



RNA m⁶A甲基化调控免疫稳态的机制及研究进展

宗鑫^{1,2,3}, 付杰¹, 靳明亮^{1,2,3}, 汪以真^{1,2,3*}

1. 浙江大学动物科学学院, 杭州 310058;

2. 动物分子营养学教育部重点实验室, 杭州 310058;

3. 浙江省饲料及动物营养重点实验室, 杭州 310058

* 联系人, E-mail: yzwang321@zju.edu.cn

收稿日期: 2022-06-04; 接受日期: 2022-08-20; 网络版发表日期: 2022-11-02

国家自然科学基金(批准号: 32002185, 31630075)资助

摘要 免疫系统的运行依赖于对基因表达的严格调控. 近些年来, 发现RNA修饰N⁶-甲基腺苷(m⁶A)在维持机体免疫稳态过程中发挥着重要作用. 本综述在介绍RNA m⁶A修饰及其研究方法的基础上, 总结了RNA m⁶A调控免疫稳态的机制及研究进展, 包括免疫识别、抗病毒感染、抗细菌感染、获得性免疫应答以及肿瘤免疫. 此外, 讨论了该领域当前的一些挑战, 并展望了m⁶A甲基化修饰与免疫稳态相关研究的未来方向.

关键词 表观遗传, RNA m⁶A甲基化, 免疫调控, 免疫稳态

在过去的几十年, 随着表观遗传学的发展, DNA甲基化、组蛋白修饰和非编码RNA等已经被证明能够通过调节基因表达感知外界的各种刺激^[1]. 近些年来, 越来越多的证据表明RNA修饰在调控基因表达方面也发挥着重要作用^[2]. 目前在RNA上已经鉴定出的化学修饰超过100种, 其中最丰富的是N⁶-甲基腺苷(m⁶A)修饰, 占RNA甲基化修饰的80%, 并且广泛参与mRNA生命周期的各个方面. 随着研究的深入, 对这种修饰的理解已经开始形成, 提示着对基因表达的调控逐渐进入新的层面.

1970年, m⁶A作为mRNA中丰富的甲基化修饰首次被提出^[3]. 虽然m⁶A相较于其他修饰是mRNA上最丰富、稳定的化学修饰, 但其含量很低, 仅占哺乳动物mRNA中所有腺苷的0.2%~0.6%. 之前, 由于研究

m⁶A修饰基因和精确修饰位点方法的欠缺, m⁶A生物学功能的相关研究停滞了数十年. 最近, 两项进展推动了对m⁶A修饰生物学功能的研究: 一是鉴定出肥胖相关蛋白FTO为m⁶A修饰关键酶, 发现其能够作为去甲基化酶去除核内RNA上的m⁶A修饰^[4], 确定m⁶A是一种动态可逆修饰^[5]; 二是m⁶A修饰的高通量检测方法的建立. 2012年, 利用m⁶A特异性抗体富集技术和第二代高通量测序手段绘制了第一个m⁶A修饰图谱, 并发现m⁶A以G m⁶A C (~70%)和A m⁶A C (~30%)两种基序在CDS、3'UTR区域和终止密码子的上游具有着显著的富集^[6,7]. 至此, 随着研究方法的不断完善, m⁶A甲基化修饰在调节mRNA命运中的作用及其在各种细胞中的功能得到了广泛的研究. m⁶A甲基化作为一种广泛的调控机制, 在各种生理过程中发挥着重要作用.

引用格式: 宗鑫, 付杰, 靳明亮, 等. RNA m⁶A甲基化调控免疫稳态的机制及研究进展. 中国科学: 生命科学, 2023, 53: 334–346
Zong X, Fu J, Jin M L, et al. Progress on N⁶-methyladenosine regulation of immune homeostasis (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2023, 53: 334–346, doi: 10.1360/SSV-2021-0284

本文在总结RNA m⁶A修饰及其研究方法的基础上,综述了RNA m⁶A修饰与免疫应答的研究进展;重点阐述了m⁶A修饰在免疫识别、先天和适应性免疫应答以及免疫系统发育过程中的作用与内在分子机制;强调了RNA m⁶A甲基化修饰在免疫稳态中的重要性,展望了使用特征明确的免疫调节途径和相应的体内模型系统来揭示RNA m⁶A甲基化调节机制的潜力,为深入探究免疫反应的RNA甲基化修饰机制提供了参考。

1 RNA m⁶A甲基化

RNA m⁶A甲基化,即腺嘌呤A第六位氮原子上发上的甲基化修饰。和DNA甲基化类似,作为一种广泛参与各种生物学功能的动态可逆修饰,其生物学功能依赖于其各种调控蛋白质的参与(图1)。m⁶A甲基化的相关调控蛋白主要包括:“擦除蛋白”(m⁶A去甲基化酶)、“写入蛋白”(m⁶A甲基转移酶)和“阅读蛋白”(m⁶A结合蛋白)。

1.1 RNA m⁶A去甲基化酶

RNA m⁶A的去甲基化主要是依赖于去甲基化酶FTO和 α -酮戊二酸依赖性双加氧酶ALKBH5。FTO是第一个被鉴定出的具有m⁶A去甲基化活性的酶^[4],以其为里程碑,确认m⁶A以一种动态可逆的方式调控基因表达,参与生物学进程,如FTO调节RUNX1T1的可变剪接参与脂肪生成^[8],以及293T细胞中的3'-末端mRNA加工^[9]。值得注意的是,也有观点认为FTO除了具有m⁶A去甲基化活性,也能够对m⁶A_m去甲基化^[10]。ALKBH5是第二个被鉴定出的去甲基化酶,与FTO有着不同的作用机制,其特异性地针对m⁶A去甲基化^[11]。ALKB结构域通常位于FTO和ALKBH5的中间区域,由两个活性基序组成,称为HXDXnH和RXXXXXR(X=任何氨基酸),分别与Fe(II)以及 α -酮戊二酸和底物结合。与ALKBH5相比,FTO的C末端的独特折叠介导其与蛋白质相互作用。ALKBH5的N末端的特征在于额外富含A的基序,其负责在核斑点处定位ALKBH5^[12]。

FTO和ALKBH5均具有显著的组织特异性和多样的细胞内定位,如FTO在脂肪和脑组织中高度丰富,而ALKBH5主要在睾丸中表达^[11]。尽管m⁶A去甲基化酶提供了以动态和信号依赖性方式调节m⁶A修饰水平的

手段,但HeLa细胞中的代谢标记试验表明m⁶A水平在整个mRNA生命周期中基本保持不变^[13],表明动态的m⁶A去甲基化可能仅限于特定条件或组织。RNA m⁶A去甲基化在其他生理过程中的潜在影响需要进一步研究。

1.2 RNA m⁶A甲基转移酶

RNA m⁶A修饰是由甲基转移酶复合物将S-腺苷甲硫氨酸(SAM)的甲基添加到目标RNA上^[14]。甲基转移酶复合物主要包括具有催化活性的METTL3^[15], RNA结合平台METTL14^[16], 发挥辅助作用的Wilms肿瘤相关蛋白WTAP和KIAA1429^[17,18], 以及甲基转移酶复合物的两个新亚基RBM15^[19]和含锌指CCCH结构域的蛋白ZC3H13^[20-22]。作为核心甲基转移酶亚基, METTL3是一种高度保守的蛋白质^[23,24], 已经被证明可以在体外选择性地对合成单链RNA中的GAC或AAC基序进行m⁶A修饰^[25,26]。METTL14在哺乳动物中也是高度保守的, 并且可以与METTL3形成稳定的蛋白质异二聚体^[27,28]。Wang等人^[29]研究了METTL3-METTL14复合物的晶体结构, 同时计算出METTL14具有退化的甲基转移酶活性位点并且不能催化m⁶A的形成, 但是METTL14可提供RNA结合支架, 激活和增强METTL3的催化功能^[30]。作为m⁶A甲基转移酶复合物的调节亚基, WTAP是METTL3-METTL14复合物定位于富含各种前体mRNA加工因子的核斑所必需的^[28], 其能够通过增强METTL3/METTL14与细胞核中的mRNA相互作用以提高m⁶A修饰效率^[27,28]。此外, 在人A549细胞中敲除KIAA1429能够导致m⁶A丰度减少四倍, 表明KIAA1429具有m⁶A甲基转移酶作用^[17]。最近, RBM15及其旁系同源RBM15B被证明是m⁶A甲基转移酶复合物的成员, 其能够通过将METTL3/14蛋白复合物募集到RNA中的特定位点, 从而进行选择性的甲基化^[19]。而另外三个研究组证明ZC3H13是m⁶A编码复合物的另一成员, 能够调节m⁶A甲基化的修饰水平^[20-22]。

除了经典的甲基转移酶复合物, 还有其他几种酶也被证明具有m⁶A甲基转移酶活性: METTL16能够修饰U6小核RNA, MAT2A转录物和可能的其他mRNA^[31], ZCCHC4和METTL5将m⁶A添加到18S和28S核糖体RNAs^[32]等, 但目前尚未发现这些酶产生的m⁶A修饰与免疫应答有关。随着研究的深入, 可能会有

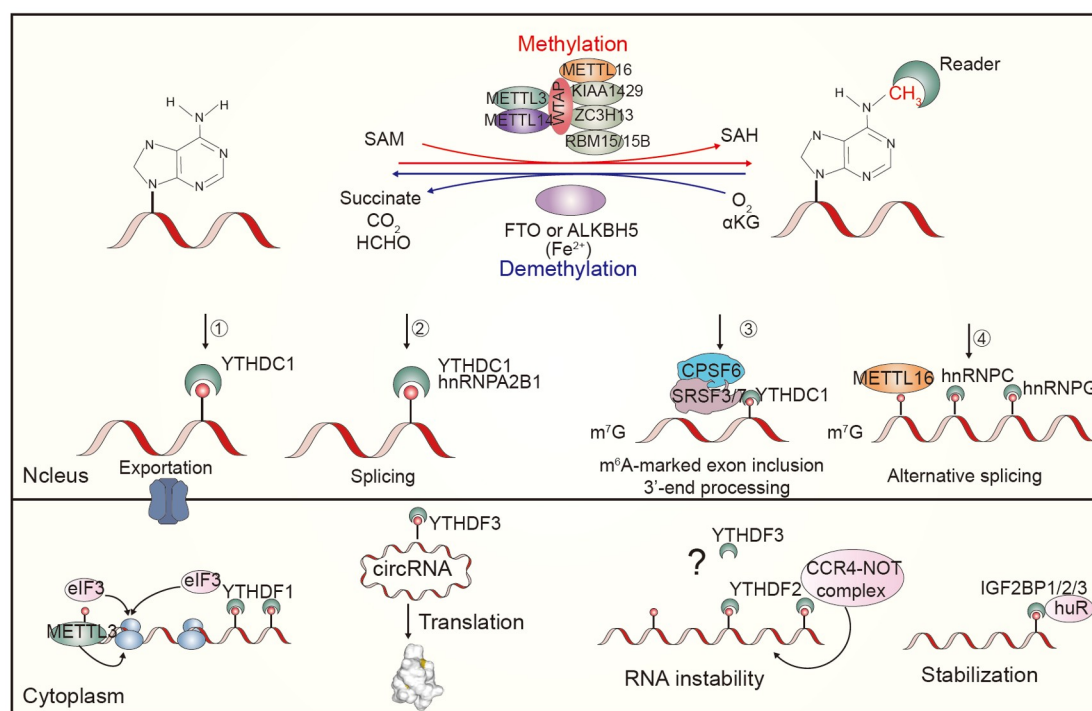


图1 RNA m⁶A的动态可逆修饰过程及其生物学功能

Figure 1 Dynamic reversible methylation process of RNA m⁶A and its molecular functions

更多的m⁶A甲基转移酶复合物的亚基被发现,从而通过选择性识别m⁶A位点来实现精准的转录后调控。

1.3 RNA m⁶A效应蛋白

m⁶A修饰对靶mRNA的功能被认为是由效应蛋白,也被称为m⁶A的“阅读蛋白”介导的^[33]。在众多效应蛋白中, YTH521-B同源性(YTH)蛋白质家族目前被研究的最为广泛^[7,19],主要包括位于细胞质中的YTHDF1, YTHDF2和YTHDF3^[6,34-36];以及两个YTHDC蛋白,一个是位于细胞核中的YTHDC1^[37],另一个是位于细胞质中的YTHDC2^[38]。YTHDF蛋白家族具有保守的YTH结构域,能够在其P/Q/N rich结构域的共同作用下靶向性地结合RNA上的m⁶A^[39]。虽然其通过几乎相同的结构域与RNA结合,但却介导着完全不同,甚至相反的生物学功能。其中, YTHDF1已经被证明能够通过翻译起始因子相结合增强mRNA的翻译效率^[35];而研究表明, YTHDF2能够通过直接募集CCR4-NOT脱腺苷酶复合物来加速m⁶A修饰的RNA降解^[34,40]; YTHDF3则被认为是通过协同YTHDF1和YTHDF2发挥作用,当与YTHDF1相互作用时, YTHDF3可以通过与一些

核糖体蛋白的相互作用促进mRNA翻译^[36,41];而当与YTHDF2相互作用时, YTHDF3又可以参与mRNA降解^[36]。据推测,在某些特定的生理情况下,细胞可能以YTHDF3依赖的方式平衡mRNA的降解和翻译,进而实现对相关基因表达的动态调节。

YTHDC蛋白的重要性也逐渐被科学家们意识到。研究发现,核内m⁶A阅读蛋白YTHDC1通过招募辅助剪接因子SRSF3,抑制SRSF10,促进外显子融合^[42]。另一项研究表明, YTHDC1与SRSF3和NXF1的结合可以促进m⁶A靶mRNA的出核^[43]。YTHDC2是相对较大的蛋白质分子(~160 kD),并含有许多解旋酶结构域和两个锚蛋白重复序列,这些特殊的结构特征可能使YTHDC2具有多种功能,包括调节RNA结合活性和改变RNA结构,以及与其他蛋白的相互作用^[38,44]。但是, YTHDC2的生物学功能尚存争议;一方面,有研究认为YTHDC2具有增强翻译效率,同时降低含m⁶A mRNA丰度的作用^[38];另一方面,也有研究发现在HEK细胞中YTHDC2不能结合mRNA上的m⁶A^[19,45];这些发现提示, YTHDC2可能通过与其他因子的相互作用间接调节m⁶A修饰的RNA表达。

除了YTH家族成员之外, 还有其他蛋白质被鉴定为识别并结合m⁶A. 例如, 真核起始因子3(eIF3)复合物, 通过多亚基界面与含m⁶A的5'UTR相互作用, 直接将40S预先起始复合物募集到靶mRNA的5'UTR以刺激翻译起始^[46]. hnRNPA2/B1和HNRNPG能够结合m⁶A修饰的RNA以调节剪接和microRNA的成熟^[47]. 家族性智力低下蛋白(fragile X mental retardation protein, FMRP)也被证明能够以序列依赖性方式结合m⁶A修饰的RNA^[48]. 也有研究发现, 胰岛素生长因子2结合蛋白IGF2BP, 在正常和应激条件下能够通过结合靶mRNA m⁶A促进mRNA的稳定性和储存^[49]. 由此可见, m⁶A修饰发挥着怎样的生物学功能, 主要取决于识别蛋白的介导.

2 RNA m⁶A甲基化修饰的检测方法

2.1 m⁶A-seq和MeRIP-seq

深入探究m⁶A修饰在各种生理学进程中的作用, 以及m⁶A修饰影响mRNA命运的机制必须检测特定mRNA上m⁶A的修饰水平(即修饰与未修饰腺苷A的量). Dominissini等人^[6]在2012年利用m⁶A抗体开发了m⁶A富集区域的全转录组测序m⁶A-seq和MeRIP-seq, 它提供了第一个全基因组m⁶A修饰转录本的全局视图^[7]. 这两种方法能够特异性地识别m⁶A修饰的转录本, 表明m⁶A是一种普遍且动态可逆的修饰, 显著富集于3'UTR和终止密码子附近; 而且证实了m⁶A修饰位点在人和小鼠转录本之间具有非常高的保守性. 虽然这两种方法简便易行, 但只能对m⁶A修饰水平的变化进行相对定量, 而且大约200 nt的分辨率难以精确识别m⁶A修饰的位置, 同时由于抗体的非特异性结合容易出现假阳性结果(表1).

表1 RNA m⁶A甲基化修饰的检测方法

Table 1 m⁶A detection methods

方法名称	特点	分辨率	劣势
MeRIP-Seq/m ⁶ A-seq	m ⁶ A抗体、简便易行	200 nt	相对定量、分辨率低、存非特异性结合
PA-m ⁶ A-seq	4-sU和RNase T1、分辨率高	30 nt	可能会有遗漏、相对定量
m ⁶ A-CLIP/miCLIP	254 nm紫外光交联	单碱基	操作复杂、mRNA用量大、相对定量
NT-m ⁶ A-seq	纳米孔技术、捕获错误率低、碱基识别准确度高	单碱基	操作复杂、mRNA用量大、相对定量
MAZTER-seq	MazF RNA酶、定量分析	单碱基	适用对象有限
DART-seq	胞苷脱氨酶APOBEC1、定量分析	单碱基	操作复杂

2.2 单碱基分辨率的检测方法

为了进一步提高m⁶A测序的分辨率, PA-m⁶A-seq应运而生(high-resolution N(6)-methyladenosine map using photo-crosslinking-assisted m⁶A sequencing). 简而言之, 将4-硫代尿苷(4-sU)添加到培养基中会导致其嵌入RNA, 然后使用365 nm紫外光对其进行交联. RNase T1将交联的RNA消化至约30 nt, 从而实现高分辨率测序. 但是, 如果m⁶A修饰位点与4-sU之间的距离太大, 则可能无法检测到. 同时, 另外的研究团队发现, 在254 nm紫外光下, RNA片段和m⁶A抗体之间可以发生交联, 通过蛋白酶K和逆转录可以获得m⁶A修饰的RNA片段, 从而在整个转录组中以单核苷酸分辨率精确映射到m⁶A修饰位点; 他们将这些新方法命名为m⁶A-CLIP和miCLIP^[50,51]. 此外, 纳米孔RNA测序技术的研发也为检测自然状态下的RNA中的m⁶A修饰提供了策略(NT-m⁶A-seq)^[52]. 此方法利用布满穿膜孔的跨膜通道蛋白(纳米孔)的多聚合物膜, 以及不同的碱基会形成特征性离子电流变化信号的工作原理, 显著降低了捕获错误率, 提高了碱基识别准确度, 而且能够直接用于分析m⁶A修饰位点与不同RNA亚型之间的关系. 虽然这些方法改进了m⁶A-seq分辨率低的问题, 但是存在操作复杂、需要mRNA的量太大, 并且仍然没有解决m⁶A绝对定量的缺点(表1).

2.3 m⁶A定量分析的测序方法

为了对m⁶A修饰进行定量分析, Garcia-Campos等人^[53]和Zhang等人^[54]跳出原有基于m⁶A抗体的思路, 开发了不依赖于抗体的m⁶A鉴定方法(表1): MAZTER-seq和DART-seq. MAZTER-seq主要利用MazF RNA酶在未甲基化的ACA处切割RNA, 而不能在甲基化处切

割RNA的特性. 这是第一个以单核苷酸分辨率对m⁶A修饰进行定量分析的方法, 但由于MazF的特异性, 其只能检测到大约16%的哺乳动物m⁶A修饰位点. DART-seq通过把胞苷脱氨酶APOBEC1与结合m⁶A的YTH结构域融合, 从而使C-to-U脱氨基发生在与m⁶A残基相邻的位点, 随后通过RNA-seq进行鉴定和定量, 但是这种方法需要在靶细胞中异位表达融合蛋白^[55].

3 RNA m⁶A修饰与抗病毒免疫

病毒感染宿主细胞时, 被识别的主要是核酸. 病毒感染的识别依赖于多种模式识别受体, 包括RIG样受体(RIG-I和MDA-5)以及Toll样受体(TLR-3, 7, 8)^[56]. 一旦模式识别受体被激活, 细胞因子尤其是I型干扰素(interferon, IFN)诱导表达, 从而产生有效的抗病毒反应. 研究表明, RNA m⁶A修饰和m⁶A相关蛋白在抗病毒免疫反应中发挥着重要作用, 不仅参与外源RNA的感知, 而且能够直接调节先天免疫信号相关基因的表达(图2).

3.1 RNA m⁶A修饰与病毒RNA的感知

最近的研究发现, 病毒基因组和转录本中广泛存在m⁶A修饰, 包括正链和负链RNA病毒、逆转录病毒和DNA病毒. 阐明m⁶A在病毒RNA中的调节作用是目

前比较火热的研究领域. 例如, 病毒转录本上的m⁶A修饰能够抑制TLR3和RIG-I的激活^[57,58], 这一发现提出了病毒能够通过m⁶A修饰逃避宿主先天免疫识别的可能性. 类似地, Lu等人^[59]在发现m⁶A修饰能够促进人类偏肺病毒(human metapneumovirus, HMPV)复制的基础上, 用同义突变构建m⁶A缺陷的HMPV病毒株, 发现m⁶A缺陷病毒的RNA能够与RIG-I结合, 并促进RIG-I的构象变化, 诱导I型干扰素表达的增加. 简而言之, HMPV病毒通过对其RNA添加m⁶A修饰作为模拟内源RNA的一种手段, 以避免被先天免疫系统感知.

RNA m⁶A甲基化调节免疫识别的另一个RNA亚类是环状RNA(circRNA). 环状RNA是通过反向剪接产生的非编码RNA, 可产生高度稳定的共价连接环, 外源circRNA是诱导抗原特异性T细胞活化、抗体产生和体内抗肿瘤免疫的有效佐剂^[58]. 研究表明, circRNA制剂的免疫原性和蛋白质表达稳定性被发现依赖于纯度, 污染少量的线性RNA会导致强大的细胞免疫反应, 被m⁶A修饰的circRNA则能够不被细胞RNA受体RIG-I和TLR识别, 从而避免引发免疫反应^[60]. Chen等人^[61]研究也发现, 相比于未修饰的circRNA, m⁶A修饰的circRNA不再能够被RIG-I受体识别, 衔接蛋白MAVS和下游转录因子IRF3也不再能被激活, 提示circRNA能够通过m⁶A实现免疫逃逸. 此外, 另一项关于小RNA的研究表明, 当siRNA中的腺嘌呤A被m⁶A取代时, 针对这些被修饰siRNA的免疫反应会降低, 而且对RNAi活性没有显著影响^[62].

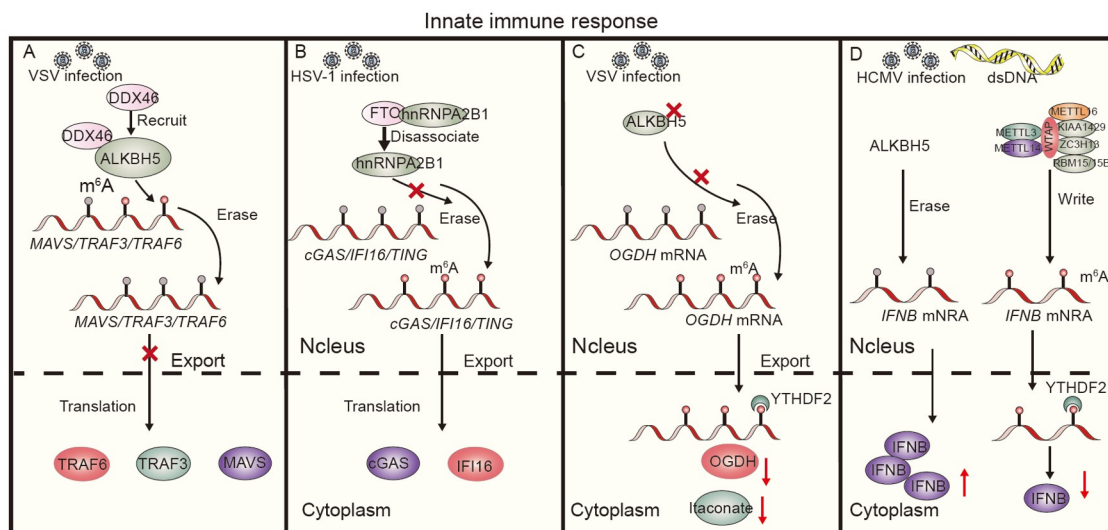


图2 RNA m⁶A修饰与抗病毒免疫的信号激活

Figure 2 m⁶A regulates antiviral response to infection through diverse mechanisms

虽然 m^6A 或其他RNA修饰在免疫识别中的作用研究刚刚开始, 但是目前的研究已经充分说明 m^6A 和其他RNA修饰作为自我识别标记的潜力, 但是其内在的作用机制到底是由于 m^6A 改变了RNA二级结构, 还是被先天传感器直接感知仍需进一步探究.

3.2 RNA m^6A 修饰与抗病毒免疫的信号激活

由于 m^6A 是在细胞核中以共转录方式添加的^[13,14], 这可以作为区分在细胞核中合成的RNA和在细胞质中生成的非自身RNA的有效策略; 这提示 m^6A 修饰除了能被病毒RNA利用进行免疫逃逸, 也能在调节抗病毒免疫信号相关基因的表达中发挥关键作用(图2).

曹雪涛团队是世界上较早将 m^6A 甲基化修饰与细胞抗病毒反应联系起来的(图2). 首先, Zheng等人^[63]发现VSV病毒感染增强了RNA解旋酶DDX46与抗病毒蛋白MAVS, TRAF3和TRAF6 mRNA的结合活性, 进而招募ALKBH5对这些mRNA去甲基化, 使其滞留在细胞核中, 降低它们的蛋白表达水平, 从而抑制I型干扰素的产生. 其次, Wang等人^[64]确定 m^6A 的核内阅读蛋白hnRNP A2B1为DNA病毒的新型核受体, 说明 m^6A 对疱疹病毒(herpes simplex virus, HSV)感染引起的免疫反应至关重要. 这项工作的结果表明, hnRNP A2B1感知外源DNA后, 迅速被精氨酸去甲基化酶JMJD6在226位精氨酸处去甲基化, 从而易位到细胞质中激活TBK1-IRF3-IFN α/β 信号通路, 启动抗病毒反应. 同时, hnRNP A2B1也能够通过阻止FTO对CGAS, IFI16和STING的mRNA去甲基化, 促进这些mRNA的出核, 增强TBK1-IRF3-IFN α/β 信号通路. 在这两项研究中, m^6A 通过不同的通路增强I型IFN的分泌, 在抗病毒免疫反应中发挥了关键作用. 然而, 在第一项研究中, 感染通过募集ALKBH5导致去甲基化增加, 而第二项研究表明感染通过阻止FTO募集来避免去甲基化, 这提示不同的 m^6A 去甲基化酶可能彼此独立, 而又相互协同地通过不同的通路发挥作用. 有趣的是, 曹雪涛团队^[65]最近的一项研究表明, ALKBH5也能够通过调控巨噬细胞免疫代谢抑制病毒的复制. 他们认为, 巨噬细胞为了应对病毒的感染, 会削弱ALKBH5的去甲基化酶活性, 增加 α -酮戊二酸脱氢酶(oxoglutarate dehydrogenase complex, OGDH) mRNA上的 m^6A 甲基化修饰水平, 降低其mRNA稳定性和蛋白表达水平, 减少病毒复制所需的代谢物衣康酸盐(itaconate)的产生, 从而

通过下调重编程细胞代谢以抑制病毒复制.

与上述研究不同的是, 其他研究组却发现 m^6A 修饰会抑制宿主细胞的抗病毒反应. Winkler等人^[66]的研究表明, 在巨细胞病毒(human cytomegalovirus, HCMV)感染成纤维细胞后, IFN β 和IFN α 的mRNA能够被METTL3进行 m^6A 甲基化修饰, 进而由结合蛋白YTHDF2识别, 并降低干扰素的表达水平; 他们强调这种 m^6A 介导的干扰素基因调控方式在小鼠中是保守的. Rubio等人^[67]发现IFN β mRNA在编码序列和3'UTR中均存在 m^6A 修饰, dsDNA或HCMV感染触发的I型干扰素的产生受到细胞 m^6A 甲基转移酶METTL14和去甲基化酶ALKBH5的控制. 全基因组和转录组分析确定ALKBH5的缺失能够直接调控抗病毒免疫反应的相关基因表达, 而METTL14缺失则是通过改变代谢重编程和应激反应等途径. 总之, 这些研究揭示了 m^6A 作为干扰素反应的负调节因子调控抗病毒免疫应答.

综上所述, m^6A 在宿主细胞抗病毒免疫反应中的作用仍然存在争议, 通过点突变分析 m^6A 修饰对每个mRNA(病毒或细胞)的直接影响, 并分析它们在不同细胞类型和病毒感染模型中作用及机制将是未来研究的重点.

4 RNA m^6A 修饰与细菌性免疫应答

除了参与抗病毒免疫之外, RNA m^6A 修饰还在宿主细胞抵御细菌入侵的过程中发挥着重要的调控作用. 细菌感染会引发炎症反应, 甚至败血症. 宿主免疫系统通过包括TLR4和各种DNA传感器在内的模式识别受体(pattern recognition receptor, PRR)感知细菌的致病因子, 如脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)或含有甲基化CpG基序的DNA; 然后激活下游信号通路, 尤其是核因子 κ B(nuclear factor κ -B, NF- κ B)和丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号通路, 导致促炎细胞因子如白细胞介素6(interleukin 6, IL-6)和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)的产生, 调节炎症反应和抗感染免疫反应^[68].

有研究通过整合分析 m^6A -SNP和表达数量性状基因座(expression quantitative trait loci, eQTL)数据, 发现有15720个 m^6A -cis-eQTLs和381个 m^6A -trans-eQTLs与败血症相关, 进而确定了1321个基因作为 m^6A -cis-eQTLs的位置; 提示 m^6A 修饰在细菌感染性疾病中起

着重要的作用^[69]。另一项研究发现, METTL3介导的m⁶A修饰通过调控DC细胞中CD40, CD80和TLR4信号适配器TIRAP mRNA的翻译过程, 激活TLR4/NF- κ B信号通路, 诱导细胞因子产生^[70], 表明m⁶A修饰可能会在细菌性免疫反应期间增强DC的成熟和启动效率; 但这种m⁶A调节机制是否对TLR4具有特异性还有待确定。Tong等人^[71]通过CRISPR-Cas9筛选试验, 证实METTL3是巨噬细胞先天反应的正调节因子, 而且发现METTL3通过降解IRAKM mRNA激活TLR4信号通路调控巨噬细胞免疫应答, 这一结果说明m⁶A能够特异性地调控TLR4信号通路, 但对其他模式识别受体(如TLR2)是否表现出类似的调控作用还需要进一步研究。Wu等人^[72]研究发现, 细菌感染时, 巨噬细胞m⁶A的阅读蛋白YTHDF2缺失增加了KDM6B mRNA的稳定性, 促进了组蛋白H3K27me3去甲基化, 增强了多种促炎细胞因子的转录。本团队研究发现, LPS刺激或大肠杆菌感染过程中, 缺失METTL3能够通过降低TRAF6 mRNA上m⁶A的修饰水平, 抑制其出核, 降低细胞因子的释放^[73]; 而YTHDF1则能够以m⁶A依赖的方式调控TRAF6 mRNA的翻译, 激活NF- κ B和MAPK信号通路, 调控肠道上皮细胞因子的释放^[74]。因为肠道内细胞因子的水平与肠道菌群的功能密切相关, 这些研究也提示肠道菌群可能在m⁶A修饰调控细菌性免疫应答过程中发挥一定的作用, 但尚需进一步的研究证实。

5 RNA m⁶A修饰与获得性免疫反应

适应性免疫反应是免疫系统的重要组成部分, 能够特异性清除病原并建立持久的免疫记忆, 涉及多种细胞类型之间的复杂关系。研究人员通过特异性地敲除CD4⁺ T细胞中的METTL3和METTL14发现, METTL3缺失的CD4⁺ T细胞的增殖活性显著降低, 同时也不再能够分化为诱导结肠炎的致病性效应T细胞, METTL14缺失的T细胞也表现出类似的表型。这些结果表明m⁶A在维持native T细胞稳态方面发挥重要作用^[75]。m⁶A-seq分析发现, SOCS家族成员Socs1, Socs3和Cish的mRNA都含有m⁶A修饰, 而METTL3的缺失能够显著增加这些mRNA的稳定性, 促进SOCS的蛋白表达, 进而抑制了IL7介导的STAT5激活和T细胞增殖和分化^[75]。值得思考的是, 宿主细胞为什么通过加速mRNA降解作为控制SOCS基因表达的机制, 而不

是像其他大部分mRNA一样, 直接调控SOCS mRNA的表达。可能是因为SOCS家族成员是通过对炎性细胞因子信号进行负调节, 从而防止免疫系统不必要的激活^[76]。因此, 为了在炎症条件下快速响应细胞因子刺激, SOCS可能会迅速降解。有意思的是, METTL3缺失的CD4⁺ T细胞在体外依然能够对T细胞受体(T cell receptor, TCR)刺激做出反应, 这表明TCR信号通路的传导可能不依赖于m⁶A修饰^[77], 但m⁶A修饰是否参与调控TCR信号通路的激活还需要进一步研究(图3A)。

CD4⁺调节性T细胞(Treg)是分化CD4⁺ T细胞的重要分支, 可介导免疫细胞功能的负调节, 从而防止自身免疫性疾病的出现。Treg细胞能够通过表达IL-2受体 α 链激活STAT5, 该途径对其抑制功能至关重要^[78]。在Treg细胞中特异性敲除METTL3会导致小鼠发生严重的自身免疫病, 并在出生后仅几周内死亡^[79]。解析其机制发现, m⁶A能够通过促进Treg细胞SOCS mRNA的降解, 降低SOCS的表达, 激活IL-2受体信号通路, 从而促进Treg抑制免疫细胞活性的作用^[79](图3B)。值得指出的是, m⁶A甲基化在CD8⁺ T细胞发育中的作用仍然未知, 而且m⁶A修饰在CD8⁺ T细胞中TCR信号传导中的作用也需要进一步研究。

此外, m⁶A对早期B细胞发育也有重要影响。Huang课题组^[80]研究发现, METTL14的缺失抑制pro-B细胞增殖, 显著减少B细胞数量。机理研究表明, METTL14一方面通过抑制YTHDF2与m⁶A的结合, 促进IL-7触发的pro-B细胞增殖; 另一方面, 调控pro-B细胞的转变, 这一过程与YTHDF1/2无关, 取决于METTL14介导的关键转录因子激活。该研究提示, m⁶A很可能通过影响基因组的稳定性, 包括染色质的可及性以及基因的转录过程参与获得性免疫应答。

6 RNA m⁶A修饰与抗肿瘤免疫反应

免疫疗法是一种新的癌症治疗策略, 可以提高免疫系统对抗癌细胞的天然能力。内源性T细胞具有识别肿瘤来源抗原并促进恶性细胞清除的能力; 而肿瘤特异性T细胞由肿瘤相关树突状细胞(dendritic cells, DC)引发, 这些DC细胞识别肿瘤抗原并将其呈递给CD8⁺ T细胞^[81]。据报道, RNA m⁶A修饰在抗肿瘤免疫反应中也发挥着重要作用, 尤其在检查点抑制剂(PD-1抑制剂)的治疗抗性方面发挥了关键作用, 为提高癌症

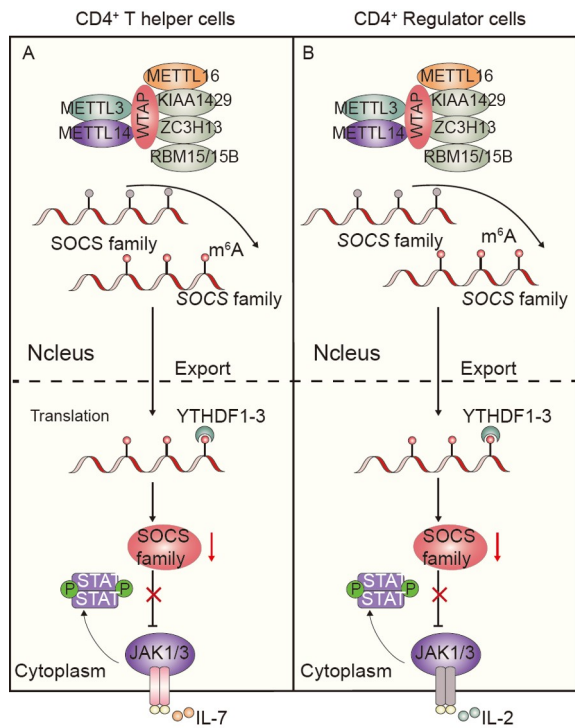


图 3 RNA m⁶A 修饰与获得性免疫反应

Figure 3 RNA m⁶A methylation plays a critical role in adaptive immunity

患者生存率和生活质量提供了新的思路(图4)。

对TCGA数据库中的775名乳腺癌患者中m⁶A相关测序数据进行分析发现, RNA甲基化修饰水平较低的患者表现出较短时间的总生存率和较高的PI3K和KRAS信号富集。另一方面, RNA甲基化修饰水平较高的患者显示出更多数量的肿瘤浸润CD8⁺ T细胞、辅助T细胞和活化的NK细胞, 但PD-L1, PD-L2, TIM3和CCR4的表达低于RNA甲基化修饰水平较低的患者^[82]。Yi等人^[83]研究也发现, 与健康组相比, m⁶A相关蛋白的表达水平在头颈部鳞状细胞癌(squamous cell carcinoma of the head and neck, HNSCC)中上调, 而且这种变化与肿瘤免疫微环境(tumor immune microenvironment, TIME)中的PDL-1呈正相关; 这一结论也在胃癌的研究中得到了证实^[84]。因此, 可以将m⁶A作为一些肿瘤可行的治疗靶点。

机制上, 一项基于结肠和黑色素瘤同基因肿瘤模型的研究表明, ALKBH5在TIME中调节Mct4/Slc16a3的表达和乳酸含量, 抑制了Treg细胞的活性, 降低了TIME中的免疫细胞浸润; 而敲除ALKBH5中使肿瘤

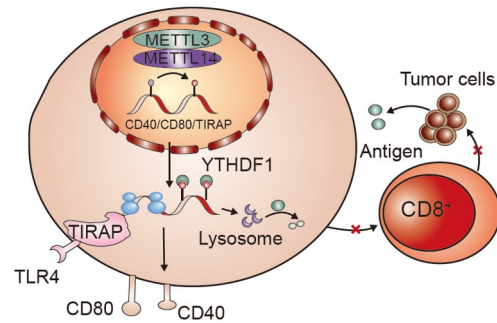


图 4 RNA m⁶A 修饰与抗肿瘤免疫反应

Figure 4 RNA m⁶A machinery regulates the function of DC cells in tumor immunity

对抗PD-1治疗更加敏感^[85]。另一项研究也表明, 黑色素瘤中FTO能够通过降低PD-1, CXCR4和SOX10中的m⁶A甲基化修饰水平抑制它们被YTHDF2识别, 从而增强mRNA的稳定性, 促进肿瘤生长。敲除FTO的黑色瘤细胞在体外对干扰素 γ (IFN γ)更敏感, 从而促进黑色素瘤对小鼠抗PD-1抗体的反应, 提高免疫疗法效果^[86]。小鼠体内实验表明, YTHDF1能够以m⁶A依赖的方式促进溶酶体蛋白酶mRNA的翻译, 增加其蛋白水平, 从而限制黑色素瘤或结肠肿瘤中浸润DC细胞的抗原交叉递呈活性^[87]。此外, YTHDF1缺失的DC细胞能够通过增强CD8⁺ T细胞消除肿瘤细胞的能力, 促进PD-L1抗体的肿瘤治疗效果^[88]。上述结果表明, m⁶A甲基化是肿瘤细胞和TIME免疫反应的主要调节剂; m⁶A可以通过调控DC细胞的抗原递呈活性与抗PD-1/PD-L1的抗体阻断相结合, 以改善抗癌免疫疗法效果。

7 研究展望

依赖于m⁶A甲基化测序技术及分析手段的进步, m⁶A甲基化在不同生物学过程中发挥的核心作用逐渐被揭示, 它也被认为将转录后的基因表达调控研究上升到了一个新层面。而一系列m⁶A修饰与免疫应答反应的相关研究提示, m⁶A修饰在控制免疫细胞功能和决定免疫细胞命运方面有着不可忽视的作用。

m⁶A修饰虽然在机体免疫学领域的研究发展迅速, 但仍有很多空白尚待填补。(1) 截至目前, 大多数依赖于m⁶A的免疫表型是基于敲除某一个m⁶A相关蛋白

的细胞来研究的。这虽然可以直观地确定哪些m⁶A相关蛋白驱动了观察到的表型, 提供对潜在分子机制的更清晰的了解; 但如何整合这些破译的信号通路, 并将它们扩展到动物模型仍然是一项重大挑战。例如, YTHDF1通过控制m⁶A修饰RNA的翻译过程促进它们的表达, 而YTHDF2则参与m⁶A修饰RNA的降解过程抑制它们的表达; 确定m⁶A介导的不同生物学功能(稳定性、翻译、出核)是否真正相互独立, 或者这些功能之间是否存在反馈调节, 将有助于深入理解m⁶A修饰调控转录后的基因表达机制, 以及它们如何嵌入和调节细胞回路。(2) 与种类繁多、可以靶向不同基因的miRNA不同, m⁶A是一种单一的表观修饰。尽管m⁶A的影响可能取决于其在mRNA中的位置或修饰水平, 但m⁶A修饰对mRNA命运的直接影响大多是微妙的, 目前尚不清楚细胞如何以及在何种条件下优先依赖RNA修饰来控制基因表达。例如, 目前的研究表明, 在同一个免疫反应的背景下, m⁶A调控可能涉及三个层面; 外源RNA的入侵, 细胞因子 I 型IFN等的合成, 以及免疫相关信号通路关键蛋白TRAF6, MAVS等的表达; 证实m⁶A参与这些事件的顺序, 并破译该过程如何

协调以产生观察到的表型是全面解析m⁶A调控免疫反应机制的重要一步。解决这一问题的挑战在于将特定的甲基化修饰位点与表型联系起来, 目前可以利用的策略是对甲基化位点的点突变, 通过能否重现观察到的表型为标准评估这一修饰位点的作用。(3) 免疫细胞的产生、分化和成熟是免疫系统发挥作用的基础, 但是m⁶A在免疫系统发育过程中的作用与机制则刚刚萌芽。一项通过单细胞RNA测序分析METTL3缺失对造血干细胞(hematopoietic stem cell, HSC)造血能力影响的研究, 发现了一个处于中间分化状态并类似于多能祖细胞的细胞群^[89]; 而且在体外人CD34⁺造血祖细胞中敲除METTL3或METTL14能够促进其分化^[90]。这些研究表明, m⁶A修饰是适当的HSC分化所必需的, 但其在造血干细胞谱系分化过程中的作用及机制仍需进一步研究。

尽管近些年来关于m⁶A与免疫取得了一系列突破进展, 但对m⁶A修饰调控免疫应答的理解仍然处于起步阶段。在以后的研究中, 应更加注重利用动物模型, 综合系统地分析m⁶A的作用机制, 解析生理环境中的RNA修饰对免疫反应的调节。

参考文献

- Allis C D, Jenuwein T. The molecular hallmarks of epigenetic control. *Nat Rev Genet*, 2016, 17: 487–500
- Zhao B S, Roundtree I A, He C. Post-transcriptional gene regulation by mRNA modifications. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2017, 18: 31–42
- 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
- Jia G, Fu Y, Zhao X, et al. N⁶-methyladenosine in nuclear RNA is a major substrate of the obesity-associated FTO. *Nat Chem Biol*, 2011, 7: 885–887
- He C. Grand challenge commentary: RNA epigenetics? *Nat Chem Biol*, 2010, 6: 863–865
- Dominissini D, Moshitch-Moshkovitz S, Schwartz S, et al. Topology of the human and mouse m⁶A RNA methylomes revealed by m⁶A-seq. *Nature*, 2012, 485: 201–206
- 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
- Merkestein M, Laber S, McMurray F, et al. FTO influences adipogenesis by regulating mitotic clonal expansion. *Nat Commun*, 2015, 6: 6792
- Bartosovic M, Molares H C, Gregorova P, et al. N⁶-methyladenosine demethylase FTO targets pre-mRNAs and regulates alternative splicing and 3'-end processing. *Nucl Acids Res*, 2017, 45: 11356–11370
- 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
- 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
- Lee M, Kim B, Kim V N. Emerging roles of RNA modification: m⁶A and u-tail. *Cell*, 2014, 158: 980–987
- Darnell R B, Ke S, Darnell Jr. J E. Pre-mRNA processing includes N⁶ methylation of adenosine residues that are retained in mRNA exons and the

- fallacy of “RNA epigenetics”. *RNA*, 2018, 24: 262–267
- 14 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
 - 15 Yao Q J, Sang L, Lin M, et al. METTL3-METTL14 methyltransferase complex regulates the quiescence of adult hematopoietic stem cells. *Cell Res*, 2018, 28: 952–954
 - 16 Kobayashi M, Ohsugi M, Sasako T, et al. The RNA methyltransferase complex of WTAP, METTL3, and METTL14 regulates mitotic clonal expansion in adipogenesis. *Mol Cell Biol*, 2018, 38
 - 17 Schwartz S, Mumbach M R, Jovanovic M, et al. Perturbation of m⁶A writers reveals two distinct classes of mRNA methylation at internal and 5' sites. *Cell Rep*, 2014, 8: 284–296
 - 18 Schöller E, Weichmann F, Treiber T, et al. Interactions, localization, and phosphorylation of the m⁶A generating METTL3-METTL14-WTAP complex. *RNA*, 2018, 24: 499–512
 - 19 Patil D P, Chen C K, Pickering B F, et al. m⁶A RNA methylation promotes XIST-mediated transcriptional repression. *Nature*, 2016, 537: 369–373
 - 20 Guo J, Tang H W, Li J, et al. Xio is a component of the *Drosophila* sex determination pathway and RNA *N*⁶-methyladenosine methyltransferase complex. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115: 3674–3679
 - 21 Knuckles P, Lence T, Haussmann I U, et al. Zc3h13/Flacc is required for adenosine methylation by bridging the mRNA-binding factor Rbm15/Spentito to the m⁶A machinery component Wtap/Fl(2)d. *Genes Dev*, 2018, 32: 415–429
 - 22 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
 - 23 Bujnicki J M, Feder M, Radlinska M, et al. Structure prediction and phylogenetic analysis of a functionally diverse family of proteins homologous to the MT-A70 subunit of the human mRNA: m⁶A methyltransferase. *J Mol Evol*, 2002, 55: 431–444
 - 24 Yang Y, Hsu P J, Chen Y S, et al. Dynamic transcriptomic m⁶A decoration: writers, erasers, readers and functions in RNA metabolism. *Cell Res*, 2018, 28: 616–624
 - 25 Rottman F M, Bokar J A, Narayan P, et al. *N*⁶-adenosine methylation in mRNA: substrate specificity and enzyme complexity. *Biochimie*, 1994, 76: 1109–1114
 - 26 Kan L, Grozhik A V, Vedanayagam J, et al. The m⁶A pathway facilitates sex determination in *Drosophila*. *Nat Commun*, 2017, 8: 15737
 - 27 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
 - 28 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
 - 29 Wang P, Duxtader K A, Nam Y. Structural basis for cooperative function of METTL3 and METTL14 methyltransferases. *Mol Cell*, 2016, 63: 306–317
 - 30 Ślędz P, Jinek M. Structural insights into the molecular mechanism of the m⁶A writer complex. *eLife*, 2016, 5: e18434
 - 31 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
 - 32 van Tran N, Ernst F G M, Hawley B R, et al. The human 18S rRNA m⁶A methyltransferase METTL5 is stabilized by TRMT112. *Nucl Acids Res*, 2019, 47: 7719–7733
 - 33 Riquelme-Barrios S, Pereira-Montecinos C, Valiente-Echeverría F, et al. Emerging roles of *N*⁶-methyladenosine on HIV-1 RNA metabolism and viral replication. *Front Microbiol*, 2018, 9
 - 34 Wang X, Lu Z, Gomez A, et al. *N*⁶-methyladenosine-dependent regulation of messenger RNA stability. *Nature*, 2014, 505: 117–120
 - 35 Wang X, Zhao B S, Roundtree I A, et al. *N*⁶-methyladenosine modulates messenger RNA translation efficiency. *Cell*, 2015, 161: 1388–1399
 - 36 Shi H, Wang X, Lu Z, et al. YTHDF3 facilitates translation and decay of *N*⁶-methyladenosine-modified RNA. *Cell Res*, 2017, 27: 315–328
 - 37 Xu C, Wang X, Liu K, et al. Structural basis for selective binding of m⁶A RNA by the YTHDC1 YTH domain. *Nat Chem Biol*, 2014, 10: 927–929
 - 38 Hsu P J, Zhu Y, Ma H, et al. YTHDC2 is an *N*⁶-methyladenosine binding protein that regulates mammalian spermatogenesis. *Cell Res*, 2017, 27: 1115–1127
 - 39 Fu Y, Dominissini D, Rechavi G, et al. Gene expression regulation mediated through reversible m⁶A RNA methylation. *Nat Rev Genet*, 2014, 15:

293–306

- 40 Du H, Zhao Y, He J, et al. YTHDF2 destabilizes m⁶A-containing RNA through direct recruitment of the CCR4-NOT deadenylase complex. *Nat Commun*, 2016, 7: 12626
- 41 Li A, Chen Y S, Ping X L, et al. Cytoplasmic m⁶A reader YTHDF3 promotes mRNA translation. *Cell Res*, 2017, 27: 444–447
- 42 Kasowitz S D, Ma J, Anderson S J, et al. Nuclear m⁶A reader YTHDC1 regulates alternative polyadenylation and splicing during mouse OOCYTE development. *PLoS Genet*, 2018, 14: e1007412
- 43 Roundtree I A, Luo G Z, Zhang Z, et al. YTHDC1 mediates nuclear export of N⁶-methyladenosine methylated mRNAs. *eLife*, 2017, 6: e31311
- 44 Tanabe A, Tanikawa K, Tsunetomi M, et al. RNA helicase YTHDC2 promotes cancer metastasis via the enhancement of the efficiency by which HIF-1 α mRNA is translated. *Cancer Lett*, 2016, 376: 34–42
- 45 Patil D P, Pickering B F, Jaffrey S R. Reading m⁶A in the transcriptome: m⁶A-binding proteins. *Trends Cell Biol*, 2018, 28: 113–127
- 46 Meyer K D, Patil D P, Zhou J, et al. 5' UTR m⁶A promotes cap-independent translation. *Cell*, 2015, 163: 999–1010
- 47 Alarcón C R, Goodarzi H, Lee H, et al. HNRNPA2B1 is a mediator of m⁶A-dependent nuclear RNA processing events. *Cell*, 2015, 162: 1299–1308
- 48 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
- 49 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
- 50 Chen K, Lu Z, Wang X, et al. High-resolution N⁶-methyladenosine (m⁶A) map using photo-crosslinking-assisted m⁶A sequencing. *Angew Chem Int Ed*, 2015, 54: 1587–1590
- 51 Linder B, Grozhik A V, Orlarier-George A O, et al. Single-nucleotide-resolution mapping of m⁶A and m⁶Am throughout the transcriptome. *Nat Methods*, 2015, 12: 767–772
- 52 Liu H, Begik O, Lucas M C, et al. Accurate detection of m⁶A RNA modifications in native RNA sequences. *Nat Commun*, 2019, 10: 4079
- 53 Garcia-Campos M A, Edelheit S, Toth U, et al. Deciphering the “m⁶A code” via antibody-independent quantitative profiling. *Cell*, 2019, 178: 731–747.e16
- 54 Zhang Z, Chen L Q, Zhao Y L, et al. Single-base mapping of m⁶A by an antibody-independent method. *Sci Adv*, 2019, 5: eaax0250
- 55 Meyer K D. DART-seq: an antibody-free method for global m⁶A detection. *Nat Methods*, 2019, 16: 1275–1280
- 56 Wu J, Chen Z J. Innate immune sensing and signaling of cytosolic nucleic acids. *Annu Rev Immunol*, 2014, 32: 461–488
- 57 Karikó K, Buckstein M, Ni H, et al. Suppression of RNA recognition by toll-like receptors: the impact of nucleoside modification and the evolutionary origin of RNA. *Immunity*, 2005, 23: 165–175
- 58 Durbin A F, Wang C, Marcotrigiano J, et al. RNAs containing modified nucleotides fail to trigger RIG-I conformational changes for innate immune signaling. *mBio*, 2016, 7: e00833-16
- 59 Lu M, Zhang Z, Xue M, et al. N⁶-methyladenosine modification enables viral RNA to escape recognition by RNA sensor RIG-I. *Nat Microbiol*, 2020, 5: 584–598
- 60 Wesselhoeft R A, Kowalski P S, Parker-Hale F C, et al. RNA circularization diminishes immunogenicity and can extend translation duration *in vivo*. *Mol Cell*, 2019, 74: 508–520.e4
- 61 Chen Y G, Chen R, Ahmad S, et al. N⁶-methyladenosine modification controls circular RNA immunity. *Mol Cell*, 2019, 76: 96–109.e9
- 62 Imaeda A, Tomoike F, Hayakawa M, et al. N⁶-methyl adenosine in siRNA evades immune response without reducing RNAi activity. *Nucleosides Nucleotides Nucl Acids*, 2019, 38: 972–979
- 63 Zheng Q, Hou J, Zhou Y, et al. The RNA helicase DDX46 inhibits innate immunity by entrapping m⁶A-demethylated antiviral transcripts in the nucleus. *Nat Immunol*, 2017, 18: 1094–1103
- 64 Wang L, Wen M, Cao X. Nuclear HNRNPA2B1 initiates and amplifies the innate immune response to DNA viruses. *Science*, 2019, 365: 656
- 65 Liu Y, You Y, Lu Z, et al. N⁶-methyladenosine RNA modification-mediated cellular metabolism rewiring inhibits viral replication. *Science*, 2019, 365: 1171–1176
- 66 Winkler R, Gillis E, Lasman L, et al. m⁶A modification controls the innate immune response to infection by targeting type I interferons. *Nat Immunol*, 2019, 20: 173–182
- 67 Rubio R M, Depledge D P, Bianco C, et al. RNA m⁶A modification enzymes shape innate responses to DNA by regulating interferon β . *Genes*

- Dev*, 2018, 32: 1472–1484
- 68 Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on toll-like receptors. *Nat Immunol*, 2010, 11: 373–384
- 69 Sun X, Dai Y, Tan G, et al. Integration analysis of m⁶A-SNPs and eqtls associated with sepsis reveals platelet degranulation and staphylococcus aureus infection are mediated by m⁶A mRNA methylation. *Front Genet*, 2020, 11: 7
- 70 Wang H, Hu X, Huang M, et al. METTL3-mediated mRNA m⁶A methylation promotes dendritic cell activation. *Nat Commun*, 2019, 10: 1898
- 71 Tong J, Wang X, Liu Y, et al. Pooled CRISPR screening identifies m⁶A as a positive regulator of macrophage activation. *Sci Adv*, 2021, 7: eabd4742
- 72 Wu C, Chen W, He J, et al. Interplay of m⁶A and H3K27 trimethylation restrains inflammation during bacterial infection. *Sci Adv*, 2020, 6: eaba0647
- 73 Zong X, Zhao J, Wang H, et al. METTL3 deficiency sustains long-chain fatty acid absorption through suppressing traf6-dependent inflammation response. *J Immunol*, 2019, 202: 567–578
- 74 Zong X, Xiao X, Shen B, et al. The N⁶-methyladenosine RNA-binding protein YTHDF1 modulates the translation of *TRAF6* to mediate the intestinal immune response. *Nucl Acids Res*, 2021, 49: 5537–5552
- 75 Li H B, Tong J, Zhu S, et al. m⁶A mRNA methylation controls T cell homeostasis by targeting the IL-7/STAT5/SOCS pathways. *Nature*, 2017, 548: 338–342
- 76 Palmer D C, Restifo N P. Suppressors of cytokine signaling (SOCs) in T cell differentiation, maturation, and function. *Trends Immunol*, 2009, 30: 592–602
- 77 Sprent J, Surh C D. Writer's block: preventing m⁶A mRNA methylation promotes T cell naivety. *Immunol Cell Biol*, 2017, 95: 855–856
- 78 Chinen T, Kannan A K, Levine A G, et al. An essential role for the IL-2 receptor in Treg cell function. *Nat Immunol*, 2016, 17: 1322–1333
- 79 Tong J, Cao G, Zhang T, et al. m⁶A mRNA methylation sustains Treg suppressive functions. *Cell Res*, 2018, 28: 253–256
- 80 Zheng Z, Zhang L, Cui X L, et al. Control of early B cell development by the RNA N⁶-methyladenosine methylation. *Cell Rep*, 2020, 31: 107819
- 81 Kurts C, Robinson B W S, Knolle P A. Cross-priming in health and disease. *Nat Rev Immunol*, 2010, 10: 403–414
- 82 He X, Tan L, Ni J, et al. Expression pattern of m⁶A regulators is significantly correlated with malignancy and antitumor immune response of breast cancer. *Cancer Gene Ther*, 2021, 28: 188–196
- 83 Yi L, Wu G, Guo L, et al. Comprehensive analysis of the PD-L1 and immune infiltrates of m⁶A RNA methylation regulators in head and neck squamous cell carcinoma. *Mol Ther-Nucl Acids*, 2020, 21: 299–314
- 84 Zhang B, Wu Q, Li B, et al. m⁶A regulator-mediated methylation modification patterns and tumor microenvironment infiltration characterization in gastric cancer. *Mol Cancer*, 2020, 19: 53
- 85 Li N, Kang Y, Wang L, et al. ALKBH5 regulates anti-PD-1 therapy response by modulating lactate and suppressive immune cell accumulation in tumor microenvironment. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2020, 117: 20159–20170
- 86 Wang Q, Chen C, Ding Q, et al. METTL3-mediated m⁶A modification of HDGF mRNA promotes gastric cancer progression and has prognostic significance. *Gut*, 2020, 69: 1193–1205
- 87 Hu X, Peng W X, Zhou H, et al. IGF2BP2 regulates dancr by serving as an N⁶-methyladenosine reader. *Cell Death Differ*, 2020, 27: 1782–1794
- 88 Han D, Liu J, Chen C, et al. Anti-tumour immunity controlled through mRNA m⁶A methylation and YTHDF1 in dendritic cells. *Nature*, 2019, 566: 270–274
- 89 Cheng Y, Luo H, Izzo F, et al. m⁶A RNA methylation maintains hematopoietic stem cell identity and symmetric commitment. *Cell Rep*, 2019, 28: 1703–1716.e6
- 90 Weng H, Huang H, Wu H, et al. METTL14 inhibits hematopoietic stem/progenitor differentiation and promotes leukemogenesis via mRNA m⁶A modification. *Cell Stem Cell*, 2018, 22: 191–205.e9

Progress on N⁶-methyladenosine regulation of immune homeostasis

ZONG Xin^{1,2,3}, FU Jie¹, JIN MingLiang^{1,2,3} & WANG YiZhen^{1,2,3}

1 College of Animal Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China;

2 Key Laboratory of Molecular Animal Nutrition of Ministry of Education, Hangzhou 310058, China;

3 Zhejiang Provincial Laboratory of Feed and Animal Nutrition, Hangzhou 310058, China

The function of the immune system relies on the strict regulation of gene expression. Recent studies have identified that RNA-modified N6-Methyladenosine (m⁶A) plays an important role in maintaining immune homeostasis. Here, based on previous research methods for RNA m⁶A methylation, we review the current research progress of the effect of RNA m⁶A regulation on immune homeostasis, such as immune recognition, antiviral infection, antibacterial infection, adaptive immune response, and tumor immunity. In addition, we discuss some of the current challenges in this field and suggest the future direction of research related to m⁶A methylation modification and immune homeostasis.

epigenetics, N6-methyladenosine; immunoregulation, immune homeostasis

doi: [10.1360/SSV-2021-0284](https://doi.org/10.1360/SSV-2021-0284)