

mRNA表观修饰方式及m⁶A功能研究进展

甘海丽, 洪岭, 杨凤莲, 柳定凤, 金莉萍, 郑青亮

同济大学附属第一妇婴保健院临床转化研究中心, 上海 201204

甘海丽, 洪岭, 杨凤莲, 等. mRNA表观修饰方式及m⁶A功能研究进展. 生物工程学报, 2019, 35(5): 775-783.

Gan HL, Hong L, Yang FL, et al. Progress in epigenetic modification of mRNA and the function of m⁶A modification. Chin J Biotech, 2019, 35(5): 775-783.

摘要: mRNA上能发生100多种化学修饰, 其中N⁶-腺嘌呤(m⁶A)是mRNA修饰中最广泛的表观修饰方式之一。在细胞分化、胚胎发育和应激等生物学过程中, 特定的mRNA会发生包括N¹-腺嘌呤甲基化、N⁵-胞嘧啶甲基化、假尿嘧啶以及N⁶-腺嘌呤甲基化等修饰, 它们共同形成了mRNA转录后调控的表观修饰转录组, 实现对mRNA翻译成蛋白质过程的精确时空调控, 特别是m⁶A修饰能通过调控mRNA的代谢和翻译等进而调控细胞的一系列生物学过程。文中主要综述mRNA的表观修饰类型和特点, 特别是m⁶A修饰参与调控mRNA和细胞生物学功能的最新研究进展, 并展望了将来m⁶A表观修饰的研究重点和方向。

关键词: mRNA表观修饰, m⁶A, m¹A, 假尿嘧啶, mRNA代谢, 细胞分化

Progress in epigenetic modification of mRNA and the function of m⁶A modification

Haili Gan, Ling Hong, Fenglian Yang, Dingfeng Liu, Liping Jin, and Qingliang Zheng

Clinical and Translational Research Center of Shanghai First Maternity and Infant Hospital, Tongji University School of Medicine, Shanghai 201204, China

Abstract: Messenger RNA (mRNA) can be modified by more than 100 chemical modifications. Among these modifications, N⁶-methyladenosine (m⁶A) is one of the most prevalent modifications. During the processes of cells differentiation, embryo development or stress, m⁶A can be modified on key mRNAs and regulate the progress of cells through modulating mRNA metabolism and translation. Other mRNA modifications, including N¹-methyladenosine (m¹A), 5-methylcytosine (m⁵C) and pseudouridine, together with m⁶A form the epitranscriptome of mRNA that accurately modulate the mRNA translation. Here we review the types and characteristic of mRNA epigenetic modifications, especially the recent progresses of the function of m⁶A, we also expect the main research direction of m⁶A epigenetic modification in the future.

Received: October 11, 2018; **Accepted:** January 24, 2019

Supported by: National Natural Science Foundation of China (Nos. 81730039, 81671460, 81871167), Natural Science Foundation of Shanghai (No. 18ZR1430000).

Corresponding authors: Qingliang Zheng. Tel: +86-21-20261379; E-mail: 1701572@tongji.edu.cn

Liping Jin. Tel: +86-21-20261379; E-mail: jinlp01@163.com

国家自然科学基金 (Nos. 81730039, 81671460, 81871167), 上海市自然科学基金 (No. 18ZR1430000) 资助。

Keywords: epigenetic modification of mRNA, N^6 -methyladenosine (m^6A), N^1 -methyladenosine (m^1A), pseudouridine, mRNA metabolism, cell differentiation

以往认为中心法则中 DNA 主要发挥模板的作用而 mRNA 则扮演着信息传递的角色。mRNA 表观修饰的发现超越了 mRNA 仅作为信息传递者这一观点。近期发现前体 mRNA 在外显子剪接、5'-加帽和 3'-加尾等加工过程中碱基也会发生 m^6A 、 m^1A 、假尿嘧啶、5'-胞嘧啶甲基化等多种化学修饰^[1-3]。这些修饰将影响 mRNA 的剪接、出核、稳定和翻译等 mRNA 代谢过程从而调控基因的表达。随后也发现 mRNA 表观修饰是动态可逆的, m^6A 修饰的可逆调控以及发挥生物学功能都需要特异的修饰酶 (Writer)、去修饰酶 (Eraser) 以及特异性的识别修饰位点的蛋白 (Reader) 的参与, 这些发现为在真核生物中研究转录后基因表达调控机制开辟了一个新领域。在这些修饰类型中, m^6A 修饰是目前研究最为深入的表观修饰, 研究发现 mRNA 的 Writer 蛋白和 Eraser 蛋白将决定靶 mRNA 的 m^6A 修饰水平, 而 Reader 蛋白将决定 m^6A 修饰 mRNA 的翻译^[4]或影响 mRNA 的稳定性。由于许多 mRNA 在稳定性和翻译效率方面存在显著差异, m^6A 甲基化修饰可以促使其同步表达从而在短时间内产生大量效应蛋白来应对自身和外界的调控, 通过加速整个 mRNA 的代谢过程进而快速调控细胞增殖和分化。

1 mRNA 表观修饰方式

1.1 m^6A 修饰

N^6 -腺嘌呤 (m^6A) 是真核生物中最丰富的一种化学修饰。 m^6A 修饰广泛存在于各种细胞中, 运用 m^6A 特异性抗体的免疫沉淀结合高通量测序技术, 发现在人类 25% 的转录子中存在约 7 000 个 m^6A 修饰位点, 并且主要在 RRm⁶ACH([G/A/U][G>A]m⁶AC[U>A>C])保守序列上进行修饰。 m^6A

修饰主要位于外显子的终止密码子附近和 3'-UTRs (3'-untranslated region) 区域^[5-6]。研究显示, m^6A 修饰参与 mRNA 代谢、mRNA 与蛋白相互作用等各种生理学过程。

1.2 m^5C 修饰

N^5 -胞嘧啶甲基化 (m^5C) 是一种 DNA 的表观遗传修饰方式。后来发现 mRNA 上也存在这种修饰方式, 但 mRNA 上的 m^5C 修饰比 m^6A 要少。通过对人细胞的 mRNA 测序发现在线粒体中富含 m^5C 修饰, 有别于 m^6A 的是, m^5C 存在于 mRNA 的翻译起始点下游区域。 m^5C 修饰后的 mRNA 由一种特定的 m^5C 识别蛋白识别并在其协助下出核, 因此 m^5C 在某种程度上可以调节 mRNA 的出核并促进 mRNA 的表达^[7]。线粒体中的 mRNA 的甲基化水平明显高于核基因转录组的 RNA 甲基化水平, 因此 m^5C 可能在调控线粒体生理功能方面扮演着重要角色^[8]。然而 m^5C 修饰的更多生理功能及其机制还有待进一步研究。

1.3 m^1A 修饰

最初发现 N^1 -腺苷酸甲基化 (m^1A) 是一种广泛存在于 tRNA、rRNA 上的化学修饰, 对 RNA 的生物学功能具有重要的调控作用。运用特异性 m^1A 抗体免疫共沉淀结合高通量测序发现人细胞 mRNA 上存在 1 000 多个 m^1A 的修饰位点^[3]。有别于 m^6A 的是, m^1A 在 mRNA 上特异分布于翻译区域的起始位点附近以及第一个剪切拼接位点附近。 m^1A 甲基化修饰能改变 mRNA 的二级结构, 例如位于 5'-UTRs (5'-untranslated region) 处的 m^1A 能够通过降低 mRNA 的二级结构的稳定性来增加翻译效率^[9]。目前 m^1A 具体的生理功能尚不明确, 需要进一步研究。

1.4 假尿嘧啶修饰

假尿嘧啶修饰 (Pseudouridine) 广泛存在于非编码 RNA, 其可稳定 tRNA 和 rRNA 的结构。通过假尿嘧啶测序发现在酵母菌和人类的非编码 RNA 中存在数百个假尿嘧啶修饰位点。进一步分析发现 mRNA 中也存在高度保守的假尿嘧啶修饰位点, 并且饥饿等环境因素可以调控 mRNA 上的假尿嘧啶修饰^[10]。假尿嘧啶修饰可改变密码子与反密码子碱基配对的相互作用, 因此假尿嘧啶不仅影响 RNA 的结构而且影响 mRNA 的编码能力^[11]。综上, 假尿嘧啶修饰和其他甲基化修饰一样能调控 mRNA 的表达, 但其具体功能仍需进一步研究。

2 m⁶A 修饰相关蛋白

m⁶A 功能的调节需要相关蛋白的参与, 其中主要包括甲基化酶、去甲基化酶以及 m⁶A 阅读蛋白。

首先 m⁶A 的一个重要相关蛋白就是甲基化酶, 其对应的编码基因称为 Writers, 主要包括甲基转移酶 3 (Methyltransferase-like 3, METTL3)、甲基转移酶 14 (Methyltransferase-like 14, METTL14)、Wilms' 瘤相关蛋白 (Wilms' tumor1-associated protein, WTAP)、甲基转移酶 16 (Methyltransferase-like 16, METTL16)、RNA 结合模体蛋白 15 (RNA binding motif protein 15, RBM15)、锌指结构域包含蛋白 13 (Zinc finger CCCH domain-containing protein 13, ZC3H13) 等, 实际上甲基化酶主要是由 METTL3 和 METTL14 组成的异源二聚体结构并且与 WTAP、ZC3H13 等调节因子附着在二聚体上构成甲基化酶复合体。其中 METTL3 具有一个 SAM 结合区域^[12]并且能够识别特定潜在的 m⁶A 修饰位点并将 SAM 的甲基转移该位点上。METTL14 与 METTL3 结合后, 在一定程度上能够促进

METTL3 识别 m⁶A。WTAP 是一种剪切体相关蛋白, 通过与 METTL3-METTL14 二聚体结合能够使甲基化酶复合体迅速识别 m⁶A 潜在修饰位点并且活化 METTL3/METTL14 甲基化酶复合体^[13]。此外, 最近研究发现, 锌指结构 (ZC3H13) 能够结合 WTAP 从而使 WTAP 固定存在于核内而不转运到核外, 实现强化甲基化酶复合体的目的^[14], 以保证足够的甲基化酶复合体在核内对转录合成的 mRNA 进行甲基化。

其次, 去甲基化酶主要包括肥胖相关基因 Fat mass and obesity-associated (FTO) 和 AlkB homolog 5 (ALKBH5), 其对应的编码基因称为 Erasers。FTO 起初是作为一种与肥胖相关的基因出现在人们的视线中, FTO 是第一个被发现的 m⁶A 去甲基化酶, 该发现证实了 m⁶A 是一个可逆的 mRNA 修饰过程。FTO 和 ALKBH5 分布具有差异性, FTO 广泛存在于成人和胚胎的组织中, 在大脑中表达尤其高, 而 ALKBH5 存在于大部分组织的细胞核中。FTO 能够有效地去除 mRNA 上的 m⁶A 修饰并且 FTO 受抑制能够增高整体 mRNA 的 m⁶A 修饰水平^[15]。ALKBH5 主要作用是使已经 m⁶A 修饰的 mRNA 发生去甲基化, 通过参与调控 mRNA 的出核等代谢过程发挥其功能, 其与精子的发育密切相关。

最后, m⁶A 相关蛋白是 m⁶A 结合蛋白, 其编码基因被称为 Readers, 主要包括 YTH 同源结构域蛋白家族: YTH 结构域家族 1 (YTH domain family 1, YTHDF1)、YTH 结构域家族 2 (YTH domain family 2, YTHDF2)、YTH 结构域家族 3 (YTH domain family 3, YTHDF3)、YTH 结构域包含蛋白 1 (YTH domain-containing proteins 1, YTHDC1)、YTH 结构域包含蛋白 2 (YTH domain-containing proteins 2, YTHDC2) 和核不均一核糖核蛋白 (Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C, HNRNPC) 等, YTHDC1 主要能够通过结

构域与特定的 m^6A 位点结合或者与剪接调控因子结合影响 m^6A 修饰的 mRNA 的出核和剪接^[16]。HNPNPC 家族的蛋白同样也可以直接或间接地调控 mRNA 的选择性剪接和 mRNA 结构的改变^[17]。YTHDF1 与 mRNA 上的 m^6A 结合提高相应的 mRNA 翻译效率^[18]。YTHDF2 主要作用则是促进 mRNA 的降解^[19]。有趣的是，YTHDF3 与 YTHDF1 结合时能够增强其翻译能力，而 YTHDF3 与 YTHDF2 结合时又能促进其促降解能力。YTHDC2 是一种具有螺旋酶结构域和蛋白重复结构域的 reader，由于这种特殊的结构使其具有调节 RNA 结合效率、调控 RNA 结构以及同时结合多种蛋白的特点，其能够促进 mRNA 的翻译^[20]。

这些 m^6A 相关蛋白以及影响因子相互作用影响 m^6A 水平，进而影响 mRNA 的剪接、出核、翻译、降解和表达等各个方面，从而影响细胞的分化、凋亡等生命过程。

3 m^6A 调控 mRNA 的代谢功能

m^6A 广泛存在于各种细胞中， m^6A 相关蛋白和甲基化调节因子以及 m^6A 的识别蛋白相互作用构建了一个调节 m^6A 基因表达的网络， m^6A 在 mRNA 的剪接、出核、翻译、降解和结构变化等方面发挥着重要的调控作用 (图 1)。

3.1 m^6A 调控 mRNA 的剪接

前体 mRNA 成熟为 mRNA 的过程主要包括 5' 端加帽、3' 端加尾以及内含子剪接 3 个部分。研究表明 m^6A 主要集中存在于前体 mRNA 的内含子并且 m^6A 的甲基化酶和 Reader 蛋白主要存在于核内^[16]，因此可以推测甲基化过程主要发生在核内并且在核内调控 mRNA 的选择性剪接。研究发现敲除 METTL3 后， m^6A 水平下降，精子来源的相关基因发生错误剪接进而表达下调，说明经 METTL3 修饰的 m^6A 能够调控多功能基因的选择

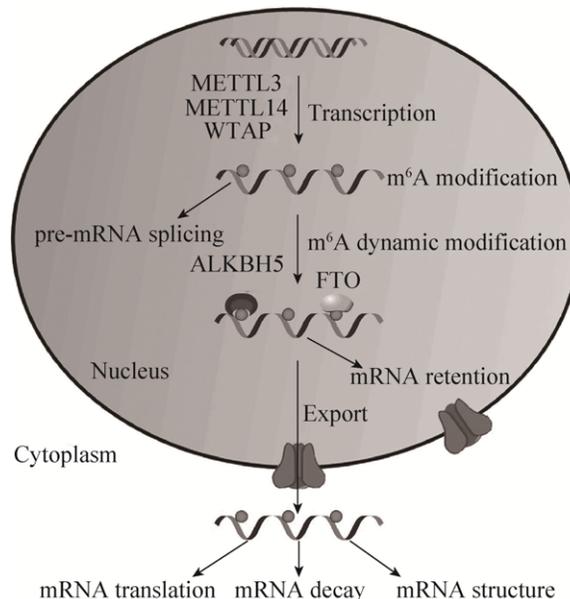


图 1 m^6A 修饰参与调控 mRNA 代谢的模式图
Fig. 1 Function of m^6A in mRNA metabolism.

性剪接和睾丸中基因的表达从而调控精原细胞分化和精母细胞形成^[21]。WTAP 作为甲基化酶复合体的一部分，敲除后的甲基化酶复合体对 mRNA 的甲基化效率降低， m^6A 水平下降也会导致 mRNA 的选择性剪接异常。 m^6A 去甲基化酶 FTO 通过去除 RNA 上的 m^6A 以及阻止 SR 蛋白与 mRNA 结合来调控 RNA 的选择性剪接，SR 蛋白是一种参与调控可变剪接的重要调控因子，例如 FTO 能够阻止 SRSF2 与 mRNA 结合从而调控 mRNA 的剪接以及转录。FTO 倾向于结合靠近外显子选择性剪接区域的内含子区域，结合了 FTO 的内含子处 m^6A 水平下降并且抑制了 SRSF2 与 mRNA 的结合，因此该处内含子后面的外显子不能进行选择性的剪接以及转录表达，这一过程称之为外显子跳跃^[22]。

此外一些阅读蛋白也可以通过抑制或促进 SR 蛋白家族的成员与 mRNA 结合来调控 mRNA 的剪接。例如 YTHDC1 促进 SRSF3 和抑制 SRSF10 与 mRNA 结合来影响 mRNA 的剪接，通过识别 XIST (X 染色体失活基因) 上的 m^6A 来使

X 染色体沉默^[23]。m⁶A 不仅仅通过 Reader 蛋白等来影响 mRNA 的选择性剪接,还能够直接调控 mRNA 选择性剪接。

总之, m⁶A 是一个动态的调控系统,通过快速改变 m⁶A 修饰位点甲基化水平,影响其与甲基化酶、去甲基化酶和 Reader 蛋白等相互作用来影响 mRNA 的剪接。

3.2 m⁶A 促进 mRNA 的出核

mRNA 的出核是连接 mRNA 转录和翻译的关键步骤同时能选择性地调控基因表达。据报道 m⁶A 甲基化能加快 mRNA 的出核, YTHDC1 结合 SRF3 和 NXF1 (核 ENA 输出因子) 会促进 m⁶A 修饰 mRNA 的出核。敲除 METTL3, m⁶A 水平下调, mRNA 的出核受阻, 表达受抑制, 而敲除 ALKBH5 对 m⁶A 去甲基化作用减弱, m⁶A 的水平提高, mRNA 结合 readers 和调控出核的影响因子促进 mRNA 的出核^[24]。本课题组发现过表达 ALKBH5 后能引起抗病毒转录子 mRNA 的核滞留, 从而抑制抗病毒转录子的表达^[25]。综上所述 m⁶A 促进 mRNA 的出核可能是其调控基因表达的重要方式, 但其具体机制仍有待研究。

3.3 m⁶A 促进 mRNA 的翻译

据报道 YTHDF1 结合 m⁶A 修饰的 mRNA 并且招募翻译起始因子复合体 eIF3 促进 mRNA 的翻译。该过程是依赖 METTL3 甲基化酶活性以及 YTHDF1-eIF3 通路^[26]。研究发现 YTHDC2 的 YTH 和 R3H 结构域能够促进其与细胞的 RNA 的结合并且与小核糖体相互作用从而促进 mRNA 的翻译^[27], 表明 m⁶A 可以通过不同的分子机制来调控 mRNA 的翻译。

3.4 m⁶A 影响 mRNA 的降解

降解是 mRNA 代谢调控的重要步骤, m⁶A 能够降低 mRNA 的稳定性, mRNA 经过 m⁶A 修饰后可能被迅速降解。METTL3 或 METTL14 敲除后 m⁶A 水平下降, mRNA 降解效率降低, 表达水

平增高^[13]。研究表明, METTL3 缺失的幼稚 T 细胞中的细胞因子诱导性 SH2 结构域包含蛋白 (Cytokine inducible SH2 containing protein, SOCS 或 CISH) 家族基因的 mRNA 降解速度较慢, 从而使 mRNA 和蛋白表达水平升高, SOCS 基因家族主要负责编码 STAT 信号抑制蛋白, 敲除 METTL3 后 SOCS 高表达, STAT 信号抑制蛋白增加从而抑制 IL-7 介导的 STAT5 活化以及 T 细胞的稳态增殖和分化^[28]。

另外 YTHDF2 的羧基末端 YTH 结构域能选择性地结合甲基化 mRNA, 而 YTHDF2 的氨基末端的结构域能将结合的 mRNA 转运到 RNA 降解器中进一步降解^[29]。RNA 降解器是由细胞内许多因子组成且能够降解 mRNA 的复合体, 在 RNA 降解器上存在一些降解 mRNA 的酶, 能够对已经翻译或错误翻译、不能翻译的 mRNA 进行不同途径的降解。敲除 YTHDF2 后, mRNA 的稳定性提高并且靶 mRNA 表达水平提高, 提示 m⁶A 能够影响 mRNA 的降解。总之, m⁶A 可以降低 mRNA 的稳定性并且促进含有 m⁶A 的 mRNA 的降解从而调控基因的表达。

3.5 m⁶A 改变 RNA 结构

m⁶A 可以改变 mRNA 的结构使其更易与核不均一核糖核蛋白 C (HNRNPC) 和核不均一核糖核蛋白 G (HNRNPG) 结合, 例如肺腺癌转移相关转录子 1 (Metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1, MALAT1) 和 CDP 二酰基甘油合成酶 2 (CDP-diacylglycerol synthase 2, CDS2), 这些 mRNA 发生 m⁶A 修饰后双链结构容易被打开并暴露单链的 U 核苷酸位点, 该位点被 HNRNPC 识别后调控这些基因的剪接^[17]。这种由于 m⁶A 修饰所引起的结构重塑而影响 mRNA 与蛋白结合的现象称为 m⁶A 开关 (m⁶A switch)。m⁶A 开关广泛存在于转录组中, 通过调控 mRNA 与结合蛋白之间的结合从而发挥相应的生物学功能。

4 m⁶A 调控细胞的生物学功能

4.1 m⁶A 调控细胞的分化能力

干细胞是一种具有向不同类型细胞分化能力的多能细胞,正常细胞分化是生物体发育的重要环节,分化障碍会导致各种严重疾病的发生。多种编码发育调控因子转录本的稳定性和表达水平与 m⁶A 的水平呈负相关。METTL3 或 METTL14 下调后, m⁶A 水平下降,维持细胞多能性的转录因子高表达,胚胎干细胞的自我更新能力显著降低^[30-31]。据报道小鼠胚胎干细胞 NANOG (细胞多能性编码因子) mRNA 上存在多个 METTL3 的结合位点,敲除 METTL3,多能性细胞多能性编码因子的 m⁶A 修饰水平下降,胚胎干细胞自我更新以及分化能力受到抑制,胚胎干细胞还保留着一部分原始细胞的状态,在种植后由于外界状态的改变以及部分基因程序的启动,导致胚胎死亡^[32]。

另外,低氧环境下乳腺癌肿瘤细胞中高表达 ALKBH5,使得关键因子 NANOG 发生去甲基化, m⁶A 水平下降,从而提高 mRNA 的稳定性以及表达水平,进一步促进了癌细胞的增殖,调控乳腺癌肿瘤细胞的分化^[33]。另一种 RNA 去甲基化酶 FTO 在急性白血病患者中呈高表达,实验证明 FTO 通过降低 m⁶A 水平增强了白血病细胞的增殖和分化,抑制了细胞的凋亡,显著增强了白血病致病基因介导的正常造血干细胞向病态细胞的转化^[34]。脂肪细胞中 FTO 能通过调控 m⁶A 的水平进而影响可变剪接调控因子 SRSF2 与 FTO 的结合,影响脂肪形成关键基因的选择性剪接从而调控前脂肪细胞的分化^[35]。综上所述 m⁶A 表观相关酶在调控干细胞或肿瘤细胞的分化发育方面发挥重要的作用。

4.2 m⁶A 调控应激反应

在低氧、营养不良等极端环境中,机体需要

快速应对外界环境变化而需在 mRNA 转录后水平上进行调控,而不是重新合成新的 mRNA。在热休克状态下, YTHDF2 定位于核内并且可以抑制 FTO 与 mRNA 的结合,阻止 mRNA 的去甲基化,从而确保 5'-UTRs 端有足够的 m⁶A, 5'-UTRs 端的 m⁶A 能推动帽子端的独立翻译过程,提高相关蛋白的形成。

除此之外, YTHDF1 能使应激颗粒局限于核内,应激颗粒是由一些蛋白包裹 mRNA 和蛋白颗粒形成的,在 YTHDF1 的作用下,应激颗粒向胞内聚集导致蛋白不释放和 mRNA 不表达,等应激源消失后,应激颗粒重新解聚释放,被包裹的 mRNA 重新表达^[36],这种机制可以避免应激源诱发的炎症反应的发生并且对损伤后的修复有一定的帮助。此外,在遗传上定义的永生化和致癌转化的人乳腺上皮细胞中,过表达 METTL3 和 METTL14 或敲除 ALKBH5 能增加 m⁶A 的水平并促进细胞增殖和迁移。永生化和致癌转化细胞中的 m⁶A 水平随着缺氧而增加,提示在应激状态下细胞可以调节 m⁶A 水平从而应对应激源的攻击^[37]。本课题组在机体应对病原体入侵这一应激环境中作了一些工作,发现 ALKBH5 在巨噬细胞的固有免疫反应中发挥重要作用,在病毒感染后,核蛋白 DDX46 可以招募 ALKBH5,使得抗病毒转录子发生去 m⁶A 甲基化修饰而被滞留在核内并抑制其表达,从而抑制巨噬细胞的抗病毒天然反应。我们目前在 m⁶A 修饰如何参与胚胎滋养细胞应对病原体入侵方面也进行了深入研究,并取得了一些重要进展。另有研究发现,在感染 KSHV 病毒的细胞中,细胞的整体 m⁶A 水平下调而病毒本身转录子的 m⁶A 水平却上调,而当 m⁶A 修饰酶被敲除之后 KSHV 病毒裂解的催化因子 ORF50 表达会受到抑制,而 YTHDF2 和 METTL3 敲除后会增加 ORF50 的水平而起到抗病毒的作用^[37]。综上所述, m⁶A 参与调控在热刺激或低氧

等环境下细胞的生理功能状态。

4.3 m⁶A 调控细胞生理节律

据报道在哺乳动物生理节律的研究中首次发现了 m⁶A 对细胞功能的影响。生理节律的维持涉及到基因表达的负反馈环路, 然而研究表明只有五分之一的节律基因是需要重新转录合成^[38], 表明转录后水平的基因调控在生物节律调控中发挥重要作用。节律基因和时钟输出基因的转录本均可以发生 m⁶A 甲基化修饰, METTL3 敲除后导致两个关键时钟基因 (PER3 和芳基羟类受体核易位体样蛋白 1, ARNTL) mRNA 的 m⁶A 水平下降使出核受阻, 导致周期蛋白表达减少、细胞生理周期延长, 细胞凋亡能力下降。这表明 mRNA 的 m⁶A 修饰改变将对细胞的生命周期产生深远的影响^[39]。以上报道表明 m⁶A 在调控细胞节律方面发挥重要作用, 但其具体机制还有待进一步的研究。

5 总结与展望

mRNA 上的 m⁶A 修饰主要特征是其广泛存在性、分布独特以及动态可逆性, 研究发现 m⁶A 修饰通过调控 mRNA 代谢过程的各个方面, 影响 mRNA 的蛋白表达, 参与调控细胞分化、应激反应、生物节律等细胞生物学过程, 调控失常将导致各种疾病的发生。因此研究清楚 m⁶A 的动态修饰规律及其如何影响细胞生物学功能的具体分子机制尤为重要。

我们认为以下几方面可能是未来研究的重要方向: 1) 随着研究的深入, 发现人类基因中尽管有超过 7 000 个 m⁶A 修饰位点, 但是还有很多符合保守序列 (RRACH motifs) 的潜在 m⁶A 位点并没有被修饰, 表明 m⁶A 甲基化修饰作为转录后调控机制还存在着更大的潜力。m⁶A 在转录本上的分布是呈不均匀以及具有组织特异性。这些特征意味着转录本上每一个 m⁶A 修饰位点均处于甲基化和未甲基化的动态平衡状态, 从而使机体对外

界的刺激能够作出迅速的反应, 那么机体是如何特异性地维持这种甲基化的动态修饰状态呢? 是依赖于修饰位点附近特异的碱基序列还是特异性的 Reader 蛋白呢? 2) mRNA 的 m⁶A 甲基化修饰能选择性地调控特异 mRNA 的代谢以及调控在细胞分化过程中细胞状态的改变。那么如何实现选择性地与特异 mRNA 结合, 以及甲基化酶、去甲基化酶和 Reader 蛋白在应对不同的信号通路调控时是如何协调的机制仍然不清楚, 需要深入研究, 因为任何一个环节的缺失都可能会诱发疾病的发生。3) m⁶A 仅是 mRNA 转录后修饰的一种方式。除了 m⁶A 外, 还有 m¹A、m⁵C、假尿苷 pseudouridine 等。每一种化学修饰均可能拥有相关的特异修饰酶、去修饰酶和 Reader 蛋白, 或许这些蛋白能共同作用于多种修饰。mRNA 经过化学修饰后, 也需要通过相关蛋白共同作用来调控基因的表达, 那么寻找这些特异的修饰相关蛋白将是一个非常重要的方面。4) 随着 mRNA 的化学修饰领域不断的扩展, 如何能够直接、及时地检测到这些化学修饰是否存在及其作用位点并及时进行干预, 对于生物的发育、疾病的控制有重要的意义。mRNA 测序技术的进一步发展将会是认识各种动态修饰的关键一步。

REFERENCES

- [1] Spenkuch F, Motorin Y, Helm M. Pseudouridine: still mysterious, but never a fake (uridine)! *RNA Biol*, 2014, 11(12): 1540–1554.
- [2] Hussain S, Aleksic J, Blanco S, et al. Characterizing 5-methylcytosine in the mammalian epitranscriptome. *Genome Biol*, 2013, 14(11): 215.
- [3] Dominissini D, Nachtergaele S, Moshitch-Moshkovitz S, et al. The dynamic N¹-methyladenosine methylome in eukaryotic messenger RNA. *Nature*, 2016, 530(7591): 441–446.
- [4] Wang X, Zhao BS, Roundtree IA, et al.

- N*⁶-methyladenosine modulates messenger RNA translation efficiency. *Cell*, 2015, 161(6): 1388–1399.
- [5] Dominissini D, Moshitch-Moshkovitz S, Schwartz S, et al. Topology of the human and mouse m⁶A RNA methylomes revealed by m⁶A-seq. *Nature*, 2012, 485(7397): 201–206.
- [6] Meyer KD, 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.
- [7] Yang X, Yang Y, Sun BF, et al. 5-methylcytosine promotes mRNA export-NSUN2 as the methyltransferase and ALYREF as an m⁵C reader. *Cell Res*, 2017, 27(5): 606–625.
- [8] Wei Z, Panneerdoss S, Timilsina S, et al. Topological characterization of human and mouse m⁵C epitranscriptome revealed by bisulfite sequencing. *Int J Genom*, 2018, 2018: 1351964.
- [9] Zhou HQ, Kimsey IJ, Nikolova EN, et al. m¹A and m¹G disrupt A-RNA structure through the intrinsic instability of Hoogsteen base pairs. *Nat Struct Mol Biol*, 2016, 23(9): 803–810.
- [10] Carlile TM, Rojas-Duran MF, Zinshteyn B, et al. Pseudouridine profiling reveals regulated mRNA pseudouridylation in yeast and human cells. *Nature*, 2014, 515(7525): 143–146.
- [11] Fernández IS, Ng CL, Kelley AC, et al. Unusual base pairing during the decoding of a stop codon by the ribosome. *Nature*, 2013, 500(7460): 107–110.
- [12] Bokar JA, Shambaugh ME, 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.
- [13] Liu JZ, Yue YN, Han DL, et al. A METTL3-METTL14 complex mediates mammalian nuclear RNA *N*⁶-adenosine methylation. *Nat Chem Biol*, 2014, 10(2): 93–95.
- [14] Wen J, Lv RT, Ma HH, et al. Zc3h13 regulates nuclear RNA m⁶A methylation and mouse embryonic stem cell self-renewal. *Mol Cell*, 2018, 69(6): 1028–1038.e6.
- [15] Su R, Dong L, Li CY, et al. R-2HG exhibits anti-tumor activity by targeting FTO/m⁶A/MYC/CEBPA signaling. *Cell*, 2018, 172(1/2): 90–105.e23.
- [16] Xiao W, Adhikari S, Dahal U, et al. Nuclear m⁶A reader YTHDC1 regulates mRNA splicing. *Mol Cell*, 2016, 61(4): 507–519.
- [17] Liu N, Dai Q, Zheng GQ, et al. *N*⁶-methyladenosine-dependent RNA structural switches regulate RNA-protein interactions. *Nature*, 2015, 518(7540): 560–564.
- [18] Shi HL, Zhang XL, Weng YL, et al. m⁶A facilitates hippocampus-dependent learning and memory through YTHDF1. *Nature*, 2018, 563(7730): 249–253.
- [19] Li ZR, Qian PX, Shao WQ, et al. Suppression of m⁶A reader Ythdf2 promotes hematopoietic stem cell expansion. *Cell Res*, 2018, 28(9): 904–917.
- [20] Wojtas MN, Pandey RR, Mendel M, et al. Regulation of m⁶A transcripts by the 3'→5' RNA helicase YTHDC2 is essential for a successful meiotic program in the mammalian germline. *Mol Cell*, 2017, 68(2): 374–387.e12.
- [21] Xu K, Yang Y, Feng GH, et al. Mettl3-mediated m⁶A regulates spermatogonial differentiation and meiosis initiation. *Cell Res*, 2017, 27(9): 1100–1114.
- [22] Bartosovic M, Molares HC, Gregorova P, et al. N⁶-methyladenosine demethylase FTO targets pre-mRNAs and regulates alternative splicing and 3'-end processing. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(19): 11356–11370.
- [23] Patil DP, Chen CK, Pickering BF, et al. m⁶A RNA methylation promotes XIST-mediated transcriptional repression. *Nature*, 2016, 537(7620): 369–373.
- [24] Zheng GQ, Dahl JA, Niu YM, et al. ALKBH5 is a mammalian RNA demethylase that impacts RNA metabolism and mouse fertility. *Mol Cell*, 2013, 49(1): 18–29.
- [25] Zheng QL, Hou J, Zhou Y, et al. The RNA helicase

- DDX46 inhibits innate immunity by entrapping m⁶A-demethylated antiviral transcripts in the nucleus. *Nat Immunol*, 2017, 18(10): 1094–1103.
- [26] Taketo K, Konno M, Asai A, et al. The epitranscriptome m⁶A writer METTL3 promotes chemo- and radioresistance in pancreatic cancer cells. *Int J Oncol*, 2018, 52(2): 621–629.
- [27] Kretschmer J, Rao H, Hackert P, et al. The m⁶A reader protein YTHDC2 interacts with the small ribosomal subunit and the 5'-3' exoribonuclease XRN1. *RNA*, 2018, 24(10): 1339–1350.
- [28] Li HB, Tong J, Zhu S, et al. m⁶A mRNA methylation controls T cell homeostasis by targeting the IL-7/STAT5/SOCS pathways. *Nature*, 2017, 548(7667): 338–342.
- [29] Wang X, Lu ZK, Gomez A, et al. N⁶-methyladenosine-dependent regulation of messenger RNA stability. *Nature*, 2014, 505(7481): 117–120.
- [30] Lin Z, Hsu PJ, Xing XD, et al. Mettl3-/Mettl14-mediated mRNA N⁶-methyladenosine modulates murine spermatogenesis. *Cell Res*, 2017, 27(10): 1216–1230.
- [31] Wang Y, Li Y, Toth JJ, et al. N⁶-methyladenosine modification destabilizes developmental regulators in embryonic stem cells. *Nat Cell Biol*, 2014, 16(2): 191–198.
- [32] Geula S, Moshitch-Moshkovitz S, Dominissini D, et al. Stem cells. m⁶A mRNA methylation facilitates resolution of naïve pluripotency toward differentiation. *Science*, 2015, 347(6225): 1002–1006.
- [33] Zhang CZ, Samanta D, Lu HQ, et al. Hypoxia induces the breast cancer stem cell phenotype by HIF-dependent and ALKBH5-mediated m⁶A-demethylation of NANOG mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113(14): E2047–E2056.
- [34] Li ZJ, Weng HYY, Su R, et al. FTO plays an oncogenic role in acute myeloid leukemia as a N⁶-methyladenosine RNA demethylase. *Cancer Cell*, 2017, 31(1): 127–141.
- [35] Zhao X, Yang Y, Sun BF, et al. FTO-dependent demethylation of N⁶-methyladenosine regulates mRNA splicing and is required for adipogenesis. *Cell Res*, 2014, 24(12): 1403–1419.
- [36] Zhou J, Wan J, Gao XW, et al. Dynamic m⁶A mRNA methylation directs translational control of heat shock response. *Nature*, 2015, 526(7574): 591–594.
- [37] Fry NJ, Law BA, Ilkayeva OR, et al. N⁶-methyladenosine contributes to cellular phenotype in a genetically-defined model of breast cancer progression. *Oncotarget*, 2018, 9(58): 31231–31243.
- [38] Koike N, Yoo SH, Huang HC, et al. Transcriptional architecture and chromatin landscape of the core circadian clock in mammals. *Science*, 2012, 338(6105): 349–354.
- [39] Fustin JM, Doi M, Yamaguchi Y, et al. RNA-methylation-dependent RNA processing controls the speed of the circadian clock. *Cell*, 2013, 155(4): 793–806.

(本文责编 郝丽芳)