

综述



苟兰涛, 中国科学院分子细胞科学卓越创新中心研究员、研究组长、博士生导师。获国家引进人才青年项目(海外)、中国科学院“百人计划”、上海市浦江人才计划等项目资助; 科技部重点研发计划课题负责人。主要从事RNA分子调控与染色质重塑调控相关研究, 探究其在生殖、发育及人类疾病中的重要功能与机制, 并通过解析可遗传信息密码为疾病预测、诊疗以及生殖医学等提供潜在靶点和理论依据。

RNA修饰在发育及相关疾病中的作用

朱岂凡, 文俊飞, 苟兰涛*

(中国科学院分子细胞科学卓越创新中心, 中国科学院上海生物化学与细胞生物学研究所, 核糖核酸功能与应用重点实验室, 中国科学院大学, 上海 200031)

摘要: 目前已发现约170种RNA分子的化学修饰。已有证据表明, RNA修饰的动态调控对维持生物体内正常的RNA分子代谢至关重要。因此, RNA修饰的功能机制研究已成为当下最前沿的基础研究领域之一。本综述主要聚焦mRNA分子修饰(包括m6A、m5C、Ψ、ac4C及m7G)在生殖细胞发育、早期胚胎及器官发生中的调控作用, 重点关注上述RNA修饰及其调控因子如何影响干细胞自我更新及细胞命运转变等关键发育生物学事件; 并进一步探讨了RNA修饰调控蛋白功能障碍、修饰动态变化异常等与疾病发生发展之间的潜在联系; 旨在为领域深入理解表观转录组调控与发育及人类疾病间的因果联系提供思路。

关键词: RNA修饰; 生殖细胞发育; 胚胎发育; 器官发生; 表观转录组学

The regulation and roles of RNA modification
in development and diseases

ZHU Qifan, WEN Junfei, GOU Lantao*

(Key Laboratory of RNA Science and Engineering, CAS Center for Excellence in Molecular Cell Science, Shanghai Institute of Biochemistry and Cell Biology, Chinese Academy of Sciences, University of Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

Abstract: To date, about 170 chemical modifications of RNA molecules have been identified. It has been

收稿日期: 2024-07-01

基金项目: 中国科学院战略先导科技专项B类(XDB0570000); 国家重点研发计划项目(2021YFC2700200, 2022YFC2702600); 国家自然科学基金项目(32170815, U23A20402, 32300459)

第一作者: E-mail: zhuqifan@sibcb.ac.cn

*通信作者: E-mail: goulantao@sibcb.ac.cn

demonstrated that the dynamic regulation of RNA modifications is essential for maintaining RNA metabolism. Therefore, investigating the dynamic regulation and functional mechanisms of these RNA modifications has become one of the cutting-edge fields. This review focuses on the regulatory roles of mRNA modifications (including m6A, m5C, Ψ, ac4C and m7G) in germ cell development, early embryo and organogenesis, with an emphasis on how the above mentioned RNA modifications and their regulatory factors affect key developmental biology events such as stem cell self-renewal and cell fate transitions. We further discuss the associations among dysfunction of RNA modification-associated proteins, aberrant changes in RNA modification dynamics, and development of diseases. The review aims to provide perspectives for further investigation of the correlation and causation among epitranscriptomic regulation, development and human diseases.

Key Words: RNA modifications; germ cell development; embryonic development; organogenesis; epitranscriptomics

自二十世纪五十年代首次被报道以来^[1-4],迄今在RNA上已发现170多种修饰,且几乎所有种类的RNA均能被修饰^[5]。这些化学修饰能够改变单个碱基的固有特征,从而影响RNA代谢调控。针对这些修饰的研究促成了表观转录组学(epitranscriptome),而表观转录组学现有研究中关注最多的是tRNA、rRNA及mRNA上的修饰。这三类RNA在翻译过程中不可或缺,其修饰也影响RNA“生命周期”中的各个阶段,包括RNA剪接、结构、运输、稳定性及翻译效率。因此,RNA修饰是基因从转录到翻译再到降解过程中至关重要的调控因素。

得益于近年来高通量测序技术的不断发展,一部分RNA修饰(如m6A和m5C)的全转录组图谱,已在不同的组织样本中得以绘制,其中包括稀有的细胞类群如卵母细胞和早期胚胎。不同组织及生理环境下RNA修饰的时空动态变化极大地丰富了领域内对其分子功能及生理作用的理解。在机体发育过程中,细胞命运受到严格调控。为了能对外界信号进行快速响应进而做出自我更新、增殖或分化的命运决定,细胞往往需要在完全重建转录谱之前,就能迅速重置蛋白质表达。高度动态的RNA修饰作为一种能够快速响应信号的调控机制,可能是实现这种快速蛋白质谱变化的重要因素^[6]。RNA修饰的调控极其复杂,涉及一系列RNA结合蛋白,即RNA修饰的“编码器(writer)”“擦除器(eraser)”和“读码器(reader)”。这些RNA结

合蛋白功能障碍导致的RNA修饰异常与不孕不育^[7-13]及各种发育障碍^[14-16]相关(表1),进一步提示RNA修饰动态变化及其调控机制在哺乳动物生理发育和疾病发生中有重要作用。

综上,本文梳理了近年来报道的RNA修饰及相关蛋白在哺乳动物生殖系统和机体发育中的调控功能,重点讨论这些修饰如何调控mRNA代谢从而发挥其生理功能,如影响干细胞的自我更新及细胞命运转换等一系列发育事件,并总结展望了RNA修饰领域有待完善或尚未系统探索的一些问题。RNA修饰及其调控蛋白的偏好RNA底物及分子功能已有多篇综述系统总结,本文将其汇总于表1,在文中不再深入讨论。

1 RNA修饰在哺乳动物精子发生中的调控功能

哺乳动物的精子发生(spermatogenesis)是一个高度特化的细胞分化过程。在睾丸的曲细精管中,不同的生精细胞按照特殊的细胞联系排列,由周缘向腔面依次为精原细胞(spermatogonia)、初级精母细胞(primary spermatocyte)、次级精母细胞(secondary spermatocyte)、单倍体精子细胞(spermatid)和精子。精子发生包含三个基本细胞生物学事件:精原细胞的有丝分裂、精母细胞的减数分裂以及单倍体精子细胞中的精子形成(spermiogenesis)。精原细胞的有丝分裂是其自我更新、增殖及分化的基础,为精子发生的稳定和可

表1 RNA修饰及其调控蛋白

RNA 修饰	调控 蛋白	调控蛋白亚细胞 定位	调控蛋白已知底物或功能	调控蛋白功能丧失小鼠模 型表型及相关的发育障碍
m ⁶ A	编码器	METTL3	催化亚基/ 蛋白 细胞核；细胞质	由RNA聚合酶Ⅱ生成的转录本 ^[17-19] 雄性不育 ^[11,12] ；雌性不育 ^[20] ；小脑发育缺陷 ^[21] ；视网膜发育缺陷 ^[22] ；压力及年龄相关的心力衰竭 ^[23] ；围产期肝损伤 ^[24] ；肝糖原合成异常 ^[25] ；间充质干细胞向成骨细胞方向分化异常 ^[26]
		METTL14	适配蛋白 细胞核	由RNA聚合酶Ⅱ生成的转录本 ^[17-19] 雄性不育 ^[11,12] ；大脑皮层神经发生过程中细胞周期紊乱 ^[27] ；神经干细胞自我更新缺陷 ^[28] ；视网膜前体细胞细胞周期及分化异常 ^[29]
		WTAP	辅助因子 细胞核	由RNA聚合酶Ⅱ生成的转录本 ^[17-19] 扩张型心肌病 ^[30]
		RBM15/15B	辅助因子 细胞核	由RNA聚合酶Ⅱ生成的转录本 ^[17-19] /
		ZC3H13	辅助因子 细胞核	由RNA聚合酶Ⅱ生成的转录本 ^[17-19] /
		VIRMA(KIAA1429)	辅助因子 细胞核	由RNA聚合酶Ⅱ生成的转录本 ^[17-19] 雌性不育 ^[31]
		DDX21	辅助因子 细胞核	由RNA聚合酶Ⅱ生成的转录本 ^[17-19] /
		METTL4	催化亚基/ 蛋白 细胞核	U2 snRNA ^[32] /
		METTL16	催化亚基/ 蛋白 细胞核	U6 snRNA、MAT2A mRNA、多种ncRNA、pre-mRNA ^[33] 雄性不育 ^[34] ；着床期胚胎发育阻滞 ^[35]
		METTL5	催化亚基/ 蛋白 细胞核	rRNA ^[36] 髓鞘化异常；智力异常 ^[37]
		TRMT112	辅助因子 细胞核；核周细胞质	rRNA ^[36] /
		ZCCHC4	辅助因子 细胞核；细胞质	rRNA ^[36] /
	擦除器	FTO	催化亚基/ 蛋白 细胞核	mRNA、snRNA ^[38] 年龄相关的雄性亚可育 ^[39] ；雌性不育 ^[40] ；肌源性分化异常 ^[41]
		ALKBH5	催化亚基/ 蛋白 细胞核；细胞质	mRNA ^[42] 雄性不育 ^[43] ；雌性不育 ^[44] ；低压缺氧环境下小脑细胞增殖分化异常 ^[22]
		RBM33	辅助因子 细胞核	mRNA ^[42] /
		ALKBH3	催化亚基/ 蛋白 细胞核	tRNA ^[45] /
读码器	YTHDC1	直接结合	细胞核	调控mRNA剪接、加尾及出核 ^[46] ；抑制逆转座子 ^[47,48] 雄性不育 ^[49] ；雌性不育 ^[49] ；扩张型心肌病 ^[50]
		YTHDC2	直接结合	细胞核；细胞质 促进mRNA翻译及降解 ^[9] 雄性不育 ^[9,13] ；雌性不育 ^[9]
		YTHDF1	直接结合	细胞质 促进mRNA翻译 ^[51] 存活且可育 ^[20] ；学习能力及记忆缺陷 ^[52]
	YTHDF2	直接结合	细胞质	促进mRNA降解 ^[53] 雄性不育 ^[54] ；雌性不育 ^[55] ；神经系统发育异常且部分断奶期致死 ^[55]
		YTHDF3	直接结合	细胞质 促进mRNA翻译及降解 ^[56] 存活且可育 ^[20]
		EIF3	依赖于GG(m ⁶ A)CU基序	细胞质 与YTHDF1共同作用促进mRNA翻译 ^[51,57] /
		hnRNPs	依赖于m ⁶ A结构开关(m ⁶ A structural switch)	细胞核 调控RNA剪接 ^[58] /

(续表1)

表1 RNA修饰及其调控蛋白

RNA 修饰	调控 蛋白		调控蛋白亚细胞 定位	调控蛋白已知底物或功能	调控蛋白功能丧失小鼠模 型表型及相关的发育障碍	
m ⁵ C	编码器	IGF2BP1/IGF2BP2/ IGF2BP3	依赖于GG (m ⁶ A)CU 基序	细胞核; 细胞质	促进mRNA稳定性及翻译 ^[59]	/
		FMR1(FMRP)	依赖于GG (m ⁶ A)CU基 序	细胞核; 细胞质	介导mRNA出核 ^[60] ; 调控mRNA稳 定性 ^[61] ; 抑制翻译 ^[62]	神经发生过程中细胞周期 紊乱 ^[63]
		PRRC2A	依赖于GG (m ⁶ A)CU基 序	细胞质	促进RNA稳定性 ^[64]	雄性不育 ^[65] ; 少突胶质细 胞的特化异常 ^[64]
		CNBP	未知	细胞核; 细胞质	促进mRNA稳定性及翻译 ^[66]	/
		ELAVL1(HUR) ^[67]	未知	细胞核; 细胞质	未知	/
		RBFOX2	未知	细胞核	Promotes m ⁶ A-dependent chromatin silencing ^[68]	/
	擦除器	NSUN1	催化亚基/ 蛋白	细胞核	rRNA ^[69]	/
		NSUN2	催化亚基/ 蛋白	细胞核	tRNA ^[70] 、mRNA ^[71] 、ncRNA ^[72] 、 viral RNA ^[73]	雄性不育 ^[74] ; 短期记忆受 损 ^[75]
		NSUN3	催化亚基/ 蛋白	线粒体	mt-tRNA ^[14,76]	线粒体脑肌病 ^[77,78]
		NSUN4	催化亚基/ 蛋白	线粒体	mt-rRNA ^[79]	/
		NSUN5	催化亚基/ 蛋白	细胞核	rRNA ^[80,81]	年龄相关的雌性亚可 育 ^[82] ; 威廉姆斯综合征 (Williams-Beuren syndrome, WBS) ^[81]
		NSUN6	催化亚基/ 蛋白	细胞质	tRNA ^[83] 、mRNA ^[84,85]	运动及学习障碍 ^[86]
		NSUN7	催化亚基/ 蛋白	未知	增强子RNA(enhancer RNA, eRNA) ^[87]	雄性不育 ^[88]
		DNMT2		细胞核	tRNA ^[89] 、病毒RNA ^[90]	表观代际遗传 ^[89]
	读码器	TET family	催化亚基/ 蛋白	细胞核	逆转座子RNA ^[91]	/
		ALKBH1		细胞质; 线粒体	胞质tRNA、mt-tRNA ^[92]	/
m ⁷ G	编码器	ALYREF	直接结合	细胞核	介导mRNA核质转运 ^[93]	/
		YBX1	直接结合	细胞质	促进mRNA稳定性 ^[94] ; 抑制mRNA 翻译 ^[95]	/
		YTHDF2	直接结合	细胞质	介导rRNA前体加工 ^[96]	/
读码器	METTL1-WDR4 complex	Catalytic complex	细胞核	tRNA、mRNA、miRNA ^[97,98]	心脏纤维化 ^[99]	
	RNMT-RAM complex	Catalytic complex	细胞核	m ⁷ G-cap ^[100]	/	
	TGS1	Catalytic complex	细胞核	TMG-cap ^[101]	/	
	WBSCLR22- TRMT112 complex	Catalytic complex	细胞核; 核周细 胞质	rRNA	/	
	Nuclear cap binding protein complex (CBC)	m ⁷ G-cap	细胞核	介导mRNA加工成熟 ^[102] 及转运 ^[103]	/	
	eIF4E	m ⁷ G-cap	细胞核; 细胞质	促进翻译起始; 促进mRNA加工 及出核 ^[104]	/	
	PARN	m ⁷ G-cap		促进去腺苷酸化 ^[105,106]	/	

(续表1) **表1 RNA修饰及其调控蛋白**

RNA 修饰	调控 蛋白		调控蛋白亚细胞 定位	调控蛋白已知底物或功能	调控蛋白功能丧失小鼠模 型表型及相关的发育障碍	
		Snuportin-1(SNUPN)	TMG-cap	细胞核；细胞质	介导snRNAs从胞质向核内运输 ^[107] /	
		Exportin-1(XPO1/ CRM1)	TMG-cap	细胞核；细胞质	介导U3 snoRNA从Cajal bodies向 核仁运输 ^[108] 以及初始miRNA(pri- miRNA)向胞质运输 ^[109] /	
		QKI	I n t e r n a l m7G	细胞质	与G3BP1相互作用，将靶RNA限 制于应激颗粒，从而抑制其翻 译 ^[110] /	
ac ⁴ C	编码器	NAT10	催 化 亚 基 / 蛋白	细胞核(核仁)	t R N A ^[1 1 1] 、r R N A ^[1 1 2 , 1 1 3] 、 mRNA ^[114-116] 、 雄性不育 ^[117] ；雌性不育 ^[118]	
Ψ	编码器	PUS1	催 化 亚 基 / 蛋白	细胞核；线粒体	mRNA ^[119] 、tRNA、mt-tRNA ^[120]	线粒体肌病伴乳酸酸中毒 和红细胞性贫血(MLASA) ^[121]
		PUSL1	催 化 亚 基 / 蛋白	线粒体内膜	mRNA ^[122]	/
		PUS3	催 化 亚 基 / 蛋白	细胞核；细胞质	mRNA、tRNA ^[122]	智力缺陷 ^[123]
		PUS7	催 化 亚 基 / 蛋白	细胞核	mRNA、tRNA ^[122]	智力缺陷及小头畸形 ^[124]
		PUS7L	催 化 亚 基 / 蛋白	细 胞 核 (核 仁 ； 核斑)	mRNA、tRNA ^[122]	/
		PUS10	催 化 亚 基 / 蛋白	细胞核(核质及核 小体)；线粒体	mRNA、tRNA ^[119]	/
		TRUB1	催 化 亚 基 / 蛋白	细胞核；线粒体	mRNA、tRNA、mt-tRNA ^[119,122]	/
		TRUB2	催 化 亚 基 / 蛋白	线粒体	mRNA、tRNA、mt-tRNA、mt- mRNA ^[119,122]	/
		DKC1	催 化 亚 基 / 蛋白	细胞核	m R N A 、 r R N A 、 s n o R N A 、 snRNA ^[120,122]	肝细胞增殖缺陷 ^[125]
		RPUSD2	催 化 亚 基 / 蛋白	细胞核；线粒体	mRNA ^[119]	/
		RPUSD3	催 化 亚 基 / 蛋白	细胞核；线粒体	mRNA、mt-mRNA ^[126]	/
		RPUSD4	催 化 亚 基 / 蛋白	细胞核；线粒体	mRNA、mt-rRNA ^[119,126]	/

“/”表示无相关研究或文献

持续提供保证; 精母细胞的减数分裂中, 同源染色体非姐妹染色单体间发生配对、联会和重组交换, 继而精确分离产生单倍体精子细胞。因而减数分裂的正常进行是染色体数目稳定性、配子遗传多样性和物种适应性的基本前提; 单倍体精子细胞则经历了染色质压缩、组蛋白-鱼精蛋白置换、顶体形成及鞭毛组装等一系列复杂的分子和形态学变化, 最终形成具有运动能力和受精潜能的精子, 即精子形成。综上所述, 精子发生这一生理过程极其复杂且高度时空特异, 需要多水平的精细调控来保证其顺利进行, 而近年来的一系列研究显示, RNA修饰是其中一种不可或缺的调

控机制。

1.1 m6A

N6-甲基腺苷(N6-methyladenosine, m6A)是mRNA上丰度最高的修饰。m6A的写入主要依赖甲基转移酶样(methyltransferase-like, METTL)蛋白家族^[18,19,127]; 而其去甲基化则主要由脂肪量和肥胖相关蛋白(fat mass and obesity associated protein, FTO)^[38,128]以及烷基化修复同系物5(alkylation repair homolog 5, ALKBH5)^[129,130]介导。m6A修饰的RNA分子能够被一系列m6A阅读蛋白识别, 包括YTH结构域蛋白家族(YTHDF1/2/3、YTHDC1/2)^[46,49,51,53,56]、胰岛素样生长因子2 mRNA结合蛋白

1/2/3(insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 1/2/3, IGF2BP1/2/3)^[59]及核不均一核糖核蛋白(heterogeneous nuclear ribonucleoproteins, hnRNPs)^[58]等。这些“读码器”通过对m6A的特异性识别,进而影响RNA剪接、核质转运、稳定性以及翻译等关键生物学过程。

2017年,两个研究组利用基于免疫沉淀(immunoprecipitation, IP)的m6A测序检测方法,分别绘制了精子发生各阶段m6A的动态变化图谱。在早期生精细胞(gonocyte)内,敲除METTL3或METTL14均可导致RNA剪接、翻译及稳定性异常,进而造成睾丸中精原干细胞(spermatogonial stem cell, SSC)缺失^[11,12]。而在较后期的精原细胞(即SSC分化后的type A1 spermatogonia)中,只有符合敲除METTL3和METTL14才能显著影响精子形成过程中关键基因的翻译,导致精子形成障碍。这一现象表明, METTL3和METTL14在精子形成过程中可能存在部分冗余^[12]。除了METTL3和METTL14, m6A编码器METTL16——秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*, *C. elegans*) METT10在哺乳动物中的直系同源蛋白也对雄性生育能力至关重要。METTL16基因在秀丽隐杆线虫及小鼠生殖细胞中的缺失均能导致不育表型。当秀丽隐杆线虫培养于高营养条件下, METT10介导的m6A修饰能阻断重要剪接因子U2AF35识别3'剪接位点,进而抑制S-腺苷甲硫氨酸(SAM)合成酶转录本的正常剪接和翻译,而在HeLa细胞中也观察到m6A对U2AF35识别存在抑制作用,表明METTL16通过介导3'-末端剪接位点的m6A修饰调控剪接的机制在哺乳动物中保守^[34]。

除了m6A编码器之外, m6A的多个读码器也是精子发生过程中的重要角色。精母细胞富集的YTHDF2介导精母细胞中的精原细胞特异性转录本的及时降解,从而确保精子发生过程中精原细胞向精母细胞的正常转变^[54]。YTHDC1从胚胎时期起在生殖细胞中持续高表达,并对精原细胞的存活至关重要,其在小鼠雄性生殖细胞中的缺失会导致类似唯支持细胞综合征的表型^[49]。在精母细胞粗线期(pachytene)高表达的YTHDC2在减数分裂过程中有重要作用,其在生精细胞中的缺失导致减数分裂相关基因表达异常及粗线期精母细胞的端

粒异常聚集,进而导致细胞凋亡。尽管YTHDC2能特异识别m6A修饰,但有研究表明, YTHDC2在精子发生中的功能并不依赖其m6A识别功能,而是依赖其3'→5' RNA解旋酶活性^[13]。PRRC2A是2019年在脑发育过程中鉴定到的新型m6A读码器^[64],而其在睾丸中有更高表达,主要存在于精母细胞及圆形精子中。在小鼠雄性生殖细胞中特异敲除PRRC2A基因,小鼠精母细胞减数分裂异常、圆形精子核型异常并产生脱落,精母细胞及圆形精子均出现大量凋亡,小鼠不育。PRRC2A RIP-seq显示其靶标mRNA中存在精原特异基因及减数分裂相关基因。转录组、翻译组及IP-MS等数据进一步提示, PRRC2A可能通过与YBX家族蛋白的相互作用,介导精原特异基因转录本的降解,同时与FXR1、PABPC1、EIF4G3等翻译相关因子相互作用,促进减数分裂细胞周期及细胞分裂相关基因的翻译。PRRC2A的这种双向调控作用,区别于其在少突胶质细胞特化过程中单一的稳定作用,提示该双向调控功能可能是生殖细胞特异的^[65]。

m6A的去甲基化酶(即擦除器) ALKBH5和FTO的缺失同样能导致小鼠精子发生障碍,提示m6A的动态可逆,即m6A的去除对于生精过程中的基因表达调控同样重要。ALKBH5于2013年在精子发生这一研究系统中被鉴定为哺乳动物中第二个m6A擦除器^[129]。ALKBH5缺失的小鼠能正常存活,但会发生雄性小鼠不育、睾丸变小、生精异常、精母粗线期和中期细胞凋亡。ALKBH5介导的m6A去甲基化显著影响核斑(nuclear speckle)中mRNA加工因子的组装,促进mRNA的正常剪接。同时, ALKBH5介导的m6A去甲基化也可能调控精子形成过程中针对3'UTR较长转录本的选择性降解^[43]。相较于ALKBH5, FTO在大脑而非睾丸中表达量较高。尽管如此,有研究表明, FTO介导的去甲基化可能调节雄激素受体(androgen receptor, AR)的翻译并促进睾丸间质细胞(Leydig cell)的成熟,从而影响未分化精原细胞的维持及精子发生^[39]。

1.2 其他RNA修饰

除了丰度最高的m6A外,近年来的研究也表明了5-甲基胞嘧啶(5-methylcytidine, m5C)和N4-乙酰胞嘧啶核苷(N4-acetylcytidine, ac4C)在精子发生过

程中的重要性。

m5C是指供体的一个活性甲基被添加到RNA中胞嘧啶碱基的第5位碳,也是一种广泛存在于mRNA和非编码RNA中的修饰。m5C的写入在哺乳动物中主要依赖于NOL1/NOP2/SUN(NSUN)结构域酶家族及DNA甲基转移酶2(DNMT2,又称tRNA天冬氨酸甲基转移酶1, TRDMT1);而其去甲基化则主要由TET家族蛋白介导。m5C修饰能够被mRNA出核接头蛋白ALYREF及Y-box结合蛋白(YBX)家族蛋白特异性识别,进而影响RNA核质运输及稳定性等。小鼠m5C编码器NSUN2的缺失会导致小鼠不育,精子发生阻滞于减数分裂细线期及偶数期(leptotene and zygotene, LZ)阶段。在圆形精子中, NSUN2定位于雄性生殖细胞特有的无膜细胞器拟染色质体(chromatoid body, CB),提示其在精子形成过程中可能存在生殖细胞特异的调控功能^[131]。小鼠中NSUN7的功能缺失同样导致小鼠不育。但与NSUN2不同, NSUN7缺失的小鼠睾丸中并未观察到精子发生阻滞,但其成熟精子鞭毛灵活性受损,进而导致精子前向游动能力丧失^[88]。与上述NSUN家族蛋白不同, DNMT2的缺失并不影响雄性生育能力;但其缺失能改变成熟精子中携带的小RNA表达谱。成熟精子中的小RNA被认为是表观代际遗传的潜在分子信息载体,能将父本环境暴露的信息如高脂饮食等传递给子代。因此, DNMT2介导的m5C修饰可能参与父本环境暴露信息的写入,调控表观代际遗传^[89]。

RNA上的ac4C修饰由目前唯一已知的编码器——N-乙酰基转移酶10(NAT10)催化产生,其去除机制及特异性识别蛋白仍不清楚。研究显示, ac4C修饰具有调控mRNA稳定性及翻译效率等功能^[4]。利用HPLC-MS/MS技术对小鼠多种组织中Total RNA和mRNA上的ac4C进行定量分析发现,与其他组织相比,睾丸和附睾的ac4C含量相对较高,且ac4C丰度在精子发生过程中高度动态变化,从精母细胞到圆形精子逐渐减少。小鼠雄性生殖细胞特异性敲除*Nat10*基因导致精原细胞分化及减数分裂起始异常,而少数能进入减数分裂的精母细胞也存在DSB修复异常及同源重组缺陷等,最终阻滞于粗线期阶段。需要指出的是, NAT10

作为乙酰转移酶,其底物除了mRNA以外,还包括多种非编码RNA、组蛋白及细胞骨架蛋白等,其缺失所造成的影响并不等同于mRNA中ac4C的潜在功能^[117]。同时, ac4C在mRNA中的丰度仍存在争议^[132],因此ac4C在精子发生中的功能仍需进一步研究。

此外,尽管已确定多个RNA修饰的编码器在精子发生过程中具有重要功能, m5C、ac4C以及假尿嘧啶(Ψ)等RNA修饰自身在生精过程中的动态变化及时空分布仍不完全清楚。

2 RNA修饰在卵子发生及着床前胚胎发育中的调控功能

卵子发生是指雌性原始生殖细胞(primordial germ cell, PGC)逐步发育为成熟卵细胞的过程,其基因表达调控与精子发生存在差异但同样极其复杂。雌性原始生殖细胞在胚胎期E13.5天进入减数分裂。出生后,未成熟的卵母细胞停滞在第一次减数分裂前期的双线期(diplotene stage),并被周围单层扁平颗粒细胞包裹,形成原始卵泡作为卵巢的基本单位。原始卵泡在形成之后处于休眠状态。在外界信号的激活下,原始卵泡中卵母细胞进入快速生长和转录活跃状态,进一步发育为初级卵泡(primary follicle)、次级卵泡(secondary follicle)、有腔卵泡(antral follicle)和排卵卵泡(ovulated follicle)。在此期间,卵母细胞会恢复减数分裂,其特点是“生发泡破裂(germinal vesicle breakdown, GVBD)”。GVBD和第一次减数分裂完成后,卵母细胞排出第一极体并进入第二次减数分裂,进而阻滞于第二次减数分裂中期直到受精。

自完全生长的初级卵母细胞(full-grown oocytes, FGOs)开始,至合子基因组激活(zygotic genome activation, ZGA)之前,卵母细胞的转录基本处于沉默状态。因此,卵母细胞中储存的mRNA除了调控自身的成熟外,也是受精后、合子基因组激活前胚胎发育的必需资源,其中转录本翻译的时空调控精细而复杂。合子基因组激活即受精卵的转录激活,在受精卵分裂到特定发育阶段(小鼠为二细胞晚期,人类为8细胞时期)时被启动。与此同时,大量母源mRNA发生降解(maternal

decay), 最终实现母源-合子转变(maternal-to-zygotic transition, MZT), 可见母源mRNA的及时降解是哺乳动物卵母细胞向受精卵发展的关键步骤。卵细胞及受精卵中RNA储存、翻译和降解的精细调控依赖于多种RNA修饰及其效应蛋白的共同参与, 而卵母细胞及早期胚胎中RNA修饰异常或其效应蛋白功能丧失可能是人类卵子及胚胎发育异常的致病原因。

2.1 m6A

近年来多项研究发现, m6A修饰是卵母细胞成熟和母源-合子转变过程中基因表达调控的关键机制。储存在成熟卵子中的大量母源RNA都携带m6A修饰, 且m6A修饰在早期胚胎发育过程中具有高度动态性^[7,133]。近期一项研究利用单细胞m6A测序(sc-m6A-seq)发现二细胞时期两个卵裂球(blastomeres)的m6A修饰存在差异^[134], 并可能与卵裂球合子基因组激活不同步现象相关。此外, 在卵子成熟和早期胚胎发育过程中, 多个m6A修饰相关蛋白都被证实具有重要功能。

m6A编码器METTL3对卵子的发生至关重要。在小鼠原始生殖细胞晚期特异性敲除METTL3基因, 其卵巢形态异常, 无明显的卵泡^[20]; 而在原始卵泡阶段敲除METTL3基因, 卵母细胞无法完成GVBD(即不能恢复减数分裂), 且只有极少数卵泡能发育至初级阶段之后^[20,135]。同时, 这些卵母细胞中出现DNA损伤累积^[135]和RNA降解异常^[134], 受精后无法发育阻滞于二细胞阶段^[8,20]。在二细胞胚胎的合子基因组激活后, METTL3介导的m6A对二至四细胞时期短暂表达的ZGA转录本的及时降解也具有调控作用^[133]。在囊胚时期, METTL3是调控干细胞多能性(pluripotency)的关键因子。METTL3缺失的囊胚或原始态(naïve)胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)中m6A修饰丰度大幅下调, 且无法完成原始态向始发态(primed)多能性的转变。大部分原始态多能性促进基因如Nanog和Klf2等都带有m6A修饰。在METTL3缺失的情况下, 细胞中原始态多能性促进基因的转录本无法及时降解, 从而稳定了原始态多能性的调控回路, 由此推断, 原始态多能性促进基因转录本上的m6A修饰可能介导其及时降解, 使细胞能退出原始态, 向始发态转变^[136]。与METTL3缺乏类

似, 卵母细胞中缺乏METTL3/METTL14复合物的关键辅助因子KIAA1429也会导致GVBD和减数分裂恢复失败。KIAA1429缺失的卵母细胞表现出RNA的异常积累和剪接缺陷^[31]。

除了编码基因外, 逆转座子(retrotransposons)来源的转录本也是METTL3/METTL14复合物的靶RNA, 如卵母细胞中高丰度转座子元件MTA(属于MaLR家族)、二细胞特异性表达的MERVL(属于ERV L家族)以及mESC中内源性逆转录病毒(endogenous retrovirus) IAPez^[47,48]等。卵细胞成熟及早期胚胎发育过程中逆转座子RNA丰度的动态变化对该过程非常重要, 而这些RNA上的m6A修饰可能是其中的一种调控机制^[133]。除了METTL3/METTL14复合物外, m6A编码器METTL16也是早期胚胎发育不可或缺的因素。小鼠16细胞胚胎中缺乏METTL16会导致其底物MAT2A(一种SAM合成酶)转录本丰度下降, 进而在64细胞阶段出现转录组大规模异常, 并在着床期前后出现发育停滞^[35]。

许多已知的m6A读码器都曾以卵子发生或早期胚胎发育作为系统进行功能研究, 且其中一些显示了其他读码器无法补偿的特有功能。YTHDF2可能是研究最为深入的m6A读码器, 相较于其他读码器, 其功能在卵母细胞和早期胚胎发育中尤为重要。当在原始卵泡阶段敲除YTHDF2基因, 卵细胞可以发育为成熟卵子(即M II时期)。然而, 这些M II卵母细胞受精后并不能正常发育。组学数据显示, 部分带有m6A修饰且与YTHDF2结合的转录本应在GV到M II的转变过程中降解; 但在YTHDF2缺失的情况下, 这些转录本在M II卵母细胞异常累积, 最终导致受精后二细胞胚胎发育异常^[55]。尽管YTHDF1、YTHDF2和YTHDF3三种同源的m6A读码器被认为具有不同的分子功能; 与YTHDF2不同, YTHDF1和YTHDF3缺失的小鼠仍能存活且可育, 提示YTHDF1和YTHDF3功能缺失可由其他YTHDF读码器进行补偿^[20]。YTH家族的另外两个读码器YTHDC1和YTHDC2在卵母细胞成熟过程中也有关键作用。YTHDC1缺失的卵母细胞发育阻滞于初级卵泡阶段^[49], 研究显示, YTHDC1与3'-末端加工因子(如SRSF3等)共同调节卵母细胞中的多聚腺苷酸化(polyA)。而YTHDC2基因敲除雌性小鼠

的卵母细胞发育阻滞于减数分裂粗线期之前,与雄性小鼠中精母细胞阻滞时期类似,提示YTHDC2在卵子发生中的作用可能与精子发生类似^[9]。如上所述,逆转座子RNA也带有m6A修饰。逆转座子RNA和编码基因RNA上的m6A均可被IGF2BP2识别,进而促进其在卵母细胞中的稳定性^[44,133]。

当m6A擦除器缺失时,卵母细胞和早期胚胎中的m6A不能及时去除,进而导致RNA代谢出现异常。首个被鉴定的m6A擦除器FTO缺失导致雌性小鼠无法产生健康存活的子代。利用小鼠胚胎干细胞(mouse embryonic stem cells, mESCs)作为研究系统,发现FTO的去甲基化底物包括染色质相关RNA(caRNA)和逆转座子LINE1 RNA。FTO敲除的mESCs中,caRNA和LINE1 RNA上的m6A修饰异常累积,并进一步导致LINE1 RNA丰度降低、染色质开放程度降低以及转录活性降低等,最终引起mESC增殖及分化缺陷。m6A另一擦除器ALKBH5的缺失会导致卵母细胞中m6A修饰的异常累积。这些m6A修饰被IGF2BP2识别,进而增强RNA的稳定性,导致转录本异常累积及减数分裂缺陷^[44]。

2.2 其他RNA修饰

m5C广泛存在于卵母细胞和早期胚胎的mRNA中,并且在调控卵细胞成熟和母源-合子转变中也起着关键作用。NSUN2敲除造成果蝇母源mRNA上m5C大规模丧失,进而导致受精后胚胎发育迟缓、母源-合子转变失败^[137]。这一表型与先前研究在斑马鱼中干扰m5C读码器YBX1后看到的表型相互验证^[94],提示m5C在卵细胞成熟及早期胚胎发育中具有重要功能。同样的,在哺乳动物卵母细胞中NSUN5基因高表达,而NSUN5缺失的雌性小鼠卵巢中m5C水平显著下降,并影响部分基因(如MAD2L2、GDF9和BRD8等)的剪接及翻译,进而导致卵巢功能及胚胎发育缺陷^[82]。得益于高通量单碱基m5C鉴定技术的发展,近来的研究显示,哺乳动物mRNA上存在两类m5C位点(Type I和Type II位点),其编码器分别为NSUN2和NSUN6。NSUN2介导的mRNA上m5C位点倾向于在其3'-末端有一个富G的基序,类似于tRNA中的小颈环结构底部;而NSUN6介导的mRNA上m5C位点富集于(m5C)UCCA基序^[84,85]。以卵细胞及早期胚胎为

研究体系,相较于小鼠、果蝇等模式动物,人类母源mRNA上具有更多NSUN6依赖的m5C位点,提示表观转录组也具有物种特异性,并可能参与调控物种特异的发育过程^[137]。

与精子发生类似,当在雌性原始生殖细胞中敲除ac4C编码器NAT10基因时,卵母细胞发育阻滞于第一次减数分裂粗线期;而在初级卵泡时期敲除NAT10基因,卵母细胞发育阻滞于次级卵泡时期。多种组学联合分析显示,NAT10介导的ac4C修饰可提升CCR4-NOT复合体中主要成分(如Cnot6l、Cnot7和Btg4)的翻译及稳定性,从而促进CCR4-NOT复合体介导的母源mRNA降解及转录组重塑。此外,NAT10介导的ac4C修饰还能提高部分看家基因的翻译效率^[118]。综上,NAT10通过调控转录本翻译及稳定性、微调基因表达,从而在小鼠卵母细胞减数分裂重启、生长和成熟的过程中发挥关键作用。

3 RNA修饰在器官发生中的调控功能及在发育疾病中的致病机理

哺乳动物器官发生(organogenesis)是胚胎中细胞经过分裂、增殖、分化、迁移及程序性死亡等一系列行为,最终构成功能结构特异器官的复杂过程。一系列儿童和成人疾病,包括结构性出生缺陷及神经发育障碍等,都可能来源于胚胎时期发育异常。因此,了解器官发生的调控机制对于揭示发育疾病的起源至关重要,同时也为相关疾病的诊疗提供新的理论基础。近年来研究显示,RNA修饰也是器官发生的重要调控机制。

3.1 神经系统

3.1.1 m6A

多项研究都重点关注了METTL3/METTL14复合物在神经系统发育和疾病中的功能。在小鼠神经系统发育过程中,不同研究对METTL3基因进行条件性敲除,发现其缺失在小鼠小脑发育过程中能导致外部颗粒层(external granule cell layer, EGL)中新生小脑颗粒细胞(cerebellar granule cells, CGC)的凋亡,进而致使小脑发育不全^[21];其缺失在大脑皮层中会导致皮层放射胶质细胞(radial glial cell)及其前体细胞的翻译异常^[138];其缺失在视网膜发生过程中导致视网膜前体细胞(retinal progenitor

cell, RPC)特异的转录本无法及时降解, 因此不能顺利分化为Müller胶质细胞^[139]。小鼠小脑中过量表达METTL3则会导致浦肯野细胞(Purkinje cells)和胶质细胞结构紊乱, 导致小脑发育异常^[22]。

同样, METTL14的缺失也会导致神经发育的多种缺陷。在小鼠胚胎期大脑中敲除METTL14基因会导致m6A丧失, 并引起放射状胶质细胞的细胞周期延长, 令其在小鼠出生后也能促进神经发生^[27]。进一步的研究发现, 读码器FMRP能特异性识别m6A并介导mRNA的核质转运, 也是神经发生中细胞周期调控的关键因素^[63]。METTL14写入的m6A修饰还能促进神经干细胞(neural stem cells, NSCs)的自我更新。NSCs中的m6A可通过调节编码组蛋白修饰酶转录本的降解, 进而调节组蛋白修饰^[28]。在视网膜前体细胞中也观察到METTL14缺失导致细胞周期紊乱及分化异常的表型^[29]。除了调节mRNA代谢外, METTL5介导的rRNA中m6A修饰对于髓鞘化和正常脑功能也不可或缺^[37]。

如上所述, YTHDF家族读码器之间可能存在部分功能冗余, 因此单个YTHDF家族读码器的缺失并不会导致所有小鼠过早死亡, 但这些m6A读码器仍然是神经发生过程中的关键调控因子。在视网膜中同时敲除三个YTHDF读码器可以重现METTL14基因敲除的表型^[29]。YTHDF1基因敲除小鼠则表现出学习和记忆缺陷。YTHDF1可识别海马区神经元中部分关键基因上的m6A修饰, 并在响应外界刺激的条件下加强其翻译, 从而调控小鼠空间学习与记忆能力^[52]。80%的YTHDF2全身性缺失小鼠可能在断奶前死亡, 其神经干/祖细胞(neural stem/progenitor cells, NSPC)中转录本无法及时降解, 从而导致NSPC自我更新及分化异常, 神经系统发育严重受损^[55,140]。有趣的是, 在视网膜神经节细胞(retinal ganglion cell, RGC)中特异性敲除YTHDF2基因可使视网膜内丛状层变厚且突触增加, 小鼠视动反应能力也有明显提升^[141]。PRRC2A是在神经细胞中鉴定到的新型m6A读码器, 识别m6A修饰的少突胶质细胞中髓鞘相关基因上游的关键转录因子OLIG2转录本并维持其稳定性, 进而促进少突胶质细胞的特化和髓鞘化^[64]。

m6A去甲基化酶FTO和ALKBH5通常被认为不

是神经发育所必需的, 然而, 它们可能是机体在面对不良环境时所需的应激机制。例如, 当暴露于低压缺氧环境时, ALKBH5的缺失会导致小脑细胞增殖和分化异常。虽然在缺乏ALKBH5的情况下, m6A整体水平仅略微上升, 但在部分调控细胞命运的转录本上, m6A水平显著改变, 进而影响该转录本的核质运输等代谢过程, 最终导致小脑发育缺陷^[22]。

3.1.2 m5C

与m6A相比, 人们对m5C在神经发育中的作用知之甚少。m5C编码器NSUN2^[75]、NSUN5^[81]和NSUN6^[86]的功能障碍可能与发育迟缓、智力残疾(intellectual disability, ID)等神经系统缺陷有关。在果蝇中, 缺乏NSUN2会导致严重的短期记忆缺陷^[75], 缺乏NSUN6则导致运动和学习障碍^[86]。在小鼠前额叶皮质(prefrontal cortex, PFC)中NSUN2的缺失可明显影响tRNA中的m5C水平, 导致多种编码甘氨酸的tRNA表达水平下降, 进而引起翻译异常、突触信号传递异常等^[142]。NSUN5功能缺陷被认为是导致威廉姆斯综合征(Williams-Beuren syndrome, WBS)的原因之一, WBS是一种具有严重神经缺陷的多系统疾病。NSUN5基因敲除小鼠也表现出认知障碍^[143-145]。NSUN5在胚胎期大脑皮层的放射状胶质细胞中高度表达, 其缺失可导致放射状神经胶质支架生长异常, 进而影响新皮层神经元的迁移^[144]。在出生后阶段, NSUN5在胼胝体少突胶质细胞前体细胞(oligodendrocyte precursor cells, OPCs)和少突胶质细胞中高表达, 而NSUN5的缺失抑制了这些细胞的增殖, 导致这些细胞类型大量减少。同时, NSUN5缺陷的小鼠胼胝体中, 细胞周期相关基因的蛋白质水平也有所降低^[143]。NSUN3作为线粒体tRNA中m5C的编码器, 对mt-tRNA^{Met}发挥正常功能至关重要, 也因此与线粒体脑肌病(mitochondrial encephalomyopathy, ME)尤为相关^[77,78]。综上, m5C修饰及其效应蛋白在神经系统发育及相关疾病的发生过程中起着重要调控作用。

3.2 心血管系统及肝脏

RNA修饰在心血管系统发育过程中的具体功能尚不清楚, 但其相关蛋白包括m6A编码器METTL3和读码器YTHDC1, 以及N7-甲基鸟苷

(m7G)编码器METTL1已被报道对心血管系统正常发育非常重要。METTL3在心肌细胞中特异性过表达和缺失分别导致m6A水平升高和降低。过表达METTL3可诱导补偿性肥厚性心肌重塑,但其功能无缺陷;心脏中特异性敲除METTL3基因,新生小鼠无异常,提示其敲除并不会损害心脏发育。然而, METTL3条件性敲除小鼠表现出与压力和年龄相关的心力衰竭,提示METTL3在损伤后适应性心脏重塑中起关键作用^[23]。WTAP是METTL3/METTL14复合物的关键辅助因子,其功能缺失与扩张型心肌病(dilated cardiomyopathy, DCM)有关。WTAP的缺乏会导致染色质可及性降低以及心肌细胞中关键转录因子MEF2A和MEF2C的转录活性下调。但WTAP的这种染色质调控功能是否依赖于m6A仍有待证实^[30]。YTHDC1功能也与扩张型心肌病相关。多组学联合分析发现, YTHDC1识别TITIN(扩张型心肌病最常见的遗传病^[50])上的m6A修饰并参与调控其正常剪接^[146]。

与METTL3不同, m7G编码器METTL1基因敲除减轻心脏肥大, 而过表达则导致心脏重塑。METTL1可能介导SRSF9 3'UTR区域的m7G修饰, 促进SRSF9转录本的稳定性, 进而促进关键转录因子NFATC4的剪接及稳定, 促进心脏肥大^[147]。在心脏纤维化组织中发现, METTL1介导的m7G水平上升, 而在心脏成纤维细胞中敲除METTL1基因可改善心脏纤维化, 提示METTL1可能是一种促纤维化因子, 也是心脏纤维化的潜在治疗靶点^[99]。

RNA修饰无疑在调控肝脏细胞发育和维持正常肝功能方面也起着关键作用。例如, Ψ修饰编码器DKC1对rRNA加工和肝细胞增殖至关重要^[125]。然而, 近期研究仍聚焦于m6A在肝脏细胞发育中的调控作用机制, 对其他修饰在肝脏中的生理功能研究较少。肝脏特异性敲除METTL3基因会导致围产期肝细胞损伤、肝脏祖细胞(liver progenitor cells)活化和肝脏纤维化, 最终导致小鼠出生后死亡。m6A读码器IGF2BP1识别METTL3写入的m6A修饰并稳定肝脏发育重要转录因子HNF4A转录本^[24]。进一步研究显示, 另一读码器IGF2BP2可识别METTL3介导的m6A并稳定GYS2转录本。GYS2编码肝脏特异的糖原合酶, 是肝糖原生成的关键酶^[25]。

3.3 肌肉骨骼系统

3.3.1 骨骼肌生成

骨骼肌由大量肌纤维组成, 占人体质量的30%~40%。成肌祖细胞(myogenic progenitor cells)增殖、分化和融合形成多核肌纤维的过程被称为肌生成。肌肉生成在胚胎和成年阶段都会发生。成年生物体内的肌肉干细胞——又称卫星细胞(satellite cells), 可在损伤或压力的触发下迅速扩增并分化形成新的肌肉纤维, 以确保肌肉组织在受到损伤后能及时修复。肌肉干细胞的增殖和分化与其线粒体功能密切相关^[148]。m6A擦除器FTO和Ψ编码器PUS1对肌肉中的线粒体功能至关重要。骨骼肌FTO缺陷型小鼠的骨骼肌发育受损。缺失FTO会导致成肌细胞中线粒体含量降低、mtDNA编码基因表达减少及ATP水平下降。PGC-1α是线粒体生物发生和能量产生的一个关键调节因子, 其表达也会在FTO缺失时下调^[41]。PUS1基因突变与线粒体肌病伴乳酸酸中毒和红细胞性贫血(MLASA)有关, MLASA是一种罕见的遗传性代谢疾病。PUS1敲除小鼠在14周龄时表现出运动能力下降, 同时伴有肌肉代谢失调、线粒体含量减少和氧化代谢能力受损^[121]。此外, NSUN5介导的rRNA的m5C修饰对肌细胞中转录本翻译起调控作用。如上所述, NSUN5与WBS(一种多系统疾病, 也以肌肉质量下降为特征)有关^[149]。同样, NSUN5基因敲除小鼠在摄食量不变的情况下也表现出肌肉量(lean mass)减少^[81]。

3.3.2 骨生成

骨生成是骨骼维持和损伤修复所必需的过程。骨的两种主要细胞类型中成骨细胞(osteoblast)分泌细胞外蛋白形成骨骼, 而破骨细胞(osteoclast)吸收旧的或受损的骨骼, 两者之间的平衡活动(骨稳态)对成年个体骨骼健康至关重要。当破骨细胞的活性超过成骨细胞的活性时, 就会出现骨质疏松症。有研究报道了METTL3在骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)中的重要作用^[150]。MSCs是成骨细胞的前体细胞之一。METTL3功能缺失会损害间充质干细胞向成骨方向分化的潜能, 而在间充质干细胞中过表达METTL3则可保护小鼠免受雌激素缺乏诱导的骨质疏松症影响。间充质干细胞中的METTL3对甲状旁腺激素

(parathyroid hormone, PTH)的主要受体甲状旁腺激素受体-1(parathyroid hormone type 1 receptor, Pth1r)的翻译至关重要, PTH/Pth1r信号促进间充质干细胞分化为成骨细胞, 并促进成骨细胞的增殖和分化^[26,150]。综上, METTL3介导的m6A修饰再次被证明对细胞分化至关重要, 而骨发育和相关疾病中还有更多的表观转录组学机制尚有待研究。

4 总结与展望

得益于近年来不断发展的检测技术, RNA修饰的种类不断增加, 也有越来越多的研究揭示其对基因表达的重要调控作用。毋庸置疑, RNA修饰的动态变化及其相关蛋白的有序表达在哺乳动物生殖及发育过程中有着不可或缺的作用, 而RNA修饰异常可能导致不孕不育, 神经发育障碍等多种出生缺陷和疾病。然而, RNA修饰如何调控机体发育, 其异常又如何导致发育疾病的发生发展, 这些过程中仍存在许多问题有待探索。

4.1 RNA修饰之间的协同互作

多种RNA修饰和相关蛋白构成复杂的调控网络, 共同影响RNA代谢。尽管多项研究提示, 多种RNA修饰均是发育过程中的关键调控因子, 但近期研究都集中于m6A(mRNA上最常见的RNA修饰)的作用, 而对其他RNA修饰的研究较少。此外, 只有少数研究探讨了这些RNA修饰及其相关蛋白如何在时空上进行相互协调。第三代长读长测序(纳米孔技术, Nanopore)结果显示, 不同的RNA修饰确实能在同一mRNA分子中共存^[151-153]。这些修饰如何共存、其背后的调控机制及影响尚不清楚, 且目前存在多种假设。例如, 存在于同一RNA分子的不同修饰, 可能是该分子在不同RNA加工阶段获得的。一种修饰的编码器和另一种修饰的读码器之间也可能存在相互作用, 从而促进了不同修饰的逐步添加。同一RNA分子的多种修饰也可能产生协同效果或互相拮抗。这些假设都是表转录组领域亟需探索的问题。

4.2 非编码RNA上RNA修饰的调控作用

尽管目前的研究主要聚焦于蛋白编码基因中的RNA修饰功能, 但多项研究表明, 非编码RNA包括lncRNA、miRNA、carRNA和逆转座子转录本等, 其修饰对于RNA代谢同样有重要的调控功

能。因此, 探索非编码RNA中RNA修饰的调控功能机制对于全面解析发育和相关疾病中的表观转录组调控至关重要。

4.3 稀有细胞类型中RNA修饰位点、丰度及其作用

虽然目前已有多种针对RNA修饰的单碱基分辨率测序方法, 但这些测序方法所需的初始样品量要求仍较高, 因此仍不适用于卵母细胞和早期胚胎等稀有细胞类型。此外, 不同的研究团队报道的RNA修饰位点及其丰度可能存在较大差异。这些差异可能源于不同的研究体系以及不同的测序方法。因此, 精确定位RNA修饰并准确测量其丰度, 尤其是稀有细胞类型中的丰度较低的修饰, 仍然是一项挑战。除了测序方法外, 基于CRISPR的RNA编辑系统可以对鉴定到的RNA修饰位点进行位点特异性编辑。因此, 该技术在阐明特定位点RNA修饰所具有的生物学功能, 以及作为治疗手段针对疾病相关位点进行修正等领域, 具有巨大的潜能。

综上所述, RNA修饰调控对于细胞进行正常基因表达和生理活动, 完成个体发育不可或缺。未来的研究通过整合多学科方法, 如高通量组学和CRISPR编辑系统等, 将有助于进一步破译RNA修饰在生理和疾病状态下的不同功能及调控机制, 进而为转化研究和相关疾病治疗提供理论依据和潜在靶标。

参考文献

- [1] Amos H, Korn M. 5-Methyl cytosine in the RNA of *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta*, 1958, 29(2): 444-445
- [2] Cohn WE. Pseudouridine, a carbon-carbon linked ribonucleoside in ribonucleic acids: isolation, structure, and chemical characteristics. *J Biol Chem*, 1960, 235(5): 1488-1498
- [3] Cohn WE, Volkin E. Nucleoside-5'-phosphates from ribonucleic acid. *Nature*, 1951, 167(4247): 483-484
- [4] Davis FF, Allen FW. Ribonucleic acids from yeast which contain a fifth nucleotide. *J Biol Chem*, 1957, 227(2): 907-915
- [5] Boccaletto P, Stefaniak F, Ray A, et al. MODOMICS: a

- database of RNA modification pathways. 2021 update. *Nucleic Acids Res*, 2022, 50(D1): D231-D235
- [6] Frye M, Harada BT, Behm M, et al. RNA modifications modulate gene expression during development. *Science*, 2018, 361(6409): 1346-1349
- [7] Zhao BS, Wang X, Beadell AV, et al. m6A-dependent maternal mRNA clearance facilitates zebrafish maternal-to-zygotic transition. *Nature*, 2017, 542(7642): 475-478
- [8] Sui X, Hu Y, Ren C, et al. METTL3-mediated m⁶A is required for murine oocyte maturation and maternal-to-zygotic transition. *Cell Cycle*, 2020, 19(4): 391-404
- [9] Hsu PJ, Zhu Y, Ma H, et al. Ythdc2 is an N⁶-methyladenosine binding protein that regulates mammalian spermatogenesis. *Cell Res*, 2017, 27(9): 1115-1127
- [10] Tang C, Xie Y, Yu T, et al. m6A-dependent biogenesis of circular RNAs in male germ cells. *Cell Res*, 2020, 30(3): 211-228
- [11] Xu K, Yang Y, Feng GH, et al. Mettl3-mediated m6A regulates spermatogonial differentiation and meiosis initiation. *Cell Res*, 2017, 27(9): 1100-1114
- [12] Lin Z, Hsu PJ, Xing X, et al. Mettl3-/Mettl14-mediated mRNA N⁶-methyladenosine modulates murine spermatogenesis. *Cell Res*, 2017, 27(10): 1216-1230
- [13] Wojtas MN, Pandey RR, Mendel M, et al. Regulation of m6A transcripts by the 3'→5' RNA helicase YTHDC2 is essential for a successful meiotic program in the mammalian germline. *Mol Cell*, 2017, 68(2): 374-387
- [14] Jonkhout N, Tran J, Smith MA, et al. The RNA modification landscape in human disease. *RNA*, 2017, 23(12): 1754-1769
- [15] Batista PJ, Molinie B, Wang J, et al. m6A RNA modification controls cell fate transition in mammalian embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*, 2014, 15(6): 707-719
- [16] Ignatova VV, Stolz P, Kaiser S, et al. The rRNA m⁶A methyltransferase METTL5 is involved in pluripotency and developmental programs. *Genes Dev*, 2020, 34(9-10): 715-729
- [17] Liu J, Dou X, Chen C, et al. N⁶-methyladenosine of chromosome-associated regulatory RNA regulates chromatin state and transcription. *Science*, 2020, 367(6477): 580-586
- [18] Bokar JA, Shambaugh ME, Polayes D, et al. Purification and cDNA cloning of the AdoMet-binding subunit of the human mRNA (N⁶-adenosine)-methyltransferase. *RNA*, 1997, 3(11): 1233-1247
- [19] Liu J, Yue Y, Han D, et al. A METTL3-METTL14 complex mediates mammalian nuclear RNA N⁶-adenosine methylation. *Nat Chem Biol*, 2014, 10(2): 93-95
- [20] Lasman L, Krupalnik V, Viukov S, et al. Context-dependent functional compensation between Ythdf m⁶A reader proteins. *Genes Dev*, 2020, 34(19-20): 1373-1391
- [21] Wang CX, Cui GS, Liu X, et al. METTL3-mediated m6A modification is required for cerebellar development. *PLoS Biol*, 2018, 16(6): e2004880
- [22] Ma C, Chang M, Lv H, et al. RNA m6A methylation participates in regulation of postnatal development of the mouse cerebellum. *Genome Biol*, 2018, 19(1): 68
- [23] Dorn LE, Lasman L, Chen J, et al. The N⁶-methyladenosine mRNA methylase METTL3 controls cardiac homeostasis and hypertrophy. *Circulation*, 2019, 139(4): 533-545
- [24] Xu Y, Zhou Z, Kang X, et al. Mettl3-mediated mRNA m6A modification controls postnatal liver development by modulating the transcription factor Hnf4a. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 4555
- [25] Zhang X, Yin H, Zhang X, et al. N⁶-methyladenosine modification governs liver glycogenesis by stabilizing the glycogen synthase 2 mRNA. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 7038
- [26] Wu Y, Xie L, Wang M, et al. Mettl3-mediated m6A RNA methylation regulates the fate of bone marrow mesenchymal stem cells and osteoporosis. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 4772
- [27] Yoon KJ, Ringeling FR, Vissers C, et al. Temporal control of mammalian cortical neurogenesis by m6A methylation. *Cell*, 2017, 171(4): 877-889
- [28] Wang Y, Li Y, Yue M, et al. N⁶-methyladenosine RNA modification regulates embryonic neural stem cell self-renewal through histone modifications. *Nat Neurosci*, 2018, 21(2): 195-206
- [29] Niu F, Che P, Yang Z, et al. m6A regulation of cortical and retinal neurogenesis is mediated by the redundant m6A readers YTHDFs. *iScience*, 2022, 25(9): 104908
- [30] Shi L, Li X, Zhang M, et al. Downregulation of Wtap causes dilated cardiomyopathy and heart failure. *J Mol Cell Cardiol*, 2024, 188: 38-51
- [31] Hu Y, Ouyang Z, Sui X, et al. Oocyte competence is maintained by m6A methyltransferase KIAA1429-mediated RNA metabolism during mouse follicular development. *Cell Death Differ*, 2020, 27(8): 2468-2483
- [32] Chen H, Gu L, Orellana EA, et al. METTL4 is an snRNA m6Am methyltransferase that regulates RNA splicing. *Cell Res*, 2020, 30(6): 544-547
- [33] Pendleton KE, Chen B, Liu K, et al. The U6 snRNA m6A methyltransferase METTL16 regulates SAM synthetase intron retention. *Cell*, 2017, 169(5): 824-835
- [34] Mendel M, Delaney K, Pandey RR, et al. Splice site m6A methylation prevents binding of U2AF35 to inhibit RNA splicing. *Cell*, 2021, 184(12): 3125-3142

- [35] Mendel M, Chen KM, Homolka D, et al. Methylation of structured RNA by the m6A writer METTL16 is essential for mouse embryonic development. *Mol Cell*, 2018, 71(6): 986-1000
- [36] Ma H, Wang X, Cai J, et al. N6-methyladenosine methyltransferase ZCCHC4 mediates ribosomal RNA methylation. *Nat Chem Biol*, 2019, 15(1): 88-94
- [37] Wang L, Liang Y, Lin R, et al. Mettl5 mediated 18S rRNA N6-methyladenosine (m6A) modification controls stem cell fate determination and neural function. *Genes Dis*, 2022, 9(1): 268-274
- [38] 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(6): 973-985
- [39] Wu Y, Li J, Li C, et al. Fat mass and obesity-associated factor (FTO)-mediated N6-methyladenosine regulates spermatogenesis in an age-dependent manner. *J Biol Chem*, 2023, 299(6): 104783
- [40] Wei J, Yu X, Yang L, et al. FTO mediates LINE1 m6A demethylation and chromatin regulation in mESCs and mouse development. *Science*, 2022, 376(6596): 968-973
- [41] Wang X, Huang N, Yang M, et al. FTO is required for myogenesis by positively regulating mTOR-PGC-1 α pathway-mediated mitochondria biogenesis. *Cell Death Dis*, 2017, 8(3): e2702
- [42] Yu F, Zhu AC, Liu S, et al. RBM33 is a unique m6A RNA-binding protein that regulates ALKBH5 demethylase activity and substrate selectivity. *Mol Cell*, 2023, 83(12): 2003-2019
- [43] Tang C, Klukovich R, Peng H, et al. ALKBH5-dependent m6A demethylation controls splicing and stability of long 3'-UTR mRNAs in male germ cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115(2): E325-E333
- [44] Bai L, Xiang Y, Tang M, et al. ALKBH5 controls the meiosis-coupled mRNA clearance in oocytes by removing the N6-methyladenosine methylation. *Nat Commun*, 2023, 14(1): 6532
- [45] Ueda Y, Ooshio I, Fusamae Y, et al. AlkB homolog 3-mediated tRNA demethylation promotes protein synthesis in cancer cells. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 42271
- [46] Xiao W, Adhikari S, Dahal U, et al. Nuclear m6A reader YTHDC1 regulates mRNA splicing. *Mol Cell*, 2016, 61(4): 507-519
- [47] Liu J, Gao M, He J, et al. The RNA m6A reader YTHDC1 silences retrotransposons and guards ES cell identity. *Nature*, 2021, 591(7849): 322-326
- [48] Xu W, Li J, He C, et al. METTL3 regulates heterochromatin in mouse embryonic stem cells. *Nature*, 2021, 591(7849): 317-321
- [49] Kasowitz SD, Ma J, Anderson SJ, et al. Nuclear m6A reader YTHDC1 regulates alternative polyadenylation and splicing during mouse oocyte development. *PLoS Genet*, 2018, 14(5): e1007412
- [50] Vogan K. TTN mutations in cardiomyopathy. *Nat Genet*, 2012, 44(4): 368
- [51] Wang X, Zhao BS, Roundtree IA, et al. N6-methyladenosine modulates messenger RNA translation efficiency. *Cell*, 2015, 161(6): 1388-1399
- [52] Shi H, Zhang X, Weng YL, et al. m6A facilitates hippocampus-dependent learning and memory through YTHDF1. *Nature*, 2018, 563(7730): 249-253
- [53] Wang X, Lu Z, Gomez A, et al. N6-methyladenosine-dependent regulation of messenger RNA stability. *Nature*, 2014, 505(7481): 117-120
- [54] Qi M, Sun H, Guo Y, et al. m6A reader protein YTHDF2 regulates spermatogenesis by timely clearance of phase-specific transcripts. *Cell Prolif*, 2022, 55(1): e13164
- [55] Ivanova I, Much C, Di Giacomo M, et al. The RNA m6A reader YTHDF2 is essential for the post-transcriptional regulation of the maternal transcriptome and oocyte competence. *Mol Cell*, 2017, 67(6): 1059-1067
- [56] Shi H, Wang X, Lu Z, et al. YTHDF3 facilitates translation and decay of N6-methyladenosine-modified RNA. *Cell Res*, 2017, 27(3): 315-328
- [57] Meyer KD, Patil DP, Zhou J, et al. 5'UTR m6A promotes cap-independent translation. *Cell*, 2015, 163(4): 999-1010
- [58] Alarcón CR, Goodarzi H, Lee H, et al. HNRNPA2B1 is a mediator of m6A-dependent nuclear RNA processing events. *Cell*, 2015, 162(6): 1299-1308
- [59] 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(3): 285-295
- [60] Hsu PJ, Shi H, Zhu AC, et al. The RNA-binding protein FMRP facilitates the nuclear export of N6-methyladenosine-containing mRNAs. *J Biol Chem*, 2019, 294(52): 19889-19895
- [61] Zhang F, Kang Y, Wang M, et al. Fragile X mental retardation protein modulates the stability of its m6A-marked messenger RNA targets. *Hum Mol Genet*, 2018, 27(22): 3936-3950
- [62] Edupuganti RR, Geiger S, Lindeboom RGH, et al. N6-methyladenosine (m6A) recruits and repels proteins to regulate mRNA homeostasis. *Nat Struct Mol Biol*, 2017, 24(10): 870-878
- [63] Edens BM, Vissers C, Su J, et al. FMRP modulates neural differentiation through m6A-dependent mRNA nuclear export. *Cell Rep*, 2019, 28(4): 845-854
- [64] Wu R, Li A, Sun B, et al. A novel m6A reader Prrc2a controls oligodendroglial specification and myelination.

- [Cell Res](#), 2019, 29(1): 23-41
- [65] Tan X, Zheng C, Zhuang Y, et al. The m6A reader PRRC2A is essential for meiosis I completion during spermatogenesis. [Nat Commun](#), 2023, 14(1): 1636
- [66] Deng J, Zhang J, Ye Y, et al. N6-methyladenosine-mediated upregulation of WTAPP1 promotes WTAP translation and Wnt signaling to facilitate pancreatic cancer progression. [Cancer Res](#), 2021, 81(20): 5268-5283
- [67] Dominissini D, Moshitch-Moshkovitz S, Schwartz S, et al. Topology of the human and mouse m6A RNA methylomes revealed by m6A-seq. [Nature](#), 2012, 485(7397): 201-206
- [68] Dou X, Xiao Y, Shen C, et al. RBFOX2 recognizes N6-methyladenosine to suppress transcription and block myeloid leukaemia differentiation. [Nat Cell Biol](#), 2023, 25(9): 1359-1368
- [69] Sharma S, Yang J, Watzinger P, et al. Yeast Nop2 and Rcm1 methylate C2870 and C2278 of the 25S rRNA, respectively. [Nucleic Acids Res](#), 2013, 41(19): 9062-9076
- [70] Blanco S, Dietmann S, Flores JV, et al. Aberrant methylation of tRNAs links cellular stress to neurodevelopmental disorders. [EMBO J](#), 2014, 33(18): 2020-2039
- [71] Huang T, Chen W, Liu J, et al. Genome-wide identification of mRNA 5-methylcytosine in mammals. [Nat Struct Mol Biol](#), 2019, 26(5): 380-388
- [72] Hussain S, Sajini AA, Blanco S, et al. NSun2-mediated cytosine-5 methylation of vault noncoding RNA determines its processing into regulatory small RNAs. [Cell Rep](#), 2013, 4(2): 255-261
- [73] Courtney DG, Chalem A, Bogerd HP, et al. Extensive epitranscriptomic methylation of A and C residues on murine leukemia virus transcripts enhances viral gene expression. [mBio](#), 2019, 10(3): e01209-19
- [74] Blanco S, Kurowski A, Nichols J, et al. The RNA-methyltransferase misu (NSun2) poises epidermal stem cells to differentiate. [PLoS Genet](#), 2011, 7(12): e1002403
- [75] Abbasi-Moheb L, Mertel S, Gonsior M, et al. Mutations in NSUN2 cause autosomal-recessive intellectual disability. [Am J Hum Genet](#), 2012, 90(5): 847-855
- [76] Nakano S, Suzuki T, Kawarada L, et al. NSUN3 methylase initiates 5-formylcytidine biogenesis in human mitochondrial tRNAMet. [Nat Chem Biol](#), 2016, 12(7): 546-551
- [77] Van Haute L, Dietmann S, Kremer L, et al. Deficient methylation and formylation of mt-tRNAMet wobble cytosine in a patient carrying mutations in NSUN3. [Nat Commun](#), 2016, 7(1): 12039
- [78] Paramasivam A, Meena AK, Venkatapathi C, et al. Novel biallelic NSUN3 variants cause early-onset mitochondrial encephalomyopathy and seizures. [J Mol Neurosci](#), 2020, 70(12): 1962-1965
- [79] Metodiev MD, Spähr H, Loguercio 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(2): e1004110
- [80] Janin M, Ortiz-Barahona V, de Moura MC, et al. Epigenetic loss of RNA-methyltransferase NSUN5 in glioma targets ribosomes to drive a stress adaptive translational program. [Acta Neuropathol](#), 2019, 138(6): 1053-1074
- [81] 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(22): 11807-11825
- [82] Ding C, Lu J, Li J, et al. RNA-methyltransferase Nsun5 controls the maternal-to-zygotic transition by regulating maternal mRNA stability. [Clin Transl Med](#), 2022, 12(12): e1137
- [83] Haag S, Warda AS, Kretschmer J, et al. NSUN6 is a human RNA methyltransferase that catalyzes formation of m⁵ C72 in specific tRNAs. [RNA](#), 2015, 21(9): 1532-1543
- [84] Selmi T, Hussain S, Dietmann S, et al. Sequence- and structure-specific cytosine-5 mRNA methylation by NSUN6. [Nucleic Acids Res](#), 2020, 49(2): 1006-1022
- [85] Liu J, Huang T, Zhang Y, et al. Sequence- and structure-selective mRNA m5C methylation by NSUN6 in animals. [Natl Sci Rev](#), 2021, 8(6): nwaa273
- [86] Mattioli F, Worpenberg L, Li CT, et al. Biallelic variants in NSUN6 cause an autosomal recessive neurodevelopmental disorder. [Genet Med](#), 2023, 25(9): 100900
- [87] Aguilo F, Li SD, Balasubramaniyan N, et al. Deposition of 5-methylcytosine on enhancer RNAs enables the coactivator function of PGC-1 α . [Cell Rep](#), 2016, 14(3): 479-492
- [88] Harris T, Marquez B, Suarez S, et al. Sperm motility defects and infertility in male mice with a mutation in Nsun7, a member of the sun domain-containing family of putative RNA methyltransferases1. [Biol Reprod](#), 2007, 77(2): 376-382
- [89] Zhang Y, Zhang X, Shi J, et al. Dnmt2 mediates intergenerational transmission of paternally acquired metabolic disorders through sperm small non-coding RNAs. [Nat Cell Biol](#), 2018, 20(5): 535-540
- [90] Durdevic Z, Hanna K, Gold B, et al. Efficient RNA virus control in *Drosophila* requires the RNA methyltransfer-

- ase Dnmt2. *EMBO Rep*, 2013, 14(3): 269-275
- [91] Guallar D, Bi X, Pardavila JA, et al. RNA-dependent chromatin targeting of TET2 for endogenous retrovirus control in pluripotent stem cells. *Nat Genet*, 2018, 50(3): 443-451
- [92] 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(12): 7401-7415
- [93] Yang X, Yang Y, Sun BF, et al. 5-methylcytosine promotes mRNA export-NSUN2 as the methyltransferase and ALYREF as an m5C reader. *Cell Res*, 2017, 27(5): 606-625
- [94] Yang Y, Wang L, Han X, et al. RNA 5-methylcytosine facilitates the maternal-to-zygotic transition by preventing maternal mRNA decay. *Mol Cell*, 2019, 75(6): 1188-1202
- [95] Sun J, Yan L, Shen W, et al. Maternal Ybx1 safeguards zebrafish oocyte maturation and maternal-to-zygotic transition by repressing global translation. *Development*, 2018, 145: dev166587
- [96] Dai X, Gonzalez G, Li L, et al. YTHDF2 binds to 5-methylcytosine in RNA and modulates the maturation of ribosomal RNA. *Anal Chem*, 2020, 92(1): 1346-1354
- [97] Deng Y, Zhou Z, Ji W, et al. METTL1-mediated m7G methylation maintains pluripotency in human stem cells and limits mesoderm differentiation and vascular development. *Stem Cell Res Ther*, 2020, 11(1): 306
- [98] Boulias K, Greer EL. Put the pedal to the METTL1: adding internal m7G increases mRNA translation efficiency and augments miRNA processing. *Mol Cell*, 2019, 74(6): 1105-1107
- [99] Wang L, Zhou J, Kong L, et al. Fibroblast-specific knockout of METTL1 attenuates myocardial infarction-induced cardiac fibrosis. *Life Sci*, 2023, 329: 121926
- [100] Gonatopoulos-Pournatzis T, Dunn S, Bounds R, et al. RAM/fam103a1 is required for mRNA cap methylation. *Mol Cell*, 2011, 44(4): 585-596
- [101] Godfrey AC, Kupsco JM, Burch BD, et al. U7 snRNA mutations in *Drosophila* block histone pre-mRNA processing and disrupt oogenesis. *RNA*, 2006, 12(3): 396-409
- [102] Rambout X, Maquat LE. The nuclear cap-binding complex as choreographer of gene transcription and pre-mRNA processing. *Genes Dev*, 2020, 34(17-18): 1113-1127
- [103] Gebhardt A, Habjan M, Benda C, et al. mRNA export through an additional cap-binding complex consisting of NCBP1 and NCBP3. *Nat Commun*, 2015, 6(1): 8192
- [104] Volpon L, Culjkovic-Kraljacic B, Sohn HS, et al. A biochemical framework for eIF4E-dependent mRNA export and nuclear recycling of the export machinery. *RNA*, 2017, 23(6): 927-937
- [105] Dehlin E, Wormington M, Körner CG, et al. Cap-dependent deadenylation of mRNA. *EMBO J*, 2000, 19(5): 1079-1086
- [106] Gao M, Fritz DT, Ford LP, et al. Interaction between a poly(A)-specific ribonuclease and the 5' cap influences mRNA deadenylation rates *in vitro*. *Mol Cell*, 2000, 5(3): 479-488
- [107] Palacios I. Nuclear import of U snRNPs requires importin beta. *EMBO J*, 1997, 16(22): 6783-6792
- [108] Boulon S, Verheggen C, Jady BE, et al. PHAX and CRM1 are required sequentially to transport U3 snoRNA to nucleoli. *Mol Cell*, 2004, 16(5): 777-787
- [109] Martinez I, Hayes KE, Barr JA, et al. An Exportin-1-dependent microRNA biogenesis pathway during human cell quiescence. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114(25): E4961-E4970
- [110] Zhao Z, Qing Y, Dong L, et al. QKI shuttles internal m7G-modified transcripts into stress granules and modulates mRNA metabolism. *Cell*, 2023, 186(15): 3208-3226
- [111] Kowalski S, Yamane T, Fresco JR. Nucleotide sequence of the "denaturable" leucine transfer RNA from yeast. *Science*, 1971, 172(3981): 385-387
- [112] Sharma S, Langhendries JL, Watzinger P, et al. Yeast Kre33 and human NAT10 are conserved 18S rRNA cytosine acetyltransferases that modify tRNAs assisted by the adaptor Tan1/THUMPDI. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43(4): 2242-2258
- [113] Ito S, Horikawa S, Suzuki T, et al. Human NAT10 is an ATP-dependent RNA acetyltransferase responsible for N4-acetylcytidine formation in 18S ribosomal RNA (rRNA). *J Biol Chem*, 2014, 289(52): 35724-35730
- [114] Arango D, Sturgill D, Alhusaini N, et al. Acetylation of cytidine in mRNA promotes translation efficiency. *Cell*, 2018, 175(7): 1872-1886
- [115] Arango D, Sturgill D, Yang R, et al. Direct epitranscriptomic regulation of mammalian translation initiation through N4-acetylcytidine. *Mol Cell*, 2022, 82(15): 2797-2814
- [116] Sas-Chen A, Thomas JM, Matzov D, et al. Dynamic RNA acetylation revealed by quantitative cross-evolutionary mapping. *Nature*, 2020, 583(7817): 638-643
- [117] Chen L, Wang WJ, Liu Q, et al. NAT10-mediated N4-acetylcytidine modification is required for meiosis entry and progression in male germ cells. *Nucleic Acids Res*, 2022, 50(19): 10896-10913
- [118] Jiang X, Cheng Y, Zhu Y, et al. Maternal NAT10

- orchestrates oocyte meiotic cell-cycle progression and maturation in mice. *Nat Commun*, 2023, 14(1): 3729
- [119] Martinez NM, Su A, Burns MC, et al. Pseudouridine synthases modify human pre-mRNA co-transcriptionally and affect pre-mRNA processing. *Mol Cell*, 2022, 82(3): 645-659
- [120] Zhang M, Jiang Z, Ma Y, et al. Quantitative profiling of pseudouridylation landscape in the human transcriptome. *Nat Chem Biol*, 2023, 19(10): 1185-1195
- [121] Mangum JE, Hardee JP, Fix DK, et al. Pseudouridine synthase 1 deficient mice, a model for mitochondrial myopathy with sideroblastic anemia, exhibit muscle morphology and physiology alterations. *Sci Rep*, 2016, 6(1): 26202
- [122] Dai Q, Zhang LS, Sun HL, et al. Quantitative sequencing using BID-seq uncovers abundant pseudouridines in mammalian mRNA at base resolution. *Nat Biotechnol*, 2023, 41(3): 344-354
- [123] Lin TY, Smigiel R, Kuzniewska B, et al. Destabilization of mutated human PUS3 protein causes intellectual disability. *Hum Mutat*, 2022, 43(12): 2063-2078
- [124] Shaheen R, Tasak M, Maddirevula S, et al. PUS7 mutations impair pseudouridylation in humans and cause intellectual disability and microcephaly. *Hum Genet*, 2019, 138(3): 231-239
- [125] Ge J, Rudnick DA, He J, et al. Dyskerin ablation in mouse liver inhibits rRNA processing and cell division. *Mol Cell Biol*, 2010, 30(2): 413-422
- [126] Antonicka H, Choquet K, Lin Z, et al. A pseudouridine synthase module is essential for mitochondrial protein synthesis and cell viability. *EMBO Rep*, 2017, 18(1): 28-38
- [127] Wang Y, Li Y, Toth JI, et al. N6-methyladenosine modification destabilizes developmental regulators in embryonic stem cells. *Nat Cell Biol*, 2014, 16(2): 191-198
- [128] 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(12): 885-887
- [129] Zheng G, Dahl JA, Niu Y, et al. ALKBH5 is a mammalian RNA demethylase that impacts RNA metabolism and mouse fertility. *Mol Cell*, 2013, 49(1): 18-29
- [130] Aik WS, Scotti JS, Choi H, et al. Structure of human RNA N6-methyladenine demethylase ALKBH5 provides insights into its mechanisms of nucleic acid recognition and demethylation. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42(7): 4741-4754
- [131] Hussain S, Tuorto F, Menon S, et al. The mouse cytosine-5 RNA methyltransferase NSun2 is a component of the chromatoid body and required for testis differentiation. *Mol Cell Biol*, 2013, 33(8): 1561-1570
- [132] Georgeson J, Schwartz S. No evidence for ac4C within human mRNA upon data reassessment. *Mol Cell*, 2024, 84(8): 1601-1610
- [133] Wu Y, Xu X, Qi M, et al. N6-methyladenosine regulates maternal RNA maintenance in oocytes and timely RNA decay during mouse maternal-to-zygotic transition. *Nat Cell Biol*, 2022, 24(6): 917-927
- [134] Yao H, Gao CC, Zhang D, et al. scm6A-seq reveals single-cell landscapes of the dynamic m6A during oocyte maturation and early embryonic development. *Nat Commun*, 2023, 14(1): 315
- [135] Mu H, Zhang T, Yang Y, et al. METTL3-mediated mRNA N6-methyladenosine is required for oocyte and follicle development in mice. *Cell Death Dis*, 2021, 12(11): 989
- [136] Geula S, Moshitch-Moshkovitz S, Dominissini D, et al. m⁶A mRNA methylation facilitates resolution of naïve pluripotency toward differentiation. *Science*, 2015, 347(6225): 1002-1006
- [137] Liu J, Huang T, Chen W, et al. Developmental mRNA m5C landscape and regulatory innovations of massive m5C modification of maternal mRNAs in animals. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 2484
- [138] Du K, Zhang Z, Zeng Z, et al. Distinct roles of Fto and Mettl3 in controlling development of the cerebral cortex through transcriptional and translational regulations. *Cell Death Dis*, 2021, 12(7): 700
- [139] Xin Y, He Q, Liang H, et al. m6A epitranscriptomic modification regulates neural progenitor-to-glial cell transition in the retina. *eLife*, 2022, 11: e79994
- [140] Li M, Zhao X, Wang W, et al. Ythdf2-mediated m6A mRNA clearance modulates neural development in mice. *Genome Biol*, 2018, 19(1): 69
- [141] Niu F, Han P, Zhang J, et al. The m6A reader YTHDF2 is a negative regulator for dendrite development and maintenance of retinal ganglion cells. *eLife*, 2022, 11: e75827
- [142] Blaze J, Navickas A, Phillips HL, et al. Neuronal Nsun2 deficiency produces tRNA epitranscriptomic alterations and proteomic shifts impacting synaptic signaling and behavior. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 4913
- [143] Yuan Z, Chen P, Zhang T, et al. Agenesis and hypomyelination of corpus callosum in mice lacking Nsun5, an RNA methyltransferase. *Cells*, 2019, 8(6): 552
- [144] Chen P, Zhang T, Yuan Z, et al. Expression of the RNA methyltransferase Nsun5 is essential for developing cerebral cortex. *Mol Brain*, 2019, 12(1): 74
- [145] Zhang T, Chen P, Li W, et al. Cognitive deficits in mice

- lacking Nsun5, a cytosine-5 RNA methyltransferase, with impairment of oligodendrocyte precursor cells. *Glia*, 2019, 67(4): 688-702
- [146] Gao S, Sun H, Chen K, et al. Depletion of m⁶A reader protein YTHDC1 induces dilated cardiomyopathy by abnormal splicing of Titin. *J Cell Mol Medi*, 2021, 25 (23): 10879-10891
- [147] Yu S, Sun ZY, Ju T, et al. The m7G methyltransferase mettl1 drives cardiac hypertrophy by regulating SRSF9-mediated splicing of NFATc4. *Adv Sci*, 2024, 29 (2308769): 2308769
- [148] Hong X, Isern J, Campanario S, et al. Mitochondrial dynamics maintain muscle stem cell regenerative competence throughout adult life by regulating metabolism and mitophagy. *Cell Stem Cell*, 2022, 29(9): 1298-1314
- [149] Stanley TL, Leong A, Pober BR. Growth, body composition, and endocrine issues in Williams syndrome. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obesity*, 2021, 28 (1): 64-74
- [150] Fan Y, Hanai J, Le PT, et al. Parathyroid hormone directs bone marrow mesenchymal cell fate. *Cell Metab*, 2017, 25(3): 661-672
- [151] Huang S, Wylder AC, Pan T. Simultaneous nanopore profiling of mRNA m6A and pseudouridine reveals translation coordination. *Nat Biotechnol*, 2024, 6: 10
- [152] Wu Y, Shao W, Yan M, et al. Transfer learning enables identification of multiple types of RNA modifications using nanopore direct RNA sequencing. *Nat Commun*, 2024, 15(1): 4049
- [153] Acera Mateos P, J Sethi A, Ravindran A, et al. Prediction of m6A and m5C at single-molecule resolution reveals a transcriptome-wide co-occurrence of RNA modifications. *Nat Commun*, 2024, 15(1): 3899