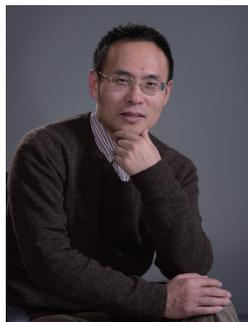


DOI: 10.13376/j.cblls/2016070

文章编号: 1004-0374(2015)05-0539-12



杨运桂, 博士, 中科院特聘研究员, 中科院北京基因组研究所“百人计划”研究员, 博士生导师。杨运桂实验室研发 RNA 化学修饰高通量测序和分析技术, 系统研究 RNA 甲基化及其修饰酶, 阐明其功能及与人类疾病关联的调控机制; 发现 RNA m<sup>6</sup>A 甲基修饰酶及其调控基因剪接的机制, 和同行一起拓展了 RNA 甲基化表观转录组学研究领域的新方向。已在 *Cell*、*Cell Stem Cell*、*Mol Cell* 等期刊发表论文 50 余篇。

## 动态RNA甲基化修饰及其调控机制研究进展

孙慧颖<sup>1,2#</sup>, 郝亚娟<sup>1,2#</sup>, 平晓丽<sup>1,2</sup>, 黄春敏<sup>1</sup>, 杨莹<sup>1</sup>, 孙宝发<sup>1</sup>, 杨运桂<sup>1\*</sup>

(1 中国科学院北京基因组研究所, 遗传与发育协同创新中心, 中国科学院精准基因组医学重点实验室, 北京100101; 2 中国科学院大学, 北京100049)

**摘要:** RNA 可以被 100 余种化学修饰所修饰。这些化学修饰以甲基化为主, 广泛分布于各种类型的 RNA 中, 如 rRNA、tRNA、snRNA、snoRNA 和 mRNA 等, 其中针对 mRNA 内部修饰丰度最高的 6- 甲基腺嘌呤 (m<sup>6</sup>A) 的研究最为深入。m<sup>6</sup>A 修饰酶 (甲基转移酶 METTL3/METTL14/WTAP 和去甲基化酶 ALKBH5 与 FTO) 和结合蛋白 YTHDF2、YTHDF1 与 YTHDC1 的发现, 证明了 RNA 甲基化修饰同 DNA 甲基化修饰一样是动态可逆的, 从而将 RNA 甲基化修饰由微调机制提升到表观转录组新层次。而候选 m<sup>5</sup>C 修饰甲基转移酶 NSUN 家族蛋白和去甲基化酶 TET 蛋白的初步鉴定, 丰富了 RNA 甲基化修饰表观转录组研究内涵。RNA 甲基化介导的表观转录组学调控和作用已成为 RNA 生物学新研究领域。现重点回顾和展望 RNA 的 m<sup>6</sup>A 和 m<sup>5</sup>C 甲基化修饰特征及其潜在生物学功能。

**关键词:** 6- 甲基腺嘌呤 (m<sup>6</sup>A); 5- 甲基胞嘧啶 (m<sup>5</sup>C); mRNA; 非编码 RNA; 甲基转移酶; 去甲基化酶; 甲基化结合蛋白

中图分类号: Q523; Q752 文献标志码: A

## Dynamics and biological significance of RNA methylations

SUN Hui-Ying<sup>1,2#</sup>, HAO Ya-Juan<sup>1,2#</sup>, PING Xiao-Li<sup>1,2</sup>, HUANG Chun-Min<sup>1</sup>,  
YANG Ying<sup>1</sup>, SUN Bao-Fa<sup>1</sup>, YANG Yun-Gui<sup>1\*</sup>

(1 Key Laboratory of Genomics and Precision Medicine, Collaborative Innovation Center of Genetics and Development, Beijing Institute of Genomics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China; 2 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

**Abstract:** Over 100 types of chemical modifications have been identified in various types of RNAs including rRNA, tRNA, snRNA, snoRNA and mRNA, among which methylation is most common. The N<sup>6</sup>-methyl-adenosine

收稿日期: 2016-03-02

基金项目: 国家自然科学基金项目(31430022, 31400672)

\*通信作者: E-mail: ygyang@big.ac.cn

#共同第一作者

(m<sup>6</sup>A) as the most common and abundant internal modification on mRNA molecules has been widely studied. The recent identification of m<sup>6</sup>A modifying enzymes including methyltransferase complex METTL3/METTL14/WTAP, two demethylases ALKBH5 and FTO and binding proteins YTHDF2, YTHDF1 and YTHDC1, indicates that RNA methylation is reversible and represents a novel epitranscriptomic mechanism instead of micro-regulation in gene expression control. Identification of candidate m<sup>5</sup>C modifying enzymes NSUN family proteins and TET proteins further expands RNA methylation-mediated epitranscriptomics. Epitranscriptomics has become a new research frontier in RNA biology. This review summarizes recent progress in RNA m<sup>6</sup>A and m<sup>5</sup>C methylations and proposes their potential biological significance.

**Key words:** m<sup>6</sup>A; m<sup>5</sup>C; mRNA; non-coding RNA; methyltransferase; demethylase; methylation binding protein

RNA 存在 100 余种化学修饰<sup>[1]</sup>, 甲基化是主要的修饰形式, 6-甲基腺嘌呤(m<sup>6</sup>A)和 5-甲基胞嘧啶(m<sup>5</sup>C)是最具有代表性的两种修饰。m<sup>6</sup>A 甲基化修饰于 20 世纪 70 年代被发现, 随后的研究陆续证实了该修饰广泛存在于包括动植物、原核生物以及病毒在内的多个物种中<sup>[2-8]</sup>。近年来, 随着酶学技术的发展, m<sup>6</sup>A 的修饰酶相继被发现, 其中 WTAP、METTL3 和 METTL14 复合物可以催化 m<sup>6</sup>A 的形成, 而 FTO 和 ALKBH5 可以使其去甲基化; m<sup>6</sup>A 修饰的生物学功能可能主要通过包含有 YTH 结构域的结合蛋白来发挥<sup>[9]</sup>。m<sup>6</sup>A 修饰如何调控编码基因 mRNA 和非编码 RNA 加工代谢目前尚不明确。m<sup>5</sup>C 修饰也存在于 mRNA、tRNA、rRNA 及长非编码 RNA 中。NSUN 家族蛋白, 如 NSUN2、NSUN4 和 DNMT2 是候选 m<sup>5</sup>C 甲基转移酶<sup>[10-12]</sup>。下面以 m<sup>6</sup>A 和 m<sup>5</sup>C 修饰为主线, 从各自的主要检测技术、分布特征、甲基化/去甲基化酶及结合蛋白、生物学功能等进行阐述。

## 1 6-甲基腺嘌呤: m<sup>6</sup>A

### 1.1 检测技术

早期研究主要通过化学手段, 包括液相色谱技术检测 m<sup>6</sup>A 含量, 它占 mRNA 中腺嘌呤总量的 0.1%~0.4%<sup>[13-14]</sup>, 并发现其修饰区域倾向于包含“RRACH”([G/A][G>A]m<sup>6</sup>AC[U>A>C])的保守序列<sup>[7]</sup>。

近年, 两个独立研究团队结合基于 m<sup>6</sup>A 抗体免疫共沉淀和高通量测序技术 (meRIP-seq 和 m<sup>6</sup>A-seq 技术), 获得了转录组水平上的 m<sup>6</sup>A 修饰数量和分布特征<sup>[15-16]</sup>。多个实验室对 m<sup>6</sup>A 单碱基分辨率技术开发进行了有益的尝试, 包括基于修饰碱基回补温度差异法<sup>[17]</sup>、基于 RNA 酶切割位点特异性并结合放射性元素标记及薄层层析方法的 SCARLET (site-specific cleavage and radioactive-labeling followed by ligation-assisted extraction and TLC)<sup>[18]</sup> 和光交联-m<sup>6</sup>A

抗体免疫共沉淀联用法, 但 m<sup>6</sup>A 修饰位点的定性和定量化还需要进一步优化。

### 1.2 分布和保守性

m<sup>6</sup>A 倾向于分布在 mRNA 的蛋白质编码序列 (CDS)、3' 非翻译区 (3'UTR)、终止密码子附近、剪切位点附近以及长的外显子区域, 而且其修饰区域在人和鼠中具有很高的保守性; 在 microRNA 靶位点及其邻近区域也有 m<sup>6</sup>A 富集<sup>[15-16,19]</sup>。

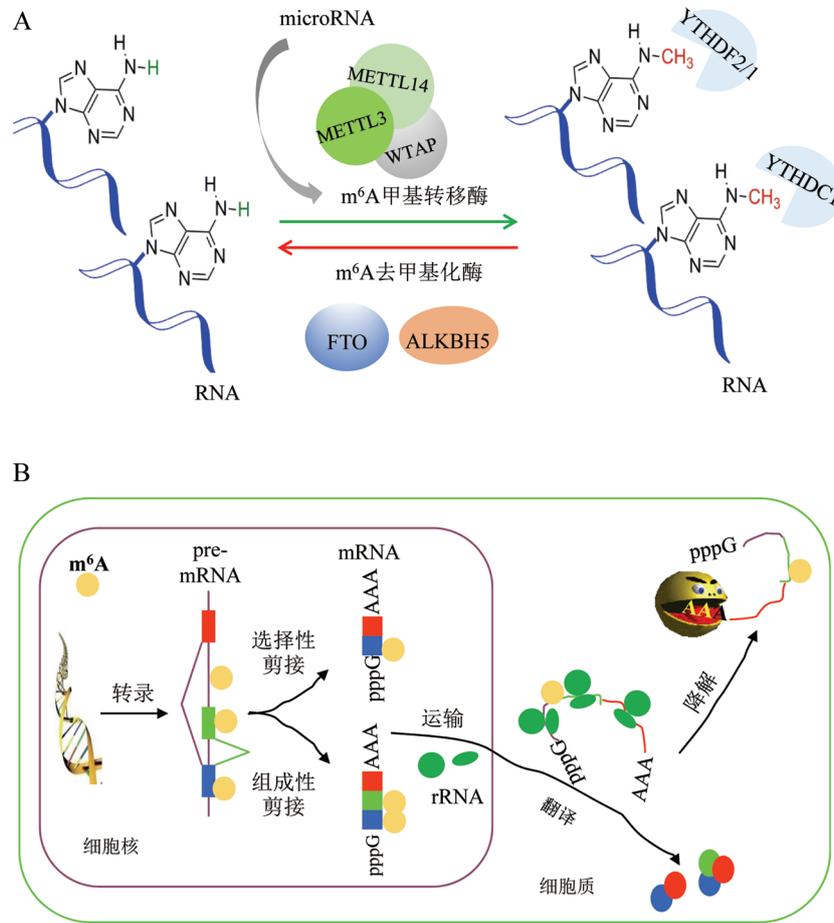
### 1.3 m<sup>6</sup>A 修饰酶及结合蛋白(图1A)

m<sup>6</sup>A 甲基转移酶复合物 METTL3、METTL14 和 WTAP 能以 S-腺苷甲硫氨酸 (S-adenosyl-L-methionine, SAM) 为甲基化供体, 催化 RNA 的 m<sup>6</sup>A 形成, 其中 WTAP 作为调节亚基调控催化亚基 METTL3 和 METTL14 细胞内活性<sup>[20-25]</sup>。FTO 和 ALKBH5 在二价铁离子和 2-酮戊二酸的辅助下催化 m<sup>6</sup>A 去甲基化<sup>[26-27]</sup>。含有 YTH 功能结构域家族的蛋白 YTHDF2 和 YTHDC1 能结合 m<sup>6</sup>A 甲基化修饰序列<sup>[8-9,15]</sup>。

#### 1.3.1 m<sup>6</sup>A 甲基转移酶(编码器)

催化 m<sup>6</sup>A 甲基化形成的甲基转移酶于 1992 年通过分离纯化首次被发现<sup>[28]</sup>, 前期研究将 HeLa 细胞核提取物与人工合成的 RNA 寡核苷酸片段共同孵育分离得到了两种组分, 分别命名为 MT-A 和 MT-B, 它们协同催化 m<sup>6</sup>A 形成<sup>[29]</sup>。随后的研究分离得到了 3 个组分 MT-A1、MT-A2 和 MT-B<sup>[29]</sup>。在设定的反应条件下, 相对分子质量为 200 kDa 的 MT-A2 和 800 kDa 的 MT-B 两个组分具备了较强催化 m<sup>6</sup>A 形成酶活性, 而只有相对分子质量为 30 kDa 的 MT-A1 在 m<sup>6</sup>A 甲基化形成的过程中作用相对较小<sup>[30]</sup>。

MT-A2 中 70 kDa 的 METTL3 亚基 (也称 MT-A70 亚基) 蛋白预测的氨基酸序列中包含原核生物甲基转移酶的两个甲基化基序, 分别是 S-腺苷甲硫氨酸 (SAM) 结合位点和有催化功能的 DPPW (Asp-Pro-Pro-Trp) 功能结构域<sup>[30]</sup>。在 HeLa 细胞中,



A: mRNA m<sup>6</sup>A修饰的动态可逆过程。m<sup>6</sup>A甲基转移酶复合体亚基 METTL3/METTL14/WTAP 催化A形成甲基化的m<sup>6</sup>A; 去甲基化酶FTO、ALKBH5催化其去甲基化; YTH家族蛋白YTHDC1结合细胞核内的m<sup>6</sup>A修饰, YTHDF2/1结合细胞质的m<sup>6</sup>A; microRNA通过调节METTL3的活性及结合RNA的能力调控m<sup>6</sup>A生成。B: m<sup>6</sup>A修饰调控mRNA加工代谢潜在功能。前体pre-mRNA转录后需要经过剪接、出核运输、定位、翻译和降解(稳定性)等加工和代谢, 而m<sup>6</sup>A作为mRNA内部的重要可逆化学修饰, 可能作为新顺式元件对上述进程进行调控。

图1 RNA m<sup>6</sup>A修饰的动态可逆过程及调控mRNA加工代谢的潜在功能

METTL3 表达缺陷会导致 m<sup>6</sup>A 水平降低约 30%。免疫荧光实验显示, METTL3 定位在富含剪切因子的细胞核内亚细胞器——核小斑 (nuclear speckle) 上, 揭示了 m<sup>6</sup>A 修饰可能和 RNA 的剪切加工相关 [24,30]。METTL3 在人体组织中广泛表达, 并保守存在于多个物种中, 如拟南芥中的 MTA、果蝇中的 IME4 等, 在这些物种中的一些研究表明 METTL3 缺陷会引起减数分裂或发育异常 [31-35]。

通过对 METTL3 同源蛋白的分析, 研究者发现 METTL14 同样含有催化 m<sup>6</sup>A 形成的 S-腺苷甲硫氨酸结合位点和有催化功能的 EPPL 功能结构域, 因此, METTL14 被认为是 m<sup>6</sup>A 甲基转移酶复合体的另一亚基 [36]。在催化 m<sup>6</sup>A 形成的过程中, METTL3 和 METTL14 按 1:1 的比例形成二聚体直接相互作用,

从而增强两者的甲基化催化能力 [20,23]。光活性增强的核糖核苷交联和免疫共沉淀 (photoactivatable-ribonucleoside-enhanced crosslinking and immunoprecipitation, PAR-CLIP) 结合二代高通量测序技术的数据分析表明, METTL14 和 METTL3 含有相同的 RNA 底物结合序列, 且该序列包含已报道的 m<sup>6</sup>A 经典保守基序 RRACH [23]。同时, METTL14 与 METTL3 一致定位在富含剪切因子的细胞核内亚细胞器——核小斑上, 其定位暗示了 m<sup>6</sup>A 的修饰可能会与 RNA 加工过程中的可变剪切相关。

WTAP 与 METTL3、METTL14 形成复合体, 共同调控 RNA m<sup>6</sup>A 的甲基化过程 [24]。WTAP 首先结合到目标 RNA 上, 进而招募催化亚基 METTL3 和 METTL14 形成的二聚体行使催化功能 [20-22]。

WTAP 最初作为剪切因子以及肿瘤结合蛋白被发现, 后来被证实参与 m<sup>6</sup>A 甲基化修饰、细胞周期以及哺乳动物胚胎细胞的发育等过程<sup>[37-38]</sup>。WTAP 缺失不仅会导致 m<sup>6</sup>A 水平下降, 而且会引起结合到 METTL3 上的 RNA 减少<sup>[24]</sup>, 这一结果表明 WTAP 的作用可能是招募甲基转移酶的催化亚基 METTL3 和 METTL14 结合到 RNA 上, WTAP 同 METTL3、METTL14 一样, 定位在核内亚细胞器——核小斑上, 可以与两者形成复合体, 加速 m<sup>6</sup>A 甲基化的形成, 进而调控 m<sup>6</sup>A 的动态变化<sup>[23-24]</sup>。

除此之外, 近期研究还发现, KIAA1429 可能是甲基转移酶复合体的新亚基, 与 mRNA 中 m<sup>6</sup>A 的形成有关<sup>[25]</sup>。在果蝇中, KIAA1429 的同源蛋白和 WTAP 同源蛋白在选择性剪切过程中存在相互作用<sup>[39-40]</sup>。在人 A549 细胞中, 敲低 KIAA1429 导致 m<sup>6</sup>A 修饰水平的降低, 其降低幅度大于 METTL3 和 METTL14 敲低后的 m<sup>6</sup>A 水平变化, 这一结果表明, KIAA1429 对 RNA 甲基化可能发挥着更加重要的作用<sup>[25,41]</sup>。

### 1.3.2 m<sup>6</sup>A 去甲基化酶(消码器)

目前已经鉴定了两个 m<sup>6</sup>A 去甲基化酶——FTO 和 ALKBH5, 催化 m<sup>6</sup>A 修饰去甲基化。FTO 作为人源 ALKB 双加氧酶蛋白家族成员, 最初被发现于一种融合脚趾突变小鼠体内, 后被证实与人的肥胖和能量稳态有关<sup>[42]</sup>, 是大肠杆菌 ALKB 的同源蛋白<sup>[43-44]</sup>。FTO 广泛存在于小鼠的多个组织, 其中脑组织中的含量尤为突出<sup>[45]</sup>。FTO 敲除的小鼠比正常的小鼠有更高的致死率, 表现为生长缓慢和体型瘦小。FTO 去甲基化酶作用的底物之一是多聚腺苷酸 RNA 上的 m<sup>6</sup>A<sup>[26,46]</sup>。FTO 依赖 2 价铁离子和 2-酮戊二酸催化 m<sup>6</sup>A 去甲基化的过程要经历复杂的中间反应步骤: 首先催化 m<sup>6</sup>A 形成 hm<sup>6</sup>A, 然后催化 hm<sup>6</sup>A 形成 f<sup>6</sup>A, 最后催化 f<sup>6</sup>A 形成 A, 每一步反应都很迅速<sup>[47]</sup>。相较于 ALKB 家族的其他分子, FTO 的 C 端有一个折叠, 该结构可能通过促进蛋白质-蛋白质或蛋白质-RNA 的相互作用调节 FTO 的功能。除此之外, 免疫荧光实验显示, FTO 部分定位在核内亚细胞器——核小斑<sup>[26,48]</sup>, 并通过调控 m<sup>6</sup>A 水平影响到 pre-mRNA 加工剪切因子 SRSF2 的结合, 影响 pre-mRNA 剪接成熟的过程<sup>[49]</sup>。近期有研究发现, 甲氯芬那酸 (meclofenamic acid) 可以和 FTO 竞争性地结合发生 m<sup>6</sup>A 修饰的核酸分子, 从而抑制 FTO 的去甲基化作用<sup>[50]</sup>。

ALKBH5 是人的大肠杆菌 ALKB 双加氧酶家

族同源蛋白的另一成员, 是继 FTO 之后第二个被发现的 m<sup>6</sup>A 去甲基化酶, 能够分别在体外和体内去除 m<sup>6</sup>A 的甲基基团<sup>[27,51]</sup>。与 FTO 不同的是, ALKBH5 可直接催化 m<sup>6</sup>A 到 A, 目前尚未发现中间产物。有研究显示, ALKBH5 倾向于结合特异的 m<sup>6</sup>A 修饰的单链 RNA 去甲基化<sup>[52]</sup>。本实验室利用 RNA 原位杂交技术 (poly(A)-tailed RNA FISH) 鉴定发现, ALKBH5 基因敲除能促进 mRNA 出核, 证实 m<sup>6</sup>A 可能参与到 mRNA 的出核转运<sup>[27]</sup>。ALKBH5 定位于细胞核内亚细胞器——核小斑, 且对 RNA 酶 A 敏感, 说明其作用依赖于 RNA。在 ALKBH5 基因敲除的雄鼠模型中, mRNA 中 m<sup>6</sup>A 的水平显著增加。ALKBH5 敲除还与精子发育密切相关, 减数分裂中期的精母细胞发生凋亡导致精子发育受损、精子畸形, 睾丸形状异常、重量变小。在 ALKBH5 敲除的雄鼠睾丸样品中, 与正常组相比较差异表达的基因涉及多种不同的生物学功能, 并包括涉及到 p53 功能互作网络的精子发育相关的功能<sup>[27]</sup>。

FTO 和 ALKBH5 是目前已知的 m<sup>6</sup>A 去甲基化酶, 其他的去甲基化酶还有待发现。由于组织特异性分布和 RNA 底物不同, FTO 和 ALKBH5 在 RNA 的加工代谢过程中起到了不同的作用, 同时, 它们的基因敲除小鼠所对应的表型也不同<sup>[53]</sup>。因此, 可能存在细胞和组织特异性 m<sup>6</sup>A 去甲基化酶。

### 1.3.3 m<sup>6</sup>A 结合蛋白(读码器)

m<sup>6</sup>A 广泛存在于生物体中并发挥着重要的生物学功能, 其修饰水平受到甲基转移酶和去甲基化酶活性的动态调控。m<sup>6</sup>A 修饰的 RNA 序列结构倾向于保持单链状态<sup>[54]</sup>, 可能与其结合蛋白的识别及协同作用相关。截至目前, 哺乳动物中已经有一些 m<sup>6</sup>A 结合蛋白被预测和发现, 其中部分已经被证实了具有能够介导 m<sup>6</sup>A 发挥重要调控作用的生物学功能。目前发现的 m<sup>6</sup>A 结合蛋白主要是含有 YTH 结构域的蛋白家族<sup>[55-56]</sup>, 分别是定位在细胞质的 YTHDF1、YTHDF2 和定位于细胞核中的 YTHDC1<sup>[8-9,15,57-59]</sup>。此外, 在哺乳动物细胞中发现与 m<sup>6</sup>A 关联的蛋白还有 HuR 和 HNRNP 等<sup>[15]</sup>。

YTHDF2 相对于 YTHDF1 而言, 对 m<sup>6</sup>A 有更强的结合能力。PAR-CLIP 测序结果表明, 该蛋白主要结合 mRNA 和一些长非编码 RNA, 结合位点主要是在富含 GAC 序列的 3' UTR 区域, 和 m<sup>6</sup>A 修饰区域有很大程度的重合<sup>[9]</sup>。在细胞中, YTHDF2 可能与介导 mRNA 翻译的核糖体 RNA 竞争性地结合甲基化的转录本, 进而影响 RNA 的半衰期, 加

速 RNA 的降解, 影响 mRNA 的稳定性<sup>[9,29]</sup>。YTHDF2 的 C 端可以特异性识别并结合 m<sup>6</sup>A, N 端则负责将已结合的复合体引导并定位到介导 RNA 降解的细胞质亚细胞器 P-body<sup>[9,60]</sup>。除 YTHDF2 外, 其家族的另外两个同源蛋白 YTHDF1 和 YTHDF3 有与 YTHDF2 相似的 RNA 结合亚基<sup>[9]</sup>。YTHDF1 已被证实与蛋白质翻译有关。人类的 YTHDF1 结合 m<sup>6</sup>A 修饰的 mRNA 后, 与起始翻译的因子 eIF 及核糖体相互作用, 核糖体结合到 mRNA 上及在其上滑动的速度加快, 增强了这些 mRNA 的翻译效率<sup>[57]</sup>。根据 YTHDF1 和 YTHDF2 的功能推测, YTHDF3 可能会与细胞内 RNA 的代谢有关系, 但是其具体功能尚不明确。YTH 家族另外一个定位于细胞质中的蛋白 YTHDC2 相对分子质量很大, 目前尚未被鉴定为 m<sup>6</sup>A 的结合蛋白, 对其功能还有待进一步的研究。

YTHDC1 定位在细胞核中的 YT-body, 与定位在细胞质中的 YTHDF2 功能不同。PAR-CLIP 测序数据表明 YTHDC1 能结合 GGAC, 与 m<sup>6</sup>A 修饰的保守基序 GGACU 一致, 并且其结合位点大部分位于终止密码子附近, 这也与 m<sup>6</sup>A 的富集位点一致<sup>[58]</sup>。YTHDC1 可以在核小斑处形成特定的结构, 能与 mRNA 剪切因子相互作用调控 mRNA 剪切<sup>[59,61]</sup>。YTHDC1 与 SRSF3 结合, 能够促进有 m<sup>6</sup>A 修饰的外显子在剪切过程中被保留。若 m<sup>6</sup>A 修饰的外显子被 SRSF10 结合或没有 m<sup>6</sup>A 修饰的外显子被 SRSF10 结合, 则促进此外显子被切除。SRSF3 和 SRSF10 竞争性结合 YTHDC1<sup>[59]</sup>。

#### 1.4 m<sup>6</sup>A 的生物学功能

m<sup>6</sup>A 广泛存在于各种真核生物的 mRNA 以及其他非编码 RNA 中, 但是其确切的生物学功能目前尚不明确, 可能与 RNA 的转录、加工、转运、翻译、降解, 细胞发育分化以及细胞分裂等多个过程相关<sup>[41,62]</sup>。在哺乳动物中, m<sup>6</sup>A 动态变化可能通过调节多种与 RNA 相关的细胞信号通路影响基因表达和细胞命运。

##### 1.4.1 m<sup>6</sup>A 调控 mRNA 加工代谢及其生物学功能(图 1B)

在拟南芥中, MTA (METTL3 同源基因) 缺陷导致胚芽发育和生长停滞<sup>[34]</sup>。在果蝇中, 敲除 IME4 (METTL3 同源基因) 会导致胚胎死亡<sup>[32]</sup>。酵母中 m<sup>6</sup>A 调控细胞减数分裂<sup>[8]</sup>。m<sup>6</sup>A 还影响干细胞定向分化及细胞重编程和生物钟节律<sup>[19-20,63-64]</sup>。HeLa 细胞中 WTAP 和 METTL3 基因缺陷均会导致细胞凋亡增加, 而 WTAP 近期被发现是急性髓性白血病

发生的新致癌基因<sup>[65]</sup>。ALKBH5 基因敲除小鼠表现为精子发育异常<sup>[27]</sup>, FTO 则是肥胖和 2 型糖尿病相关基因<sup>[26]</sup>。YTHDF2 结合的 mRNA 倾向于快速降解<sup>[9]</sup>, 且其基因变异与髓性白血病和急性髓性白血病发生相关<sup>[66]</sup>。此外, 在胚胎干细胞中, m<sup>6</sup>A 可以影响 mRNA 的代谢, 维持细胞的自我更新, 作为转录组水平标志控制胚胎细胞的分化和细胞命运<sup>[67-68]</sup>。综上, mRNA m<sup>6</sup>A 修饰具有重要生物学功能, 并和疾病的发生发展紧密相关。

mRNA m<sup>6</sup>A 修饰的甲基化和去甲基化过程主要发生在细胞核。前体 pre-mRNA 的内含子区域也存在 m<sup>6</sup>A, 提示该甲基化修饰可能调控 mRNA 前体选择性剪切加工形成成熟的 mRNA<sup>[41]</sup>。METTL3 基因沉默引起的 m<sup>6</sup>A 水平下降会导致 mRNA 选择性剪切发生变化, 并显著富集于 p53 信号通路和细胞凋亡通路中, 这种调控作用在脑组织中更为明显<sup>[16]</sup>; METTL3 和拟南芥中同源基因 MTA 与剪接调控蛋白 WTAP (AtFIP37) 相互作用, 提示 m<sup>6</sup>A 可能与 mRNA 剪接相关<sup>[69]</sup>。WTAP、METTL3、ALKBH5 基因敲低细胞中, mRNA 表达水平和选择性剪接模式发生显著变化<sup>[24,27]</sup>。FTO 基因敲低会影响甲基化的修饰水平, 进而通过影响剪切因子 SRSF2 结合到 mRNA 上的水平, 最终导致选择性剪接成不同的转录本<sup>[41,49]</sup>。而分布在内含子区域的 m<sup>6</sup>A 修饰可能调控了 hnRNPC 剪接因子结合 mRNA 内含子序列, 从而影响 mRNA 的剪接<sup>[70]</sup>。总之, mRNA m<sup>6</sup>A 修饰的 RRACH 序列可能类似于顺式调控因子, 调控 mRNA 加工和代谢。

m<sup>6</sup>A 修饰在 mRNA 的 3'UTR 区域高度富集, 同时, 这一区域也是 microRNA 的靶向结合区域, 因此, m<sup>6</sup>A 修饰可能会参与调控 microRNA 与 mRNA 的结合过程。在 3'UTR 存在 m<sup>6</sup>A 修饰的转录本中, 约 67% 含有至少一个 microRNA 结合位点<sup>[16]</sup>。本实验室研究发现了 microRNA 调控 mRNA m<sup>6</sup>A 甲基化位点生成的选择性机制, 同时, 发现了 m<sup>6</sup>A 调控细胞重编程的重要功能。microRNA 通过序列配对机制调控 mRNA m<sup>6</sup>A 的水平。人为改变 microRNA 的表达或者突变其靶标 mRNA 配对种子区的序列, 可以调控与 m<sup>6</sup>A 甲基转移酶亚基 METTL3 结合的 RNA (同时这些 RNA 也是 microRNA 靶标), 进而调节 m<sup>6</sup>A 的修饰水平。过表达 RNA m<sup>6</sup>A 甲基转移酶催化亚基 METTL3 引起的 m<sup>6</sup>A 水平升高能显著提高小鼠成纤维细胞重编程为多能性干细胞的效率, 反之则抑制重编程, 并且使用抑制 m<sup>6</sup>A 形成的

小分子抑制剂环亮氨酸处理得到了和敲低 METTL3 一致的效果,显著降低了小鼠成纤维细胞的重编程效率<sup>[19]</sup>。

#### 1.4.2 m<sup>6</sup>A调控非编码RNA加工代谢(图2)

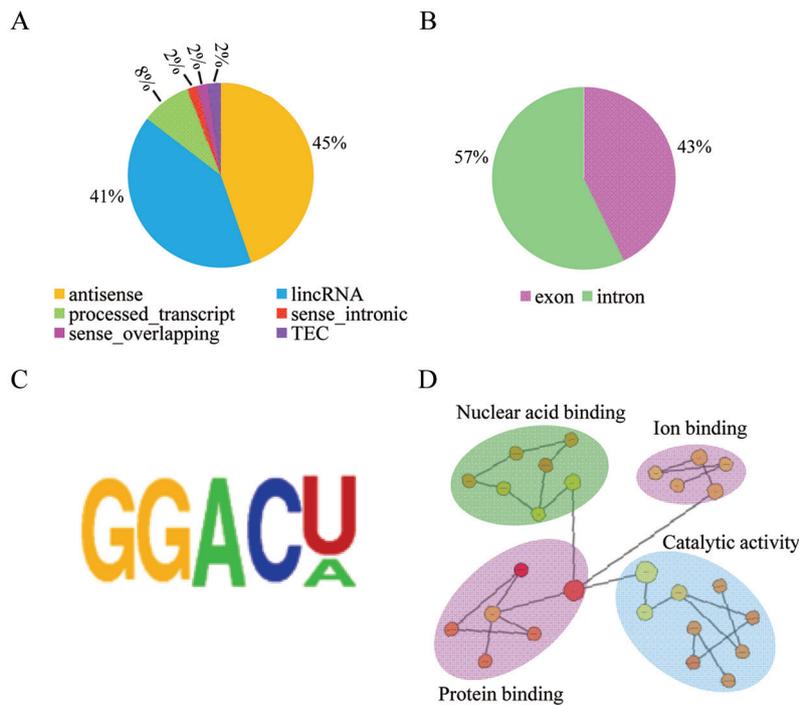
通过对已有的 m<sup>6</sup>A 数据进行整合分析,发现在很多长非编码 RNA 上同样存在着 m<sup>6</sup>A 修饰,如 7SK、XIST、HOTAIR、HOTTIP、TUG1 等。从基因类型上讲, m<sup>6</sup>A 修饰主要存在于 lincRNA 和 antisense 两种长链非编码 RNA。不同于 mRNA 的是, m<sup>6</sup>A 在内含子区域的分布数量高于外显子区域,但 m<sup>6</sup>A 修饰同样倾向于富含 GAC 的保守序列。通过对人源 m<sup>6</sup>A 修饰的非编码基因的功能注释,发现这些基因主要参与蛋白质或者核酸的结合,表明非编码 RNA 可能通过这种 m<sup>6</sup>A 修饰来引导蛋白质在细胞内正确定位并结合 DNA 或者 RNA,进而影响转录或翻译等过程。最近有研究表明, m<sup>6</sup>A 去甲基化酶 FTO 可能调控了非编码 microRNA 的 m<sup>6</sup>A 修饰<sup>[71]</sup>。与 mRNA 类似, lincRNA 中的 m<sup>6</sup>A 修饰可能同样会影响多外显子的非编码 RNA 选择性剪切,形成不同的转录本,进而影响到其下游功能。

## 2 5-甲基胞嘧啶(m<sup>5</sup>C)

### 2.1 检测技术

除 m<sup>6</sup>A 外, m<sup>5</sup>C 是另一种在 RNA 中广泛存在的甲基化修饰形式。目前, DNA 中的 m<sup>5</sup>C 修饰已经成为表观遗传学的研究热点,而在 RNA 中的研究则处于起步阶段,其修饰位点的分布特征以及生物学功能等仍不清楚<sup>[72]</sup>。近期,在 RNA m<sup>5</sup>C 的基因组水平上的单位点检测及生物学功能方面才有初步探索<sup>[73]</sup>。

通常可以利用质谱技术检测 RNA 整体水平上的 m<sup>5</sup>C 修饰程度。至今为止,已有 4 种方法应用于 m<sup>5</sup>C 的单位点鉴定,分别为 RNA 亚硫酸盐测序、m<sup>5</sup>C-RIP、Aza-IP、miCLIP<sup>[10-12]</sup>。其中 RNA 亚硫酸盐测序是目前最为理想的方法,该方法可以检测到 RNA 经亚硫酸盐处理后转换为尿嘧啶的非甲基化胞嘧啶,而甲基化胞嘧啶经处理后不发生转换。与亚硫酸盐测序方法不同, m<sup>5</sup>C-RIP、Aza-IP 和 miCLIP 方法并不依赖于化学碱基的转化,因此,可以避免过激的化学伤害造成的 RNA 降解,并能在免疫沉



A: 含有 m<sup>6</sup>A 修饰的非编码 RNA 基因类型注释。以 GENCODE 数据库为参考, m<sup>6</sup>A 甲基化修饰的长非编码 RNA 主要是 antisense RNA 以及 lincRNA。B: m<sup>6</sup>A 修饰普遍分布于非编码 RNA 的编码区(外显子 exon)和非编码区(内含子 intron),且内含子中的分布多于外显子。C: 非编码 RNA m<sup>6</sup>A 修饰具有与 mRNA 一致的保守序列: GGACU。D: m<sup>6</sup>A 修饰的非编码 RNA 的功能富集。主要涉及: 核酸结合、催化活性、蛋白质结合和离子结合。

图2 非编码RNA中m<sup>6</sup>A修饰的分布及功能富集

淀的过程中富集 RNA 底物, 使低丰度的 RNA 在普通的深度测序中同样可以被检测到, 但这些方法的敏感性低于 RNA 亚硫酸盐测序方法, 检测到的  $m^5C$  修饰位点数量远远低于后者。早期研究受到检测技术的限制, 在 mRNA 中仅发现少数的  $m^5C$  修饰, 而近期通过亚硫酸盐测序方法发现, 在 HeLa 细胞中 mRNA 和非编码 RNA 的  $m^5C$  均存在着广泛的修饰, 并且得到了单位点的  $m^5C$  谱<sup>[10]</sup>。

## 2.2 分布特征

很多古细菌以及真核生物的 tRNA 中都已经证实存在  $m^5C$  修饰<sup>[74]</sup>, 修饰位点主要集中在可变臂和反密码环。有研究指出, 这种修饰可以稳定 tRNA 的二级结构, 影响氨酰化的形成及密码子的识别<sup>[75-80]</sup>。此外,  $m^5C$  修饰还存在于 rRNA 结合 tRNA 发挥翻译活性的区域<sup>[81]</sup>。

2012 年, Squires 等<sup>[10]</sup> 通过亚硫酸盐处理转录组结合测序技术得到了 mRNA 上的  $m^5C$  修饰位点, 并指出 mRNA 中的  $m^5C$  修饰主要富集在非翻译区 (3'UTR 和 5'UTR) 以及 AGO 蛋白结合位点附近。

## 2.3 修饰酶(图3)

### 2.3.1 $m^5C$ 甲基转移酶

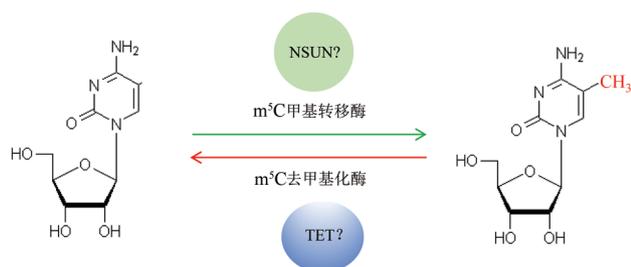
和  $m^6A$  一样, RNA  $m^5C$  修饰也可能是动态可逆的, 甲基转移酶以 S-腺苷甲硫氨酸 (SAM) 为供体, 将甲基转移到胞嘧啶 C 形成 5-甲基胞嘧啶  $m^5C$ <sup>[82]</sup>。RsmB 是第一个被发现的  $m^5C$  甲基转移酶, 主要催化细菌 rRNA 上的甲基化形成<sup>[83]</sup>。随后, 30 多种 RNA 上的  $m^5C$  甲基转移酶陆续被发现, 这些甲基转移酶主要可分为 NOP2/NOL1、YebU/Ttm4、RsmB/Yn1022c 和 PH1991/NSUN 四类<sup>[82]</sup>, 而且这些酶在真核生物中有很高的保守性。近年来 NSUN 蛋白家族被广泛深入研究。人的 NSUN 蛋白家族共有 9 个蛋白<sup>[10,84]</sup>, 该家族的多个成员都具有潜在的  $m^5C$  甲

基转移酶功能结构域, 其中 NSUN2 的催化活性已被证实<sup>[85]</sup>。

NSun2 和 Dnmt2 被认为可能是哺乳动物的 RNA  $m^5C$  甲基转移酶<sup>[10-11]</sup>, 它们的催化位点有一定的交集。其他的酶, 如 NSUN1 和 NSUN3~7 被预测可以催化一些保守的甲基化位点的甲基化过程<sup>[86]</sup>。NSUN1、NSUN2 和 NSUN5 已被证实能结合 RNA, 但这些酶的特异性结合底物并不是很清楚<sup>[87]</sup>。NSUN 蛋白家族的生物学功能至今还不是非常清楚, 但是它们都在小鼠的胚胎发育过程中有表达, NSUN2~7 的转录本富集在发育的脑中并对神经发育有重要调控作用<sup>[86]</sup>。小鼠的 NSUN2 是染色质体的重要组成成分, 而且对于表皮干细胞的自我更新和分化有密切的联系<sup>[88]</sup>。NSUN2 能够催化 tRNA 的甲基化, 而且在 mRNA 和非编码 RNA 中也有一定作用<sup>[10-12]</sup>。另外, 已有研究表明, DNMT2 是 tRNA 的甲基转移酶<sup>[89]</sup>。目前发现的多数的甲基转移酶定位在细胞核内, 表明这些酶本身以及其调控的甲基化过程可能对 RNA 的加工有作用。NSUN2 最初在哺乳动物上皮中被发现作为原癌基因 c-Myc 的转录靶点, 且 NSUN2 在多种癌组织中呈上调趋势, 人鳞状细胞癌中 NSUN2 基因敲低抑制了其生长能力。NSUN2 还是能被 AuraroB 激酶调控的核仁蛋白, 在肿瘤细胞中通过稳定分裂期纺锤体而促进细胞分裂。然而, 这一功能似乎与其甲基转移酶功能无关, 且有待被体内实验验证。

此外, NSUN2 敲除小鼠呈现出与 DNMT2 敲除斑马鱼类似的表型, NSUN2 敲除小鼠体型偏小, 且在包括皮肤和睾丸等的特异性组织的后期发育受到延迟或阻碍, 因此, NSUN2 可以维持鼠表皮细胞的正常分化<sup>[88]</sup>。在人中, NSUN2 的几个遗传突变已被鉴定, 且初步导致常染色体隐性的智障以及 Dubowitz 样综合征, 其共同特征为生长和心智阻滞, 面部异常以及皮肤畸形<sup>[90]</sup>。RNA 甲基化缺失是否是这些复杂疾病的诱因以及如何致病尚不清楚。然而, 与人的综合征相似的是, 果蝇中 NSUN2 同源基因敲除导致严重的短期记忆异常, 而 DNMT2 和 NSUN2 双敲除使得所有的 tRNA 甲基化丢失, 特异性影响脑、肝脏和脂肪组织的发育<sup>[91]</sup>。

NSUN1 (NOP2) 是核仁蛋白, 能够结合 60~80S 的核糖体前体颗粒, 目前已知其主要功能在于调控细胞分裂<sup>[92]</sup>。NSUN1 能否甲基化核糖体 RNA 还有待被证实。此外, NSUN1 基因定位于具有智能缺陷和小头畸形等特征的 Cri-du-chat 综合征患者中缺



RNA 受到甲基转移酶, 如 NSUN 家族蛋白催化 C 形成甲基化的  $m^5C$  修饰, 而去甲基化酶, 如可能性较大的 TET 家族蛋白催化其去甲基化。

图3  $m^5C$  修饰的动态可逆过程

失的基因组区域。

NSUN4 主要作用于线粒体中由线粒体 DNA 编码的 12S rRNA 的 C911 位点。与 NSUN2 基因敲除不同的是, 生殖细胞中 NSUN4 基因敲除可致死, 8.5 d 的胚胎表现出严重的生长迟钝并缺乏明显的可辨别解剖学结构<sup>[93]</sup>。心脏中的 NSUN4 条件性敲除可诱发心肌病和因线粒体核糖体组装受损和线粒体翻译受抑制后导致的呼吸链缺陷。

虽然酵母的 NSUN5 同源基因 Rcm1 已被报道能特异性修饰 25S rRNA<sup>[94]</sup>, 然而, 截至目前 NSUN5 的生物学功能和 RNA 底物尚未可知。在人中, NSUN5 基因定位于在 Williams-Beuren 综合征患者中缺失的基因组区域, 这是一种罕见的神经发育紊乱的疾病, 缺乏 NSUN5 可能与该疾病的生长迟缓、肌肉病变, 或早老等表型相关。NSUN7 基因突变可导致精子的运动能力受损, 可能与人和小鼠的不育症相关<sup>[95]</sup>。

NSUN3 和 NSUN6 蛋白的生物学功能尚属未知。

总之, 目前对于 RNA m<sup>5</sup>C 甲基转移酶的生物学功能的证据非常有限, 然而一些共性却已凸显。首先, NSUN 蛋白多与人类综合性疾病相关, 包括生长迟缓和神经发育缺陷等。rRNA 和 tRNA 的 m<sup>5</sup>C 修饰能直接调控总的蛋白质翻译, 或许能够解释这一关联。而许多缺乏 RNA 甲基转移酶的器官之所以呈现变小的表型, 可能是因为蛋白质合成途径可关联到细胞的大小。另外, 一个共性在于 RNA 甲基转移酶缺陷对脑和睾丸的影响较为普遍, 而这两者也是对蛋白质翻译速率变化反应最为敏感的器官。

### 2.3.2 m<sup>5</sup>C 去甲基化酶

Tet 家族蛋白依赖 2 价铁离子和 2- 酮戊二酸催化 DNA m<sup>5</sup>C 去甲基化过程, 但在 RNA 中还未发现能够去除 m<sup>5</sup>C 甲基化的酶, 此前有报道称 RNA m<sup>5</sup>C 的去甲基化过程也可能是由 Tet 催化完成, 但仍需要实验进一步验证<sup>[96]</sup>。

## 2.4 m<sup>5</sup>C 的生物学功能

### 2.4.1 m<sup>5</sup>C 在 mRNA 中的功能

相较于 m<sup>6</sup>A, m<sup>5</sup>C 在 mRNA 中的功能研究还并不深入。基于现有的一些研究基础, 我们推测, m<sup>5</sup>C 的修饰可能会调控 mRNA 的选择性剪切, m<sup>5</sup>C 修饰水平可能会影响外显子的保留水平以及转录本的组装形式。除此之外, m<sup>5</sup>C 在 RNA 翻译起始位点的富集提示其可能与蛋白质翻译有较为密切的关系<sup>[97]</sup>。而且, m<sup>5</sup>C 可能和 mRNA 的稳定性有关:

含有 m<sup>5</sup>C 修饰的 mRNA 其稳定性较强, 而 3'UTR m<sup>5</sup>C 水平的降低可以导致 mRNA 的稳定性降低<sup>[97]</sup>。鉴于 mRNA 中 m<sup>5</sup>C 的修饰位点富集在 AGO 蛋白的结合位点附近, m<sup>5</sup>C 修饰可能会影响 microRNA 参与的 RNA 降解途径, 但 miCLIP 方法表明在 NSUN2 缺失的情况下, 其靶标 mRNA 的表达并不会明显降低, 因此, 目前并没有足够的证据证明 m<sup>5</sup>C 是否可以调控 mRNA 的稳定性<sup>[98]</sup>。NSUN2 基因的突变会引起常染色体隐性综合征, 表现为智力障碍、皮肤问题和生长迟缓<sup>[90,99-101]</sup>。总之, m<sup>5</sup>C 修饰在 RNA 中广泛存在, 而且其功能可能涉及到细胞内信号转导、组织发育分化和癌症等许多方面<sup>[102-103]</sup>。

### 2.4.2 m<sup>5</sup>C 在非编码 RNA 中的功能

多项研究表明, m<sup>5</sup>C 在 tRNA 和 rRNA 中有重要的作用<sup>[104-106]</sup>。在 tRNA 中, m<sup>5</sup>C 主要存在于可变区和反密码子环, 从而使 tRNA 的二级结构更加稳定, 增强密码子识别的能力<sup>[75]</sup>。在 DNMT2 和 NSUN2 双敲除小鼠中, tRNA 中的 m<sup>5</sup>C 修饰消失, tRNA 的功能减弱从而抑制蛋白质的合成<sup>[107]</sup>。在其他物种, 如酵母、果蝇、斑马鱼中, tRNA m<sup>5</sup>C 和蛋白质的翻译和组织分化有关<sup>[108-110]</sup>, 而发生在 rRNA 中的 m<sup>5</sup>C 修饰被认为和翻译过程有关<sup>[81]</sup>。

在长非编码 RNA (lincRNA), 如 HOTAIR 和 XIST 中, m<sup>5</sup>C 修饰存在于 lincRNA 和染色质相互结合的功能区, 这些转录后的修饰增加了长非编码 RNA 结构的多样性。有研究表明, Nsun2 催化的 m<sup>5</sup>C 的修饰会发生在穹窿体 RNA 上 (Vault RNA), 这是一种存在于穹窿体核糖核蛋白复合物中的非编码 RNA。这种修饰能够调控自身加工成特异的小 RNA<sup>[12]</sup>。

## 3 展望

尽管 RNA 修饰早已被发现, 但其具体功能还知之甚少。这些修饰对个体生命活动的影响将会是以后 RNA 领域研究的重点与热点。

目前, 在 m<sup>6</sup>A 修饰领域中, 研究者已发现其甲基转移酶、去甲基化酶及结合蛋白等较为完整的酶学系统。microRNA 等微调控的机制也已越来越清楚, 但由于目前实验和测序技术限制, mRNA m<sup>6</sup>A 单位点鉴定仍是很大的挑战。与之相比, mRNA m<sup>5</sup>C 利用亚硫酸盐测序能够较精确地定位 m<sup>5</sup>C 单位点, 但相关的酶系统基本还是空白, 需要尽快完善补充。与 m<sup>6</sup>A 类似, m<sup>5</sup>C 在 3'UTR 也有明显的富集, 且与 AGO 蛋白引导的 microRNA 靶

标 mRNA 3'UTR 序列有重合, 预示 microRNA 对 m<sup>5</sup>C 可能也有微调作用。m<sup>6</sup>A 和 m<sup>5</sup>C 在 pre-mRNA 内含子区也有富集, 对 mRNA 的选择性剪接可能发挥着一定的作用, 需要进一步深入研究。

m<sup>6</sup>A 的 RNA 甲基转移酶可能是一个包含多个亚基的酶复合体, 目前只发现约 180 kDa 的 METTL3/METTL14/WTAP 三聚体, 因此, 通过免疫共沉淀和同源搜索等方法找到并确定更多的 m<sup>6</sup>A 甲基转移酶和去甲基化酶, 可以更清晰地阐述 m<sup>6</sup>A 甲基化形成的选择性机制。另外, 还需要找到更多的 m<sup>6</sup>A 结合蛋白, 这些蛋白可以通过结合甲基化位点, 从而招募其他的重要分子, 如剪切因子等结合到 RNA 上进而发挥相应的功能。但是到目前为止, 已经确定能够结合 m<sup>6</sup>A 并行使功能的 m<sup>6</sup>A 结合蛋白只有 YTHDF2、YTHDF1 和 YTHDC1。因此, 该领域的研究是扩展 m<sup>6</sup>A 修饰功能的重要突破口。除了 m<sup>6</sup>A, 对于其他的修饰形式, 如 m<sup>5</sup>C, 其相应的甲基转移酶和去甲基化酶的发现对研究其机制和功能均起着重要的推进作用。

m<sup>6</sup>A 可能会影响细胞内的多项生命活动, 如 mRNA 转录、选择性剪切、出核转运、翻译、降解等过程, 但目前已被证实的只有 YTHDF2 介导的 mRNA 降解、YTHDF1 介导的 mRNA 翻译以及 YTHDC1 介导的选择性剪切, 其他的生物学功能亟待去揭示。而对于 m<sup>5</sup>C 修饰的功能, 目前也知之甚少。因此, 深入了解 m<sup>6</sup>A 和 m<sup>5</sup>C 修饰的功能是表观转录组研究的一项重要任务。

除 mRNA 外, m<sup>6</sup>A 和 m<sup>5</sup>C 在非编码 RNA 中也存在, 非编码 RNA 在加工成熟过程中也经历了选择性剪接、形成高级结构等复杂的过程。这些甲基化修饰在非编码 RNA 中很可能会同影响 mRNA 一样影响非编码 RNA 的选择性剪接。

除上述 m<sup>6</sup>A 和 m<sup>5</sup>C 外, RNA 还存在其他约 150 余种化学修饰, 这些修饰必定对 RNA 的功能起到了不容忽视的作用。随着技术手段的不断提高, 期待这些修饰在不久的将来能得到透彻地研究, 进而对生命活动现象的理解和疾病的诊治提供理论基础。

#### [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] Beemon K, Keith J. Localization of N<sup>6</sup>-methyladenosine in the Rous sarcoma virus genome. *J Mol Biol*, 1977, 113: 165-79
- [3] Krug RM, Morgan MA, Shatkin AJ. Influenza viral mRNA contains internal N<sup>6</sup>-methyladenosine and 5'-terminal 7-methylguanosine in cap structures. *J Virol*, 1976, 20: 45-53
- [4] Rottman FM, Desrosiers RC, Friderici K. Nucleotide methylation patterns in eukaryotic mRNA. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 1976, 19: 21-38
- [5] Schibler U, Kelley DE, Perry RP. Comparison of methylated sequences in messenger RNA and heterogeneous nuclear RNA from mouse L cells. *J Mol Biol*, 1977, 115: 695-714
- [6] Chen-Kiang S, Nevins JR, Darnell J. N<sup>6</sup>-methyladenosine in adenovirus type 2 nuclear RNA is conserved in the formation of messenger RNA. *J Mol Biol*, 1979, 135: 733-52
- [7] Wei CM, Moss B. Nucleotide sequences at the N<sup>6</sup>-methyladenosine sites of HeLa cell messenger ribonucleic acid. *Biochemistry*, 1977, 16: 1672-6
- [8] Schwartz S, Agarwala SD, Mumbach MR, et al. High-resolution mapping reveals a conserved, widespread, dynamic mRNA methylation program in yeast meiosis. *Cell*, 2013, 155: 1409-21
- [9] Wang X, Lu Z, Gomez A, et al. N<sup>6</sup>-methyladenosine-dependent regulation of messenger RNA stability. *Nature*, 2014, 505: 117-20
- [10] 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
- [11] Khoddami V, Cairns BR. Identification of direct targets and modified bases of RNA cytosine methyltransferases. *Nat Biotechnol*, 2013, 31: 458-64
- [12] 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: 255-61
- [13] Perry RP, Kelley DE, Friderici K, et al. The methylated constituents of L cell messenger RNA: evidence for an unusual cluster at the 5' terminus. *Cell*, 1975, 4: 387-94
- [14] Wei CM, Gershowitz A, Moss B. Methylated nucleotides block 5' terminus of HeLa cell messenger RNA. *Cell*, 1975, 4: 379-86
- [15] Dominissini D, Moshitch-Moshkovitz S, Schwartz S, et al. Topology of the human and mouse m<sup>6</sup>A RNA methylomes revealed by m<sup>6</sup>A-seq. *Nature*, 2012, 485: 201-6
- [16] 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
- [17] Golovina AY, Dzama MM, Petriukov KS, et al. Method for site-specific detection of m<sup>6</sup>A nucleoside presence in RNA based on high-resolution melting (HRM) analysis. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42: e27
- [18] Liu N, Parisien M, Dai Q, et al. Probing N<sup>6</sup>-methyladenosine RNA modification status at single nucleotide resolution in mRNA and long noncoding RNA. *RNA*,

- 2013, 19: 1848-56
- [19] Chen T, Hao YJ, Zhang Y, et al. m<sup>6</sup>A RNA methylation is regulated by microRNAs and promotes reprogramming to pluripotency. *Cell Stem Cell*, 2015, 16: 289-301
- [20] Wang Y, Li Y, Toth JI, et al. N<sup>6</sup>-methyladenosine modification destabilizes developmental regulators in embryonic stem cells. *Nat Cell Biol*, 2014, 16: 191-8
- [21] Fu Y, Dominissini D, Rechavi G, et al. Gene expression regulation mediated through reversible m<sup>6</sup>A RNA methylation. *Nat Rev Genet*, 2014, 15: 293-306
- [22] Lee M, Kim B, Kim VN. Emerging roles of RNA modification: m<sup>6</sup>A and U-tail. *Cell*, 2014, 158: 980-7
- [23] Liu J, Yue Y, Han D, et al. A METTL3-METTL14 complex mediates mammalian nuclear RNA N<sup>6</sup>-adenosine methylation. *Nat Chem Biol*, 2014, 10: 93-5
- [24] Ping XL, Sun BF, Wang L, et al. Mammalian WTAP is a regulatory subunit of the RNA N<sup>6</sup>-methyladenosine methyltransferase. *Cell Res*, 2014, 24: 177-89
- [25] Schwartz S, Mumbach MR, Jovanovic M, et al. Perturbation of m<sup>6</sup>A writers reveals two distinct classes of mRNA methylation at internal and 5' sites. *Cell Rep*, 2014, 8: 284-96
- [26] Jia G, Fu Y, Zhao X, et al. N<sup>6</sup>-methyladenosine in nuclear RNA is a major substrate of the obesity-associated FTO. *Nat Chem Biol*, 2011, 7: 885-7
- [27] Zheng GQ, Dahl JA, Niu YM, et al. ALKBH5 is a mammalian RNA demethylase that impacts RNA metabolism and mouse fertility. *Mol Cell*, 2013, 49: 18-29
- [28] Tuck MT. Partial purification of a 6-methyladenine mRNA methyltransferase which modifies internal adenine residues. *Biochem J*, 1992, 288: 233-40
- [29] Bokar JA, Rath-Shambaugh ME, Ludwiczak R, et al. Characterization and partial purification of mRNA N<sup>6</sup>-adenosine methyltransferase from HeLa cell nuclei. Internal mRNA methylation requires a multisubunit complex. *J Biol Chem*, 1994, 269: 17697-704
- [30] Bokar JA, Shambaugh ME, Polayes D, et al. Purification and cDNA cloning of the AdoMet-binding subunit of the human mRNA (N<sup>6</sup>-adenosine)-methyltransferase. *RNA*, 1997, 3: 1233-47
- [31] Bujnicki JM, 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: m<sup>6</sup>A methyltransferase. *J Mol Evol*, 2002, 55: 431-44
- [32] Clancy MJ, Shambaugh ME, Timpte CS, et al. Induction of sporulation in *Saccharomyces cerevisiae* leads to the formation of N<sup>6</sup>-methyladenosine in mRNA: a potential mechanism for the activity of the *IME4* gene. *Nucleic Acids Res*, 2002, 30: 4509-18
- [33] Hongay CF, Orr-Weaver TL. *Drosophila* inducer of MEiosis 4 (IME4) is required for Notch signaling during oogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108: 14855-60
- [34] 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
- [35] 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
- [36] Havugimana PC, Hart GT, Nepusz T, et al. A census of human soluble protein complexes. *Cell*, 2012, 150: 1068-81
- [37] Horiuchi K, Kawamura T, Iwanari H, et al. Identification of Wilms' tumor 1-associating protein complex and its role in alternative splicing and the cell cycle. *J Biol Chem*, 2013, 288: 33292-302
- [38] Little NA, Hastie ND, Davies RC. Identification of WTAP, a novel Wilms' tumour 1-associating protein. *Hum Mol Genet*, 2000, 9: 2231-9
- [39] Granadino B, Campuzano S, Sanchez L. The *Drosophila melanogaster fl(2)d* gene is needed for the female-specific splicing of Sex-lethal RNA. *EMBO J*, 1990, 9: 2597-602
- [40] Ortega A, Niksic M, Bachi A, et al. Biochemical function of female-lethal (2)D/Wilms' tumor suppressor-1-associated proteins in alternative pre-mRNA splicing. *J Biol Chem*, 2003, 278: 3040-7
- [41] Yang Y, Sun BF, Xiao W, et al. Dynamic m<sup>6</sup>A modification and its emerging regulatory role in mRNA splicing. *Sci Bull*, 2014, 60: 21-2
- [42] Peters T, Ausmeier K, Ruther U. Cloning of Fatso (*Fto*), a novel gene deleted by the Fused toes (*Fi*) mouse mutation. *Mamm Genome*, 1999, 10: 983-6
- [43] Falnes PO, Bjoras M, Aas PA, et al. Substrate specificities of bacterial and human AlkB proteins. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32: 3456-61
- [44] Ougland R, Zhang CM, Liiv A, et al. AlkB restores the biological function of mRNA and tRNA inactivated by chemical methylation. *Mol Cell*, 2004, 16: 107-16
- [45] Gerken T, Girard CA, Tung YC, et al. The obesity-associated *FTO* gene encodes a 2-oxoglutarate-dependent nucleic acid demethylase. *Science*, 2007, 318: 1469-72
- [46] Hess ME, Hess S, Meyer KD, et al. The fat mass and obesity associated gene (*Fto*) regulates activity of the dopaminergic midbrain circuitry. *Nat Neurosci*, 2013, 16: 1042-8
- [47] Fu Y, Jia G, Pang X, et al. FTO-mediated formation of N<sup>6</sup>-hydroxymethyladenosine and N<sup>6</sup>-formyladenosine in mammalian RNA. *Nat Commun*, 2013, 4: 1798
- [48] Jia G, Yang CG, Yang S, et al. Oxidative demethylation of 3-methylthymine and 3-methyluracil in single-stranded DNA and RNA by mouse and human FTO. *FEBS Lett*, 2008, 582: 3313-9
- [49] Zhao X, Yang Y, Sun BF, et al. FTO-dependent demethylation of N<sup>6</sup>-methyladenosine regulates mRNA splicing and is required for adipogenesis. *Cell Res*, 2014, 24: 1403-19
- [50] Huang Y, Yan J, Li Q, et al. Meclofenamic acid selectively inhibits FTO demethylation of m<sup>6</sup>A over ALKBH5. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43: 373-84
- [51] Kurowski MA, Bhagwat AS, Papaj G, et al. Phylogenomic identification of five new human homologs of the DNA repair enzyme AlkB. *BMC Genomics*, 2003, 4: 48

- [52] Xu C, Liu K, Tempel W, et al. Structures of human ALKBH5 demethylase reveal a unique binding mode for specific single-stranded N<sup>6</sup>-methyladenosine RNA demethylation. *J Biol Chem*, 2014, 289: 17299-311
- [53] Zheng G, Dahl JA, Niu Y, et al. Sprouts of RNA epigenetics: the discovery of mammalian RNA demethylases. *RNA Biol*, 2013, 10: 915-8
- [54] Roost C, Lynch SR, Batista PJ, et al. Structure and thermodynamics of N-methyladenosine in RNA: a spring-loaded base modification. *J Am Chem Soc*, 2015, 137: 2107-15
- [55] Luo S, Tong L. Molecular basis for the recognition of methylated adenines in RNA by the eukaryotic YTH domain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111: 13834-9
- [56] Theler D, Dominguez C, Blatter M, et al. Solution structure of the YTH domain in complex with N<sup>6</sup>-methyladenosine RNA: a reader of methylated RNA. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42: 13911-9
- [57] Wang X, Zhao BS, Roundtree IA, et al. N<sup>6</sup>-methyladenosine modulates messenger RNA translation efficiency. *Cell*, 2015, 161: 1388-99
- [58] Xu C, Wang X, Liu K, et al. Structural basis for selective binding of m<sup>6</sup>A RNA by the YTHDC1 YTH domain. *Nat Chem Biol*, 2014, 10: 927-9
- [59] Xiao W, Adhikari S, Dahal U, et al. Nuclear m<sup>6</sup>A reader YTHDC1 regulates mRNA splicing. *Mol Cell*, 2016, 61: 507-19
- [60] Sheth U, Parker R. Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies. *Science*, 2003, 300: 805-8
- [61] Nayler O, Hartmann AM, Stamm S. The ER repeat protein YT521-B localizes to a novel subnuclear compartment. *J Cell Biol*, 2000, 150: 949-62
- [62] Niu Y, Zhao X, Wu YS, et al. N<sup>6</sup>-methyl-adenosine (m<sup>6</sup>A) in RNA: an old modification with a novel epigenetic function. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 2013, 11: 8-17
- [63] Hastings MH. m<sup>6</sup>A mRNA methylation: a new circadian pacesetter. *Cell*, 2013, 155: 740-1
- [64] 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
- [65] Bansal H, Yihua Q, Iyer SP, et al. WTAP is a novel oncogenic protein in acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 2014, 28: 1171-4
- [66] Nguyen TT, Ma LN, Slovak ML, et al. Identification of novel *Runx1* (*AML1*) translocation partner genes *SH3D19*, *YTHDF2*, and *ZNF687* in acute myeloid leukemia. *Gene Chromosome Cancer*, 2006, 45: 918-32
- [67] Batista PJ, Molinie B, Wang J, et al. m<sup>6</sup>A RNA modification controls cell fate transition in mammalian embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*, 2014, 15: 707-19
- [68] Lin SB, Gregory RI. Methyltransferases modulate RNA stability in embryonic stem cells. *Nat Cell Biol*, 2014, 16: 129-31
- [69] Vespa L, Vachon G, Berger F, et al. The immunophilin-interacting protein AtFIP37 from *Arabidopsis* is essential for plant development and is involved in trichome endoreduplication. *Plant Physiol*, 2004, 134: 1283-92
- [70] Liu N, Dai Q, Zheng G, et al. N<sup>6</sup>-methyladenosine-dependent RNA structural switches regulate RNA-protein interactions. *Nature*, 2015, 518: 560-4
- [71] Berulava T, Rahmann S, Rademacher K, et al. N<sup>6</sup>-adenosine methylation in miRNAs. *PLoS One*, 2015, 10: e0118438
- [72] Motorin Y, Lyko F, Helm M. 5-methylcytosine in RNA: detection, enzymatic formation and biological functions. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38: 1415-30
- [73] Hussain S, Aleksic J, Blanco S, et al. Characterizing 5-methylcytosine in the mammalian epitranscriptome. *Genome Biol*, 2013, 14: 215
- [74] Edelheit S, Schwartz S, Mumbach MR, et al. Transcriptome-wide mapping of 5-methylcytidine RNA modifications in bacteria, archaea, and yeast reveals m<sup>5</sup>C within archaeal mRNAs. *PLoS Genet*, 2013, 9: e1003602
- [75] Agris PF. Bringing order to translation: the contributions of transfer RNA anticodon-domain modifications. *EMBO Rep*, 2008, 9: 629-35
- [76] Squires JE, Preiss T. Function and detection of 5-methylcytosine in eukaryotic RNA. *Epigenomics*, 2010, 2: 709-15
- [77] Anderson JT, Wang X. Nuclear RNA surveillance: no sign of substrates tailing off. *Crit Rev Biochem Mol*, 2009, 44: 16-24
- [78] Helm M. Post-transcriptional nucleotide modification and alternative folding of RNA. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34: 721-33
- [79] Schaefer M, Pollex T, Hanna K, et al. RNA methylation by Dnmt2 protects transfer RNAs against stress-induced cleavage. *Gene Dev*, 2010, 24: 1590-5
- [80] Motorin Y, Helm M. tRNA stabilization by modified nucleotides. *Biochemistry*, 2010, 49: 4934-44
- [81] Chow CS, Lamichhane TN, Mahto SK. Expanding the nucleotide repertoire of the ribosome with post-transcriptional modifications. *ACS Chem Biol*, 2007, 2: 610-9
- [82] Bujnicki JM, Feder M, Ayres CL, et al. Sequence-structure-function studies of tRNA:m<sup>5</sup>C methyltransferase Trm4p and its relationship to DNA:m<sup>5</sup>C and RNA:m<sup>5</sup>U methyltransferases. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32: 2453-63
- [83] Liu J, Jia G. Methylation modifications in eukaryotic messenger RNA. *J Genet Genomics*, 2014, 41: 21-33
- [84] Frye M, Watt FM. The RNA methyltransferase Misu (NSun2) mediates Myc-induced proliferation and is upregulated in tumors. *Curr Biol*, 2006, 16: 971-81
- [85] Brzezicha B, Schmidt M, Makalowska I, et al. Identification of human tRNA:m<sup>5</sup>C methyltransferase catalysing intron-dependent m<sup>5</sup>C formation in the first position of the anticodon of the pre-tRNA Leu (CAA). *Nucleic Acids Res*, 2006, 34: 6034-43
- [86] Chi L, Delgado-Olguin P. Expression of NOL1/NOP2/sun domain (Nsun) RNA methyltransferase family genes in early mouse embryogenesis. *Gene Expr Patterns*, 2013, 13: 319-27

- [87] Castello A, Fischer B, Eichelbaum K, et al. Insights into RNA biology from an atlas of mammalian mRNA-binding proteins. *Cell*, 2012, 149: 1393-406
- [88] Blanco S, Kurowski A, Nichols J, et al. The RNA-methyltransferase Misu (NSun2) poises epidermal stem cells to differentiate. *PLoS Genet*, 2011, 7: e1002403
- [89] Goll MG, Kirpekar F, Maggert KA, et al. Methylation of tRNA<sup>Asp</sup> by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2. *Science*, 2006, 311: 395-8
- [90] Abbasi-Moheb L, Mertel S, Gonsior M, et al. Mutations in NSUN2 cause autosomal-recessive intellectual disability. *Am J Hum Genet*, 2012, 90: 847-55
- [91] Tuorto F, Liebers R, Musch T, et al. RNA cytosine methylation by Dnmt2 and NSun2 promotes tRNA stability and protein synthesis. *Nat Struct Mol Biol*, 2012, 19: 900-5
- [92] Gustafson WC, Taylor CW, Valdez BC, et al. Nucleolar protein p120 contains an arginine-rich domain that binds to ribosomal RNA. *Biochem J*, 1998, 331: 387-93
- [93] Metodiev MD, Spahr 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: e1004110
- [94] 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: 9062-76
- [95] 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 methyltransferases. *Biol Reprod*, 2007, 77: 376-82
- [96] Fu L, Guerrero CR, Zhong N, et al. Tet-mediated formation of 5-hydroxymethylcytosine in RNA. *J Am Chem Soc*, 2014, 136: 11582-5
- [97] Zhang X, Liu Z, Yi J, et al. The tRNA methyltransferase NSun2 stabilizes p16INK4 mRNA by methylating the 3'-untranslated region of p16. *Nat Commun*, 2012, 3:712
- [98] Hiriart E, Vavasseur A, Touat-Todeschini L, et al. Mmi1 RNA surveillance machinery directs RNAi complex RITS to specific meiotic genes in fission yeast. *EMBO J*, 2012, 31: 2296-308
- [99] Khan MA, Rafiq MA, Noor A, et al. Mutation in NSUN2, which encodes an RNA methyltransferase, causes autosomal-recessive intellectual disability. *Am J Hum Genet*, 2012, 90: 856-63
- [100] Martinez FJ, Lee JH, Lee JE, et al. Whole exome sequencing identifies a splicing mutation in NSUN2 as a cause of a Dubowitz-like syndrome. *J Med Genet*, 2012, 49: 380-5
- [101] Fahiminiya S, Almuriekh M, Nawaz Z, et al. Whole exome sequencing unravels disease-causing genes in consanguineous families in Qatar. *Clin Genet*, 2014, 86: 134-41
- [102] Hussain S, Benavente SB, Nascimento E, et al. The nucleolar RNA methyltransferase Misu (NSun2) is required for mitotic spindle stability. *J Cell Biol*, 2009, 186: 27-40
- [103] Sakita-Suto S, Kanda A, Suzuki F, et al. Aurora-B regulates RNA methyltransferase NSUN2. *Mol Biol Cell*, 2007, 18: 1107-17
- [104] Alexandrov A, Chernyakov I, Gu W, et al. Rapid tRNA decay can result from lack of nonessential modifications. *Mol Cell*, 2006, 21: 87-96
- [105] Chernyakov I, Whipple JM, Kotelawala L, et al. Degradation of several hypomodified mature tRNA species in *Saccharomyces cerevisiae* is mediated by Met22 and the 5'-3' exonucleases Rat1 and Xrn1. *Gene Dev*, 2008, 22: 1369-80
- [106] Schaefer M, Lyko F. Solving the Dnmt2 enigma. *Chromosoma*, 2010, 119: 35-40
- [107] Basti MM, Stuart JW, Lam AT, et al. Design, biological activity and NMR-solution structure of a DNA analogue of yeast tRNA(Phe) anticodon domain. *Nat Struct Biol*, 1996, 3: 38-44
- [108] Chan CT, Pang YL, Deng W, et al. Reprogramming of tRNA modifications controls the oxidative stress response by codon-biased translation of proteins. *Nat Commun*, 2012, 3: 937
- [109] Rai K, Chidester S, Zavala CV, et al. Dnmt2 functions in the cytoplasm to promote liver, brain, and retina development in zebrafish. *Gene Dev*, 2007, 21: 261-6
- [110] 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: 1561-70