



## 真菌组蛋白赖氨酸甲基转移酶的研究进展

李梦雪<sup>1</sup>, 李亚楠<sup>2</sup>, 曲音波<sup>1</sup>, 秦玉琪<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> 山东大学国家糖工程技术研究中心, 山东 青岛 266237

<sup>2</sup> 河南农业大学生命科学学院, 河南 郑州 450002

**摘要:** 甲基化修饰是蛋白翻译后修饰的主要方式之一。真菌中, 多种赖氨酸甲基转移酶能够执行组蛋白特定位点上赖氨酸的甲基化。组蛋白上赖氨酸的甲基化与真菌 DNA 的复制、转录以及异染色质的形成相关。甲基化参与了多种生物学过程, 如真菌发育、昼夜节律调节、次级代谢基因簇表达、水解酶合成、致病真菌毒力形成。本文结合笔者工作, 对目前真菌中已经发现的组蛋白赖氨酸甲基转移酶的命名、分类、结构域特征、催化域的三维结构以及它们所执行的甲基化在各种真菌中的作用进行了总结, 提出了目前研究的不足并对未来的研究方向和内容进行了展望。

**关键词:** 真菌, 组蛋白, 甲基化, 甲基转移酶

真核细胞中, DNA 缠绕在 4 种核心组蛋白 H2A、H2B、H3 和 H4 形成的组蛋白八聚体周围, 组装成核蛋白复合体——核小体。核小体的形状类似扁平的碟子, 一连串的核小体组成染色质。核小体组蛋白由球状结构域和 N 端尾巴组成, N 端尾巴不参与形成核小体的内在结构, 但 N 端尾巴上的氨基酸残基存在多种翻译后修饰 (post-translational modification, PTMs) 类型。组蛋白修饰酶能够通过乙酰化、甲基化、磷酸化、泛素化等共价修饰组蛋白尾巴的特定氨基酸残基。组蛋白被修饰后, 其带有的电荷数发生改变,

组蛋白与 DNA 的结合力变化, 最终影响染色质结构和基因表达。同时, 被修饰的组蛋白尾巴还能够为转录因子、染色质重塑因子和 DNA 相互作用蛋白所识别, 进而调节包括 DNA 复制、修复、基因表达、基因沉默在内的多种生物学过程<sup>[1]</sup>。

真菌基因组较小, 携带了最小的一套组蛋白编码基因。除有些真菌含有两个 H4 的拷贝 (命名为 H4.1 和 H4.2) 外, 大多数真菌编码核心组蛋白 H3、H2A、H2B 以及链接区组蛋白 H1 的基因都是唯一的。同时, 真菌也没有很多如编码染色质成分或组蛋白修饰酶的冗余基因, 这使

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFA0900500); 国家自然科学基金(32070077); 山东省自然科学基金(ZR2019MC007)

\*通信作者。E-mail: qinyuqi@sdu.edu.cn

收稿日期: 2020-11-27; 修回日期: 2021-03-16; 网络出版日期: 2021-04-07

得它们成为对组蛋白功能及组蛋白修饰酶进行遗传分析和研究的最优生物体<sup>[2]</sup>。真菌中, 组蛋白的甲基化修饰由组蛋白甲基转移酶(histone methyltransferases, HMTs)和组蛋白去甲基化酶(histone demethylases, HDMs)共同调控。根据靶向氨基酸残基的不同, HMTs 又可分为两类: 组蛋白赖氨酸甲基转移酶(lysine (K) methyltransferases, KMTs)和蛋白质精氨酸甲基转移酶(protein arginine (R) methyltransferases, PRMTs)<sup>[3]</sup>。二者均负责将甲基从 S-腺苷甲硫氨酸(S-adenosylmethionin, SAM)转移至底物组蛋白。KMTs 主要负责组蛋白上的碱性氨基酸赖氨酸(K)上的甲基化, 在其 $\epsilon$ -胺基上加上 1 到 3 个甲基, 形成一甲基、二甲基或三甲基赖氨酸。PRMTs 主要负责组蛋白上的碱性氨基酸精氨酸(R)上的甲基化, 在其胍基上加上 1 个或 2 个甲基, 形成一甲基或二甲基精氨酸。目前, 真菌中对 KMTs 及其生物学功能的研究较 PRMTs 的研究更为广泛和深入。

## 1 KMTs 的结构

大多数 KMTs 含有进化保守的 SET 结构域。SET 结构域是根据在果蝇中发现的同样具有此结构域的 3 种蛋白(Suppressor of variegation 3-9[SU(Var)3-9]、Enhancer of zeste [E(Z)] 和 Trithorax (Trx))而命名, 由相对保守的 130 个氨基酸残基组成<sup>[4]</sup>。随着大规模基因组测序和注释的完成, 研究发现真菌中广泛存在含有 SET 结构域的 KMTs。在两种模式酵母酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*, Sc)和裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*, Sp)中, 分别预测有 12 种和 13 种含有 SET 结构域的蛋白。其中酿酒酵母中的两种蛋白(ScSet1 和 ScSet2)以及裂殖酵母中的 4 种蛋白

(SpSet1、SpSet2、SpClr4、SpSet9)已经被证实具有组蛋白上赖氨酸的转甲基功能。相较于以上两种酵母, 丝状真菌如粗糙脉孢菌(*Neurospora crassa*, Nc)、构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*, An)、禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*, Fg)的基因组上含有编码 SET 结构域蛋白的基因更多, 一般超过 20 个。

在对人类中的 SET7/9、植物中豌豆 Rubisco 大亚基甲基转移酶(LSMT)所含 SET 结构域的三维结构解析的同时, 真菌中执行 H3K9 甲基化的粗糙脉孢菌的 DIM-5 (defective in methylation-5)<sup>[5]</sup>以及裂殖酵母中的 Clr4 (cryptic loci regulator 4)<sup>[6]</sup>的三维结构也被解析。研究表明, 这些蛋白都含有结构上同源的 SET 结构域。图 1-A 以粗糙脉孢菌 NcDIM-5 为例, 展示了此类蛋白的基本结构。含有 SET 结构域的 KMTs 大都包含 1 个核心的 SET 结构域以及分别位于 N 端和 C 端的 2 个非连续性的区域, 这两个侧翼区域分别被称为 Pre-SET (N-SET)和 Post-SET (C-SET)<sup>[7]</sup>。Pre-SET 和 Post-SET 均包含 3-4 条短的  $\beta$  折叠、1 条短的螺旋和几个连接这些二级结构的卷曲环。其中, Post-SET 为不寻常的拓扑结状结构, 1 条  $\beta$  折叠穿过 1 个环区, 形成结状结构(knot-like structure), 也称为假结(pseudoknot)。它们被认为可以帮助转移酶活性位点的构成, 并与整个蛋白的稳定性相关。核心的 SET 结构域含有一系列的  $\beta$  折叠, 形成 3 个分离的片层, 围绕着结状结构(图 1-A)。相对核心 SET 结构域的高度保守性, Pre-SET 和 Post-SET 在不同蛋白中显示出更高的序列和结构变异性。

虽然大多数的 KMTs 含有 SET 结构域, 还有一类不含有 SET 结构域却包含 DOT 结构域的

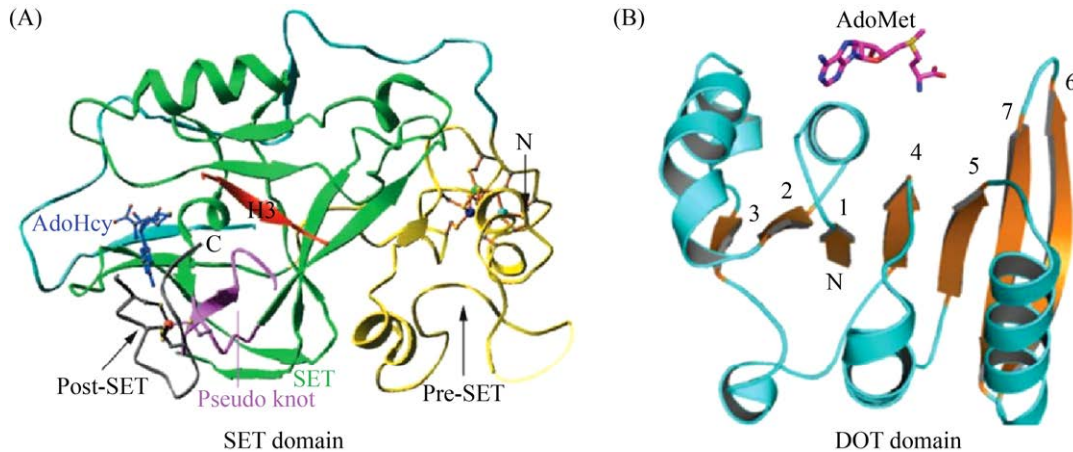


图 1. 组蛋白赖氨酸甲基转移酶的典型结构

Figure 1. Structure of histone lysine methyltransferase. A: SET domain of NcDIM-5. Pre-SET (yellow), SET (green) and Post-SET (gray), N-SET of SET7/9 (yellow), SET (green) and C-SET (gray), Knot-like structure (purple), Bound histone H3 (red). B: DOT domain of ScDot1. Helical domain (blue),  $\beta$ -sheet (orange), Thioadenosylmethionine (pink).

KMTs。对酿酒酵母 *ScDot1* 的结构分析表明，保守的 *Dot1* 结构含有一个 N 端螺旋结构域和 7 个  $\beta$  折叠，其内部包含甲基供体 SAM 的结合位点并带有保守疏水残基的活性位点口袋(图 1-B)。因此，*Dot1* 被归为 7 $\beta$  折叠甲基转移酶(even- $\beta$ -strand (7BS) MTases, 7BS KMTs)。7BS KMTs 主要存在于原核生物和古菌中，除可以甲基化组蛋白外，其底物还包括脂类、核酸和其他非组蛋白。组蛋白特异性的 *Dot1* 是目前发现的唯一真核生物 7BS KMT<sup>[8]</sup>。

## 2 KMTs 的命名、分类和结构域特征

在真菌、植物、果蝇、哺乳动物细胞中均发现了组蛋白的甲基化修饰及其修饰酶。不幸的是，目前的研究中，各个物种中对组蛋白甲基化修饰酶的命名相当混乱，如在人类细胞中，既有根据其功能命名的，如 SUV39H1，又有根据甲基转移酶结构域命名的，如 SET8 (又称 PR-SET7、

KMT5A)。酵母和丝状真菌中对组蛋白甲基化修饰酶的命名也未达成统一，如粗糙脉孢菌中的命名通常与其影响 DNA 甲基化的功能相关，如 NcDIM-5，它与果蝇中的 *Su(var3-9)* 以及裂殖酵母中的 *SpClr4* 蛋白同源。相反的，构巢曲霉中对组蛋白甲基转移酶的命名与酵母系统类似。因此，有必要对其命名和分类进行规范化。

### 2.1 KMTs 的命名和分类

为规范命名，Allis 等<sup>[10]</sup>于 2007 年提出了 KMTs 家族新的命名体系(表 1)，根据其系统发育关系和结构域特征，将 KMTs 家族分为 8 大类，即 KMT1–KMT8。不同物种中的相似酶被赋予了相同的名称，但用不同的前缀来表示起源的物种，如 Sc=*S. cerevisiae*, Sp=*S. pombe*, Nc=*N. crassa*，以更好地区别各类真菌中的组蛋白甲基转移酶。我们现将几类代表性真菌的组蛋白甲基转移酶的命名总结在了表 1，并根据新的命名体系，列出了其对应的新的命名。

表 1. 真菌组蛋白赖氨酸甲基转移酶的命名、甲基化位点和主要功能

Table 1. The nomenclature, methylation sites and main functions of fungal histone lysine methyltransferases

Species	Name		Methylation site	Main function	References	
	New	Original				
Sc	KMT2	ScSet1	H3K4	Transcriptional activation/inhibition; Mitosis	[24–25]	
	KMT3	ScSet2	H3K36	Transcriptional activation/inhibition	[28]	
	KMT4	ScDot1	H3K79	DNA damage repair; Transcription; Heterochromatin maintenance	[30]	
Sp	KMT1	SpClr4	H3K9	Heterochromatin formation; Euchromatin gene silencing	[17]	
	KMT2	SpSet1	H3K4	Transcriptional activation/inhibition	[41]	
	KMT3	SpSet2	H3K36	DNA replication; DNA damage repair	[42]	
KMT5	SpSet9	H4K20	Sensitive to toxic stress	[33]		
	Nc	KMT1	NcDIM-5	H3K9	Heterochromatin formation; DNA methylation	[11,18–19]
		KMT2	NcSET1	H3K4	Development; Circadian rhythm	[27]
KMT3		NcSET2	H3K36	Development; Circadian rhythm	[26–27]	
KMT6	NcSET7	H3K27	Transcription repression	[36–37]		
	Fg	KMT2	FgKMT2	H3K4	Development; Virulence	[43]
		KMT3	FgSET2	H3K36	DNA damage repair; Virulence	[44]
KMT6		FgKMT6	H3K27	Development; Secondary metabolite formation	[38–39]	
Po	KMT2	PoSet1	H3K4	Transcriptional activation; Glycoside hydrolase biosynthesis	[23]	
	KMT3	PoSet2	H3K36	Transcription activation/inhibition; Glycoside hydrolase biosynthesis	[23]	
	KMT4	PoDot1	H3K79	Development; Glycoside hydrolase synthesis	[32]	
Mo	KMT2	MoSET1	H3K4	Development; Virulence	[22]	
An	KMT2	AnSet1	H3K4	Mitosis	[45]	
Afl	KMT2	AflSET1	H3K4	Fungal morphogenesis; Secondary metabolite formation; Virulence	[46]	
	KMT4	AflDOT1	H3K79	Secondary metabolite formation; Virulence	[31]	

Sc=*Saccharomyces cerevisiae*; Sp=*Schizosaccharomyces pombe*; Nc=*Neurospora crassa*; Fg=*Fusarium graminearum*; Po=*Penicillium oxalicum*; Mo=*Magnaporthe oryzae*; An=*Aspergillus nidulans*; Afl=*Aspergillus flavus*.

## 2.2 不同 KMTs 的结构域特征

新的命名和分类体系主要考虑了结构域的进化相关性, 以及酶催化结构域之间的序列同源性和它们的底物特异性。不同 KMTs 显示了区别性的结构域特征。我们将真菌中研究较多的 5 类 KMTs, 即 KMT1–KMT4 和 KMT6 的结构域的基本特征呈现在了图 2 中。

(1) KMT1/SUV39。此类 KMT 的典型结构域特征是, 核心 SET 结构域两侧被 Pre-SET (N-SET) 和 Post-SET 结构域包围, 这两个结构域富含半胱

氨酸, 为组蛋白甲基转移酶行使活性所需(图 2-A)。真菌中的 KMT1 以裂殖酵母中的 SpClr4 和粗糙脉孢菌中的 NcDIM-5 为代表, 但在酿酒酵母中未发现 KMT1。SpClr4 和 NcDIM-5 与果蝇的 Su(Var)3-9 类似, 主要执行 H3K9 甲基化, 导致基因沉默和异染色质形成<sup>[11]</sup>。

(2) KMT2/SET1。此类 KMT 的典型结构域特征是, 存在 3 个显著的同源性区域: RNA 识别基序(RNA recognition motif, RRM)、核心 SET 结构域和 Post-SET 结构域(图 2-B), 其中 RRM 有

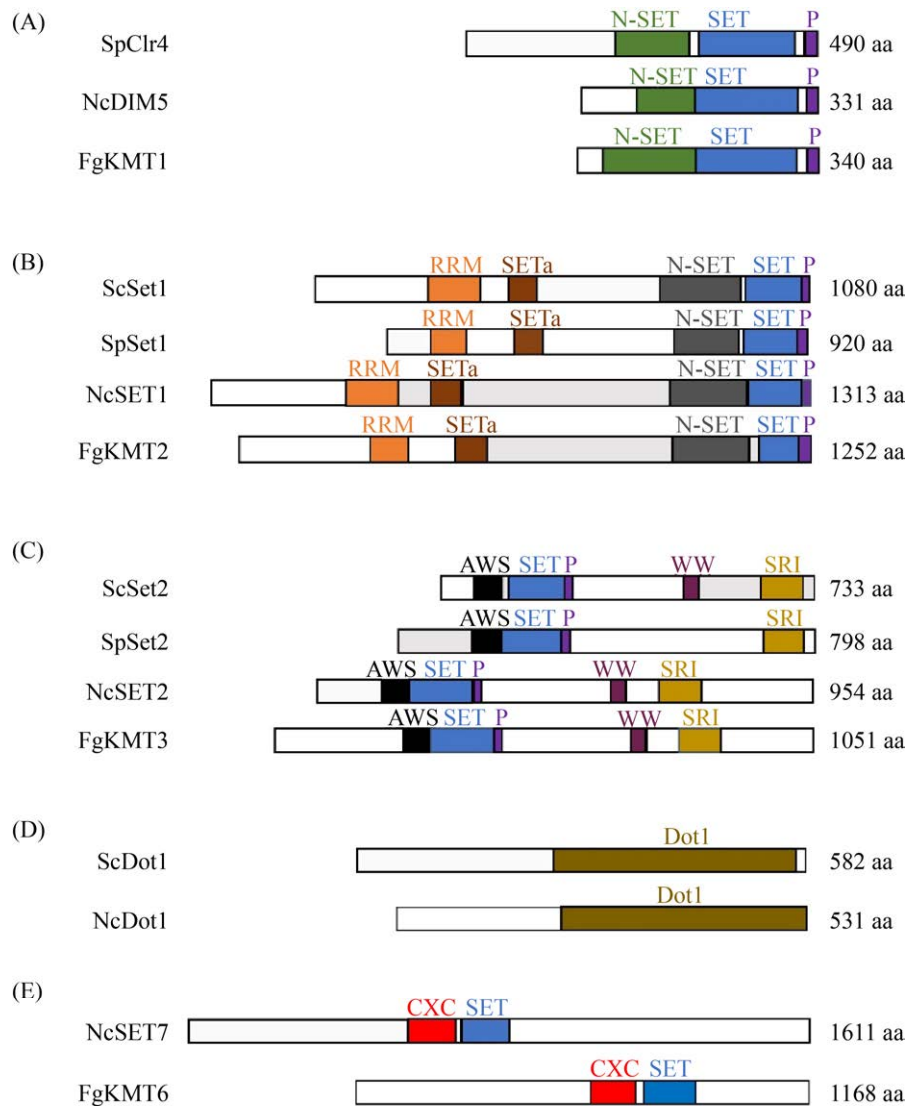


图 2. 五类 KMTs 的结构域特征

Figure 2. The domains of five types of KMTs. A: KMT1; B: KMT2; C: KMT3; D: KMT4; E: KMT6. Sc=*Saccharomyces cerevisiae*; Sp=*Schizosaccharomyces pombe*; Nc=*Neurospora crassa*; Fg=*Fusarium graminearum*. RRM: RNA recognition motif; SETa: SET associated; N-SET: Pre-SET; P: Post-SET; AWS: Associated with SET; WW: Tryptophans-Tryptophans; SRI: Set2 Rpb1 interacting domain.

助于甲基转移酶和染色质结合并与甲基转移酶的活性相关。真菌中的 KMT2 以酿酒酵母和裂殖酵母的甲基转移酶 SET1 为代表，它们与黑腹果蝇中的 Trithorax 类似，特异性催化 H3K4 位点的甲基化。一般认为，H3K4 位点的甲基化是基因激活的标志，但也发现了基因抑制的现象<sup>[12]</sup>。

(3) KMT3/SET2。此类 KMT 的典型结构域特征是，除包含核心 SET 和 Post-SET 结构域外，还有一个 Pre-SET 的子域 AWS (associated with SET) 和一个 WW 结构域 (tryptophans(W)-tryptophans (W))。靠近蛋白的 C 末端，还含有 SRI (Set2 rpb1 interacting) 结构域 (图 2-C)。SRI 结构域负责将

SET2 的催化活性靶向到基因编码区, 从而将 H3K36 的甲基化与转录延长耦合。真菌中的 KMT3 以酿酒酵母和裂殖酵母中的组蛋白甲基转移酶 SET2 为代表。一般认为, SET2 可与转录延伸阶段的 RNA 聚合酶 II (Pol II) 结合并使 H3K36 甲基化, 与转录延伸密切相关<sup>[13]</sup>。

(4) KMT4/DOT1。此类 KMT 是目前唯一知道的不包含 SET 结构域的组蛋白赖氨酸甲基转移酶, 含有典型的 DOT 结构域(图 2-D)。真菌中的 KMT4 以酿酒酵母的组蛋白甲基转移酶 ScDOT1 (disruptor of telomeric silencing) 为代表, 并因其受损能够干扰端粒沉默而被命名<sup>[14]</sup>。裂殖酵母中不存在 DOT1 同源蛋白。

(5) KMT6。此类 KMT 的典型结构域特征是, 在核心 SET 结构域的两侧, 不具有典型的 Pre-SET 和 Post-SET 结构域, 但在其 N 端, 含有富含半胱氨酸的 CXC 结构域(图 2-E)。酿酒酵母和裂殖酵母中均不存在 KMT6, 但另一种酵母型真菌新型隐球菌(*Cryptococcus neoformans*)以及丝状真菌粗糙脉胞菌和禾谷镰刀菌中存在 KMT6。一般认为, KMT6 执行 H3K27 的甲基化, 与异染色质形成和转录沉默相关。

除以上含有比较典型结构域特征的 KMTs, 真菌中还存在着一些同时具有 SET 结构域和其他特殊结构域的蛋白。如脉胞菌中的 NcSET-8, 除包含一个 SET 结构域外, 还包含 JmjC 基序。在许多真核蛋白质中均具有 JmjC 结构域, 但有趣的是, 通常认为 JmjC 在组蛋白去甲基化而非甲基化机制中起作用<sup>[15]</sup>。此外, 裂殖酵母 SpSET-3 包含部分 SET 结构域和 Znf\_RING/FYVE/PHD 基序, 后者为较特殊的结构域, 真核生物中具有此类结构域的蛋白较少, 其在转甲基中的功能也尚未确定。

### 3 KMTs 的甲基化位点和生物学功能

根据目前的研究结果, KMTs 对真菌组蛋白赖氨酸甲基化位点主要为组蛋白 H3 上 K4、K9、K27、K36、K79 以及组蛋白 H4 的 K20。研究显示, 不同种类 KMTs 可能和其他辅助亚基一起构成复合物, 执行不同位点的甲基化, 在不同真菌物种间具有不同的生物学功能。我们对两种模式酵母酿酒酵母和裂殖酵母、一种模式丝状真菌粗糙脉胞菌以及其他的一些重要丝状真菌如构巢曲霉、稻瘟病菌、禾谷镰刀菌、草酸青霉 (*Penicillium oxalicum*) 中的组蛋白不同位点甲基化的研究结果进行了总结(表 1)。

#### 3.1 KMT1 执行的 H3K9 位点的甲基化

真菌中 H3K9 位点的甲基化主要由 KMT1 执行。一般认为, H3K9 的甲基化与异染色质形成和常染色质基因沉默有关。裂殖酵母中, SpClr4 和其他 4 个亚基(SpRik1、SpRaf1、SpRaf、SpRbx1) 形成的 SpClr4 复合物(SpClr4 complex, SpCLRC) 是真菌中首次发现的 KMT1 复合物。除 SpRbx1 外, SpCLRC 中的其他亚基都被证明为异染色质沉默所必需<sup>[16]</sup>。SpClr4 催化 H3K9 位点的甲基化优先发生在异染色质相关区域, 甲基化后的 H3K9me 可以作为异染色质蛋白(HP1)的结合位点, 从而为 Swi6 (果蝇 HP1 的同源蛋白) 创造结合位点。Swi6 被 H3K9me 招募后, 与染色质修饰因子形成沉默复合物, 帮助异染色质的形成<sup>[17]</sup>。同时, SpClr4 本身含有一个与 H3K9me<sub>3</sub> 结合的色域(chromo domain), 这对沉默复合物的扩散过程至关重要。

粗糙脉胞菌中由 NcDIM-5 执行 H3K9 的三甲

基化, 被 HP1 识别后, 招募 DNA 甲基转移酶 DIM-2 使 DNA 甲基化。如果 H3K9me3 丧失, 异染色质区的转化率(turnover)增加<sup>[18]</sup>。不同真菌中的 KMT1 复合物组成不同。粗糙脉孢菌中, NcDim-5 与 DIM-7、-9、CUL4、DDB1 形成复合物 NcDCDC (DIM-5、-7、-9、CUL4、DDB1 complex)。NcDIM-5 的活性依赖于完整的 NcDCDC。其中, 复合物中 NcDIM-7 招募 NcDIM-5 到异染色质区, 泛素连接酶组分 Cul4 和 DDB1 与 H3K9 甲基化密切相关<sup>[19]</sup>。

### 3.2 KMT2 执行的 H3K4 位点的甲基化

真菌中 H3K4 位点的甲基化主要由 KMT2/Set1 执行。在多种真菌中均发现了 KMT2/Set1。酿酒酵母中的 ScSet1 与其他 7 个保守的亚基即 Swd1、Swd2、Swd3、Bre2、Sdc1、Spp1 和 Sgh1 共同形成 COMPASS (complex proteins associated with Set1)复合物, 这些亚基在高等真核生物具有较高的保守性。研究表明, 亚基中的 Swd1 和 Swd3 负责复合物的稳定性, Swd2 与复合物的复杂活性有关, Spp1、Bre2 和 Sdc1 负责二甲基化和三甲基化位点的特异性<sup>[20]</sup>, 这些亚基共同作用, 帮助催化 H3K4 的甲基化<sup>[21]</sup>。组蛋白 H3K4 位点的甲基化主要发生在活性转录基因的增强子区和启动子区, 与基因转录活性相关。例如, 对稻瘟病菌野生株和 Mose1 突变体的 RNA-seq 和 ChIP-seq 研究显示, 在稻瘟病菌感染水稻期间, 5%的基因上的 H3K4me2/3 水平发生变化, 并与基因激活相关。MoSet1 突变体表现显著的生长缺陷, 其分生孢子和附着胞形成受损, 并严重影响其感染过程<sup>[22]</sup>。本研究室最近的研究表明, 在纤维素酶产生菌草酸青霉中, PoSet1 负责 H3K4 的一甲基化和二甲基化。PoSet1 通过与其他

COMPASS 亚基、RNA Pol II 和通用转录因子如 TFIID 的相互作用, 偏向结合靶基因的核心启动子区, 激活主要纤维素酶编码基因的转录<sup>[23]</sup>。最新在酿酒酵母中的研究也证实, ScSet1 的 N-末端结构域和 Swd2 亚基一起与 Pol II 的 CTD 区相互作用以招募 COMPASS 参与转录激活<sup>[24]</sup>。除与基因转录活性相关外, 最近还发现活性基因的 H3K4 甲基化减轻了酿酒酵母复制压力下的转录-复制冲突(transcription-replication conflicts)<sup>[25]</sup>。

现有研究显示, 真菌中含有 SET1 的 COMPASS 复合物相对保守, 但是它们的精确组成和各个亚基的功能可能因物种而异。对植物或动物病原菌来说, 可以根据宿主内部不同生长阶段以及外部的不同条件灵活改变这些复合物的组成。

### 3.3 KMT3 执行的 H3K36 位点的甲基化

H3K36 位点的二、三甲基化主要由 KMT3/SET2 执行。在多种真菌中均发现了 KMT3/Set2。酿酒酵母中的研究发现, Set2 通过与延伸阶段的 RNA Pol II 结合并甲基化 H3K36。其中, H3K36me3 通常出现在基因的 3'端附近, 与活跃转录相关。如在粗糙脉孢菌中, NcSet2 突变株生长缓慢, 产生的分生孢子稀少, 且雌性不育, 推测 H3K36 的甲基化为参与无性和有性发育基因正常表达所必需<sup>[26]</sup>。NcSet2 能够被节律性地招募到 *frq* 基因座(rhythmic frequency)上, 导致 *frq* 基因座上节律性的 H3K36 甲基化, 同时抑制核小体中的组蛋白交换以维持适当的乙酰化状态, 从而维持生物钟的节律性。由于 NcSET-2 缺失或 H3K36R 突变所导致的 H3K36 甲基化缺失, 可引起 *frq* 基因转录失调并带来明显的节律丧失<sup>[27]</sup>。



尽管大多数研究表明 Set2 和 H3K36 的甲基化与转录激活有关,也有发现 H3K36 的甲基化与转录抑制有关。如裂殖酵母中的 H3K36me<sub>2</sub> 可以招募 Rpd3S 组蛋白去乙酰酶复合物抑制转录<sup>[28]</sup>。本研究室也发现草酸青霉 PoSet2 的缺失反而广泛激活纤维素酶编码基因的转录,上调纤维素酶合成,证明 PoSet2 是纤维素酶基因表达的负调控因子<sup>[23]</sup>。

### 3.4 KMT4 执行的 H3K79 位点的甲基化

H3K79 位点的甲基化主要由 KMT4/DOT1 执行。酿酒酵母中的研究显示,与含有 SET 结构域的甲基转移酶相比,ScDot1 对游离的组蛋白没有活性;此外, DOT1 对赖氨酸残基的修饰并非发生在组蛋白 N 端或 C 端尾部,而是发生在组蛋白 H3 的球状区域内,与 DNA 损伤修复、RNA 转录、细胞周期调控和异染色质的维持相关<sup>[29]</sup>。最近的研究还表明, ScDot1 显示组蛋白伴侣活性,即 ScDot1 可通过核小体结合域将核心组蛋白组装成核小体,促进 ATP 依赖的染色质重塑活动,通过组蛋白交换动态调节核小体<sup>[30]</sup>。

虽然在多种丝状真菌如粗糙脉孢菌和构巢曲霉中均发现了单一的 Dot1 同源蛋白,且具有相似的结构域,但目前丝状真菌中有关 Dot1 和 H3K79 甲基化的研究仍然较少。仅在黄曲霉和草酸青霉中开展了对其效应和机制的研究。黄曲霉 AflDot1 与黄曲霉毒素的产生和黄曲霉致病性相关<sup>[31]</sup>。草酸青霉 PoDot1 则参与调控真菌的无性发育和形态发生,同时特别影响了以淀粉酶和主要纤维素酶为代表的糖苷水解酶的合成<sup>[32]</sup>。

### 3.5 KMT5 执行的 H4K20 位点的甲基化

H4K20 位点的甲基化主要由 KMT5 执行。在人和果蝇中,都鉴定到了 KMT5/Set9 所执行的

H4K20 位点的甲基化。根据基因组的序列信息,许多真菌也含有 Set9 的同源物,但相比其他种类的 KMTs,真菌中对 KMT5 研究的覆盖面较小,目前仅在裂殖酵母中进行了实验研究。结果显示, SpSet9 可在 H4K20 位点进行一、二、三甲基化反应。其中,含有 PWWP 结构域的 Pdp1 蛋白同时结合甲基化的 H4K20 和双链 DNA,起到衔接蛋白的作用。然而, Pdp1 的丢失也会消除 H4K20 甲基化,使细胞对毒性胁迫敏感,并降低检查点蛋白 Crb2 与 H4K20me<sub>2</sub> 的结合<sup>[33]</sup>。

### 3.6 KMT6 执行的 H3K27 位点的甲基化

H3K27 位点的甲基化主要由 KMT6 执行。H3K27 的甲基化与兼性异染色质形成有关,以时间和空间依赖的方式控制基因的表达。许多真菌都含有 KMT6 的同源基因,但也有很多真菌如酿酒酵母、裂殖酵母和构巢曲霉无编码 KMT6 的基因。KMT6 是多梳抑制复合物(polycomb repressive complex 2, PRC2)的一部分<sup>[34]</sup>。不同真菌中的 PRC2 (KMT6)复合物组成有所不同。除 KMT6 外,粗糙脉孢菌中的 PRC2 复合物还包括 EED、SUZ12 和 NPF 三个亚基,这些亚基与兼性以及组成型异染色质的形成都相关。有趣的是,脉孢菌中 KMT6 的缺失并不会产生明显的表型,但会导致 H3K27me<sub>3</sub> 标记的区域和未标记的区域中约 130 个基因上调<sup>[35]</sup>。粗糙脉孢菌中的最新研究表明,除需要 PRC2 中包含的亚基, H3K27 的甲基化还需要组蛋白变体 H2A.Z 以及 PRC2 辅助亚基 PAS (PRC2 accessory subunit)的参与<sup>[36-37]</sup>。

藤仓镰刀菌(*Fusarium fujikuroi*)中, PRC2 复合体由 KMT6、EED 和 SUZ12 组成,缺少脉孢菌中发现的 NPF 亚基。H3K27 甲基化产生沉默的兼性异染色质,覆盖基因组上超过三分之一的



区域。PRC2 复合体中的 KMT6 突变或敲低可降低细胞内 H3K27me3 水平, 消除沉默标记, 激活约占基因组 14% 的 1500 多个基因的表达<sup>[38]</sup>, 并诱导隐性和沉默的次级代谢物基因簇的表达<sup>[39]</sup>。禾谷镰刀菌中 KMT6 的突变体表现出生长缺陷和不育, 编码真菌毒素、色素相关的基因组成性表达。

新型隐球菌中, PRC2 复合物由 KMT6、EED、CCC1、BND1 和 MSL1 组成, 删除 EED 会消除 H3K27me, 而 CCC1 亚基的破坏则导致 H3K27me 的重新分布。PRC2 亚基之间的物理相互作用, 以及它们相应的编码基因敲除的表型, 表明它们在功能上相互配合, 各个亚基在基因沉默中发挥了特异而可分离的作用<sup>[40]</sup>。

对以上 KMT1–KMT6 的功能及其结构域分析表明, 大部分真菌甲基转移酶和组蛋白的特定修饰位点存在一一对应的关系。但是, 对于是否某个保守结构域决定甲基化靶点, 尚未有定论。例如, 在藤仓镰刀菌中, 除 Set2 外, 还具有另外一种 H3K36me-KMT——Ash1。Ash1 的结构域组成与 Set2 有所不同, 前者缺少典型 Set2 甲基转移酶所具有的 WW 和 SRI 区域, 但其甲基化靶标同样为 H3K36, 主要负责 H3K36 位点的一、二甲基化<sup>[47]</sup>。这表明, 一个位点的甲基化可由不同的甲基转移酶负责。而构巢曲霉 AnCclA (COMPASS 复合物的亚基 Bre2 的同系物) 的突变不仅造成 H3K4me2/3 的下降, 同时还伴有 H3K9me2/3 水平的下降<sup>[48]</sup>。显示 Set1/COMPASS (KMT2) 和 KMT1 复合物的功能似乎有重叠, 反映了真菌中组蛋白修饰及其修饰酶的多样性和复杂性。

## 4 总结和展望

自然界中, 真菌显示出广泛的形态, 并发展出各自的复杂的代谢网络。真菌能够利用各种各样的底物, 产生多种代谢产物, 如乙醇、各种水解酶类、抗生素和毒素等, 这使得真菌在生物技术、医学、药物生产和农业生产领域中备受关注。近年来, 真菌中组蛋白甲基化修饰的研究表明, 甲基化标记除了可作为招募效应蛋白的平台参与转录调控, 还与真菌中 DNA 复制和修复、异染色质形成相关, 参与了包括真菌光调节和昼夜节律、水解酶合成、致病力形成、次级代谢基因簇表达等过程(表 1), 显示了组蛋白甲基化修饰对真菌重要生物过程的调节作用。值得注意的是, 虽然真菌中组蛋白甲基化修饰的研究取得了快速的进展, 但还有许多问题有待于解决。

(1) 揭示真菌中所有 KMTs 的靶标和生物学功能是当前的重要目标。目前在真菌中, 对组蛋白甲基化修饰的研究主要局限于两种酵母(酿酒酵母和裂殖酵母)和一种丝状真菌(粗糙脉孢菌)。然而, 这 3 种真菌并不能完全代表具有代谢和系统发育多样性的真菌世界。即便在这 3 种真菌中, 一些保守的具有 SET 结构域的蛋白其甲基化底物的生物学功能也仍然未知。例如, 酿酒酵母 ScSet3 和粗糙脉孢菌的 NcSET-4 是保守的 HDAC 复合物的一部分, 通过 PHD 域与 H3K4me2 结合<sup>[49]</sup>, 然而其甲基化的底物仍然未知。粗糙脉孢菌 NcSET-2 预测甲基化 H3K36, 也尚未有实验证据支持。真菌中已经发现的组蛋白的某些甲基化位点, 如酿酒酵母中被认为是一种进化保守的减数分裂标记的甲基化的 H2BK34 位点<sup>[50]</sup>, 其甲基化由哪种 KMTs 执行也尚未知晓。同时, 真菌与多细胞动物中的组蛋白甲基

转移酶的种类和功能有差异。在人、小鼠以及果蝇中取得的 KMTs 的研究结果无法完全应用于真菌相似蛋白的研究中。如脊椎动物中的 KMT7 和 KMT8 在真菌中完全缺失, 其功能可能由一些真菌特异性 SET 结构域蛋白执行。

(2) 组蛋白甲基转移酶之间的关系尚待解析。细胞内部, 各种翻译后修饰过程并非独立存在, 包括 KMTs 在内的各种修饰蛋白之间存在的“交叉对话”(cross talk)能够产生相互连接的正负反馈回路。例如, 禾谷镰刀菌缺乏 H3K27 甲基化的突变体中, 大约四分之一的基因表达被上调, 同时在这些区域中的许多位置没有检测到 H3K4me2 或 H3K4me3<sup>[37]</sup>。粗糙脉孢菌中包括 *frq* 在内的部分基因座上, H3K9me3 介导的兼性异染色质的形成同时需要 H3K4 的甲基化<sup>[51]</sup>。最新的研究发现, Set1/COMPASS 通过破坏 KMT1/Clr4 活性和核小体稳定性阻止异染色质侵入常染色体位点<sup>[52]</sup>。以上现象提示了组蛋白甲基化相互影响、相互协调的关系。除了组蛋白甲基转移酶本身的“交叉对话”, 组蛋白甲基转移酶与其他包括乙酰化、泛素化修饰酶类在内的多种组蛋白修饰酶也具有“交叉对话”。对它们具体作用机制以及产生的生物学效应还有待于深入了解。

(3) 与两种模式酵母相比, 目前人们对丝状真菌的组蛋白甲基化修饰了解更少。相比酿酒酵母, 丝状真菌具有显著不同和更加复杂的代谢组成, 因此, 酿酒酵母中获得的数据通常不适用于丝状真菌。真菌包含大约 150 万种, 其中大部分是丝状真菌, 因此有必要投入更多的研究到丝状真菌的组蛋白甲基化修饰相关领域的研究中, 从而更加充分地了解真菌生物学并在各种生物技术领域中有效利用真菌。

## 参考文献

- [1] Lachner M, Jenuwein T. The many faces of histone lysine methylation. *Current Opinion in Cell Biology*, 2002, 14(3): 286–298.
- [2] Freitag M. 5 Fungal Chromatin and Its Role in Regulation of Gene. *Expression Fungal Genomics*, 2014, 2(5): 99–120. DOI: 10.1007/978-3-642-45218-5\_5.
- [3] Freitag M. Histone methylation by SET domain proteins in fungi. *Annual Review of Microbiology*, 2017, 71: 413–439.
- [4] Strahl BD, Allis CD. The language of covalent histone modifications. *Nature*, 2000, 403(6765): 41–45.
- [5] Zhang X, Tamaru H, Khan SI, Horton JR, Keefe LJ, Selker EU, Cheng XD. Structure of the *Neurospora* SET domain protein DIM-5, a histone H3 lysine methyltransferase. *Cell*, 2002, 111(1): 117–127.
- [6] Min JR, Zhang X, Cheng XD, Grewal SIS, Xu RM. Structure of the SET domain histone lysine methyltransferase Clr4. *Nature Structural Biology*, 2002, 9(11): 828–832.
- [7] Yeates TO. Structures of SET domain proteins: protein lysine methyltransferases make their mark. *Cell*, 2002, 111(1): 5–7.
- [8] Falnes PØ, Jakobsson ME, Davydova E, Ho A, Malecki J. Protein lysine methylation by seven- $\beta$ -strand methyltransferases. *The Biochemical Journal*, 2016, 473(14): 1995–2009.
- [9] Dillon SC, Zhang X, Trievel RC, Cheng XD. The SET-domain protein superfamily: protein lysine methyltransferases. *Genome Biology*, 2005, 6(8): 1–10.
- [10] Allis CD, Berger SL, Cote J, Dent S, Jenuwien T, Kouzarides T, Pillus L, Reinberg D, Shi Y, Shiekhhattar R, Shilatifard A, Workman J, Zhang Y. New nomenclature for chromatin-modifying enzymes. *Cell*, 2007, 131(4): 633–636.
- [11] Jackson JP, Lindroth AM, Cao XF, Jacobsen SE. Control of CpNpG DNA methylation by the KRYPTONITE histone H3 methyltransferase. *Nature*, 2002, 416(6880): 556–560.
- [12] Cheng J, Blum R, Bowman C, Hu DQ, Shilatifard A, Shen S, Dynlacht BD. A role for H3K4 monomethylation in gene repression and partitioning of chromatin readers. *Molecular Cell*, 2014, 53(6): 979–992.
- [13] Kizer KO, Phatnani HP, Shibata Y, Hall H, Greenleaf AL, Strahl BD. A novel domain in Set2 mediates RNA polymerase II interaction and couples histone H3 K36 methylation with transcript elongation. *Molecular and Cellular Biology*, 2005, 25(8): 3305–3316.

- [14] Singer MS, Kahana A, Wolf AJ, Meisinger LL, Peterson SE, Goggin C, Mahowald M, Gottschling DE. Identification of high-copy disruptors of telomeric silencing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 1998, 150(2): 613–632.
- [15] Tsukada YI, Fang J, Erdjument-Bromage H, Warren ME, Borchers CH, Tempst P, Zhang Y. Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins. *Nature*, 2006, 439(7078): 811–816.
- [16] Kuscu Z, Zaratiegui M, Kim HS, Wah DA, Martienssen RA, Schalch T, Joshua-Tor L. CRL4-like Clr4 complex in *Schizosaccharomyces pombe* depends on an exposed surface of Dos1 for heterochromatin silencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 111(5): 1795–1800.
- [17] Grewal SIS, Jia ST. Heterochromatin revisited. *Nature Reviews Genetics*, 2007, 8(1): 35–46.
- [18] Storck WK, Abdulla SZ, Rountree MR, Bicocca VT, Selker EU. A light-inducible strain for genome-wide histone turnover profiling in *Neurospora crassa*. *Genetics*, 2020, 215(3): 569–578.
- [19] Zhao YB, Shen Y, Yang SL, Wang JY, Hu QW, Wang Y, He Q. Ubiquitin ligase components Cullin4 and DDB1 are essential for DNA methylation in *Neurospora crassa*. *Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285(7): 4355–4365.
- [20] Schneider J, Wood A, Lee JS, Schuster R, Dueker J, Maguire C, Swanson SK, Florens L, Washburn MP, Shilatifard A. Molecular regulation of histone H3 trimethylation by COMPASS and the regulation of gene expression. *Molecular Cell*, 2005, 19(6): 849–856.
- [21] Dehé PM, Géli V. The multiple faces of Set1. *Biochemistry and cell biology*, 2006, 84(4): 536–548.
- [22] Pham KTM, Inoue Y, Vu BV, Nguyen HH, Nakayashiki T, Ikeda KI, Nakayashiki H. MoSET1 (histone H3K4 methyltransferase in *Magnaporthe oryzae*) regulates global gene expression during infection-related morphogenesis. *PLoS Genetics*, 2015, 11(7): e1005385.
- [23] Li YN, Hu YY, Zhu Z, Zhao KL, Liu GD, Wang LS, Qu YB, Zhao J, Qin YQ. Normal transcription of cellulolytic enzyme genes relies on the balance between the methylation of H3K36 and H3K4 in *Penicillium oxalicum*. *Biotechnology for Biofuels*, 2019, 12: 198.
- [24] Bae HJ, Dubarry M, Jeon J, Soares LM, Dargemont C, Kim J, Geli V, Buratowski S. The Set1 N-terminal domain and Swd2 interact with RNA polymerase II CTD to recruit COMPASS. *Nature Communications*, 2020, 11(1): 2181.
- [25] Chong SY, Cutler S, Lin JJ, Tsai CH, Tsai HK, Biggins S, Tsukiyama T, Lo YC, Kao CF. H3K4 methylation at active genes mitigates transcription-replication conflicts during replication stress. *Nature Communications*, 2020, 11: 809.
- [26] Adhvaryu KK, Morris SA, Strahl BD, Selker EU. Methylation of histone H3 lysine 36 is required for normal development in *Neurospora crassa*. *Eukaryotic Cell*, 2005, 4(8): 1455–1464.
- [27] Sun GY, Zhou ZP, Liu X, Gai KX, Liu QQ, Cha J, Kaleri FN, Wang Y, He Q. Suppression of WHITE COLLAR-independent frequency transcription by histone H3 lysine 36 methyltransferase SET-2 is necessary for clock function in *Neurospora*. *Journal of Biological Chemistry*, 2016, 291(21): 11055–11063.
- [28] Suzuki S, Kato H, Suzuki Y, Chikashige Y, Hiraoka Y, Kimura H, Nagao K, Obuse C, Takahata S, Murakami Y. Histone H3K36 trimethylation is essential for multiple silencing mechanisms in *fission yeast*. *Nucleic Acids Research*, 2016, 44(9): 4147–4162.
- [29] Wood K, Tellier M, Murphy S. DOT1L and H3K79 methylation in transcription and genomic stability. *Biomolecules*, 2018, 8(1): E11.
- [30] Lee S, Oh S, Jeong K, Jo H, Choi Y, Seo HD, Kim M, Choe J, Kwon CS, Lee D. Dot1 regulates nucleosome dynamics by its inherent histone chaperone activity in yeast. *Nature Communications*, 2018, 9: 240.
- [31] Liang LL, Liu YH, Yang KL, Lin GN, Xu ZL, Lan HH, Wang XN, Wang SH. The putative histone methyltransferase DOT1 regulates aflatoxin and pathogenicity attributes in *Aspergillus flavus*. *Toxins*, 2017, 9(7): E232.
- [32] Li YN, Hu YY, Zhao KL, Pan YJ, Qu YB, Zhao J, Qin YQ. The indispensable role of histone methyltransferase PoDot1 in extracellular glycoside hydrolase biosynthesis of *Penicillium oxalicum*. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 2566.
- [33] Qiu Y, Zhang W, Zhao C, Wang Y, Wang WW, Zhang JH, Zhang ZY, Li GH, Shi YY, Tu XM, Wu JH. Solution structure of the Pdp1 PWWP domain reveals its unique binding sites for methylated H4K20 and DNA. *The Biochemical Journal*, 2012, 442(3): 527–538.
- [34] Jiao L, Liu X. Structural basis of histone H3K27 trimethylation by an active polycomb repressive complex 2. *Science*, 2015, 350(6258): aac4383.
- [35] Jamieson K, Rountree MR, Lewis ZA, Stajich JE, Selker EU. Regional control of histone H3 lysine 27 methylation in *Neurospora*. *PNAS*, 2013, 110(15): 6027–6032.

- [36] McNaught KJ, Wiles ET, Selker EU. Identification of a PRC2 accessory subunit required for subtelomeric H3K27 methylation in *Neurospora*. *Molecular and Cellular Biology*, 2020, 40(11):e00003–e00020.
- [37] Courtney AJ, Kamei M, Ferraro AR, Gai KX, He Q, Honda S, Lewis ZA. Normal patterns of histone H3K27 methylation require the histone variant H2A.Z in *Neurospora crassa*. *Genetics*, 2020, 216(1): 51–66.
- [38] Connolly LR, Smith KM, Freitag M. The *Fusarium graminearum* histone H3 K27 methyltransferase KMT6 regulates development and expression of secondary metabolite gene clusters. *PLoS Genetics*, 2013, 9(10): e1003916.
- [39] Studt L, Rösler SM, Burkhardt I, Arndt B, Freitag M, Humpf HU, Dickschat JS, Tudzynski B. Knock-down of the methyltransferase Kmt6 relieves H3K27me3 and results in induction of cryptic and otherwise silent secondary metabolite gene clusters in *Fusarium fujikuroi*. *Environmental Microbiology*, 2016, 18(11): 4037–4054.
- [40] Dumesic PA, Homer CM, Moresco JJ, Pack LR, Shanle EK, Coyle SM, Strahl BD, Fujimori DG, Yates JR III, Madhani HD III. Product binding enforces the genomic specificity of a yeast polycomb repressive complex. *Cell*, 2015, 160(1/2): 204–218.
- [41] Noma KI, Grewal SIS. Histone H3 lysine 4 methylation is mediated by Set1 and promotes maintenance of active chromatin states in *fission yeast*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, 99(Suppl 4): 16438–16445.
- [42] Pai CC, Kishkevich A, Deegan RS, Keszthelyi A, Folkes L, Kearsey SE, De León N, Soriano I, de Bruin RAM, Carr AM, Humphrey TC. Set2 methyltransferase facilitates DNA replication and promotes genotoxic stress responses through MBF-dependent transcription. *Cell Reports*, 2017, 20(11): 2693–2705.
- [43] Janevska S, Güldener U, Sulyok M, Tudzynski B, Studt L. Set1 and Kdm5 are antagonists for H3K4 methylation and regulators of the major conidiation-specific transcription factor gene ABA1 in *Fusarium fujikuroi*. *Environmental Microbiology*, 2018, 20(9): 3343–3362.
- [44] Gu Q, Wang ZZ, Sun X, Ji TT, Huang H, Yang Y, Zhang H, Tahir HAS, Wu LM, Wu HJ, Gao XW. FvSet2 regulates fungal growth, pathogenicity, and secondary metabolism in *Fusarium verticillioides*. *Fungal Genetics and Biology*, 2017, 107: 24–30.
- [45] Govindaraghavan M, Anglin SL, Osmani AH, Osmani SA. The Set1/COMPASS histone H3 methyltransferase helps regulate mitosis with the CDK1 and NIMA mitotic kinases in *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 2014, 197(4): 1225–1236.
- [46] Liu YJ, Zhang MJ, Xie R, Zhang F, Wang S, Pan XH, Wang SH, Zhuang ZH. The methyltransferase AflSet1 is involved in fungal morphogenesis, AFB1 biosynthesis, and virulence of *Aspergillus flavus*. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 234.
- [47] Bicocca VT, Ormsby T, Adhvaryu KK, Honda S, Selker EU. ASH1-catalyzed H3K36 methylation drives gene repression and marks H3K27me2/3-competent chromatin. *ELife*, 2018, 7: e41497.
- [48] Bok JW, Chiang YM, Szewczyk E, Reyes-Dominguez Y, Davidson AD, Sanchez JF, Lo HC, Watanabe K, Strauss J, Oakley BR, Wang CCC, Keller NP. Chromatin-level regulation of biosynthetic gene clusters. *Nature Chemical Biology*, 2009, 5(7): 462–464.
- [49] Pijnappel WW, Schaft D, Roguev A, Shevchenko A, Tekotte H, Wilm M, Rigaut G, Séraphin B, Aasland R, Stewart AF. The *S. cerevisiae* SET3 complex includes two histone deacetylases, Hos2 and Hst1, and is a meiotic-specific repressor of the sporulation gene program. *Genes & Development*, 2001, 15(22): 2991–3004.
- [50] Crespo M, Luense LJ, Arlotto M, Hu JL, Dorsey J, García-Oliver E, Shah PP, Pflieger D, Berger SL, Govin J. Systematic genetic and proteomic screens during gametogenesis identify H2BK34 methylation as an evolutionary conserved meiotic mark. *Epigenetics & Chromatin*, 2020, 13(1): 35.
- [51] Zhu QQ, Ramakrishnan M, Park J, Belden WJ. Histone H3 lysine 4 methyltransferase is required for facultative heterochromatin at specific loci. *BMC Genomics*, 2019, 20(1): 350.
- [52] Greenstein RA, Barrales RR, Sanchez NA, Bisanz JE, Braun S, Al-Sady B. Set1/COMPASS repels heterochromatin invasion at euchromatic sites by disrupting Suv39/Clr4 activity and nucleosome stability. *Genes & Development*, 2020, 34(1/2): 99–117.

# Advances in the research of fungal lysine methyltransferases

Mengxue Li<sup>1</sup>, Yanan Li<sup>2</sup>, Yinbo Qu<sup>1</sup>, Yuqi Qin<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>National Glycoengineering Research Center, Shandong University, Qingdao 266237, Shandong Province, China

<sup>2</sup>College of Life Sciences of Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, Henan Province, China

**Abstract:** Protein methylation modification is one of the ways of post-translational modification. In fungi, a variety of lysine methyltransferases perform methylation of lysines at specific sites on histones. The methylation of lysine on histones is related to fungal DNA replication, transcription, and heterochromatin formation. Methylation is involved in a variety of biological processes, such as fungal development, circadian rhythm regulation, secondary metabolic gene cluster expression, hydrolase synthesis, and pathogenic fungal virulence formation. We summarize the nomenclature, classification, domains, structures of the catalytic domain of KMTs, and the roles of methylation in different fungi. We also discuss the research limitations and the future research direction.

**Keywords:** fungi, histone, methylation, methyltransferases

(本文责编: 张晓丽)

---

Supported by the National Key Research and Development Program (2018YFA0900500), by the National Natural Science Foundation of China (32070077) and by the Shandong Natural Science Foundation (ZR2019MC007)

\*Corresponding author. Tel: +86-13964077822; E-mail: qinyuqi@sdu.edu.cn

Received: 27 November 2020; Revised: 16 March 2021; Published online: 7 April 2021