蛋白 (YTHDF1、YTHDF2、YTHDF3) 等发挥各自的功能而共同完成^[5-10]。近年来,关于 m^6A 及其相关蛋白影响病毒-宿主互作的研究屡有报道,它们可通过对病毒基因组的修饰直接影响病毒的生命周期,或者通过调控宿主免疫、代谢等途径等间接影响病毒复制,提示 m^6A 是调节抗病毒免疫的潜在靶点。

目前已发现黄病毒科、黄病毒属的一些成员如寨卡病毒 (Zika virus, ZIKV) 和丙型肝炎病毒 (hepatitis C virus, HCV) 的感染与 m^6A 及其相关蛋白具有关联性, m^6A 通过不相同的机制,调控它们的复制^[11-12]。然而对于 JEV 是否受到 m^6A 调控,目前暂未有研究报道。因此,本研究选择 JEV 的易感动物 C57BL/6 小鼠作为体内模型,易感细胞 BHK-21 作为体外模型,通过 m^6A 水平检测、Western blot、激光共聚焦等试验探究 JEV 感染在体内外两个层面的 m^6A 水平的变化及其主要相关蛋白的表达水平和亚细胞定位的变化,对 JEV 的感染与 m^6A 的关系进行初步探究,为后续进一步研究 m^6A 对 JEV 感染的调控及其相关机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 细胞、病毒和试验动物

乳仓鼠肾细胞 (BHK-21) 和 JEV NJ2008 株 (GenBank 序列号: GQ918133) 由本实验室保存。3 周龄 SPF 级雌性 C57BL/6 小鼠购自南京青龙山动物繁殖场。

1.2 主要抗体、试剂

鼠源 JEV-NS5 单克隆抗体由华中农业大学曹胜波教授惠赠; 兔源 METTL3 (15073-1-AP)、METTL14 (26158-1-AP)、FTO (27226-1-AP)、YTHDF1 (17479-1-AP)、YTHDF2 (24744-1-AP)、YTHDF3 (25537-1-AP) 多克隆抗体购自 Proteintech 公司。

高糖 DMEM 培养基、胎牛血清 (FBS)、青链霉素购自 Gibco 公司; 预染蛋白 Marker 购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司; 鼠源 β -actin 单抗, 羊抗鼠、羊抗兔 IgG HRP, 购自 Santa Cruz 公司; TRIzol 购自 TaKaRa 公司; 羊抗兔 IgG H&L (Alexa Fluor

488)、羊抗鼠 IgG H&L (Alexa Fluor 594) 购自 Proteintech 公司; EvaGreen 2 \times qPCR MasterMix、5 \times All-In-One RT Master Mix 快速反转录试剂盒购自南京爱必梦生物材料有限公司; 增强型 ECL 化学发光检测试剂盒购自 Biosharp 公司; AR 级纯度化学试剂购自南京寿德试验器材有限公司; RIPA 细胞裂解液购自北京索莱宝科技有限公司; DAPI 染色液购自上海碧云天生物技术有限公司; EpiQuikTM m^6A RNA 甲基化定量比色法检测试剂盒 (P-9005) 购自 EpiGentek 公司。

1.3 细胞接毒及样本处理

将 BHK-21 细胞传代后均匀铺至 35 mm 细胞碟皿进行培养,待细胞密度长至 80% 左右时,接种稀释好的 JEV 病毒液,感染复数 (MOI) = 0.1, 孵育 1.5 h 后弃去病毒液,用含有 2% FBS 的 DMEM 培养基维持,继续培养相应的时间,收取样本用于后续试验。若收样用于 m^6A 水平检测,则提取 RNA; 若收样用于 Western blot,则提取总蛋白,将 35 mm 细胞碟皿弃上清液,用预冷的 1 \times PBS 清洗后加入 RIPA 裂解液,置于 4 $^{\circ}$ C 摇床孵育 30 min,于冰浴中用细胞刮子刮下残留团块,将液体转移到离心管,以 4 $^{\circ}$ C, 12 000 r/min 离心 10 min,弃沉淀,将上清液转移到新的离心管,测定蛋白浓度,按体积比 1:5 的比例加入 5 \times SDS Loading buffer,待上样用。上样时根据每个样品蛋白浓度加入不同体积样品,以调齐蛋白上样量 (统一为 30 μ g)。

1.4 小鼠模型建立与脏器样本的处理

将同批次小鼠分别设置对照组 10 只和 JEV 攻毒组 10 只,随机分笼饲养。为了使腹腔注射的病毒能较完全地进入血脑屏障,攻毒前将所有小鼠用微量注射器进行破脑处理,并缓慢注射 50 μ L 无菌 1 \times PBS 以保证破脑成功,待小鼠状态恢复后开始攻毒。攻毒组每只小鼠腹腔注射稀释好 2×10^4 PFU (0.2 mL 毒价为 10^5 PFU/mL 的病毒液) 的 JEV 病毒,对照组腹腔注射等量无菌 1 \times PBS。每日观察小鼠生命体征和精神状态,攻毒组每次有小鼠出现 JEV 感染典型症状 (拒食、离群、精神沉郁、共济失调、颤抖) 后,抽取等量同日对照组小鼠,一同断颈处死后剖取脑、脾和肾等脏器,迅速冻存于液氮中,待后续试验取用。若样本用于 m^6A 水平检测或荧光定量 PCR (RT-qPCR),则将样品各切取 0.1 g,在冰浴中加入 RIPA 充分研磨后,在 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 的条件下离心 2 min,弃沉淀将研磨液转至离心管,进行 RNA 的提取;若样本用于 Western blot,则提取总蛋白,加入 RIPA 裂解液充分研磨,于 4 $^{\circ}$ C 摇床孵育 30 min,孵育后每个样品超声破碎 10 min,再以 4 $^{\circ}$ C、12 000

r/min离心 10 min, 将上清液转移到新的离心管, 测定蛋白浓度, 按 1:5 比例加入 5×SDS Loading buffer, 待上样用。上样时根据每个样品蛋白浓度加入不同体积样品, 以调齐蛋白上样量 (统一为 30 μg)。

1.5 RNA 的提取和反转录

用 TRIzol 试剂抽提总 RNA, 根据 5×All-In-One MasterMix 快速反转录试剂盒配制反转录体系。体系 1: 将 4 μL 提取的 RNA 和 2 μL 4×AccuRT Reaction Mix 加入 PCR 管中, 总体系为 6 μL, 混匀、瞬离, 室温静置 5 min。体系 2: 将 2 μL 5×AccuRT Reaction Stopper、4 μL 5×All-In-One RT Master Mix 以及 6 μL DEPC 水同时加入 PCR 管中, 总体系为 12 μL, 混匀、瞬离。将体系 2 与体系 1 混匀、瞬离。置于 PCR 仪中进行反转录, 反转录程序: 25 °C 10 min, 42 °C 15 min, 85 °C 5 min (35 个循环)。

1.6 RT-qPCR 检测小鼠脏器中病毒载量

选取 1.4 中每个发病日同一只发病小鼠的脑、脾和肾, 各脏器切取等质量的 3 份 (均为 0.1 g), 进行样本处理、RNA 的提取和反转录。设计 qPCR 引物序列, 由南京金斯瑞生物科技有限公司合成引物。本研究所使用的引物序列如表 1 所示。根据 EvaGreen 试剂盒说明书配制反应体系, 设置 qPCR 反应程序。根据 qPCR 试验数据比较各脏器中病毒载量。试验数据使用相对定量法进行分析, 每组数据均设置 3 个重复。将试验得到的 JEV 的目的基因 Ct 值与自身内参 (GAPDH) Ct 值相减得到每一组的 ΔCt , 再将试验组 ΔCt 与对照组 ΔCt 相减可得 ΔCt , $2^{-\Delta Ct}$ 表示目的基因表达水平与对照组的倍数差异。

表 1 RT-qPCR 引物序列

基因名称	引物名称	引物序列 (5'→3')
GAPDH	GAPDH-F	GAAGGTCGGAGTGAACGGATTT
	GAPDH-R	TGGGTGGAATCATACTGGAACA
JEV-E	JEV-F	AGAGCGGGGAAAAAGGTCAT
	JEV-R	TTTCACGCTCTTCTACAGT

1.7 细胞和小鼠脏器的 m⁶A 水平检测

按照 1.3 的方法在 35 mm 细胞碟皿铺细胞, 同时设置对照组, 感染 JEV 24 h 后, 收集和处理样品, 提取 RNA; 切取 1.4 中第 1 个发病日 (第 9 天) 的感染小鼠和对照小鼠的脑、肾, 处理样品, 将上述样

品提取 RNA。按照 EpiQuik™ m⁶A RNA Methylation Quantification Kit 说明书中的具体步骤检测样本中 m⁶A 水平。

1.8 蛋白免疫印迹试验检测细胞和小鼠脏器 m⁶A 相关蛋白表达水平

选取 1.2 中第 1 个发病日 (第 9 天) 的 JEV 感染小鼠和对照小鼠的脑、肾切取等质量 (0.1 g) 样品, 收取 35 mm 中细胞碟皿中 JEV (MOI=0.1) 感染 0、6、12、24 和 36 h 的细胞样品, 按照 1.3 和 1.4 中的方法提取总蛋白。通过 Western blot 检测组织和细胞中 m⁶A 相关蛋白水平, 以 β -actin 为内参蛋白。

1.9 激光共聚焦

将 BHK-21 细胞均匀铺于共聚焦小皿, 待细胞汇合度为 90% 左右, 感染 JEV (MOI=0.1) 24 h, 设对照组和感染组。感染 24 h 后, 收获细胞样本, 用 4% 多聚甲醛室温固定 15 min, 并用 0.1% Triton X-100 室温透膜处理, 然后各组使用 METTL3、METTL14、FTO、YTHDF1、YTHDF2、YTHDF3 和 JEV NS5 抗体 4 °C 孵育过夜, 并通过 FITC 和 TRITC 标记的荧光二抗染色, 使用 DAPI 染核, 使用共聚焦显微镜观察蛋白在胞内的定位分布。

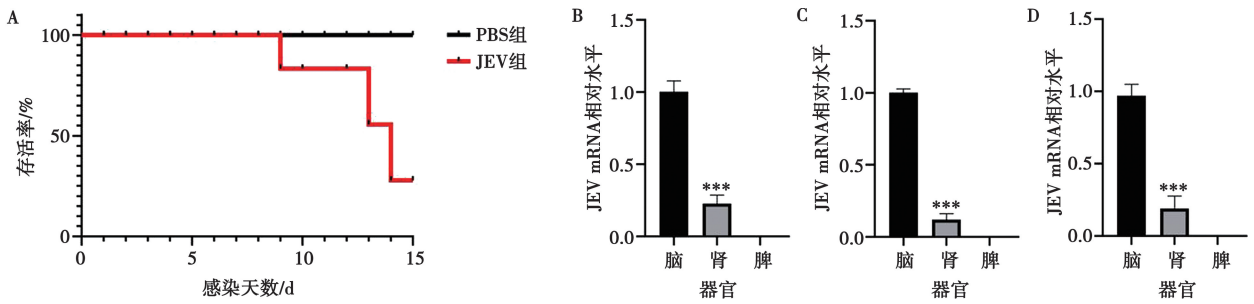
1.10 数据统计与分析

使用 GraphPad Prism 8 软件分析, 用 *t* 检验方法比较对照组和试验组中的数据, 各试验均独立重复 3 次。所有数据均表示为 “平均值±标准差”。

2 结果与分析

2.1 JEV 感染小鼠模型的生存曲线和脏器病毒载量

初步建立了 JEV 感染的 C57BL/6 小鼠模型, 攻毒组部分小鼠分别于攻毒后的第 9、13 和 14 天开始出现感染症状, 第 15 天后未出现发病小鼠, 最终存活率为 30% (图 1A)。每个发病日选取同一只发病小鼠的脑、脾和肾 3 种 JEV 靶器官, 各器官切取等质量的 3 份 (均为 0.1 g) 提取 RNA 进行 RT-qPCR。检测各器官中病毒载量, 以 JEV 在鼠中组织嗜性最强的靶器官脑为参照, 对 3 种器官的病毒载量进行比较。结果显示, 3 个发病日的样品中, 均只在脑和肾中检出有病毒, 且脑中的病毒载量极显著高于肾 ($P<0.001$), 而脾脏中始终未检出病毒 (图 1B、1C、1D)。因此采用脑和肾进行后续试验。



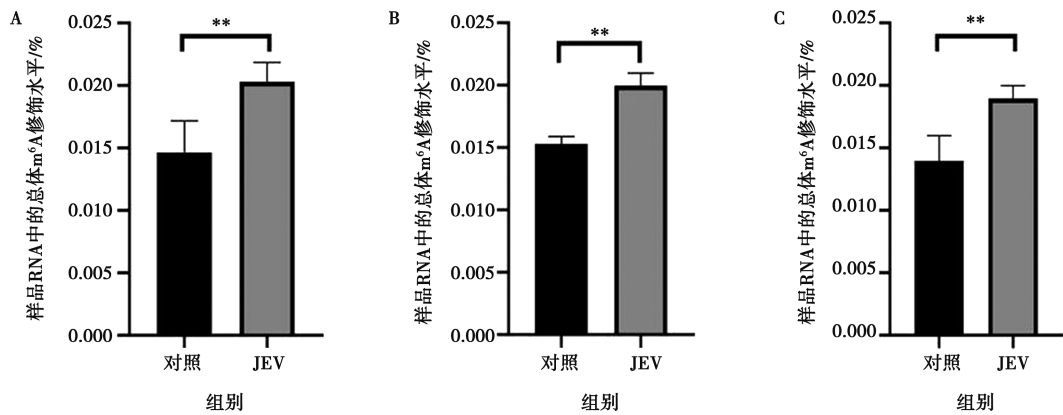
A. 生存曲线; B. 感染第9天; C. 感染第13天; D. 感染第14天。***表示肾组织与脑组织比较差异极显著 ($P < 0.001$)。

图1 JEV感染小鼠模型的生存曲线和不同感染天数脏器中病毒载量比较

2.2 JEV感染对体内外 m⁶A 水平的影响

采取同一个发病日的对照小鼠和发病小鼠的脑和肾以及感染 JEV (MOI=0.1) 的 BHK-21 细胞, 分别提取 RNA 并检测总体 m⁶A 水平。结果显示, 与对照组小鼠相比, 攻毒组小鼠的脑、肾中带有 m⁶A 修饰的 RNA 占总 RNA 的比例极显著升高 ($P < 0.01$, 图 2A、2B); 同样地, 感染 JEV 的 BHK-21 细胞和

未感染细胞相比, m⁶A 修饰的 RNA 占比也极显著升高 ($P < 0.01$, 图 2C)。结果说明, JEV 感染能使小鼠脑、肾以及 BHK-21 细胞总体 m⁶A 水平上升, 推测 JEV 的感染可能通过 m⁶A 水平的上升来触发细胞内的某些生物学变化, 这些变化与 JEV 的感染具有关联性。



**表示差异极显著 ($P < 0.01$)。

图2 JEV感染后小鼠脑(A)、肾(B)和细胞(C)中的总体 m⁶A 修饰水平变化

2.3 JEV感染对体内外 m⁶A 相关蛋白表达水平的影响

通过 Western blot 检测同一个发病日(第9天)的 JEV 感染小鼠和对照小鼠脑、肾中 METTL3、METTL14、FTO、YTHDF1、YTHDF2 和 YTHDF3 蛋白表达量。结果发现, 与对照组相比, 在感染 JEV 小鼠的脑和肾中, METTL3 表达均显著增加, 且脑中该蛋白与对照组相比的上升幅度远大于肾, 而其他蛋白未发生明显变化(图 3A)。随着时间点的推移, 感染 JEV (MOI=0.1) 的 BHK-21 细胞中 METTL3 表达量逐渐增加, 而其他蛋白未呈现出明显的或有规律的变化趋势(图 3B、3C)。以上结果说明, JEV 感染促进了 C57BL/6 小鼠脑、肾以及 BHK-21 细胞

中 METTL3 的表达。

2.4 JEV感染对细胞中 m⁶A 相关蛋白亚细胞定位的影响

将 JEV (MOI=0.1) 感染 BHK-21 细胞 24 h, 用共聚焦显微镜进行观察。结果显示, 对照组细胞中的 METTL3、METTL14、FTO 基本分布在细胞核中, YTHDF1、YTHDF2、YTHDF3 基本分布在细胞质中, 而感染 JEV 后 METTL3、METTL14 的亚细胞定位发生了明显的改变, 从核中往外弥散到细胞质, 与 JEV 的 NS5 蛋白共存于细胞质中(图 4A、4B), 但其他蛋白的亚细胞定位未出现明显变化(图 4C、4D、4E 和 4F)。这个现象说明 JEV 具备“招募”甲基转移酶并改变其亚细胞定位的能力, 这样更多的 METTL3

和 METTL14 蛋白出现在细胞质中, 然后与 JEV 产生

某些联系, 调控其复制。

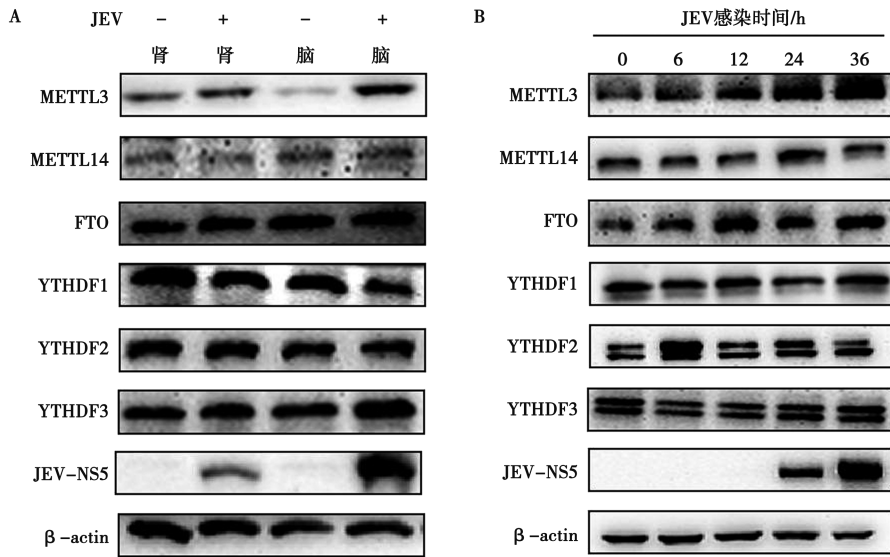


图3 JEV 感染后小鼠脑、肾 (A) 和 BHK-21 细胞 (B) 中 m⁶A 相关蛋白的变化

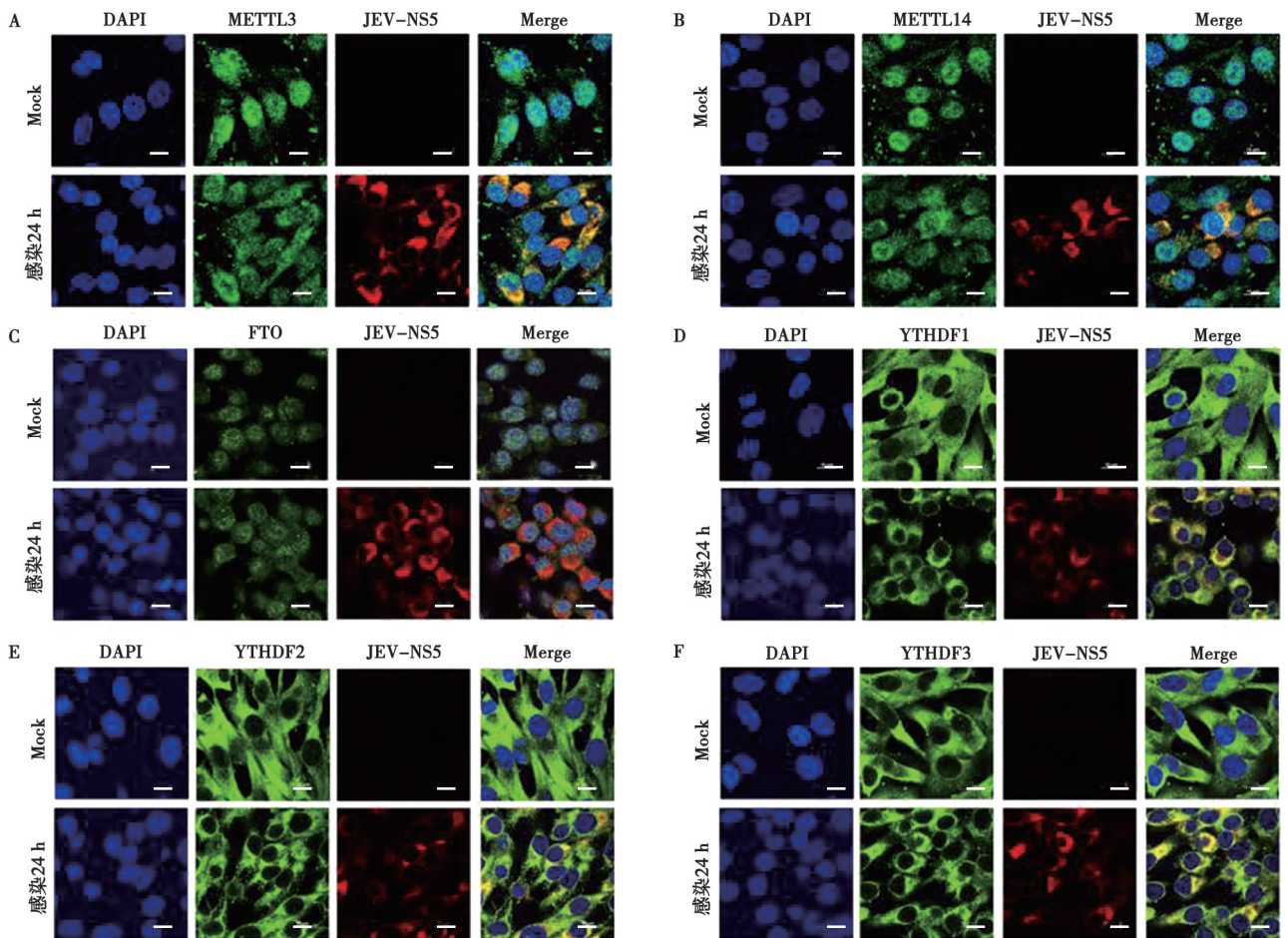


图4 JEV 感染后 BHK-21 细胞中 m⁶A 相关蛋白的亚细胞定位 (标尺 = 10 μm)

3 讨论

以 JEV、ZIKV、HCV、登革病毒 (DENV)、西

尼罗河病毒 (WNV) 和黄热病毒 (YFV) 为代表的黄病毒严重危害人类和动物健康^[13], 揭示病毒与宿主互作关系是不断提升病毒病诊断与防治技术的基

础。近年来,学者们填补了 m^6A 甲基化在黄病毒中作用研究的空白, m^6A 对ZIKV和HCV的负向调控作用被发现,其通过加速病毒RNA转录本的降解抑制ZIKV的复制,通过结合蛋白YTHDF1、YTHDF2、YTHDF3作用于脂滴影响病毒的装配、释放,抑制HCV的复制^[11-12],但仍然存在许多未知的机制有待发掘,并且同为黄病毒属的JEV的 m^6A 相关研究也仍是一片空白。因此,探究 m^6A 是否调控以及如何调控JEV的复制,揭示 m^6A 修饰在JEV感染中的作用,具有重要意义。

JEV具有强烈的神经嗜性,脑是JEV在小鼠体内十分重要的靶器官^[3,14-15]。除脑外,脾脏、肾脏、肝脏、肺脏和肠也是较为重要的靶器官,且感染选择性、感染效率因毒株、小鼠种类、周龄和个体差异而异^[14,16]。本文以C57BL/6小鼠作为JEV体内感染模型,在脑和肾脏中检测出明显的病毒载量,而脾脏未检测出,说明在3周龄雌性C57BL/6小鼠中,JEV在脑和肾脏中具有较强的复制能力,而在脾脏中的复制能力极其微弱。随后发现感染了JEV的小鼠脑和肾脏以及BHK-21细胞中总体 m^6A 水平都显著高于对照组,说明JEV的感染可诱导体内 m^6A 水平上调,这表明JEV的复制可能受到 m^6A 修饰的调控。

在 m^6A 修饰的过程中,METTL3和METTL14等甲基转移酶催化甲基化过程,FTO等去甲基化酶催化去甲基化过程,两过程动态可逆,而结合蛋白YTHDF1、YTHDF2、YTHDF3发挥了辅助作用,帮助 m^6A 修饰实现对靶RNA的生物学功能,如提高翻译效率,延缓或加速mRNA的降解,调控RNA的剪切和核转运等^[4-10]。而 m^6A 对不同病毒复制的促进或者抑制,通常由上述蛋白中的1~2种起着决定性作用,如 m^6A 在A549细胞中正向调控甲型流感病毒(IAV)复制由METTL3和YTHDF2主导^[16],在小鼠源巨噬细胞中正向调控水疱性口炎病毒(VSV)和仙台病毒(SeV)由METTL14主导^[17-18]。参考Winkler等^[19]、李卫宇^[20]的相关研究方法进一步试验,发现感染JEV小鼠的脑和肾中METTL3的表达量相比对照组有了明显增加,且病毒载量较高的脑中METTL3表达量上升幅度显著高于病毒载量相对较低的肾脏;感染JEV的BHK-21细胞中METTL3表达量随感染时间推移而上升,初步推测JEV感染C57BL/6小鼠和BHK-21细胞造成的 m^6A 水平上升,是由METTL3主导,JEV的感染与METTL3存在较大关联。

与其他黄病毒一样,JEV复制的全过程在细胞质中完成^[3]。正常情况下,METTL3、METTL14和FTO定位于细胞核中表达^[5,7],而YTHDF1、YTHDF2、YTHDF3则分布在细胞质中^[8-10]。因此,在共聚焦显

微镜下观察,理论上感染JEV后如果METTL3、METTL14和FTO不发生易位,则不会和病毒蛋白共存于细胞质内,而YTHDF1、YTHDF2、YTHDF3能和病毒蛋白共存于细胞质内。已有文献报道一些在细胞质中复制的病毒如柯萨奇病毒A组16型(CVA16)、肠病毒71(EV71)、新型冠状病毒(SARS-CoV-2)感染细胞后,可诱导METTL3、METTL14和FTO定位改变,即大量蛋白由细胞核被“招募”到了细胞质,从而细胞核、细胞质均有弥散分布该蛋白的情况^[19-22]。研究者发现,METTL3与EV71的3D蛋白之间存在互作,并通过降低3D的泛素化和SUMO化修饰提高3D稳定性及聚合酶活性进而促进病毒复制,这个过程却与 m^6A 修饰没有直接关系^[21]。不同的是,SARS-CoV-2的RdRP(RNA依赖的RNA聚合酶)可反过来抑制METTL3的泛素化和SUMO化而促进METTL3的表达,进而加强SARS-CoV-2自身RNA的 m^6A 修饰,促进病毒复制,这个发现的前提是建立在他们已发现SARS-CoV-2基因组RNA上存在 m^6A 修饰,且 m^6A 修饰促进该病毒复制^[23]。本研究的共聚焦显微镜结果表明,在感染JEV的BHK-21细胞中也发现了类似现象,JEV感染“招募”METTL3和METTL14出核,而这种亚细胞定位改变的具体机制有待进一步探究。

本研究将JEV的感染和 m^6A 甲基化建立起联系,JEV感染后在体内外引起 m^6A 水平和METTL3蛋白上调,但是 m^6A 调控JEV复制的具体机制是今后试验中需要解决的问题。总之,本文为JEV的感染机制研究提供了新思路。

参考文献:

- [1] MALHOTRA S, KUMAR P. Japanese encephalitis and its epidemiology [J]. *J Infect Dis Ther*, 2015, 3 (5): 243.
- [2] YUN S I, KIM S Y, CHOI W Y, et al. Molecular characterization of the full-length genome of the Japanese encephalitis viral strain K87P39 [J]. *Virus Res*, 2003, 96 (1/2): 129-140.
- [3] UNNI S K, RUZEK D, CHHATBAR C, et al. Japanese encephalitis virus: from genome to infectome [J]. *Microbes Infect*, 2011 (4): 13.
- [4] WANG S, LV W, LI T, et al. Dynamic regulation and functions of mRNA m^6A modification [J]. *Cancer Cell Int*, 2022, 22 (1): 1-12.
- [5] LIU J, YUE Y, HAN D, et al. A METTL3-METTL14 complex mediates mammalian nuclear RNA N^6 -adenosine methylation [J]. *Nat Chem Biol*, 2013, 10 (2): 93-95.
- [6] PING X L, SUN B F, WANG L, et al. Mammalian WTAP is a regulatory subunit of the RNA N^6 -methyladenosine methyltransferase [J]. *Cell Res*, 2014, 24: 177-189.
- [7] JIA G, FU Y, ZHAO X, et al. N^6 -methyladenosine in nuclear RNA

- is a major substrate of the obesity-associated FTO [J]. *Nat Chem Biol*, 2011, 7 (12): 885-887.
- [8] XIAO W, ZHAO B S, ROUNDTREE I A, et al. *N*⁶-methyladenosine modulates messenger RNA translation efficiency [J]. *Cell*, 2015, 161 (6): 1388-1399.
- [9] DU H, ZHAO Y, HE J, et al. YTHDF2 destabilizes m⁶A-containing RNA through direct recruitment of the CCR4-NOT deadenylase complex [J]. *Nat Commun*, 2016, 7 (1): 12626.
- [10] SHI H, WANG X, LU Z, et al. YTHDF3 facilitates translation and decay of *N*⁶-methyladenosine-modified RNA [J]. *Cell Res*, 2017, 27: 315-328.
- [11] LICHINCHI G, ZHAO B, WU Y, et al. Dynamics of human and viral RNA methylation during Zika virus infection [J]. *Cell Host Microbe*, 2016 (10): 666-673.
- [12] GOKHALE N S, MCLNTYRE A B R, MATTOCKS M D, et al. Altered m⁶A modification of specific cellular transcripts affects flaviviridae infection [J]. *Mol Cell*, 2020, 77 (3): 542.
- [13] SCHNEIDER W M, HOFFMANN H H. Flavivirus-host interactions: an expanding network of proviral and antiviral factors [J]. *Curr Opin Virol*, 2022, 52: 71-77.
- [14] 王欣, 钟登科, 李鹏, 等. 流行性乙型脑炎病毒 GI 型毒株 SD12 在 C57BL/6 小鼠体内的动态分布研究 [J]. *中国动物传染病学报*, 2022 (1): 30.
- [15] 潘俊慧, 刘亚林, 梁真洁, 等. 日本脑炎病毒 NS1 蛋白致脑血管内皮细胞损伤研究 [J]. *南京农业大学学报*, 2023, 46 (6): 1107-1115.
- [16] 王晓航, 鲍诗骏, 陈洋, 等. 日本脑炎病毒感染 ICR 小鼠模型的初步建立 [J]. *畜牧与兽医*, 2022 (7): 54.
- [17] COURTNEY D G, KENNEDY E M, DUMM R E, et al. Epitranscriptomic enhancement of influenza A virus gene expression and replication [J]. *Cell Host Microbe*, 2017, 22: 377-386.
- [18] QIN F, CAI B, ZHAO J, et al. Methyltransferase-like protein 14 attenuates mitochondrial antiviral signaling protein expression to negatively regulate antiviral immunity via *N*⁶-methyladenosine modification [J]. *Adv Sci*, 2021, 8 (15): e2100606.
- [19] WINKLER R, GILLIS E, LASMAN L, et al. m⁶A modification controls the innate immune response to infection by targeting type I interferons [J]. *Nature Rev Neurosci*, 2019, 20 (2): 173-182.
- [20] 李卫宇. CVA16 感染对 m⁶A 甲基化相关蛋白表达和定位的影响 [D]. 昆明: 北京协和医学院, 2020.
- [21] HAO H J, HAO S J, CHEN H H, et al. *N*⁶-methyladenosine modification and METTL3 modulate enterovirus 71 replication [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47 (1): 362-374.
- [22] YAO M, DONG Y, WANG Y, et al. *N*⁶-methyladenosine modifications enhance enterovirus 71 ORF translation through METTL3 cytoplasmic distribution [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 527 (1): 297-304.
- [23] ZHANG X, HAO H, MA L, et al. Methyltransferase-like 3 modulates severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 RNA *N*⁶-methyladenosine modification and replication [J]. *mBio*, 2021 (4): e0106721.