

真核生物 mRNA 上的修饰核苷及在发育调控中的作用

刘雪, 张涛, 周笑琦, 管伦, 陈鹏

华中农业大学 植物科学技术学院, 湖北 武汉 430070

刘雪, 张涛, 周笑琦, 等. 真核生物 mRNA 上的修饰核苷及在发育调控中的作用. 生物工程学报, 2020, 36(9): 1779–1793.
Liu X, Zhang T, Zhou XQ, et al. Modified nucleosides in eukaryotic messenger RNAs and their roles in developmental regulation. Chin J Biotech, 2020, 36(9): 1779–1793.

摘要: 信使 RNA (Messenger RNA, mRNA) 上的表观修饰对于转录本的稳定性和翻译活性有重要影响。在不同生物体的不同发育时期和不同组织器官中, 特异转录本不同位点存在的核苷修饰影响 mRNA 的前体剪切、成熟 mRNA 的稳定性以及其翻译为蛋白质的效率。目前已知的 170 多种修饰核苷中在 mRNA 上发现的只占极少数, 由于 mRNA 的丰度低、组织和发育特异性强等特点, 研究 mRNA 特异位点的核苷修饰有很大的技术难度。近年来随着 meRIP 等技术的进步, mRNA 核苷修饰功能的研究得到了长足的发展, 特别是针对 m⁶A、m⁵C 等甲基化修饰的研究已经相当深入。文中简要回顾近年来 mRNA 核苷修饰领域的研究进展, 对不同位点和不同类型的修饰核苷在不同物种生长发育中的调控作一总结, 并对未来的研究热点和技术瓶颈展开讨论。

关键词: 信使 RNA, 核苷修饰, 发育调控, 表观转录组学, RNA 表观遗传学

Modified nucleosides in eukaryotic messenger RNAs and their roles in developmental regulation

Xue Liu, Tao Zhang, Xiaoqi Zhou, Lun Guan, and Peng Chen

Faculty of Plant Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, Hubei, China

Abstract: Epigenetic nucleoside modifications are critical for the stability and translational efficiency of messenger RNA. Depending on the organism, developmental stage, and tissue/organ investigated, the location and abundance of these nucleoside modifications may differ, which in turn influence the splicing event, half-life time of mature mRNA, as well as translation efficiency. Among the approximately 170 RNA nucleoside modifications, only a handful are found in mRNAs. The low abundance and high organ specificity make it a challenging work to study the role of each specific mRNA nucleoside modification. However, with the technical advances in recent years, including meRIP, great progress has been achieved, especially on the function of m⁶A and m⁵C epigenetic markers in eukaryotes. This review summarizes recent progress on nucleoside modifications of messenger RNAs, on their distribution on transcripts and their role in regulating growth and

Received: December 24, 2019; **Accepted:** March 25, 2020

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 31100268), Natural Science Foundation of Hubei Province, China (No. 2016CFB438), Fundamental Research Funds for the Central Universities, China (No. 2662015PY168).

Corresponding author: Peng Chen. Tel: +86-27-87281399; E-mail: chenpeng@mail.hzau.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 31100268), 湖北省自然科学基金 (No. 2016CFB438), 高校科研基本业务费 (No. 2662015PY168) 资助。

网络出版时间: 2020-04-15

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20200415.1036.002.html>

development. We also discuss the technical bottleneck and key issues for future investigation.

Keywords: messenger RNA, modified nucleosides, developmental regulation, epitranscriptome, RNA epigenetics

信使 RNA (Messenger RNA, mRNA) 是遗传信息表达的核心分子, mRNA 作为蛋白质合成的模板, 其碱基序列决定着蛋白质装配时的氨基酸序列。中心法则中, 遗传信息表达的解码过程需要转运 RNA (tRNA) 上的反密码子和信使 RNA (mRNA) 上的密码子完成配对和携带入对应的氨基酸掺入多肽链, 由于修饰核苷的存在, 即使是相同的核苷酸序列, 也可最终表达出不同的遗传信息。已有较多的研究证明, 转运 RNA (tRNA) 和核糖体 RNA (rRNA) 的加工和成熟过程涉及大量的化学修饰, 在某些情况下, 这些额外的基团修饰对其正常折叠和行使功能至关重要^[1]。mRNA 也可以像 rRNA 和 tRNA 一样被修饰。目前已经知道的 RNA 核苷修饰有 170 余种 (Modomics Database,

<http://modomics.genesilico.pl/modifications/>), 其中大部分出现在 tRNA 和 rRNA 中, mRNA 中已知的修饰仅有 18 种, 其中大多为甲基化修饰 (图 1)。其中 5 种: 1-甲基腺苷 (1-methyladenosine, m¹A)、假尿嘧啶 (Pseudouridine, ψ)、5-羟甲基胞苷 (5-hydroxymethylcytidine, hm⁵C)、6-甲酰腺苷 (6-formyladenosine, f⁶A) 以及 6-羟甲基腺苷 (6-hydroxymethyladenosine, hm⁶A) 发现较晚, 目前还未被 RNA Modification Database (<https://mods.rna.albany.edu/>) 收录。

不同的修饰核苷在 mRNA 上的分布不同 (图 2): 7-甲基鸟苷 (7-methylguanosine, m⁷G) 主要分布于 mRNA 的 5'帽子区域, 在 mRNA 内部也有分布^[2]; 6-methyladenosine (m⁶A) 在哺乳动物中主

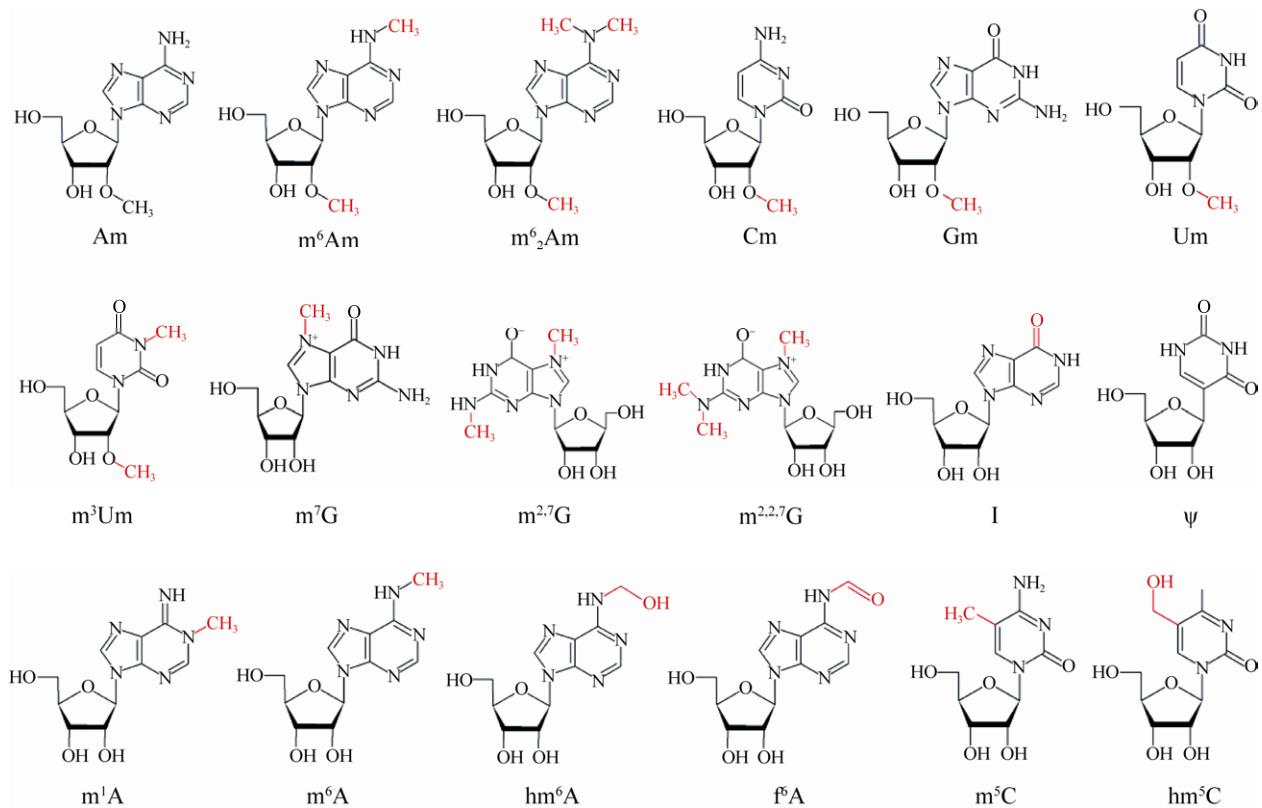


图 1 mRNA 上分布的 18 种修饰核苷

Fig. 1 18 modified nucleosides found on mRNA.

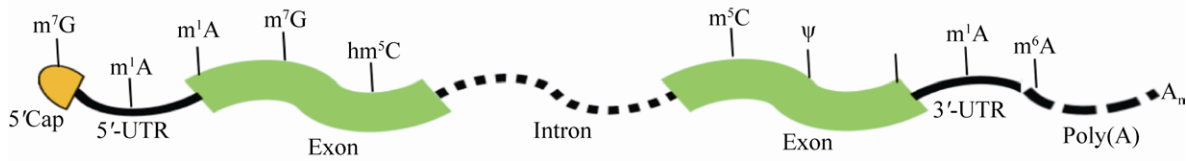


图 2 m^7G 、 m^1A 、 m^6A 、 m^5C 、 hm^5C 和 ψ 修饰核苷在 mRNA 上的区间分布

Fig. 2 Distribution of m^7G , m^1A , m^6A , m^5C , hm^5C and ψ in mRNA.

要分布在 mRNA 的终止密码子附近, 3'-UTR 区域 (3'-untranslated regions) 以及长外显子内^[3], 在植物 mRNA 的起始密码子和 poly A 尾巴上游也有分布^[4-5]; 5-methylcytidine (m^5C) 主要出现在 mRNA 的 CDS (Coding sequence) 区^[6]; m^1A 在 mRNA 的 5'-UTR (5'-untranslated regions)、CDS、3'-UTR 区域都存在^[7-8]; ψ 主要分布在 mRNA 的 CDS 和 3'-UTR 区域^[9]; hm^5C 主要分布在 mRNA 的 CDS 区域^[10]。DNA 与 RNA 的主要差别在于核糖 2'-C 上分别是-OH 和-H, 一个基团的不同却使 DNA 和 RNA 在结构和功能呈现巨大的差异, 可见修饰基团的存在对 RNA 结构和功能的影响。由于 RNA 的不稳定性、结构复杂性以及检测技术有限, 表观遗传学中 RNA 来源核苷修饰的研究比 DNA 上的研究进展慢。2011 年第一个 RNA 去甲基化酶 FTO (Fat-mass and obesity associated protein, m^6A 去甲基酶) 的发现揭示了 RNA 修饰的可逆性^[11], 是 RNA 表观遗传学研究的里程碑。近些年, 随着 meRIP 等技术的快速发展, 不同生物全转录组范围内的 RNA 修饰谱图得到揭示, 越来越多的研究表明 mRNA 上表观修饰对生物体生长发育具有重要的调控作用。本文针对研究较多的 6 种 mRNA 上的核苷修饰, 包括 ψ 、 m^7G 、 m^1A 、 m^6A 、 m^5C 和 hm^5C , 从其合成、分布和功能上进行阐述和讨论。

1 假尿嘧啶 (ψ)

假尿嘧啶是尿苷 (1-核糖尿苷) 的异构体 (5-核糖尿苷), 被认为是第 5 种核苷酸。假尿嘧啶是非编码 RNA (Non-coding RNA) 中最丰富的

一种修饰^[12-14], 在 tRNA 和 rRNA 中也存在, 具有稳定 RNA 结构的功能^[15-17]。mRNA 上的假尿嘧啶影响 mRNA 的剪切^[13]。在酵母中改变 rRNA 的假尿嘧啶修饰可以影响其对于抗生素的敏感性^[18-19]。在哺乳动物中, 假尿嘧啶修饰与先天性胰岛功能不良、核糖体合成紊乱以及癌症的发生相关^[20]。利用 pseudo-seq、 ψ -seq、PSI-seq 和 CeU-Seq 技术可实现人或酵母 mRNA 上单碱基分辨率下 ψ 的位点鉴定, 数据表明哺乳动物中 ψ/U 的相对丰度约为 0.2%–0.4%^[21]。

mRNA 的假尿嘧啶修饰由位点特异的 snoRNA 引导的 PUSs (假尿嘧啶合成酶) 催化形成, 人类细胞中有 23 个蛋白含有 PUS 结构域^[22], 合成的 ψ 主要富集在 mRNA 的 CDS 和 3'-UTR 区域^[9,21,23-24]。mRNA 的假尿嘧啶修饰有 3 个主要功能: 1) 改变密码子; 2) 影响转录本稳定性; 3) 应激反应应答^[23,25-26]。在酵母中尿嘧啶 (U) 被替换为假尿嘧啶 (ψ) 之后, 原本的无义密码便可改为编码氨基酸。当酵母受到热激刺激时, 由 PUS7 介导的假尿嘧啶位点突增; 反之, PUS7 缺失时含有这些 ψ 位点的 mRNA 水平下降^[23]。在刚地弓形虫中的研究发现, *TgPUS1* 突变体中 ψ 位点比野生型寄生虫中更稳定^[27], 由此推测 mRNA 的假尿嘧啶修饰可能具有双向作用, 在不同的生物体、基因或者不同条件下可能会增强 mRNA 的稳定性或者降低其稳定性。人类细胞在热激或者是 H_2O_2 处理下 mRNA 上的假尿嘧啶修饰水平升高, 而在饥饿刺激下则会下降; 酵母在营养不足的情况下和人细胞处于血清饥饿的情况下, mRNA 上的假尿嘧啶化修饰水平都发生变化, 可

见 mRNA 上的大多数假尿嘧啶修饰与细胞对环境信号的应答有关^[9]。

2 m⁷G

m⁷G 甲基化是指 RNA 分子鸟嘌呤第 7 位氮原子上的甲基化修饰。m⁷G 是目前发现的唯一一个在真核生物 mRNA 的 5' 端帽子结构区域出现的核苷修饰^[2]。mRNA 的 5' 帽子结构对于 mRNA 具有重要作用, 5' 帽子结构可以促使 mRNA 与核糖体的结合, m⁷Gppp 结构使 mRNA 形成封闭的 5' 端, 可有效防止 mRNA 的降解, 此外 5' 帽子结构还影响前体 mRNA 的剪切、3' 末端的多聚腺苷酸化以及 mRNA 的出核运输^[28-32]。

1975 年就有学者发现真核生物 mRNA 5' 帽子结构区域的 m⁷G 修饰促进蛋白质的合成, 且消除 m⁷G 修饰后相对应的 mRNA 就不能正常翻译^[33]。1976 年在卤虫藻胚胎中发现, 帽子绑定蛋白 (Cap-binding protein) 可识别 mRNA 5' 端的 m⁷GpppN 的结构, 促进 mRNA 与核糖体的结合, 进而影响翻译进程^[34]。后来发现, m⁷G 不仅仅存在于 mRNA 的 5' 端帽子结构区域, 在 mRNA 的内部同样存在。真核生物 mRNA 内部 m⁷G 含量为 0.4–5.3/10⁵, 5' 帽子结构区域 m⁷G 含量为 1.0–4.9/10⁴。植物 mRNA 的内部 m⁷G 含量明显高于哺乳动物。此外, 研究还发现真核生物 mRNA 中的 m⁷G 修饰可以被动态调控。经过镉处理, 水稻中 m⁷G 去帽基因表达量上升, mRNA 5' 端帽子结构和内部的 m⁷G 水平均降低, 内部 m⁷G 含量在水稻不同发育阶段变化趋势相同, 说明 mRNA 内部 m⁷G 相对稳定, 而 5' 端帽子结构的 m⁷G 与环境胁迫的应答相关^[2]。

3 m⁶A

m⁶A 甲基化是指 RNA 分子腺嘌呤第 6 位氮原子上的甲基化修饰。20 世纪 70 年代, 在哺乳动物和植物中首次发现了 mRNA 上 m⁶A 的修饰,

之后在病毒、果蝇、酵母等物种中陆续发现了 m⁶A 的存在^[35-40]。已有研究表明, m⁶A 修饰和 mRNA 的稳定性、剪接加工、翻译以及 microRNA 的加工有关, 影响干细胞命运、生物节律等生物过程。随着 m⁶A-seq、MeRIP、miCLIP 等新技术的产生, m⁶A 在全转录组范围内的分布越来越清晰。2012 年 Dominissini 等利用 m⁶A-seq 技术发现人类细胞中 mRNA 和长链非编码 RNA (Long non-coding RNAs) 上有超过 10 000 个 m⁶A 修饰位点^[3], Meyer 等利用 MeRIP-seq 技术发现 7 676 个哺乳类基因的 mRNA 上有 m⁶A 的修饰^[41]。这些研究还表明 mRNA 上的 m⁶A 位点在人和鼠之间高度保守, 主要富集在终止密码子附近、3'-UTR 区域、长外显子内以及可变剪切位点内。在植物材料中, Bodi 等发现拟南芥转录组中 m⁶A 修饰位点主要位于 3' poly A 尾巴上游的 100–150 nt 的范围内^[4]。Li 等利用 MeRIP-seq 技术鉴定到水稻愈伤组织和叶片中 8 138 个和 14 253 个转录本上含有 m⁶A 修饰, 并且修饰位点倾向分布于翻译的起始位点和终止位点附近^[5]。与哺乳动物 m⁶A 保守基序“GRACH” (R=A/G; H=A/U/C) 有区别的是, 水稻愈伤组织中 m⁶A 保守基序为“RAGRAG”, 而叶片中 m⁶A 保守基序为“UGUAMM” (M=C/A)^[5]。水稻花序中 m⁶A 的保守基序与水稻叶片中的保守基序相似, 为“UGWAMH” (W=U/A)^[42]。拟南芥中 m⁶A 的保守基序与水稻也不同, 为“RRACH”^[43]。由此可见在不同物种、不同发育阶段以及不同组织中 m⁶A 位点的合成和识别可能存在高度的物种和组织特异性。

m⁶A 是目前所知的唯一由合成蛋白 (m⁶A writer)、去除蛋白 (m⁶A eraser) 和识别蛋白 (m⁶A reader) 构成的甲基组系统。近年来有多篇综述报道了 mRNA 上 m⁶A 修饰强大的调控功能^[44-46], 下面简要介绍下影响 m⁶A 合成及分布的这 3 类蛋白。

3.1 合成蛋白 (m⁶A writer)

在哺乳动物中, m⁶A 甲基转移酶复合体由甲基转移酶类 3 (methyltransferase-like3, METTL3)、甲基转移酶类 14 (METTL14)、Wilm 肿瘤关联蛋白 (Wilm's tumor 1-associating protein, WTAP)、KIAA1429/VIRMA、HAKAI、RNA 结合蛋白 15 (RNA Binding Motif Protein15, RBM15) 和锌指蛋白 C3H 结构域蛋白 13 (Zinc finger CCCH domain-containing protein 13, ZC3H13) 组成。WTAP、METTL3 和 METTL14 主要富集在核小点处, METTL3 是甲基转移酶复合体的催化中心, METTL14 序列上与 METTL3 相似, 但是 METTL14 不具有独立的体外甲基化酶活性, 主要负责活化 METTL3 和招募 RNA 与 METTL3 反应^[47-49]。WTAP 是甲基化酶的构架蛋白, 主要起稳定 METTL 类蛋白之间的互作, 既可影响转录, 也可影响 RNA 的剪切^[50]。KIAA1429 和 RBM15 主要起识别甲基化靶向位点的作用。拟南芥中发现 HAKAI 蛋白调控 m⁶A 的合成, 动物细胞中 HAKAI 突变也造成 m⁶A 的合成受阻^[51]。ZC3H13 通过与 WTAP、VIR 和 HAKAI 形成蛋白复合体, 将整个 m⁶A 合成复合体锚定于细胞核内^[52-53]。

多个研究发现 m⁶A writer 的突变可导致不同的表型甚至胚胎致死 (表 1)。例如酿酒酵母, 只有在减数分裂时期的 mRNA 才具有 m⁶A 修饰, IME4/METTL3 的缺失影响酵母的出芽和减数分裂过程^[54-55]。酵母中 Kar4/METTL14 的突变造成单倍体配子融合失败^[56-57]。斑马鱼中 METTL3 和 WTAP 的表达富集于脑部, 基因敲除导致胚胎细胞凋亡增加, 斑马鱼头部和脑部发育缺陷, 生育能力下降^[58]。果蝇的 METTL3 和 METTL14 突变体在传代能力、飞行技能、神经发育和性别决定等方面表现出不同程度的缺陷^[59-64]。果蝇的 m⁶A 标记影响 XIST 和 Sxl 等母本 mRNA 的特异选择和剪切, 从而影响性别的决定^[65]。小鼠 METTL3、WTAP 或 RBM15 的缺失导致胚胎干细胞失去分化能力并导致胚胎致死^[50,66-68]; METTL14 的突变

影响精细胞发育和个体的育性^[69]。人类细胞中 METTL3 缺失抑制胚胎干细胞分化, 造成生物钟周期延长, METTL3 可以促进癌症细胞中蛋白质的翻译, 从而影响多种肿瘤疾病进程^[70-72]。拟南芥 MTA (METTL3 的同系物) 突变体和 VIR 突变体都是在胚胎的球形期停止发育, 其中 MTA 突变体中 m⁶A 水平减少了将近 90%, 突变体花器官异常、无顶端优势, 生长模式发生改变^[4,41]。拟南芥 FIP37 (WTAP 的同系物) 突变体 m⁶A 水平减少约 85%, 顶端分生组织过度繁殖, 植株生长不正常^[73]。拟南芥 *hakai* 突变体中 m⁶A 水平相对野生型降低 35%, 但没有明显的表型^[51]。因此, 拟南芥中除了 HAKAI, 其他 m⁶A 甲基转移酶复合体成员缺失对于胚胎发育都至关重要, 但是各组分对于植物发育的影响强度又各有不同。

3.2 去除蛋白 (m⁶A eraser)

目前已经发现的 m⁶A eraser 包括 FTO 和 ALKBH5, 它们都属于 ALKBH 家族, 可以去除包括 DNA 和 mRNA 上的 m⁶A 修饰^[11,74-76]。最早的 ALKBH 蛋白是大肠杆菌中鉴定出来的, 它通过氧化反应去除双链 DNA 上的 m¹A 甲基基团, 参与修复 DNA 烷基化损伤^[74]。人类细胞中 ALKBH 家族蛋白有 9 个, 包括 ALKBH 1-8 和 FTO。在大鼠中, ALKBH5 在睾丸中表达量最高, 其突变会影响精母细胞的减数分裂和大鼠育性^[76-77]。早期研究显示 FTO 与人类肥胖疾病相关, 且影响人体内多巴胺的水平, FTO 缺失的小鼠脂肪组织减少, 产后生长缓慢^[78]。在其他动物细胞中的研究发现 FTO 与细胞分化及肿瘤的形成有关^[75,79-82]。FTO 主要定位于细胞核中, 降低 FTO 的表达引起 RNA 上 m⁶A 水平的升高^[11,83]。拟南芥中没有发现 FTO 同源蛋白, 但是有 13 个 ALKBH 蛋白。ALKBH 家族蛋白种类多、分布广, 有可能识别单链或双链 DNA、单链 RNA 或双链 RNA, 也有可能作为蛋白上的去甲基酶, 不仅可以去除 m⁶A, 还有可能去除其他种类的甲基化修饰。ALKBH9B 和

表 1 mRNA 常见修饰核苷的分布和功能

Table 1 Distribution and function of modified nucleosides commonly found on mRNA

Modification	Distribution	Abundance	Proteins involved	Protein classification	Biological roles	Reference
ψ	CDS 3'-UTR	0.2%–0.4%	PUSs	Synthetase	Affect the sensitivity of yeast to antibiotics; Related to congenital islet dysfunction, ribosome synthesis disorder and cancer in mammal	[23,25–26]
m^7G	5'Cap	0.01%–0.05%	RNMT eIF4E, CBP20/CBP80	Synthetase Binding protein	Affects the synthesis of proteins; Responses to environmental stress	[2,33–34]
m^6A	CDS 3'-UTR	0.4%–1.50%	METTL3, METTL14, WTAP, KIAA1429, HAKAI, RBM15, ZC3H13 FTO, ALKBH5 YTH	m^6A methyltransferase m^6A demethylase m^6A reader	Affect the budding and meiosis of yeast; [4,41,54–55,58–64] Affecting head and brain development and fertility of zebrafish; Affects the reproduction, flight skill, neurodevelopment and sex determination of fruit fly; Inhibiting differentiation of embryonic stem cells and prolonging the biological clock cycle of human; Abnormal organs, no apical dominance and changed growth pattern in <i>Arabidopsis</i>	[100,145]
m^1A	5'-UTR CDS 3'-UTR	0.015%–0.16%	TRMT6/TRMT61A, TRMT61B, TRMT10C ALKBH3	Synthetase m^1A demethylase	Regulates translation stability and protein synthesis	[123–129]
m^5C	CDS 3'-UTR	~0.43%	TRM4, NSUN2 Tet	Methyltransferase Demethylase	Affecting the body size development and embryonic stem cell differentiation in mouse and human; Affects memory in fruit fly and human; Affects body size, retina, liver and brain development of zebrafish; Affects root development and oxidative stress in <i>Arabidopsis</i>	[10,133]
hm^5C	CDS	0.000 1%–0.000 44%	Tet	Demethylase	Affects the brain development in human	[10,133]

ALKBH10B 被证实有体外去甲基化的功能, ALKBH10B 具有体内去甲基化活性^[84]。被 AMV 侵染的拟南芥中 ALKBH9B 活性降低, 病毒胞内复制减慢, 推测可能和 ALKBH9B 与病毒粒子结合后去除了病毒 RNA 上的 m^6A 有关^[85]。拟南芥 *alkbh10* 突变体营养生长受到抑制, 开花延迟^[84]。与 ALKBH 类蛋白类似, FTO 蛋白不仅能去除 m^6A 和 m^6Am , 还能识别除 mRNA 外的其他底物, 关于 m^6A eraser 还有很多问题尚待研究。

3.3 识别蛋白 (m^6A reader)

如上文所述, m^6A 修饰水平的变化可引起生

物体各种表型, 可见 m^6A 修饰对于生物的生长发育的重要性。细胞体内 m^6A 修饰的变化必须通过 m^6A reader, 即 m^6A 识别蛋白来发挥作用。目前发现的 m^6A reader 主要是哺乳动物中的 YTH 蛋白家族。YTH 是一类保守的蛋白家族, 在人类、小鼠、酵母、果蝇、水稻、拟南芥中都存在, 主要分为 2 个亚类: YTHDF 和 YTHDC。人类细胞的 YTHDF2 是第一个被鉴定的 YTH 蛋白, 定位于细胞质, 该蛋白包含 2 个功能域: C 端含 YTH 结构域直接结合 m^6A ; N 端可使 mRNA 重新定位于 P 小体, 促使其降解^[86]。YTHDC1 属于细胞核定位

的 m⁶A 识别蛋白, 可以与 pre-mRNA 剪切因子 SRSF3 相互作用, 抑制剪切因子 SRSF10 与 mRNA 的结合, 影响 mRNA 的剪切, 从而影响小鼠卵细胞的发育^[87]。酿酒酵母的 Mrb1 属于 YTH 蛋白家族; 而 Mmi1 则是裂殖酵母中发现的 YTH 蛋白, 调控酵母的生殖生长^[88]。拟南芥中含有 13 个 YTH 类蛋白, 其中 ECT2、ECT3 或 ECT4 的突变造成叶片表皮毛发育异常^[89-90]。2018 年 Huang 等利用 RNA pull down 及 CLIP-seq 等技术发现, 人类细胞中的 IGF2BP3 也可结合含有 GG(m⁶A)C 基序的 mRNA, 这种结合增强 mRNA 的稳定性, 利于其在胞内储存^[91]。

4 m¹A

m¹A 甲基化是指 RNA 分子腺嘌呤第 1 位氮原子上的甲基化修饰。m¹A 是 RNA 修饰中比较重要且常见的一种修饰。m¹A 修饰不仅使腺嘌呤多了一个甲基, 还使其在生理条件下附了一个正电荷, 影响了 RNA 的结构及与蛋白的互作。单个电荷的不同可以使蛋白和 DNA 之间的亲和力相差 100–1 000 倍^[92]。关于 m¹A 修饰对 tRNA 结构和功能的影响已有报道^[93-95], 有研究显示 tRNA 上的 m¹A 修饰与环境胁迫相关^[96-97], 而 rRNA 上的 m¹A 修饰影响核糖体的合成和细菌对抗生素的耐受性^[98-99]。

由于 mRNA 在胞内丰度低, 修饰检测困难, 因此 mRNA 上的修饰研究相对缓慢。在酵母、小鼠和人类等上千个转录组中都检测到 m¹A 的存在。TRMT6/TRMT61A 复合体负责 tRNA 上 m¹A58 (第 58 位) 的甲基化, 也可催化 mRNA 上 m¹A 的形成, 但需要与 tRNA 类似的基序 GUUCRA 和 T-loop 结构的存在^[100]。哺乳动物中 m¹A/A 的相对丰度为 0.015%–0.16%^[7], 从分布上看, m¹A 在 mRNA 的 5'-UTR、CDS、3'-UTR 都存在, 主要富集于起始密码子附近及 5'-UTR 的 GC 富集区^[7]。m¹A 修饰在不同物种中相对保守,

由于其位于起始密码子附近, 因此可以促进翻译效率^[7-8]。在碱性条件下, m¹A 可以发生化学重排, 转换成 m⁶A^[101]。人类细胞中发现 mRNA 上的 m¹A 修饰可以被 ALKBH3 去除^[102-103]。m¹A 核苷修饰与翻译的稳定性及蛋白的合成相关, 在不同的生理条件下 (如热激、H₂O₂、饥饿状态), m¹A 核苷修饰水平是动态变化的, 但是其变化背后的调控机制尚不清楚。

5 m⁵C

m⁵C 甲基化是指 RNA 分子胞嘧啶第 5 位氮原子上的甲基化修饰。早期研究发现 DNA 上的 m⁵C 修饰对于转录沉默和基因组印记具有重要作用^[104-105]。RNA 上 m⁵C 修饰的研究主要集中在 tRNA 和 rRNA^[6,104,106-107], mRNA 和 lncRNA 上的 m⁵C 修饰报道较晚^[108-109]。tRNA 中的 m⁵C 主要集中在可变环和反密码子环, 对于维持 tRNA 的二级结构、密码子的识别、tRNA 的代谢以及对于氧化胁迫的感应具有重要作用^[102,104,110-114]。m⁵C 修饰影响 rRNA 的加工、结构, 有研究报道 rRNA 上的 m⁵C 修饰与生物体寿命相关^[115]。此外, 还有研究发现 m⁵C 修饰可以维持 ncRNA 的稳定性^[108]。

在 HeLa 细胞的 2 243 种 RNA 上发现 5 399 个 m⁵C 的修饰位点, 其中 94% (5 063/5 399) 的位点出现在 mRNA 上^[6]。m⁵C 位点主要集中在 CDS 区域 (约占总数的 45%), 其中 55% 分布在 CG 富集区域, 28% 分布在 CHG 富集区域, 17% 分布在 CHH 富集区域 (H=A/C/U)^[6]。在小鼠组织的 3 904 个 mRNA 中共发现 9 788 个 m⁵C 的修饰位点, 小鼠组织 mRNA 的平均 m⁵C 水平达 20.6%–23.2%, 与人类 HeLa 细胞含量类似。小鼠中 m⁵C 位点分布与人类 HeLa 细胞相似, 主要集中于 CG 富集区和 CDS 紧邻翻译起始位点下游区域^[6,116]。mRNA 上的 m⁵C 核苷修饰与 ALYREF 结合, 介导 mRNA 的出核运动^[6]。拟南芥 mRNA 中的 m⁵C 位点主要

集中在 3'-UTR^[117], 预示着和动物中不同的调控模式。

在真核生物中有 2 种甲基转移酶, 催化 mRNA 和其他非编码 RNA 上的 m⁵C 修饰: 一种是 TRDMT1, 即已知的 DNA 甲基转移酶 (DNMT2), 参与动物、植物和裂殖酵母的 tRNA 修饰^[107,118-120]; 另一种是 TRM4 (酵母) 或 NSUN2 (动物)^[113,121-122]。NSUN2 与哺乳动物癌细胞增殖, 干细胞的自我更新及分化相关, *nsun2*^{-/-} 的小鼠雄性不育、体型变小、表皮分化缺陷, 胚胎干细胞的自我更新和分化受影响^[123-124]; 人类研究中发现, NSUN2 缺失的病人智力缺陷, 体格小^[125-128]。其他物种的研究发现, NSUN2 突变的果蝇短期记忆能力缺陷^[125], 而斑马鱼缺失 DNMT2 酶活性时, 个体体型变小, 胚胎的视网膜、肝脏和大脑发育缺陷^[129]。

植物中 m⁵C 的相关报道很少。在拟南芥发现有 TRM4A 和 TRM4B 两个同源基因^[130-131], 其中 *trm4b* 突变体中 mRNA 的 m⁵C 修饰水平下降, 根比较短, 对于氧化胁迫更敏感, tRNA 稳定性降低^[125]。

6 hm⁵C

hm⁵C 是 m⁵C 的胞嘧啶第 5 位甲基发生氧化反应, 将一个 H 变为 OH 后所得产物。该种核苷修饰于 1978 年首次从小麦幼苗的 rRNA 中发现^[132], 但是直到最近人们才在 mRNA 中检测到 hm⁵C 核苷修饰的存在^[133]。2014 年有学者发现 Tet 不仅可以使 DNA 形成 hm⁵C 修饰, 也可催化 RNA 产生该种核苷修饰^[133]。利用 MeRIP-seq 技术在果蝇中进行的研究发现, RNA 中的 hm⁵C 修饰主要分布在 CDS 区, 且在 UC 含量高的区域富集^[10]。通过 GO 分析发现, mRNA 上的 hm⁵C 修饰位点在与胚胎发育相关的基因中较丰富^[10], 推测 mRNA 上的 hm⁵C 核苷修饰可能参与调控胚胎发育。翻译活性较高的 mRNA 含有较多的 hm⁵C 修饰^[10], 由此推测 hm⁵C 修饰可能参与调控基因的表达。缺少 Tet

的果蝇, RNA 的羟甲基化水平下降, 且果蝇的大脑发育受损^[10]。但是由于检测技术的限制, 我们对于 hm⁵C 修饰的合成细节和调控模式还了解甚少, 在植物中也未有关于 mRNA 的 hm⁵C 修饰的报道。

7 mRNA 核苷修饰的检测技术

随着科技的进步, mRNA 核苷修饰的检测技术也在快速发展。早期 mRNA 修饰常用放射性标记技术^[134-136]和薄层色谱法^[137-138]来分析, 但是这些方法成本高, 操作过程繁琐, 且无法用于大规模的检测和修饰位点的准确定位。质谱技术 (LC-MS/MS, Liquid chromatography-tandem mass spectrometry) 和抗体免疫印迹法 (Dot-blotting) 可实现修饰核苷的定量分析^[11,76], 但是同样也不能定位修饰位点。免疫沉淀法 (Immunoprecipitation, IP) 与二代测序技术 (Next generation sequencing, NGS) 结合形成 IP-seq 技术, 应用较多的有 ChIP-seq^[139]、PAR-CLIP^[140-141]和 MeRIP-seq^[41], 前两种技术用于检测 DNA/RNA 与蛋白的结合, 不能做定量分析, 对于修饰位点的定位停留在数十个碱基到数百个碱基的区段, MeRIP-seq 可以通过查找保守基序来确定修饰位点, 但是该方法分析的是总 RNA 水平上的核苷修饰水平, 且此方法的精确度受数据分析方法、序列比对软件和测序深度等因素的影响较大。与 MeRIP-seq 相类似的另一种 m⁶A 修饰水平检测方法 m⁶A-seq^[3]可检测 mRNA 上的碱基修饰, 分辨率在 200 nt 左右。miCLIP (m⁶A individual-nucleotide-resolution cross-linking and immunoprecipitation)^[142]、SCARLET^[143]、PA-m⁶A-seq (Photo-crosslinking-assisted m⁶A sequencing strategy)^[144]等技术可达单核苷酸的分辨率, 局限性包括: miCLIP 对抗体的依赖性高; SCARLET 无法实现高通量; PA-m⁶A-seq 需要引入 4-硫代尿苷 (4-thiouridine, 4SU), 适用于动物细胞实验。

8 总结与展望

近些年, RNA 表观遗传学得到了越来越广泛的关注,新的技术手段的出现大大加速了 RNA 修饰的研究进展。但是目前仍有部分 RNA 修饰缺少直接有效的检测手段,且在转录本层面的检测精度有待提高。现有的 170 余种 RNA 修饰中, mRNA 修饰仅占 18 种,当前的研究主要聚集在修饰位点的鉴定和修饰缺陷的表型分析。未来更大的挑战是追踪这些修饰位点的动态变化,以及从深层次揭示修饰的改变如何影响基因/蛋白的表达和细胞的生命过程。

mRNA 上部分修饰核苷,例如 m⁶A 和 m⁵C 的合成和去除,是动态可逆的,这种动态调控预示着在基因表达调控中的巨大潜能。哺乳动物中关于 mRNA 核苷修饰对 mRNA 加工、稳定性、翻译过程的影响,以及如何影响细胞分化、胚胎发育、应激反应、癌症发展和病毒感染等,已有很多研究成果,但植物中的相关研究还很有限,特别是大宗农作物中几乎未见报道。未来在植物中的工作将有助于我们对 mRNA 表观修饰对真核生物的生长发育调控有更全面的理解。

REFERENCES

- [1] Motorin Y, Helm M. RNA nucleotide methylation. Wiley Interdiscip Rev RNA, 2011, 2(5): 611–631.
- [2] Chu JM, Ye TT, Ma CJ, et al. Existence of internal N7-methylguanosine modification in mRNA determined by differential enzyme treatment coupled with mass spectrometry analysis. ACS Chem Biol, 2018, 13(12): 3243–3250.
- [3] 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.
- [4] Bodi Z, Zhong SL, Mehra S, et al. Adenosine methylation in *Arabidopsis* mRNA is associated with the 3' end and reduced levels cause developmental defects. Front Plant Sci, 2012, 3: 48.
- [5] Li YL, Wang XL, Li CP, et al. Transcriptome-wide N⁶-methyladenosine profiling of rice callus and leaf reveals the presence of tissue-specific competitors involved in selective mRNA modification. RNA Biol, 2014, 11(9): 1180–1188.
- [6] 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.
- [7] Dominissini D, Nachtergaele S, Moshitch-Moshkovitz S, et al. The dynamic N¹-methyladenosine methylome in eukaryotic messenger RNA. Nature, 2016, 530(7591): 441–446.
- [8] Li XY, Xiong XS, Wang K, et al. Transcriptome-wide mapping reveals reversible and dynamic N¹-methyladenosine methylome. Nat Chem Biol, 2016, 12(5): 311–316.
- [9] 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.
- [10] Delatte B, Wang F, Ngoc LV, et al. RNA Biochemistry. Transcriptome-wide distribution and function of RNA hydroxymethylcytosine. Science, 2016, 351(6270): 282–285.
- [11] Jia GF, Fu Y, Zhao X, et al. N6-methyladenosine in nuclear RNA is a major substrate of the obesity-associated FTO. Nat Chem Biol, 2011, 7(12): 885–887.
- [12] Charette M, Gray MW. Pseudouridine in RNA: What, where, how, and why. IUBMB Life, 2000, 49(5): 341–351.
- [13] Yu AT, Ge JH, Yu YT. Pseudouridines in spliceosomal snRNAs. Protein Cell, 2011, 2(9): 712–725.
- [14] Ge JH, Yu YT. RNA pseudouridylation: new insights into an old modification. Trends Biochem Sci, 2013, 38(4): 210–218.
- [15] Durant PC, Davis DR. The effect of pseudouridine and pH on the structure and dynamics of the anticodon stem-loop of Trna (Lys, 3). Nucleic Acids Symp Ser, 1997, (36): 56–57.
- [16] Kierzek E, Malgowska M, Lisowiec J, et al. The contribution of pseudouridine to stabilities and structure of RNAs. Nucleic Acids Res, 2014, 42(5):

- 3492–3501.
- [17] Toh SM, Mankin AS. An indigenous posttranscriptional modification in the ribosomal peptidyl transferase center confers resistance to an array of protein synthesis inhibitors. *J Mol Biol*, 2008, 380(4): 593–597.
- [18] Jiang W, Middleton K, Yoon HJ, et al. An essential yeast protein, CBF5p, binds in vitro to centromeres and microtubules. *Mol Cell Biol*, 1993, 13(8): 4884–4893.
- [19] Zebajarian Y, King T, Fournier MJ, et al. Point mutations in yeast *CBF5* can abolish *in vivo* pseudouridylation of rRNA. *Mol Cell Biol*, 1999, 19(11): 7461–7472.
- [20] Nelson ND, Bertuch AA. Dyskeratosis congenita as a disorder of telomere maintenance. *Mutat Res*, 2012, 730(1/2): 43–51.
- [21] Li XY, Zhu P, Ma SQ, et al. Chemical pulldown reveals dynamic pseudouridylation of the mammalian transcriptome. *Nat Chem Biol*, 2015, 11(8): 592–597.
- [22] Hunter S, Jones P, Mitchell A, et al. InterPro in 2011: new developments in the family and domain prediction database. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40(D1): D306–D312.
- [23] Schwartz S, Bernstein DA, Mumbach MR, et al. Transcriptome-wide mapping reveals widespread dynamic-regulated pseudouridylation of ncRNA and mRNA. *Cell*, 2014, 159(1): 148–162.
- [24] Lovejoy AF, Riordan DP, Brown PO. Transcriptome-wide mapping of pseudouridines: pseudouridine synthases modify specific mRNAs in *S. cerevisiae*. *PLoS ONE*, 2014, 9(10): e110799.
- [25] Karikó K, Muramatsu H, Welsh FA, et al. Incorporation of pseudouridine into mRNA yields superior nonimmunogenic vector with increased translational capacity and biological stability. *Mol Ther*, 2008, 16(11): 1833–1840.
- [26] Karijolich J, Yu YT. Converting nonsense codons into sense codons by targeted pseudouridylation. *Nature*, 2011, 474(7351): 395–398.
- [27] Nakamoto MA, Lovejoy AF, Cygan AM, et al. mRNA pseudouridylation affects RNA metabolism in the parasite *Toxoplasma gondii*. *RNA*, 2017, 23(12): 1834–1849.
- [28] Ghosh A, Lima CD. Enzymology of RNA cap synthesis. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 2010, 1(1): 152–172.
- [29] Ramanathan A, Robb GB, Chan SH. mRNA capping: biological functions and applications. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44(16): 7511–7526.
- [30] Izaurralde E, Lewis J, McGuigan C, et al. A nuclear cap binding protein complex involved in pre-mRNA splicing. *Cell*, 1994, 78(4): 657–668.
- [31] Cooke C, Alwine JC. The cap and the 3' splice site similarly affect polyadenylation efficiency. *Mol Cell Biol*, 1996, 16(6): 2579–2584.
- [32] Izaurralde E, Lewis J, Gamberi C, et al. A cap-binding protein complex mediating U snRNA export. *Nature*, 1995, 376(6542): 709–712.
- [33] Muthukrishnan S, Both GW, Furuichi Y, et al. 5'-Terminal 7-methylguanosine in eukaryotic mRNA is required for translation. *Nature*, 1975, 255(5503): 33–37.
- [34] Filipowicz W, Furuichi Y, Sierra JM, et al. A protein binding the methylated 5'-terminal sequence, m7GpppN, of eukaryotic messenger RNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1976, 73(5): 1559–1563.
- [35] Clancy MJ, Shambaugh ME, Timpte CS, et al. Induction of sporulation in *Saccharomyces cerevisiae* leads to the formation of *N*⁶-methyladenosine in mRNA: a potential mechanism for the activity of the *IME4* gene. *Nucleic Acids Res*, 2002, 30(20): 4509–4518.
- [36] Dalman FC, Scherrer LC, Taylor LP, et al. Localization of the 90-kDa heat shock protein-binding site within the hormone-binding domain of the glucocorticoid receptor by peptide competition. *J Biol Chem*, 1991, 266(6): 3482–3490.
- [37] Levis R, Penman S. 5'-Terminal structures of poly(A)⁺ cytoplasmic messenger RNA and of poly(A)⁺ and poly(A)⁻ heterogeneous nuclear RNA of cells of the dipteran *Drosophila melanogaster*. *J Mol Biol*, 1978, 120(4): 487–515.
- [38] Nichols JL. 'Cap' structures in maize poly(A)-containing RNA. *Biochim Biophys Acta*, 1979, 563(2): 490–495.
- [39] Wei CM, Gershowitz A, Moss B. Methylated nucleotides block 5' terminus of HeLa cell

- messenger RNA. *Cell*, 1975, 4(4): 379–386.
- [40] Zhong SL, Li HY, Bodi Z, et al. MTA is an *Arabidopsis* messenger RNA adenosine methylase and interacts with a homolog of a sex-specific splicing factor. *Plant Cell*, 2008, 20(5): 1278–1288.
- [41] Meyer K, 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.
- [42] Zhang F, Zhang YC, Liao JY, et al. The subunit of RNA N6-methyladenosine methyltransferase OsFIP regulates early degeneration of microspores in rice. *PLoS Genet*, 2019, 15(5): e1008120.
- [43] Wan YZ, Tang K, Zhang DY, et al. Transcriptome-wide high-throughput deep m⁶A-seq reveals unique differential m⁶A methylation patterns between three organs in *Arabidopsis thaliana*. *Genome Biol*, 2015, 16: 272.
- [44] Shen L, Liang Z, Wong CE, et al. Messenger RNA modifications in plants. *Trends Plant Sci*, 2019, 24(4): 328–341.
- [45] Lence T, Soller M, Roignant JY. A fly view on the roles and mechanisms of the m⁶A mRNA modification and its players. *RNA Biol*, 2017, 14(9): 1232–1240.
- [46] Peer E, Rechavi G, Dominissini D. Epitranscriptomics: regulation of mRNA metabolism through modifications. *Curr Opin Chem Biol*, 2017, 41: 93–98.
- [47] Wang P, Doxtader KA, Nam Y. Structural basis for cooperative function of Mettl3 and Mettl14 methyltransferases. *Mol Cell*, 2016, 63(2): 306–317.
- [48] Wang X, Feng J, Xue Y, et al. Structural basis of N⁶-adenosine methylation by the METTL3-METTL14 complex. *Nature*, 2016, 534(7608): 575–578.
- [49] Wang X, Huang JB, Zou TT, et al. Human m⁶A writers: two subunits, 2 roles. *RNA Biol*, 2017, 14(3): 300–304.
- [50] Horiuchi K, Kawamura T, Iwanari H, et al. Identification of Wilms' tumor 1-associating protein complex and its role in alternative splicing and the cell cycle. *J Biol Chem*, 2013, 288(46): 33292–33302.
- [51] Růžička K, Zhang M, Campilho A, et al. Identification of factors required for m⁶A mRNA methylation in *Arabidopsis* reveals a role for the conserved E3 ubiquitin ligase HAKAI. *New Phytol*, 2017, 215(1): 157–172.
- [52] 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.
- [53] Knuckles P, Lence T, Haussmann IU, et al. Zc3h13/Flacc is required for adenosine methylation by bridging the mRNA-binding factor Rbm15/Spenito to the m⁶A machinery component Wtap/Fl(2)d. *Genes Dev*, 2018, 32(5/6): 415–429.
- [54] Schwartz S, Agarwala SD, Mumbach MR, et al. High-resolution mapping reveals a conserved, widespread, dynamic mRNA methylation program in yeast meiosis. *Cell*, 2013, 155(6): 1409–1421.
- [55] Agarwala SD, Blitzblau HG, Hochwagen A, et al. RNA methylation by the MIS complex regulates a cell fate decision in yeast. *PLoS Genet*, 2012, 8(6): e1002732.
- [56] Kurihara LJ, Stewart BG, Gammie AE, et al. Kar4p, a karyogamy-specific component of the yeast pheromone response pathway. *Mol Cell Biol*, 1996, 16(8): 3990–4002.
- [57] Lahav R, Gammie A, Tavazoie S, et al. Role of transcription factor Kar4 in regulating downstream events in the *Saccharomyces cerevisiae* pheromone response pathway. *Mol Cell Biol*, 2007, 27(3): 818–829.
- [58] Ping XL, Sun BF, Wang L, et al. Mammalian WTAP is a regulatory subunit of the RNA N6-methyladenosine methyltransferase. *Cell Res*, 2014, 24(2): 177–189.
- [59] Haussmann I, Bodi Z, Sanchez-Moran E, et al. m⁶A potentiates *Sxl* alternative pre-mRNA splicing for robust *Drosophila* sex determination. *Nature*, 2016, 540(7632): 301–304.
- [60] Lence T, Akhtar J, Bayer M, et al. m⁶A modulates neuronal functions and sex determination in *Drosophila*. *Nature*, 2016, 540(7632): 242–247.
- [61] Hongay CF, Orr-Weaver TL. *Drosophila* Inducer of MEiosis 4 (IME4) is required for Notch signaling during oogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(36): 14855–14860.

- [62] Anderson SJ, Kramer MC, Gosai SJ, et al. N⁶-methyladenosine inhibits local ribonucleolytic cleavage to stabilize mRNAs in *Arabidopsis*. *Cell Rep*, 2018, 25(5): 1146–1157.e3.
- [63] Chang JL, Lin HV, Blauwkamp TA, et al. Spenito and Split ends act redundantly to promote Wingless signaling. *Dev Biol*, 2008, 314(1): 100–111.
- [64] Jemc J, Rebay I. Characterization of the *split ends*-like gene *spenito* reveals functional antagonism between SPOC family members during *Drosophila* eye development. *Genetics*, 2006, 173(1): 279–286.
- [65] Granadino B, Campuzano S, Sánchez L. The *Drosophila melanogaster* fl(2)d gene is needed for the female-specific splicing of Sex-lethal RNA. *EMBO J*, 1990, 9(8): 2597–2602.
- [66] Geula S, Moshitch-Moshkovitz S, Dominissini D, et al. Stem Cells. m⁶A mRNA methylation facilitates resolution of naive pluripotency toward differentiation. *Science*, 2015, 347(6225): 1002–1006.
- [67] Horiuchi K, Umetani M, Minami T, et al. Wilms' tumor 1-associating protein regulates G₂/M transition through stabilization of cyclin A2 mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(46): 17278–17283.
- [68] Raffel GD, Chu GC, Jesneck JL, et al. Ott1 (*Rbm15*) is essential for placental vascular branching morphogenesis and embryonic development of the heart and spleen. *Mol Cell Bio*, 2009, 29(2): 333–341.
- [69] Lin Z, Hsu PJ, Xing XD, et al. Mettl3-/Mettl14-mediated mRNA N⁶-methyladenosine modulates murine spermatogenesis. *Cell Res*, 2017, 27(10): 1216–1230.
- [70] Batista PJ, Molinie B, Wang J, et al. m⁶A RNA modification controls cell fate transition in mammalian embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*, 2014, 15(6): 707–719.
- [71] 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.
- [72] Lin SB, Choe J, Du P, et al. The m⁶A methyltransferase METTL3 promotes translation in human cancer cells. *Mol Cell*, 2016, 62(3): 335–345.
- [73] Shen LS, Liang Z, Gu XF, et al. N⁶-methyladenosine RNA modification regulates shoot stem cell fate in *Arabidopsis*. *Dev Cell*, 2016, 38(2): 186–200.
- [74] Falnes PØ, Johansen RF, Seeberg E. AlkB-mediated oxidative demethylation reverses DNA damage in *Escherichia coli*. *Nature*, 2002, 419(6903): 178–182.
- [75] Fu Y, Jia GF, Pang XQ, et al. FTO-mediated formation of N⁶-hydroxymethyladenosine and N⁶-formyladenosine in mammalian RNA. *Nat Commun*, 2013, 4: 1798.
- [76] 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.
- [77] Tang C, Klukovich R, Peng HY, et al. ALKBH5-dependent m⁶A demethylation controls splicing and stability of long 3'-UTR mRNAs in male germ cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115(2): E325–E333.
- [78] Fischer J, Koch L, Emmerling C, et al. Inactivation of the *Fto* gene protects from obesity. *Nature*, 2009, 458(7240): 894–898.
- [79] Frayling TM, Timpson NJ, Weedon MN, et al. A common variant in the *FTO* gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. *Science*, 2007, 316(5826): 889–894.
- [80] Dina C, Meyre D, Gallina S, et al. Variation in *FTO* contributes to childhood obesity and severe adult obesity. *Nat Genet*, 2007, 39(6): 724–726.
- [81] 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.
- [82] Li ZJ, Weng HY, 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.
- [83] Gerken T, Girard CA, Tung YC, et al. The obesity-associated *FTO* gene encodes a 2-oxoglutarate-dependent nucleic acid demethylase. *Science*, 2007, 318(5855): 1469–1472.
- [84] Duan HC, Wei LH, Zhang C, et al. ALKBH10B is an RNA N⁶-methyladenosine demethylase affecting

- Arabidopsis* floral transition. *Plant Cell*, 2017, 29(12): 2995–3011.
- [85] Martínez-Pérez M, Aparicio F, López-Gresa MP, et al. *Arabidopsis* m⁶A demethylase activity modulates viral infection of a plant virus and the m⁶A abundance in its genomic RNAs. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114(40): 10755–10760.
- [86] Wang X, Lu Z, Gomez A, et al. N⁶-methyladenosine-dependent regulation of messenger RNA stability. *Nature*, 2014, 505(7481): 117–120.
- [87] Kasowitz SD, Ma J, Anderson SJ, et al. Nuclear m⁶A reader YTHDC1 regulates alternative polyadenylation and splicing during mouse oocyte development. *PLoS Genet*, 2018, 14(5): e1007412.
- [88] Chen HM, Fitcher B, Leatherwood J, et al. The fission yeast RNA binding protein Mmi1 regulates meiotic genes by controlling intron specific splicing and polyadenylation coupled RNA turnover. *PLoS ONE*, 2011, 6(10): e26804.
- [89] Wei LH, Song P, Wang Y, et al. The m⁶A reader ECT2 controls trichome morphology by affecting mRNA stability in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2018, 30(5): 968–985.
- [90] Arribas-Hernández L, Bressendorff S, Hansen MH, et al. An m⁶A-YTH module controls developmental timing and morphogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2018, 30(5): 952–967.
- [91] Huang HL, Weng HY, Sun WJ, et al. Recognition of RNA N⁶-methyladenosine by IGF2BP proteins enhances mRNA stability and translation. *Nat Cell Biol*, 2018, 20(3): 285–295.
- [92] He C, Hus JC, Sun LJ, et al. A methylation-dependent electrostatic switch controls DNA repair and transcriptional activation by *E. coli* Ada. *Mol Cell*, 2005, 20(1): 117–129.
- [93] Chujo T, Suzuki T. Trmt61B is a methyltransferase responsible for 1-methyladenosine at position 58 of human mitochondrial tRNAs. *RNA*, 2012, 18(12): 2269–2276.
- [94] Saikia M, Fu Y, Pavon-Eternod M, et al. Genome-wide analysis of N1-methyl-adenosine modification in human tRNAs. *RNA*, 2010, 16(7): 1317–1327.
- [95] Mark H, Brulé H, Degoul F, et al. The presence of modified nucleotides is required for cloverleaf folding of a human mitochondrial tRNA. *Nucleic Acids Res*, 1998, 26(7): 1636–1643.
- [96] Chan CT, Dyavaiah M, DeMott MS, et al. A quantitative systems approach reveals dynamic control of tRNA modifications during cellular stress. *PLoS Genet*, 2010, 6(12): e1001247.
- [97] Helm M, Alfonzo JD. Posttranscriptional RNA modifications: playing metabolic games in a cell's chemical legoland. *Chem Biol*, 2014, 21(2): 174–185.
- [98] Peifer C, Sharma S, Watzinger P, et al. Yeast Rrp8p, a novel methyltransferase responsible for m¹A 645 base modification of 25S rRNA. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41(2): 1151–1163.
- [99] Ballesta JP, Cundliffe E. Site-specific methylation of 16S rRNA caused by pct, a pactamycin resistance determinant from the producing organism, *Streptomyces pactum*. *J Bacteriol*, 1991, 173(22): 7213–7218.
- [100] Li XQ, Xiong XS, Zhang ML, et al. Base-resolution mapping reveals distinct m¹A methylome in nuclear- and mitochondrial-encoded transcripts. *Mol Cell*, 2017, 68(5): 993–1005.e9.
- [101] Macon JB, Wolfenden R. 1-Methyladenosine. Dimroth rearrangement and reversible reduction. *Biochemistry*, 1968, 7(10): 3453–3458.
- [102] Aas PA, Otterlei M, Falnes PØ, et al. Human and bacterial oxidative demethylases repair alkylation damage in both RNA and DNA. *Nature*, 2003, 421(6925): 859–863.
- [103] Ougland R, Zhang CM, Liiv A, et al. AlkB restores the biological function of mRNA and tRNA inactivated by chemical methylation. *Mol Cell*, 2004, 16(1): 107–116.
- [104] Motorin Y, Lyko F, Helm M. 5-methylcytosine in RNA: detection, enzymatic formation and biological functions. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38(5): 1415–1430.
- [105] Hotchkiss RD. The quantitative separation of purines, pyrimidines, and nucleosides by paper chromatography. *J Biol Chem*, 1948, 175(1): 315–332.
- [106] Edelheit S, Schwartz S, Mumbach MR, et al. Transcriptome-wide mapping of 5-methylcytidine

- RNA modifications in bacteria, archaea, and yeast reveals m⁵C within archaeal mRNAs. *PLoS Genet*, 2013, 9(6): e1003602.
- [107] Burgess AL, David R, Searle IR. Conservation of tRNA and rRNA 5-methylcytosine in the kingdom Plantae. *BMC Plant Biol*, 2015, 15: 199.
- [108] Hussain S, Sajini A, Blanco S, et al. NSun2-mediated cytosine-5 methylation of vault noncoding RNA determines its processing into regulatory small RNAs. *Cell Rep*, 2013, 4(2): 255–261.
- [109] Khoddami V, Cairns BR. Identification of direct targets and modified bases of RNA cytosine methyltransferases. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(5): 458–464.
- [110] Schaefer M, Pollex T, Hanna K, et al. RNA methylation by Dnmt2 protects transfer RNAs against stress-induced cleavage. *Genes Dev*, 2010, 24(15): 1590–1595.
- [111] Tuorto F, Liebers R, Musch T, et al. RNA cytosine methylation by Dnmt2 and NSun2 promotes tRNA stability and protein synthesis. *Nat Struct Mol Biol*, 2012, 19(9): 900–905.
- [112] Chen Y, Sierzputowska-Gracz H, Guenther R, et al. 5-methylcytidine is required for cooperative binding of Mg²⁺ and a conformational transition at the anticodon stem-loop of yeast phenylalanine tRNA. *Biochemistry*, 1993, 32(38): 10249–10253.
- [113] Tuorto F, Herbst F, Alerasool N, et al. The tRNA methyltransferase Dnmt2 is required for accurate polypeptide synthesis during haematopoiesis. *EMBO J*, 2015, 34(18): 2350–2362.
- [114] Chan CTY, Pang YLJ, Deng WJ, et al. Reprogramming of tRNA modifications controls the oxidative stress response by codon-biased translation of proteins. *Nat Commun*, 2012, 3: 937.
- [115] Schosserer M, Minois N, Angerer TB, et al. Methylation of ribosomal RNA by NSUN5 is a conserved mechanism modulating organismal lifespan. *Nat Commun*, 2015, 6: 6158.
- [116] Amort T, Rieder D, Wille A, et al. Distinct 5-methylcytosine profiles in poly(A) RNA from mouse embryonic stem cells and brain. *Genome Biol*, 2017, 18: 1.
- [117] David R, Burgess A, Parker B, et al. Transcriptome-wide mapping of RNA 5-methylcytosine in *Arabidopsis* mRNAs and noncoding RNAs. *Plant Cell*, 2017, 29(3): 445–460.
- [118] Goll MG, Kirpekar F, Maggert KA, et al. Methylation of tRNA^{Asp} by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2. *Science*, 2006, 311(5759): 395–398.
- [119] Jurkowski TP, Meusburger M, Phalke S, et al. Human DNMT2 methylates tRNA^{Asp} molecules using a DNA methyltransferase-like catalytic mechanism. *RNA*, 2008, 14(8): 1663–1670.
- [120] Becker M, Müller S, Nellen W, et al. Pmt1, a Dnmt2 homolog in *Schizosaccharomyces pombe*, mediates tRNA methylation in response to nutrient signaling. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40(22): 11648–11658.
- [121] Motorin Y, Grosjean H. Multisite-specific tRNA: m⁵C-methyltransferase (Trm4) in yeast *Saccharomyces cerevisiae*: Identification of the gene and substrate specificity of the enzyme. *RNA*, 1999, 5(8): 1105–1118.
- [122] Auxilien S, Guérineau V, Szweykowska-Kulińska Z, et al. The human tRNA m⁵C methyltransferase Misu is multisite-specific. *RNA Biol*, 2012, 9(11): 1331–1338.
- [123] Blanco S, Kurowski A, Nichols J, et al. The RNA-methyltransferase Misu (NSun2) poises epidermal stem cells to differentiate. *PLoS Genet*, 2011, 7(12): e1002403.
- [124] Hussain S, Tuorto F, Menon S, et al. The mouse cytosine-5 RNA methyltransferase NSun2 is a component of the chromatoid body and required for testis differentiation. *Mol Cell Biol*, 2013, 33(8): 1561–1570.
- [125] Abbasi-Moheb L, Mertel S, Gonsior M, et al. Mutations in NSUN2 cause autosomal-recessive intellectual disability. *Am J Hum Genet*, 2012, 90(5): 847–855.
- [126] Khan MA, Rafiq MA, Noor A, et al. Mutation in NSUN2, which encodes an RNA methyltransferase, causes autosomal-recessive intellectual disability. *Am J Hum Genet*, 2012, 90(5): 856–863.
- [127] Martinez FJ, Lee JH, Lee JE, et al. Whole exome sequencing identifies a splicing mutation in NSUN2 as a cause of a Dubowitz-like syndrome. *J Med Genet*, 2012, 49(6): 380–385.

- [128] Fahiminiya S, Almuriekh M, Nawaz Z, et al. Whole exome sequencing unravels disease-causing genes in consanguineous families in Qatar. *Clin Genet*, 2014, 86(2): 134–141.
- [129] Rai K, Chidester S, Zavala CV, et al. Dnmt2 functions in the cytoplasm to promote liver, brain, and retina development in zebrafish. *Genes Dev*, 2007, 21(3): 261–266.
- [130] Pavlopoulou A, Kossida S. Phylogenetic analysis of the eukaryotic RNA (cytosine-5)-methyltransferases. *Genomics*, 2009, 93(4): 350–357.
- [131] Chen P, Jäger G, Zheng B. Transfer RNA modifications and genes for modifying enzymes in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biol*, 2010, 10: 201.
- [132] Rácz I, Király I, Lásztity D. Effect of light on the nucleotide composition of rRNA of wheat seedlings. *Planta*, 1978, 142(3): 263–267.
- [133] Fu LJ, Guerrero CR, Zhong N, et al. Tet-mediated formation of 5-hydroxymethylcytosine in RNA. *J Am Chem Soc*, 2014, 136(33): 11582–11585.
- [134] Dubin DT, Taylor RH. The methylation state of poly A-containing-messenger RNA from cultured hamster cells. *Nucleic Acids Res*, 1975, 2(10): 1653–1668.
- [135] Sommer S, Salditt-Georgieff M, Bachenheimer S, et al. The methylation of adenovirus-specific nuclear and cytoplasmic RNA. *Nucleic Acids Res*, 1976, 3(3): 749–765.
- [136] Canaani D, Kahana C, Lavi S, et al. Identification and mapping of N^6 -methyladenosine containing sequences in simian virus 40 RNA. *Nucleic Acids Res*, 1979, 6(8): 2879–2899.
- [137] Kane SE, Beemon K. Precise localization of m⁶A in Rous sarcoma virus RNA reveals clustering of methylation sites: implications for RNA processing. *Mol Cell Biol*, 1985, 5(9): 2298–2306.
- [138] Keith G. Mobilities of modified ribonucleotides on two-dimensional cellulose thin-layer chromatography. *Biochimie*, 1995, 77(1/2): 142–144.
- [139] Kharchenko PV, Tolstorukov MY, Park PJ. Design and analysis of CHIP-seq experiments for DNA-binding proteins. *Nat Biotechnol*, 2008, 26(12): 1351–1359.
- [140] Hafner M, Landthaler M, Burger L, et al. Transcriptome-wide identification of RNA-binding protein and microRNA target sites by PAR-CLIP. *Cell*, 2010, 141(1): 129–141.
- [141] Corcoran DL, Georgiev S, Mukherjee N, et al. PARalyzer: definition of RNA binding sites from PAR-CLIP short-read sequence data. *Genome Biol*, 2011, 12(8): R79.
- [142] Linder B, Grozhik AV, Olarerin-George AO, et al. Single-nucleotide-resolution mapping of m⁶A and m⁶Am throughout the transcriptome. *Nat Methods*, 2015, 12(8): 767–772.
- [143] Liu N, Parisien M, Dai Q, et al. Probing N^6 -methyladenosine RNA modification status at single nucleotide resolution in mRNA and long noncoding RNA. *RNA*, 2013, 19(12): 1848–1856.
- [144] Aguilo F, Zhang F, Sancho A, et al. Coordination of m⁶A mRNA methylation and gene transcription by ZFP217 regulates pluripotency and reprogramming. *Cell Stem Cell*, 2015, 17(6): 689–704.
- [145] Xiong XS, Li XY, Yi CQ. N^1 -methyladenosine methylome in messenger RNA and non-coding RNA. *Curr Opin Chem Biol*, 2018, 45: 179–186.

(本文责编 陈宏宇)