

DOI: 10.13376/j.cblls/2016069

文章编号: 1004-0374(2016)05-0531-08



屈良鹄, 博士, 国家杰出青年基金获得者, 现任教育部“长江学者奖励计划”特聘教授, 中山大学“有害生物控制与资源利用国家重点实验室”主任、中国生化与分子生物学学会 RNA 专业委员会主任。主要从事 RNA 信息学、RNA 生物学及非编码基因资源与技术等方面研究。先后主持国家自然科学基金重点项目、国家科技部“973”重要科学前沿项目以及中美和中法等国际合作等项目, 在国际重要杂志上发表论文 160 余篇, 获得国家自然科学奖二等奖 1 项。

mRNA 修饰研究概况及展望

孙文举, 周克任, 杨建华, 周 惠, 屈良鹄*

(中山大学有害生物控制与资源利用国家重点实验室, 广州 510275)

摘 要: 信使 RNA 的核苷酸修饰主要包括 2'-O-甲基化、假尿嘧啶化、m6A、m5C、m7G、m1A、5hmC 等。已有的研究表明, 这些修饰在 mRNA 稳定性、加工、遗传信息传递以及细胞的应激反应中起到重要作用。由于技术的限制, 过去我们对于 mRNA 修饰知之甚少。近年来, 一系列新技术的产生为全面地考察 mRNA 核苷酸修饰状况, 深入地研究它们的生物学功能提供了极大的便利, 并且取得了一些重要的进展。就此方面的研究概况作简要概述。

关键词: 信使 RNA; 核苷酸修饰; 假尿嘧啶化; m6A; m1A; m5C; 表观转录组学

中图分类号: Q524; Q527 **文献标志码:** A

Research progress and prospects of mRNA modification

SUN Wen-Ju, ZHOU Ke-Ren, YANG Jian-Hua, ZHOU Hui, QU Liang-Hu*

(State Key Laboratory of Biocontrol, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: Nucleotide modifications of messenger RNA include 2'-O-methylation, pseudouridylation, m6A, m5C, m7G, m1A, 5hmC, etc. Previous studies have shown that these modifications play an important role in mRNA stability, processing, transmission of genetic information and cellular stress response. As a result of the limitation of technology, we know very little for mRNA modification in the past. Recently, a series of new technology provide great convenience for comprehensive inspection and further biological function research of mRNA nucleotide modification and have already made some important progress. This review introduced the research progress and prospects of mRNA modification.

Key words: mRNA; nucleotide modifications; pseudouridylation; m6A; m1A; m5C; epitranscriptome

信使 RNA (mRNA) 是联系 DNA 与蛋白质的核心分子, 其参与的遗传信息传递过程是生命的核心

进程。虽然 mRNA 的修饰在 20 世纪 70 年代就已经被发现, 但是由于 mRNA 本身的特性和技术的

收稿日期: 2016-03-06

基金项目: 国家自然科学基金项目(31471223), 广州市科技计划项目(201504010022)

*通信作者: E-mail: lssqlh@mail.sysu.edu.cn

限制,使得 mRNA 的修饰研究进展较为缓慢。随着 m6A-seq、MeRIP、miCLIP、m¹A-seq、m¹A-ID-seq、Aza-IP、hMeRIP-seq、 ψ -seq、CeU-seq 和 RiboMeth-seq 等一系列技术的产生,转录组范围内 mRNA 分子的 m6A、m1A、m5C、5hmC、假尿嘧啶修饰和 2'-O-甲基化等修饰位点信息被揭示。近两年来,mRNA 修饰研究出现了井喷式的发展,本文就 mRNA 修饰研究进展作一简要论述。

1 mRNA 修饰的发现、种类、数量及分布

目前在真核生物 mRNA 上发现的修饰总共有 16 种,其中有 13 种修饰已被 RNAMDB^[1] 收录,而 mRNA 上的假尿嘧啶化修饰(ψ)、5-羟甲基胞嘧啶(5hmC)和 N1-甲基腺嘌呤(m1A)这 3 种修饰则是最近才被报道。这些修饰可以分为甲基化、假尿嘧啶化和次黄嘌呤三类,其中甲基化又可分为核糖甲基化、碱基甲基化和混合型甲基化三类。其中 m6A、m5C、Nm、 ψ 和 m6Am 在 5'-UTR、CDS、内含子和 3'-UTR 区都有分布,m1A 主要分布在起始密码子附近,5hmC 主要分布在编码序列,而 m7G、m2,7G、m2,2,7G 和 Nm 等修饰主要分布在 5' 帽子区域^[2](图 1)。

20 世纪 70 年代,Wei 等^[4-5]就已经在 HeLa 细胞的 mRNA 上发现 m6A、m7G、Nm 和 m6Am 等修饰核苷酸,并基本确定了这些修饰在 mRNA 分子内的大致分布。他们发现 m7G 修饰主要分布在 5' 末端,可以通过高碘酸盐氧化和 β 消除方式移除该修饰。他们提出 mRNA 5' 末端帽子的组成可能是 m7G5'ppp5'Nm- 或 m7G5'ppp5'NmNm- 两种形式。

2012 年,Dominianni 等^[6]借助其实验室开发的 m6A-seq 技术分别在人和鼠的转录组水平揭示了 m6A 修饰的分布,他们发现在人的 mRNA 上有超过 12 000 个 m6A 修饰位点。m6A 修饰位点主要分布在终止密码子附近和长外显子内,并且修饰位点的分布在人和鼠之间高度保守。随后,Meyer 等^[7]通过 MeRIP-seq 技术发现在 7 676 个哺乳类基因的 mRNA 上存在 m6A 修饰,这些修饰位点主要富集在终止密码子附近和 3'-UTR 区域。2012 年,Bodi 等^[8]发现,在拟南芥中 m6A 修饰主要分布在 3' 端 poly(A) 尾上游 100~150 nt 范围内。2014 年,Li 等^[9]在水稻愈伤组织和叶子分别发现了 8 138 和 14 253 个基因的 mRNA 含有 m6A 修饰,并且这些 m6A 修饰倾向于分布在翻译的起始位点和终止位点附近。

2014 年,有三篇文献报道了假尿嘧啶修饰在

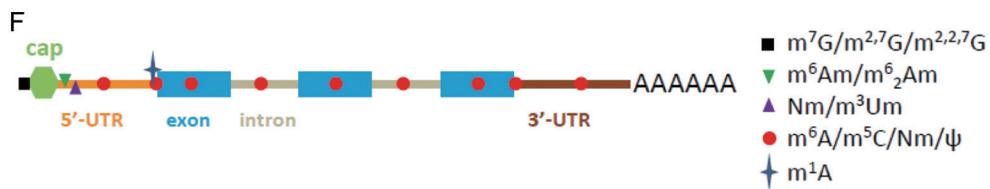
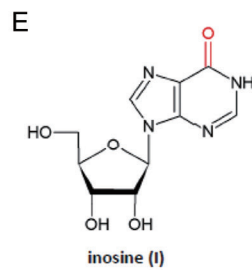
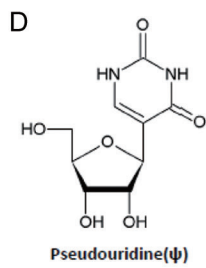
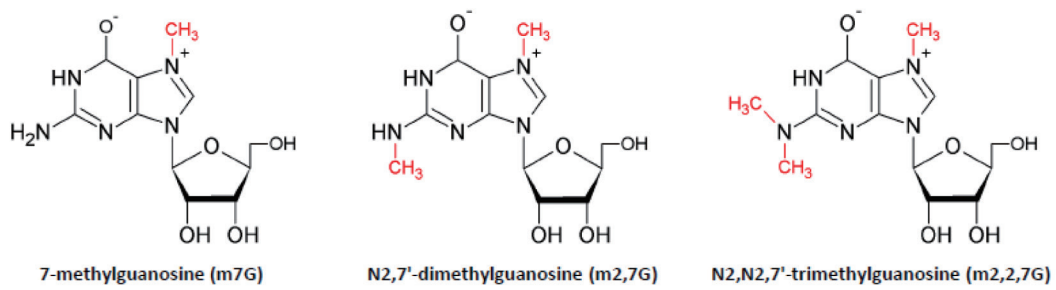
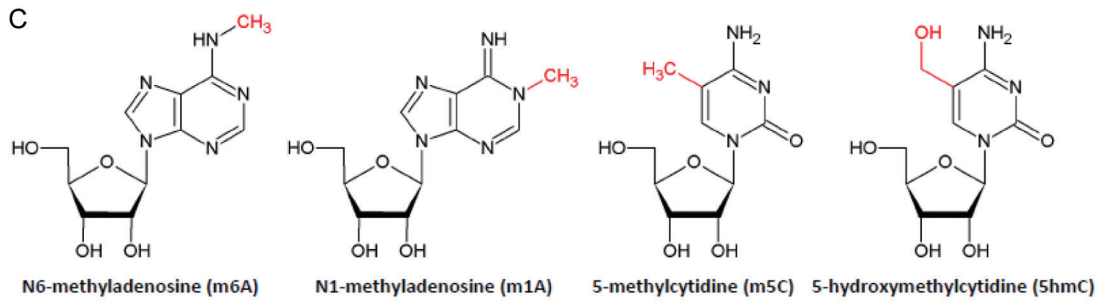
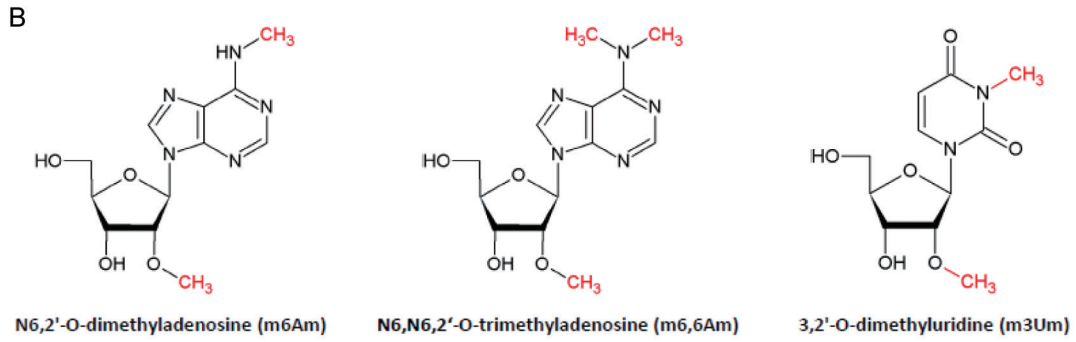
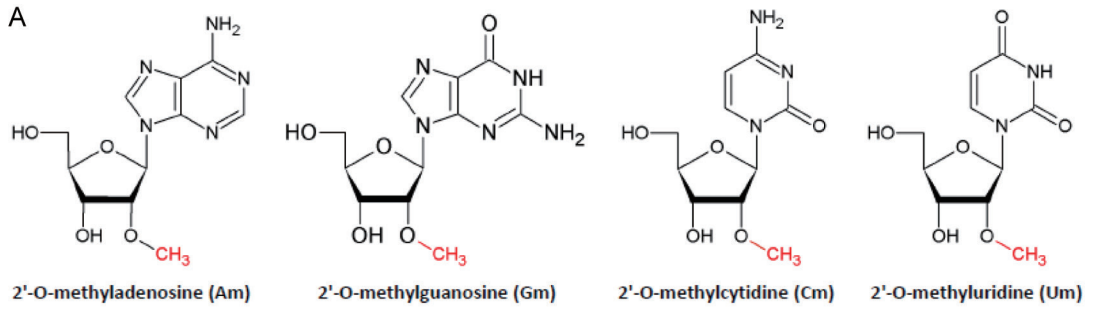
整个转录组范围内的分布,都显示在 mRNA 上存在数百个假尿嘧啶修饰位点。Schwartz 等^[10]用他们开发的 Ψ -seq 技术在人和酵母的 mRNA 上都发现数百个假尿嘧啶修饰位点。Lovejoy 等^[11]用他们开发的 PSI-seq 技术在酵母 mRNA 上发现了几十个假尿嘧啶修饰位点。Carlile 等^[12]用他们开发的 Pseudo-seq 技术也在人和酵母的 mRNA 上发现数百个假尿嘧啶修饰位点。2015 年,Li 等^[13]使用 CeU-Seq 技术从人的 1 929 条转录本上鉴定了 2 084 个假尿嘧啶修饰位点,一些特定 mRNA 上的修饰可由特定的应激刺激引入;此外,他们在小鼠的脑和肝脏中发现了保守的并且组织特异的假尿嘧啶化修饰。

近几年在 mRNA 和其他 ncRNA 上发现上万个 m5C 修饰位点,暗示这种修饰可能在转录后水平调节 RNA 的功能。2012 年,Squires 等^[14]用重亚硫酸盐处理 RNA 然后通过高通量方法,揭示了 m5C 修饰在转录组水平的位点分布,他们在 mRNA 和其他 ncRNA (指 tRNA 以外的)发现了 10 275 个 m5C 修饰位点,暗示这种修饰可能在转录后水平调节 RNA 的功能。2013 年,Edelheit 等^[15]用同样的方法,揭示了 m5C 修饰在多个物种分类单元(包括革兰氏阳性菌 *B. subtilis*、革兰氏阴性菌 *E. coli*、古细菌 *S. solfataricus* 以及真核生物 *S. cerevisiae*)的转录组水平的位点分布,他们发现在这些物种中的 RNA 上都有 m5C 修饰,并且这一修饰位点的分布并不随机。他们首次证明在古细菌 (*S. solfataricus*) 的 mRNA 上有 m5C 修饰,并且修饰位点的 motif 为 AUCGANGU。

最近,Delatte 等^[16]使用 hMeRIP-seq 技术在果蝇的 mRNA 上发现了 5-羟甲基胞嘧啶(5hmC),该修饰主要分布在编码序列上,含有 5hmC 修饰的 mRNA 主要富集在果蝇的脑组织。何川团队和 Yi 团队分别采用 m¹A-seq 和 m¹A-ID-seq 在人、鼠、酵母的 mRNA 上发现 m1A 修饰,该修饰主要富集在起始密码子附近和 5'-UTR 的 GC-rich 区域,这种修饰相对比较保守,但也有一部分是可以随不同的外部刺激而动态调节^[17-18]。

2 mRNA 修饰的形成机制

帽子结构是真核生物成熟 mRNA 5' 端的一个特殊结构,根据甲基化程度的不同可分为 CAP 0 型(m7GpppN)、CAP I 型(m7GpppNm)和 CAP II 型(m7GpppNmNm)三种类型。5' 帽子的加工过程是



A: 2'-O-核糖甲基化修饰; B: 混合型甲基化修饰; C: 碱基甲基化修饰; D: 假尿嘧啶; E: 次黄嘌呤; F: mRNA上各种修饰的分布(图中分子的结构式来自Modomics数据库^[3])

图1 mRNA修饰核苷酸分类和分布

由特定的酶催化完成。首先是RNA磷酸酶切掉mRNA 5'末端最后一个磷酸基团,然后在鸟苷酰转移酶的作用下将GTP以5'-5'三磷酸键的形式链接到mRNA 5'末端,随后鸟嘌呤-N7-甲基转移酶将S-腺苷甲硫氨酸上的甲基转给鸟嘌呤的N7位,完成m7G修饰,相邻核苷酸上的2'-O-核糖甲基化修饰则是由特定的甲基转移酶催化^[19]。

Schwartz等^[10]发现在酵母中缺少假尿苷合酶(Pus), mRNA上的假尿嘧啶化修饰水平降低,说明mRNA上的假尿嘧啶化修饰需要Pus的参与。Lovejoy等^[11]发现RPL11a mRNA的假尿嘧啶化修饰需要假尿苷合酶Pus1的催化,而TEF1 mRNA和KAR2 mRNA上的假尿嘧啶化修饰则分别需要Pus4和Pus6的催化。Li等^[13]发现,人mRNA上有77个假尿嘧啶化修饰位点由Pus1催化,214个位点由TRUB1催化,125个位点由Pus7催化修饰。已有的研究表明,不同的mRNA上的假尿嘧啶化修饰是由不同的假尿苷合酶催化修饰。

Sibbritt等^[20]发现甲基转移酶METTL3与mRNA上的m6A修饰形成有关,而脱甲基酶FTO则与m6A的“擦除”有关;此外,他们还发现,甲基转移酶NSUN2和TRDMT1与mRNA上的m5C修饰的形成有关。Liu等^[21]发现,哺乳类mRNA上的m6A修饰是由METTL3-METTL14复合物催化修饰的,而WTAP可以影响该复合体的形成,从而影响m6A修饰。目前已经研究确认的m6A修饰酶主要有Mettl3、Mettl14和WTAP酶,m6A的去除酶主要有FTO和ALKBH5,而细胞内对这一修饰的解读主要依赖于YTHDF1/2/3蛋白^[22-26]。

2016年,Delatte等^[16]报道,果蝇mRNA上的5-羟甲基胞嘧啶(5hmC)修饰需要dTet(果蝇甲基加氧酶)的参与,该酶催化5mC到5hmC的转变,并且该酶也可以作用于DNA上的5mC。这是目前报道的第一个由同一个酶分别作用于RNA和DNA的修饰现象,考虑到这两种物质在细胞内的分布,细胞内核酸修饰机制的复杂程度可见一斑。有些修饰是经过多个修饰酶分多步催化,并且参与各步修饰的酶有特定的时空分布特征,其中参与有些催化步骤的酶在DNA和RNA之间是共享的。

mRNA上发现的m1A修饰尚不清楚其生成机

制,研究人员考虑到已知真核生物tRNA和rRNA上的m1A修饰是由SAM-依赖的甲基转移酶催化的,进而猜测mRNA上的m1A修饰应该也是由这类酶或是其同源物催化。此外,他们还发现ALKBH3可以擦除mRNA上的m1A修饰^[17-18]。ALKBH3属于AlkB家族成员,该家族是一类DNA/RNA脱甲基酶,其中的ALKBH5就是一种m6A修饰擦除蛋白。

mRNA上绝大多数修饰的形成机制还不清楚。如上所述,之前的报道只是提到特定的修饰需要特定的酶参与,但这并不排除有guide RNA指导酶催化修饰的可能。

2010年,Ge等^[27]的实验表明,爪蟾卵母细胞在特定的条件下,人为引入的box C/D RNA可以指导甲基转移酶对pre-mRNA的特定位置进行2'-O-甲基化修饰。2015年,Chen等^[28]发现microRNA可以通过序列互补配对机制调节mRNA相应区域m6A修饰的产生及其丰度。在人类HeLa细胞中,过表达miR-423-3p和miR-1226-3p可以提高m6A丰度,敲低这两个microRNA可以降低m6A丰度。突变实验显示,microRNA可以给mRNA上引入新的m6A修饰。随后他们又证明,microRNA是通过影响METTL3(参与m6A形成的甲基转移酶)与mRNA的结合来调控m6A修饰,过表达miR-423-3p和miR-1226-3p可以显著提高与mRNA结合的METTL3数量,反之则降低。这是否意味着microRNA可以作为guide RNA指导对应的甲基转移酶对mRNA进行m6A修饰还有待讨论。

3 mRNA修饰的生物学功能

3.1 5'帽子功能

一般认为5'帽子可以促使mRNA和核糖体的结合,m7Gppp结构能有效地封闭RNA 5'末端,以保护mRNA免受5'核酸外切酶的降解,增强mRNA的稳定性。此外,5'帽子还参加mRNA前体的剪接^[29],参与mRNA 3'末端多聚腺苷酸化^[30],mRNA从核中到细胞质中的运输也需要5'帽子的参与^[31]。

1975年,Both等^[32]发现病毒的mRNA在翻译起始阶段需要5'末端甲基化修饰的参与。同年,

Muthukrishnan 等^[33]发现真核生物 mRNA 5' 末端的 m⁷G 修饰可以促进蛋白质合成, 通过 β -消除的方法移除 m⁷G 修饰 mRNA 就不能翻译。随后, 他们还发现 5' 帽子中的 2'-O-甲基化修饰也可以促进 mRNA 和核糖体的结合^[34]。1976 年, Filipowicz 等^[35]发现, 帽子结合蛋白 (cap binding protein, CBP) 可以识别 mRNA 5' 末端 m⁷GpppN 并与其结合, 促进 mRNA 和核糖体的结合, 从而影响蛋白质合成起始。Sonenberg 等^[36]在其综述中讨论了 5' 帽子结合蛋白 eIF4E 对细胞生长的调节作用。1998 年, Wei 等^[37]发现 CBP 可以与 ploy(A) 结合蛋白 (PABP) 相互作用, 拉近了 5' 帽子与 ploy(A) 尾的距离, 形成的环状结构可以加强帽结构与 CBP 的亲合力, 加快核糖体的循环, 从而提高翻译效率。(图 2A)

2010 年, Daffis 等^[38]发现病毒 RNA 5' 帽子的 2'-O-甲基化修饰可以使其逃脱宿主的抗病毒应答, 细胞质 RNA 5' 帽子的 2'-O-甲基化修饰可能是宿主区分自身 RNA 和外来 RNA 的一个重要标识。哺乳动物细胞对 5' 帽子没有 2'-O-甲基化修饰的病毒具有天然的免疫, 因为 IFIT1 可以与这类病毒 mRNA 结合, 使其不能被翻译^[39](图 2B)。

3.2 假尿嘧啶修饰功能

已有的研究表明, mRNA 的假尿嘧啶化修饰主要有三个功能: 改变密码子、增强转录本稳定性和应激反应应答。

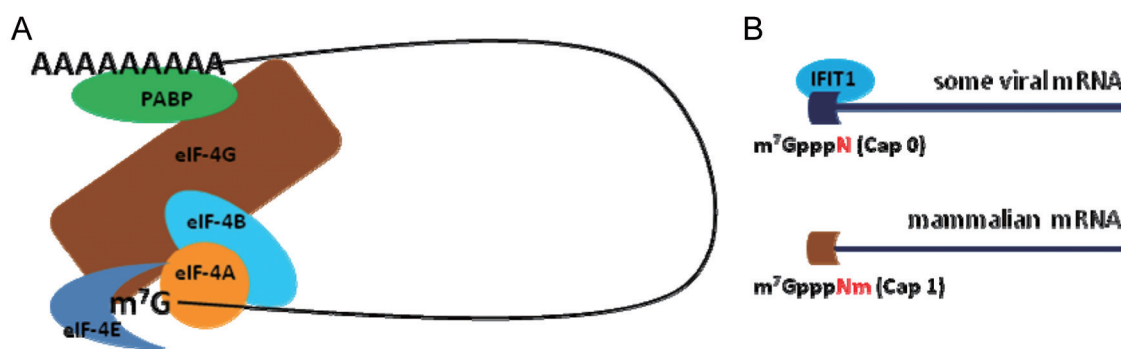
2011 年, Karijolic 等^[40]研究表明, mRNA 上的假尿嘧啶化修饰可以改变密码子。在酵母中将无意密码子中的尿嘧啶 (U) 替换为假尿嘧啶 (Ψ), 这些密码子就能编码氨基酸, 如 Ψ AA 可以编码丝氨酸; Ψ AG 可以编码苏氨酸; Ψ GA 既可以编码酪氨酸,

也可以编码苯丙氨酸。2014 年, Schwartz 等^[10]发现, 酵母发生热休克时, 会由 Pus7p 额外引入超过 200 个假尿嘧啶修饰位点, 如果敲除 PUS7 基因, 则那些含有新引入修饰的 mRNA 会减少, 这暗示着假尿嘧啶修饰可能会增强转录本稳定性。Carlile 等^[12]发现, mRNA 上的大多数假尿嘧啶修饰与细胞对环境信号的应答有关, 如酵母的营养不足和人细胞的血清饥饿。2015 年, Li 等^[13]报道人细胞在热刺激或是使用 H₂O₂ 处理的条件下, mRNA 上的假尿嘧啶化修饰会增加, 而在饥饿刺激下则会减少。

3.3 m⁶A 修饰功能

已有的研究表明, m⁶A 修饰和 mRNA 的稳定性、剪接加工、翻译以及 microRNA 的加工有关。此外, m⁶A 还和干细胞命运、生物节律相关。

Dominissini 等^[6]发现, 沉默 m⁶A 甲基转移酶可以显著影响基因表达水平和选择性剪接模式, 从而影响 p53 信号通路和细胞凋亡。Meyer 等^[7]发现, m⁶A 修饰呈现组织特异性调控, 其在脑的发育过程中会显著增加。此外, 他们还发现有 67% 的 3'-UTR 存在 m⁶A 修饰, 而这些 3'-UTR 同时会有至少一个 TargetScan 预测的 microRNA 结合位点, 并且这些 m⁶A 修饰位点大都在 microRNA 结合位点的上游。在脑组织的进一步实验显示, 那些表达量较高的 microRNA 的靶标也会有较高的 m⁶A 修饰水平, 这暗示 microRNA 水平可能调控着其靶标转录本的 m⁶A 水平。Batista 等^[41]的研究表明, m⁶A 可以促使干细胞从自我更新状态转向细胞分化。2015 年, Geula 等^[42]关于 m⁶A 修饰对胚胎干细胞多能性调控作用的研究表明, m⁶A 能够通过影响促多能性基因的 mRNA 水平与稳定性, 对 ESCs 的多能性进行



A: 5'帽子通过CBP与PABP之间的相互作用使mRNA形成环状结构, 是真核生物翻译起始的重要步骤。B: IFIT1可以和5'帽子没有2'-O-甲基化修饰的病毒mRNA结合, 抑制其翻译, 而哺乳动物自身的mRNA 5'帽子有2'-O-甲基化修饰, 所以IFIT1不能与其结合。

图2 5'帽子的功能示意图

调控。研究人员发现,甲基化会缩短 mRNA 的半衰期,减少其丰度。随后,Zhao 和 He^[43]通过点评 m6A 研究的最新进展,探讨了这种修饰的功能和作用机制,认为 m6A 修饰可以决定干细胞命运。Aguilo 等^[44]的研究表明,ZFP217 蛋白通过与 METTL3 蛋白的结合影响 m6A 的生成,增加促多能性基因的 mRNA 水平与稳定性,从而对 ESCs 的多能性进行调控;相反,细胞的发育分化是由于 ZFP217 蛋白的水平降低,释放出的 METTL3 与 METTL14 结合则会使促多能性基因 mRNA 上的 m6A 修饰增多,从而缩短 mRNA 的半衰期,减少其丰度,细胞就向特定的方向分化。Fustin 等^[45-47]发现 m6A 和生物节律相关,他们在许多生物钟相关基因的转录本上发现了 m6A 修饰,通过沉默 Mettl3 抑制这些修饰,就会导致生物钟延长以及 RNA 加工延迟。

m6A 修饰对植物的生长发育至关重要。2008 年,Zhong 等^[48]发现拟南芥缺失 m6A 修饰会引发胚胎致死表型。2012 年,Bodi 等^[8]发现缺少 m6A 修饰的拟南芥中那些与物质运输相关的基因表达被下调,而那些与应激反应相关的基因表达上调。他们还发现 m6A 修饰水平的降低会导致花器官缺陷和顶端优势的削弱。Li 等^[9]发现,在水稻的愈伤组织和叶子中,m6A 与基因表达呈负相关关系,与特定的基因特性呈弱正相关,如外显子长度和数量。此外,m6A 修饰的基因存在组织特异性表达。Luo 等^[49]发现,在拟南芥中 mRNA 上的 m6 修饰是非常保守的,和哺乳动物不同,拟南芥中 m6A 不仅在终止密码附近和 3'-UTR 区有分布,在起始密码附近也有分布。GO 分析显示,m6A 修饰独特的分布模式和植物特有的一些信号通路有关。

此外,Liu 等^[50]发现 m6A 可以作为 RNA 结构开关,动态地改变 mRNA 的二级结构,促进其与 HNRNPC 的结合,从而影响 mRNA 的选择性剪接。也就是说,m6A 可以通过改变 RNA 结构调节其与蛋白质的互作,进而影响 mRNA 的选择性剪接^[51]。Zhao 等^[52]发现 m6A 可以影响 mRNA 的剪接,并提出了 m6A 依赖的外显子剪切模型。Alarcon 等^[53-54]发现 HNRNPA2B1 可以识别并结合 m6A,间接地表明 m6A 和 microRNA 前体的剪接加工有关。Jia 等^[55]发现 FTO 酶可以催化 m6A 去甲基化,而该酶与人类肥胖密切相关,因此,m6A 修饰与人类健康之间可能存在某种联系。Wang 等^[56]发现 m6A 可以通过其结合蛋白 YTHDF1 调节 mRNA 的翻译效率。Zhou 等^[57]和 Meyer 等^[58]的研究发现,

m6A 修饰可以介导不依赖于帽子结构的翻译起始,正常情况下 YTHDF2 蛋白在细胞质、热刺激条件下,该蛋白进入细胞核与 mRNA 5'-UTR 的 m6A 修饰结合,保护该修饰不被 FTO 擦除,细胞质中的 eIF3 可以与 5'-UTR 的 m6A 结合起始翻译,不需要依赖帽子结构。5'-UTR 只要有一个 m6A 修饰就可以介导此类翻译起始,并且 m6A 位点位于 5'-UTR 的 3' 末端(即起始密码子上游附近)时,这种翻译起始的效率最高。

最近在 mRNA 上发现的 5hmC 能促进翻译并且和神经发育相关^[16,59],起始密码子附近的 m1A 修饰可以提高翻译效率,并且和应激反应有关^[17-18]。到目前为止,除了 5' 帽子结构的功能研究的比较清楚之外,mRNA 上的其他修饰的生物学功能研究才开始不久,如假尿嘧啶化修饰和 m6A 修饰的生物学功能就是近几年才取得了一些成果。此外,mRNA 上还有很多修饰的生物学功能尚不清楚,如 m5C、5hmC、m1A 以及帽子结构之外的 2'-O-甲基化修饰。

RNA 修饰的重要生物学功能是毋庸置疑的。仔细比对 DNA 和 RNA 的基本组成成分,不难发现,除了核糖 2'-C 上链接的是 -OH 和 H 这一差别外,二者唯一的差别就在于尿嘧啶碱基环上 5 号碳原子是接的 H 还是甲基,前者是尿嘧啶,后者则是胸腺嘧啶(m5U 就是 T)。从这个意义上讲,DNA 可以看作是被修饰堕化的 RNA,一个化学基团的微小差异,导致的却是二者在结构和功能上的巨大差异,足以见得核酸修饰的重要意义;并且,也就不难理解为什么 5mC 到 5hmC 的转变在 DNA 和 RNA 上是同一种酶催化的,这种情况应该也不是特例,可能还有其他尚未发现的共享的修饰元件。此外,RNA 修饰、DNA 修饰和组蛋白修饰三大修饰体系也可能存在着复杂的协同修饰关系。

4 展望

过去几十年,由于技术的限制使得 mRNA 修饰的研究进展较为缓慢。近几年来出现的新技术手段为研究 mRNA 的修饰提供了很大的便利。虽然 ψ -seq 和 RiboMeth-seq 等技术对假尿嘧啶化修饰和 2'-O-核糖甲基化修饰位点的定位可以达到单核苷酸的精度,但是基于免疫沉淀技术的 MeRIP 和 m6A-seq 手段对 m6A 位点的定位精度还不够高。SCARLET 技术^[60]虽是单核苷酸精度,但是无法高通量,不过 miCLIP^[61]和 PA-m⁶A-seq^[62]技术已经

能做到单核苷酸分辨率。此外, 还有很多 RNA 修饰缺乏相应的技术手段去深入研究。因此, 在技术方面还需要有更多的“NGS+”型(传统检测手段与高通量测序相结合)的高通量技术产生。随着新技术的产生, 不仅可以促进修饰的功能研究, 也有可能像发现 mRNA 假尿嘧啶化修饰那样, 在 mRNA 上发现新的修饰。

以往的研究多集中在修饰的鉴定和修饰位点的确定, 近来一些关于修饰生成机制及其生物学功能研究已经表明, mRNA 上的修饰具有重要的生物学功能, 并且有些修饰高度动态可变。随着表观转录组学的发展和新技术的不断涌现, 将极大地促进 mRNA 转录后修饰形成机制和生物学功能的研究。我们将逐步揭开 mRNA 转录后修饰在复杂的调控网络中的重要作用。不同物种中的 mRNA 转录后修饰研究将揭示这些修饰在进化的过程中是何时产生以及它们是怎样保持和演变的, 这对我们深入理解 mRNA 转录后修饰的重要生物学功能具有重要意义。mRNA 的转录后修饰研究不仅会推动表观转录组学的发展, 同时也将促进个体化医疗和精准医疗的发展。

[参 考 文 献]

- [1] Cantara WA, Crain PF, Rozenski J, et al. The RNA modification database, RNAMDB: 2011 update. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39: D195-201
- [2] Li S, Mason CE. The pivotal regulatory landscape of RNA modifications. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 2014, 15: 127-50
- [3] Machnicka MA, Milanowska K, Osman Oglou O, et al. MODOMICS: a database of RNA modification pathways--2013 update. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41: D262-7
- [4] Wei CM, Gershowitz A, Moss B. Methylated nucleotides block 5' terminus of HeLa cell messenger RNA. *Cell*, 1975, 4: 379-86
- [5] Wei CM, Gershowitz A, Moss B. 5'-Terminal and internal methylated nucleotide sequences in HeLa cell mRNA. *Biochemistry*, 1976, 15: 397-401
- [6] 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: 201-6
- [7] Meyer KD, Saletore Y, Zumbo P, et al. Comprehensive analysis of mRNA methylation reveals enrichment in 3' UTRs and near stop codons. *Cell*, 2012, 149: 1635-46
- [8] Bodi Z, Zhong S, Mehra S, et al. Adenosine methylation in *Arabidopsis* mRNA is associated with the 3' end and reduced levels cause developmental defects. *Front Plant Sci*, 2012, 3: 48
- [9] Li Y, Wang X, Li C, et al. Transcriptome-wide N(6)-methyladenosine profiling of rice callus and leaf reveals the presence of tissue-specific competitors involved in selective mRNA modification. *RNA Biol*, 2014, 11: 1180-8
- [10] Schwartz S, Bernstein DA, Mumbach MR, et al. Transcriptome-wide mapping reveals widespread dynamic-regulated pseudouridylation of ncRNA and mRNA. *Cell*, 2014, 159: 148-62
- [11] Lovejoy AF, Riordan DP, Brown PO. Transcriptome-wide mapping of pseudouridines: pseudouridine synthases modify specific mRNAs in *S. cerevisiae*. *PLoS One*, 2014, 9: e110799
- [12] Carlile TM, Rojas-Duran MF, Zinshteyn B, et al. Pseudouridine profiling reveals regulated mRNA pseudouridylation in yeast and human cells. *Nature*, 2014, 515: 143-6
- [13] Li X, Zhu P, Ma S, et al. Chemical pulldown reveals dynamic pseudouridylation of the mammalian transcriptome. *Nat Chem Biol*, 2015, 11: 592-7
- [14] Squires JE, Patel HR, Nousch M, et al. Widespread occurrence of 5-methylcytosine in human coding and non-coding RNA. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40: 5023-33
- [15] Edelheit S, Schwartz S, Mumbach MR, et al. Transcriptome-wide mapping of 5-methylcytidine RNA modifications in bacteria, archaea, and yeast reveals m5C within archaeal mRNAs. *PLoS Genet*, 2013, 9: e1003602
- [16] Delatte B, Wang F, Ngoc LV, et al. RNA biochemistry. Transcriptome-wide distribution and function of RNA hydroxymethylcytosine. *Science*, 2016, 351: 282-5
- [17] Dominissini D, Nachtergaele S, Moshitch-Moshkovitz S, et al. The dynamic N(1)-methyladenosine methylome in eukaryotic messenger RNA. *Nature*, 2016, 530: 441-6
- [18] Li X, Xiong X, Wang K, et al. Transcriptome-wide mapping reveals reversible and dynamic N-methyladenosine methylome. *Nat Chem Biol*, 2016, doi: 10.1038/nchembio.2040.
- [19] Shatkin AJ. Capping of eucaryotic mRNAs. *Cell*, 1976, 9: 645-53
- [20] Sibbritt T, Patel HR, Preiss T. Mapping and significance of the mRNA methylome. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 2013, 4: 397-422
- [21] Liu J, Yue Y, Han D, et al. A METTL3-METTL14 complex mediates mammalian nuclear RNA N6-adenosine methylation. *Nat Chem Biol*, 2014, 10: 93-5
- [22] Niu Y, Zhao X, Wu YS, et al. N6-methyl-adenosine (m6A) in RNA: an old modification with a novel epigenetic function. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 2013, 11: 8-17
- [23] 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: 18-29
- [24] Wang X, Lu Z, Gomez A, et al. N6-methyladenosine-dependent regulation of messenger RNA stability. *Nature*, 2014, 505: 117-20
- [25] Baumann K. RNA: the (methylation) reader. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15: 2
- [26] Ping XL, Sun BF, Wang L, et al. Mammalian WTAP is a regulatory subunit of the RNA N6-methyladenosine methyltransferase. *Cell Res*, 2014, 24: 177-89
- [27] Ge J, Liu H, Yu YT. Regulation of pre-mRNA splicing in

- Xenopus* oocytes by targeted 2'-O-methylation. RNA, 2010, 16: 1078-85
- [28] Chen T, Hao YJ, Zhang Y, et al. m(6)A RNA methylation is regulated by microRNAs and promotes reprogramming to pluripotency. Cell Stem Cell, 2015, 16: 289-301
- [29] Izaurralde E, Lewis J, McGuigan C, et al. A nuclear cap binding protein complex involved in pre-mRNA splicing. Cell, 1994, 78: 657-68
- [30] Cooke C, Alwine JC. The cap and the 3' splice site similarly affect polyadenylation efficiency. Mol Cell Biol, 1996, 16: 2579-84
- [31] Izaurralde E, Lewis J, Gamberi C, et al. A cap-binding protein complex mediating U snRNA export. Nature, 1995, 376: 709-12
- [32] Both GW, Banerjee AK, Shatkin AJ. Methylation-dependent translation of viral messenger RNAs *in vitro*. Proc Natl Acad Sci USA, 1975, 72: 1189-93
- [33] Muthukrishnan S, Both GW, Furuichi Y, et al. 5'-Terminal 7-methylguanosine in eukaryotic mRNA is required for translation. Nature, 1975, 255: 33-7
- [34] Muthukrishnan S, Morgan M, Banerjee AK, et al. Influence of 5'-terminal m7G and 2'-O-methylated residues on messenger ribonucleic acid binding to ribosomes. Biochemistry, 1976, 15: 5761-68
- [35] Filipowicz W, Furuichi Y, Sierra JM, et al. A protein binding the methylated 5'-terminal sequence, m7GpppN, of eukaryotic messenger RNA. Proc Natl Acad Sci USA, 1976, 73: 1559-63
- [36] Sonenberg N, Gingras AC. The mRNA 5' cap-binding protein eIF4E and control of cell growth. Curr Opin Cell Biol, 1998, 10: 268-75
- [37] Wei CC, Balasta ML, Ren J, et al. Wheat germ poly(A) binding protein enhances the binding affinity of eukaryotic initiation factor 4F and (iso)4F for cap analogues. Biochemistry, 1998, 37: 1910-6
- [38] Daffis S, Szretter KJ, Schriewer J, et al. 2'-O methylation of the viral mRNA cap evades host restriction by IFIT family members. Nature, 2010, 468: 452-6
- [39] Hyde JL, Diamond MS. Innate immune restriction and antagonism of viral RNA lacking 2-O methylation. Virology, 2015, 479-480: 66-74
- [40] Karijolich J, Yu YT. Converting nonsense codons into sense codons by targeted pseudouridylation. Nature, 2011, 474: 395-98
- [41] Batista PJ, Molinie B, Wang J, et al. m(6)A RNA modification controls cell fate transition in mammalian embryonic stem cells. Cell Stem Cell, 2014, 15: 707-19
- [42] Geula S, Moshitch-Moshkovitz S, Dominissini D, et al. Stem cells. m6A mRNA methylation facilitates resolution of naive pluripotency toward differentiation. Science, 2015, 347: 1002-6
- [43] Zhao BS, He C. Fate by RNA methylation: m6A steers stem cell pluripotency. Genome Biol, 2015, 16: 43
- [44] Aguilo F, Zhang F, Sancho A, et al. Coordination of m(6)A mRNA methylation and gene transcription by ZFP217 regulates pluripotency and reprogramming. Cell Stem Cell, 2015, 17: 689-704
- [45] Fustin JM, Doi M, Yamaguchi Y, et al. RNA-methylation-dependent RNA processing controls the speed of the circadian clock. Cell, 2013, 155: 793-806
- [46] Hastings MH. m(6)A mRNA methylation: a new circadian pacesetter. Cell, 2013, 155: 740-1
- [47] Lokody I. Gene regulation: RNA methylation regulates the circadian clock. Nat Rev Genet, 2014, 15: 3
- [48] Zhong S, Li H, Bodi Z, et al. MTA is an *Arabidopsis* messenger RNA adenosine methylase and interacts with a homolog of a sex-specific splicing factor. Plant Cell, 2008, 20: 1278-88
- [49] Luo GZ, MacQueen A, Zheng G, et al. Unique features of the m6A methylome in *Arabidopsis thaliana*. Nat Commun, 2014, 5: 5630
- [50] Liu N, Dai Q, Zheng G, et al. N(6)-methyladenosine-dependent RNA structural switches regulate RNA-protein interactions. Nature, 2015, 518: 560-4
- [51] Theler D, Allain FH. Molecular biology: RNA modification does a regulatory two-step. Nature, 2015, 518: 492-3
- [52] Zhao X, Yang Y, Sun BF, et al. FTO-dependent demethylation of N6-methyladenosine regulates mRNA splicing and is required for adipogenesis. Cell Res, 2014, 24: 1403-19
- [53] Alarcon CR, Goodarzi H, Lee H, et al. HNRNPA2B1 is a mediator of m(6)A-dependent nuclear RNA processing events. Cell, 2015, 162: 1299-308
- [54] Alarcon CR, Lee H, Goodarzi H, et al. N6-methyladenosine marks primary microRNAs for processing. Nature, 2015, 519: 482-5
- [55] 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: 885-7
- [56] Wang X, Zhao BS, Roundtree IA, et al. N(6)-methyladenosine modulates messenger RNA translation efficiency. Cell, 2015, 161: 1388-99
- [57] Zhou J, Wan J, Gao X, et al. Dynamic m(6)A mRNA methylation directs translational control of heat shock response. Nature, 2015, 526: 591-4
- [58] Meyer KD, Patil DP, Zhou J, et al. 5' UTR m(6)A promotes cap-independent translation. Cell, 2015, 163: 999-1010
- [59] Miura G. RNA modification: translating for growth. Nat Chem Biol, 2016, 12: 125
- [60] Liu N, Parisien M, Dai Q, et al. Probing N6-methyladenosine RNA modification status at single nucleotide resolution in mRNA and long noncoding RNA. RNA, 2013, 19: 1848-56
- [61] Linder B, Grozhik AV, Olarerin-George AO, et al. Single-nucleotide-resolution mapping of m6A and m6Am throughout the transcriptome. Nat Methods, 2015, 12: 767-72
- [62] Chen K, Lu Z, Wang X, et al. High-resolution N(6)-methyladenosine (m(6)A) map using photo-crosslinking-assisted m(6)A sequencing. Angewandte Chemie, 2015, 54: 1587-90