

DOI: 10.13376/j.cblls/2021107

文章编号: 1004-0374(2021)08-0979-10

# m<sup>6</sup>A修饰的调控机制及其在发育和干细胞中的功能研究进展

张璐纯, 袁 梦, 曹芊梓, 黄星卫, 雷 蕾\*

(哈尔滨医科大学组织学与胚胎学教研室, 哈尔滨 150081)

**摘要:** N<sup>6</sup>-甲基腺嘌呤 (m<sup>6</sup>A) 作为真核生物 RNA 上的一种重要的表观遗传修饰, 拥有众多的识别蛋白, 形成了复杂多样的调控网络, 在调控生物体的生长发育以及疾病的发生中有着重要的作用。该文对 m<sup>6</sup>A 以及其检测方法和阅读蛋白进行简要介绍, 着重讨论了 m<sup>6</sup>A 在干细胞干性维持以及胚胎发育中的生物学功能, 总结了 m<sup>6</sup>A 与其他分子修饰的联系, 讨论了 rRNA 上的 m<sup>6</sup>A 修饰, 最后对 m<sup>6</sup>A 可能参与的其他生物学过程进行了展望。

**关键词:** m<sup>6</sup>A; 胚胎发育; 干细胞; rRNA

**中图分类号:** Q71; Q813 **文献标志码:** A

## Research progress on the regulatory mechanism of m<sup>6</sup>A modification and its functions in development and stem cells

ZHANG Lu-Chun, YUAN Meng, CAO Qian-Zi, HUANG Xing-Wei, LEI Lei\*

(Department of Histology and Embryology, Harbin Medical University, Harbin 150081, China)

**Abstract:** N<sup>6</sup>-methyladenosine (m<sup>6</sup>A) is one of the most important epigenetic modifications on eukaryotic RNAs. It is identified by many proteins and forms a complex network, which plays crucial roles in regulating development and diseases. In this review, we briefly introduced the concept of m<sup>6</sup>A and its readers, as well as its detection methods. Furthermore, we emphasized on the m<sup>6</sup>A's biological functions in stemness maintenance and embryo development, summarized the connections between m<sup>6</sup>A and other modifications, then discussed the effect of m<sup>6</sup>A in rRNA. In the end, we prospected other processes that m<sup>6</sup>A may participate in.

**Key words:** m<sup>6</sup>A; embryonic development; stem cell; rRNA

### 1 表观遗传修饰介绍

表观遗传修饰是指在 DNA 序列不改变的情况下基因表达发生可遗传的改变的现象, 是生物体调控自身功能的一种重要的方法, 包括 DNA 的修饰、非编码 RNA 干扰、RNA 修饰、组蛋白修饰等。随着科学技术水平的提高, 实验技术和检测方法不断更新, 表观遗传现象的重要性也越来越被人们所认识<sup>[1]</sup>。DNA 修饰主要包括胞嘧啶 C5 位的甲基化修饰 (5-methylcytosine, 5mC)、腺嘌呤 N6 位的甲基化修饰 (6-methyladenine, 6mA)、鸟嘌呤的 N7 位甲基化修饰 (7-methylguanine, 7mG) 和胞嘧啶 N4 位甲基

化修饰 (N<sup>4</sup>-methylcytosine, 4mC), 它们主要发生于 CpG 岛 (CpG island) 处, 是调控基因表达的一种重要手段<sup>[2]</sup>; 非编码 RNA 是指一类不编码蛋白质的 RNA, 包括 microRNA、circRNA 等, 它们会通过自身序列影响转录翻译, 进而影响细胞功能<sup>[3]</sup>; 组蛋白修饰有多种类型, 包括甲基化修饰、乙酰化修饰、磷酸化修饰、泛素化修饰等, 这些修饰会影响组蛋白与 DNA 的相互作用, 从而使染色质状态、

收稿日期: 2021-01-28; 修回日期: 2021-05-12

基金项目: 国家自然科学基金项目(31671545)

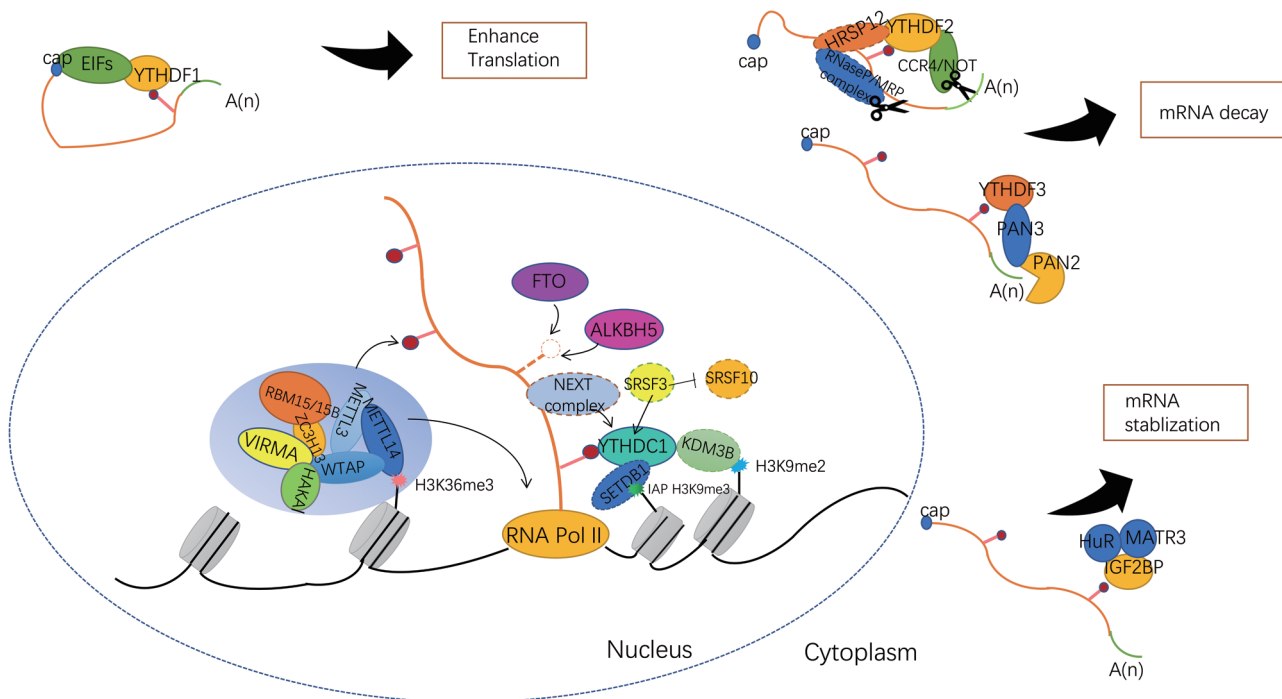
\*通信作者: E-mail: lei086@ems.hrbmu.edu.cn

基因转录、DNA 复制等发生改变<sup>[4]</sup>；而 RNA 的修饰目前已经发现超过 170 种，包括 *N*<sup>1</sup>-甲基腺嘌呤 (*N*<sup>1</sup>-methyladenosine, *m*<sup>1</sup>A)、7-甲基鸟嘌呤 (*N*<sup>7</sup>-methylguanosine, *m*<sup>7</sup>G)、5-甲基胞嘧啶 (5-methylcytosine, *m*<sup>5</sup>C)、*N*<sup>6</sup>-甲基腺嘌呤 (*N*<sup>6</sup>-methyladenosine, *m*<sup>6</sup>A) 等，它们分布于 mRNA、tRNA、rRNA 等多种 RNA 上，调控着 RNA 命运的决定<sup>[5]</sup>。在生物体的生长发育过程中，表观遗传因子始终进行着复杂且有规律的变化，异常的表现修饰往往和多种疾病的发生发展相关，如肿瘤的发生、免疫系统疾病的发展、神经系统的异常等。

## 2 *m*<sup>6</sup>A 修饰

*N*<sup>6</sup>-甲基腺嘌呤 (*m*<sup>6</sup>A) 是指 RNA 腺嘌呤第六位 N 原子上的甲基化修饰，广泛存在于酵母、植物、哺乳动物等多种真核生物以及一些病毒中，是 mRNA 上含量最丰富的一类甲基化修饰，并且在 rRNA、tRNA、microRNA、circRNA 等非编码 RNA

上也有分布。*m*<sup>6</sup>A 具有相对保守的序列 RRACH (R 代表 A 或 G, H 代表 A、C 或 U)，且主要富集于长外显子、终止密码子，以及 3' 非翻译区。作为一种动态可逆的表观修饰，*m*<sup>6</sup>A 拥有许多的识别蛋白，根据功能的不同，可分为三大类：“编码器”、“消码器”和“读码器” (图 1)。编码器是指各种甲基转移酶，具有向 RNA 添加甲基化修饰的作用，主要包括 METTL3 (methyltransferase like 3)、METTL14 (methyltransferase like 14)、WTAP (Wilms' tumor 1-associating protein)<sup>[6]</sup>。此外，还有 VIRMA (vir like *m*<sup>6</sup>A methyltransferase associated)、ZC3H13 (zinc finger CCCH-type containing 13)<sup>[7]</sup>、RBM15 (RNA binding motif protein 15) 等一些新组分，它们组成甲基转移酶复合体共同发挥功能。“消码器”是指 *m*<sup>6</sup>A 的去甲基化酶，目前发现的仅有 FTO (fat mass and obesity associated gene)<sup>[8]</sup> 和 ALKBH5 (alkB homolog 5)<sup>[9]</sup> 两种，可在一定条件下去除 *m*<sup>6</sup>A 上的甲基化修饰。“读码器”是指一大类阅读蛋白，包括 YTH 家



METTL3、METTL14、WTAP 以及与其相互作用的各种蛋白一起组成 MACOM 复合物，给 mRNA 腺嘌呤第六位 N 上添加甲基；METTL14 可以识别组蛋白 H3K36me3 并与 RNA Pol II 结合介导新生 mRNA 上的 *m*<sup>6</sup>A 修饰；FTO 与 ALKBH5 执行 *m*<sup>6</sup>A 的去甲基化功能；YTHDC1 可以通过结合 NEXT 复合体降解含 *m*<sup>6</sup>A 修饰的染色质相关调节 RNAs，还可以与 SRSF3 结合介导 mRNA 的出核或者执行可变剪接的功能，还可以与 KDM3B 以及 SETDB1 结合介导 H3K9me2 和逆转录转座子 IAP 上的 H3K9me3；YTHDF2 以两种相互耦联的方式对成熟 mRNA 进行降解，一种是通过 HRSP12 与 RNaseP/MRP 复合体对 mRNA 进行内切，另一种则是通过 CCR4/NOT 复合物进行去腺苷酸化；YTHDF3 招募 PAN3-PAN2 复合体对 mRNA 进行脱腺苷化；IGF2BP 可以通过 HuR、MATR3 等稳定含 *m*<sup>6</sup>A 的 mRNA；YTHDF1 具有促进翻译的功能。图中虚线表示的蛋白质是与 *m*<sup>6</sup>A 有间接相互作用的蛋白。

图1 *m*<sup>6</sup>A 的编码器、擦除器、阅读器及其相互作用

族蛋白、IGF2BP 家族蛋白 (insulin-like growth factor 2 mRNA-binding proteins)、FMR1 (fragile X mental retardation type 1) 等, 它们能够识别甲基化修饰的 mRNA, 并直接或间接与其结合, 调控基因的表达。m<sup>6</sup>A 的修饰还具有组织与时空特异性, 在大脑以及肝肾中高表达, 在发育的不同时期也有不同程度的表达。随着对 m<sup>6</sup>A 研究的不断深入, m<sup>6</sup>A 修饰介导的 RNA 的加工、代谢以及翻译等各种功能也逐渐清晰<sup>[10-11]</sup>。

## 2.1 m<sup>6</sup>A 阅读蛋白结构与分子功能

### 2.1.1 编码器——甲基转移酶

执行 m<sup>6</sup>A 甲基化的甲基转移酶复合物的核心组分主要包括 3 种: METTL3、METTL14 和 WTAP。METTL3 具有 N 端结构域、甲基转移酶结构域以及两段串联的锌指结构域, 是主要的催化结构; METTL14 与 METTL3 之间具有强烈的相互作用, 但是其甲基供体位点退化, 不具有催化活性, 只是对 METTL3 起到催化的辅助作用, 维持 METTL3 的活性<sup>[12]</sup>。WTAP 也不具有催化活性, 但是它可以帮助复合物向细胞核定位, 并促进复合物和 mRNA 的亲和力<sup>[10]</sup>。

METTL3 催化体内大多数的 mRNA 的甲基化修饰, 其同源蛋白 METTL16 (methyltransferase-like protein 16) 可以调控 U6snRNA 和少部分 mRNA 的 m<sup>6</sup>A 修饰<sup>[13]</sup>。此外, 还有 METTL5 (methyltransferase like 5)、ZCCHC4 (zinc finger CCHC-type containing 4) 等, 它们对 rRNA 上的 m<sup>6</sup>A 有一定的催化功能<sup>[14]</sup>。在甲基转移酶复合体中, 一些新组分包括 VIRMA、RBM15/15B、ZC3H13 等可以作为调节亚基直接或间接地与 WTAP 相互作用, 它们与 WTAP 一起形成 MACOM 复合体, 指导整个复合体在细胞中的定位<sup>[15]</sup>。甲基转移酶复合体的活性也受 miRNA 的影响<sup>[16]</sup>。

现已知, m<sup>6</sup>A 是在转录本上共转录修饰的, METTL3 以转录依赖的方式被募集到染色质上, 介导新生转录本的甲基化, 并且甲基化程度的高低与 RNA 聚合酶 II 的活性相关<sup>[17]</sup>, 但甲基转移酶复合物如何识别底物 RNA 以及复合物的活性如何被调控等问题仍然有待研究。

### 2.1.2 读码器——m<sup>6</sup>A 的阅读蛋白

YTH 家族蛋白作为 m<sup>6</sup>A 的阅读蛋白, 共有 5 个家族成员: YTHDF1 (YTH domain-containing protein 1)、YTHDF2 (YTH domain-containing protein 2)、YTHDF3 (YTH domain-containing protein 3)、

YTHDC1 (YTH domain containing 1)、YTHDC2 (YTH domain containing 1), 目前对于 YTH 结构域识别 m<sup>6</sup>A 的机制已经了解的比较清楚。YTH 结构域含有几个保守的芳香族氨基酸, 其上的苯环不仅与 m<sup>6</sup>A 腺嘌呤和甲基基团之间存在相互作用, 而且还能形成笼状的三级结构, 将 m<sup>6</sup>A 的甲基基团牢牢卡住, 由此来对 m<sup>6</sup>A 进行识别<sup>[18]</sup>。YTH 结构域家族蛋白对调控 RNA 的稳定性、翻译的效率等有着重要的作用。YTHDF1 被认为具有促进翻译的功能。而 YTHDF2 具有降解 RNA 的作用, 它可以通过募集脱腺苷酸酶复合物 CCR4-NOT (the carbon catabolite repression 4-negative on TATA-less complex) 到含有 m<sup>6</sup>A 修饰的 RNA 上来对该 RNA 进行降解, 也可以以热响应蛋白 HRSP12 (heat-responsive protein 12) 作为桥梁, 通过 RNaseP/MRP (ribonuclease P and RNase MRP) 核酸内切酶对 RNA 的内部进行剪切<sup>[15]</sup>。2019 年, 研究表明, YTHDF 蛋白 YTH 结构域上游的一段无序区 (LCD) 能够发生 m<sup>6</sup>A 依赖的相分离现象, 这可能与应激现象有关<sup>[19]</sup>。YTHDF3 与 YTHDF1 功能类似, 可以与 YTHDF1 一起协同调控 mRNA 翻译效率, 但是对于 YTHDF1、3 调控翻译的现象仍有部分争议存在。近期有研究组提出 YTHDF1/2/3 并不参与翻译的调控, 且其蛋白质结构近乎相同, 以一种冗余的方式非特异性地识别 m<sup>6</sup>A 修饰来对 RNA 进行降解<sup>[20]</sup>; 而另一实验室使用 QTL 分析表明, m<sup>6</sup>A 对翻译的影响复杂, 并不是简单地促进或抑制<sup>[21]</sup>。

YTHDC1 是 YTH 家族中定位于细胞核的蛋白质, 它可以与剪切因子 SRSF3 (serine and arginine rich splicing factor 3) 和 SRSF10 (serine and arginine rich splicing factor 3) 相互作用, 调控核内 m<sup>6</sup>A mRNA 的选择性剪切, 并且对 m<sup>6</sup>A mRNA 的出核也有一定的作用<sup>[22]</sup>。YTHDC2 被认为能够调控 RNA 的翻译与稳定性。

HNRNP 家族成员包括 HNRNPA2/B1 (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1)、HNRNPG (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein G) 以及 HNRNPC (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C)。HNRNPA2/B1 拥有两段串联的 RNA 结合区域 (RNA recognition motif, RRM) 以及 C 端的低复杂度区域 (low complexity, LC)<sup>[23]</sup>, 作为核内的 m<sup>6</sup>A 阅读器, 它能够识别 RGm<sup>6</sup>AC 基序, 以 METTL3 依赖的方式调控 RNA 的选择性剪切, 并能够介导前体 miRNA 的加工进程, 敲除 HNRNPA2B1 的细胞可

变剪切发生异常,并且成熟的 miRNA 明显减少<sup>[24]</sup>。与之类似的是, HNRNPG 的低复杂区域的 RGG 基序 (Arg-Gly-Gly) 可以直接结合 RNA 聚合酶 II 的磷酸化的羧基末端结构域 (carboxy-terminal domain, CTD), 并能够识别新生 RNA 剪接位点附近的 m<sup>6</sup>A 修饰, 与新生 RNA 相互作用, 调节转录本的选择性剪接<sup>[25]</sup>。

IGF2BPs 也是近年来被鉴定出来的 m<sup>6</sup>A 阅读蛋白, 作为保守的单链 RNA 结合蛋白家族, 它具有 6 个 RNA 结合域, 包括 2 个 RRM 区域和 4 个 K 同源结构域 (K-homology, KH), KH 结构域主要起着识别 mRNA 上的 m<sup>6</sup>A 修饰的作用。IGF2BPs 具有稳定 mRNA 的功能, 这可能是由其可以招募一些 RNA 稳定蛋白如 ELAVL1 (ELAV-like RNA-binding protein1)、MATR3 (matrin3) 来发挥作用实现的<sup>[26]</sup>。

此外, 还有其他的一些阅读蛋白如 FMRP (fragile X mental retardation protein)、PRRC2A (proline rich coiled-coil 2 A) 等, 它们对调控 RNA 的稳定性、RNA 的出核等有一定的作用, 但具体机制还需要进一步的研究。

### 2.1.3 消除器——去甲基化酶

目前发现的 m<sup>6</sup>A 去甲基化酶有 FTO 与 ALKBH5 两种, FTO 是肥胖相关蛋白, 具有催化 m<sup>6</sup>A 去甲基化的作用。FTO 属于  $\alpha$  酮戊二酸 ( $\alpha$  ketoglutaric acid,  $\alpha$ -KG) 和二价铁离子 Fe(II) 依赖的 ALKB 双加氧酶家族, 在细胞核和细胞质中都有定位。它具有两个结构域: N 端结构域和 C 端结构域。N 端结构域与双加氧酶家族序列保守, C 端结构域主要起着支架的作用。FTO 对 m<sup>6</sup>A 去甲基化的机理为 m<sup>6</sup>A 首先被氧化成 hm<sup>6</sup>A (*N*<sup>6</sup>-hydroxymethyladenosine)、f<sup>6</sup>A (*N*<sup>6</sup>-formyladenosine), 然后脱去甲醛和甲酸完成去甲基化<sup>[27]</sup>。但是, FTO 的底物并不仅仅是 m<sup>6</sup>A, *N*<sup>6</sup>,2'-O-二甲基腺嘌呤 (m<sup>6</sup>Am) 以及 tRNA 上的 m<sup>1</sup>A 也是其催化底物<sup>[11]</sup>。2019 年, 贾桂芳课题组获得了 FTO 核酸复合物的晶体结构, 解析了 FTO 与各个底物的相互作用机制<sup>[28]</sup>。他们发现, FTO 活性口袋虽然能够识别多个 RNA 修饰底物的分子, 但是其更加偏爱结合 *N*-6 甲基腺嘌呤碱基, 且对具有相同 *N*<sup>6</sup> 甲基腺嘌呤碱基的 m<sup>6</sup>A 和 m<sup>6</sup>Am 具有相同的去甲基化活性, 表明 FTO 的去甲基化活性主要依赖其催化口袋中的残基与碱基的识别, 而不是依赖核糖环, 并且不同的 RNA 三级结构也会影响 FTO 的催化功能。

ALKBH5 同 FTO 一样, 也属于二价铁离子、

$\alpha$ -KG 依赖型的 ALKB 双加氧酶家族成员之一, 与 FTO 不同, ALKBH5 对 m<sup>6</sup>A 的去甲基化并不需要经过多步反应, 而是直接进行去甲基化, 有研究表明 ALKBH5 可能调控 mRNA 的出核转运<sup>[11]</sup>。

### 2.2 m<sup>6</sup>A 的检测方法

由于 m<sup>6</sup>A 具有在细胞中的绝对含量较低、表达稳定不易被化学试剂影响等特征, 对其检测方法的探索和优化仍然比较困难。目前比较常用的技术有液相色谱-质谱联用 (LC-MS)、斑点杂交 (Dot-Blot)、免疫共沉淀-测序分析 (MeRIP-seq) 等, 它们有着各自的优缺点。MeRIP-Seq 技术的主要原理是将细胞内的 mRNA 提取出来, 打断成 100 nt 左右的片段, 然后用 m<sup>6</sup>A 抗体进行孵育并对含 m<sup>6</sup>A 的 RNA 片段进行富集, 最后进行测序并计算 m<sup>6</sup>A 的表达量<sup>[29]</sup>。这种方法操作较为简单精确, 且可以获得序列信息, 但所需样本量较大, 而且无法做到单碱基水平的分辨率。基于此技术, 建立出一些优化的方法, 如 PA-m<sup>6</sup>A-seq<sup>[30]</sup>、miCLIP 法<sup>[31]</sup>等。

随着科学技术的发展, 一些不依赖于抗体的 m<sup>6</sup>A 检测技术也逐渐被开发, 如 2019 年 9 月, Meyer<sup>[32]</sup> 开发了 DART-seq 法, 他将胞嘧啶脱氨酶 APOBEC1 与 YTH 结构域融合, 构建出了 APOBEC1-YTH 融合蛋白, 该蛋白可识别 m<sup>6</sup>A 位点并将 m<sup>6</sup>A 后的 C 变成 U, 通过测序和比对基因组信息, 便可以将 m<sup>6</sup>A 识别出来, 且其总 RNA 的量只需 10 ng, 大大降低了 RNA 的投入量; 2020 年, 贾桂芳实验团队开发了 m<sup>6</sup>A-SEAL (FTO-assisted m<sup>6</sup>A selective chemical labeling method) 法, 她们利用 FTO 将 RNA 中的 m<sup>6</sup>A 转化为 hm<sup>6</sup>A, 接着利用二硫苏糖醇 (DTT) 与 hm<sup>6</sup>A 反应生成更稳定的 dm<sup>6</sup>A (*N*<sup>6</sup>-dithio-lsitolmethyladenosine), dm<sup>6</sup>A 上的游离巯基可以与甲烷硫代磺酸 (methanethiosulfonate, MTSEA) 反应来安装各种标记, 从而更容易对其进行亲和纯化、测序等后续实验<sup>[33]</sup>。该方法不仅具有高灵敏度和高特异性, 还可以通过条件优化特异性测定帽端的 m<sup>6</sup>A<sub>m</sub>。此外, 还有其他的 m<sup>6</sup>A 检测技术, 如 m<sup>6</sup>A-REF-seq (m<sup>6</sup>A-sensitive RNA-Endoribonuclease-Facilitated sequencing)<sup>[34]</sup>、SELECT (single-base elongation-and ligation-based qPCR amplification method)<sup>[35]</sup>、m<sup>6</sup>A-label-seq<sup>[36]</sup> 等。总之, 虽然在 m<sup>6</sup>A 检测技术上已经有了很大的进步, 但是每个方法也都有各自的局限性, 因此, 开发一种简单、快速、精确且起始量少的 m<sup>6</sup>A 检测技术仍然面临着一定的挑战。

### 3 m<sup>6</sup>A在胚胎干细胞、重编程及配子发生和早期发育中的功能

作为一种拥有众多识别蛋白且分布广泛的RNA修饰, m<sup>6</sup>A介导的生物学功能也是多种多样, 它可以调控干细胞的分化方向, 调控发育的进程, 而且对肿瘤以及神经系统疾病等的发生和发展也有着重要的影响。

#### 3.1 m<sup>6</sup>A参与胚胎干细胞的分化调控

胚胎干细胞 (embryonic stem cell, ESC) 是指从早期胚胎或者原始性腺中分离出来的一类细胞, 具有无限增殖以及多项分化的潜能, 在再生医学、疾病模型的建立和药物筛选等方面有着广泛的应用前景。m<sup>6</sup>A与胚胎干细胞干性的维持息息相关, 一些实验室认为m<sup>6</sup>A的降低可以使细胞维持多潜能状态<sup>[17, 37]</sup>, 例如, 在胚胎干细胞中敲低组蛋白H3K36甲基转移酶SETD2 (SET domain containing 2)后, H3K36me3 (histone H3 trimethylation at Lys36)以及m<sup>6</sup>A的水平都显著降低, 且去甲基化主要发生在*Oct4*、*Nanog*、*Sox2*等干性相关基因上, 干性基因的表达升高, 使胚胎干细胞的体外分化受到抑制<sup>[17]</sup>。但也有实验室得出了相反的结论。他们发现m<sup>6</sup>A甲基转移酶复合体中的调节组分ZC3H13或WTAP的降低可以减少mESC (mouse ESC) m<sup>6</sup>A的表达, RNA-seq分析发现干性相关基因表达下降而分化相关基因上调, 间接表明了m<sup>6</sup>A对多潜能性的抑制作用<sup>[38]</sup>。有实验室对这种现象进行了更加细致的研究, 发现在*Mettl3*敲除的mESC中, 带有m<sup>6</sup>A修饰的多潜能基因的mRNA半衰期更长, 表达量更高, 且其分化能力受阻, 在体外产生的部分分化的拟胚体 (embryoid bodies, EBs) 无法形成成熟的神经元, 表明m<sup>6</sup>A修饰的降低能够增加多潜能基因mRNA的稳定性及表达水平。但是, 在始发态 (primed) 下的外胚层干细胞 (EpiSCs) 中降低*Mettl3*的表达, 细胞的自我更新能力降低并且快速分化, 最终导致细胞死亡。因此, m<sup>6</sup>A对干性的影响与干细胞的两种状态有关。幼稚态 (naïve) 的干细胞更倾向于维持多潜能状态, m<sup>6</sup>A的降低会使早已高表达的多潜能基因表达更高; 始发态的干细胞倾向于向分化态转变, m<sup>6</sup>A的降低会使谱系相关基因高表达<sup>[39-40]</sup>。

此外, 随着研究的不断深入, 许多会影响干细胞分化的m<sup>6</sup>A相关因子也逐渐被发现, 如ZFP217 (zinc finger protein 217) 能够通过METTL3结合并抑制其功能来减少m<sup>6</sup>A的水平, 从而促进ESC

的多潜能性和重编程效率<sup>[41]</sup>; ZC3H13的降低会减少WTAP的核定位, 降低m<sup>6</sup>A的修饰水平, 损害ESCs的自我更新并促进其分化<sup>[38]</sup>; 含有m<sup>6</sup>A修饰的非编码RNA *linc1281*对ESC的干性也有影响, 突变掉其上的m<sup>6</sup>A位点无法拯救*linc1281*缺失造成的ESC分化异常等<sup>[42]</sup>。这些因子之间的相互联系以及可能的其他功能也需要更多的探讨。

#### 3.2 m<sup>6</sup>A参与诱导多能干细胞的重新编程

诱导多能干细胞 (induced pluripotent stem cells, iPSCs) 是指将若干多能性相关基因导入体细胞, 从而诱导产生与胚胎干细胞类似的、具有多向分化潜能的细胞类型, 是再生医学领域的一次革新。尽管诱导多能干细胞的应用前景巨大, 但仍有许多问题没有解决, 如诱导效率低、安全性的不确定性等。有研究表明, METTL3的过表达会增加m<sup>6</sup>A的含量以及多潜能基因*Oct4*、*Sox2*、*Nanog*等的表达, 提高iPSC重编程效率<sup>[16]</sup>。也有实验指出, ZFP217可以与METTL3相互作用, 降低m<sup>6</sup>A的水平, ZFP217的敲除会使m<sup>6</sup>A的水平上升, 却导致体细胞重编程受损, 虽然该结果与上述结果相悖, 但这种结果更可能是由ZFP217自身而不是m<sup>6</sup>A直接造成的<sup>[41, 43]</sup>。总的来说, m<sup>6</sup>A对iPSC的影响更有可能是正向的促进作用。2020年, 陈捷凯课题组发现, YTHDF2和YTHDF3可以通过不同的途径调控重编程的进程, YTHDF2可以通过CCR4-NOT脱腺苷化复合体促进体细胞相关基因mRNA的快速清除, 而YTHDF3则是通过PAN2-PAN3来对mRNA进行脱腺苷化使其降解, 它们都会促进细胞的基因表达从体细胞向多能细胞转变<sup>[44]</sup>; 他们还发现YTHDF2/3的敲除会影响上皮间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 相关基因*Tead2*的表达进而影响EMT, 最终损害iPSC的重编程效率。

#### 3.3 m<sup>6</sup>A调控配子发生与胚胎发育

##### 3.3.1 m<sup>6</sup>A与精子发生

精子的发生是一个复杂且有序的过程, 主要包括3个阶段: 精原干细胞增殖分化为精原细胞, 最终发育为初级精母细胞; 精母细胞启动减数分裂形成圆形精子; 圆形精子变形成为长型精子。在精子发生的过程中, m<sup>6</sup>A起到了重要的调控作用。在m<sup>6</sup>A相关蛋白中, ALKBH5介导的m<sup>6</sup>A对生殖细胞的影响是较早发现的。何川实验室在2013年指出, ALKBH5敲除的小鼠能够正常存活, 但雄性小鼠生殖细胞转录组剪切受到影响, 睾丸变小, 生精异常, 精母细胞粗线期 (pachytene stage) 和中期细胞凋亡

异常, 其差异表达基因涉及精子发生<sup>[9]</sup>。而对于甲基转移酶组分 METTL3、METTL14 介导的 m<sup>6</sup>A 水平的改变也会影响精子发生。在生殖细胞中特异性地敲除 *Mettl3* 或 *Mettl14* 会影响 m<sup>6</sup>A 和精原干细胞分化增殖相关基因的表达, 使精原干细胞的数量减少, 对 *Mettl3* 和 *Mettl14* 同时敲除会损害精子发生, 这与单倍体特异性基因的受损有关, 但是敲除其中的一个, 精子发生并不会受到影响<sup>[45]</sup>。在 YTH 家族蛋白中, *Ythdc2* 敲除的小鼠雌性和雄性都不可育, 雄性睾丸变小, 其输精管和附睾中缺少精子, 进一步分析发现敲除组精母细胞减数第一次分裂前期异常, 可以正常进入细线期却无法进入粗线期阶段, 最终停留在偶线期 (zygotene stage) 样的状态<sup>[46]</sup>。有研究发现了 circRNA 上的 m<sup>6</sup>A 修饰在精子发生中的新作用。在精母细胞发育过程中, circRNA 的合成增加, 且这些 circRNA 含有大的开放阅读框以及带有 m<sup>6</sup>A 修饰的起始密码子, 并能够翻译成蛋白质, 调控精子的发育过程, 其中的具体机制仍然需要更加深入的探讨<sup>[47]</sup>。

### 3.3.2 m<sup>6</sup>A 与卵母细胞成熟

在斑马鱼中, 大约有三分之一的母源 mRNA 是被 m<sup>6</sup>A 修饰的, 这暗示着 m<sup>6</sup>A 在卵母细胞成熟中的重要作用。缺失 *Ythdf2* 的雌鼠不育, 但其卵母细胞仍然可以正常完成第一次减数分裂并可以在第二次减数分裂中期适当停滞, *Ythdf2* 条件性敲除的雌鼠在与野生型雄鼠杂交后其合子也可以正常排出第二极体, 但之后会出现 2- 细胞阻滞的现象。对第二次减数分裂时期的卵母细胞进行 RNA-seq, 发现 *Ythdf2* 的敲除会使母源转录本的剂量失衡, 表明其调控着母源转录本的降解<sup>[48]</sup>。YTHDC1 作为调控可变剪切的重要组分, 也被报道在卵子发生中执行重要的功能。*Ythdc1* 特异性敲除的雌鼠不育, 卵母细胞成熟发生阻滞, 且细胞质内会出现大的 RNA 颗粒 (RNA granules)。进一步分析发现, YTHDC1 可以与 mRNA 多聚腺苷酸化的切割因子的亚基之一 CPSF6 (cleavage and polyadenylation specificity factor 6) 以及可变剪切因子 SRSF3、SRSF7 (serine and arginine rich splicing factor 7) 相互作用, *Ythdc1* 的敲除可导致可变剪切的改变, 进而对卵子发生产生影响<sup>[49]</sup>。与精子发生类似, *Ythdc2* 的敲除也会使雌性不育, 卵巢变小, 减数分裂异常<sup>[46]</sup>。除了 YTH 家族, METTL3 对卵母细胞的成熟也有影响。在母源生殖细胞中敲除 *Mettl3*, 会改变 mRNA 的翻译效率, 强烈抑制卵母细胞成熟, 并且会导致母源合子

转换 (maternal-to-zygotic transition, MZT) 的缺陷<sup>[50]</sup>。2020 年, 有实验室指出 KIAA1429 作为甲基转移酶的新组分, 在卵巢中条件性敲除后会导致卵巢变小、生发泡破裂异常, 并且能够通过调控 YTHDC1 和剪切因子 SRSF3 的定位影响可变剪切, 最终导致雌性不育<sup>[51]</sup>。但是对于调控精子减数分裂必不可少的 ALKBH5, 在调控卵母细胞成熟的过程中似乎并没有起到重要的作用, 这提示 ALKBH5 对减数分裂的调控可能是性别依赖的。

### 3.3.3 m<sup>6</sup>A 与胚胎发育

母源合子转换是受精后胚胎发育的一个重要的过程, 包括母源 RNA 的降解和合子基因组的激活两个部分, 其中, 表观遗传在母源合子转换中起到了重要的调控作用。除了 DNA 甲基化、组蛋白修饰, 近年来 m<sup>6</sup>A 在母源合子转换中的影响也逐渐被发现。2017 年, 何川实验室发现, YTHDF2 在斑马鱼胚胎发育中能够调控母源 RNA 的降解, 缺失 YTHDF2 会使胚胎发育受阻<sup>[52-53]</sup>。此后, 也有人在小鼠中同样证明了 YTHDF2 对母源 RNA 清除的作用<sup>[48]</sup>。但目前为止, 在 m<sup>6</sup>A 对母源合子转换方面的研究仍然较少, 除了 YTHDF2, m<sup>6</sup>A 修饰的其他相关因子是否也调控着母源合子转换还未见报道。

hnRNPA2B1 在调控植入前胚胎发育中也起着一定作用。hnRNPA2/B1 敲减的胚胎内细胞团中与多潜能相关的基因如 *Oct4*、*Sox2* 以及原始内胚层的标记 *Gata4* 的表达下调, 表明其调控着植入前胚胎发育的细胞命运决定<sup>[54]</sup>。而对于植入后胚胎发育, METTL14 的表达必不可少。METTL14 可以促进外胚层细胞从幼稚态到始发态的转变, 缺少 METTL14 的胚胎发育迟缓且分化受到抑制, 最终导致早期胚胎致死<sup>[55]</sup>。总的来说, 对于胚胎发育, m<sup>6</sup>A 及其相关蛋白虽然起着重要的作用, 但是相关研究较少, 仍有许多问题没有解决。

### 3.4 m<sup>6</sup>A 与组蛋白修饰在发育调控中的协同作用

组蛋白修饰作为另一种重要的表观遗传修饰, 与 m<sup>6</sup>A 之间的联系近年来也逐渐被认识到。陈建军教授团队发现 m<sup>6</sup>A 甲基化与组蛋白 H3K36me3 之间存在联系。METTL14 能够识别并结合到 H3K36me3 上, 同时能够结合 RNA 聚合酶 II, 使甲基转移酶复合物在转录延伸过程中介导新生 RNA 链上的 m<sup>6</sup>A 甲基化<sup>[17]</sup>。m<sup>6</sup>A 的降低还可以破坏组蛋白甲基转移酶 EZH2 (enhancer of zeste homolog 2) 的转录本来降低组蛋白 H3K27me3 (trimethylation of Lys-27 in histone 3) 修饰的含量, 影响胚胎神经干细胞的自

我重建<sup>[56]</sup>。夏来新团队发现 m<sup>6</sup>A 修饰与抑制性组蛋白 H3K9me2 (dimethylated histone H3 lysine 9) 之间存在相关性, YTHDC1 可以和 H3K9me2 去甲基化酶 KDM3B (histone lysine demethylase 3B) 相互作用, 将 KDM3B 招募到 m<sup>6</sup>A 相关区域来完成该区域的组蛋白去甲基化<sup>[57]</sup>(图 1)。而与组蛋白密切相关的染色质重塑也受到 m<sup>6</sup>A 的调控。在小鼠胚胎干细胞中敲除 *Mettl3* 后, 新生 RNA 的合成和染色质开放程度增加, 这是由 YTHDC1 通过 NEXT (nuclear exosome targeting complex) 复合体降解携带 m<sup>6</sup>A 的染色质相关调节 RNA 来实现的<sup>[58]</sup>。2021 年, 陈捷凯课题组发现 YTHDC1 蛋白可以通过识别逆转录转座子 RNA 上的 m<sup>6</sup>A 修饰, 并结合 H3K9 甲基转移酶 SETDB1 (SET domain bifurcated 1), 调控 SETDB1 依赖的 H3K9me3, 从而介导逆转录转座子的沉默的维持。YTHDC1 的敲除使逆转录转座子的表达水平升高, 细胞进入 2C 样 (2C-like) 状态, 多潜能性增高, 且细胞的增殖也受到抑制<sup>[59]</sup>。与此同时, 沈宏杰课题组也发现了类似的现象。他们指出, METTL3 可以结合逆转录转座子 IAP (intracisternal A particle) 家族的 RNA, 进而招募 SETDB1 和 TRIM28 (tripartite motif containing 28) 甲基转移酶并在 IAP 转座子上加上 H3K9me3, 调控转座子的沉默, 且 METTL3 在 IAP 上的定位受到 m<sup>6</sup>A 的影响。此外, 他们发现 YTHDC1 在 IAP 上也有结合, 且 YTHDC1 与 METTL3 有互作, 推测 METTL3 在 IAP 上的定位是通过 YTHDC1 识别 m<sup>6</sup>A 修饰来间接介导的<sup>[60]</sup>。这些结果都表明, YTHDC1 作为核内 m<sup>6</sup>A 阅读器, 与组蛋白修饰联系密切。目前对于组蛋白和 m<sup>6</sup>A 之间的研究还较少, 其具体的机制以及相关的信号通路也需要更加深入的研究。

### 3.5 rRNA 上的 m<sup>6</sup>A 修饰参与调控干细胞的发育

核糖体 RNA 是一种重要的非编码 RNA, 是细胞内蛋白质翻译机器的主要组成成分。rRNA 的修饰对于核糖体的结构和功能的维持有着重要影响, METTL5 作为一种新发现的甲基转移酶组分, 被认为能够催化 18S rRNA A1832 位点的 m<sup>6</sup>A 修饰。缺少 *Mettl5* 的胚胎干细胞翻译效率降低、多潜能性降低, 但 18S rRNA 丰度不变, 并且 *Mettl5* 缺乏的小鼠出生后有表型和行为的缺陷, 证明 METTL5 在发育中的重要作用<sup>[14]</sup>。METTL5 还能够通过介导 FBXW7 (F-box with 7 tandem WD40) 的翻译效率并间接影响 c-MYC 的表达从而调控胚胎干细胞的分化<sup>[61]</sup>。2019 年, 人源 METTL5 的互作蛋白 TRMT112

(tRNA methyltransferase 11-2) 也被发现具有稳定 METTL5 功能的作用<sup>[62]</sup>。

CCHC 含锌指蛋白是真核生物中最常见的锌指蛋白, 能够调控许多 RNA 相关的生物进程。在人类中, 28S rRNA 上的 m<sup>6</sup>A 修饰被 ZCCHC4 (zinc finger CCHC-type containing 4) 催化, 它能够识别 28S rRNA 中的 AAC 序列, 并对 A4220 进行甲基化修饰。ZCCHC4 的降低对成熟 rRNA 的形成没有影响, 但是会介导核糖体结构和亚基的组装, *Zcchc4* 敲除的细胞中 60S 核糖体占 80S 核糖体的比例明显降低, 翻译效率也有所下降。同时, 肿瘤患者 28S rRNA 的 m<sup>6</sup>A 水平也高于癌旁组织, 暗示 ZCCHC4 在调控肿瘤进程的作用<sup>[63]</sup>。这些都表明了 rRNA 上的 m<sup>6</sup>A 修饰有着不可或缺的地位。

### 3.6 m<sup>6</sup>A 的其他生物功能

m<sup>6</sup>A 除了在干细胞中扮演着重要的角色之外, 在免疫反应、病毒入侵、肿瘤发生等过程中也都有它的身影。首先在癌症中, m<sup>6</sup>A 修饰在肝癌的发生、增殖、迁移中起着重要的作用。*Mettl3* 的敲除在体外能够降低 *Socs2* (suppressor of cytokine signaling 2) 的 m<sup>6</sup>A 水平, 从而降低 YTHDF2 对 *Socs2* mRNA 的降解, 增加其 mRNA 的表达, 最终抑制肝癌 HCC 的增殖、迁移以及克隆形成<sup>[64]</sup>。在人的非小细胞肺癌中, m<sup>6</sup>A 的去甲基化酶 FTO 的表达量升高, 对 *Fto* 进行敲减发现肿瘤细胞的增殖能力降低, 进一步研究发现 FTO 能够降低整体 m<sup>6</sup>A 的含量并增加泛素特异蛋白酶 USP7 的稳定性, 从而促进非小细胞肺癌的进程<sup>[65]</sup>。此外, 越来越多的研究发现 m<sup>6</sup>A 与胃癌之间存在相关性, 通过对 METTL14 的敲减发现 m<sup>6</sup>A 的降低会激活肿瘤相关的 Wnt/PI3K-Akt 信号通路, 增加胃癌细胞的增殖和侵袭能力<sup>[66]</sup>。而在免疫方面, METTL3 介导的 m<sup>6</sup>A 水平的变化可以影响细胞因子信号抑制分子 SOCS 家族蛋白的表达, 从而影响了 IL-7/STAT 和 TCR 信号通路, 最终改变幼稚态 T 细胞的稳态增殖和分化<sup>[67]</sup>。最后, m<sup>6</sup>A 在热激响应中的功能也不可忽视。在热激条件下, 响应压力诱导的 mRNA 在 5' UTR 处会有增加的 m<sup>6</sup>A 修饰, m<sup>6</sup>A 阅读蛋白 YTHDF2 的定位会从细胞质转移到细胞核中, 并增加表达量, 阻止 FTO 对 5' UTR 处的 mRNA 去甲基化, 促进了这些 RNA 的帽端非依赖性翻译, 用以响应压力<sup>[68]</sup>。

## 4 展望

综上所述, m<sup>6</sup>A 作为一种普遍且重要的表观遗

传修饰,在配子发生、胚胎发育、干细胞分化、体细胞重编程、癌症的发生等方面都有重要作用,但是由于 m<sup>6</sup>A 调控网络复杂,具体机制仍然不清楚。比如在早期胚胎发育中,合子基因组的激活是否需要 m<sup>6</sup>A 水平的调控, YTHDF2 在应激方面的功能是否也参与了早期胚胎发育,组蛋白修饰的改变与 m<sup>6</sup>A 的具体关系,它们是否也参与到谱系分化、多潜能维持的发育进程中等都需要深入研究。此外,最近发现的 m<sup>6</sup>A 与逆转录转座子之间的关系,将 m<sup>6</sup>A 与染色质修饰联系起来,这种联系对细胞命运决定的作用也有待解决。而 m<sup>6</sup>A 与其他的表观遗传修饰如 DNA 甲基化修饰或者其他 RNA 修饰之间的关系也并不清晰,仅有少量报道它们之间可能存在某些关联<sup>[69]</sup>,其具体机制仍然需要大量的补充研究。最后,作为新发现的 rRNA 甲基化修饰蛋白, METTL5 和 ZCCHC4 对 rRNA 上的 m<sup>6</sup>A 修饰的影响会造成哪些生物功能的改变以及是否能够促进胚胎发育以及重编程过程也值得深入探究。

#### [参 考 文 献]

- [1] Zhang Y, Sun Z, Jia J, et al. Overview of histone modification. *Adv Exp Med Biol*, 2021, 1283: 1-16
- [2] Skvortsova K, Stirzaker C, Taberlay P. The DNA methylation landscape in cancer. *Essays Biochem*, 2019, 63: 797-811
- [3] Guil S, Esteller M. RNA-RNA interactions in gene regulation: the coding and noncoding players. *Trends Biochem Sci*, 2015, 40: 248-56
- [4] Bannister AJ, Kouzarides T. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res*, 2011, 21: 381-95
- [5] Liu J, Jia G. Methylation modifications in eukaryotic messenger RNA. *J Genet Genomics*, 2014, 41: 21-33
- [6] 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
- [7] Yue Y, Liu J, Cui X, et al. VIRMA mediates preferential m<sup>6</sup>A mRNA methylation in 3'UTR and near stop codon and associates with alternative polyadenylation. *Cell Discov*, 2018, 4: 10
- [8] 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
- [9] 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
- [10] Zaccara S, Ries RJ, Jaffrey SR. Reading, writing and erasing mRNA methylation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2019, 20: 608-24
- [11] Shi H, Wei J, He C. Where, when, and how: context-dependent functions of RNA methylation writers, readers, and erasers. *Mol Cell*, 2019, 74: 640-50
- [12] Huang J, Yin P. Structural insights into N<sup>6</sup>-methyladenosine (m<sup>6</sup>A) modification in the transcriptome. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 2018, 16: 85-98
- [13] Pendleton KE, Chen B, Liu K, et al. The U6 snRNA m<sup>6</sup>A methyltransferase METTL16 regulates SAM synthetase intron retention. *Cell*, 2017, 169: 824-835 e14
- [14] Ignatova VV, Stolz P, Kaiser S, et al. The rRNA m<sup>6</sup>A methyltransferase METTL5 is involved in pluripotency and developmental programs. *Genes Dev*, 2020, 34: 715-29
- [15] Lee Y, Choe J, Park OH, et al. Molecular mechanisms driving mRNA degradation by m<sup>6</sup>A modification. *Trends Genet*, 2020, 36: 177-88
- [16] 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
- [17] Huang H, Weng H, Zhou K, et al. Histone H3 trimethylation at lysine 36 guides m<sup>6</sup>A RNA modification co-transcriptionally. *Nature*, 2019, 567: 414-9
- [18] Liao S, Sun H, Xu C. YTH domain: a family of N<sup>6</sup>-methyladenosine (m<sup>6</sup>A) readers. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 2018, 16: 99-107
- [19] Gao Y, Pei G, Li D, et al. Multivalent m<sup>6</sup>A motifs promote phase separation of YTHDF proteins. *Cell Res*, 2019, 29: 767-9
- [20] Zaccara S, Jaffrey SR. A unified model for the function of YTHDF proteins in regulating m<sup>6</sup>A-modified mRNA. *Cell*, 2020, 181: 1582-95.e18
- [21] Zhang Z, Luo K, Zou Z, et al. Genetic analyses support the contribution of mRNA N<sup>6</sup>-methyladenosine (m<sup>6</sup>A) modification to human disease heritability. *Nat Genet*, 2020, 52: 939-49
- [22] 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
- [23] Wu B, Su S, Patil DP, et al. Molecular basis for the specific and multivalent recognitions of RNA substrates by human hnRNP A2/B1. *Nat Commun*, 2018, 9: 420
- [24] 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
- [25] Zhou KI, Shi H, Lyu R, et al. Regulation of co-transcriptional pre-mRNA splicing by m<sup>6</sup>A through the low-complexity protein hnRNPG. *Mol Cell*, 2019, 76: 70-81 e9
- [26] Huang H, Weng H, Sun W, et al. Recognition of RNA N<sup>6</sup>-methyladenosine by IGF2BP proteins enhances mRNA stability and translation. *Nat Cell Biol*, 2018, 20: 285-95
- [27] Wu B, Li L, Huang Y, et al. Readers, writers and erasers of N(6)-methylated adenosine modification. *Curr Opin Struct Biol*, 2017, 47: 67-76
- [28] Zhang X, Wei LH, Wang Y, et al. Structural insights into FTO's catalytic mechanism for the demethylation of multiple RNA substrates. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, 116: 2919-24
- [29] 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
- [30] Chen K, Lu Z, Wang X, et al. High-resolution N<sup>6</sup>-methyladenosine (m<sup>6</sup>A) map using photo-crosslinking-assisted m<sup>6</sup>A sequencing. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2015, 54: 1587-90
- [31] Linder B, Grozhik AV, Olarerin-George AO, et al. Single-nucleotide-resolution mapping of m<sup>6</sup>A and m<sup>6</sup>Am throughout the transcriptome. *Nat Methods*, 2015, 12: 767-72
- [32] Meyer KD. DART-seq: an antibody-free method for global m<sup>6</sup>A detection. *Nat Methods*, 2019, 16: 1275-80
- [33] Wang Y, Xiao Y, Dong S, et al. Antibody-free enzyme-assisted chemical approach for detection of N<sup>6</sup>-methyladenosine. *Nat Chem Biol*, 2020, 16: 896-903
- [34] Zhang Z, Chen LQ, Zhao YL, et al. Single-base mapping of m<sup>6</sup>A by an antibody-independent method. *Sci Adv*, 2019, 5: eaax0250
- [35] Xiao Y, Wang Y, Tang Q, et al. An elongation- and ligation-based qPCR amplification method for the radiolabeling-free detection of locus-specific N<sup>6</sup>-methyladenosine modification. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2018, 57: 15995-6000
- [36] Shu X, Cao J, Cheng M, et al. A metabolic labeling method detects m<sup>6</sup>A transcriptome-wide at single base resolution. *Nat Chem Biol*, 2020, 16: 887-95
- [37] 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
- [38] Wen J, Lv R, Ma H, et al. Zc3h13 regulates nuclear RNA m<sup>6</sup>A methylation and mouse embryonic stem cell self-renewal. *Mol Cell*, 2018, 69: 1028-38 e6
- [39] Geula S, Moshitch-Moshkovitz S, Dominissini D, et al. Stem cells m<sup>6</sup>A mRNA methylation facilitates resolution of naive pluripotency toward differentiation. *Science*, 2015, 347: 1002-6
- [40] Zhao BS, He C. Fate by RNA methylation: m<sup>6</sup>A steers stem cell pluripotency. *Genome Biol*, 2015, 16: 43
- [41] Aguilo F, Zhang F, Sancho A, et al. Coordination of m<sup>6</sup>A mRNA methylation and gene transcription by ZFP217 regulates pluripotency and reprogramming. *Cell Stem Cell*, 2015, 17: 689-704
- [42] Yang D, Qiao J, Wang G, et al. N<sup>6</sup>-methyladenosine modification of lincRNA 1281 is critically required for mESC differentiation potential. *Nucleic Acids Res*, 2018, 46: 3906-20
- [43] Guo M, Liu X, Zheng X, et al. m<sup>6</sup>A RNA modification determines cell fate by regulating mRNA degradation. *Cell Reprogram*, 2017, 19: 225-31
- [44] Liu J, Gao M, Xu S, et al. YTHDF2/3 are required for somatic reprogramming through different RNA deadenylation pathways. *Cell Rep*, 2020, 32: 108120
- [45] Lin Z, Hsu PJ, Xing X, et al. Mettl3-/Mettl14-mediated mRNA N<sup>6</sup>-methyladenosine modulates murine spermatogenesis. *Cell Res*, 2017, 27: 1216-30
- [46] Hsu PJ, Zhu Y, Ma H, et al. Ythdc2 is an N<sup>6</sup>-methyladenosine binding protein that regulates mammalian spermatogenesis. *Cell Res*, 2017, 27: 1115-27
- [47] Tang C, Xie Y, Yu T, et al. m<sup>6</sup>A-dependent biogenesis of circular RNAs in male germ cells. *Cell Res*, 2020, 30: 211-28
- [48] Ivanova I, Much C, Di Giacomo M, et al. The RNA m<sup>6</sup>A reader YTHDF2 is essential for the post-transcriptional regulation of the maternal transcriptome and oocyte competence. *Mol Cell*, 2017, 67: 1059-67 e4
- [49] Kasowitz SD, Ma J, Anderson SJ, et al. Nuclear m<sup>6</sup>A reader YTHDC1 regulates alternative polyadenylation and splicing during mouse oocyte development. *PLoS Genet*, 2018, 14: e1007412
- [50] Sui X, Hu Y, Ren C, et al. METTL3-mediated m<sup>6</sup>A is required for murine oocyte maturation and maternal-to-zygotic transition. *Cell Cycle*, 2020, 19: 391-404
- [51] Hu Y, Ouyang Z, Sui X, et al. Oocyte competence is maintained by m<sup>6</sup>A methyltransferase KIAA1429-mediated RNA metabolism during mouse follicular development. *Cell Death Differ*, 2020, 27: 2468-83
- [52] Zhao BS, Wang X, Beadell AV, et al. m<sup>6</sup>A-dependent maternal mRNA clearance facilitates zebrafish maternal-to-zygotic transition. *Nature*, 2017, 542: 475-8
- [53] Zhao BS, He C. "Gamete on" for m<sup>6</sup>A: YTHDF2 exerts essential functions in female fertility. *Mol Cell*, 2017, 67: 903-5
- [54] Kwon J, Jo YJ, Namgoong S, et al. Functional roles of hnRNPA2/B1 regulated by METTL3 in mammalian embryonic development. *Sci Rep*, 2019, 9: 8640
- [55] Meng TG, Lu X, Guo L, et al. Mettl14 is required for mouse postimplantation development by facilitating epiblast maturation. *FASEB J*, 2019, 33: 1179-87
- [56] Wang Y, Li Y, Yue M, et al. N<sup>6</sup>-methyladenosine RNA modification regulates embryonic neural stem cell self-renewal through histone modifications. *Nat Neurosci*, 2018, 21: 195-206
- [57] Li Y, Xia L, Tan K, et al. N<sup>6</sup>-methyladenosine co-transcriptionally directs the demethylation of histone H3K9me2. *Nat Genet*, 2020, 52: 870-7
- [58] Liu J, Dou X, Chen C, et al. N<sup>6</sup>-methyladenosine of chromosome-associated regulatory RNA regulates chromatin state and transcription. *Science*, 2020, 367: 580-6
- [59] Liu J, Gao M, He J, et al. The RNA m<sup>6</sup>A reader YTHDC1 silences retrotransposons and guards ES cell identity. *Nature*, 2021, 591: 322-6
- [60] Xu W, Li J, He C, et al. METTL3 regulates heterochromatin in mouse embryonic stem cells. *Nature*, 2021, 591: 317-21
- [61] Xing M, Liu Q, Mao C, et al. The 18S rRNA m<sup>6</sup>A methyltransferase METTL5 promotes mouse embryonic stem cell differentiation. *EMBO Rep*, 2020, 21: e49863
- [62] van Tran N, Ernst FGM, Hawley BR, et al. The human 18S rRNA m<sup>6</sup>A methyltransferase METTL5 is stabilized by TRMT112. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47: 7719-33
- [63] Ma H, Wang X, Cai J, et al. N<sup>6</sup>-methyladenosine methyltransferase ZCCHC4 mediates ribosomal RNA methylation. *Nat Chem Biol*, 2019, 15: 88-94
- [64] Chen M, Wei L, Law CT, et al. RNA N<sup>6</sup>-methyladenosine methyltransferase-like 3 promotes liver cancer progression

- through YTHDF2-dependent posttranscriptional silencing of SOCS2. *Hepatology*, 2018, 67: 2254-70
- [65] Li J, Han Y, Zhang H, et al. The m<sup>6</sup>A demethylase FTO promotes the growth of lung cancer cells by regulating the m<sup>6</sup>A level of USP7 mRNA. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 512: 479-85
- [66] Zhang C, Zhang M, Ge S, et al. Reduced m<sup>6</sup>A modification predicts malignant phenotypes and augmented Wnt/PI3K-Akt signaling in gastric cancer. *Cancer Med*, 2019, 8: 4766-81
- [67] Li HB, Tong J, Zhu S, et al. m<sup>6</sup>A mRNA methylation controls T cell homeostasis by targeting the IL-7/STAT5/SOCS pathways. *Nature*, 2017, 548: 338-42
- [68] Zhou J, Wan J, Gao X, et al. Dynamic m<sup>6</sup>A mRNA methylation directs translational control of heat shock response. *Nature*, 2015, 526: 591-4
- [69] Zhou L, Tian S, Qin G. RNA methylomes reveal the m<sup>6</sup>A-mediated regulation of DNA demethylase gene SIDML2 in tomato fruit ripening. *Genome Biol*, 2019, 20: 156