RNA化学修饰m⁶A的生物功能研究进展

唐乾[†], 张梧桐[†], 贾桂芳^{*}

北京大学化学与分子工程学院化学生物学系, 北京 100871

[†]同等贡献

^{*}通讯作者, E-mail: guifangjia@pku.edu.cn

收稿日期: 2020-06-23; 接受日期: 2020-07-28; 网络版发表日期: 2020-09-28

国家重点研发计划(编号: 2019YFA0802201)和国家自然科学基金(编号: 21822702, 21820102008)资助项目

摘要 N^6 -甲基腺嘌呤(m⁶A)是真核生物mRNA上含量最高的化学修饰. m⁶A动态可逆调控机制的发现大大推动了以m⁶A为首的表现转录组学的发展. 多种m⁶A高通量测序技术及检测方法加深了对m⁶A的分布规律和调控机理的理解. 在动物或植物体内, m⁶A可以被一系列甲基转移酶、去甲基酶和结合蛋白进行修饰、去修饰和识别. m⁶A可以通过影响RNA加工代谢从而调控多种生物学功能. 在本文中, 我们总结介绍了近十年来m⁶A检测技术、m⁶A在动物和植物中的功能研究进展, 为后续m⁶A相关领域的研究与发展提供方向与思考.

关键词 N^6 -甲基腺嘌呤(m⁶A), 表现转录组学, RNA化学修饰

1 引言

基因表达是一种多组分参与、多层次调控的过程. 根据中心法则, 储存在DNA中的遗传信息只有通过转录得到RNA才能最终翻译成蛋白质并行使生物功能^[1]. 正因如此, DNA和蛋白质一直作为调控生命活动的重点研究对象. 除了序列中呈现的遗传信息, DNA和蛋白质上的化学修饰也可以影响基因的表达, 从而调控生命活动^[2,3]. 与DNA类似, RNA上也存在着上百种化学修饰. 这些修饰广泛地存在于多种RNA中, 如信使RNA(messenger RNA, mRNA)、转运RNA(transfer RNA, tRNA)、核糖体RNA(ribosomal RNA, rRNA)、核内小RNA(small nuclear RNA, snRNA)等^[4]. 这些化学修饰对RNA的功能具有重要的调控作用, 因

此以研究这些转录后化学修饰的功能为主的表现转录组学成为近年来的研究热点.

N^6 -甲基腺嘌呤(m⁶A)是目前发现的真核生物mRNA上含量最多的化学修饰, 同时也广泛存在于多种细菌和RNA病毒中^[5]. 早在20世纪70年代, 细胞中就已经鉴定到了m⁶A, 但随着m⁶A去甲基酶FTO的发现, m⁶A动态可逆的调控机制受到越来越多的关注^[6]. 随后通过多种针对m⁶A的高通量测序技术, m⁶A对RNA的调控机理越来越清晰. 目前调控m⁶A的蛋白主要有三类: 称为“Writers”的m⁶A甲基转移酶、称作“Easers”的去甲基酶和称作“Readers”的结合蛋白(图1, 表1). 本文主要介绍近10年来m⁶A相关领域取得的研究进展, 主要包括m⁶A的检测方法、m⁶A在动物和在植物中的功能研究.

引用格式: Tang Q, Zhang W, Jia G. Advances in biological functions of RNA chemical modification m⁶A. *Sci Sin Chim*, 2020, 50: 1233–1249, doi: 10.1360/SSC-2020-0103

图1 动物与植物中m⁶A作用机理示意图(网络版彩图)

Figure 1 Schematic overview of the m⁶A machinery in plants and mammals (color online).

2 RNA化学修饰m⁶A的检测技术

薄层色谱或者串联质谱的方法虽然可以定量分析m⁶A的含量,但无法对m⁶A的分布进行分析。m⁶A虽然仅占细胞总RNA中A的0.1%~0.4%,但广泛地分布在转录组中^[7]。同时对于单一基因的mRNA上的m⁶A又不符合化学计量,有些特定的mRNA上不存在m⁶A,而有些却呈现m⁶A簇状分布的特点^[8]。因此需要发展针对m⁶A的检测技术来更精确地了解转录组水平上m⁶A的分布、含量以及功能。

2.1 m⁶A高通量测序技术

虽然针对DNA化学修饰的测序方法有很多,但发展研究RNA的m⁶A的测序方法仍存在很多困难。首先RNA不能直接用于扩增和测序,必须先经过反转录为cDNA后才能进行扩增,但m⁶A的结构不会影响正常的碱基配对,因此m⁶A的位点信息就会在反转录过程中

丢失;其次虽然m⁶A是真核生物mRNA上含量最高的修饰,但绝对含量仍然很低,并且细胞中还存在大量的rRNA、tRNA的干扰,因此需要利用特异性高的方法将含有m⁶A的RNA在复杂的体系中富集出来。目前出现了多种适用于不同情况的m⁶A的高通量测序技术。利用这些技术,研究者揭示了m⁶A的分布规律,并解释了不同条件下m⁶A的生物功能以及动态变化^[9]。这些m⁶A高通量测序技术极大地推动了m⁶A的相关研究。

2.1.1 基于特异性抗体的测序技术

使用特异性抗体将目标物从复杂的生物体系中分离富集出来是最常用的生物实验方法,而针对m⁶A的抗体目前已经商业化,因此最先出现的就是基于m⁶A特异抗体发展的测序技术。

MERIP-Seq和m⁶A-seq是最早利用m⁶A的抗体发展的高通量测序技术^[10,11]。这两种方法的原理与操作

表 1 动物和植物中m⁶A相关蛋白的功能Table 1 Function of m⁶A related proteins in animals and plants

m ⁶ A调控蛋白	动物	功能	植物	功能	引用
Writers					
	METTL3	结合SAM; 细胞质中可以促进翻译	MTA	影响胚胎发育、顶端优势、根的发展	[34~36,76,77]
	METTL14	与METTL3形成异质二聚体	MTB	与维管、木质部发育有关	[38,39,78]
	WTAP	稳定异质二聚体、帮助定位核斑点	FIP37	促进RNA降解; 调控细胞分化增殖	[35,42]
	VIRMA	影响mRNA的多聚腺苷化	VIRILIZER	与维管、木质部发育有关	[45,78]
	RBM15	影响XIST对性染色体的沉默	—	—	[47]
	HAKAI	与WTAP互作, 影响m ⁶ A	HAKAI	与维管、木质部发育有关	[45,78]
	METTL16	只作用于特定的RNA	—	—	[51]
Erasers					
	FTO	分步氧化m ⁶ A; 底物选择与定位有关	—	—	[22,59]
	ALKBH5	影响RNA的稳定性	ALKBH9B	参与RNA病毒侵染	[61,81]
			ALKBH10B	影响RNA稳定; 调控开花	[80]
Readers					
	YTHDF2	促进RNA降解	ECT2	增强RNA稳定性; 调控表皮毛分叉	[23,26,86,87]
	YTHDF1	促进RNA翻译	ECT3	调控表皮毛分叉和叶片发育	[65,23,86,87]
	YTHDF3	辅助YTHDF1/2发挥功能	ECT4	调控叶片发育	[66,23,86,87]
	YTHDC1	影响RNA剪接、出核以及基因沉默	—	—	[48,67,68]
	YTHDC2	降低RNA稳定性和促进RNA翻译	—	—	[69]
	IGF2BPs	增加RNA稳定性、存储RNA	—	—	[70]
	HNRPNPA2B1	参与pri-mRNA的加工剪接	—	—	[71]
	eIF3	结合m ⁶ A开始翻译	—	—	[72]
	HNRNPC	“m ⁶ A -switch”	—	—	[73]

步骤类似, 首先将提取的RNA碎片化成100~200 nt的片段, 然后将m⁶A的抗体与这些RNA碎片孵育, 最后将洗脱下来的RNA进行建库测序(图2(a))^[10,11]. 这两种方法各鉴定到上万个m⁶A位点, 共包含了4000多个基因, 其中主要是mRNA, 还有部分非编码RNA. 这些方法还发现m⁶A呈现保守的RRACH(R=G/A, H=A/C/U)的序列特征并偏向簇状分布, 主要分布在mRNA的靠近终止密码子附近、3端UTR区域和长的外显子^[10,11]. 这两种方法操作简单, 所有试剂已全部商业化, 是目前应用最多的方法.

随后出现的m⁶A-LAIC-seq(m⁶A-level and isoform characterization sequencing)则实现了在全转录组水平上对m⁶A的定量分析. m⁶A-LAIC-seq的方法流程与m⁶A-seq和MERIP-seq类似, 不同点在于首先在提取后的RNA中加入一定量的外源RNA内参用于后续数据分析中的定量; 其次使用过量的m⁶A抗体与全长的

RNA孵育, 从而保证将所有的m⁶A都富集出来(图2(a))^[12]. m⁶A-LAIC-seq可以对基因转录本上m⁶A的含量与丰度进行绝对定量分析. 通过m⁶A-LAIC-seq, 发现大部分基因的甲基化程度小于50%; 对于同一基因的不同转录本的m⁶A含量不同; 含有更短的3端UTR的转录本的m⁶A含量更多并且更集中在聚腺嘌呤位点^[12]. 这种方法的优点在于可以定量分析一个基因不同转录本上m⁶A的水平, 适用于研究低甲基化程度的基因或者转录本不同、功能不同的基因. 缺点在于单独使用这种方法无法得到m⁶A的位点信息和分布规律并且实验操作比较复杂、成本较高.

利用不同波长的紫外光将抗体与含m⁶A的RNA交联的策略可以进一步提高抗体与RNA的结合效率以及测序数据的分辨率. PA-m⁶A-seq(photo crosslinking-assisted m⁶A sequencing strategy)利用365 nm的紫外光在4SU的帮助下, 将抗体与RNA片段交联起来(图2(a)).

图 2 RNA化学修饰m⁶A的检测技术. (a) 基于抗体的测序技术; (b) 非抗体依赖的测序技术; (c) 基于结合蛋白的检测技术; (d) 代谢标记的测序技术; (e) m⁶A位点检测技术(网络版彩图)

Figure 2 Detection methods for RNA chemical modification m⁶A. (a) Antibody-based sequencing method; (b) antibody-free sequencing method; (c) binding protein-based sequencing method; (d) metabolic labeling sequencing method; (e) m⁶A locus detection method (color online).

这种方法的优势在于将RNA的碎片缩小到30 nt, 从而大大提高了测序数据的分辨率; 引入4SU后可以在反转录过程中造成U to C的定向突变, 通过突变位点可以进一步缩小m⁶A的位点范围^[13]. 由于PA-m⁶A-seq使用了代谢标记4SU, 所以这种方法可以监测新生成mRNA上的m⁶A动态变化, 但m⁶A位点附近没有4SU的掺入, 则会出现假阴性的结果.

m⁶A-CLIP(UV-CLIP)和miCLIP(m⁶A individual nucleotide resolution cross-linking and immune precipitation)则是直接利用254 nm的紫外光将抗体与RNA进行交联^[14,15]. 蛋白酶消化得到的氨基酸残基会阻碍反转录中的碱基配对, 这就导致m⁶A位点附近会形成切断或者突变, 最终得到单碱基分辨率的m⁶A位点信息(图2(a))^[15]. m⁶A-CLIP的结果表明, m⁶A主要分布在最后一个非编码的外显子上, 而在靠近终止密码子附近没有明显的富集^[14]. miCLIP则在一些含量较少的RNA中鉴定到了m⁶A的位点^[15]. m⁶A-CLIP和miCLIP的实验步骤均是将RNA碎片化后再与抗体孵育交联, 然而抗体的结合效率和交联效率会严重影响最后的测序结果. 不仅如此, 交联主要发生在抗体的芳香氨基酸与RNA的嘧啶碱基之间, 因此这两种方法并不是直接得到m⁶A单碱基分辨率的结果, 而是通过邻近的嘧啶位点发生突变来间接分析得到m⁶A的位点. 这就导致两种方法无法在多个邻近的腺嘌呤中准确定位m⁶A, 而对于簇状分布的m⁶A分析则更困难^[16].

将光交联策略与RNA外切酶消化结合的m⁶ACE(m⁶A-crosslinking-exonuclease-sequencing)方法则更精确地绘制了m⁶A位点信息^[17]. m⁶ACE并不是用蛋白酶来消化抗体与RNA的复合物, 而是利用RNA外切酶XRN1将RNA从5端开始消化, 含有m⁶A的RNA由于抗体的结合会保护m⁶A的位点使其不被酶消化, 而只会消化到m⁶A位点5端的核苷. 最后测序数据前端出现堆积的腺嘌呤信号就是m⁶A位点(图2(a))^[17]. m⁶ACE可以得到单碱基分辨率的测序结果, 所以通过敲除m⁶A调控蛋白就可以研究各自蛋白的RNA底物. 由于m⁶ACE需要读取的是测序结果中第一位的信息, 所以在PCR过程以及接头连接过程出现的偏差会影响最终结果, 为了尽可能地减少这一影响, m⁶ACE需要使用带有特殊的分子标识的接头片段, 这导致实验成本升高. m⁶ACE可以直接得到m⁶A的单碱基分辨率的结果, 但可能无法检测成簇状分布的m⁶A位点.

随着基于抗体的m⁶A高通量测序技术的不断发展, 此类方法的弊端也逐渐显现出来, 主要集中在m⁶A抗体的质量不容易控制、使用不同品牌的抗体最终得到的结果差距较大两方面. 而抗体的价格偏高并且测序所需的RNA量过多也阻碍了其大规模应用. 为了克服这些缺点, 近期陆续出现了多种非抗体依赖的m⁶A高通量测序方法. 这些方法利用对甲基敏感的RNA内切酶、m⁶A的调控蛋白或者代谢标记的方法在细胞内或体外识别含m⁶A的RNA, 实现了与抗体法类似甚至更高的分辨率. 这也是目前发展m⁶A高通量测序方法的新方向.

2.1.2 非抗体依赖的测序技术

MAZTER-seq和m⁶A-REF-seq(m⁶A-sensitive RNA-endoribonuclease-facilitated sequencing)均是利用RNA内切酶MazF实现了对m⁶A的单碱基分辨率的分析^[18,19]. RNA内切酶MazF可以识别并切割ACA序列, 但不会切割m⁶ACA^[20]. m⁶A-REF-seq和MAZTER-seq直接利用MazF酶对RNA进行碎片化处理, 然后进行建库测序, 最终就可以得到一系列以ACA序列为开头的结果, 而在中间出现的ACA序列即为m⁶A的位点(图2(b))^[18,19]. m⁶A-REF-seq和MAZTER-seq的优势在于可以对m⁶A的位点实现单碱基分辨率的检测和定量分析, 特别是对于高甲基化程度或低丰度的转录本. 但之前的测序结果表明, m⁶A主要存在的保守序列为RRACH, 其中在细胞中ACA序列仅占16%~25%, 因此得到的结果并不完整^[18]. 单链RNA的二级结构、MazF酶的活性以及序列偏好性也会影响结果的准确性; 如果出现两个ACA位点位置过近, 则会导致得到的RNA碎片过小而无法建库测序, 这些都限制了其在复杂体系中的应用.

m⁶A-SEAL-seq(FTO-assisted m⁶A selective chemical labeling method)利用去甲基酶FTO的特性实现在体外标记m⁶A并进行高通量测序^[21]. FTO可以在5 min内将m⁶A氧化成hm⁶A(N⁶-hydroxy methyladenosine), 但继续氧化成f⁶A(N⁶-formyl adenosine)则需要很长时间^[22]. 利用这一特性, m⁶A-SEAL利用FTO将m⁶A转换成易于反应的hm⁶A, 通过二硫苏糖醇(DTT)进一步将hm⁶A转换成稳定的dm⁶A(N⁶-dithiolisitolmethyladenosine), 最后利用生物素试剂与dm⁶A反应, 富集原本m⁶A的RNA碎片, 建库测序得到整个转录组的m⁶A位

点信息(图2(b))^[21]. m⁶A-SEAL在水稻中还鉴定到了植物特有的m⁶A保守序列UGUAHH^[23,24]. m⁶A-SEAL中所有使用的试剂均已商业化, 并且FTO去甲基活性强, 几乎没有序列选择性^[24]. 体外标记的方法也适用于各种样品, 同时所需的RNA起始量也很少. m⁶A-SEAL不足在于操作较多、时间较长. 虽然每次转换的效率均超过50%但仍存在丢失部分数据的风险^[21]. m⁶A-SEAL的分辨率与MeRIP-seq类似, 但对比新出现的方法仍存在差距, 因此提高分辨率仍是后续改进的重点.

2.1.3 基于结合蛋白的测序技术

利用具有结合m⁶A能力的YTH结构域与胞嘧啶脱氨酶APOBEC1的DART-seq(deamination adjacent to RNA modification targets)可以实现低起始量的m⁶A高通量单碱基分辨率测序^[25]. DART-seq主要利用YTH结构域与APOBEC1的融合蛋白在细胞内去识别并结合m⁶A位点^[25]. 由于m⁶A的保守序列中m⁶A紧邻的均是C, 所以理论上APOBEC1就可以与这个m⁶A位点后的C发生脱氨反应, 在反转录过程中就会定向突变为U, 从而通过与对照组的比较实现对m⁶A的单碱基分辨率的分析(图2(c))^[25]. DART-seq的优势在于在细胞中瞬时表达融合蛋白后, 仅需要进行常规的RNA测序就可以获得m⁶A高分辨率的测序结果, 操作简便同时需要的RNA起始量大大降低, 特别适用于珍贵的样品. 由于DART-Seq需要在细胞水平上进行瞬时表达, 所以可以用来检测特定刺激下m⁶A的变化以及积累. 但对于不易或不能进行转染的材料, 体外DART-seq的效率会明显下降, 需要后续优化实验条件^[25]. DART-seq最大的问题在于使用的YTH结构域的RNA底物中只有60%左右含有m⁶A并且并不是所有含m⁶A的RNA都会被YTH结构域结合, 因此得到的数据不完整并会有很多的假阳性^[26]. YTH结构域与m⁶A结合后形成的空间位阻是否容易让APOBEC1与相邻的C反应也是需要解决的问题.

2.1.4 代谢标记的测序技术

m⁶A结构稳定、不易于化学试剂作用的特性一直是阻碍利用化学生物学策略发展m⁶A高通量测序方法的最大原因. m⁶A-label-seq采用代谢标记的策略将稳定的m⁶A结构转换成易于反应的结构, 从而实现了非抗体依赖的m⁶A的高通量测序^[16]. m⁶A-label-seq利用

含烯丙基官能团的甲基供体SAM(*S*-adenosyl methionine), 使原本的m⁶A位点变为N⁶-烯丙基腺嘌呤(N⁶-allyl-adenosine, a⁶A). 而碘在温和条件下就可以与a⁶A发生加成反应并通过自发环化得到CycA(N¹,N⁶-cyclized adenosine)^[27]. 在反转录过程中CycA无法进行正常的碱基配对, 相应的位点就会产生随机突变, 从而实现对m⁶A的单碱基分辨率的分析(图2(d))^[16]. 这种方法的优势在于利用代谢的方法对m⁶A进行标记, 不存在序列的选择性. a⁶A不会在反转录过程产生突变, 而后续碘加成反应的转换率接近100%, 因此测序结果中背景的干扰少. 将m⁶A的位点直接突变可以得到精准的m⁶A位点信息, 也利于分析成簇状分布的m⁶A. 缺点是标记效率较低, 只有正常m⁶A水平的10%, 得到的数据不完整^[16]. 由于代谢标记的方法只适用于细胞水平, 对于研究不易体外培养的细胞或者组织样品则不适用.

此外, 利用在反转录过程中含硒的dSeTTP(Se-modified deoxythymidine triphosphates)不易于m⁶A配对从而形成截断的性质, 发展了一种FTO辅助m⁶A测序方法, 但目前只适用于合成的RNA单链上m⁶A的检测, 需要后续优化实验条件才能应用于整个转录组上的m⁶A^[28].

2.2 m⁶A位点的检测技术

高通量的测序技术虽然可以快速得到数千个m⁶A位点信息, 但仍会由于测序过程出现的偏差或技术原理存在缺陷而出现假阳性或假阴性的结果, 因此也需要发展针对单基因单碱基的m⁶A位点检测的方法. 目前应用最多的分别是SCARLET(site-specific cleavage and radioactive-labeling followed by ligation-assisted extraction and thin-layer chromatography)和SELECT(single-base elongation- and ligation-based qPCR amplification method)^[8,29].

SCARLET组合了RNase H特定位置切割、放射性标记、夹板连接、薄层色谱等方法, 实现了在总RNA中精确鉴定特定基因上特定位置的m⁶A修饰程度(图2(e))^[8]. SCARLET验证了多个之前测序结果中的m⁶A位点, 并且证实甲基化程度在不同细胞中差距很大^[8]. SCARLET的优势在于可以精确地检测m⁶A的位点和甲基化程度, 但步骤复杂、实验耗时长, 放射性试剂的使用也限制了应用.

SELECT则利用 m^6A 会阻碍DNA聚合酶和连接酶的特性, 方便快捷地检测特定位置 m^6A 修饰以及程度^[29]. SELECT利用DNA聚合酶和连接酶将目标位点上下游两条互补的DNA引物连在一起, 而在这个过程中首先 m^6A 会干扰和上游引物的延伸, 其次 m^6A 也会阻碍与下游引物的连接(图2(e)). 虽然 m^6A 对每一步不是100%的抑制, 但通过两步反应则可以大大降低最终产物的含量, 最后通过QPCR分析与对照组的Ct值差距就可以检测目标位点的 m^6A 修饰以及甲基化程度^[29]. SELECT的操作简单, 所有实验均可以在一个反应体系下完成, 不需要额外的纯化步骤. 但在实验设计中需要引入对照组以及绘制标准曲线才能完成检测和定量分析.

m^6A 高通量测序技术和 m^6A 位点检测技术大大推动了 m^6A 功能的研究. 而目前发展方便快捷、高精度的 m^6A 检测技术仍是一个挑战.

3 RNA化学修饰 m^6A 在动物中的研究进展

m^6A 最早就是在小鼠的RNA上发现, 后被证实为是一种在多物种中广泛存在的RNA化学修饰^[30]. 随后在pre-mRNA中也发现了 m^6A , 明确了这一修饰发生的时间是在转录过程中或者不久后^[31].

尽管在20世纪70年代就已经发现了这一修饰, 由于技术的限制, 对其的研究十分有限, 也缺乏足够的关注. 直到发现了第一个去甲基酶FTO, m^6A 被证明是动态可逆的, 才使人们重新审视这一修饰的功能^[6]. 目前在动物中发现的 m^6A 可以被甲基转移酶(writers)、结合蛋白(readers)和去甲基酶(erasers)调控并发挥功能.

3.1 哺乳动物中 m^6A 的甲基转移酶

目前至少有两类蛋白质被发现可以进行 m^6A 修饰: METTL3(methyltransferases like 3)等多个蛋白组成的甲基转移酶复合体以及METTL16(methyltransferases like 16), 其中甲基转移酶复合体已经被证实具有RRACH的选择性^[32].

在人宫颈癌细胞系(HeLa)的细胞核提取物中分离出了一种1 MDa的 m^6A 甲基转移酶复合体组分, 它可以被分为两个亚基单元: 200 KDa左右的METTL3和800 KDa左右的METTL14. 其中METTL3具有催化中

心并可以结合SAM, 而且该蛋白序列在真核生物中是高度保守的^[33]. METTL3在不同细胞系中的分布不同, 且会随着细胞应激而重新分布. 当与METTL14以稳定二聚体的形式结合并与WTAP(Wilms' tumour 1-associating protein)相互作用时, METTL3定位于HeLa细胞的核斑点, 但实验结果显示在细胞质中仍有部分分布, 但METTL3在细胞质中并没有起到甲基转移酶的功能, 而是作为 m^6A 结合蛋白发挥功效, 可以识别mRNA 3'端UTR的 m^6A 位点, 并招募eIF3h(eukaryotic translation initiation factor 3 subunit h)促进翻译^[34-36].

METTL14是 m^6A 甲基转移酶复合体的组分之一, 它和METTL3均属于Group I N^6A -Mtases^[37]. METTL3和METTL14的甲基转移结构域紧紧地结合形成异质二聚体^[38]. METTL14在与METTL3分开情况下, 其本身只有很微弱的甲基转移活性, 而形成异质二聚体后, 催化活性会极大提高^[39]. 该二聚体的结构表明, 只有METTL3具有结合SAM的口袋, 而METTL14有结合RNA的能力. 在METTL14的C端有RCG的重复序列, 这对其结合RNA十分重要^[40].

在被证实为 m^6A 甲基转移酶复合体的组分之前, WTAP及其同源蛋白已经进行了初步的研究. WTAP最初被发现是肾母细胞瘤中的一种结合蛋白^[41], 其在果蝇中的同源蛋白Fl(2)d可以影响pre-mRNA的剪接^[31]. WTAP在拟南芥中的同源蛋白FIP37(FKBP12 INTERACTING PROTEIN 37)最早被发现与拟南芥 m^6A 甲基转移酶复合体组分MTA(即METTL3同源蛋白)存在相互作用^[42]. WTAP本身没有甲基转移酶的能力, 但敲低METTL3、METTL14和WTAP中的任何一个均会导致复合体的 m^6A 修饰能力下降, 敲低WTAP对 m^6A 修饰能力的影响最大, 揭示了其在复合体中的重要功能^[35].

通过METTL3免疫共沉淀实验发现, VIRMA(KIAA1429)存在于 m^6A 甲基转移酶复合体中^[43]. 在之前的研究中发现, 果蝇中的同源蛋白VIRILIZER可以与Fl(2)d共同作用来影响mRNA的剪接, 最终决定果蝇的性别^[44]. VIRMA可以调控3'端UTR和终止密码子附近区域的 m^6A 甲基化来影响mRNA的多聚腺苷化^[45].

在WTAP的免疫共沉淀实验中发现了一系列WTAP互作蛋白, 如VIRMA、RBM15、HAKAI、KIAA0853、BCLAF1和THRAP3^[46]. 随后RBM15被报道和 m^6A 修饰有关. 在小鼠中缺失了RBM15会导致小鼠胚胎致死^[47]. XIST是一种调控雌性X性染色体上基

因沉默的一种重要的非编码RNA. 敲低RBM15会导致m⁶A水平的下降, 同时影响XIST对X性染色体的沉默作用^[48]. 在果蝇中, RBM15的同源蛋白Nito可以影响果蝇的性别分化, 将其敲低后同样会导致m⁶A水平的下降^[49].

HAKAI最初被鉴定为E3泛素连接酶. 在细胞中敲低HAKAI后同样会导致m⁶A的下降^[45].

METTL16是U6 snRNA的甲基转移酶, 它能识别UACAGAGAA序列^[50]. 与上述庞大的甲基转移酶复合体家族不同, METTL16并不是一个广泛的甲基转移酶, 它只针对几个特定的底物, 目前报道可以作用于U6 snRNA、*MAT2A*内含子以及非编码RNA *MALAT1*的一些特定结构^[51].

甲基化的过程也受诸多因素的调控, 例如METTL3/14-WTAP复合体在多能干细胞中可以受转录因子招募, 促进相关转录本上m⁶A的生成^[52]. 组蛋白修饰H3K36me3(histone H3 trimethylation at lysine 36)可以与METTL14互作, 并招募甲基化复合体调控m⁶A位点^[53].

3.2 哺乳动物中m⁶A的去甲基酶

RNA上的修饰是否可逆是一个十分重要的问题, 第一个m⁶A去甲基酶FTO(fat mass and obesity-associated protein)的发现极大地刺激了对RNA修饰的研究. FTO最先被发现为肥胖相关蛋白. 对FTO基因进行沉默导致小鼠产生明显的脂肪组织减少和体重的减轻, 而过表达FTO后, 小鼠的进食明显增加, 并出现肥胖. 此外, 敲除FTO后会导致小鼠生长缓慢并出现各种畸形^[54,55].

全基因组关联分析(GWAS)显示FTO和人类肥胖、代谢失调以及神经疾病有关, 推动人们去研究其分子机制和生理底物^[56]. FTO属于Fe(II)/ α -KG依赖性的双加氧酶超家族. 在体外实验中, 最开始其被认为是其他甲基化修饰碱基的去甲基酶^[57]. 随后, 在体内实验证实其是m⁶A的去甲基酶. FTO首先氧化m⁶A形成hm⁶A, 紧接着继续将其氧化为f⁶A, 两者均可以通过释放甲醛或者甲酸的形式转变为未修饰的A^[22]. 除了以m⁶A为底物, FTO同样可以催化氧化m⁶A_m(N⁶,2'-O-dimethyladenosine)以及tRNA上的m¹A(N¹-methyladenosine)^[58,59]. FTO选择去甲基的底物与其在细胞中的定位有关. 在细胞核内FTO的底物为mRNA内部的

m⁶A、snRNA上的m⁶A和m⁶A_m, 而在细胞质中为mRNA内部的m⁶A和Cap区的m⁶A_m^[59]. 随后通过对FTO-核酸复合物晶体结构的解析发现, FTO的催化口袋更倾向于结合m⁶A修饰碱基. 在相同的RNA序列中, FTO对于m⁶A和m⁶A_m的催化活性是一致的, 而在Cap区域, FTO对于m⁶A_m的高活性是由于Cap区域的特殊结构容易吸引FTO导致的, 与m⁶A和m⁶A_m五碳糖环上的差异无关^[24]. 利用光交联探针技术探究FTO的互作蛋白, 发现SFPQ(splicing factor, proline- and glutamine-rich)可以识别CUGUG序列并招募FTO对其临近m⁶A进行去甲基化反应, 是一种全新的调控FTO底物选择性的机制^[60].

ALKBH5(alkylation repair homologue protein 5)是第二个被发现的m⁶A去甲基酶, 其同样也属于Fe(II)/ α -KG依赖性的双加氧酶超家族^[61]. ALKBH5主要在雄鼠中的睾丸组织高表达, ALKBH5的缺失会导致精子畸变^[62]. 而FTO在脑中高表达, 组织间ALKBH5和FTO表达差异可能是这两种m⁶A去甲基酶参与不同生物途径的原因之一. 与FTO相比, ALKBH5与底物的结合更加紧密^[63]. ALKBH5影响RNA的稳定, 在细胞中敲低ALKBH5会导致多聚腺苷化的RNA出核数目增加. 它同时还会影响新生成的mRNA的合成以及剪接的比例^[61].

3.3 哺乳动物中m⁶A的结合蛋白

m⁶A介导的生物学功能离不开相关蛋白识别与结合. YTH(YT521-B)结构域家族蛋白可以直接识别m⁶A修饰, 并广泛存在于多个物种中. 通过m⁶A结合实验, 利用甲基化的RNA探针先后发现了多个YTH结构域蛋白, 随后的研究表明YTH家族通过识别m⁶A参与了多种生物过程^[10].

YTHDF2是第一个被证实具有m⁶A结合能力的蛋白. YTHDF2可以调控降低目标mRNA的稳定性^[26]. 通过CLIP实验证实YTHDF2主要识别目标RNA上的RRACH序列. YTHDF2结合的RNA和m⁶A测序的结果有半数以上重复, 揭示了YTHDF2和m⁶A之间的关系. 随后的研究表明YTHDF2结合m⁶A后会招募CCR4-NOT去腺苷化来降低目的mRNA的稳定性^[64](图3).

和YTHDF2相比, YTHDF1对RNA稳定性的影响很小, 主要对RNA的翻译起作用^[65]. 蛋白组学分析表明YTHDF1的互作蛋白超过1/2都与RNA的翻译有关. YTHDF1可以与eIFs结合并促进翻译(图3). 有趣的是,

图 3 动物和植物中m⁶A结合蛋白功能示意图(网络版彩图)
Figure 3 Regulatory roles of the m⁶A binding protein in plants and mammals (color online).

YTHDF1和YTHDF2在同源序列上高度相似，但表现出近乎相反的生物学功能，揭示了RNA上m⁶A修饰具有多种调控的功能。

YTHDF3结合的RNA有1/2以上与YTHDF1、YTHDF2的重合, 这表明这三者存在协同作用。YTHDF3可以与YTHDF1一起促进底物RNA的翻译。当YTHDF3的表达量降低时, YTHDF1或YTHDF2对于底物的特异性结合会下降, 这说明YTHDF3可以辅助另两个YTHDF蛋白实现各自的生物功能^[66](图3)。

与分布在细胞质中的YTHDF1和YTHDF2不同, YTHDC1主要分布在细胞核中, 参与pre-mRNA的剪接成熟过程^[67]. YTHDC1可以与许多剪接因子互作(SRSF1/3/9/7/10). 其中SRSF3/10可以影响RNA的可变剪接过程, 但它们的作用却是相反的, SRSF3促进剪接而SRSF10抑制这一过程. 实验证实了SRSF3、SRSF10和YTHDC1有相同的空间分布, 并且SRSF3和SRSF10可以竞争性地与YTHDC1结合, 证实了当有m⁶A存在时, YTHDC1/SRSF3可以被招募从而促进剪接, 而当m⁶A修饰缺失时, SRSF10则被招募, 避免剪接的发生(图3)^[67].

YTHDC1不仅在pre-mRNA的剪接中起作用, 其同样参与到非编码RNA的调控中. XIST上有丰富的m⁶A甲基化修饰, 可以被YTHDC1识别并促进其基因沉默的功能^[48](图3). 此外, YTHDC1也参与甲基化mRNA的出核运输. 晶体结构表明, YTHDC1的N端参与pre-mRNA的剪接, 而C端可以调控RNA的出核^[68](图3).

YTHDC2比其他YTH家族蛋白要大得多(160 kDa, 其余YTH蛋白在60~85 kDa). YTHDC2也是唯一一个具有RNA解旋结构域的YTH家族蛋白, 预示着它可能影响RNA的二级结构^[69]. YTHDC2同时具有YTHDF1和YTHDF2的功能, 可以降低RNA的稳定性和促进RNA的翻译(图3). 敲除YTHDC2后老鼠的睾丸组织和卵巢组织发育不良, 并出现不育的表型^[69].

IGF2BPs(insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein)家族是一类不含YTH结构域的m⁶A结合蛋白, 包含IGF2BP1/2/3^[70]. 尽管不含YTH结构域, 但其仍表现出了优先结合GGAC序列上m⁶A修饰的能力, 并增加底物mRNA的稳定性. IGF2BPs具有6个RNA结合域, 其中的KH结构域对m⁶A的识别与结合最为重要. 这一特殊的识别机理仍待研究. 在热刺激条件下,

IGF2BPs倾向定位在压力小体中,表明其可能具有储存mRNA的功能^[70](图3)。

HNRNPA2B1也是一类不含YTH结构域的m⁶A结合蛋白^[71]。m⁶A修饰除了存在于mRNA上,在小RNA上也有分布,且有重要的作用。HNRNPA2B1是新发现的一种核定位的m⁶A识别蛋白,参与miRNA的形成。当敲低HNRNPA2B1后,成熟的miRNA上的m⁶A分布减少,未成熟的pre-miRNA出现累积,这一点和METTL3比较相似。此外,敲除HNRNPA2B1和METTL3在RNA的可变剪接方面出现了相近的结果。测序结果确定了HNRNPA2B1的结合序列和m⁶A的序列有高度重合。后续的生化实验证明HNRNPA2B1可以结合RNA,同时结合可以招募与pri-miRNA加工有关蛋白。不仅如此,还证实了一系列miRNA(miR106b、miR17、miR222)确实可以被m⁶A修饰和被HNRNPA2B1调控^[71](图3)。这有力地证明了miRNA受m⁶A及识别蛋白的调控,扩展了m⁶A调控RNA的种类。HNRNPA2B1虽不具有YTH结构域仍能够识别m⁶A,其分子机制是个值得研究的方向。

eIF3可以直接结合m⁶A位点,在交联实验中发现eIF3倾向于结合含有m⁶A的RNA,CLIP数据显示eIF3位点与5'UTR区m⁶A位点有约35%的重合,因此证实了其m⁶A结合蛋白。通常mRNA的翻译离不开结合在Cap区的eIF4E,而eIF3可以通过结合m⁶A位点独立完成这一功能^[72](图3)。

一些蛋白可以通过RNA的结构而不是m⁶A修饰本身来识别m⁶A。m⁶A会影响碱基的互补配对,从而导致RNA的二级结构变化。HNRNPC可以结合一种由多聚U形成的“发卡”状RNA中的m⁶A^[73]。m⁶A破坏了RNA二级结构的稳定性,增强了HNRNPC与RNA结合的能力,被称为“m⁶A-switch”(图3)。实验证明了“m⁶A-switch”主要集中于内含子区域,并且同时具有GRACH和ploy-U的序列,这是HNRNPC特有的识别序列。METTL3/14敲除后,HNRNPC-RNA结合能力降低。这一独特的机制极大地扩展了我们研究m⁶A及其识别蛋白的思路。

4 RNA化学修饰m⁶A在植物中的功能研究

与动物中的研究类似,以拟南芥为主的高等植物中也发现了多种m⁶A的调控蛋白。研究m⁶A影响植物

功能的实验方法主要包括同源基因分析、突变体寻找、高通量测序分析等。通过研究植物中的m⁶A调控蛋白,m⁶A调控基因表达的功能也逐渐被揭示,为进一步研究植物生长发育功能和应激响应方面提供了新的方向^[74]。

m⁶A在拟南芥RNA中的分布与在动物中的类似,主要分布在靠近终止密码子的区域和3端的UTR,并且呈现保守的RRACH的序列,但不同组织中的m⁶A含量差别很大^[75]。在拟南芥中大约有2/3的转录本上含有m⁶A并且这些转录本多与应激响应、氧化还原、调控因子和转运蛋白相关^[75]。与动物相比,m⁶A在拟南芥中的研究相对滞后,但拟南芥生长周期短、基因组小、性状明显、后代多的特点以及拥有庞大的商业化突变体库,这些均说明拟南芥是一种研究m⁶A功能,特别是研究m⁶A与遗传、发育、胁迫响应等方面很好的实验材料,同时m⁶A在植物中的功能研究也可以为在动物中的研究提供思路与方向。

4.1 拟南芥中m⁶A甲基转移酶

与动物一致,拟南芥中同样存在甲基转移酶复合物。MTA(METHYLTRANSFERASE A)作为METTL3的同源蛋白是第一个在拟南芥中被发现具有m⁶A甲基转移酶活性的蛋白,同时MTA的发现也促进了动物中甲基转移酶和去甲基酶的研究^[76]。MTA主要表达在拟南芥细胞分裂旺盛的组织和器官中,如生殖器官、顶端分生组织和侧根,而在这些组织中的m⁶A含量也明显高于其他组织器官^[76]。敲除MTA明显减少m⁶A的含量并且会抑制胚胎发育导致胚胎死亡,而回补植株虽然可以生长,但顶端优势和根的发育均受到影响,这些植株花的数目、大小和形态也明显与野生型不同^[77]。通过酵母双杂,FIP37(WTAP的同源蛋白)最早被发现与MTA具有相互作用^[42]。随着人体细胞中WTAP作为m⁶A甲基转移酶复合体组分的功能被证实,拟南芥FIP37的功能研究也被揭示^[42,76]。FIP37主要表达在顶芽、嫩叶、花和种子等细胞分化旺盛的组织中,而亚细胞定位则表明FIP37主要表达在这些组织的细胞核中^[42]。FIP37作为m⁶A甲基转移酶组分,与mta一致,纯合的fip37突变体也是致死的。特异性回补的fip37突变体会出现顶端分生组织过度增殖的表型,主要是因为调控的STM(SHOOT MERISTEMLESS)和WUS(WUSCHEL)表达量明显上升,而FIP37可以对其

mRNA进行m⁶A甲基化来促进mRNA的降解^[42]。

随后通过同源分析, 鉴定出了越来越多的甲基转移酶复合物的组分, 其中包括METTL14的同源蛋白MTB(METHYLTRANSFERASE B)、VIRMA同源蛋白VIR(VIRILIZER)和E3泛素连接酶HAKAI^[78]。这些基因的突变体中的m⁶A水平都有明显下降, 并且下降程度与维管、木质部发育受损正相关。虽然HAKAI的突变体受影响程度最轻, 但与其他突变体杂交后代会出现更严重的发育受损表型^[78]。

4.2 拟南芥中m⁶A去甲基酶

在动物中承担m⁶A去甲基功能的主要是AlkB家族蛋白FTO和ALKBH5, 在拟南芥中一共有13个同源蛋白, 其中与ALKBH5同源的有5个, 分别是ALKBH9A/9B/9C/10A/10B^[79,80]。

ALKBH9B是最早被证实在体外可以去除单链RNA上的m⁶A的蛋白^[81]。ALKBH9B可以结合苜蓿花叶病毒(alfalfa mosaic virus, AMV)的外壳蛋白和其RNA并消除m⁶A。alkbh9b突变体植株相比于野生型, 病毒RNA和外壳蛋白的水平均明显下降, 因此对AMV的侵染具有更强的抵抗能力。随后通过RIP实验证实AMV在侵染过程中RNA会被修饰上m⁶A, 并且在突变体中病毒RNA上的m⁶A水平明显上升, 这表明AMV可以利用ALKBH9B去除其RNA上的m⁶A来增强侵染能力^[81]。虽然通过实验证实ALKBH9B可以定位在细胞质中的P-body, 但并没有发现其在拟南芥中的底物, 并且突变体中的m⁶A含量没有明显的变化。而关于ALKBH10B的研究则充分很多。

ALKBH10B在拟南芥中的各个组织均有表达, 在花中的表达量最高。体外去甲基实验表明ALKBH10B可以去除单链RNA和拟南芥提取的RNA上的m⁶A, 而将酶活中心保守的Fe²⁺结合位点突变后, 去甲基活性消失, 这也与ALKBH5的结果一致^[80]。alkbh10b突变体中mRNA上的m⁶A水平在各个组织中均有上升。突变体会出现晚花的表型, 主要是由于控制开花的调控因子FT(FLORING LOCUS T)、SPL3和SPL9(SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN LIKE 3 and 9)的mRNA含量下降但甲基化的程度上升。在突变体中这些mRNA上增加的m⁶A会加速RNA的降解, 而在野生型中ALKBH10B可以去除这些mRNA上的m⁶A, 从而增加其稳定性, 最终调控开花的时间^[80]。

4.3 拟南芥中m⁶A结合蛋白

在拟南芥中m⁶A可以作为稳定RNA的一种转录后修饰。当缺少了m⁶A修饰, 多种mRNA的稳定性和含量均会大大降低。在盐刺激下, 一些编码响应渗透压和盐刺激蛋白的mRNA上的m⁶A修饰会大大增加并会导致对应的mRNA更加稳定^[82]。m⁶A还可以通过多种调控蛋白来影响RNA的稳定性。

目前证实存在m⁶A结合能力的蛋白结构域主要是YTH结构域, 而在拟南芥中共有13个蛋白含有YTH结构域, 其中大部分属于ECT(CONSERVED C-TERMINAL REGION)家族蛋白^[83]。拟南芥中与动物的YTH结构域序列高度保守, 其中连续的色氨酸均是结合m⁶A的关键位点, 因此拟南芥中这些含有YTH结构域的蛋白都具有结合m⁶A的潜在功能^[26,65]。ECT2目前是在拟南芥中唯一被证实的m⁶A结合蛋白^[23,84,85]。ECT2在多种组织中均有表达, 在细胞分裂旺盛的区域表达量较高^[86]。体外实验证实ECT2可以结合含m⁶A的RNA^[23,26]。ect2突变体叶片的表皮毛分叉数明显多于野生型并且叶片的发育受损, 这些表型存在冗余性, 当同时敲除ECT2/3/4得到的植株表型更加明显^[23,86,87]。通过开发的FA-CLIP技术(formaldehyde cross-linking and immunoprecipitation), 鉴定到了数千个ECT2结合RNA底物, 主要位于3'端UTR, 其中包括控制表皮毛分叉数的多个基因^[23]。通过m⁶A-seq和RNA-seq的测序数据分析以及单基因m⁶A验证、基因表达量及稳定性实验证实ECT2通过结合控制表皮毛分叉数相关基因mRNA上m⁶A提高mRNA稳定性, 从而最终影响了表皮毛的形态与数量(图3)^[23]。

ECT2在亚细胞层面可以定位在细胞核和细胞质中, 预示着ECT2可能存在多种功能; 同时利用FA-CLIP、体外酶活实验及EMSA实验, 揭示ECT2结合的m⁶A保守序列并不是传统的RRACH, 而是特有的UR-UAY, 这些都预示着在m⁶A调控拟南芥的生理活动机理可能与动物的不同。m⁶A发挥生物功能主要通过结合蛋白, 而在拟南芥中存在13个潜在的结合蛋白预示着m⁶A对拟南芥多种生理活动存在调控作用。这些蛋白的功能的揭示会极大地推动m⁶A在拟南芥中的生物功能研究。

5 RNA化学修饰m⁶A介导的生物学功能

m⁶A是一种动态可逆的RNA化学修饰, 其调控机

理复杂多样, 预示着其所介导的生物学功能也十分复杂. 近年的研究表明m⁶A参与了诸多生理过程的调控, 如细胞分化、肿瘤发生、病毒免疫等, 其与人类健康息息相关, 因此愈发引起人们的注意.

5.1 m⁶A调控细胞分化

m⁶A在胚胎和成体干细胞(ESCs)分化中的起关键作用. METTL3和METTL14的下调均促进了自我更新的维持和分化受损^[84]. 然而, 有研究组发现, m⁶A的降低导致小鼠ESCs和小鼠胚胎成纤维细胞自我更新能力的丧失^[85,88]. 导致这一矛盾结果的原因是m⁶A在干细胞分化中的调节作用依赖于细胞状态, 而不同的ESCs中转录组的表达和甲基化存在差异. 这一矛盾的事实表明m⁶A的生物学效应高度依赖于细胞类型和细胞状态.

5.2 m⁶A调控癌症的发展

癌症是人类健康的重大威胁, 近年来探究m⁶A与癌症间的研究成为热门. m⁶A及其相关蛋白功能复杂, 癌症细胞类型多样, 可以预见m⁶A在癌症调节中的扮演了复杂的角色.

一方面, m⁶A修饰可抑制肿瘤的发生. 例如, 在恶性胶质瘤中, 降低FTO活性、上调m⁶A水平可抑制肿瘤发生, 敲低METTL3/METTL14则有相反的效果^[89]. 此外, 一些促癌基因受m⁶A调控, m⁶A的存在降低其稳定性, 可抑制肿瘤的发生^[90]. 在乳腺癌中, 缺氧的条件导致ALKBH5上调, 导致m⁶A水平下降, 稳定性增加, 最终可促进肿瘤的生长^[91,92]. 在宫颈癌中, FTO显著高表达, m⁶A下降, 连环素表达下调, 表现出对化疗的抗性.

另一方面, m⁶A修饰同样会促进肿瘤的发生. 例如, 在肝癌(HCC)中, METTL3高表达, 高m⁶A水平促使抑癌基因被YTHDF2降解, 促进了肿瘤的发生. 同样在肺癌中, METTL3高表达, 增强了致癌基因的翻译, 促进了肿瘤细胞的生长^[93].

在急性髓性白血病(AML)中的情况更为复杂, 甲基转移酶METTL3表达水平升高, 导致BCL2和PTEN转录本上m⁶A甲基化水平升高, 从而促进其翻译, 改变PI3K/AKT信号通路, 从而调控细胞分化和自我更新^[94]. METTL3还增强了致癌基因SP1的m⁶A修饰和表达, 调控了c-MYC的表达^[95]. 与之类似, AML中METTL14也存在表达升高的现象, 可增强MYB和MYC的表达, 从

而阻止髓系分化^[96]. WTAP升高可促进细胞增殖并抑制AML细胞分化^[97]. 相反地, 在其他AML亚型中, 去甲基酶FTO的表达也升高, 导致ASB2和RARA转录本非翻译区上m⁶A水平下调, 降低其mRNA和蛋白水平, 抑制了其正常造血的功能^[98]. 此外, FTO通过下调m⁶A水平, 可抑制YTHDF2介导的mRNA降解, 促进MYC的稳定性, 参与白血病的发生^[99].

5.3 m⁶A调控RNA病毒侵袭

与真核生物不同, 大部分病毒的遗传物质就是RNA. RNA上的可逆化学修饰在病毒的生命周期中会起到非常重要的作用. 例如, 寨卡病毒(ZIKV)、丙型肝炎病毒(HCV)、艾滋病毒(HIV-1)等RNA病毒基因组上均检测到m⁶A修饰的存在^[100-102].

HIV病毒侵染宿主细胞后会自身和宿主细胞的m⁶A水平上升. 敲低ALKBH5或METTL3/14来影响m⁶A的水平会促进或抑制HIV的复制. 后续报道HIV的RNA上的m⁶A会增加HIV蛋白的结合能力, 促进HIV的复制^[103]. ZIKV基因组RNA上也有12个m⁶A位点. 与HIV病毒相反, 敲除宿主细胞的去甲基酶会抑制ZIKV的复制, 敲除宿主的甲基酶, ZIKV的复制速度增加^[100]. 沉默YTHDF1-3蛋白后, ZIKV的复制增加. 其中YTHDF2的作用最明显, 这表明宿主可能会通过m⁶A来响应病毒的入侵. 和ZIKV病毒相似, m⁶A也是丙肝病毒HCV的抑制剂^[102]. 敲除宿主的METTL3/14后, HCV病毒颗粒的数量明显增多. 除此以外, 研究表明HCV本身的转录和翻译并不受影响, 这预示着m⁶A可干预HCV病毒的组装和转运.

此外, 近年的研究还表明m⁶A直接或间接地参与了固有免疫的调节. 例如, HMPV病毒上存在m⁶A修饰位点, 可以阻止RIG-I的寡聚结合, 抑制了固有免疫的识别环节, 从而帮助病毒逃避免疫^[103]. 水泡性口炎病毒(VSV)可以促使宿主DDX46招募ALKBH5对抗病毒转录本进行去甲基化, 下调m⁶A水平, 并抑制其出核, 最终逃避免疫^[104]. 此外, VSV入侵还导致宿主降低ALKBH5蛋白的活性, 进而影响免疫代谢产物衣康酸的累积, 增强免疫反应, 抑制病毒复制^[105].

6 总结与展望

表观转录组学是一个新兴的学科, 以m⁶A为代表

RNA化学修饰调控了诸多生物过程,影响RNA的转录、剪接、出核、翻译以及稳定性等功能. 尽管我们已经揭开了这一领域“面纱”的一角,仍有大量的工作可以继续挖掘.

目前对 m^6A 的检测和测序对样品的质量要求还是较高,rRNA的污染问题严重,且样品起始量较大,既难以进行单细胞测序,也难以广泛应用到珍贵的临床样本上,在分辨率上单碱基分辨率的实现也比较困难,极大地制约了这一领域的发展.

虽然在动物中 m^6A 的调控蛋白研究较多,但具体调控 m^6A 的机理仍有空白.而在植物中关于 m^6A 调控蛋白的研究仍不充分,寻找在动物与植物中未被发现的 m^6A 调控蛋白仍是值得研究的方向. m^6A 在植物体内的功能目前研究仍存在开始阶段,但 m^6A 对植物的生长发育的调控具有十分重要的功能,可能在作物增产、抗逆和防虫病害等领域发挥作用,有很大的应用潜力.

此外,表观转录组“跨域”发展十分火热.表观遗传学与表观转录组学密切相关,已有报道DNA上 m^5C 修饰,组蛋白乙酰化修饰与RNA上 m^6A 修饰能互相影响^[53,106],这值得我们进一步研究,完善中心法则. m^6A 修饰与人类健康息息相关, m^6A 参与了癌症的发生发展以及病毒免疫过程,但这一方面的认知仍十分有限,深入探究也许可以提供一些防治的新思路.

目前研究 m^6A 生物功能的主要方法是敲除、敲低或过表达 m^6A 调控蛋白,这虽然能从整体上研究 m^6A 的程度对生命活动的影响,但并不能区分单独序列和位点上 m^6A 修饰的功能,阻碍了进一步研究 m^6A 的调控机理.以CRISPR-Cas蛋白为主的基因编辑技术极大地推动了相关领域的发展,同时也为我们提供了精确识别核酸序列的系统.利用CRISPR-dCas9系统融合甲基转移酶可以实现对特定序列、特定位点添加 m^6A 修饰;同样的,融合去甲基酶也可以实现精准地去甲基^[107].使用RCas9和FTO的融合蛋白同样可以去除特异位点上的 m^6A ^[108].利用CRISPR-Cas9系统最大的问题在于需要PAM(PAMer)序列,然而利用不需要PAM序列的Cas13则可以进一步拓宽序列的选择性.利用

CRISPR-dCas13与ALKBH5或METTL3-METTL14的融合蛋白也可以实现对 m^6A 的定向编辑^[109,110].通过这些定向 m^6A 编辑系统,发现不同位置的 m^6A 会影响RNA的翻译和稳定性^[107~110].利用CRISPR-Cas系统与 m^6A 调控蛋白可以实现对 m^6A 的定向编辑,为研究特定生命活动如胚胎发育、细胞分化中关键因子上 m^6A 的功能提供了新的方法,同时这种技术也为后续临床RNA治疗方案提供了新思路.然而脱靶效应、sgRNA的选择、融合蛋白的结构都会影响最终的实验结果,因此发展普适性好、特异性高的 m^6A 定点修饰方法需要更多的努力.

通过化学小分子影响 m^6A 相关蛋白进而调控 m^6A 水平也是一个有潜力同时充满挑战的科研切入点.针对FTO和ALKBH5有抑制效果的小分子已经有不少报道,如大黄酸(rhein)、柠檬酸盐等,在体内或体外实验中能抑制 m^6A 的去甲基化反应^[62,111].后续选择性更强的抗炎药物甲氯芬那酸(meclofenamic acid, MA)以及在此之上发展的FB23和FB23-2可以特异性地针对FTO而对ALKBH5的效果不明显,给我们提供了更多可操作的空间^[112,113].FB23和FB23-2可以在AML中抑制FTO活性,调控 m^6A 水平并影响如ASB2、RARA、MYC等关键基因的表达,最终抑制白血病的发展.在PDX(patient-derived xeno-transplantation)小鼠模型上表现出了抗白血病的活性,而且没有明显的副作用,有很强的临床潜力^[113].另一组研究从FTO晶体结构出发,利用虚拟筛选技术从26000个化合物中成功筛选出2个FTO特异性抑制剂,可以明显抑制白血病细胞的增殖,而且具有广谱抗癌性,对乳腺癌、胰腺癌、胶质母细胞瘤等实体瘤均有明显效果^[114].相比于基因编辑、RNAi等生物手段,利用小分子进行化学调控在操作上更加的简便,与临床研究也更为紧密,但现有的小分子在选择性和活性上仍不能令人满意,有很大的进步空间,值得深入研究.

总之,以 m^6A 为首的表观转录组学方兴未艾, m^6A 相关领域研究的不断深入有助于我们进一步理解生命活动的奥秘.

参考文献

- 1 Duan H, Wang Y, Jia G. *WIREs RNA*, 2019, 10: e1507
- 2 Jones PA. *Nat Rev Genet*, 2012, 13: 484–492

- 3 Kouzarides T. *Cell*, 2007, 128: 693–705
- 4 Machnicka MA, Milanowska K, Osman Oglou O, Purta E, Kurkowska M, Olchowik A, Januszewski W, Kalinowski S, Dunin-Horkawicz S, Rother KM, Helm M, Bujnicki JM, Grosjean H. *Nucl Acids Res*, 2013, 41: D262–D267
- 5 Yue Y, Liu J, He C. *Genes Dev*, 2015, 29: 1343–1355
- 6 Jia G, Fu Y, Zhao X, Dai Q, Zheng G, Yang Y, Yi C, Lindahl T, Pan T, Yang YG, He C. *Nat Chem Biol*, 2011, 7: 885–887
- 7 Wei CM, Moss B. *Biochemistry*, 1977, 16: 1672–1676
- 8 Liu N, Parisien M, Dai Q, Zheng G, He C, Pan T. *RNA*, 2013, 19: 1848–1856
- 9 Li X, Xiong X, Yi C. *Nat Methods*, 2016, 14: 23–31
- 10 Dominissini D, Moshitch-Moshkovitz S, Schwartz S, Salmon-Divon M, Ungar L, Osenberg S, Cesarkas K, Jacob-Hirsch J, Amariglio N, Kupiec M, Sorek R, Rechavi G. *Nature*, 2012, 485: 201–206
- 11 Meyer KD, Saletore Y, Zumbo P, Elemento O, Mason CE, Jaffrey SR. *Cell*, 2012, 149: 1635–1646
- 12 Molinie B, Wang J, Lim KS, Hillebrand R, Lu Z, Van Wittenberghe N, Howard BD, Daneshvar K, Mullen AC, Dedon P, Xing Y, Giallourakis CC. *Nat Methods*, 2016, 13: 692–698
- 13 Chen K, Lu Z, Wang X, Fu Y, Luo GZ, Liu N, Han D, Dominissini D, Dai Q, Pan T, He C. *Angew Chem Int Ed*, 2015, 54: 1587–1590
- 14 Ke S, Alemu EA, Mertens C, Gantman EC, Fak JJ, Mele A, Haripal B, Zucker-Scharff I, Moore MJ, Park CY, Vågbo CB, Kusnierczyk A, Klungland A, Darnell Jr. JE, Darnell RB. *Genes Dev*, 2015, 29: 2037–2053
- 15 Linder B, Grozhik AV, Olarerin-George AO, Meydan C, Mason CE, Jaffrey SR. *Nat Methods*, 2015, 12: 767–772
- 16 Shu X, Cao J, Cheng M, et al. A metabolic labeling method detects m⁶A transcriptome-wide at single base resolution. *Nat Chem Biol*, 2020, 16: 887–895
- 17 Koh CWQ, Goh YT, Goh WSS. *Nat Commun*, 2019, 10: 5636
- 18 Garcia-Campos MA, Edelheit S, Toth U, Saфра M, Shachar R, Viukov S, Winkler R, Nir R, Lasman L, Brandis A, Hanna JH, Rossmanith W, Schwartz S. *Cell*, 2019, 178: 731–747.e16
- 19 Zhang Z, Chen LQ, Zhao YL, Yang CG, Roundtree IA, Zhang Z, Ren J, Xie W, He C, Luo GZ. *Sci Adv*, 2019, 5: eaax0250
- 20 Imanishi M, Tsuji S, Suda A, Futaki S. *Chem Commun*, 2017, 53: 12930–12933
- 21 Wang Y, Xiao Y, Dong S, Yu Q, Jia G. *Nat Chem Biol*, 2020, 16: 896–903
- 22 Fu Y, Jia G, Pang X, Wang RN, Wang X, Li CJ, Smemo S, Dai Q, Bailey KA, Nobrega MA, Han KL, Cui Q, He C. *Nat Commun*, 2013, 4: 1798
- 23 Wei LH, Song P, Wang Y, Lu Z, Tang Q, Yu Q, Xiao Y, Zhang X, Duan HC, Jia G. *Plant Cell*, 2018, 30: 968–985
- 24 Zhang X, Wei LH, Wang Y, Xiao Y, Liu J, Zhang W, Yan N, Amu G, Tang X, Zhang L, Jia G. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, 116: 2919–2924
- 25 Meyer KD. *Nat Methods*, 2019, 16: 1275–1280
- 26 Wang X, Lu Z, Gomez A, Hon GC, Yue Y, Han D, Fu Y, Parisien M, Dai Q, Jia G, Ren B, Pan T, He C. *Nature*, 2014, 505: 117–120
- 27 Shu X, Dai Q, Wu T, Bothwell IR, Yue Y, Zhang Z, Cao J, Fei Q, Luo M, He C, Liu J. *J Am Chem Soc*, 2017, 139: 17213–17216
- 28 Hong T, Yuan Y, Chen Z, Xi K, Wang T, Xie Y, He Z, Su H, Zhou Y, Tan ZJ, Weng X, Zhou X. *J Am Chem Soc*, 2018, 140: 5886–5889
- 29 Xiao Y, Wang Y, Tang Q, Wei L, Zhang X, Jia G. *Angew Chem Int Ed*, 2018, 57: 15995–16000
- 30 Desrosiers R, Friderici K, Rottman F. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1974, 71: 3971–3975
- 31 Granadino B, Campuzano S, Sánchez L. *EMBO J*, 1990, 9: 2597–2602
- 32 Liu N, Pan T. *Translational Res*, 2015, 165: 28–35
- 33 Bokar JA, Rath-Shambaugh ME, Ludwiczak R, Narayan P, Rottman F. *J Biol Chem*, 1994, 269: 17697–17704
- 34 Bokar JA, Shambaugh ME, Polayes D, Matera AG, Rottman FM. *RNA*, 1997, 3: 1233–1247
- 35 Ping XL, Sun BF, Wang L, Xiao W, Yang X, Wang WJ, Adhikari S, Shi Y, Lv Y, Chen YS, Zhao X, Li A, Yang Y, Dahal U, Lou XM, Liu X, Huang J, Yuan WP, Zhu XF, Cheng T, Zhao YL, Wang X, Danielsen JMR, Liu F, Yang YG. *Cell Res*, 2014, 24: 177–189
- 36 Choe J, Lin S, Zhang W, Liu Q, Wang L, Ramirez-Moya J, Du P, Kim W, Tang S, Sliz P, Santisteban P, George RE, Richards WG, Wong KK, Locker N, Slack FJ, Gregory RI. *Nature*, 2018, 561: 556–560
- 37 Iyer LM, Zhang D, Aravind L. *BioEssays*, 2016, 38: 27–40
- 38 Schöller E, Weichmann F, Treiber T, Ringle S, Treiber N, Flatley A, Feederle R, Bruckmann A, Meister G. *RNA*, 2018, 24: 499–512
- 39 Liu J, Yue Y, Han D, Wang X, Fu Y, Zhang L, Jia G, Yu M, Lu Z, Deng X, Dai Q, Chen W, He C. *Nat Chem Biol*, 2014, 10: 93–95
- 40 Wang X, Feng J, Xue Y, Guan Z, Zhang D, Liu Z, Gong Z, Wang Q, Huang J, Tang C, Zou T, Yin P. *Nature*, 2016, 534: 575–578

- 41 Little NA, Hastie ND, Davies RC. *Human Mol Genet*, 2000, 9: 2231–2239
- 42 Shen L, Liang Z, Gu X, Chen Y, Teo ZWN, Hou X, Cai WM, Dedon PC, Liu L, Yu H. *Dev Cell*, 2016, 38: 186–200
- 43 Schwartz S, Mumbach MR, Jovanovic M, Wang T, Maciag K, Bushkin GG, Mertins P, Ter-Ovanesyan D, Habib N, Cacchiarelli D, Sanjana NE, Freinkman E, Pacold ME, Satija R, Mikkelsen TS, Hacohen N, Zhang F, Carr SA, Lander ES, Regev A. *Cell Rep*, 2014, 8: 284–296
- 44 Ortega A, Niksic M, Bachi A, Wilm M, Sánchez L, Hastie N, Valcárcel J. *J Biol Chem*, 2003, 278: 3040–3047
- 45 Yue Y, Liu J, Cui X, Cao J, Luo G, Zhang Z, Cheng T, Gao M, Shu X, Ma H, Wang F, Wang X, Shen B, Wang Y, Feng X, He C, Liu J. *Cell Discov*, 2018, 4: 10
- 46 Horiuchi K, Kawamura T, Iwanari H, Ohashi R, Naito M, Kodama T, Hamakubo T. *J Biol Chem*, 2013, 288: 33292–33302
- 47 Raffel GD, Mercher T, Shigematsu H, Williams IR, Cullen DE, Akashi K, Bernard OA, Gilliland DG. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 6001–6006
- 48 Patil DP, Chen CK, Pickering BF, Chow A, Jackson C, Guttman M, Jaffrey SR. *Nature*, 2016, 537: 369–373
- 49 Yan D, Perrimon N. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112: 11606–11611
- 50 Pendleton KE, Chen B, Liu K, Hunter OV, Xie Y, Tu BP, Conrad NK. *Cell*, 2017, 169: 824–835.e14
- 51 Li X, Xiong X, Zhang M, Wang K, Chen Y, Zhou J, Mao Y, Lv J, Yi D, Chen XW, Wang C, Qian SB, Yi C. *Mol Cell*, 2017, 68: 993–1005.e9
- 52 Bertero A, Brown S, Madrigal P, Osnato A, Ortmann D, Yiangou L, Kadiwala J, Hubner NC, de los Mozos IR, Sadée C, Lenaerts AS, Nakanoh S, Grandy R, Farnell E, Ule J, Stunnenberg HG, Mendjan S, Vallier L. *Nature*, 2018, 555: 256–259
- 53 Huang H, Weng H, Zhou K, Wu T, Zhao BS, Sun M, Chen Z, Deng X, Xiao G, Auer F, Klemm L, Wu H, Zuo Z, Qin X, Dong Y, Zhou Y, Qin H, Tao S, Du J, Liu J, Lu Z, Yin H, Mesquita A, Yuan CL, Hu YC, Sun W, Su R, Dong L, Shen C, Li C, Qing Y, Jiang X, Wu X, Sun M, Guan JL, Qu L, Wei M, Müschen M, Huang G, He C, Yang J, Chen J. *Nature*, 2019, 567: 414–419
- 54 Dina C, Meyre D, Gallina S, Durand E, Körner A, Jacobson P, Carlsson LMS, Kiess W, Vatin V, Lecoeur C, Delplanque J, Vaillant E, Pattou F, Ruiz J, Weill J, Levy-Marchal C, Horber F, Potoczna N, Hercberg S, Le Stunff C, Bougnères P, Kovacs P, Marre M, Balkau B, Cauchi S, Chèvre JC, Froguel P. *Nat Genet*, 2007, 39: 724–726
- 55 Church C, Moir L, McMurray F, Girard C, Banks GT, Teboul L, Wells S, Brüning JC, Nolan PM, Ashcroft FM, Cox RD. *Nat Genet*, 2010, 42: 1086–1092
- 56 Keller L, Xu W, Wang HX, Winblad B, Fratiglioni L, Graff C. *J Alzheimer's Disease*, 2011, 23: 461–469
- 57 Jia G, Yang CG, Yang S, Jian X, Yi C, Zhou Z, He C. *FEBS Lett*, 2008, 582: 3313–3319
- 58 Mauer J, Luo X, Blanjoie A, Jiao X, Grozhik AV, Patil DP, Linder B, Pickering BF, Vasseur JJ, Chen Q, Gross SS, Elemento O, DeBart F, Kiledjian M, Jaffrey SR. *Nature*, 2017, 541: 371–375
- 59 Wei J, Liu F, Lu Z, Fei Q, Ai Y, He PC, Shi H, Cui X, Su R, Klungland A, Jia G, Chen J, He C. *Mol Cell*, 2018, 71: 973–985.e5
- 60 Song H, Wang Y, Wang R, Zhang X, Liu Y, Jia G, Chen PR. *Cell Chem Biol*, 2020, 27: 283–291.e6
- 61 Zheng G, Dahl JA, Niu Y, Fedorcsak P, Huang CM, Li CJ, Vågbo CB, Shi Y, Wang WL, Song SH, Lu Z, Bosmans RPG, Dai Q, Hao YJ, Yang X, Zhao WM, Tong WM, Wang XJ, Bogdan F, Furu K, Fu Y, Jia G, Zhao X, Liu J, Krokan HE, Klungland A, Yang YG, He C. *Mol Cell*, 2013, 49: 18–29
- 62 Xu C, Liu K, Tempel W, Demetriades M, Aik WS, Schofield CJ, Min J. *J Biol Chem*, 2014, 289: 17299–17311
- 63 Baltz AG, Munschauer M, Schwanhäusser B, Vasile A, Murakawa Y, Schueler M, Youngs N, Penfold-Brown D, Drew K, Milek M, Wyler E, Bonneau R, Selbach M, Dieterich C, Landthaler M. *Mol Cell*, 2012, 46: 674–690
- 64 Du H, Zhao Y, He J, Zhang Y, Xi H, Liu M, Ma J, Wu L. *Nat Commun*, 2016, 7: 12626
- 65 Wang X, Zhao BS, Roundtree IA, Lu Z, Han D, Ma H, Weng X, Chen K, Shi H, He C. *Cell*, 2015, 161: 1388–1399
- 66 Shi H, Wang X, Lu Z, Zhao BS, Ma H, Hsu PJ, Liu C, He C. *Cell Res*, 2017, 27: 315–328
- 67 Xiao W, Adhikari S, Dahal U, Chen YS, Hao YJ, Sun BF, Sun HY, Li A, Ping XL, Lai WY, Wang X, Ma HL, Huang CM, Yang Y, Huang N, Jiang GB, Wang HL, Zhou Q, Wang XJ, Zhao YL, Yang YG. *Mol Cell*, 2016, 61: 507–519
- 68 Xu C, Wang X, Liu K, Roundtree IA, Tempel W, Li Y, Lu Z, He C, Min J. *Nat Chem Biol*, 2014, 10: 927–929
- 69 Hsu PJ, Zhu Y, Ma H, Guo Y, Shi X, Liu Y, Qi M, Lu Z, Shi H, Wang J, Cheng Y, Luo G, Dai Q, Liu M, Guo X, Sha J, Shen B, He C. *Cell Res*, 2017, 27: 1115–1127
- 70 Huang H, Weng H, Sun W, Qin X, Shi H, Wu H, Zhao BS, Mesquita A, Liu C, Yuan CL, Hu YC, Hüttelmaier S, Skibbe JR, Su R, Deng X, Dong L, Sun M, Li C, Nachtergaele S, Wang Y, Hu C, Ferchen K, Greis KD, Jiang X, Wei M, Qu L, Guan JL, He C, Yang J, Chen J. *Nat Cell*

- Biol*, 2018, 20: 285–295
- 71 Alarcón CR, Goodarzi H, Lee H, Liu X, Tavazoie S, Tavazoie SF. *Cell*, 2015, 162: 1299–1308
- 72 Meyer KD, Patil DP, Zhou J, Zinoviev A, Skabkin MA, Elemento O, Pestova TV, Qian SB, Jaffrey SR. *Cell*, 2015, 163: 999–1010
- 73 Liu N, Dai Q, Zheng G, He C, Parisien M, Pan T. *Nature*, 2015, 518: 560–564
- 74 Reichel M, Köster T, Staiger D. *J Mol Cell Biol*, 2019, 11: 899–910
- 75 Luo GZ, MacQueen A, Zheng G, Duan H, Dore LC, Lu Z, Liu J, Chen K, Jia G, Bergelson J, He C. *Nat Commun*, 2014, 5: 5630
- 76 Zhong S, Li H, Bodi Z, Button J, Vespa L, Herzog M, Fray RG. *Plant Cell*, 2008, 20: 1278–1288
- 77 Bodi Z, Zhong S, Mehra S, Song J, Graham N, Li H, May S, Fray RG. *Front Plant Sci*, 2012, 3: 48
- 78 Růžicka K, Zhang M, Campilho A, Bodi Z, Kashif M, Saleh M, Eeckhout D, El-Showk S, Li H, Zhong S, De Jaeger G, Mongan NP, Hejácíto J, Helariutta Y, Fray RG. *New Phytol*, 2017, 215: 157–172
- 79 Mielecki D, Zugaj D, Muszewska A, Piwowarski J, Chojnacka A, Mielecki M, Niemiuszczy J, Grynberg M, Grzesiuk E. *PLoS One*, 2012, 7: e30588
- 80 Duan HC, Wei LH, Zhang C, Wang Y, Chen L, Lu Z, Chen PR, He C, Jia G. *Plant Cell*, 2017, 29: 2995–3011
- 81 Martínez-Pérez M, Aparicio F, López-Gresa MP, Bellés JM, Sánchez-Navarro JA, Pallás V. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114: 10755–10760
- 82 Anderson SJ, Kramer MC, Gosai SJ, Yu X, Vandivier LE, Nelson ADL, Anderson ZD, Beilstein MA, Fray RG, Lyons E, Gregory BD. *Cell Rep*, 2018, 25: 1146–1157.e3
- 83 Li D, Zhang H, Hong Y, Huang L, Li X, Zhang Y, Ouyang Z, Song F. *Plant Mol Biol Rep*, 2014, 32: 1169–1186
- 84 Batista PJ, Molinie B, Wang J, Qu K, Zhang J, Li L, Bouley DM, Lujan E, Haddad B, Daneshvar K, Carter AC, Flynn RA, Zhou C, Lim KS, Dedon P, Wernig M, Mullen AC, Xing Y, Giallourakis CC, Chang HY. *Cell Stem Cell*, 2014, 15: 707–719
- 85 Chen T, Hao YJ, Zhang Y, Li MM, Wang M, Han W, Wu Y, Lv Y, Hao J, Wang L, Li A, Yang Y, Jin KX, Zhao X, Li Y, Ping XL, Lai WY, Wu LG, Jiang G, Wang HL, Sang L, Wang XJ, Yang YG, Zhou Q. *Cell Stem Cell*, 2015, 16: 289–301
- 86 Scutenaire J, Deragon JM, Jean V, Benhamed M, Raynaud C, Favory JJ, Merret R, Bousquet-Antonelli C. *Plant Cell*, 2018, 30: 986–1005
- 87 Arribas-Hernández L, Bressendorff S, Hansen MH, Poulsen C, Erdmann S, Brodersen P. *Plant Cell*, 2018, 30: 952–967
- 88 Wang Y, Li Y, Toth JJ, Petroski MD, Zhang Z, Zhao JC. *Nat Cell Biol*, 2014, 16: 191–198
- 89 Cui Q, Shi H, Ye P, Li L, Qu Q, Sun G, Sun G, Lu Z, Huang Y, Yang CG, Riggs AD, He C, Shi Y. *Cell Rep*, 2017, 18: 2622–2634
- 90 Zhang S, Zhao BS, Zhou A, Lin K, Zheng S, Lu Z, Chen Y, Sulman EP, Xie K, Böglér O, Majumder S, He C, Huang S. *Cancer Cell*, 2017, 31: 591–606.e6
- 91 Zhang C, Zhi WI, Lu H, Samanta D, Chen I, Gabrielson E, Semenza GL. *Oncotarget*, 2016, 7: 64527–64542
- 92 Zhang C, Samanta D, Lu H, Bullen JW, Zhang H, Chen I, He X, Semenza GL. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113: E2047–E2056
- 93 Chen M, Wei L, Law CT, Tsang FHC, Shen J, Cheng CLH, Tsang LH, Ho DWH, Chiu DKC, Lee JMF, Wong CCL, Ng IOL, Wong CM. *Hepatology*, 2018, 67: 2254–2270
- 94 Vu LP, Pickering BF, Cheng Y, Zaccara S, Nguyen D, Minuesa G, Chou T, Chow A, Saletore Y, MacKay M, Schulman J, Famulare C, Patel M, Klimek VM, Garrett-Bakelman FE, Melnick A, Carroll M, Mason CE, Jaffrey SR, Kharas MG. *Nat Med*, 2017, 23: 1369–1376
- 95 Barbieri I, Tzelepis K, Pandolfini L, Shi J, Millán-Zambrano G, Robson SC, Aspris D, Migliori V, Bannister AJ, Han N, De Braekeleer E, Ponstingl H, Hendrick A, Vakoc CR, Vassiliou GS, Kouzarides T. *Nature*, 2017, 552: 126–131
- 96 Weng H, Huang H, Wu H, Qin X, Zhao BS, Dong L, Shi H, Skibbe J, Shen C, Hu C, Sheng Y, Wang Y, Wunderlich M, Zhang B, Dore LC, Su R, Deng X, Ferchen K, Li C, Sun M, Lu Z, Jiang X, Marcucci G, Mulloy JC, Yang J, Qian Z, Wei M, He C, Chen J. *Cell Stem Cell*, 2018, 22: 191–205.e9
- 97 Bansal H, Yihua Q, Iyer SP, Ganapathy S, Proia D, Penalva LO, Uren PJ, Suresh U, Carew JS, Karnad AB, Weitman S, Tomlinson GE, Rao MK, Kornblau SM, Bansal S. *Leukemia*, 2014, 28: 1171–1174
- 98 Li Z, Weng H, Su R, Weng X, Zuo Z, Li C, Huang H, Nachtergaele S, Dong L, Hu C, Qin X, Tang L, Wang Y, Hong GM, Huang H, Wang X, Chen P, Gurbuxani S, Arnovitz S, Li Y, Li S, Strong J, Neilly MB, Larson RA, Jiang X, Zhang P, Jin J, He C, Chen J. *Cancer Cell*, 2017, 31: 127–141
- 99 Su R, Dong L, Li C, Nachtergaele S, Wunderlich M, Qing Y, Deng X, Wang Y, Weng X, Hu C, Yu M, Skibbe J, Dai Q, Zou D, Wu T, Yu K, Weng H, Huang H, Ferchen K, Qin X, Zhang B, Qi J, Sasaki AT, Plas DR, Bradner JE, Wei M, Marcucci G, Jiang X, Mulloy JC, Jin J, He C, Chen J. *Cell*, 2018, 172: 90–105.e23

- 100 Lichinchi G, Zhao BS, Wu Y, Lu Z, Qin Y, He C, Rana TM. *Cell Host Microbe*, 2016, 20: 666–673
- 101 Lichinchi G, Gao S, Saletore Y, Gonzalez GM, Bansal V, Wang Y, Mason CE, Rana TM. *Nat Microbiol*, 2016, 1: 16011
- 102 Gokhale NS, McIntyre ABR, McFadden MJ, Roder AE, Kennedy EM, Gandara JA, Hopcraft SE, Quicke KM, Vazquez C, Willer J, Ilkayeva OR, Law BA, Holley CL, Garcia-Blanco MA, Evans MJ, Suthar MS, Bradrick SS, Mason CE, Horner SM. *Cell Host Microbe*, 2016, 20: 654–665
- 103 Lu M, Zhang Z, Xue M, Zhao BS, Harder O, Li A, Liang X, Gao TZ, Xu Y, Zhou J, Feng Z, Niewiesk S, Peeples ME, He C, Li J. *Nat Microbiol*, 2020, 5: 584–598
- 104 Zheng Q, Hou J, Zhou Y, Li Z, Cao X. *Nat Immunol*, 2017, 18: 1094–1103
- 105 Liu Y, You Y, Lu Z, Yang J, Li P, Liu L, Xu H, Niu Y, Cao X. *Science*, 2019, 365: 1171–1176
- 106 Zhou L, Tian S, Qin G. *Genome Biol*, 2019, 20: 156
- 107 Liu XM, Zhou J, Mao Y, Ji Q, Qian SB. *Nat Chem Biol*, 2019, 15: 865–871
- 108 Rau K, Rösner L, Rentmeister A. *RNA*, 2019, 25: 1311–1323
- 109 Li J, Chen Z, Chen F, Xie G, Ling Y, Peng Y, Lin Y, Luo N, Chiang CM, Wang H. *Nucl Acids Res*, 2020, 48: 5684–5694
- 110 Wilson C, Chen PJ, Miao Z, Liu DR. *Nat Biotechnol*, 2020, doi: 10.1038/s41587-020-0572-6
- 111 Chen B, Ye F, Yu L, Jia G, Huang X, Zhang X, Peng S, Chen K, Wang M, Gong S, Zhang R, Yin J, Li H, Yang Y, Liu H, Zhang J, Zhang H, Zhang A, Jiang H, Luo C, Yang CG. *J Am Chem Soc*, 2012, 134: 17963–17971
- 112 Huang Y, Yan J, Li Q, Li J, Gong S, Zhou H, Gan J, Jiang H, Jia GF, Luo C, Yang CG. *Nucl Acids Res*, 2015, 43: 373–384
- 113 Huang Y, Su R, Sheng Y, Dong L, Dong Z, Xu H, Ni T, Zhang ZS, Zhang T, Li C, Han L, Zhu Z, Lian F, Wei J, Deng Q, Wang Y, Wunderlich M, Gao Z, Pan G, Zhong D, Zhou H, Zhang N, Gan J, Jiang H, Mulloy JC, Qian Z, Chen J, Yang CG. *Cancer Cell*, 2019, 35: 677–691.e10
- 114 Su R, Dong L, Li Y, Gao M, Han L, Wunderlich M, Deng X, Li H, Huang Y, Gao L, Li C, Zhao Z, Robinson S, Tan B, Qing Y, Qin X, Prince E, Xie J, Qin H, Li W, Shen C, Sun J, Kulkarni P, Weng H, Huang H, Chen Z, Zhang B, Wu X, Olsen MJ, Müschen M, Marcucci G, Salgia R, Li L, Fathi AT, Li Z, Mulloy JC, Wei M, Horne D, Chen J. *Cancer Cell*, 2020, 38: 79–96.e11

Advances in biological functions of RNA chemical modification m⁶A

Qian Tang[†], Wutong Zhang[†], Guifang Jia^{*}

School of Chemistry and Chemical Biology, Peking University, Beijing 100871, China

[†]These authors contributed equally to this work.

^{*}Corresponding author (email: guifangjia@pku.edu.cn)

Abstract: N⁶-methyladenine (m⁶A) is the most abundant internal chemical modification in eukaryotic messenger RNAs (mRNAs). The discovery of m⁶A dynamic reversible regulatory mechanism has greatly promoted the development of epitranscriptomics. Our understanding of the m⁶A distribution and regulation is deepened by a variety of m⁶A high-throughput sequencing technologies or detection methods. In mammals and plants, m⁶A can be deposited, removed and interpreted by an arsenal of methyltransferases, demethylases and binding proteins. m⁶A can regulate various biological activities by affecting the function of RNA. In this review, we summarize the research progress of m⁶A detection methods, m⁶A function in mammals and plants in the past decade and provide an outlook on the m⁶A related fields.

Keywords: N⁶-methyladenine (m⁶A), epitranscriptomics, RNA modification

doi: [10.1360/SSC-2020-0103](https://doi.org/10.1360/SSC-2020-0103)