真核生物mRNA上的化学修饰和基因表达调控

宋靖慧, 彭金英*, 伊成器*

北京大学生命科学学院, 蛋白质与植物基因研究国家重点实验室, 北京 100871

* 联系人, E-mail: jypengpku@pku.edu.cn; chengqi.yi@pku.edu.cn

收稿日期: 2020-08-21; 接受日期: 2020-09-22; 网络版发表日期: 2021-01-05

国家自然科学基金重大研究计划集成项目(批准号: 91940304)、国家重点研发计划(批准号: 2019YFA08002201)和国家自然科学基金杰出青年基金(批准号: 21865701)资助

摘要 从1951年首个RNA修饰被发现以来, 细胞内天然RNA上已有超过160种化学修饰被鉴定. 早期关于RNA修饰的研究大多集中于细胞内丰度较高的转运RNA(transfer RNA, tRNA)、核糖体RNA(ribosomal RNA, rRNA)和核内小RNA(small nuclear RNA, snRNA). 近年来, 随着测序技术的发展, 在mRNA上也鉴定到多种动态调节的化学修饰, 从而促进了“表观转录组学”这一新兴领域的诞生和发展. 本文围绕mRNA内部的化学修饰, 以 N^6 -甲基腺嘌呤(N^6 -methyladenosine, m^6A)、 $N^6,2'$ -O-二甲基腺嘌呤核苷($N^6,2'$ -O-dimethyladenosine, m^6Am)、 N^1 -甲基腺嘌呤(N^1 -methyladenosine, m^1A)、假尿苷修饰(pseudouridine, Ψ)、5-甲基胞嘧啶(5-methylcytosine, m^5C)和 N^7 -甲基鸟苷(N^7 -methylguanosine, m^7G)为例, 阐释了其修饰酶、测序技术以及生物学功能, 并讨论了目前RNA修饰研究所面临的主要挑战和机遇.

关键词 RNA修饰, 表观转录组, N^6 -甲基腺嘌呤, $N^6,2'$ -O-二甲基腺嘌呤核苷, N^1 -甲基腺嘌呤, 假尿苷

在中心法则中, 遗传信息由DNA通过转录传递给mRNA, mRNA再通过翻译将信息传递给蛋白质, 最后由蛋白质发挥功能. mRNA在基因表达调控过程中起到了至关重要的作用, 其携带的遗传信息不仅仅是A/U/C/G四种碱基, 还包括多种多样的化学修饰^[1]. 例如, 在真核生物中, mRNA的5'末端通过5'-5'三磷酸键连接一个 N^7 -甲基鸟苷(N^7 -methylguanosine, m^7G), 形成5'帽子修饰; 而mRNA的3'末端会被加上50~200个核苷酸长度的poly(A)尾巴. 这两种末端修饰对mRNA加工、出核、稳定性和翻译起到了重要的作用^[2,3].

除了末端修饰之外, mRNA还含有多种内部修饰.

例如, N^6 -甲基腺嘌呤(N^6 -methyladenosine, m^6A)是mRNA上含量最丰富的内部修饰^[4]; 次黄苷(inosine, I)是由腺苷转化的, 并可改变mRNA的编码信息^[5]. 此外, 通过高通量检测技术, 还有许多化学修饰被发现也存在于mRNA内部, 包括 $N^6,2'$ -O-二甲基腺嘌呤核苷($N^6,2'$ -O-dimethyladenosine, m^6Am)、 N^1 -甲基腺嘌呤(N^1 -methyladenosine, m^1A)、5-甲基胞嘧啶(5-methylcytosine, m^5C)、5-羟甲基胞嘧啶(5-hydroxymethylcytosine, hm^5C)、 N^4 -乙酰胞苷(N^4 -acetylcytidine, ac^4C)、假尿苷(pseudouridine, Ψ)、 N^7 -甲基鸟苷、2'-O-甲基化核苷酸(2'-O-methylated nucleotides, Nm)等. 转录组

引用格式: 宋靖慧, 彭金英, 伊成器. 真核生物mRNA上的化学修饰和基因表达调控. 中国科学: 生命科学, 2021, 51: 479–495

Song J H, Peng J Y, Yi C Q. Chemical modifications in eukaryotic mRNA regulate gene expression (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2021, 51: 479–495, doi: 10.1360/SSV-2020-0159

(transcriptome)上多种多样、普遍存在的化学修饰几乎参与了RNA生命周期的各个方面,为基因表达提供了新的调节层面,对这些RNA修饰的分布、调控和功能的研究促进了RNA表观遗传学(RNA epigenetics)以及表观转录组学(epitranscriptomics)的迅猛发展^[1,6~8]。本文围绕mRNA内部的m⁶A, m¹A, m⁶Am, Ψ, m⁵C和m⁷G等修饰,阐释了有关修饰酶、高通量测序技术以及生物学功能的研究,希望可以了解目前表观转录组学研究的发展历史和现状提供一个切入点。

1 mRNA修饰的书写、擦除以及读取

RNA修饰是由酶催化产生的,这种修饰酶被称之为“书写”蛋白(writers)。有些RNA修饰还可通过酶被去除掉,这种去修饰酶被称之为“擦除”蛋白(erasers)。RNA的动态修饰水平可通过“书写”蛋白和“擦除”蛋白来调控。此外,有一类特定的RNA结合蛋白(RNA-binding proteins, RBP)能够特异性识别并结合有修饰的RNA或被RNA修饰间接影响其结合能力,从而特异性调节被修饰标记的RNA,此类蛋白质被称为“阅读”蛋白(readers)。通过“阅读”蛋白,表观转录组的修饰信息能够被读取并翻译,从而调控下游的生物学过程。

1.1 mRNA内部含量最丰富的修饰: m⁶A

m⁶A是真核生物mRNA内部含量最丰富的修饰,最早发现于19世纪70年代,由腺嘌呤核苷的N⁶位被甲基化而形成(图1A),平均每个mRNA分子约有3个m⁶A位点^[4]。LC-MS/MS(liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry)定量实验表明,人源mRNA中m⁶A/A的比例约为0.4%~0.7%^[9~11]。大多数m⁶A修饰位点都符合RRACH(R=A, G; H=A, C, U)的基序,这部分m⁶A是由甲基转移酶复合物催化产生的(图1A)。该复合物包括METTL3(methyltransferase like 3), METTL14(methyltransferase like 14)和几种辅助蛋白(WTAP(regulatory subunit Wilms' tumor 1-associating protein), VIRMA(Protein virilizer homolog), HAKAI(E3 ubiquitin-protein ligase Hakai), Zc3h13(Zinc finger CCCH domain-containing protein 13)和RBM15/15B(RNA-binding protein 15/15B))^[11~19]。其中, METTL3是具有催化能力的甲基转移酶, METTL14与METTL3形成异二聚体以增强其催化活性。对于辅助蛋白,虽然没

有直接证据支持WTAP蛋白本身具有甲基转移酶活性,但WTAP敲除后mRNA中m⁶A修饰会显著降低^[11,15]。WTAP与METTL3-METTL14相互作用,可能有助于甲基转移酶复合物转移到核散斑体(nuclear speckles); VIRMA介导在3'UTR(untranslated region)和终止密码子附近的偏好性甲基化; HAKAI和Zc3h13促进mRNA上的m⁶A修饰; RBM15及其旁系同源RBM15B调节m⁶A修饰并影响XIST介导的X染色体失活^[16~21]。此外,有研究发现, METTL16(RNA N⁶-adenosine-methyltransferase METTL16)也是一种m⁶A的甲基转移酶,它能够甲基化MAT2A(S-adenosylmethionine synthase isoform type-2)的mRNA(图1A)^[22]。

去甲基化酶FTO(fat mass and obesity-associated protein)和ALKBH5(alkylation repair homologue protein 5)是m⁶A的“擦除”蛋白,均属于二价铁离子和α-酮戊二酸依赖性的加氧酶超家族^[9,10]。“擦除”蛋白的发现揭示了m⁶A的可逆性,暗示了其潜在的动态调节功能。

m⁶A功能的发挥离不开“阅读”蛋白(图1A)。其中最具代表的是YTH(the YT521-B homology domain)家族蛋白,包括在脊椎动物中的YTHDF1~3(YTH domain-containing family protein 1~3)和YTHDC1~2(YTH domain-containing protein 1~2)^[23~28]。除了YTH家族蛋白外, eIF3(eukaryotic initiation factor 3), FMR1(fragile X mental retardation protein 1), IGF2BPs(insulin-like growth factor 2 mRNA-binding proteins)和Prp2a(proline rich coiled-coil 2 A)也是直接识别m⁶A的“阅读”蛋白^[29~32]。此外, m⁶A修饰可改变RNA的局部结构,从而间接影响RNA结合蛋白与RNA靶点的相互作用,这种机制被称为“m⁶A-switch”。m⁶A-switch可促进核内蛋白HNRNPC(heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2), HNRNPG(heterogeneous nuclear ribonucleoprotein G)和HNRNPA2B1(heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1)与RNA靶点的结合,从而调节靶RNA的功能^[33~35]。多样化的“阅读”蛋白赋予了m⁶A多重调节功能。

1.2 位于帽子结构后的第一个核苷酸: m⁶Am

与m⁶A等内部碱基修饰不同, m⁶Am是主要位于真核生物5'端帽子结构后的第一位核苷酸(图1B)。最近,本团队以及其他团队陆续独立发现,甲基转移酶PCIF1(phosphorylated CTD interacting factor 1)是

图 1 mRNA化学修饰的结构、“书写”蛋白、“擦除”蛋白以及“阅读”蛋白。A: N^6 -甲基腺嘌呤; B: $N^6,2'$ -O-二甲基腺嘌呤核苷; C: N^1 -甲基腺嘌呤; D: 假尿苷修饰; E: 5-甲基胞嘧啶; F: N^7 -甲基鸟苷

Figure 1 The structures, writers, erasers, and readers of chemical modifications in mRNA. A: m^6A ; B: m^6Am ; C: m^1A ; D: Ψ ; E: m^5C ; F: m^7G

m^6Am 的“书写”蛋白,它特异性识别5'帽子结构,将5'末端的Am甲基化为 m^6Am (图1B)^[36~39]。与 m^6A 相似, m^6Am 可被FTO去除,转换为Am(图1B)^[40,41]。LC-MS/MS定量实验显示,人源mRNA中 m^6Am/A 的比例约为0.02%~0.05%^[36,41], m^6Am 含量大约是 m^6A 的1/10。由于 m^6Am 恰好位于帽子结构后的第一个核苷酸处,这与分布在整个mRNA上的许多修饰不同,因此 m^6Am 的“局部浓度”仍然很高,这暗示了该修饰可能具有重要

的生物学功能。

1.3 腺嘌呤的其他甲基化修饰: m^1A

m^1A 是另一个众所周知的甲基化的腺嘌呤修饰,它是 m^6A 的同分异构体。不同于 m^6A , m^1A 是腺嘌呤核苷 N^1 位被甲基化而形成的(图1C),它广泛分布于转运RNA(transfer RNA, tRNA)和核糖体RNA(ribosomal RNA, rRNA)。近几年通过高通量测序技术,人们发现

m¹A也存在于mRNA^[42~45]。多项研究报道, 人源mRNA中的m¹A/A比例约为0.01%~0.05%^[42,43,46,47], 该结果支持了mRNA中存在成百上千的m¹A位点^[42~44], 但通过m¹A-seq-TGIRT方法仅检测到了屈指可数的修饰位点^[45]。m¹A的“书写”蛋白和“擦除”蛋白有多种(图1C)。mRNA上的一部分m¹A修饰是由TRMT6-TRMT61A(tRNA(adenine(58)-N(1))-methyltransferase non-catalytic subunit TRM6/tRNA(adenine(58)-N(1))-methyltransferase catalytic subunit TRMT61A)复合物催化形成的, 该复合物识别GUUCRA基序和与tRNA T Ψ C环相似的结构; 线粒体mRNA上的m¹A是由甲基转移酶TRMT61B(tRNA(adenine(58)-N(1))-methyltransferase, mitochondrial)和TRMT10C(tRNA methyltransferase 10 homolog C)催化形成的^[44,45]。m¹A可通过“擦除”蛋白ALKBH1(alkylated DNA repair protein alkB homolog 1), ALKBH3和FTO去甲基化^[41~43,48]。与FTO相同, ALKBH1和ALKBH3都是属于二价铁离子和 α -酮戊二酸依赖性的加氧酶超家族。至于mRNA上的m¹A是否还有其他的“书写”蛋白和“擦除”蛋白, 仍需进一步研究。

1.4 尿嘧啶核苷的旋转异构体: Ψ

Ψ 是尿嘧啶核苷的旋转异构体。首先尿苷的N-C糖苷键发生断裂, 接着尿嘧啶碱基沿着N³-C⁶的轴旋转180度, 最后形成假尿苷的C-C糖苷键(图1D)。 Ψ 是RNA上第一个被发现的化学修饰, 并且是总RNA上含量最丰富的修饰, 因此又被称为RNA的“第五种”核苷^[49,50]。 Ψ 修饰普遍存在于tRNA, rRNA和核内小RNA(small nuclear RNA, snRNA), 直到2014年, 多个独立的科研团队均发现 Ψ 也存在于mRNA^[51~55]。哺乳动物mRNA中 Ψ /U的比例约为0.2%~0.6%^[54], 其含量仅次于m⁶A。生物体内存在多种可催化 Ψ 产生的假尿苷合酶(pseudouridine synthase, PUS)。根据序列同源性, 假尿苷合酶被分为六大家族: TruA, TruB, TruD, RluA, RsuA和PUS10^[56~58]。根据催化机制, 假尿苷合酶又可被分为两类: 一类假尿苷合酶可独立发挥催化功能, 无需其他辅助因子; 另一类假尿苷合酶是DKC1(H/ACA ribonucleoprotein complex subunit DKC1), 它与snoRNA(small nucleolar RNA)以及NHP2(H/ACA ribonucleoprotein complex subunit 2)、NOP10(H/ACA ribonucleoprotein complex subunit 3)和GAR1(H/ACA

ribonucleoprotein complex subunit 1)核心蛋白质形成snoRNP复合物从而发挥催化功能(图1D)^[58]。迄今已在人类中发现13种假尿苷合酶, 分属于除RsuA家族外的其他5个家族, 在这13个酶中只有DKC1需要通过snoRNP复合物起催化作用。目前, 假尿苷合酶PUS1(tRNA pseudouridine synthase A), PUS7(pseudouridylate synthase 7 homolog), TRUB1(probable tRNA pseudouridine synthase 1)和DKC1被报道可催化mRNA中的部分 Ψ 修饰位点。尚不清楚其他假尿苷合酶是否也可以靶向mRNA。

1.5 胞嘧啶核苷的甲基化: m⁵C

甲基化修饰也可发生在胞嘧啶核苷的C⁵位, 从而形成m⁵C(图1E)。20世纪70年代, m⁵C最早发现于tRNA, rRNA和mRNA^[59]。作为m⁵C的“书写”蛋白, NSUN2(RNA cytosine C(5)-methyltransferase NSUN2)是mRNA上m⁵C的主要甲基转移酶^[60~62]。目前尚不清楚其他m⁵C甲基转移酶是否也可靶向mRNA, 以及mRNA上的m⁵C是否能被主动去除。研究发现, m⁵C可被TET家族酶(ten-eleven translocation family enzymes)进一步氧化成hm⁵C^[63~65]。最近的研究鉴定出两个m⁵C的“阅读”蛋白——ALYREF(Aly/REF export factor)和YBX1(Y-box binding protein 1)^[62,66,67]。LC-MS/MS定量实验显示, 人源mRNA中m⁵C/C的比例约为0.02%~0.09%^[68]。

1.6 鸟嘌呤核苷的甲基化: m⁷G

鸟嘌呤核苷也可以被甲基化形成m⁷G(图1F)。m⁷G是一个众所周知的mRNA 5'帽子修饰, 并且也广泛存在于tRNA。最近的研究发现, m⁷G修饰也存在于mRNA的内部, 在哺乳动物mRNA中内部的m⁷G/G的含量大约为0.002%~0.05%^[69~71]。METTL1-WDR4是已知的tRNA m⁷G甲基转移酶复合物, 同时该复合物也催化一部分mRNA内部的m⁷G修饰形成。未来仍需进一步研究是否有其他的甲基转移酶也能催化内部m⁷G修饰形成。

2 mRNA上化学修饰的高通量测序技术

RNA修饰的高通量检测技术根据其采取的策略, 可分为以下3种: (i) 通过抗体富集含有修饰的RNA;

(ii) 利用特异性化学反应标记RNA修饰; (iii) 利用对RNA修饰敏感的内切核糖核酸酶. RNA修饰测序技术最主要的关注点是精确度、灵敏度、分辨率、通量和定量能力, 每种类别的技术都具有相对优势^[72]. 下文分别对这几类检测技术进行介绍.

2.1 基于抗体的测序技术

(1) 基于特异性识别RNA修饰抗体的测序技术. 大多数 m^6A 的表观转录组测序方法依赖于 m^6A 特异性抗体. 例如, m^6A /MeRIP-seq方法利用抗体富集含有 m^6A 修饰的RNA片段, 实现了以100~200 nt的分辨率在哺乳动物mRNA中鉴定到数以千计的 m^6A 位点(图2A)^[73,74]. 大多数 m^6A 位点位于3'UTRs和终止密码子附近. 随后, 几个研究团队基于 m^6A /MeRIP-seq相继开发了改进的方法, 以提高 m^6A 谱图的分辨率. PA- m^6A -seq, m^6A -CLIP和miCLIP方法利用紫外线诱导的抗体与RNA交联和反转录后在 m^6A 修饰位点处发生的突变或终止特征, 以获得单碱基分辨率的 m^6A 谱图(图2A)^[75-77]. 进一步改良的方法 m^6A -LAIC-seq实现了在整个转录组范围内对 m^6A 的化学计量进行定量(图2A)^[78]. 该方法首先使用 m^6A 抗体进行免疫沉淀(immunoprecipitation, IP), 分别收集 m^6A 阳性(洗脱物)和 m^6A 阴性(上清液)组分中的全长RNA转录本并进行测序; 然后通过比较 m^6A 阳性和 m^6A 阴性组分中的RNA丰度来量化每个基因中的 m^6A 化学计量. m^6A -LAIC-seq结果表明, 在人类胚胎干细胞中, 大多数基因的 m^6A 修饰水平平均低于50%, 优化的检测方法有助于人们更好地了解错综复杂的 m^6A 谱图. 这些基于抗体的 m^6A 测序方法可以预先富集 m^6A 信号并便于检测低丰度的RNA转录本, 但是 m^6A 特异性抗体往往具有固有的偏好性并且还能识别其他二级修饰^[76,79].

m^6A 特异性抗体也可以识别 m^6Am , 但 m^6Am 只位于转录起始位点(transcription start site, TSS), 因此 m^6A 的测序技术 m^6A /MeRIP-seq和miCLIP也可用于检测 m^6Am ^[36,76]. 基于这些方法, 研究者们开发了一种优化的 m^6Am 测序方法—— m^6Am -Exo-seq(图2B)^[38]. 该方法使用5'核酸外切酶去除内部含有 m^6A 的RNA片段, 从而富集被帽子结构保护的mRNA 5'端片段, 之后再使用 m^6A 抗体进行免疫沉淀. 通过 m^6Am -Exo-seq方法发现, 在人源细胞中有上千个基因存在 m^6Am 修饰. 尽管如此, 当前几乎所有的 m^6Am 测序技术都依赖于 m^6A

抗体, 因此仍需进一步开发无偏好性和特异的 m^6Am 检测方法, 以帮助人们更好地了解 m^6Am 谱图.

与 m^6A 类似, m^1A 也可以通过特异性抗体来检测. 利用 m^1A 特异性抗体, 目前已有的 m^1A 测序技术包括 m^1A -ID-seq, m^1A -seq, m^1A -MAP和 m^1A -seq-TGIRT等^[42-45]. 由于 m^1A N¹位的甲基位于Watson-Crick界面, 所以 m^1A 修饰会影响正常的碱基互补配对^[80]. 在反转录过程中, m^1A 会导致反转录终止或者错配产生, 因此在抗体富集和测序之后利用该特征可以实现单碱基分辨率鉴定 m^1A 位点. 此外, 作为附加的验证步骤, 对抗体富集后的含 m^1A 的RNA片段平行进行去甲基酶处理(去除 m^1A 修饰)或者Dimroth重排反应(将 m^1A 转变为 m^6A 修饰), 即可抹去 m^1A 在反转录中的特征; 因此通过比较处理组和未处理组的测序数据, 即可鉴定出高度可信的 m^1A 修饰位点. 其中, m^1A -seq和 m^1A -ID-seq分别利用了Dimroth重排反应和去甲基酶处理作为验证步骤, 在哺乳动物mRNA上鉴定到了成百上千的 m^1A 位点, 这些位点富集在5'UTR^[42,43]. 该工作首次报道了哺乳动物mRNA上也存在动态的、可逆的 m^1A 修饰. 随后, 为了提高 m^1A 谱图的分辨率, 本团队及其他团队开发了 m^1A -MAP和 m^1A -seq-TGIRT(图2C)^[44,45]. 这两种方法在 m^1A -seq和 m^1A -ID-seq的基础上优化了反转录条件, 使用TGIRT反转录酶, 提高了反转录时 m^1A 的通读效率和 m^1A 位点处的突变率, 从而实现了以单碱基分辨率检测 m^1A 修饰. 通过以上检测技术, m^1A 被发现既存在于细胞核编码的mRNA, 也存在于线粒体编码的mRNA上, 并且可以响应环境变化而动态调节. m^1A -seq-TGIRT在人类mRNA中仅仅检测到15个 m^1A 修饰位点^[45]; 而 m^1A -MAP在人类mRNA中检测到了473个 m^1A 位点, 这些位点涵盖了 m^1A -seq-TGIRT检测到的所有15个 m^1A 位点^[44]. 对这两种方法的深入分析揭示了导致 m^1A -seq-TGIRT测序方法灵敏性差的潜在原因, 包括严重的测序reads重复、rRNA的污染、显著的RNA降解、低效率的Dimroth反应、测序深度不足等^[81]. 最近, 研究人员利用进化的反转录酶更有效地读取 m^1A 的新方法(m^1A -IP-Seq和 m^1A -quant-Seq)又报道了数以百计的 m^1A 位点, 进一步证实了该修饰在mRNA中的普遍性^[82].

理论上, 基于抗体的方法可用于检测任何其他修饰, 包括 m^5C 和 m^7G . m^5C -RIP方法利用 m^5C 特异性抗体来识别细菌、古细菌、酵母和植物转录体中的 m^5C 修

图2 利用抗体富集修饰的高通量测序技术流程图。A: m^6A 测序技术; B: m^6Am 测序技术; C: m^1A 测序技术; D: m^5C 测序技术
Figure 2 The antibody-based high-throughput strategies for detecting mRNA modifications. A: m^6A sequencing methods; B: m^6Am sequencing method; C: m^1A sequencing methods; D: m^5C sequencing methods

饰(图2D)^[83,84]。 m^7G -MeRIP-seq利用 m^7G 特异性抗体,在哺乳动物转录组中鉴定出超过2000个 m^7G 修饰^[70]。 m^7G 的miCLIP-seq(类似于 m^6A 的miCLIP)使用交联诱导产生的cDNA终止和突变信号检测 m^7G 修饰^[71]。

(2) 基于抗体的其他测序技术。RNA修饰不仅可以被特异性识别抗体富集,也可通过“书写”蛋白和“阅读”蛋白被富集。2019年,一种新型 m^6A 测序方法DART-Seq被报道,该方法利用融合的APOBEC1-YTH蛋白(YTH结构域起到了抗体的作用可以识别 m^6A 修饰, APOBEC1在 m^6A 附近引入C到U的编辑),从而鉴定 m^6A 位点^[85]。但是该方法使用的YTH结构域对 m^6A 修饰的亲和力和特异性可能会影响靶点的检测精度,并

且需要在细胞内表达外源融合蛋白。对于 m^5C 修饰, Aza-IP方法利用胞苷类似物5-azacytidine与甲基转移酶形成共价加合物,该加合物可富集 m^5C 靶点并用于测序(图2D)^[86]。 m^5C 的miCLIP方法(不同于 m^6A 的miCLIP方法)利用“书写”蛋白NSUN2的C271A突变体与底物之间形成共价键来富集并检测 m^5C 靶点(图2D)^[61]。

2.2 基于化学标记的测序技术

前文提到的 m^6A 测序技术都依赖于特异性抗体,这些技术可以富集 m^6A 信号并检测丰度低的RNA转录本。鉴于 m^6A 抗体对RNA的序列和结构存在固有偏好,而且会识别其他二级修饰^[76,79]。研究者们进一步开发

了基于化学标记的 m^6A 测序技术. 其中, m^6A -SEAL技术巧妙地利用FTO将 m^6A 修饰氧化成高反应活性的中间态 hm^6A (N^6 -hydroxymethyladenosine), 再利用二硫苏糖醇将 hm^6A 转化为稳定的 dm^6A (N^6 -dithiolisitolmethyladenosine)(图3A)^[87], 然后 dm^6A 通过与甲硫硫代磷酸反应加上生物素(biotin)标记, 利用生物素即可富集含有 m^6A 修饰的RNA片段并用于测序. 另一项技术 m^6A -label-seq利用烯丙基修饰的甲硫氨酸喂养细胞, 将烯丙基加到原本的 m^6A 位点处形成 a^6A (N^6 -allyl adenosine), 再在碘化条件下将 a^6A 转化为 $cyc-A$ (N^1, N^6 -cyclized adenosine)(图3A)^[88]. $cyc-A$ 在反转录过程中会发生碱基错配, 根据突变位点即可鉴定出 m^6A 位点.

与其他RNA修饰不同, Ψ 具有与常规U相同的分子量和碱基互补配对特性, 因此传统的RNA测序方法难以检测该修饰. 幸运的是, 一种化合物CMC(N -cyclohexyl- N' - β -(4-methylmorpholinium) ethylcarbodiimide)可以特异性地标记 Ψ 修饰位点^[51-54,89]. CMC与RNA反应后, 可以在鸟苷(G)的 N^1 位、尿苷(U)的 N^3 位以及 Ψ 的 N^1 和 N^3 位加上CMC; 随后CMC-G和CMC-U加合物在弱碱性(pH 10.4)条件下被水解, 只有 Ψ 的 N^3 位上的CMC被保留^[90]. 在反转录过程中, 反转录酶会停在CMC标记的 Ψ 位点紧挨着的3'核苷酸处, 利用这一特征即可实现单碱基分辨率检测 Ψ 修饰^[89]. 利用这一原

理, Ψ -seq, Pseudo-seq和PSI-seq技术已经被独立开发出来, 并鉴定到人类mRNA中约100~400个 Ψ 位点和酵母mRNA中50~100个 Ψ 位点(图3B)^[51-53]. 为了验证mRNA中的 Ψ 位点, 另一项研究将体外合成的RNA底物文库与假尿苷合酶重组蛋白或细胞提取物一起孵育, 然后通过Pseudo-Seq来检测 Ψ 修饰位点^[91]. 本团队^[92]将CMC标记与高分辨率qPCR偶联还实现了便捷检测特定位点的 Ψ 修饰. 此外, 亚硫酸氢盐(bisulfite)处理可使 Ψ 转变成单亚硫酸氢盐加合物, 该加合物位点在反转录过程中会产生缺失信号. RBS-Seq技术就是利用亚硫酸氢盐处理来检测 Ψ 修饰^[93]. 类似于普通CMC标记, 该方法只鉴定到mRNA上332个 Ψ 位点; 即使对于丰度高的tRNA, RBS-Seq也不能检测到所有已知的 Ψ 位点. 本团队^[94]将去甲基酶处理和CMC标记结合, 开发了DM- Ψ -Seq技术, 该方法可以检测tRNA上全部的 Ψ 修饰.

但是以上这些方法不能富集含有 Ψ 修饰的RNA, 不利于检测丰度较低的RNA转录本或者化学计量较低的 Ψ 位点. 为了进一步改进 Ψ 测序技术, 本团队^[54]设计并合成了CMC衍生物, 叠氮-CMC(N_3 -CMC), 并利用该化合物开发了CeU-Seq技术(图3B). 该技术通过“点击”化学(click chemistry)将生物素连接到 N_3 -CMC- Ψ 加合物上, 利用生物素标记可富集含有 Ψ 修饰的RNA.

图3 化学标记检测RNA修饰. A: m^6A 测序技术; B: Ψ 测序技术; C: m^5C 测序技术

Figure 3 The chemical labeling high-throughput strategies for detecting mRNA modifications. A: m^6A sequencing methods; B: Ψ sequencing methods; C: m^5C sequencing method

CeU-Seq在human mRNA中检测到约2000个 Ψ 修饰位点, 在小鼠mRNA中检测到约1500~1700个位点。事实上, 通过LC-MS/MS实验检测到哺乳动物mRNA中 Ψ /U的比例大约为0.2%~0.6%, 进一步支持了mRNA上含有数以千计的 Ψ 修饰位点^[54]。虽然基于CMC化学标记的 Ψ 测序方法已成功地实现以单碱基分辨率鉴定转录组中的 Ψ 位点, 但是碱处理步骤会导致RNA降解从而损失RNA, 并且现有方法不能准确定量修饰的化学计量。因此, 未来仍需对 Ψ 的测序技术进行进一步改进, 例如, 寻找能够特异性标记 Ψ 的新型化合物。

DNA上的 m^5dC 修饰可通过亚硫酸氢盐处理来检测, 类似地, RNA上的 m^5C 修饰也可以通过改良版的亚硫酸氢盐处理来检测^[95], 该化学标记方法以单碱基分辨率提供了第一个转录组范围的 m^5C 图谱(图3C)^[60]。对于 m^7G 修饰, 也发展了基于化学标记的方法。 m^7G -seq采用还原诱导的脱嘌呤反应, 在 m^7G 处产生脱碱基位点, 从而进一步被biotin标记和富集。在反转录过程中被标记的 m^7G 位点会产生错配, 因此利用该特征可实现 m^7G 甲基化修饰的单碱基分辨率检测^[70]。

2.3 基于内切酶的测序技术

RNA修饰测序技术除了利用抗体富集、特异性化学标记之外, 还可以利用对修饰敏感的内切核糖核酸酶。两个独立的课题组分别报道了不依赖于抗体的 m^6A 测序技术(MAZTER-seq和 m^6A -REF-seq), 利用内切核糖核酸酶来检测 m^6A 修饰(图4)^[96,97]。这两个方法利用对 m^6A 敏感的RNA酶MazF来切割没有甲基化的ACA基序, 但是该酶不会切割 m^6ACA 基序; 将酶消化后的RNA用于测序即可实现 m^6A 的单碱基分辨率检测。MAZTER-seq还被用于追踪酵母细胞减数分裂过程中的 m^6A 修饰水平变化。另外, MAZTER-seq得出的结论认为, m^6A 修饰水平是“硬编码”的, 即mRNA的序列指示 m^6A 的存在和修饰水平。这与大量研究表明的动态的 m^6A 修饰不一致^[6,73,74,79,98]。例如, 针对人类和小鼠组织的 m^6A 甲基化图谱分析发现, 存在大量组织特异的 m^6A 修饰^[99,100]。此外, 由于MazF的序列偏好性, 基于该酶的方法只能检测到部分 m^6A 位点。

3 mRNA修饰的功能

越来越多的证据表明, RNA上的化学修饰在各种

图4 利用对修饰敏感的内切酶的高通量测序技术流程图
Figure 4 The endoribonuclease-based high-throughput strategies for detecting m^6A modification

各样的生理和病理过程中起到了重要的调控作用^[6,7,101]。例如, m^6A 修饰被认为在胚胎干细胞状态转换、胚胎发育、病毒感染、精子发生、性别决定和癌症发展等重要过程中发挥调控作用^[102]。因此, RNA修饰功能的研究可以帮助人们从一个新的层次理解基因表达调控。此处, 本文将主要介绍研究较多的 m^6A 修饰的功能, 并将讨论包括 m^1A , m^6Am , Ψ , m^5C 和 m^7G 在内的mRNA上已经鉴定到其他的化学修饰的功能。

3.1 m^6A 的功能

(1) m^6A 影响mRNA的稳定性。作为mRNA上含量最高的内部修饰, m^6A 在RNA代谢过程中起重要的调控作用。mRNA降解是调节mRNA丰度的重要且快速的过程, 可帮助细胞快速适应多变的环境。YTHDF2是第一个被鉴定到的 m^6A “阅读”蛋白, 它的C端结构域选择性地结合带有 m^6A 修饰的mRNA, N端结构域将结合的mRNA定位到P-bodies(processing bodies)中以促使其被降解^[23]。YTHDF2介导的 m^6A 修饰的mRNA降解在细胞生理和疾病中具有重要作用。例如, 在斑马鱼早期胚胎发育的母本到合子转变过程(maternal-to-zy-

gotic transition, MZT)中, Ythdf2促进 m^6A 标记的母本mRNA的清除^[103]. 在小鼠卵母细胞成熟和合子早期发育过程中, YTHDF2调节母本转录本的剂量, 因此对雌性的生育能力至关重要^[104]. 在成体干细胞维持中, YTHDF2调节小鼠和人类造血干细胞的扩增^[105]. 此外, m^6A 与癌症的发生和发展密切相关^[106]. 在肝癌细胞中, YTHDF2识别 m^6A 修饰的SOCS2 mRNA以促使其降解, 并且YTHDF2缺失会抑制细胞生长和转移^[107]. 除了促进降解外, m^6A 修饰也可增强某些mRNA的稳定性. 在小鼠神经细胞中, “阅读”蛋白Prrc2a识别并结合位于*Olig2*基因CDS区域的 m^6A 修饰, 并稳定*Olig2* mRNA, 从而调节少突神经胶质细胞的发育^[32].

(2) m^6A 调节mRNA的翻译. mRNA翻译是中心法则中的关键步骤, m^6A 修饰也可以影响mRNA的翻译效率. 作为第二个被报道的 m^6A “阅读”蛋白, YTHDF1结合 m^6A 修饰的mRNA, 并通过与翻译起始因子相互作用来促进其翻译^[24]. YTHDF1在神经元功能和肿瘤免疫中发挥重要作用. 在成年小鼠背根神经节中, m^6A 和YTHDF1促进损伤诱导的蛋白翻译^[108]. YTHDF1结合 m^6A 修饰的Robo3.1 mRNA, 并促进其翻译, 从而调节轴突导向^[109]. 在成年小鼠海马中, YTHDF1响应神经元刺激, 促进 m^6A 修饰的转录本的翻译, 从而增强学习和记忆能力^[110,111]. 在树突状细胞中, YTHDF1识别 m^6A 修饰的溶酶体蛋白酶转录本并促进其翻译, 从而抑制肿瘤抗原的交叉呈递^[112]. 除YTHDF1外, FMR1作为一个序列依赖性的“阅读”蛋白, 也能够调节 m^6A 修饰的mRNA的翻译^[30].

“阅读”蛋白并不是独立调节RNA代谢过程, 事实上, 许多“阅读”蛋白可以同时调节mRNA的翻译和降解过程. 除了促进mRNA降解外, YTHDF2还可响应外界刺激. 在热激条件下, YTHDF2重新定位到细胞核并与应激诱导的mRNA 5'UTR的 m^6A 结合, 从而阻止这些转录本被FTO去甲基^[113], 而这些在5'UTR中增加的 m^6A 能够被“阅读”蛋白eIF3结合, 从而促进不依赖于5'帽子的翻译^[29,113]. 另一个“阅读”蛋白YTHDF3可与YTHDF1协同作用促进含有 m^6A 的mRNA的翻译, 并且影响YTHDF2介导的甲基化转录本的降解^[25,26]. 据报道, YTHDF1和YTHDF2有近1/2的mRNA靶点是共享的^[25]. 作为YTH家族的第五个成员, YTHDC2可以通过招募不同的伴侣或效应子来增强翻译和降低mRNA的丰度^[28]. 作为非YTH家族的“阅读”蛋白,

IGF2BPs可以优先结合含有GG(m^6A)C序列的RNA, 并促进其靶mRNA的稳定性和翻译^[31]. 这些复杂的调节作用有助于维持翻译和降解之间的平衡, 从而调控基因的表达.

(3) m^6A 影响RNA的加工和出核. 除了调节细胞质内mRNA的稳定性和翻译外, m^6A 还在核内RNA加工过程中发挥重要作用. 其“书写”蛋白、“擦除”蛋白以及“阅读”蛋白都会对剪接过程产生影响. 对于“书写”蛋白, Mettl3缺失显著影响小鼠胚胎干细胞的可变剪接^[114]. 对于“擦除”蛋白, ALKBH5缺失会改变HeLa细胞的剪接^[10]. FTO倾向结合pre-mRNA的内含子区域, FTO缺失也会导致HEK293T和小鼠3T3-L1细胞中剪接发生改变^[115,116]. 对于“阅读”蛋白, YTHDC1通过招募剪接因子(SRSF3和SRSF10)来调节 m^6A 修饰的mRNA的剪接^[27]. HNRNPC和HNRNPG通过 m^6A -switch来调节靶mRNA的表达以及可变剪接^[33,34]. 并且新生RNA上的 m^6A 修饰可调节RNA剪接的动力学^[117]. 此外, m^6A 也可能影响pre-mRNA的可变聚腺苷酸化(alternative polyadenylation, APA)^[77,78]. pri-miRNA上的 m^6A 还可促进pri-miRNA的加工, 从而调控miRNA的表达水平, 该调节作用是由“阅读”蛋白HNRNPA2B1介导的^[118]. 以上丰富的证据支持了 m^6A 在核内RNA加工中的重要作用.

pre-mRNA在细胞核中加工完成后, 成熟的mRNA会输出到细胞质中. ALKBH5敲低会加速核内mRNA的输出, 该结果暗示 m^6A 可能参与mRNA出核^[10]. 进一步研究发现, “阅读”蛋白YTHDC1可通过促进出核接头蛋白SRSF3和出核受体NXF1的结合来促进含有 m^6A 的mRNA出核^[119].

(4) m^6A 对病毒的影响. 除宿主细胞之外, m^6A 还被发现存在于多种病毒的基因组内, 包括寨卡病毒(Zika virus, ZIKV)、丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)、甲型流感病毒(influenza A virus, IAV)、猿猴病毒40(Simian virus 40, SV40)和艾滋病毒(human immunodeficiency virus type 1, HIV-1)等. 当病毒感染时, m^6A 修饰具有复杂的调节功能. m^6A 负调控ZIKV和HCV的感染^[120,121], 但促进IAV和SV40的基因表达和复制^[122,123]. 在HIV中, m^6A 被报道可以增强HIV-1基因的表达和复制^[124,125]. 同时也有科研人员发现, m^6A 通过减少HIV-1的反转录来抑制病毒的复制^[126,127]. m^6A 对HIV的调控作用未来有待进一步研究. 此外, 宿主细胞mRNA的

m⁶A修饰也对病毒感染有调节作用^[128,129]。虽然m⁶A是调控病毒感染的重要表观转录组修饰,但目前仍不清楚m⁶A如何调节病毒感染,以及为什么m⁶A对不同的病毒具有不同的调节作用。

此外,研究RNA修饰的功能时,应格外注意将修饰酶独立的功能与修饰本身的功能区分开。因为有些“书写”蛋白具有不依赖于RNA修饰的功能。例如,METTL3可与翻译起始装置相互作用来促进翻译,该功能不依赖于其催化活性^[130,131]。类似地,METTL16通过其在MAT2A转录本上的停留时间(而不是m⁶A修饰本身)调节MAT2A的剪接^[22]。

3.2 其他RNA修饰的功能

除m⁶A外,真核生物mRNA上还存在多种发挥功能的化学修饰。

m⁶Am的功能研究目前仍处于起步阶段。2017年有研究报道,在HEK293T细胞中含有m⁶Am的转录本具有增强的稳定性,并且FTO敲低会导致含m⁶Am的mRNA表达水平普遍升高^[40]。该结果暗示,m⁶Am可能会影响mRNA的稳定性;但是该团队并没有把m⁶Am与内部m⁶A修饰的作用区分开,因为有很多mRNA同时具有m⁶Am和m⁶A修饰;并且最近的一些研究结果也不支持m⁶Am对mRNA稳定性的影响。有研究发现,在HEK293T细胞中,FTO缺失不会明显影响仅含m⁶Am修饰的mRNA表达水平^[41]。进一步的研究表明,HEK293T或MEL624细胞中*PCIF1*基因敲除后虽然m⁶Am修饰会减少,但是含m⁶Am的mRNA表达水平没有显著变化^[37,38]。此外,还有研究报道了有争议的观察结果:在*PCIF1*敲除的HEK293T细胞中,如果将表达量较高的一半和表达量较低的一半转录本分别来看时,只有表达较低部分中含m⁶Am的转录本的半衰期显著降低^[39]。另一方面,m⁶Am也可能影响mRNA的翻译^[37,38]。总体而言,m⁶Am在mRNA中的调节功能有待进一步研究。

mRNA上的m¹A修饰调控翻译过程。据报道,在起始密码子周围携带m¹A的基因与较高的翻译水平和蛋白质水平相关,暗示了m¹A对翻译的积极作用^[43]。进一步的研究表明,线粒体mRNA上的m¹A修饰会抑制翻译^[44,45]。考虑到修饰酶TRMT6-TRMT61A,TRMT61B和TRMT10C同时作用于mRNA和tRNA,而tRNA上的m¹A有助于稳定tRNA的结构和帮助tRNA折叠,因此

研究mRNA上的m¹A修饰对翻译的调控作用时应注意区分tRNA上m¹A修饰的作用。

mRNA中的Ψ可能影响mRNA的剪接、稳定性和翻译。首先,在体外转录的pre-mRNA的多嘧啶区(靠近3'剪接位点)用Ψ替代U,会影响非洲爪蟾卵母细胞中的U2辅助因子(U2 auxiliary factor, U2AF)的结合从而抑制pre-mRNA剪接^[132]。其次,在酵母中热休克诱导的依赖于Pus7的Ψ位点可能有助于增强RNA的稳定性^[51]。再次,Ψ可能以复杂的方式影响mRNA的翻译过程。当含Ψ的mRNA在兔网织红细胞裂解物中翻译时,Ψ的存在会刺激翻译;但是在小麦胚芽提取物和细菌细胞裂解物中,Ψ抑制翻译^[133]。当Ψ位于mRNA的不同位置和密码子时,对翻译的作用也不同。一项研究报道发现,在细菌mRNA密码子“UUU”的每个位置分别替换成Ψ会抑制体外翻译,并且在密码子的第三个碱基处的抑制作用最强^[134]。另一项研究发现,用Ψ替代终止密码子中的U可在体内抑制翻译终止并将无义密码子转化为有义密码子^[135,136]。体内天然mRNA中的Ψ位点是否影响mRNA的剪接、稳定性和翻译还有待进一步研究。

m⁵C修饰影响mRNA的出核与稳定性,而m⁷G修饰影响mRNA的翻译过程。ALYREF是一种mRNA的出核适配器,它能够识别m⁵C修饰的mRNA并促进其出核^[62]。YBX1是一种定位于细胞质的m⁵C“阅读”蛋白,通过招募mRNA稳定维持因子ELAVL1来调节其靶点的稳定性^[66]。在人类膀胱尿路上皮癌(urothelial carcinoma of the bladder, UCB)中,YBX1靶向癌基因*HDGF*的3'UTR中的m⁵C位点以稳定其mRNA,从而发挥致癌作用^[66]。在斑马鱼胚胎发生中,Ybx1通过招募Pabpc1a来维持被m⁵C修饰的母体mRNA的稳定性,从而调节母本到合子的转变^[67]。对于m⁷G修饰,两个课题组独立发现,mRNA内m⁷G在翻译中发挥调节作用^[70,71]。考虑到翻译过程也需要METTL1修饰的tRNA上的m⁷G,并且mRNA和tRNA上m⁷G修饰酶是共享的^[137],研究时应注意区分mRNA和tRNA上m⁷G的功能。

4 总结与展望

虽然早在20世纪70年代人们就知道真核生物tRNA和rRNA上存在丰富的化学修饰,但是直到最近10年,mRNA和lncRNA(long non-coding RNA)上的化

学修饰才逐渐得到科学家的重视. 越来越多的证据表明, 表观转录组参与细胞内多种生物学过程, 包括转录、剪接、翻译、RNA的加工、结构、稳定性、定位等, 因此开展表观转录组学的研究有助于更好地理解基因表达的调控. 但是作为一个新兴的领域, 表观转录组学仍处于起步阶段, 人们对RNA修饰的产生、分布、功能和调控机制的认识还不完全.

目前, 除 m^6A 以外, 大多数修饰的测序技术无法量化修饰水平. (i) 在某些转录本中具有高化学计量的修饰更有可能影响RNA的命运. 并且所有现有的RNA修饰测序方法均不能直接应用于单细胞. 已知 m^6A 在胚胎干细胞多能性和胚胎发育过程中具有调节作用, 因此, 开发 m^6A 以及其他修饰的单细胞测序技术有助于揭示RNA修饰在发育和分化过程中对细

胞命运决定的贡献. (ii) m^1A 和 Ψ 的“书写”蛋白目前仍不清楚. 对于 m^1A , 现阶段鉴定到的“书写”蛋白只负责一部分mRNA上的 m^1A 修饰, 其他靶向mRNA的修饰酶有待进一步研究. 对于 Ψ , 将人源细胞的13种假尿苷合酶分别敲低, mRNA上的 Ψ 含量只有轻微下降^[54], 这一结果暗示, 多种假尿苷合酶存在潜在的功能冗余. 此外, m^1A , Ψ 和 m^7G 的“书写”蛋白在mRNA, tRNA和rRNA之间是共享的, 这使得mRNA修饰的功能研究复杂化. (iii) 一些修饰的“阅读”蛋白仍未知, 因此未来“阅读”蛋白的发现将有助于更好地阐明这些表观转录组学修饰的功能和调控机制. (iv) 许多修饰与多种疾病有关, 说明它们在人类健康中的重要性. 然而, 这些关联的病理学尚未被明确阐明, 亟待进一步研究.

参考文献

- 1 He C. Grand challenge commentary: RNA epigenetics? *Nat Chem Biol*, 2010, 6: 863–865
- 2 Topisirovic I, Svitkin Y V, Sonenberg N, et al. Cap and cap-binding proteins in the control of gene expression. *WIREs RNA*, 2011, 2: 277–298
- 3 Zhang X, Virtanen A, Kleiman F E. To polyadenylate or to deadenylate. *Cell Cycle*, 2010, 9: 4437–4449
- 4 Desrosiers R, Friderici K, Rottman F. Identification of methylated nucleosides in messenger RNA from Novikoff hepatoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1974, 71: 3971–3975
- 5 Walkley C R, Li J B. Rewriting the transcriptome: adenosine-to-inosine RNA editing by ADARs. *Genome Biol*, 2017, 18: 205
- 6 Roundtree I A, Evans M E, Pan T, et al. Dynamic RNA modifications in gene expression regulation. *Cell*, 2017, 169: 1187–1200
- 7 Frye M, Jaffrey S R, Pan T, et al. RNA modifications: what have we learned and where are we headed? *Nat Rev Genet*, 2016, 17: 365–372
- 8 Gilbert W V, Bell T A, Schaening C. Messenger RNA modifications: Form, distribution, and function. *Science*, 2016, 352: 1408–1412
- 9 Jia G, Fu Y, Zhao X, et al. N^6 -methyladenosine in nuclear RNA is a major substrate of the obesity-associated FTO. *Nat Chem Biol*, 2011, 7: 885–887
- 10 Zheng G, Dahl J A, Niu Y, et al. ALKBH5 is a mammalian RNA demethylase that impacts RNA metabolism and mouse fertility. *Mol Cell*, 2013, 49: 18–29
- 11 Liu J, Yue Y, Han D, et al. A METTL3-METTL14 complex mediates mammalian nuclear RNA N^6 -adenosine methylation. *Nat Chem Biol*, 2014, 10: 93–95
- 12 Harper J E, Miceli S M, Roberts R J, et al. Sequence specificity of the human mRNA N^6 -adenosine methylase *in vitro*. *Nucl Acids Res*, 1990, 18: 5735–5741
- 13 Bokar J A, Rath-Shambaugh M E, Ludwiczak R, et al. Characterization and partial purification of mRNA N^6 -adenosine methyltransferase from HeLa cell nuclei. Internal mRNA methylation requires a multisubunit complex. *J Biol Chem*, 1994, 269: 17697–17704
- 14 Wang Y, Li Y, Toth J I, et al. N^6 -methyladenosine modification destabilizes developmental regulators in embryonic stem cells. *Nat Cell Biol*, 2014, 16: 191–198
- 15 Schwartz S, Mumbach M R, Jovanovic M, et al. Perturbation of m^6A writers reveals two distinct classes of mRNA methylation at internal and 5' sites. *Cell Rep*, 2014, 8: 284–296
- 16 Ping X L, Sun B F, Wang L, et al. Mammalian WTAP is a regulatory subunit of the RNA N^6 -methyladenosine methyltransferase. *Cell Res*, 2014, 24: 177–189
- 17 Patil D P, Chen C K, Pickering B F, et al. m^6A RNA methylation promotes XIST-mediated transcriptional repression. *Nature*, 2016, 537: 369–373

- 18 Yue Y, Liu J, Cui X, et al. VIRMA mediates preferential m⁶A mRNA methylation in 3'UTR and near stop codon and associates with alternative polyadenylation. *Cell Discov*, 2018, 4: 10
- 19 Wen J, Lv R, Ma H, et al. Zc3h13 regulates nuclear RNA m⁶A methylation and mouse embryonic stem cell self-renewal. *Mol Cell*, 2018, 69: 1028–1038.e6
- 20 Wang X, Feng J, Xue Y, et al. Structural basis of N⁶-adenosine methylation by the METTL3-METTL14 complex. *Nature*, 2016, 534: 575–578
- 21 Wang P, Doxtader K A, Nam Y. Structural basis for cooperative function of Mettl3 and Mettl14 methyltransferases. *Mol Cell*, 2016, 63: 306–317
- 22 Pendleton K E, Chen B, Liu K, et al. The U6 snRNA m⁶A methyltransferase METTL16 regulates SAM synthetase intron retention. *Cell*, 2017, 169: 824–835.e14
- 23 Wang X, Lu Z, Gomez A, et al. N⁶-methyladenosine-dependent regulation of messenger RNA stability. *Nature*, 2014, 505: 117–120
- 24 Wang X, Zhao B S, Roundtree I A, et al. N⁶-methyladenosine modulates messenger RNA translation efficiency. *Cell*, 2015, 161: 1388–1399
- 25 Shi H, Wang X, Lu Z, et al. YTHDF3 facilitates translation and decay of N⁶-methyladenosine-modified RNA. *Cell Res*, 2017, 27: 315–328
- 26 Li A, Chen Y S, Ping X L, et al. Cytoplasmic m⁶A reader YTHDF3 promotes mRNA translation. *Cell Res*, 2017, 27: 444–447
- 27 Xiao W, Adhikari S, Dahal U, et al. Nuclear m⁶A reader YTHDC1 regulates mRNA splicing. *Mol Cell*, 2016, 61: 507–519
- 28 Hsu P J, Zhu Y, Ma H, et al. Ythdc2 is an N⁶-methyladenosine binding protein that regulates mammalian spermatogenesis. *Cell Res*, 2017, 27: 1115–1127
- 29 Meyer K D, Patil D P, Zhou J, et al. 5' UTR m⁶A promotes cap-independent translation. *Cell*, 2015, 163: 999–1010
- 30 Edupuganti R R, Geiger S, Lindeboom R G H, et al. N⁶-methyladenosine (m⁶A) recruits and repels proteins to regulate mRNA homeostasis. *Nat Struct Mol Biol*, 2017, 24: 870–878
- 31 Huang H, Weng H, Sun W, et al. Recognition of RNA N⁶-methyladenosine by IGF2BP proteins enhances mRNA stability and translation. *Nat Cell Biol*, 2018, 20: 285–295
- 32 Wu R, Li A, Sun B, et al. A novel m⁶A reader Prrc2a controls oligodendroglial specification and myelination. *Cell Res*, 2019, 29: 23–41
- 33 Liu N, Dai Q, Zheng G, et al. N⁶-methyladenosine-dependent RNA structural switches regulate RNA-protein interactions. *Nature*, 2015, 518: 560–564
- 34 Liu N, Zhou K I, Parisien M, et al. N⁶-methyladenosine alters RNA structure to regulate binding of a low-complexity protein. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45: 6051–6063
- 35 Wu B, Su S, Patil D P, et al. Molecular basis for the specific and multivalent recognitions of RNA substrates by human hnRNP A2/B1. *Nat Commun*, 2018, 9: 420
- 36 Sun H, Zhang M, Li K, et al. Cap-specific, terminal N⁶-methylation by a mammalian m⁶Am methyltransferase. *Cell Res*, 2019, 29: 80–82
- 37 Akichika S, Hirano S, Shichino Y, et al. Cap-specific terminal N⁶-methylation of RNA by an RNA polymerase II-associated methyltransferase. *Science*, 2019, 363: eaav0080
- 38 Sendinc E, Valle-Garcia D, Dhall A, et al. PCIF1 catalyzes m⁶Am mRNA methylation to regulate gene expression. *Mol Cell*, 2019, 75: 620–630.e9
- 39 Boulias K, Toczydłowska-Socha D, Hawley B R, et al. Identification of the m⁶Am methyltransferase PCIF1 reveals the location and functions of m⁶Am in the transcriptome. *Mol Cell*, 2019, 75: 631–643.e8
- 40 Mauer J, Luo X, Blanjoie A, et al. Reversible methylation of m⁶Am in the 5' cap controls mRNA stability. *Nature*, 2017, 541: 371–375
- 41 Wei J, Liu F, Lu Z, et al. Differential m⁶A, m⁶Am, and m¹A demethylation mediated by FTO in the cell nucleus and cytoplasm. *Mol Cell*, 2018, 71: 973–985.e5
- 42 Li X, Xiong X, Wang K, et al. Transcriptome-wide mapping reveals reversible and dynamic N¹-methyladenosine methylome. *Nat Chem Biol*, 2016, 12: 311–316
- 43 Dominissini D, Nachtergaele S, Moshitch-Moshkovitz S, et al. The dynamic N¹-methyladenosine methylome in eukaryotic messenger RNA. *Nature*, 2016, 530: 441–446
- 44 Li X, Xiong X, Zhang M, et al. Base-resolution mapping reveals distinct m¹A methylome in nuclear- and mitochondrial-encoded transcripts. *Mol Cell*, 2017, 68: 993–1005.e9
- 45 Safra M, Sas-Chen A, Nir R, et al. The m¹A landscape on cytosolic and mitochondrial mRNA at single-base resolution. *Nature*, 2017, 551: 251–255

- 46 Xu L, Liu X, Sheng N, et al. Three distinct 3-methylcytidine (m^3C) methyltransferases modify tRNA and mRNA in mice and humans. *J Biol Chem*, 2017, 292: 14695–14703
- 47 Ueda Y, Ooshio I, Fusamae Y, et al. AlkB homolog 3-mediated tRNA demethylation promotes protein synthesis in cancer cells. *Sci Rep*, 2017, 7: 42271
- 48 Liu F, Clark W, Luo G, et al. ALKBH1-mediated tRNA demethylation regulates translation. *Cell*, 2016, 167: 816–828.e16
- 49 Cohn, W. E. Some results of the applications of ion-exchange chromatography to nucleic acid chemistry. *J Cell Physiol*, 1951, Supplement 38: 21–40
- 50 Cohn W E, Volkin E. Nucleoside-5'-phosphates from ribonucleic acid. *Nature*, 1951, 167: 483–484
- 51 Schwartz S, Bernstein D A, Mumbach M R, et al. Transcriptome-wide mapping reveals widespread dynamic-regulated pseudouridylation of ncRNA and mRNA. *Cell*, 2014, 159: 148–162
- 52 Carlile T M, Rojas-Duran M F, Zinshteyn B, et al. Pseudouridine profiling reveals regulated mRNA pseudouridylation in yeast and human cells. *Nature*, 2014, 515: 143–146
- 53 Lovejoy A F, Riordan D P, Brown P O. Transcriptome-wide mapping of pseudouridines: pseudouridine synthases modify specific mRNAs in *S. cerevisiae*. *PLoS ONE*, 2014, 9: e110799
- 54 Li X, Zhu P, Ma S, et al. Chemical pulldown reveals dynamic pseudouridylation of the mammalian transcriptome. *Nat Chem Biol*, 2015, 11: 592–597
- 55 Karijovich J, Yi C, Yu Y T. Transcriptome-wide dynamics of RNA pseudouridylation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2015, 16: 581–585
- 56 Hamma T, Ferré-D'Amaré A R. Pseudouridine synthases. *Chem Biol*, 2006, 13: 1125–1135
- 57 Kaya Y, Ofengand J. A novel unanticipated type of pseudouridine synthase with homologs in bacteria, archaea, and eukarya. *RNA*, 2003, 9: 711–721
- 58 Spenkuch F, Motorin Y, Helm M. Pseudouridine: still mysterious, but never a fake (uridine)! *RNA Biol*, 2014, 11: 1540–1554
- 59 Dubin D T, Taylor R H. The methylation state of poly A-containing-messenger RNA from cultured hamster cells. *Nucl Acids Res*, 1975, 2: 1653–1668
- 60 Squires J E, Patel H R, Nousch M, et al. Widespread occurrence of 5-methylcytosine in human coding and non-coding RNA. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40: 5023–5033
- 61 Hussain S, Sajini A 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: 255–261
- 62 Yang X, Yang Y, Sun B F, et al. 5-Methylcytosine promotes mRNA export—NSUN2 as the methyltransferase and ALYREF as an m^5C reader. *Cell Res*, 2017, 27: 606–625
- 63 Fu L, Guerrero C R, Zhong N, et al. Tet-mediated formation of 5-hydroxymethylcytosine in RNA. *J Am Chem Soc*, 2014, 136: 11582–11585
- 64 Shen Q, Zhang Q, Shi Y, et al. Tet2 promotes pathogen infection-induced myelopoiesis through mRNA oxidation. *Nature*, 2018, 554: 123–127
- 65 Delatte B, Wang F, Ngoc L V, et al. Transcriptome-wide distribution and function of RNA hydroxymethylcytosine. *Science*, 2016, 351: 282–285
- 66 Chen X, Li A, Sun B F, et al. 5-Methylcytosine promotes pathogenesis of bladder cancer through stabilizing mRNAs. *Nat Cell Biol*, 2019, 21: 978–990
- 67 Yang Y, Wang L, Han X, et al. RNA 5-methylcytosine facilitates the maternal-to-zygotic transition by preventing maternal mRNA decay. *Mol Cell*, 2019, 75: 1188–1202.e11
- 68 Huber S M, van Delft P, Mendil L, et al. Formation and abundance of 5-hydroxymethylcytosine in RNA. *Chembiochem*, 2015, 16: 752–755
- 69 Chu J M, Ye T T, Ma C J, et al. Existence of internal N^7 -methylguanosine modification in mRNA determined by differential enzyme treatment coupled with mass spectrometry analysis. *ACS Chem Biol*, 2018, 13: 3243–3250
- 70 Zhang L S, Liu C, Ma H, et al. Transcriptome-wide mapping of internal N^7 -methylguanosine methylome in mammalian mRNA. *Mol Cell*, 2019, 74: 1304–1316.e8
- 71 Malbec L, Zhang T, Chen Y S, et al. Dynamic methylome of internal mRNA N^7 -methylguanosine and its regulatory role in translation. *Cell Res*, 2019, 29: 927–941
- 72 Li X, Xiong X, Yi C. Epitranscriptome sequencing technologies: decoding RNA modifications. *Nat Methods*, 2017, 14: 23–31
- 73 Dominissini D, Moshitch-Moshkovitz S, Schwartz S, et al. Topology of the human and mouse m^6A RNA methylomes revealed by m^6A -seq. *Nature*, 2012, 485: 201–206

- 74 Meyer K D, Saletore Y, Zumbo P, et al. Comprehensive analysis of mRNA methylation reveals enrichment in 3' UTRs and near stop codons. *Cell*, 2012, 149: 1635–1646
- 75 Chen K, Lu Z, Wang X, et al. High-resolution N^6 -methyladenosine (m^6A) map using photo-crosslinking-assisted m^6A sequencing. *Angew Chem Int Ed*, 2015, 54: 1587–1590
- 76 Linder B, Grozhik A V, Olarerin-George A O, et al. Single-nucleotide-resolution mapping of m^6A and m^6Am throughout the transcriptome. *Nat Methods*, 2015, 12: 767–772
- 77 Ke S, Alemu E A, Mertens C, et al. A majority of m^6A residues are in the last exons, allowing the potential for 3' UTR regulation. *Genes Dev*, 2015, 29: 2037–2053
- 78 Molinie B, Wang J, Lim K S, et al. m^6A -LAIC-seq reveals the census and complexity of the m^6A epitranscriptome. *Nat Methods*, 2016, 13: 692–698
- 79 Schwartz S, Agarwala S D, Mumbach M R, et al. High-resolution mapping reveals a conserved, widespread, dynamic mRNA methylation program in yeast meiosis. *Cell*, 2013, 155: 1409–1421
- 80 Hauenschild R, Tserovski L, Schmid K, et al. The reverse transcription signature of N^1 -methyladenosine in RNA-Seq is sequence dependent. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43: 9950–9964
- 81 Xiong X, Li X, Wang K, et al. Perspectives on topology of the human m^1A methylome at single nucleotide resolution. *RNA*, 2018, 24: 1437–1442
- 82 Zhou H, Rauch S, Dai Q, et al. Evolution of a reverse transcriptase to map N^1 -methyladenosine in human messenger RNA. *Nat Methods*, 2019, 16: 1281–1288
- 83 Edelheit S, Schwartz S, Mumbach M R, et al. Transcriptome-wide mapping of 5-methylcytosine RNA modifications in bacteria, archaea, and yeast reveals m^5C within archaeal mRNAs. *PLoS Genet*, 2013, 9: e1003602
- 84 Cui X, Liang Z, Shen L, et al. 5-Methylcytosine RNA methylation in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant*, 2017, 10: 1387–1399
- 85 Meyer K D. DART-seq: an antibody-free method for global m^6A detection. *Nat Methods*, 2019, 16: 1275–1280
- 86 Khoddami V, Cairns B R. Identification of direct targets and modified bases of RNA cytosine methyltransferases. *Nat Biotechnol*, 2013, 31: 458–464
- 87 Wang Y, Xiao Y, Dong S, et al. Antibody-free enzyme-assisted chemical approach for detection of N^6 -methyladenosine. *Nat Chem Biol*, 2020, 16: 896–903
- 88 Shu X, Cao J, Cheng M, et al. A metabolic labeling method detects m^6A transcriptome-wide at single base resolution. *Nat Chem Biol*, 2020, 16: 887–895
- 89 Gilham P T. An addition reaction specific for uridine and guanosine nucleotides and its application to the modification of ribonuclease action. *J Am Chem Soc*, 1962, 84: 687–688
- 90 Bakin A, Ofengand J. Four newly located pseudouridylate residues in *Escherichia coli* 23S ribosomal RNA are all at the peptidyltransferase center: analysis by the application of a new sequencing technique. *Biochemistry*, 1993, 32: 9754–9762
- 91 Carlile T M, Martinez N M, Schaening C, et al. mRNA structure determines modification by pseudouridine synthase 1. *Nat Chem Biol*, 2019, 15: 966–974
- 92 Lei Z, Yi C. A radiolabeling-free, qPCR-based method for locus-specific pseudouridine detection. *Angew Chem Int Ed*, 2017, 56: 14878–14882
- 93 Khoddami V, Yerra A, Mosbrugger T L, et al. Transcriptome-wide profiling of multiple RNA modifications simultaneously at single-base resolution. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, 116: 6784–6789
- 94 Song J, Zhuang Y, Zhu C, et al. Differential roles of human PUS10 in miRNA processing and tRNA pseudouridylation. *Nat Chem Biol*, 2020, 16: 160–169
- 95 Schaefer M, Pollex T, Hanna K, et al. RNA cytosine methylation analysis by bisulfite sequencing. *Nucleic Acids Res*, 2008, 37: e12
- 96 Garcia-Campos M A, Edelheit S, Toth U, et al. Deciphering the “ m^6A code” via antibody-independent quantitative profiling. *Cell*, 2019, 178: 731–747.e16
- 97 Zhang Z, Chen L Q, Zhao Y L, et al. Single-base mapping of m^6A by an antibody-independent method. *Sci Adv*, 2019, 5: eaax0250
- 98 Cao G, Li H B, Yin Z, et al. Recent advances in dynamic m^6A RNA modification. *Open Biol*, 2016, 6: 160003
- 99 Xiao S, Cao S, Huang Q, et al. The RNA N^6 -methyladenosine modification landscape of human fetal tissues. *Nat Cell Biol*, 2019, 21: 651–661
- 100 Liu J, Li K, Cai J, et al. Landscape and regulation of m^6A and m^6Am methylome across human and mouse tissues. *Mol Cell*, 2020, 77: 426–440.e6

- 101 Song J, Yi C. Chemical modifications to RNA: A new layer of gene expression regulation. *ACS Chem Biol*, 2017, 12: 316–325
- 102 Duan H C, Wang Y, Jia G. Dynamic and reversible RNA N^6 -methyladenosine methylation. *WIREs RNA*, 2019, 10: e1507
- 103 Zhao B S, Wang X, Beadell A V, et al. m^6A -dependent maternal mRNA clearance facilitates zebrafish maternal-to-zygotic transition. *Nature*, 2017, 542: 475–478
- 104 Ivanova I, Much C, Di Giacomo M, et al. The RNA m^6A reader YTHDF2 is essential for the post-transcriptional regulation of the maternal transcriptome and oocyte competence. *Mol Cell*, 2017, 67: 1059–1067.e4
- 105 Li Z, Qian P, Shao W, et al. Suppression of m^6A reader Ythdf2 promotes hematopoietic stem cell expansion. *Cell Res*, 2018, 28: 904–917
- 106 Sun T, Wu R, Ming L. The role of m^6A RNA methylation in cancer. *Biomed Pharmacother*, 2019, 112: 108613
- 107 Chen M, Wei L, Law C T, et al. RNA N^6 -methyladenosine methyltransferase-like 3 promotes liver cancer progression through YTHDF2-dependent posttranscriptional silencing of SOCS2. *Hepatology*, 2018, 67: 2254–2270
- 108 Weng Y L, Wang X, An R, et al. Epitranscriptomic m^6A regulation of axon regeneration in the adult mammalian nervous system. *Neuron*, 2018, 97: 313–325.e6
- 109 Zhuang M, Li X, Zhu J, et al. The m^6A reader YTHDF1 regulates axon guidance through translational control of Robo3.1 expression. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47: 4765–4777
- 110 Shi H, Zhang X, Weng Y L, et al. m^6A facilitates hippocampus-dependent learning and memory through YTHDF1. *Nature*, 2018, 563: 249–253
- 111 Zhang Z, Wang M, Xie D, et al. METTL3-mediated N^6 -methyladenosine mRNA modification enhances long-term memory consolidation. *Cell Res*, 2018, 28: 1050–1061
- 112 Han D, Liu J, Chen C, et al. Anti-tumour immunity controlled through mRNA m^6A methylation and YTHDF1 in dendritic cells. *Nature*, 2019, 566: 270–274
- 113 Zhou J, Wan J, Gao X, et al. Dynamic m^6A mRNA methylation directs translational control of heat shock response. *Nature*, 2015, 526: 591–594
- 114 Geula S, Moshitch-Moshkovitz S, Dominissini D, et al. m^6A mRNA methylation facilitates resolution of naïve pluripotency toward differentiation. *Science*, 2015, 347: 1002–1006
- 115 Zhao X, Yang Y, Sun B F, et al. FTO-dependent demethylation of N^6 -methyladenosine regulates mRNA splicing and is required for adipogenesis. *Cell Res*, 2014, 24: 1403–1419
- 116 Bartosovic M, Molares H C, Gregorova P, et al. N^6 -methyladenosine demethylase FTO targets pre-mRNAs and regulates alternative splicing and 3'-end processing. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45: 11356–11370
- 117 Louloui A, Ntini E, Conrad T, et al. Transient N^6 -methyladenosine transcriptome sequencing reveals a regulatory role of m^6A in splicing efficiency. *Cell Rep*, 2018, 23: 3429–3437
- 118 Alarcón C R, Goodarzi H, Lee H, et al. HNRNPA2B1 is a mediator of m^6A -dependent nuclear RNA processing events. *Cell*, 2015, 162: 1299–1308
- 119 Roundtree I A, Luo G Z, Zhang Z, et al. YTHDC1 mediates nuclear export of N^6 -methyladenosine methylated mRNAs. *eLife*, 2017, 6: e31311
- 120 Lichinchi G, Zhao B S, Wu Y, et al. Dynamics of human and viral RNA methylation during Zika virus infection. *Cell Host Microbe*, 2016, 20: 666–673
- 121 Gokhale N S, McIntyre A B R, McFadden M J, et al. N^6 -methyladenosine in flaviviridae viral RNA genomes regulates infection. *Cell Host Microbe*, 2016, 20: 654–665
- 122 Tsai K, Courtney D G, Cullen B R. Addition of m^6A to SV40 late mRNAs enhances viral structural gene expression and replication. *PLoS Pathog*, 2018, 14: e1006919
- 123 Courtney D G, Kennedy E M, Dumm R E, et al. Epitranscriptomic enhancement of influenza A virus gene expression and replication. *Cell Host Microbe*, 2017, 22: 377–386.e5
- 124 Kennedy E M, Bogerd H P, Kornepati A V R, et al. Posttranscriptional m^6A editing of HIV-1 mRNAs enhances viral gene expression. *Cell Host Microbe*, 2016, 19: 675–685
- 125 Lichinchi G, Gao S, Saletore Y, et al. Dynamics of the human and viral m^6A RNA methylomes during HIV-1 infection of T cells. *Nat Microbiol*, 2016, 1: 16011
- 126 Tirumuru N, Zhao B S, Lu W, et al. N^6 -methyladenosine of HIV-1 RNA regulates viral infection and HIV-1 Gag protein expression. *eLife*, 2016, 5: e15528
- 127 Lu W, Tirumuru N, St. Gelais C, et al. N^6 -methyladenosine-binding proteins suppress HIV-1 infectivity and viral production. *J Biol Chem*, 2018,

- 293: 12992–13005
- 128 Liu Y, You Y, Lu Z, et al. *N*⁶-methyladenosine RNA modification-mediated cellular metabolism rewiring inhibits viral replication. *Science*, 2019, 365: 1171–1176
- 129 Wang L, Wen M, Cao X. Nuclear hnRNP A2B1 initiates and amplifies the innate immune response to DNA viruses. *Science*, 2019, 365: eaav0758
- 130 Lin S, Choe J, Du P, et al. The m⁶A methyltransferase METTL3 promotes translation in human cancer cells. *Mol Cell*, 2016, 62: 335–345
- 131 Choe J, Lin S, Zhang W, et al. mRNA circularization by METTL3-eIF3h enhances translation and promotes oncogenesis. *Nature*, 2018, 561: 556–560
- 132 Chen C, Zhao X, Kierzek R, et al. A flexible RNA backbone within the polypyrimidine tract is required for U2AF65 binding and pre-mRNA splicing *in vivo*. *Mol Cell Biol*, 2010, 30: 4108–4119
- 133 Karikó K, Muramatsu H, Welsh F A, et al. Incorporation of pseudouridine into mRNA yields superior nonimmunogenic vector with increased translational capacity and biological stability. *Mol Ther*, 2008, 16: 1833–1840
- 134 Hoernes T P, Clementi N, Faserl K, et al. Nucleotide modifications within bacterial messenger RNAs regulate their translation and are able to rewire the genetic code. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44: 852–862
- 135 Karijolich J, Yu Y T. Converting nonsense codons into sense codons by targeted pseudouridylation. *Nature*, 2011, 474: 395–398
- 136 Fernández I S, Ng C L, Kelley A C, et al. Unusual base pairing during the decoding of a stop codon by the ribosome. *Nature*, 2013, 500: 107–110
- 137 Lin S, Liu Q, Lelyveld V S, et al. Mettl1/Wdr4-mediated m⁷G tRNA methylome is required for normal mRNA translation and embryonic stem cell self-renewal and differentiation. *Mol Cell*, 2018, 71: 244–255.e5

Chemical modifications in eukaryotic mRNA regulate gene expression

SONG JingHui, PENG JinYing & YI ChengQi

State Key Laboratory of Protein and Plant Gene Research, School of Life Sciences, Peking University, Beijing 100871, China

Since the discovery of the first RNA modification in 1951, more than 160 chemical modifications have been identified in cellular RNA. Previously, most studies of RNA modifications have focused on abundant transfer RNA (tRNA), ribosomal RNA (rRNA), and small nuclear RNA (snRNA). In recent years, with the development of sequencing methods, dynamic modifications have also been identified in mRNA, which leads to the birth and development of “epitranscriptomics” field. In this review, we focus on chemical modifications to internal mRNA, such as *N*⁶-methyladenosine (m⁶A), *N*⁶,2'-O-dimethyladenosine (m⁶Am), *N*¹-methyladenosine (m¹A), pseudouridine (Ψ), 5-methylcytosine (m⁵C), and *N*⁷-methylguanosine (m⁷G). We provide an overview of their modification enzymes, high-throughput detection methods and biological functions, and discuss the current challenges and opportunities in the investigation of mRNA modifications.

RNA modification, epitranscriptomic, *N*⁶-methyladenosine, *N*⁶,2'-O-dimethyladenosine, *N*¹-methyladenosine, pseudouridine

doi: 10.1360/SSV-2020-0159

伊成器, 北京大学生命科学学院教授, 北京大学博雅特聘教授, 博士生导师, 蛋白质与植物基因工程国家重点实验室副主任. 2010年于美国芝加哥大学化学系获得博士学位. 2012年以“青年千人计划”(第二批)入选者的身份引进北京大学. 2015年获得国家自然科学基金“优秀青年科学基金项目”. 2016年获得中国化学会青年化学家奖、北京市青年岗位能手、“第十届药康明德生命化学研究奖”等荣誉称号. 2018年获得“国家杰出青年科学基金”资助. 2019年获第四批国家“万人计划”科技创新领军人才称号. 伊成器教授通过化学生物学新技术新方法的发展, 致力于核酸化学修饰调控重要生命过程的机制研究, 在表观遗传学领域获得一系列突破性进展. 课题组成立以来, 已在高水平学术期刊上发表论文三十余篇.