

DOI: 10.13376/j.cblls/2018049

文章编号: 1004-0374(2018)04-0407-07



孙宝发, 中国科学院北京基因组研究所副研究员、中国科学院青年创新促进会会员(2016年)。2006年本科毕业于湖南科技大学, 2013年博士毕业于中国科学院动物研究所, 2013—2016年在中国科学院北京基因组研究所做助理研究员, 2016年至今在中国科学院北京基因组研究所任副研究员。研究领域为表观转录组学功能调控规律及其与遗传性状表型和疾病关联机制。近年来发现了RNA 6-甲基腺嘌呤( $m^6A$ )修饰酶新复合物, 揭示了 $m^6A$ 修饰调控mRNA翻译、剪切的分子机理, 建立了多种类型RNA甲基化的生物信息学分析流程, 拓展了RNA甲基化表观转录组学研究领域分析方法。在*Nature*、*Mol Cell*、*Cell Res*等杂志发表30余篇学术论文。

## RNA修饰分布特征概述

韩 潇, 孙宝发\*

(中国科学院北京基因组研究所精准基因组医学重点实验室, 北京 100101)

**摘要:** RNA修饰研究是表观遗传研究领域的新热点之一, 近年来多种RNA修饰陆续被研究者发现, 如6-甲基腺嘌呤( $m^6A$ )、5-甲基胞嘧啶( $m^5C$ )、假尿嘧啶( $\psi$ )等, 通过高通量测序结合生物信息学分析揭示了这些RNA修饰的分布特征。不同的RNA修饰在转录本上具有其特异的分布特征, 并与所发挥的RNA加工和代谢功能密切相关。随着RNA修饰检测和测序技术的发展以及单细胞、单碱基分辨率等新兴技术的兴起, RNA修饰的分布特征及规律将会得到更精确、更深入的解析。该文主要介绍目前研究比较深入的几种RNA修饰在转录本上的分布特征, 并对目前该方向面临的主要机遇与挑战进行讨论。

**关键词:** RNA修饰; 分布特征; 转录后调控; 6-甲基腺嘌呤; 5-甲基胞嘧啶

**中图分类号:** Q311; Q71      **文献标志码:** A

## Distribution features of RNA modifications

HAN Xiao, SUN Bao-Fa\*

(Key Laboratory of Genomic and Precision Medicine, Beijing Institute of Genomics,  
Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

**Abstract:** RNA modifications have become as one of the hotspots in epigenetics.  $N^6$ -methyladenosine ( $m^6A$ ), 5-methylcytosine ( $m^5C$ ), pseudouridylation ( $\psi$ ) and many other types of modifications have been identified in recent years. They displayed distinct distribution features and these features are closely associated with their RNA post-transcriptional processing. Development of traditional detecting techniques, single-cell, single base resolution sequencing and other novel emerging technologies opens the possibility of more precise and deeper analysis for RNA modifications. Here, we mainly introduce the distribution features of RNA modifications and discuss its future challenges and perspectives.

收稿日期: 2017-11-22

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31670824); 中国科学院青年创新促进会项目(2016097)

\*通信作者: E-mail: sunbf@big.ac.cn

**Keywords:** RNA modification; distribution features; post-transcriptional regulation;  $N^6$ -methyladenosine; 5-methylcytosine

## 1 概述

目前已知的几种 RNA 修饰均具有特异性的分布特征, 其在转录本的 5' 非编码区 (untranslated region, UTR) 到 3' 非编码区的不同区域具有各自的偏好性, 并与其行使的生物学功能密切相关 (图 1)。为了研究 RNA 链上各种化学修饰的位置及分布特征, 各种新兴的测序技术应运而生 (如  $m^6A$ -LAIC-seq、miCLIP、CeU-seq 等)。这些高通量检测技术的发展使得 6-甲基腺嘌呤 ( $N^6$ -methyladenosine,  $m^6A$ )、5-甲基胞嘧啶 (5-methylcytosine,  $m^5C$ )、假尿嘧啶 (pseudouridylated,  $\psi$ )、1-甲基腺嘌呤 ( $N^1$ -methyladenosine,  $m^1A$ ) 等几种 RNA 修饰的分布特征及规律得到了深入的解析。

## 2 典型RNA修饰的分布特征

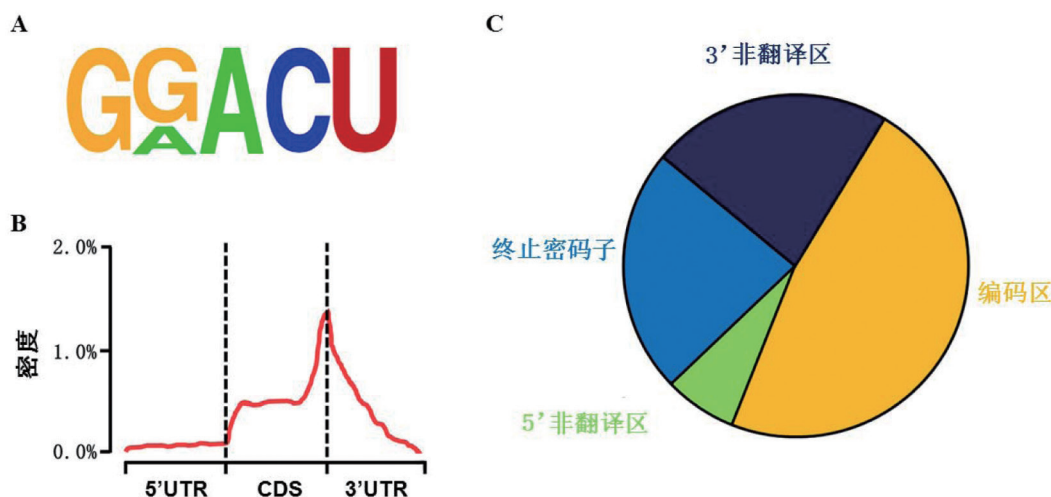
### 2.1 $m^6A$

$m^6A$  是 mRNA 中除了 5' $m^7G$  帽子结构外, 含

量最高的甲基化修饰。2012 年, 通过  $m^6A$  抗体富集结合高通量测序的 MeRIP-seq (methylated RNA immunoprecipitation sequencing) 技术, 人类和小鼠整个转录组中的  $m^6A$  修饰图谱首次被揭示, 这是  $m^6A$  修饰研究的一个重要里程碑<sup>[1-2]</sup>。 $m^6A$  修饰在 mRNA 上的分布具有序列特异性, 倾向于发生在保守基序 (motif) RRACH (R = G, A; H = A, C 或 U) 中 (图 2A)。其在 mRNA 上的分布具有一定偏好性, 主要分布在编码区 (coding sequence, CDS) 和 3' 非编码区 (3'UTR), 特别是在终止密码子附近显著富集 (图 2B-C)<sup>[1-3]</sup>。 $m^6A$  在剪接位点附近的外显子区域也存在高度富集, 并与剪切因子 SRSF1 和 SRSF2 的 RNA 结合位点具有显著的空间重叠, 进一步的实验研究揭示了  $m^6A$  修饰的外显子在剪接过程中倾向于被保留<sup>[4]</sup>; 2016 年, Xiao 等<sup>[5]</sup> 研究阐明了  $m^6A$  修饰的外显子在剪接过程中被保留的分子机理:  $m^6A$  结合蛋白 YTHDC1 通过促进 SRSF3 并



图1 真核生物mRNA中常见化学修饰分布



A:  $m^6A$ 保守基序; B:  $m^6A$ 修饰峰在转录本各个位置分布百分比; C:  $m^6A$ 修饰峰在转录本各区域的分布

图2 mRNA  $m^6A$ 分布特征模式图

抑制 SRSF10 与 m<sup>6</sup>A 修饰的外显子结合从而促进其保留。m<sup>6</sup>A 在转录本的最后一个外显子中也呈现富集趋势,这可能与调控 mRNA 的选择性多聚腺苷酸化 (alternative polyadenylation, APA) 有关<sup>[6]</sup>。对于 m<sup>6</sup>A 修饰水平和基因表达之间的关系,研究表明两者并非简单的正负相关的线性关系。中度表达的 mRNA 更倾向于被 m<sup>6</sup>A 修饰,而高表达和低表达的 mRNA 中包含 m<sup>6</sup>A 修饰峰的比例则较少<sup>[1]</sup>。

除了人类和小鼠,拟南芥和水稻等植物的 m<sup>6</sup>A 分布特征及规律近年也得到了揭示<sup>[7-8]</sup>。在拟南芥中, m<sup>6</sup>A 富集在起始密码子、终止密码子附近和 3'UTR 区域,并含有保守基序 RRACH。对于不同生境选取的两种拟南芥,甲基化图谱显示这两种拟南芥的甲基化位点高度一致<sup>[7]</sup>。在水稻中,通过 m<sup>6</sup>A-seq 技术对水稻愈伤组织与叶片组织全转录组 m<sup>6</sup>A 的深度测序,阐明了水稻 m<sup>6</sup>A 修饰谱的基本特征。平均每个 mRNA 含有 2~3 个 m<sup>6</sup>A 修饰峰,并主要分布在起始密码子、序列编码区和 3'UTR 区域<sup>[8]</sup>。

在酵母中,研究者通过对减数分裂期的酵母进行研究,在 1 183 个转录产物中鉴定到 1 308 个 m<sup>6</sup>A 修饰峰。这些 m<sup>6</sup>A 修饰峰倾向于分布在转录本的 3' 端,并含有保守基序 RGAC;同时在两种酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae* 和 *S. mikatae*) 中是保守存在的。含有 m<sup>6</sup>A 修饰的转录本功能与减数分裂密切相关。此外,含有 m<sup>6</sup>A 修饰的基因还参与了其他一系列广泛的生物学功能,如信号、维持、代谢等<sup>[9]</sup>。

除了 mRNA 之外,在多种非编码 RNA (noncoding RNA, ncRNA), 如 tRNA、rRNA、snRNA、snoRNA 及 lncRNA 上也存在着 m<sup>6</sup>A 的修饰。m<sup>6</sup>A 对这些非编码 RNA 结构以及功能的发挥有着非常重要的意义。m<sup>6</sup>A 在初级 miRNA (pri-miRNA) 中显著富集,并可以通过结合蛋白 HNRNPA2B1 的结合,进而招募 DGCR8 促进 miRNA 的加工成熟<sup>[10-11]</sup>。同时,研究发现,在 XIST、MALAT1 等长链非编码 RNA 上也存在 m<sup>6</sup>A 修饰,并确定 MALAT1 上的 m<sup>6</sup>A 修饰可以影响其茎环结构的形成<sup>[12]</sup>,而 XIST 上的 m<sup>6</sup>A 可通过招募结合蛋白 YTHDC-1 促进 X 染色体基因的转录抑制<sup>[13]</sup>。

## 2.2 m<sup>6</sup>A<sub>m</sub>

N<sup>6</sup>,2'-O-二甲基腺嘌呤 (m<sup>6</sup>A<sub>m</sub>) 存在于 mRNA 帽子结构相邻碱基上,其含量远低于 mRNA 上的 m<sup>6</sup>A。2015 年,通过单碱基精度的 miCLIP-seq (m<sup>6</sup>A individual-nucleotide-resolution cross-linking and

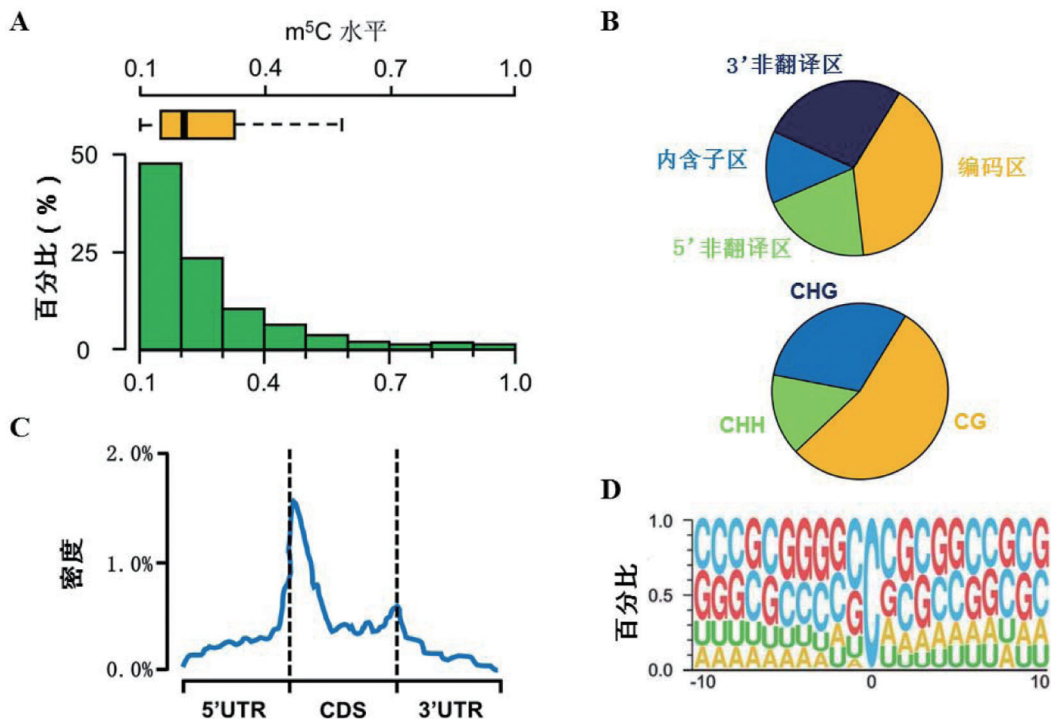
immunoprecipitation sequencing) 测序技术,发现其在转录起始位点下游存在富集<sup>[14]</sup>。5'UTR 上的 797 个 m<sup>6</sup>A<sub>m</sub> 修饰位点,其保守基序主要存在两大类,一类与 m<sup>6</sup>A 经典基序 RRACH 一致,另一类则表现为 BCA (B: 非腺嘌呤),这两类修饰位点的数目比例约为 1:3。经过鉴定发现,BCA 特征的修饰位点为 m<sup>6</sup>A<sub>m</sub>,继而绘制了 mRNA 上 m<sup>6</sup>A<sub>m</sub> 修饰的分布图谱。2016 年,研究人员发现,除 m<sup>6</sup>A 外, m<sup>6</sup>A<sub>m</sub> 修饰也可被 FTO 去甲基化。FTO 通过动态调控转录起始位点处的 m<sup>6</sup>A<sub>m</sub> 甲基化状态,抑制 DCP2 介导的脱帽过程,使得含有 m<sup>6</sup>A<sub>m</sub> 修饰的 mRNA 具有更长的半衰期,表明 m<sup>6</sup>A<sub>m</sub> 调控 mRNA 的稳定性<sup>[15]</sup>。

## 2.3 m<sup>5</sup>C

由于 m<sup>5</sup>C 修饰的水平 and 丰度较低,早期在 RNA 分子中检测到的 m<sup>5</sup>C 位点非常有限,研究主要集中在 tRNA 和 rRNA 上。在很多古细菌以及真核生物的 tRNA 中都已经证实了 m<sup>5</sup>C 修饰的存在<sup>[16]</sup>。这些 m<sup>5</sup>C 位点主要富集在可变臂和反密码环,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>[17-20]</sup>。在 rRNA 中, m<sup>5</sup>C 修饰主要存在于 rRNA 结合 tRNA 发挥翻译活性的区域,与核糖体的合成和蛋白质翻译过程有关<sup>[21]</sup>。近年来,随着测序技术的发展,全转录组水平上的 m<sup>5</sup>C 位点,尤其对于 mRNA 中的 m<sup>5</sup>C 鉴定得到了突破。

2012 年,通过亚硫酸盐处理结合高通量测序技术,研究者在 HeLa 细胞中检测到 10 581 个 m<sup>5</sup>C 位点。其中,8 495 个 m<sup>5</sup>C 位点存在于 mRNA 上,225 个位点存在于 tRNA 上,1 780 个位点分布在其他类型的非编码 RNA 中<sup>[22]</sup>。不同于 m<sup>6</sup>A, m<sup>5</sup>C 位点的分布并未检测到保守基序,但其侧翼碱基序列存在着一定的 CG 偏好。此外,这些 m<sup>5</sup>C 位点在 miRNA 复合物组分 AGO 蛋白结合位点附近有显著富集,暗示了 m<sup>5</sup>C 可能与 miRNA 调控的 mRNA 稳定性有关。2013 年,研究者通过 Aza-IP (5-azacytidine-mediated RNA immunoprecipitation) 和 miCLIP 技术在人类 HeLa 细胞和 HEK293 分别检测到 617 和 1 084 个 NSUN2 特异修饰的 m<sup>5</sup>C 位点<sup>[23-24]</sup>。

2017 年,通过改进的基于 ACT 三碱基随机引物的 RNA m<sup>5</sup>C 单碱基分辨率高通量测序技术与生物信息分析相结合, mRNA m<sup>5</sup>C 的分布规律得到了系统全面的揭示。在 HeLa 细胞系中, mRNA 中的 m<sup>5</sup>C 修饰水平中值为 20.5% (图 3A),并在 mRNA 的翻译起始位点下游存在显著富集 (图 3B),其主要分布于 CG 富集区域 (图 3C-D)。通过分析对比



A: m<sup>5</sup>C 修饰水平分布百分比; B: m<sup>5</sup>C 位点在转录本各区域的分布; C: m<sup>5</sup>C 位点在转录本各个位置的分布百分比; D: m<sup>5</sup>C 位点上下游 10 nt 碱基组成

图3 mRNA m<sup>5</sup>C 分布特征模式图

人和小鼠不同组织, 研究发现, m<sup>5</sup>C 在 mRNA 上的分布特征在哺乳动物中十分保守, 而在不同组织中修饰的基因具有特异性。在小鼠睾丸发育过程中, 动态的 m<sup>5</sup>C 修饰基因显著富集于精子发育相关基因, 提示 m<sup>5</sup>C 修饰参与生殖发育调控。进一步的实验研究发现了 mRNA m<sup>5</sup>C 的主要甲基转移酶 NSUN2 及第一个结合蛋白 ALYREF, 并揭示了 m<sup>5</sup>C 调控 mRNA 出核的重要功能<sup>[25]</sup>。2017 年, 小鼠 ES 细胞以及脑组织中 m<sup>5</sup>C 的相关研究也发现了 m<sup>5</sup>C 在翻译起始位点显著富集的特征<sup>[26]</sup>。在另一项研究中, 小鼠 ES 细胞 tRNA 的 m<sup>5</sup>C 甲基化图谱也得到了绘制, 并在 28S rRNA 上发现了 2 个进化保守的新标记<sup>[27]</sup>。

在拟南芥中, 通过亚硫酸盐测序, 分别在角果、嫩枝和根三个组织中检测到了 128、201、859 个 m<sup>5</sup>C 位点, 但不同于动物, 拟南芥中 m<sup>5</sup>C 位点分布并没有呈现在翻译起始位点富集的特征<sup>[28]</sup>。另一项基于 m<sup>5</sup>C-RIP-seq 的研究发现, 拟南芥中 m<sup>5</sup>C 修饰在各种 RNA 中均存在且在 mRNA 上占较高比例; 在 mRNA 中, m<sup>5</sup>C 主要存在于 CDS (92%), 并主要富集在两类基序 HACCR (50%) 和 CTYCTYC 中<sup>[29]</sup>。m<sup>5</sup>C 在拟南芥的各组织中普遍存在, 角果中占比例

更高; 同时, 随着拟南芥发育的进行, m<sup>5</sup>C 修饰比例逐渐增加<sup>[29]</sup>。

在古生菌中, 利用 m<sup>5</sup>C 抗体免疫沉淀结合重亚硫酸盐处理测序共鉴定到 mRNA 上的 14 个 m<sup>5</sup>C 修饰位点。其保守序列为 AU (m<sup>5</sup>C) GANGU, 和古生菌的 rRNA 上的保守序列一致, 说明在古生菌中 mRNA 和 rRNA 上的 m<sup>5</sup>C 修饰可能通过同一种甲基转移酶催化形成<sup>[16]</sup>。

除了 tRNA、rRNA 和 mRNA 外, m<sup>5</sup>C 位点也分布在 lncRNA 中, 如穹窿体 RNA (Vault RNA)<sup>[24]</sup>、scaRNA2<sup>[23]</sup>、HOTAIR 和 XIST<sup>[30]</sup> 等。在穹窿体 RNA 上的 NSUN2 催化的 m<sup>5</sup>C 修饰会调控它加工成特异的类似于 miRNA 的小 RNA。在 HOTAIR 和 XIST 中的 m<sup>5</sup>C 修饰主要存在于它们行使功能的区域, 这些修饰可以影响到其功能的发挥, 如 XIST 的 m<sup>5</sup>C 位点会抑制 PRC2 的结合。

## 2.4 m<sup>1</sup>A

早期, m<sup>1</sup>A 的研究主要集中在 tRNA 和 rRNA 上, 研究表明, 它影响 tRNA 和 rRNA 的结构和功能<sup>[31-32]</sup>。随着检测技术的发展, 2016 年, mRNA 上的 m<sup>1</sup>A 谱首次得到了揭示。在 HeLa 细胞中共检测到 7 154 个 m<sup>1</sup>A 修饰峰, 这些修饰峰存在于

4 151 个编码基因和 63 个非编码基因上。平均每个修饰的转录本含有 1.4 个 m<sup>1</sup>A 峰,且多数基因 (70%) 只含有一个 m<sup>1</sup>A 修饰峰<sup>[33]</sup>。研究者进一步揭示了 m<sup>1</sup>A 主要分布于序列编码区第一个外显子上。不同于 m<sup>6</sup>A, m<sup>1</sup>A 修饰序列并没有明显的保守基序,修饰位点周围富集 GC 碱基,最小自由能较低。含有 m<sup>1</sup>A 修饰的 mRNA 在 5'UTR 区域更倾向于形成二级结构,且翻译效率更高。这些修饰特征在小鼠和人类中高度保守。此外,小鼠不同组织的 m<sup>1</sup>A 含量存在差异,肾和脑的含量相对较高。m<sup>1</sup>A 可以对生理条件做出动态响应,并能促进甲基化的 mRNA 翻译。2016 年,另一项研究证实, m<sup>1</sup>A 普遍存在于人类 mRNA, m<sup>1</sup>A/A 比例约为 0.02%。基于 m<sup>1</sup>A 免疫沉淀法及 m<sup>1</sup>A 具有阻止逆转录的能力,研究者开发了一种 m<sup>1</sup>A-ID-seq 技术来进行全转录组 m<sup>1</sup>A 分析<sup>[34]</sup>。m<sup>1</sup>A-ID-seq 技术成功实现了人细胞系全转录组水平的高分辨率 m<sup>1</sup>A 检测,鉴定出 901 个含有 m<sup>1</sup>A 修饰的转录本,并发现 m<sup>1</sup>A 富集于 mRNA 转录本的 5'UTR 区。

2017 年,基于 m<sup>1</sup>A 反转录过程中会产生错配的特性,研究者开发了单碱基分辨率的 m<sup>1</sup>A-MAP 技术。基于该技术,在人 293T 细胞系中鉴定到了 740 个 m<sup>1</sup>A 位点,其中的 473 个位点位于 mRNA 和 lncRNA 中,且多数修饰位点富集在 5'UTR。位于 5'UTR 区第一及第二位上的 m<sup>1</sup>A 对翻译起促进作用;但编码区的 m<sup>1</sup>A 却起相反的抑制作用。甲基化酶复合物 TRMT6/61A 可以介导修饰一小部分基序为“GUUCRA”的 m<sup>1</sup>A 位点。此外,研究发现,线粒体编码的转录本上也含有大量 m<sup>1</sup>A 修饰。这项研究首次高精度地绘制了人胚胎肾细胞核及线粒体转录本上不同类型的 m<sup>1</sup>A 修饰分布图谱,为进一步探究 m<sup>1</sup>A 功能提供了有力工具<sup>[35]</sup>。另一项研究通过改进的 m<sup>1</sup>A-seq 技术绘制了细胞核及线粒体转录本的单碱基分辨率图谱。研究发现,胞内 mRNA 上的 m<sup>1</sup>A 修饰水平较低,并且鉴定到线粒体 ND5 转录本上的一个 m<sup>1</sup>A 位点可以被 TRMT10C 催化,这个位点具有高度的组织特异性。进一步研究证明, m<sup>1</sup>A 可能通过核糖体扫描及翻译机制抑制翻译的进行<sup>[36]</sup>。

## 2.5 $\psi$

假尿嘧啶化是指尿嘧啶 (U) 的化学结构发生改变形成假尿嘧啶 ( $\psi$ ),它是最丰富的 RNA 修饰之一,并且在物种间高度保守。假尿嘧啶化普遍存在于 tRNA、rRNA 和 snRNA 中,对于剪接体 snRNA 和

rRNA 的生物合成和正常功能非常重要。但由于缺乏有效的方法,长久以来,  $\psi$  在 mRNA 中的存在情况以及潜在功能并未得到深入开展。

近年来,通过新测序技术的开发,研究者绘制了  $\psi$  的全转录组图谱<sup>[37-38]</sup>。研究表明,  $\psi$  普遍存在于 mRNAs 和各种 ncRNAs 中,同时受到环境信号的动态调控。2014 年,基于 Pseudo-seq 全基因组、单碱基分辨率方法,研究者对酿酒酵母和人中 mRNA 和 ncRNA 分子的  $\psi$  位点进行了鉴定。在酵母的 238 个蛋白质编码转录物中共鉴定到大约 260 个  $\psi$  位点,在人的 89 个 mRNAs 中鉴定出了 96 个  $\psi$  位点。进一步发现, mRNA 和 ncRNA 中有一组  $\psi$  位点显示差异性修饰,揭示了一种响应环境信号的假尿嘧啶化反应<sup>[37]</sup>。另一项研究开发了高通量测序技术  $\psi$ -seq,绘制了广泛的、高分辨率  $\psi$  位点图谱。研究报道了酵母 mRNA 和 ncRNA 中的 328 个独特的  $\psi$  位点。通过遗传干扰实验证实,其中 108 个位点与结合蛋白 PUS 和 (或) snoRNA 有关联。进一步研究证实,在酵母中,热休克情况下 mRNA 和 ncRNA 中的  $\psi$  显著减少,表明了热休克刺激下与假尿嘧啶合酶 Pus7p 再定位相关的一种机制。通过对先天性角化不良患者样本进行  $\psi$ -seq,发现患者细胞中的 rRNAs 和端粒酶 RNA 组分 (TERC) 上一个高度保守位点  $\psi$  水平显著下降;TERC 中的  $\psi$  位点有可能对于 TERC 的稳定极为重要<sup>[38]</sup>。2015 年,研究者开发了 N<sub>3</sub>-CMC 富集假尿嘧啶测序 (CeU-Seq) 技术,鉴别出了 1 929 个人类转录本中的 2 084 个  $\psi$  位点;同时,研究发现在小鼠转录组中存在着保守的、组织特异性的 mRNA 假尿嘧啶化。进一步研究鉴定了一种已知的  $\psi$  合酶 hPUS1 参与调控 mRNA 上的假尿嘧啶合成,并发现了在压力之下存在诱导的、压力特异性的 mRNA 假尿嘧啶化<sup>[39]</sup>。

## 2.6 其他类型的修饰

mRNA 上还存在许多其他修饰,它们的分布也具有不同的特征。

m<sup>7</sup>G 加帽过程是真核生物 mRNA 成熟过程中非常重要的一个环节,最常见的修饰形式是 m<sup>7</sup>G (5') ppp (5') N,它对于 mRNA 翻译起始和维持 mRNA 稳定性起着重要作用<sup>[40]</sup>。在病毒 RNA 中也存在着类似的修饰,不过在原核生物 mRNA 中不存在这种甲基化修饰。

mRNA 上也存在另一种胞嘧啶上的修饰——5-羟甲基胞嘧啶 (hm<sup>5</sup>C)。研究发现,在果蝇中,1 597 个 mRNA 上包含 hm<sup>5</sup>C 修饰。这些 hm<sup>5</sup>C 修

饰主要分布在 mRNA 的外显子中, 并包含 CU 富集的保守基序<sup>[41]</sup>。进一步研究发现, hm<sup>5</sup>C 能够促进 mRNA 的翻译效率, 含有 hm<sup>5</sup>C 修饰的 RNA 的翻译水平明显高于不含有 hm<sup>5</sup>C 修饰的 RNA。TET 敲除后, RNA 中 hm<sup>5</sup>C 修饰水平降低, 造成了果蝇脑部发育异常<sup>[41]</sup>。

除了上述甲基化修饰形式, 最近在 mRNA 上又发现一种新型的甲基化修饰, 即 3- 甲基胞嘧啶 (m<sup>3</sup>C)。研究人员发现了哺乳动物中 2 个 tRNA m<sup>3</sup>C 甲基转移酶 METTL2 和 METTL6, 以及 1 个 mRNA m<sup>3</sup>C 甲基转移酶 METTL8。基因敲除小鼠模型研究发现, METTL 家族蛋白缺失虽然未引起明显的发育缺陷, 但对于细胞生长速率和整体翻译水平都有影响。当然, m<sup>3</sup>C 及其修饰酶的功能还有待进一步深入研究<sup>[42]</sup>。

### 3 展望

虽然目前我们已经发现了超过 100 种不同的 RNA 化学修饰, 但绝大多数并未研究透彻, 其在转录组层面的鉴定亟需解决。对于 RNA 化学修饰蓝图的绘制还面临着诸多的挑战。单碱基、高分辨率的高通量测序技术仍有待完善; RNA 修饰时空动态性和组织特异性有待进一步深入研究。另外, 对于其他低修饰水平和丰度 RNA 修饰, 如 m<sup>3</sup>C, 目前鉴定技术以及研究成果还比较局限, 需要进一步的研究探索<sup>[42]</sup>。此外, 临床肿瘤样本中 RNA 修饰的分布目前鲜有报道, 主要是由于难以在疾病样本中提取足量 RNA 并进行精确检测。因此, 为了实现 RNA 修饰在疾病发生发展中的调控机制相关研究广泛开展, 新的痕量、微量 RNA 修饰测序检测技术亟待开发。RNA 修饰与疾病的关联研究将是今后研究的一大重点, 通过分析 RNA 修饰的动态变化, 研究它们与疾病发生发展的关系, 将为疾病的诊断和治疗开辟新方向。

随着测序与分析技术的不断发展, 对于各类 RNA 修饰的检测准确度和灵敏性会不断增加, m6A-LAIC-seq、miCLIP、CeU-seq、m1A-ID-seq 等新兴技术的不断涌现, 也为更深入、精确解析 RNA 修饰分布特征提供了更便捷的渠道。对各种 RNA 修饰特征的研究探索, 将为其调控功能的研究开展提供有利线索。

### 【参 考 文 献】

- [1] 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
- [2] 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
- [3] Wang X, Zhao BS, Roundtree IA, et al. N<sup>6</sup>-methyladenosine modulates messenger RNA translation efficiency. *Cell*, 2015, 161: 1388-99
- [4] 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
- [5] 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
- [6] Ke S, Alemu EA, Mertens C, et al. A majority of m<sup>6</sup>A residues are in the last exons, allowing the potential for 3' UTR regulation. *Genes Dev*, 2015, 29: 2037-53
- [7] Luo GZ, MacQueen A, Zheng G, et al. Unique features of the m<sup>6</sup>A methylome in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Commun*, 2014, 5: 5630
- [8] Li Y, Wang X, Li C, et al. Transcriptome-wide N<sup>6</sup>-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
- [9] 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
- [10] Alarcon CR, Lee H, Goodarzi H, et al. N<sup>6</sup>-methyladenosine marks primary microRNAs for processing. *Nature*, 2015, 519: 482-5
- [11] Alarcon CR, Goodarzi H, Lee H, et al. HNRNPA2B1 is a mediator of m<sup>6</sup>A-dependent nuclear RNA processing events. *Cell*, 2015, 162: 1299-308
- [12] 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
- [13] Patil DP, Chen CK, Pickering BF, et al. m<sup>6</sup>A RNA methylation promotes XIST-mediated transcriptional repression. *Nature*, 2016, 537: 369-73
- [14] Linder B, Grozhik AV, Orlarerin-George AO, et al. Single-nucleotide-resolution mapping of m<sup>6</sup>A and m<sup>6</sup>A<sub>m</sub> throughout the transcriptome. *Nat Methods*, 2015, 12: 767-72
- [15] Mauer J, Luo X, Blanjoie A, et al. Reversible methylation of m<sup>6</sup>A<sub>m</sub> in the 5' cap controls mRNA stability. *Nature*, 2017, 541: 371-5
- [16] 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
- [17] Agris PF. Bringing order to translation: the contributions of transfer RNA anticodon-domain modifications. *EMBO Rep*, 2008, 9: 629-35
- [18] Squires JE, Preiss T. Function and detection of

- 5-methylcytosine in eukaryotic RNA. *Epigenomics*, 2010, 2: 709-15
- [19] Helm M. Post-transcriptional nucleotide modification and alternative folding of RNA. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34: 721-33
- [20] Schaefer M, Pollex T, Hanna K, et al. RNA methylation by Dnmt2 protects transfer RNAs against stress-induced cleavage. *Genes Dev*, 2010, 24: 1590-5
- [21] Chow CS, Lamichhane TN, Mahto SK. Expanding the nucleotide repertoire of the ribosome with post-transcriptional modifications. *ACS Chem Biol*, 2007, 2: 610-9
- [22] 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
- [23] Khoddami V, Cairns BR. Identification of direct targets and modified bases of RNA cytosine methyltransferases. *Nat Biotechnol*, 2013, 31: 458-64
- [24] 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
- [25] Yang X, Yang Y, Sun BF, et al. 5-methylcytosine promotes mRNA export - NSUN2 as the methyltransferase and ALYREF as an m<sup>5</sup>C reader. *Cell Res*, 2017, 27: 606-25
- [26] Amort T, Rieder D, Wille A, et al. Distinct 5-methylcytosine profiles in poly(A) RNA from mouse embryonic stem cells and brain. *Genome Biol*, 2017, 18: 1
- [27] Legrand C, Tuorto F, Hartmann M, et al. Statistically robust methylation calling for whole-transcriptome bisulfite sequencing reveals distinct methylation patterns for mouse RNAs. *Genome Res*, 2017, 27: 1589-96
- [28] David R, Burgess A, Parker B, et al. Transcriptome-wide mapping of RNA 5-methylcytosine in *Arabidopsis* mRNAs and noncoding RNAs. *Plant Cell*, 2017, 29: 445-60
- [29] Cui X, Liang Z, Shen L, et al. 5-methylcytosine RNA methylation in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant*, 2017, 10: 1387-99
- [30] Amort T, Souliere MF, Wille A, et al. Long non-coding RNAs as targets for cytosine methylation. *RNA Biol*, 2013, 10: 1003-9
- [31] El Yacoubi B, Bailly M, de Crecy-Lagard V. Biosynthesis and function of posttranscriptional modifications of transfer RNAs. *Annu Rev Genet*, 2012, 46: 69-95
- [32] Sharma S, Watzinger P, Kotter P, et al. Identification of a novel methyltransferase, Bmt2, responsible for the N<sup>1</sup>-methyl-adenosine base modification of 25S rRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41: 5428-43
- [33] Dominissini D, Nachtergaele S, Moshitch-Moshkovitz S, et al. The dynamic N-methyladenosine methylome in eukaryotic messenger RNA. *Nature*, 2016, 530: 441-6
- [34] Li X, Xiong X, Wang K, et al. Transcriptome-wide mapping reveals reversible and dynamic N<sup>1</sup>-methyladenosine methylome. *Nat Chem Biol*, 2016, 12: 311-6
- [35] Li XY, Xiong XS, Zhang ML, et al. Base-resolution mapping reveals distinct m<sup>1</sup>A methylome in nuclear-and mitochondrial-encoded transcripts. *Mol Cell*, 2017, 68: 993-1005
- [36] Safra M, Chen AS, Nir R, et al. The m<sup>1</sup>A landscape on cytosolic and mitochondrial mRNA at single-base resolution. *Nature*, 2017, 551: 251-5
- [37] 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
- [38] 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
- [39] Li X, Zhu P, Ma S, et al. Chemical pulldown reveals dynamic pseudouridylation of the mammalian transcriptome. *Nat Chem Biol*, 2015, 11: 592-7
- [40] Pournatzis TG, Gowling VH. Ca-binding complex (CBC). *Biochem J*, 2014, 457: 231-42
- [41] Delatte B, Wang F, Ngoc LV, et al. RNA biochemistry. Transcriptome-wide distribution and function of RNA hydroxymethylcytosine. *Science*, 2016, 351: 282-5
- [42] Xu L, Liu X, Sheng N, et al. Three distinct 3-methylcytidine (m<sup>3</sup>C) methyltransferases modify tRNA and mRNA in mice and humans. *J Biol Chem*, 2017, 292: 14695-703