



RNA m⁵C修饰调控病毒复制的研究进展

张婷¹, 王紫凌^{1,2}, 郑永唐^{1,2*}

1. 中国科学院昆明动物研究所, 中国科学院动物模型与人类疾病机理重点实验室, 昆明 650223;

2. 中国科学技术大学生命科学学院, 合肥 230026

* 联系人, E-mail: zhengyt@mail.kiz.ac.cn

2022-04-21 收稿, 2022-07-01 修回, 2022-07-04 接受, 2022-07-05 网络版发表

国家自然科学基金(82151214)和国家重点研发计划(2021YFC2301303)资助

摘要 5-甲基胞嘧啶(5-methylcytosine, m⁵C)作为一类重要的转录后修饰形式, 在真核生物信使RNA(messenger RNA, mRNA)、转运RNA(transfer RNA, tRNA)和核糖体RNA(ribosomal RNA, rRNA)上普遍存在, 并且参与调控RNA出核、翻译和稳定性维持等代谢加工过程. 该修饰是动态可逆的, 由甲基转移酶(methyltransferases)催化生成, 并由去甲基化酶(demethylases)移除, 通过招募特定的识别蛋白(reader proteins, readers)参与调控胚胎发育、肿瘤发展和干细胞分化等生理及病理过程. 近期研究表明, 除真核生物RNA外, 病毒RNA上同样富含m⁵C修饰, 并且在转录、剪切和翻译等复制阶段扮演重要角色. 此外, 病毒感染可诱发宿主RNA的m⁵C修饰改变, 从而影响宿主对病毒感染的应答反应. 随着RNA m⁵C修饰测序技术的快速发展, 病毒m⁵C修饰的相关报道大量涌现, 然而m⁵C修饰在病毒感染中的具体调控机制至今尚未完全阐明. 本文综述了近年来RNA m⁵C修饰在逆转录病毒(retrovirus)、DNA病毒(DNA virus)、黄病毒(flavivirus)和冠状病毒(coronavirus)复制, 以及宿主抗病毒免疫应答中的调控作用和分子机制, 旨在为病毒表观遗传学研究提供参考.

关键词 5-甲基胞嘧啶, 甲基转移酶, 去甲基化酶, 识别蛋白, 病毒复制, 宿主抗病毒免疫反应

目前, 已有170种RNA修饰类型被成功鉴定, 其中甲基化修饰约占RNA修饰总量的三分之二^[1]. m⁵C是胞嘧啶(cytosine, C)第5位碳原子上的甲基化修饰形式, 在真核生物mRNA、tRNA、rRNA、穹窿体RNA(vault RNA, vtRNA)、长非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA)以及增强子RNA(enhancer RNA, eRNA)中普遍存在, 并占真核生物mRNA所有C的0.05%^[2,3]. 作为真核生物mRNA上重要的甲基化修饰类型之一, m⁵C修饰倾向于在GC二碱基富集区域出现, 如编码区(coding sequence, CDS)的翻译起始密码子周围^[4]. 该修饰是动态可逆的, 其形成和去除由甲基转移酶和去甲基化酶协同调控, 并通过招募特定的识别蛋白影响mRNA的出核、翻译和稳定性维持等^[3,5]. 此外, tRNA和rRNA上

的m⁵C修饰位点高度保守^[5-7]. tRNA上的m⁵C修饰主要分布于可变区和反密码子环, 从而维持tRNA二级结构的稳定性和促进密码子识别. rRNA上的m⁵C修饰通常具有100%甲基化的特征, 并且参与维持rRNA折叠和促进蛋白质翻译. m⁵C修饰的动态性改变在众多生理及病理过程中扮演重要角色, 如相变、癌症转移、水稻耐高温、斑马鱼胚胎发育和果蝇生殖干细胞分化等^[5,8].

病毒作为宿主细胞的“寄生虫”, 通过抢夺宿主细胞的营养物质以合成自身的DNA、RNA及蛋白质, 严重威胁了人类的生命健康^[9]. 除真核生物RNA外, 病毒RNA上同样富含多种修饰类型^[10-13], 其中包括m⁵C、N⁶-甲基腺嘌呤(N⁶-methyadenosine, m⁶A)、N⁷-甲基鸟

引用格式: 张婷, 王紫凌, 郑永唐. RNA m⁵C修饰调控病毒复制的研究进展. 科学通报, 2022, 67: 3654–3666

Zhang T, Wang Z L, Zheng Y K. Research advances in the role of RNA m⁵C in viral replication (in Chinese). Chin Sci Bull, 2022, 67: 3654–3666, doi: 10.1360/TB-2022-0461

嘌呤(N^7 -methylguanosine, m^7G)和2-O-甲基化(2'-O-methylation, Nm)、 N^6,N^6 -2-甲基腺嘌呤(N^6,N^6 -dimethyladenosine, $m^{6,6}A$)、1-甲基腺嘌呤(N^1 -methyladenosine, m^1A)、假尿嘧啶(pseudouridine, ψ)和 N^4 -乙酰胞嘧啶(N^4 -acetylcytidine, ac^4C)等。因此,从RNA修饰角度探索病毒复制的精细调控机制,对抗病毒药物研发具有重要意义。由于众多RNA修饰类型中, m^6A 、 m^7G 和Nm在病毒RNA上最为常见,因此在病毒表观遗传学研究中备受关注。其中, m^6A 修饰^[14-17]和 m^7G 修饰^[18,19]已被证实具有维持病毒RNA稳定性、促进病毒蛋白质翻译及子代病毒产量的生物学功能;Nm修饰^[20]能够保护病毒RNA免受宿主天然免疫信号通路的影响,从而促进病毒复制。

人们最早在辛德比斯病毒(Sindbis virus)^[21,22]和腺病毒(adenovirus)^[23]RNA上检测到 m^5C 修饰,但由于当时技术局限,无法深入解析其生物学功能。近年,随着酶学技术和高通量测序技术的快速发展,部分逆转录病毒^[24-28]、DNA病毒^[29]、黄病毒^[13]和冠状病毒^[30,31]的RNA m^5C 修饰图谱已被成功绘制。研究发现,病毒可以招募宿主甲基转移酶催化自身RNA的 m^5C 修饰生成,并且利用宿主识别蛋白调控病毒复制周期^[32]。进一步分析发现,逆转录病毒RNA的 m^5C 修饰水平显著高于宿主mRNA^[25,28],提示该修饰可作为宿主细胞区分“自我”和“非我”物质的重要依据,特异性调控病毒RNA命运决定。此外,病毒感染可引起宿主RNA m^5C 修饰的动态性变化,以抑制天然免疫信号通路活化,从而促进子代病毒产生^[33,34]。然而,与 m^6A 、 m^7G 和Nm相比, m^5C 修饰在病毒感染中的具体调控机制至今尚未完全阐明,是亟待解决的重要科学问题。因此,本文总结了近年来RNA m^5C 修饰相关蛋白、高通量测序技术及其在病毒复制和宿主抗病毒免疫应答调控的最新发现,旨在为病毒相关领域的表观遗传学研究提供参考。

1 RNA m^5C 修饰调节机制

作为一类重要的RNA甲基化修饰形式, m^5C 在生物体内是动态可逆的,其形成、去除及功能行使分别依赖于甲基转移酶、去甲基化酶和识别蛋白共同参与,如图1所示。

1.1 甲基转移酶

甲基转移酶以S-腺苷甲硫氨酸(S-adenosyl-L-methionin, SAM)为供体,将甲基转移至C第5位碳原子

上形成 m^5C 修饰^[3]。目前鉴定到的 m^5C 修饰甲基转移酶包括DNMT2和NSUN蛋白家族等^[3,35],其中NSUN蛋白家族具有9个成员,分别为NSUN1-4、NSUN5a/b/c和NSUN6-7^[3]。研究表明,上述 m^5C 修饰甲基转移酶在真核细胞的亚细胞定位及底物RNA各不相同(图1)。DNMT2是早期被鉴定的RNA m^5C 修饰甲基转移酶,具有催化tRNA^{Asp}、tRNA^{Val}和tRNA^{Gly}第38位C形成 m^5C 修饰的功能^[36-38]。NSUN1能够直接结合酵母60-80S核糖体前体颗粒,并且具有催化人类28S rRNA第4447位C、酵母25S rRNA第2870位C形成 m^5C 修饰的功能^[39]。NSUN2作为核心的 m^5C 修饰甲基转移酶,在细胞质和细胞核内均有分布,并且依赖第271和321位半胱氨酸(C271/C321)参与催化真核生物mRNA、tRNA(C47/C48/C49/C50)和vtRNA的 m^5C 修饰生成^[4,40,41]。NSUN3是线粒体tRNA的 m^5C 修饰甲基转移酶,其缺失将阻断mt-tRNA^{Met}甲基化修饰形成,从而影响线粒体的翻译和呼吸过程^[42]。根据蛋白三维空间结构和同源性建模分析,NSUN4被鉴定为rRNA的 m^5C 修饰甲基转移酶,参与催化人线粒体12S rRNA m^5C_{911} 的生成^[43]。NSUN5是另一个rRNA的 m^5C 修饰甲基转移酶,具有催化人类和小鼠的28S rRNA m^5C_{3782} 与 m^5C_{3438} 形成的能力^[44,45]。NSUN6定位于高尔基体和细胞质基质,能利用自身的半胱氨酸C373参与调控tRNA^{Cys}、tRNA^{Thr}和mRNA的 m^5C 修饰形成^[46,47]。NSUN7是eRNA的 m^5C 修饰甲基转移酶,但其调控机制尚不清晰^[48]。此外,DNMT2、NSUN1、NSUN2和NSUN5已被报道参与催化病毒RNA的 m^5C 修饰生成,提示病毒和宿主共用一套修饰调控体系。因此,从RNA m^5C 修饰度解析病毒复制的精细调控机制,对抗病毒药物研发具有重要意义。

1.2 去甲基化酶

目前,鉴定到的 m^5C 修饰去甲基化酶包括TET蛋白家族(TET1-3)^[49]和ALKBH1^[50,51]。TETs属于 α -酮戊二酸(α -ketoglutaric acid, α -KG)和Fe²⁺依赖的双加氧酶,具有催化 m^5C 修饰去甲基化生成5-羟甲基胞嘧啶(5-hydroxymethylcytidine, hm^{5C})的生物学功能。与TETs不同,ALKBH1催化 m^5C 修饰去甲基化需经历两个中间步骤:首先催化 m^5C 修饰生成中间产物hm^{5C},随后将hm^{5C}进一步氧化生成5-胞嘧啶甲酰(5-formylcytosine, f^{5C})。研究表明,ALKBH1主要参与调控tRNA的去甲基化过程,其中包括mt-tRNA^{Leu}和mt-tRNA^{Met}。

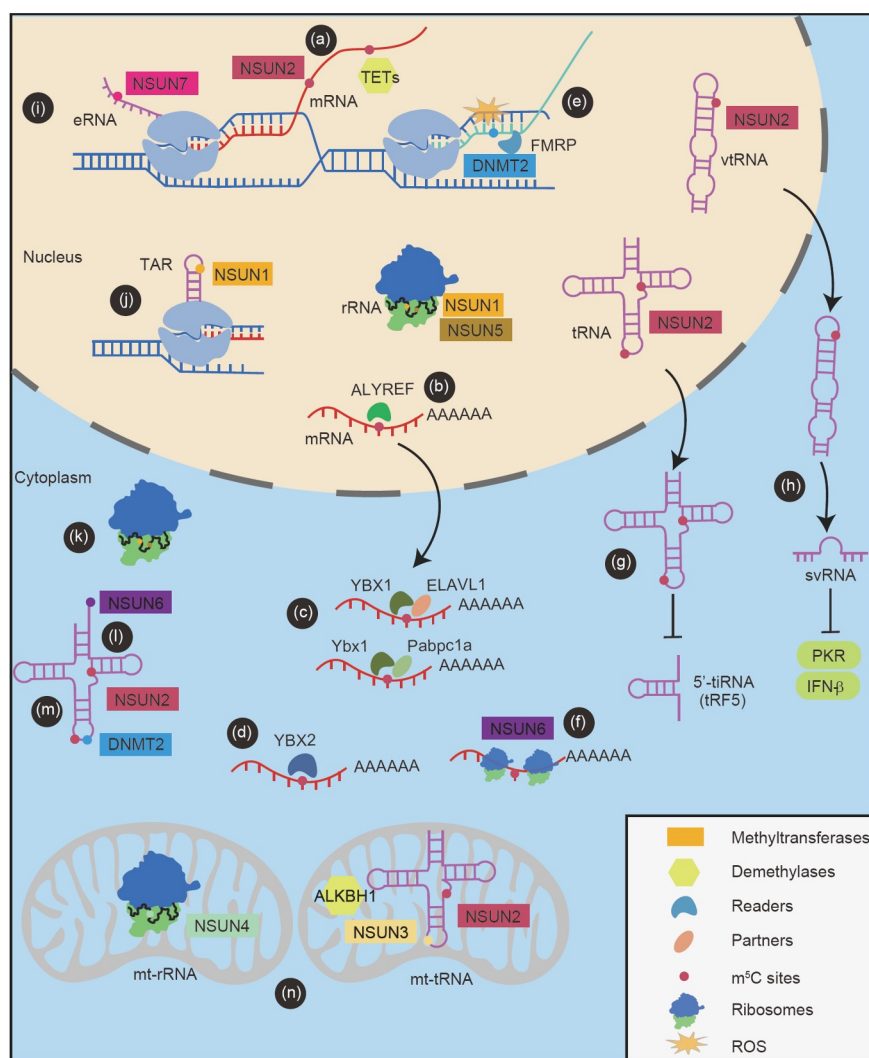


图1 RNA m^5C 修饰调节机制。(a)~(d) NOP2/Sum家族的RNA m^5C 甲基化酶2(nop2/sun RNA methyltransferase 2, NSUN2)和去甲基化酶(ten-eleven translocation, TETs)介导mRNA的 m^5C 修饰生成和去除。识别蛋白Aly/REF输出因子(aly/ref export factor, ALYREF)和Y盒结合蛋白(y-box binding proteins, YBXs)靶向结合含 m^5C 修饰的mRNA, 从而促进其出核(b)、稳定(c)并引发(d)相分离。(e) DNA甲基转移酶2(DNA methyltransferase-2, DNMT2)和脆性X信使核糖蛋白1(fragile X messenger ribonucleoprotein, FMRP)介导DNA损伤修复。(f) NOP2/Sum家族的RNA m^5C 甲基化酶6(nop2/sun RNA methyltransferase 6, NSUN6)催化mRNA的 m^5C 修饰生成, 从而促进其翻译。(g) NSUN2介导小tRNA(tRNA halves, tiRNA)生成。(h) NSUN2介导小穹窿RNA(small vault RNA, svRNA)生成, 从而抑制蛋白激酶R(protein kinase R, PKR)和乙型肝炎病毒(interferon beta 1, IFN- β)翻译。(i) NOP2/Sum家族的RNA m^5C 甲基化酶7(nop2/sun RNA methyltransferase 7, NSUN7)催化eRNA的 m^5C 修饰生成。(j) NOP2/Sum家族的RNA m^5C 甲基化酶1(nop2/sun RNA methyltransferase 1, NSUN1)催化HIV-1 TAR区域的 m^5C 修饰生成, 从而促进病毒潜伏。(k) NSUN1和NOP2/Sum家族的RNA m^5C 甲基化酶5(NOP2/Sun RNA methyltransferase 5, NSUN5)催化rRNA的 m^5C 修饰生成, 从而促进核糖体组装及蛋白质翻译。(l), (m) NSUN2、NSUN6和DNMT2介导tRNA的 m^5C 修饰生成, 从而维持tRNA稳定性和促进蛋白质翻译。(n) NSUN2、NOP2/Sum家族的RNA m^5C 甲基化酶3(nop2/sun RNA methyltransferase 3, NSUN3)和NOP2/Sum家族的RNA m^5C 甲基化酶4(nop2/sun RNA methyltransferase 4, NSUN4)具有催化线粒体tRNA和rRNA(mt-tRNA和mt-rRNA) m^5C 修饰生成的潜能, AlkB同源物1(alkB homolog 1, histone H2A dioxygenase, ALKBH1)介导mt-tRNA的去甲基化过程

Figure 1 Regulatory mechanisms of RNA m^5C modification. (a)~(d) NSUN2-mediated the methylation in mRNAs and may be removed by TETs. It can be recognized by a set of reader proteins to promote mRNA nuclear export (b), stability (c) and phase transition (d). (e) DNMT2- and FMRP-mediated DNA repair. (f) NSUN6-mediated the formation of m^5C in mRNAs to promote their translation efficiency. (g) NSUN2-mediated the biogenesis of tiRNAs. (h) NSUN2-mediated the biogenesis of svRNAs to inhibit the translation of PKR and IFN- β . (i) NSUN7-mediated the m^5C formation in eRNAs. (j) Viral latency of HIV-1 triggered by NSUN1-mediated m^5C methylation in TAR. (k) NSUN1- and NSUN5-mediated m^5C methylation of rRNAs to support ribosome biogenesis and efficient translation. (l), (m) NSUN2-, NSUN6- and DNMT2-mediated the methylation of tRNAs to maintain the stabilization of tRNAs and support the efficient translation. (n) NSUN2-, NSUN3-, and NSUN4-mediated methylation of tRNAs and rRNAs in mitochondria (mt-tRNAs and mt-rRNAs). ALKBH1-mediated the demethylation of mt-tRNAs

1.3 识别蛋白

目前鉴定到的真核生物mRNA的m⁵C修饰识别蛋白包括ALYREF、YBX1、YBX2和FMRP^[5,8,52]。其中ALYREF和FMRP主要分布于细胞核^[4,52]，而YBX1和YBX2主要分布于细胞质^[8,53]。ALYREF通过赖氨酸K171特异性识别mRNA上的m⁵C修饰以促进其出核^[4]。YBX1通过冷休克结构域的W65吡咯环识别mRNA上的m⁵C修饰以维持其稳定性^[8]。YBX2通过冷休克结构域的W100结合mRNA上的m⁵C修饰以促进液-液相分离^[8]。FMRP通过DNMT2的招募，参与TET1介导的R-loop去甲基化过程，从而确保DNA损伤修复的顺利实施^[52]。

2 RNA m⁵C修饰高通量测序技术

m⁵C修饰高通量测序技术的快速发展为深入探索m⁵C修饰的生物学功能提供了强有力的技术支撑。甲基化RNA免疫沉淀测序(methylated RNA immunoprecipitation sequencing, MeRIP-seq)^[54]是当前常用的m⁵C修饰检测技术。该方法将纯化后的总RNA或mRNA打断成100~150 nt的RNA片段；随后，将RNA片段与m⁵C修饰抗体共孵育，通过抗体富集含有m⁵C修饰的RNA片段进行建库测序；最后，与无m⁵C修饰抗体共孵育的对照组文库进行比对分析，以获得含m⁵C修饰的转录组区域。MeRIP-seq虽然应用广泛，但其分辨率为~200 nt，无法获得精确的m⁵C修饰位点信息。光交联辅助m⁵C测序技术(photo-crosslinking-assisted m⁵C sequencing, PA-m⁵C-seq)^[25]在细胞培养过程中添加4-硫代尿苷(4-thiouridine, 4-SU)，并利用365 nm的紫外光照射诱导m⁵C抗体和底物RNA之间产生交联反应，从而在m⁵C

位点周边引发T>C突变。因此，根据富集峰中是否存在T>C的突变信息，可有效过滤假阳性位点，并且该方法的分辨率可达~23 nt。RNA重亚硫酸氢盐测序(RNA bisulfite sequencing, RNA-BisSeq)^[4]通过重亚硫酸氢盐处理使RNA上未修饰的C发生脱氨基反应，从而转变为尿嘧啶(uracil, U)。m⁵C修饰由于受到甲基基团的保护则不会发生任何改变。通过计算未转化C所在位置和出现频率可精确推断参考转录组上的m⁵C修饰位点和相应的甲基化水平。与二代测序不同，Nanopore测序^[30,55]根据单个核苷酸通过纳米孔通道时造成的电信号差异，应用模式识别算法推算出对应的碱基序列，可直接检测全长RNA上的修饰信息。

3 RNA m⁵C修饰对病毒复制的调控作用

RNA m⁵C修饰及其相关蛋白在多种病毒的感染过程中发挥重要调控作用。基于病毒种类的不同，对其调控作用的总结如表1所示。

3.1 逆转录病毒

逆转录病毒属于有包膜的RNA病毒，基因组为线性的单股正链RNA，长度为8~11 kb^[56]。根据基因组结构的复杂性可将其划分为简单逆转录病毒和复杂逆转录病毒两大类^[56]。逆转录病毒的复制周期是一个相对复杂的过程，包括吸附融合、脱衣壳、逆转录、入核、整合、转录、RNA剪切、出核、翻译、组装和释放传播等步骤^[57]。其中逆转录和整合是逆转录病毒复制的关键步骤，依赖整合前复合体(pre-integration complex, PIC)将病毒逆转录生成的双链DNA从宿主细胞质转运到细胞核，从而整合至宿主基因组^[58,59]。

表 1 RNA m⁵C修饰在不同病毒感染中的作用

Table 1 Roles of RNA m⁵C in different viral infections

病毒类型	病毒分类	病毒名称	m ⁵ C修饰在病毒感染中的作用	文献
逆转录病毒	逆转录病毒科	MLV	促进MLV RNA出核和MLV复制	[27,28]
		HIV-1	促进HIV-1 RNA剪切、翻译和稳定性维持；抑制HIV-1 RNA转录	[24~26]
DNA病毒	疱疹病毒科	EBV	促进EBV非编码RNA(EBER1)降解	[29]
黄病毒	黄病毒科	DENV	未知	[13]
		ZIKV	未知	
		HCV	未知	
冠状病毒	冠状病毒科	SARS-CoV-2 HCoV	未知 未知	[30,31]

3.1.1 小鼠白血病病毒

小鼠白血病病毒(murine leukemia virus, MLV)是典型的简单逆转录病毒,基因组全长8 kb,能够编码病毒复制所需的结构蛋白(GAG、ENV)和酶(POL)^[60]。由于PIC缺乏核定位信号,MLV病毒只能感染处于有丝分裂状态的宿主细胞,并在核膜解体期间完成入核和整合过程^[60]。MLV复制周期受到反式作用因子的精细调控,其中包括转录因子CBF^[61]、ZAS1^[62]、剪切因子SRSF2^[63]、核RNA输出因子NXF、UAP56、CRM1^[64-66]等宿主蛋白。随着高通量检测和测序技术的快速发展,研究发现,除上述宿主蛋白外,RNA m⁵C修饰同样在MLV复制过程中发挥重要作用^[24-26]。

2019年,Courtney等人^[28]使用MLV前病毒质粒pNCS感染3T3细胞,于感染72 h收集释放至上清液中的病毒颗粒,并从中纯化MLV基因组RNA(genomic RNA, gRNA),使其纯度达到99.4%。随后,结合超高效液相色谱串联质谱技术(ultrahigh-performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)成功解析并定量MLV gRNA上的转录后修饰形式。UPLC-MS/MS结果显示,MLV gRNA上富含m⁵C修饰:平均每个gRNA约含有13个m⁵C修饰位点、占病毒所有C残基的0.54%,并且该比例是宿主mRNA的9倍。随后结合PA-m⁵C-seq高通量测序技术,绘制并比较3T3细胞内和上清液病毒颗粒中MLV RNA的m⁵C修饰图谱。由于受RNA剪切的调控作用,3T3细胞内50%的MLV RNA不含GAG和POL开放阅读框。因此,3T3细胞内鉴定到的MLV m⁵C修饰位点主要分布于ENV开放阅读框,并且GAG和POL开放阅读框上的m⁵C修饰水平远低于病毒颗粒的检测结果。然而与UPLC-MS/MS检测结果不同,PA-m⁵C-seq数据显示,MLV gRNA上约含有40个m⁵C位点,提示不同检测技术的分析精度对鉴定结果具有较大影响。为探索RNA m⁵C修饰对MLV复制的调控作用,突变pNCS质粒中POL基因上的m⁵C修饰位点,并使用该突变质粒感染293T细胞。分析结果显示,293T细胞内的MLV GAG mRNA/蛋白以及释放至上清液病毒颗粒中的GAG蛋白均显著减少。然而,通过7SL RNA矫正MLV gRNA含量后发现,m⁵C修饰突变虽然降低释放至上清液中的病毒颗粒,但不影响组装至病毒颗粒中的gRNA含量,提示m⁵C修饰在宿主细胞内影响MLV RNA代谢加工,但具体调控机制尚不清楚。进一步研究发现,宿主m⁵C修饰甲基转移酶——NSUN2通过C321催化MLV RNA的m⁵C修饰生成;NSUN2敲

低将显著抑制宿主细胞内MLV GAG RNA及蛋白表达,说明NSUN2催化MLV RNA m⁵C修饰生成以促进病毒复制。

近期,Eckwahl等人^[27]通过MLV前病毒质粒pNCA感染3T3细胞,并于感染48 h收集和纯化释放至上清液中的病毒颗粒gRNA。随后结合液相色谱-质谱联用技术(liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS)发现,MLV gRNA上的m⁵C修饰水平是宿主mRNA的~7倍。通过单碱基分辨率的RNA-BisSeq测序技术,Eckwahl等人^[27]将两次生物学重复中均出现且修饰水平>0.2的m⁵C修饰位点定义为真阳性位点。与PA-m⁵C-seq测序结果不同,使用该方法在MLV gRNA上鉴定到8个m⁵C修饰位点,并发现这些位点主要分布于GAG上游非编码区和ENV开放阅读框^[27],这种差异可能由病毒种类、感染时间、测序精度、阳性位点筛选阈值等多方因素造成。通过分子进化分析发现,8个高可信度的m⁵C修饰位点中有5个在不同MLV临床株中高度保守,提示RNA m⁵C具有物种保守性并且对不同MLV临床株的复制具有一致性调控作用。由于MLV RNA在宿主细胞质和细胞核内均有分布,为确定其RNA m⁵C修饰形成场所,分别提取病毒感染后宿主细胞质和细胞核RNA进行亚硫酸氢盐处理。随后通过Sanger测序发现,仅位于GAG上游非编码区的m⁵C修饰位点形成于宿主细胞核。结合RNA免疫沉淀-RT-PCR联用技术发现,野生型ALYREF结合MLV gRNA,而突变型ALYREF-K171A的结合能力显著减弱,提示ALYREF以m⁵C修饰依赖的方式结合病毒gRNA。与促进宿主mRNA出核的生物学功能一致,ALYREF缺失将增加MLV gRNA的核质比,从而抑制MLV GAG蛋白表达、阻碍病毒复制,说明m⁵C修饰相关蛋白能通过不同的调节机制影响MLV复制周期。

3.1.2 人免疫缺陷病毒I型

人免疫缺陷病毒I型(human immunodeficiency virus type 1, HIV-1)属于复杂逆转录病毒,基因组全长9 kb,包含9个开放阅读框,分别编码病毒复制所需的结构蛋白(GAG、POL、ENV)和调节蛋白(TAT、REV、NEF、VIF、VPR、VPU)^[67],其中TAT和REV蛋白协同调控HIV-1 RNA转录和出核^[68]。高效抗逆转录病毒治疗(highly active antiretroviral therapy, HAART)是当前最行之有效的抗HIV-1治疗策略。然而HAART治疗无法根除患者体内的病毒潜伏库,停药后病毒载量将大幅度反弹、致使病情恶化^[69]。因此,深入探索HIV-1复

制精细调控机制,有助于制定更加安全有效的治疗策略。研究发现, RNA m⁵C修饰甲基转移酶和HIV-1复制之间有着密切联系^[24-26]。

2017年, Dev等人^[26]证实宿主RNA m⁵C修饰甲基转移酶DNMT2能够催化HIV-1 RNA的m⁵C修饰生成。通过免疫荧光(immunofluorescence, IF)染色发现, 正常情况下, CEMx174细胞中的DNMT2是一个核定位蛋白; 但HIV-1感染12 h后, DNMT2将大量出核并与应激颗粒标记蛋白G3BP共定位, 说明病毒感染促进DNMT2出核并在细胞质内成为应激颗粒的组成蛋白之一。DNMT2由于自身缺乏出核信号, 因此通常定位于细胞核内。但细胞受到外界刺激后, ATM磷酸化激酶通过激酶结构域催化DNMT2第215位和第219位丝氨酸磷酸化, 从而促进其出核。此外, 结合RNA免疫沉淀-sqRT-PCR、荧光原位杂交(fluorescence *in situ* hybridization, FISH)和免疫染色等多种实验手段发现, HIV-1感染后DNMT2可以靶向结合HIV-1 RNA并共定位于应激颗粒中, 提示DNMT2可能参与调控HIV-1 RNA命运决定。NEF是HIV-1编码的重要调节蛋白, 具有复杂的生物学功能, 在病毒复制过程中发挥双向调控作用^[70]。Dev等人^[26]发现, DNMT2作为RNA m⁵C修饰甲基转移酶能够催化HIV-1 NEF区段的m⁵C修饰生成, 从而维持HIV-1 RNA稳定性。DNMT2缺失将显著降低HIV-1 RNA的半衰期、抑制病毒颗粒组装、阻碍病毒复制。

2019年, Courtney等人^[25]使用HIV-1前病毒质粒NL4-3感染CEM细胞, 并于感染72 h收集和纯化释放至上清液中的病毒颗粒gRNA。随后结合UPLC-MS/MS发现, HIV-1 gRNA的m⁵C修饰水平是宿主mRNA的14倍, 平均每个gRNA含有~11个m⁵C修饰位点、占病毒所有C残基的0.645%, 提示该修饰可作为宿主细胞区分“自我”和“非我”物质的依据, 特异性调控HIV-1复制。随后Courtney等人^[25]通过PA-m⁵C-seq测序技术对感染HIV-1的HEK293、CEM和PBMC细胞进行综合分析, 发现不同细胞系中鉴定到HIV-1 RNA的m⁵C修饰数量各不相同, 但仍有19个细胞系高度保守的m⁵C修饰峰且倾向富集于病毒RNA 3'端, 提示病毒RNA修饰的形成具有一定的特征性。NSUN2作为m⁵C修饰甲基转移酶, 通过C321氨基酸残基催化HIV-1 RNA的m⁵C修饰生成, 并以该方式调控其代谢加工。然而NSUN2 CLIP-seq数据分析结果显示, HIV-1 RNA上存在3个m⁵C修饰峰, 分别位于GAG和NEF区域, 其形成不受NSUN2调控, 提示多种

甲基转移酶共同介导病毒RNA m⁵C修饰生成。不同于DNMT2, NSUN2敲除将显著减少结合至HIV-1 RNA的核糖体数量, 从而抑制HIV-1 RNA的翻译过程。此外, NSUN2还参与调控HIV-1 RNA的选择性剪切, NSUN2缺失将显著降低HIV-1 A2剪切位点的使用效率, 进而抑制病毒复制。

TAT蛋白是HIV-1编码的反式转录激活因子, 通过结合HIV-1 5' LTR以启动病毒基因组转录; 随后招募宿主转录延长复合体P-TEFb以促进病毒RNA转录延伸^[71]。2020年, Kong等人^[24]通过siRNA文库数据分析发现, m⁵C修饰甲基转移酶NSUN1缺失具有促进HIV-1复制的作用。HEK293细胞中NSUN1过表达能够显著抑制TAT/LTR启动的基因表达; J-Lat 10.6、EF7和U1细胞中NSUN1缺失将显著促进HIV-1转录激活, 说明NSUN1参与抑制TAT蛋白依赖的HIV-1转录过程, 从而促进病毒潜伏。结合ChIP-PCR、m⁵C RIP-qPCR等实验发现, NSUN1通过RNA甲基转移酶结构域靶向结合HIV-1 5' LTR并促进TAR区域的m⁵C修饰生成。病毒潜伏感染阶段, NSUN1与TAT蛋白竞争性结合HIV-1 5' LTR并且其结合效率显著高于TAT蛋白。因此, NSUN1在抑制TAT蛋白依赖的病毒RNA转录和延伸中发挥关键作用。

综上所述, 宿主甲基转移酶DNMT2、NSUN1和NSUN2均参与催化HIV-1 RNA的m⁵C修饰生成, 并以m⁵C修饰依赖的方式参与调控病毒复制的不同阶段, 说明RNA m⁵C修饰对病毒复制的调节机制复杂而精细, 具有明显的时空特异性。因此, 仍需进一步深化RNA m⁵C修饰及其相关蛋白调控研究, 才能更好地理解该修饰对HIV-1的影响。

3.2 DNA病毒

爱泼斯坦-巴尔病毒(Epstein-Barr virus, EBV)属于DNA病毒, 基因组全长172 kb, 编码~80个开放阅读框和44个非编码RNA^[72]。全球95%的成年人感染过EBV^[73,74]。EBV的复制周期大致划分为潜伏期和裂解复制期2个阶段^[73]。虽然现有抗病毒策略可以有效抑制EBV裂解复制, 但无法根除EBV潜伏感染, 是亟待解决的问题之一^[74]。EBER1和EBER2是EBV编码的小RNA^[75,76], 同源性为54%, 具有明确的二级结构^[75,77], 可与多个宿主蛋白形成复合物, 其中包括PKR、RIG-I和AUF1等^[78-80]。尽管EBER1和EBER2含量丰富, 结构特征明确, 但其生物学功能尚不清晰。近期, Henry等人^[29]通过LC-MS/MS发现, EBER1含有m⁵C修饰, 而

EBER2不含 m^5C 修饰。随后,通过RNA-BisSeq高通量测序技术发现,约95%的EBER1第147位C(C_{147})上含有 m^5C 修饰,提示该修饰对EBER1代谢加工具有重要调控作用。结合NSUN2-C271A突变体和免疫沉淀技术,他们发现,NSUN2靶向结合EBER1 C_{147} ,并且NSUN2敲除后 C_{147} 的 m^5C 修饰水平降低至0,说明NSUN2特异性催化EBER1的 m^5C_{147} 生成。ANG属于核糖核酸酶,tRNA中 m^5C 修饰具有阻碍ANG的内切作用,从而维持tRNA的稳定性^[41]。与tRNA不同,Henry等人^[29]发现,EBV感染BJAB-B1细胞后,ANG能够结合含 m^5C 修饰的EBER1从而促进其降解。NSUN2缺失或ANG缺失均显著提升BJAB-B1细胞内的EBER1含量,提示 m^5C 修饰可作为宿主防御机制的一部分。然而,丁酸钠激活EBV裂解复制后,NSUN2敲除并不影响宿主细胞内的病毒滴度,提示RNA m^5C 修饰仅参与调控潜伏期的EBV病毒复制。此外,通过紫外交联免疫沉淀结合高通量测序(high-throughput sequencing of RNAs isolated by cross-linking immunoprecipitation, HITS-CLIP)发现,识别蛋白ALYREF和YBX1无法结合EBER1上的 m^5C 修饰,并且ALYREF或YBX1敲低均不影响EBER1命运决定,提示存在其他识别蛋白参与调控DNA病毒复制,具体机制需进一步研究。

3.3 黄病毒

黄病毒是一类有包膜的RNA病毒,包括丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)、登革病毒(dengue virus, DENV)和寨卡病毒(zika virus, ZIKV)等^[81]。黄病毒的基因组为单股正链RNA,可编码3种结构蛋白(C、prM、E)和7种非结构蛋白(NS1、NS2A、NS2B、NS3、NS4A、NS4B、NS5)^[82]。2018年,McIntyre等人^[13]通过离子淌度质谱发现HCV、DENV和ZIKV RNA上含有29种相同的转录后修饰形式,其中包括 m^5C 修饰,提示该修饰对黄病毒复制具有重要调控作用。Lee等人^[83]通过酵母双杂交筛选系统,证实宿主 m^5C 甲基转移酶NSUN5结合HCV C蛋白,提示NSUN5可能参与催化HCV RNA的 m^5C 修饰生成。此外,西尼霉素(sinefungin, A9145)及其代谢产物A9145C是甲基供体SAM类似物,可作为抑制剂阻断DNA和RNA甲基转移酶活性。研究发现,A9145可有效抑制DENV^[84]和ZIKV^[85]复制。因此,深入探索RNA m^5C 修饰调控黄病毒复制的精细机制,可为抗病毒治疗提供新思路和新希望。

3.4 冠状病毒

冠状病毒属于有包膜的RNA病毒,基因组为线性的单股正链RNA,长度为27~32 kb,包含alpha、beta、gamma和delta等4个亚群^[86]。目前发现的感染人类的冠状病毒包括中东呼吸综合征冠状病毒(middle east respiratory syndrome coronavirus, MERS-CoV)、人冠状病毒(human coronavirus, HCoV)、非典病毒(severe acute respiratory syndrome associated coronavirus, SARS-CoV)和新型冠状病毒(severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2)^[86]。

SARS-CoV-2属于beta冠状病毒,其引起的新型冠状病毒肺炎在全球大范围传播,严重危害人类身心健康^[86]。2020年,Kim等人^[30]以SARS-CoV-2感染的Vero细胞为研究对象,通过纳米孔RNA直接测序和DNA纳米球测序,首次揭示了SARS-CoV-2的转录组及表观转录组图谱。分析结果显示,被感染的Vero细胞中SARS-CoV-2的RNA含量超过65%,说明感染过程中该病毒显著抑制宿主基因表达。与真核生物mRNA相似,SARS-CoV-2 RNA含有Poly(A)尾。借助纳米孔测序优势,Kim等人^[30]发现病毒gRNA比亚基因组RNA(subgenomic RNA, sgRNA)的Poly(A)尾长,提示病毒gRNA具有更长的半衰期。根据核苷酸通过纳米孔产生的电信号差异,他们发现SARS-CoV-2 RNA上含有41个修饰位点,其中6个为C原子上的修饰,但是否为 m^5C 修饰尚待测定。此外,分析发现携带修饰的SARS-CoV-2 RNA具有更短的Poly(A)尾,提示RNA修饰可能参与调控病毒Poly(A)尾形成。因此,针对RNA m^5C 修饰探索冠状病毒复制调控机制具有重要意义。

人冠状病毒229E(human coronavirus 229E, HCoV-229E)属于alpha冠状病毒,主要感染呼吸道和肠黏膜表面,从而引发感冒^[87]。Vieheweger等人^[31]通过纳米孔RNA直接测序发现HCoV-229E RNA上含有 m^5C 修饰。通过比较不同HCoV-229E RNA的 m^5C 修饰图谱,发现其分布特征具一致性,提示冠状病毒RNA的 m^5C 修饰具有保守的基序特征,或者生成受到RNA二级结构调控。但目前尚不清楚RNA m^5C 修饰是否参与调控HCoV-229E生命周期。

4 RNA m^5C 修饰对宿主抗病毒免疫应答的调控作用

随着研究的不断深入,研究人员发现 m^5C 修饰在宿

主抗病毒免疫应答中扮演重要角色。NSUN2作为多功能的m⁵C修饰甲基转移酶,在维持tRNA结构的稳定性中发挥重要作用^[88]。Gkatza等人^[88]发现,氧化应激条件下NSUN2的蛋白表达受阻致使tRNA的m⁵C修饰水平急剧下降、tRNA片段化后生成短链非编码RNA(tRNA-derived RNA fragment, tRF),进而阻碍细胞的翻译过程^[89,90]。随后,Deng等人^[91]发现,呼吸道合胞病毒(respiratory syncytial virus, RSV)感染宿主细胞后,能够诱导tRF5-GluCTC产生,以逃逸宿主细胞的免疫监察机制。tRF5-GluCTC主要分布于宿主细胞质内,作为反式沉默调控元件靶向结合抗RSV蛋白APOER2 mRNA的3'UTR区域,从而加速其降解以促进病毒复制^[91]。VtRNA是定位于穹窿核糖核蛋白颗粒中的非编码RNA,通过剪切生成小穹窿RNA(small vault RNA, svRNA),从而在RNA水平上调节基因表达量^[33]。NSUN2催化vtRNA的m⁵C修饰形成,并以m⁵C修饰依赖的方式促进vtRNA剪切^[34]。与tRF相似,病毒可利用vtRNA沉默宿主抗病毒免疫反应,如甲型流感病毒(influenza A virus, IAV)通过自身的NS1蛋白诱导宿主vtRNA高表达,从而抑制抗病毒蛋白PKR的活化,进而抑制一型干扰素信号通路的激活以促进病毒复制^[33]。2017年,Morales等人^[92]从SARS-CoV感染的小鼠肺泡中分离出3个长度为18~22 nt的小病毒RNA(small viral RNA, svRNA)。研究发现,svRNA分别来源于病毒的Nsp3基因和N基因,并且svRNA缺失将显著降低促炎因子的表达和减缓小鼠肺部病变^[92],上述表型提示,NSUN2可能靶向调控svRNA代谢加工,但其分子调控机制仍需进一步验证。

5 总结与展望

综上所述, RNA m⁵C作为重要的转录后修饰形式之一,具有动态性和可逆性特征,可通过“直接”或“间接”2种方式影响病毒RNA命运决定。因此,深入解析其分子调控机制,可为抗病毒治疗提供新希望。研究发现,病毒感染宿主细胞后,宿主甲基转移酶可以直接结合并催化病毒RNA的m⁵C修饰生成,其中包括

HIV-1^[24-26]、MLV^[27,28]、EBV^[29]和HCV^[13]等,提示病毒和宿主之间共享一套RNA m⁵C修饰调控体系。此外,针对同一病毒,多种宿主甲基转移酶可以协同调控其RNA m⁵C修饰形成,从而在不同的复制阶段行使不同的生物学功能。例如,细胞核中NSUN1催化HIV-1 RNA 5'端的m⁵C修饰生成,从而抑制HIV-1 RNA转录^[24];而NSUN2催化HIV-1 RNA 3'端的m⁵C修饰生成,从而促进HIV-1 RNA选择性剪切和翻译^[25]。不同于NSUN1和NSUN2, DNMT2在细胞质中催化病毒RNA的m⁵C修饰生成,从而维持HIV-1 RNA稳定性^[26]。因此,宿主甲基转移酶和病毒RNA之间存在复杂而精细的调控网络,并且该网络具有明显的时空特异性。由于RNA m⁵C修饰是通过招募不同的识别蛋白来调控不同的RNA加工代谢过程^[5]。所以, RNA m⁵C修饰对病毒复制调控的多样性,提示识别蛋白在其中发挥重要作用,如ALYREF能够结合MLV RNA上的m⁵C修饰,从而促进其出核;ALYREF缺失将显著抑制MLV复制^[27]。此外, RNA m⁵C修饰还能够通过调节宿主抗病毒反应间接影响病毒复制,如NSUN2催化vtRNA的m⁵C修饰形成,以抑制PKR依赖的一型干扰素信号通路活化,从而促进病毒复制^[33,34]。因此,结合m⁵C修饰在病毒复制中的不同作用方式,针对m⁵C修饰甲基转移酶、去甲基化酶和识别蛋白开发相应的小分子抑制剂或激活剂,以破坏病毒对宿主细胞的感染,具有重要研究意义。

虽然已有大量研究表明RNA m⁵C修饰在病毒复制和宿主抗病毒反应中发挥关键调控作用,但仍有许多问题需要进一步探索,如m⁵C修饰是否直接影响HCoV-229E和SARS-CoV-2等致病病毒的RNA代谢和复制;除宿主m⁵C修饰甲基转移酶、去甲基化酶和识别蛋白外,病毒是否具有m⁵C修饰相关蛋白并参与调控自身复制;除ALYREF外,其他识别蛋白是否参与调控病毒复制等。由于当前m⁵C修饰对不同致病病毒的调控机制研究不够深入,未来研究仍需综合考虑病毒类型、感染时间、细胞亚细胞定位等各方面因素,系统地解析病毒或宿主RNA的m⁵C修饰对病毒复制周期的影响及作用机制,为后续抗病毒研究夯实理论基础。

参考文献

- 1 Boccaletto P, Machnicka M A, Purta E, et al. MODOMICS: A database of RNA modification pathways. 2017 update. *Nucleic Acids Res*, 2018, 46: 303-307
- 2 Li X, Xiong X, Yi C. Epitranscriptome sequencing technologies: Decoding RNA modifications. *Nat Methods*, 2016, 14: 23-31

- 3 Trixl L, Lusser A. The dynamic RNA modification 5-methylcytosine and its emerging role as an epitranscriptomic mark. [Wiley Interdiscip Rev RNA](#), 2019, 10: e1510
- 4 Yang X, Yang Y, Sun B F, et al. 5-Methylcytosine promotes mRNA export—NSUN2 as the methyltransferase and ALYREF as an m⁵C reader. [Cell Res](#), 2017, 27: 606–625
- 5 Chen Y S, Yang W L, Zhao Y L, et al. Dynamic transcriptomic m⁵C and its regulatory role in RNA processing. [Wiley Interdiscip Rev RNA](#), 2021, 12: e1639
- 6 Schaefer M, Pollex T, Hanna K, et al. RNA cytosine methylation analysis by bisulfite sequencing. [Nucleic Acids Res](#), 2009, 37: e12
- 7 García-Vilchez R, Sevilla A, Blanco S. Post-transcriptional regulation by cytosine-5 methylation of RNA. [Biochim Biophys Acta-Gen Regul Mech](#), 2019, 1862: 240–252
- 8 Wang X, Wang M, Dai X, et al. RNA 5-methylcytosine regulates YBX2-dependent liquid-liquid phase separation. [Fundam Res](#), 2022, 2: 48–55
- 9 Pellett P E, Mitra S, Holland T C. Basics of virology. [Handb Clin Neurol](#), 2014, 123: 45–66
- 10 Netzband R, Pager C T. Epitranscriptomic marks: Emerging modulators of RNA virus gene expression. [Wiley Interdiscip Rev RNA](#), 2020, 11: e1576
- 11 Tsai K, Jaguva Vasudevan A A, Martinez Campos C, et al. Acetylation of cytidine residues boosts HIV-1 gene expression by increasing viral RNA stability. [Cell Host Microbe](#), 2020, 28: 306–312.e6
- 12 Furuse Y. RNA modifications in genomic RNA of influenza A virus and the relationship between RNA modifications and viral infection. [Int J Mol Sci](#), 2021, 22: 9127–9144
- 13 McIntyre W, Netzband R, Bonenfant G, et al. Positive-sense RNA viruses reveal the complexity and dynamics of the cellular and viral epitranscriptomes during infection. [Nucleic Acids Res](#), 2018, 46: 5776–5791
- 14 Kennedy E M, Bogerd H P, Kornepati A V R, et al. Posttranscriptional m⁶A editing of HIV-1 mRNAs enhances viral gene expression. [Cell Host Microbe](#), 2016, 19: 675–685
- 15 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
- 16 Hao H, Hao S, Chen H, et al. N⁶-methyladenosine modification and METTL3 modulate enterovirus 71 replication. [Nucleic Acids Res](#), 2019, 47: 362–374
- 17 Tirumuru N, Zhao B S, Lu W, et al. N⁶-methyladenosine of HIV-1 RNA regulates viral infection and HIV-1 Gag protein expression. [eLife](#), 2016, 5: e15528
- 18 Decroly E, Ferron F, Lescar J, et al. Conventional and unconventional mechanisms for capping viral mRNA. [Nat Rev Microbiol](#), 2011, 10: 51–65
- 19 Ramanathan A, Robb G B, Chan S H. mRNA capping: Biological functions and applications. [Nucleic Acids Res](#), 2016, 44: 7511–7526
- 20 Daffis S, Szretter K J, Schriewer J, et al. 2'-O methylation of the viral mRNA cap evades host restriction by IFIT family members. [Nature](#), 2010, 468: 452–456
- 21 Dubin D T, Stollar V. Methylation of sindbis virus “26S” messenger RNA. [Biochem Biophys Res Commun](#), 1975, 66: 1373–1379
- 22 Dubin D T, Stollar V, Hsueh C C, et al. Sindbis virus messenger RNA: The 5'-termini and methylated residues of 26 and 42 S RNA. [Virology](#), 1977, 77: 457–470
- 23 Sommer S, Salditt-Georgieff M, Bachenheimer S, et al. The methylation of adenovirus-specific nuclear and cytoplasmic RNA. [Nucleic Acids Res](#), 1976, 3: 749–766
- 24 Kong W, Biswas A, Zhou D, et al. Nucleolar protein NOP2/NSUN1 suppresses HIV-1 transcription and promotes viral latency by competing with Tat for TAR binding and methylation. [PLoS Pathog](#), 2020, 16: e1008430
- 25 Courtney D G, Tsai K, Bogerd H P, et al. Epitranscriptomic addition of m⁵C to HIV-1 transcripts regulates viral gene expression. [Cell Host Microbe](#), 2019, 26: 217–227.e6
- 26 Dev R R, Ganji R, Singh S P, et al. Cytosine methylation by DNMT2 facilitates stability and survival of HIV-1 RNA in the host cell during infection. [Biochem J](#), 2017, 474: 2009–2026
- 27 Eckwahl M, Xu R, Michalkiewicz J, et al. 5-Methylcytosine RNA modifications promote retrovirus replication in an ALYREF reader protein-dependent manner. [J Virol](#), 2020, 94: 544–564
- 28 Courtney D G, Chalem A, Bogerd H P, et al. Extensive epitranscriptomic methylation of A and C residues on murine leukemia virus transcripts enhances viral gene expression. [mBio](#), 2019, 10: 1209–1228
- 29 Henry B A, Kanarek J P, Kotter A, et al. 5-Methylcytosine modification of an Epstein-Barr virus noncoding RNA decreases its stability. [RNA](#),

- 2020, 26: 1038–1048
- 30 Kim D, Lee J Y, Yang J S, et al. The architecture of SARS-CoV-2 transcriptome. *Cell*, 2020, 181: 914–921.e10
 - 31 Viehweger A, Krautwurst S, Lamkiewicz K, et al. Direct RNA nanopore sequencing of full-length coronavirus genomes provides novel insights into structural variants and enables modification analysis. *Genome Res*, 2019, 29: 1545–1554
 - 32 Courtney D G. Post-transcriptional regulation of viral RNA through epitranscriptional modification. *Cells*, 2021, 10: 1129–1141
 - 33 Li F, Chen Y, Zhang Z, et al. Robust expression of vault RNAs induced by influenza A virus plays a critical role in suppression of PKR-mediated innate immunity. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43: 10321–10337
 - 34 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
 - 35 Chen H, Yang H, Zhu X, et al. m⁵C modification of mRNA serves a DNA damage code to promote homologous recombination. *Nat Commun*, 2020, 11: 2834–2846
 - 36 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: 900–905
 - 37 Schaefer M, Pollex T, Hanna K, et al. RNA methylation by Dnmt2 protects transfer RNAs against stress-induced cleavage. *Genes Dev*, 2010, 24: 1590–1595
 - 38 Goll M G, Kirpekar F, Maggert K A, et al. Methylation of tRNA^{Asp} by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2. *Science*, 2006, 311: 395–398
 - 39 Bourgeois G, Ney M, Gaspar I, et al. Eukaryotic rRNA modification by yeast 5-methylcytosine-methyltransferases and human proliferation-associated antigen p120. *PLoS One*, 2015, 10: e0133321
 - 40 Sajini A A, Choudhury N R, Wagner R E, et al. Loss of 5-methylcytosine alters the biogenesis of vault-derived small RNAs to coordinate epidermal differentiation. *Nat Commun*, 2019, 10: 2550–2563
 - 41 Blanco S, Dietmann S, Flores J V, et al. Aberrant methylation of tRNAs links cellular stress to neuro-developmental disorders. *EMBO J*, 2014, 33: 2020–2039
 - 42 Nakano S, Suzuki T, Kawarada L, et al. NSUN3 methylase initiates 5-formylcytidine biogenesis in human mitochondrial tRNA^{Met}. *Nat Chem Biol*, 2016, 12: 546–551
 - 43 Metodieiev M D, Spähr H, Loguerio Polosa P, et al. NSUN4 is a dual function mitochondrial protein required for both methylation of 12S rRNA and coordination of mitoribosomal assembly. *PLoS Genet*, 2014, 10: e1004110
 - 44 Heissenberger C, Liendl L, Nagelreiter F, et al. Loss of the ribosomal RNA methyltransferase NSUN5 impairs global protein synthesis and normal growth. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47: 11807–11825
 - 45 Janin M, Ortiz-Barahona V, de Moura M C, et al. Epigenetic loss of RNA-methyltransferase NSUN5 in glioma targets ribosomes to drive a stress adaptive translational program. *Acta Neuropathol*, 2019, 138: 1053–1074
 - 46 Selmi T, Hussain S, Dietmann S, et al. Sequence- and structure-specific cytosine-5 mRNA methylation by NSUN6. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49: 1006–1022
 - 47 Haag S, Warda A S, Kretschmer J, et al. NSUN6 is a human RNA methyltransferase that catalyzes formation of m⁵C₇₂ in specific tRNAs. *RNA*, 2015, 21: 1532–1543
 - 48 Aguilo F, Li S D, Balasubramaniyan N, et al. Deposition of 5-methylcytosine on enhancer RNAs enables the coactivator function of PGC-1 α . *Cell Rep*, 2016, 14: 479–492
 - 49 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
 - 50 Kawarada L, Suzuki T, Ohira T, et al. ALKBH1 is an RNA dioxygenase responsible for cytoplasmic and mitochondrial tRNA modifications. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45: 7401–7415
 - 51 Haag S, Sloan K E, Ranjan N, et al. NSUN3 and ABH1 modify the wobble position of mt-tRNA^{Met} to expand codon recognition in mitochondrial translation. *EMBO J*, 2016, 35: 2104–2119
 - 52 Yang H, Wang Y, Xiang Y, et al. FMRP promotes transcription-coupled homologous recombination via facilitating TET1-mediated m⁵C RNA modification demethylation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2022, 119: e2116251119
 - 53 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
 - 54 Yang L, Perrera V, Saplaoura E, et al. m⁵C methylation guides systemic transport of messenger RNA over graft junctions in plants. *Curr Biol*, 2019,

- 29: 2465–2476.e5
- 55 Zheng H X, Zhang X S, Sui N. Advances in the profiling of N^6 -methyladenosine (m^6A) modifications. *Biotechnol Adv*, 2020, 45: 107656–107672
- 56 Coffin J M, Hughes S H, Varmus H E. The interactions of retroviruses and their hosts. In: Coffin J M, Hughes S H, Varmus H E, eds. *Retroviruses*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997
- 57 Lusic M, Siliciano R F. Nuclear landscape of HIV-1 infection and integration. *Nat Rev Microbiol*, 2017, 15: 69–82
- 58 Bukrinsky M. A hard way to the nucleus. *Mol Med*, 2004, 10: 1–5
- 59 Brzezinski J D, Felkner R, Modi A, et al. Phosphorylation requirement of murine leukemia virus p12. *J Virol*, 2016, 90: 11208–11219
- 60 Maetzig T, Galla M, Baum C, et al. Gammaretroviral vectors: Biology, technology and application. *Viruses*, 2011, 3: 677–713
- 61 Lewis A F, Stacy T, Green W R, et al. Core-binding factor influences the disease specificity of moloney murine leukemia virus. *J Virol*, 1999, 73: 5535–5547
- 62 Bruce J W, Hierl M, Young J A T, et al. Cellular transcription factor ZASC1 regulates murine leukemia virus transcription. *J Virol*, 2010, 84: 7473–7483
- 63 Keriell A, Mahuteau-Betzer F, Jacquet C, et al. Protection against retrovirus pathogenesis by SR protein inhibitors. *PLoS One*, 2009, 4: e4533
- 64 Mougél M, Akkawi C, Chamontin C, et al. NXF1 and CRM1 nuclear export pathways orchestrate nuclear export, translation and packaging of murine leukaemia retrovirus unspliced RNA. *RNA Biol*, 2020, 17: 528–538
- 65 Sakuma T, Davila J I, Malcolm J A, et al. Murine leukemia virus uses NXF1 for nuclear export of spliced and unspliced viral transcripts. *J Virol*, 2014, 88: 4069–4082
- 66 Pessel-Vivares L, Houzet L, Lainé S, et al. Insights into the nuclear export of murine leukemia virus intron-containing RNA. *RNA Biol*, 2015, 12: 942–949
- 67 Frankel A D, Young J A T. HIV-1: Fifteen proteins and an RNA. *Annu Rev Biochem*, 1998, 67: 1–25
- 68 Groom H C T, Anderson E C, Lever A M L. Rev: Beyond nuclear export. *J Gen Virol*, 2009, 90: 1303–1318
- 69 Lu D Y, Wu H Y, Yarla N S, et al. HAART in HIV/AIDS treatments: Future trends. *Infect Disord Drug Targets*, 2018, 18: 15–22
- 70 Neri F, Giolo G, Potestà M, et al. The HIV-1 Nef protein has a dual role in T cell receptor signaling in infected $CD4^+$ T lymphocytes. *Virology*, 2011, 410: 316–326
- 71 Jean M J, Power D, Kong W, et al. Identification of HIV-1 Tat-associated proteins contributing to HIV-1 transcription and latency. *Viruses*, 2017, 9: 67–79
- 72 Zavala-Vega S, Palma-Lara I, Ortega-Soto E, et al. Role of Epstein-Barr virus in glioblastoma. *Crit Rev Oncog*, 2019, 24: 307–338
- 73 Guo R, Gewurz B E. Epigenetic control of the Epstein-Barr lifecycle. *Curr Opin Virol*, 2022, 52: 78–88
- 74 Münz C. Latency and lytic replication in Epstein-Barr virus-associated oncogenesis. *Nat Rev Microbiol*, 2019, 17: 691–700
- 75 Khan G, Coates P J, Kangro H O, et al. Epstein Barr virus (EBV) encoded small RNAs: Targets for detection by *in situ* hybridisation with oligonucleotide probes. *J Clin Pathol*, 1992, 45: 616–620
- 76 Weiss L M, Chen Y Y, Liu X F, et al. Epstein-Barr virus and Hodgkin's disease. A correlative *in situ* hybridization and polymerase chain reaction study. *Am J Pathol*, 1991, 139: 1259–1265
- 77 Glickman J N, Howe J G, Steitz J A. Structural analyses of EBER1 and EBER2 ribonucleoprotein particles present in Epstein-Barr virus-infected cells. *J Virol*, 1988, 62: 902–911
- 78 Lee N, Pimienta G, Steitz J A. AUF1/hnRNP D is a novel protein partner of the EBER1 noncoding RNA of Epstein-Barr virus. *RNA*, 2012, 18: 2073–2082
- 79 Clarke P A, Schwemmle M, Schickinger J, et al. Binding of Epstein-Barr virus small RNA EBER-1 to the double-stranded RNA-activated protein kinase DAI. *Nucl Acids Res*, 1991, 19: 243–248
- 80 Samanta M, Iwakiri D, Kanda T, et al. EB virus-encoded RNAs are recognized by RIG-I and activate signaling to induce type I IFN. *EMBO J*, 2006, 25: 4207–4214
- 81 van Leur S W, Heunis T, Munnur D, et al. Pathogenesis and virulence of flavivirus infections. *Virulence*, 2021, 12: 2814–2838
- 82 Lindenbach B D, Rice C M. Molecular biology of flaviviruses. *Adv Virus Res*, 2003, 59: 23–61
- 83 Lee J S, Tabata K, Twu W I, et al. RACK1 mediates rewiring of intracellular networks induced by hepatitis C virus infection. *PLoS Pathog*, 2019, 15: e1008021
- 84 Lim S P, Sonntag L S, Noble C, et al. Small molecule inhibitors that selectively block dengue virus methyltransferase. *J Biol Chem*, 2011, 286:

6233–6240

- 85 Hercik K, Brynda J, Nencka R, et al. Structural basis of Zika virus methyltransferase inhibition by sinefungin. [Arch Virol](#), 2017, 162: 2091–2096
- 86 Malik Y A. Properties of coronavirus and SARS-CoV-2. [Malays J Pathol](#), 2020, 42: 3–11
- 87 Li S W, Lin C W. Human coronaviruses: Clinical features and phylogenetic analysis. [Biomedicine](#), 2013, 3: 43–50
- 88 Gkatza N A, Castro C, Harvey R F, et al. Cytosine-5 RNA methylation links protein synthesis to cell metabolism. [PLoS Biol](#), 2019, 17: e3000297
- 89 Goodarzi H, Liu X, Nguyen H C B, et al. Endogenous tRNA-derived fragments suppress breast cancer progression via YBX1 displacement. [Cell](#), 2015, 161: 790–802
- 90 Gebetsberger J, Wyss L, Mleczko A M, et al. A tRNA-derived fragment competes with mRNA for ribosome binding and regulates translation during stress. [RNA Biol](#), 2017, 14: 1364–1373
- 91 Deng J, Ptashkin R N, Chen Y, et al. Respiratory syncytial virus utilizes a tRNA fragment to suppress antiviral responses through a novel targeting mechanism. [Mol Ther](#), 2015, 23: 1622–1629
- 92 Morales L, Oliveros J C, Fernandez-Delgado R, et al. SARS-CoV-encoded small RNAs contribute to infection-associated lung pathology. [Cell Host Microbe](#), 2017, 21: 344–355

Summary for “RNA m⁵C 修饰调控病毒复制的研究进展”

Research advances in the role of RNA m⁵C in viral replication

Ting Zhang¹, Ziling Wang^{1,2} & Yongtang Zheng^{1,2*}¹ Key Laboratory of Animal Models and Human Disease Mechanisms, Kunming Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223, China;² School of Life Sciences, University of Science and Technology of China, Hefei 230026, China* Corresponding author, E-mail: zhengyt@mail.kiz.ac.cn

It is well-known that RNA is the target of numerous chemical modifications which currently amount to over a hundred. Among them, 5-methylcytosine (m⁵C) is a prevalent RNA modification in multiple eukaryotic RNA species, such as messenger RNAs (mRNAs), transfer RNAs (tRNAs), ribosomal RNAs (rRNAs), vault RNAs (vtRNAs), long non-coding RNAs (lncRNAs) and enhancer RNAs (eRNAs). In recent years, several techniques for detecting m⁵C have been developed, including UPLC-MS/MS, m⁵C-MeRIP-seq, PA-m⁵C-seq, RNA-BisSeq and nanopore sequencing. The rapid development of these high-throughput techniques sharply facilitates the in-depth studies of the biological functions of m⁵C. The m⁵C modification is enriched around start codon along mRNAs and conserved in tRNAs and rRNAs. It is a reversible RNA modification catalyzed by methyltransferases (NSUN, DNMT, and TRDMT family members) and removed by demethylases (TET family members and ALKBH1). The m⁵C modification can be recognized by a set of RNA-binding proteins (YBX family members, ALYREF and FMRP) and is widely involved in the regulation of RNA metabolic processes, including nuclear export, stability and translation. In addition, the dysregulation of m⁵C modification is closely related with the defect of DNA repair, cell proliferation, embryonic development and stem cell differentiation.

Viruses are infectious agents that rely on host cells for replication. They have evolved numerous strategies to shape the cellular biosynthesis and metabolism machinery of hosts to complete their life cycle and propagate. One strategy is to modify viral RNAs using host m⁵C RNA methyltransferases (NSUN1, NSUN2, NSUN5 and DNMT2), and thus directly regulates their transcription, splicing and translation. So far, combined with the high-throughput techniques, some viral m⁵C landscapes have been precisely depicted, including human immunodeficiency virus type (HIV-1), murine leukemia virus (MLV), Epstein-Barr virus (EBV), and so on. Studies showed that the m⁵C level of retroviral mRNAs is much higher than cellular mRNAs, suggesting this modification can be a special marker for host cells to distinguish “self” and “non-self”. In addition, the m⁵C methylome of cellular RNAs is dynamically regulated under viral infection, leading to the suppression of host innate immunity. Therefore, it will be of great significance in the design and development of novel antiviral drugs by systemically understanding the molecular mechanisms of m⁵C modification in controlling viral replication and host innate immunity.

In this review, the latest findings of m⁵C methyltransferases, demethylases, reader proteins and high-throughput sequencing techniques are presented. We discuss how m⁵C modification is catalyzed and recognized on viral RNAs of retrovirus, DNA virus, flavivirus and coronavirus. Furthermore, we summarize the roles of RNA m⁵C modification in viral replications and host innate immunity. This review will provide some valuable information for understanding the epigenetics in viral RNAs.

5-methylcytosine, methyltransferases, demethylases, reader proteins, viral replication, host antiviral immune responses

doi: [10.1360/TB-2022-0461](https://doi.org/10.1360/TB-2022-0461)