



RNA化学修饰的调控、检测与功能应用

肖叶^{2,3†}, 邓启东^{1,2†}, 林汇源^{1,2†}, 陈雪梅^{1,2,3}, 胡昊^{1,2,3*}, 刘君^{1,2,3*}, 伊成器^{1,2,3*}

1. 北京大学生命科学学院, 基因功能研究与操控全国重点实验室, 北京 100871

2. 北京大学核糖核酸北京研究中心, 北京 100871

3. 北大-清华生命科学联合中心, 北京 100871

† 同等贡献

* 联系人, E-mail: hao.hu@pku.edu.cn; junliu1223@pku.edu.cn; chengqi.yi@pku.edu.cn

收稿日期: 2025-01-13; 接受日期: 2025-03-14; 网络版发表日期: 2025-04-09

摘要 基因表达调控是影响动植物生长发育的重要影响因素。RNA修饰作为表观遗传学的重要组成部分, 在不改变遗传序列信息的情况下通过精妙调控RNA分子命运影响基因表达, 并贯穿于RNA生成、转运、功能实现及降解的全过程。本文系统地回顾了过去五年间RNA上5'端非典型帽子修饰(如NAD⁺)以及RNA内部修饰(包括m⁶A, m⁵C, Ψ, m¹A, m⁶Am)的前沿进展, 探讨了其调控机制、检测技术、分子作用机理、生物学功能以及其潜在的未来发展方向。鉴于RNA修饰在细胞功能与生理调控中的作用日益显著, 本文还探讨了它们在作物品种改良, 人类疾病诊断、治疗与预防方面的应用前景。展望未来, 本文特别强调了新修饰如RNA糖基化未来在机制与功能研究方面的潜在突破。随着对RNA新修饰、新功能的深入研究以及新兴测序技术的发展, 我们有理由相信RNA修饰在疾病治疗和生物工程中展现出更大的应用潜力。

关键词 核糖核酸, 化学修饰, 非典型加帽, 内部修饰, 调控机制, 检测手段, 生物学功能

作为分子生物学的基本理论, 经典的中心法则奠定了现代生物学的基础, 它清晰地描绘了遗传信息从脱氧核糖核酸(DNA)转录为核糖核酸(RNA), 并最终翻译为蛋白质的基本流程。在这一过程中, RNA作为信息传递的关键媒介, 其角色至关重要。随着研究的深入, 科学家们逐渐揭示了一个更为复杂而精细的层面——RNA的表观遗传修饰系统^[1]。这一系统超越了传统的遗传密码框架, 通过化学修饰的方式, 极大地扩展了RNA的信息编码与调控能力。自1951年首次在RNA上发现化学修饰以来, 目前已鉴定出超过170种天然存在的RNA修饰类

型^[2], 这些修饰广泛分布于RNA的各个位置, 包括末端化学修饰(如5'端7-甲基鸟嘌呤m⁷G、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸NAD⁺等帽子修饰)及内部碱基修饰(如N⁶-甲基腺嘌呤m⁶A、5-甲基胞嘧啶m⁵C等), 共同构成了RNA分子上复杂而精密的调控网络(图1)。

本文围绕mRNA的5'端非典型帽子修饰(NAD⁺等)以及RNA内部修饰(m⁶A, m⁵C, Ψ, m¹A, m⁶Am), 阐述了其生物学机制、高通量测序技术(表1)以及生物学功能方面近五年内的研究进展, 旨在促进对RNA表观遗传修饰及其生物学功能的深入理解。

引用格式: 肖叶, 邓启东, 林汇源, 等. RNA化学修饰的调控、检测与功能应用. 中国科学: 生命科学, 2025, 55: 971–994

Xiao Y, Deng Q D, Lin H Y, et al. Mechanism, detection, and functional application of RNA chemical modifications (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2025, 55: 971–994, doi: 10.1360/SSV-2024-0283

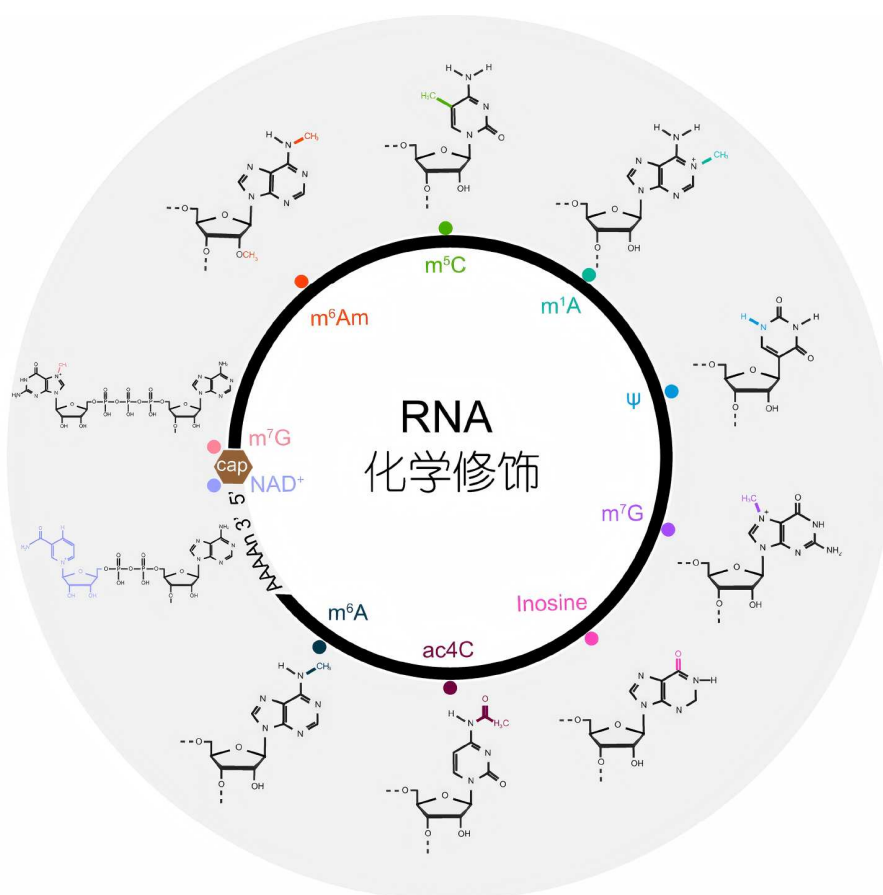


图 1 RNA化学修饰类型

Figure 1 Types of RNA chemical modifications

1 RNA 5'端非典型帽子修饰

RNA 5'端帽子结构对RNA的命运具有至关重要的作用,它参与了多种RNA代谢过程,包括多腺苷酸化、前体信使RNA(pre-mRNA)剪接、信使RNA(mRNA)输出、转录本稳定性以及翻译起始等^[3]。长期以来, m⁷G帽子被认为是唯一的RNA 5'帽子结构,且仅存在于真核生物中,而原核生物RNA的5'端通常为裸露的三磷酸RNA(ppp-RNA)基团。近年来,人们发现参与氧化还原反应的一些特殊的腺嘌呤核苷酸代谢物,如NAD⁺、3'-脱磷酸辅酶A(dpCoA)等也可以在细菌RNA核糖核酸聚合酶(RNAP)以及真核生物RNA核糖核酸聚合酶II(RNAPII)的催化作用下作为首个核苷酸代替三磷酸腺苷(ATP)起始RNA转录^[4]。2009年, Liu团队^[5]将大肠杆菌(*Escherichia coli*)和委内瑞拉链霉菌

(*Streptomyces venezuelae*)总RNA用核酸酶P1水解成小分子物质并借助液相色谱-质谱联用(LC-MS)技术,首次在体内鉴定到RNA 5'端存在NAD⁺与dpCoA化学修饰。随后,利用类似的方法在酵母^[6]、小鼠^[7]、人源细胞^[8]以及拟南芥^[9]等多种生物中也相继发现了NAD⁺加帽修饰RNA(NAD-RNA)的存在。同时,更多的代谢物,如黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)、尿嘧啶二磷酸葡萄糖(UDP-Glc)^[10]等物质也被发现可以在RNA的5'端加帽。这类不同于常规m⁷G的帽子结构被统称为非典型加帽修饰^[11]。其中, NAD⁺修饰是目前研究最为深入的一类非典型加帽修饰。

1.1 NAD⁺加帽修饰的调控机制

经典的m⁷G帽子结构是在转录产物长度达到25 nt后添加在RNA 5'末端的^[12]。不同于m⁷G-RNA的转录时

表 1 本文提及的RNA修饰及检测原理总述

Table 1 Overview of RNA modification and detection principles mentioned in this review

修饰类型	方法	检测原理
m ⁶ A	MeRIP-seq/m ⁶ A-seq	利用抗体特异性识别结合细胞内含有m ⁶ A的RNA片段, 通过免疫共沉淀富集m ⁶ A标记的RNA, 随后进行高通量测序, 从而定位m ⁶ A修饰的大致位置, 分辨率在100~200 nt
	PA-m ⁶ A-seq	将光敏感的核苷类似物4-硫代尿苷(4sU)掺入新生poly(A) RNA, UV引发交联并免疫沉淀, 通过核糖核酸酶T1消化RNA到30 nt左右后经过高通量测序, 4sU会在交联位点产生T到C的碱基错配以准确鉴定m ⁶ A位点
	m ⁶ A-CLIP/miCLIP	通过UV交联RNA和m ⁶ A抗体的结合位点, RNA逆转录过程中, 抗体结合的特异性位点会引入C-T转换或者导致截短, 从而准确鉴定m ⁶ A位点
	m ⁶ A-LAIC-seq	不打断RNA, 同时对免疫沉淀下的m ⁶ A阳性部分和上清液, 即m ⁶ A阴性部分的完整全长转录本进行测序, 以在转录组范围内区分甲基化与非甲基化转录本
	m ⁶ A-seq2	将不同样本连接含特异性条形码的接头, 混合后进行合并样本的IP, 在减少样品间技术误差的同时, 将单个样品的起始量降低为50 ng
	MAZTER-seq/m ⁶ A-REF-seq	通过对于m ⁶ A具有敏感性的RNA内切酶MazF, 识别切割无甲基化修饰的ACA位点, 对切割后的RNA进行高通量测序, 以确定未被切割的ACA位点实现单碱基分辨率的m ⁶ A
	DART-seq	将胞苷脱氨酶APOBEC1和m ⁶ A识别的YTH结构域融合, 在细胞内将m ⁶ A相邻位点诱导C-U转换以鉴定m ⁶ A位点
	m ⁶ A-SEAL	利用m ⁶ A去甲基酶FTO蛋白作为催化剂辅助氧化m ⁶ A为N ⁶ -羟甲基腺嘌呤(hm ⁶ A), 之后利用二硫苏糖醇(DTT)的巯基与hm ⁶ A发生加成反应, 将其转化为稳定的巯基加成产物dm ⁶ A, 与甲硫硫代磺酸反应带上生物素, 可以被链袂亲和素捕获, 富集用于进一步测序和分析
	m ⁶ A-label-seq	利用细胞内自身代谢作用形成allyl-SAM或allyl-SeAM, 将原本假定的m ⁶ A的位点代谢性地修饰为N ⁶ -烯丙基腺苷(a ⁶ A), 之后在逆转录过程中碘化诱导a ⁶ A的cDNA对应位点错误掺入, 以检测碱基分辨率位点
	m ⁶ A-SAC-seq	使用特异性甲基转移酶MjDim1对Gm ⁶ AC基序上的m ⁶ A添加丙烯基标记成为N ⁶ -丙烯基-甲基腺苷(am ⁶ A), 使用I ₂ 处理产生N ¹ ,N ⁶ -环化的腺苷衍生物, 在逆转录时引入突变, 从而实现在单核苷酸分辨率水平的检测
Ψ	Nanopore direct RNA sequencing	无需逆转录和扩增, 直接通过纳米孔读取全长转录本, 通过电信号差异对m ⁶ A修饰进行单碱基水平检测
	eTAM-seq/GLORI	利用乙二醇和亚硝酸盐的化学反应, 或定向进化的腺苷脱氨酶TadA 8.20酶促脱氨反应将未甲基化的A高效脱氨为I, 在测序过程中被识别为G, 形成未甲基化区域A到G的转换, 实现了对m ⁶ A修饰位点的高精度定量检测
	Ψ-seq, Pseudo-seq, PSI-seq, CeU-seq	Ψ可被CMC/N3-CMC标记, 诱导逆转录终止
m ⁶ Am	BID-seq, PRAISE	Ψ经过重亚硫酸盐处理后形成开环加合物, 在逆转录时会诱导缺失信号
	BACS	Ψ与2-溴丙烯酰胺的环化反应, 导致逆转录时Ψ被识别为胞嘧啶
	m ⁶ Am-Exo-seq, miCLIP	含修饰的RNA片段可通过m ⁶ A特异性抗体免疫沉淀法富集
m ¹ A	m ⁶ Am-seq	含修饰的RNA片段可通过m ⁶ A特异性抗体免疫沉淀法富集, 体外选择性去甲基化m ⁶ Am以区分m ⁶ Am和m ⁶ A
	m ¹ A-MAP, m ¹ A-IP-seq	m ¹ A会诱导逆转录时出现错配, 结合m ¹ A特异性抗体富集和AlkB 去甲基化酶处理作为阴性对照
	m ¹ A-seq-TGIRT	m ¹ A会诱导逆转录时出现错配, 结合m ¹ A特异性抗体富集和Dimroth重排将m ¹ A转化为m ⁶ A作为阴性对照
	m ¹ A-quant-seq	m ¹ A会诱导逆转录时出现错配, 结合AlkB去甲基化酶处理作为阴性对照, 添加spike-in实现对修饰水平的定量
	red-m ¹ A-seq	m ¹ A被NaBH ₄ 还原后, 能够在多种逆转录酶的反应体系中出现错配
NAD-RNA	NAD captureSeq	ADPRC在炔醇催化下将RNA的5'NAD ⁺ 转糖基化, 生成具有炔烃基团的RNA. 随后通过CuAAC反应对NAD-RNA进行生物素酰化与后续分离
	SPAAC-NAD-seq	利用anti-m ⁷ G抗体特异性去除总mRNA中的m ⁷ G-RNA, 随后利用SPAAC反应对NAD-RNA进行生物素酰化与后续分离
	NADcapPro	使用SPAAC前利用Dcs1对m ⁷ G帽子进行水解, 并进一步利用IRDye®800CW链霉亲和素检测
	NAD-tagSeq	在经CuAAC或SPAAC处理后, 将RNA的5'端连接一段tagRNA, 富集后通过Nanopore完成测序
	One-seq	利用HEEB将NAD ⁺ 中的烟酰胺部分进行取代, 后对富集得到的RNA通过NudC脱帽酶进行特异性洗脱并测序
	CapZyme-Seq	通过CIP处理去除5'p-RNA, 再利用脱帽酶水解NAD-RNA, 形成新的5'p-RNA, 再将新生成的5'p-RNA与一段5'RNA寡核苷酸接头连接, 之后进行测序

加帽, NAD-RNA的加帽可能存在两种形式, 最主要的一种为从头加帽形式(*ab initio* capping, AIC), 即在转录开始时即被RNAP识别, 代替ATP作为首位碱基共价结合到原核和真核的5'末端(图2)^[13]。同时, 目前研究表明, NAD从头加帽受到多种因素的影响, 包括RNAP活性位点氨基酸的种类、启动子序列^[13]、细胞中NAD⁺和ATP的相对浓度^[14]以及DNA的超螺旋状态^[15]等。体外转录实验证明, 真核生物酵母和人的线粒体RNAP也可利用NAD⁺合成NAD-RNA, 且比核RNAP II更加高效^[14]。同时, 转录起始位点(TSS)上游-1位、下游+1位、+2位的碱基类型对加帽效率有显著的影响^[16]。此外, 细胞代谢物浓度越高似乎被掺入到RNA末端的概率也越高, 从而影响加帽效率^[14]。近期研究表明, NAD⁺也可通过转录后途径进行加帽, 研究人员发现, 被核酸外切酶加工过的哺乳动物snoRNA(small

nucleolar RNA)和scaRNA(small cajal body RNA)的5'端可以被NAD⁺转录后修饰, 但关于其具体机制还有待进一步验证和探索^[8]。

除加帽以外, NAD-RNA也可在脱帽酶的作用下实现动态可逆调控。根据脱帽产物的不同, NAD-RNA脱帽可分为两种类型, 即deNADding和deNMning。deNADding主要依赖于DXO/Rai家族等脱帽酶, 它们可以水解二核苷酸和剩余RNA间的磷酸二酯键, 从而将整个NAD⁺部分去除, 这类酶包括真菌Rai1和Dxo1、哺乳动物DXO^[8]和植物AtDXO1^[17]。另一方面, deNMning则主要依赖于Nudix 家族, 如*E.coli* NudC^[18]、哺乳动物Nudt12^[19]和拟南芥Nudt19^[20], 这类酶具有焦磷酸水解活性, 可以释放烟酰胺单核苷酸(NMN)部分, 保留原始NAD⁺基团的腺嘌呤单核苷酸。此外, 本团队近期研究发现, 来自细菌和古细菌的TIR

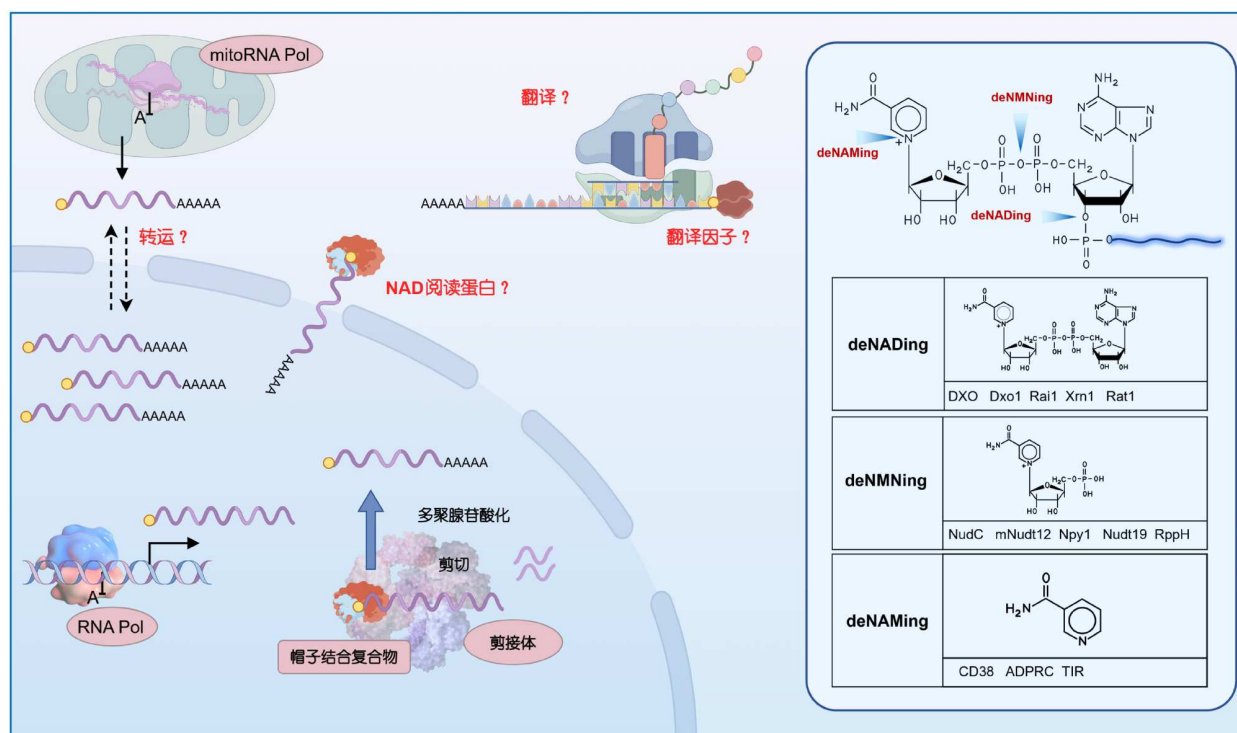


图2 NAD-RNA体内合成、转运、翻译及脱帽机制。生物体内主要采用从头加帽的方式进行合成NAD-RNA, 在转录开始时即被RNA聚合酶识别, 代替ATP作为首位碱基共价结合到真核和原核的5'末端; 并由帽结合复合体进行加工、出核、转运及翻译; NAD-RNA存在三种脱帽机制, 即deNADding(释放出完整的NAD⁺结构)、deNMning(释放NMN核AMP-RNA)、deNAMing(释放NAM和cADPR-RNA及其类似物)

Figure 2 NAD-RNA synthesis, transport, translation and decapping mechanism *in vivo*. NAD-RNA is mainly synthesized *in vivo* by *ab initio* capping. It is recognized by RNA polymerase at the beginning of transcription and covalently binds to the 5' end of eukaryotic and prokaryotic cells instead of ATP as the first base. It is processed, exported from the nucleus, transported and translated by the cap-binding complex. There are three decapping mechanisms for NAD-RNA, namely deNADding (releasing the complete NAD⁺ structure), deNMning (releasing NMN nuclear AMP-RNA), and deNAMing (releasing NAM and cADPR-RNA and its analogs)

结构域蛋白具有强烈的NAD-RNA脱帽酶活性^[21], 能够将NAD-RNA分离为烟酰胺(NAM)基团和cADPR-RNA或者其变体, 属于一种新型的脱帽机制, 类似的还有CD38^[22]及腺苷二磷酸核糖环化酶ADPRC^[11]等酶。然而, 目前关于体内NAD-RNA加帽和脱帽等代谢过程及其调控途径的研究仍处于起步阶段, 有待在后续研究中进一步解析。值得注意的, AtDXO1不仅被证实是一种NAD-RNA脱帽酶, 还被报道参与m⁷G帽子的形成。近期研究表明, AtDXO1能与鸟苷-7甲基转移酶(AtRNMT1)结合并激活其活性, 催化鸟苷帽转化为m⁷G帽子, 这暗示了NAD⁺脱帽与m⁷G加帽之间可能存在相互关联^[23], 为深入解析RNA加帽和脱帽的基因调控机制提供了新线索。

1.2 NAD⁺加帽修饰RNA的高通量测序技术

为深入了解NAD-RNA在生物体内参与的代谢及生理活动, 研究人员开发出一系列针对NAD-RNA进行序列信息深度分析的高通量测序技术(图3), 并成功应用于大肠杆菌、酵母、小鼠、人源细胞和拟南芥等多种生物体中, 极大地推动了对非典型RNA加帽修饰生物学功能及调控机制的理解。

2015年, 研究人员首次开发了针对NAD-RNA的高通量测序技术NAD captureSeq(图3A)^[24]。该技术利用ADPRC在炔醇催化下将RNA的5' NAD⁺转糖基化, 生成具有炔基基团的RNA。随后通过铜催化的叠氮-炔点击化学反应(CuAAC), 将炔基RNA转化为生物素标记的RNA。最后借助链霉素亲和素珠进行捕捉和富集, 并结合高通量测序, 实现对全基因组范围内NAD-RNA的鉴定和分析。该方法首次鉴定到大肠杆菌中发生NAD⁺加帽的主要为参与胁迫应答的sRNAs和编码参与代谢的酶的mRNAs, 并发现植物中NAD-RNA广泛存在于除叶绿体RNA外的整个转录组中^[9]。尽管该技术已成功应用于多种物种, 揭示了它们的NAD-RNA组成特征, 但在建库过程中引入的Cu²⁺会引起RNA的片段化, 从而不利于获取完整的RNA信息, 同时该方法可同时识别m⁷G-RNA从而存在较大的假阳性, 使得在真核生物中的NAD-RNA检测准确率较低。基于以上缺陷, 2021年本团队研发了 SPAAC-NAD-seq(图3D)^[25], 该技术首先利用anti-m⁷G抗体特异性去除总mRNA中的m⁷G-RNA, 随后利用无需Cu²⁺参与的应变促进炔叠氮化物环加成反应(SPAAC)对NAD-

RNA进行生物素酰化与后续分离。该技术不仅提升了富集的特异性, 也避免了Cu²⁺对RNA的降解, 保留了全长序列信息, 从而大大提升了鉴定的准确性和灵敏度。利用该技术更新了拟南芥新的NAD-RNA图谱, 并发现利用过去的NAD captureSeq预测到的NAD-RNA所参与的生物学过程由于受到m⁷G-RNA的干扰而并不准确。2023年, 研究人员在该方法的基础上进行改进, 开发了NADcapPro技术(图3E)^[26]。该方法在使用SPAAC前利用Dcs1对m⁷G帽子进行水解, 并进一步利用基于高灵敏度的IRDye®800CW链霉亲和素检测来可视化低至15 fmol的NAD-RNAs, 并成功地在酵母中鉴定到多个未被鉴定到的NAD-RNA。

由于NAD captureSeq和SPAAC-NAD-seq无法很好地检测到5'末端序列信息, 研究人员分别于2019年(图3B)^[27]和2021年(图3C)^[28], 针对上述两种方法开发了NAD-tagSeq。该方法在经CuAAC或SPAAC处理后, 将RNA的5'端连接一段合成的RNA序列标签(tagRNA), 在经过富集后通过Nanopore三代测序完成序列信息鉴定。该技术不仅进一步简化了测序流程, 还能得到NAD⁺帽子附近精准的序列信息, 目前已在拟南芥、大肠杆菌中得到应用。

虽然SPAAC-NAD-seq相比NAD captureSeq而言减轻了非特异性富集, 但同时也增加了实验复杂度, 并需要更多的mRNA用于建库。为解决这些问题, 2023年, 研究人员又研发了一种新的技术One-seq(图3F)^[29]。该技术利用N-[2-羟基乙氧基]-生物素酰胺(HEEB)在ADPRC存在时可将NAD⁺中的烟酰胺部分进行取代, 后对富集得到的RNA通过NudC脱帽酶进行特异性洗脱并测序, 从而实现了NAD-RNA特异性富集, 又极大简化了实验流程。利用该方法, 研究人员成功地在小鼠肝脏中鉴定到1000多个以前未知的NAD-RNA, 并揭示了NAD-RNA随年龄增长的表现转录组范围的动态变化。为进一步提高数据分析效率, 后续该团队又针对One-seq开发了一个专门的分析工具enONE^[30], 实现了对不同组分间NAD-RNA数据的降噪及定量评估。

此外, 基于RNA脱帽酶, 研究人员开发了Cap-Zyme-Seq方法(图3G)^[16]。该技术首先对RNA进行碱性磷酸酶CIP处理去除5'p-RNA, 其次利用已报道的脱帽酶(如NudC, Rai1)水解NAD-RNA, 形成新的5'p-RNA, 再将新生成的5'p-RNA与一段5'RNA寡核苷酸接头连

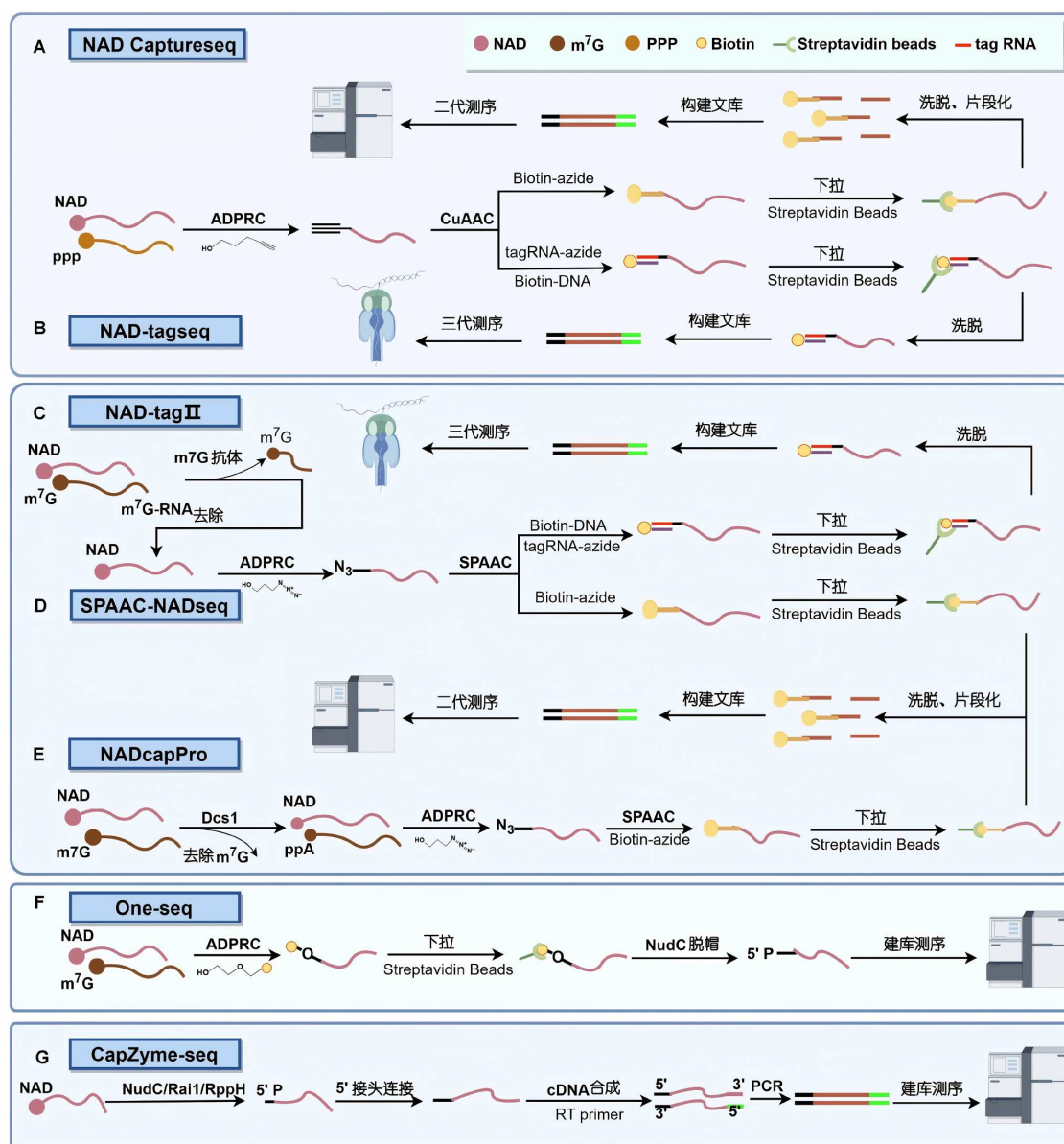


图 3 NAD-RNA测序技术原理及流程. A: NAD capture: 利用ADPRC在炔烃催化下将RNA的5'端转糖基化, 后通过CuAAC反应将炔烃RNA转化为生物素标记的RNA, 最后将标记的RNA进行富集完成建库测序; B: NAD-tag-seq: 经CuAAC反应后, 将RNA 5'端与tagRNA连接, 富集后可进行Nanopore三代测序; C: NAD-tagII: 经SPAAC反应后, 将RNA 5'端与tagRNA连接; D: SPAAC-NADseq: 首先利用anti-m⁷G抗体特异性去除总mRNA中的m⁷G-RNA, 随后利用SPAAC对NAD-RNA进行生物素酰化与后续分离; E: NADcapPro: 在使用SPAAC前利用Dcs1对m⁷G帽子进行水解, 并利用IRDye®800CW链霉亲和素检测来可视化; F: One-seq: 利用HEEB将NAD⁺中的烟酰胺部分进行取代, 后对富集得到的RNA通过NudC进行特异性洗脱并测序; G: CapZyme-seq: 对RNA进行CIP处理, 再利用已报道的脱帽酶水解NAD-RNA, 形成新的5'p-RNA并与接头连接, 富集后完成建库测序

Figure 3 Principle and process of NAD-RNA sequencing technology. A: NAD capture: ADPRC is used to transglycosylate the 5' end of RNA under alkyne catalysis, and then the alkyne RNA is converted into biotin-labeled RNA through CuAAC reaction, and finally the labeled RNA is enriched to complete library construction and sequencing; B: NAD-tag-seq: after CuAAC reaction, the 5' end of RNA is connected to tagRNA, and Nanopore third-generation sequencing can be performed after enrichment; C: NAD-tagII: after SPAAC reaction, the 5' end of RNA is connected to tagRNA; D: SPAAC-NADseq: first, anti-m⁷G antibody is used to specifically remove m⁷G-RNA from total mRNA, and then SPAAC is used to biotinylate NAD-RNA and subsequently separate it; E: NADcapPro: the m⁷G cap is hydrolyzed by Dcs1 before using SPAAC, and visualized using IRDye®800CW streptavidin detection; F: One-seq: use HEEB to replace the nicotinamide part of NAD⁺, then specifically elute and sequence the enriched RNA through NudC; G: CapZyme-seq: CIP treatment of RNA, then use the reported decapping enzyme to hydrolyze NAD-RNA to form new 5'p-RNA and connect it to the adapter, and complete library construction and sequencing after enrichment

接,之后将与RNA寡核苷酸连接的RNA进行建库测序.该技术可成功地识别大肠杆菌中NAD-RNA的转录起始位点以及启动子序列偏好性,对研究NAD-RNA的转录起始因素有重要的指示作用.但该技术最大的缺点是使用的脱帽酶水解活性并不特异,也会裂解其他非典型帽子,因此无法排除文库中是否有其他非典型帽子修饰RNA的干扰.

1.3 NAD⁺加帽修饰的功能研究

1.3.1 NAD⁺加帽修饰的分子功能

RNA 5'端结构对于维持RNA的稳定性有重要作用.原核生物大肠杆菌中,5' ppp-RNA通常比5' p-RNA具有更长的半衰期,而在真核生物中,mRNA主要受m⁷G帽子保护而维持其稳定性.然而,非典型RNA帽子是否也能调节mRNA稳定性尚存在一定的争议.在大肠杆菌中,三磷酸化的RNA的5'末端可以通过Nudix蛋白焦磷酸水解酶(RppH)的水解作用产生5' p-RNA,从而触发RNase E介导的降解;类似地,在枯草杆菌(*Bacillus subtilis*)中,NAD⁺帽子修饰同样提高了mRNA的稳定性,使其免受RNase J1的外切核酸酶降解,后者更倾向于降解5'单磷酸化的RNA^[31].但在真核生物中,目前的研究结论刚好相反,NAD⁺帽有效促进了RNA的降解.在人类细胞中,转染的NAD⁺帽修饰的聚腺苷酸化的荧光素酶mRNA的稳定性较低,因为NAD-RNA可以被DXO酶进行deNADding形式脱帽后又进一步被DXO介导的5'到3'外切酶活性进行降解^[32].这表明真核和原核生物中NAD⁺加帽修饰似乎存在不同的生物学意义.

翻译起始对于蛋白质的生成至关重要.真核生物中,翻译起始主要通过mRNA 5'末端m⁷G帽与eIF4F蛋白复合体的结合来实现,该复合体负责招募与启动子预结合的核糖体亚基.而非典型帽子结构是否能被类似翻译复合体识别还未有研究,因此关于NAD-RNA是否可以被翻译,目前尚无定论.体外翻译实验表明,酵母细胞核中NAD-RNA无法被翻译,产生的蛋白质比5' ppp-RNA还要少^[33].同时,转染到细胞中的外源NAD⁺加帽修饰聚腺苷酸化的荧光素酶mRNA显示的翻译信号也不比未加帽的mRNA强,也暗示NAD-RNA可能无法启动翻译^[34].然而,这项研究使用的是人工合成的、外源性的NAD-RNA,可能无法反映体内的自然条件.在植物中的研究表明,NAD-RNA在植物解旋

化活性多聚核糖体富集,并且大多数被NAD⁺加帽的真核RNA具有蛋白质编码能力^[9],这暗示内源性NAD-RNA具有被翻译的可能.另外,通过体外翻译实验和在大肠杆菌中表达含有 λcI 基因序列的lacZ融合基因,发现NAD-RNA能够被70S核糖体有效识别,NAD修饰并不妨碍无领袖序列mRNA的翻译过程^[15].因此,NAD-RNA的翻译机制如何,是否存在翻译识别复合物,以及真核与原核生物翻译的异同点仍有待探索.

1.3.2 NAD⁺加帽修饰的生物学功能

细胞内的NAD⁺在代谢过程中发挥着至关重要的作用,并作为连接细胞代谢、转录水平和环境刺激的因素.由于NAD⁺在细胞中扮演着重要的角色,NAD-RNA的丰度和含量也可能受到环境和生长阶段的影响.大肠杆菌生长过程中,NAD-RNA在稳定生长期的含量比指数生长期高出2倍^[28].在含有不同类型营养物质的合成培养基中培养的酵母细胞,其NAD-RNA数量及丰度也存在显著差别^[6].人源细胞暴露于热休克或葡萄糖不足环境中,NAD-RNA含量也会明显激增^[19].同样,拟南芥在ABA胁迫下,相关mRNA的NAD⁺加帽减少,促使mRNA稳定性增强从而应对ABA的胁迫^[35].这些现象说明NAD-RNA的合成受环境调控,并反映细胞的生长和代谢状况.

而关于NAD-RNA的生物学功能的研究目前在病毒系统中较为深入.NAD-RNA的含量在T4噬菌体感染大肠杆菌过程中会随感染阶段的进行而在宿主和噬菌体体内发生显著变化,证明了NAD-RNA在噬菌体感染过程中可能发挥了重要作用^[36].同时,在T4噬菌体感染大肠杆菌过程中,NAD-RNA可以通过来自T4噬菌体的腺苷二磷酸-核糖基转移酶(ADP-ribosyltransferase, ADP-ART)ModB,将整个RNA链连接到细菌核糖体蛋白上,完成蛋白质的“RNA化”过程,为噬菌体调节宿主翻译机制提供了一种策略^[37].而由于ADP-ART作用的普遍性,以NAD-RNA为媒介实现RNA与蛋白质的互作对生物过程有着重要意义.此外,通过对HIV-1感染和未感染的细胞进行测序发现,NAD⁺帽的存在降低了HIV-1前体mRNA的稳定性,而过表达DXO脱帽酶能进一步降低NAD-RNA的含量从而导致HIV-1感染性增加,表明NAD加帽修饰对HIV-1感染具有负调控作用^[38].而在另一种细菌金黄色葡萄球菌RNA III中,NAD⁺帽修饰的比例改变会影响该菌的细胞毒

性^[39]。以上证据表明, NAD-RNA在病毒侵染及其致病性等方面均发挥了重要作用。但目前关于其功能研究仍处于起步阶段, 尤其在真核生物中的生物学意义有待于研究人员进行更为深入和系统的探索。

1.4 小结

自2009年NAD⁺等非典型加帽修饰被鉴定以来, 科学界已经证实了这类修饰在生物体内的广泛存在性。尽管关于NAD-RNA等的研究已取得显著进展, 但仍有几个关键问题亟待进一步探索。(i) 帽子结构的选择机制: 生物体如何根据需要选择不同的RNA典型与非典型帽子结构; (ii) 翻译机制与识别机制: NAD-RNA等非典型加帽修饰是否参与翻译过程, 是否存在某种独特的识别机制; (iii) 脱帽酶的特异性识别与调控机制: 脱帽酶如何特异性地识别并调控NAD-RNA, 以及这种调控如何执行其生物学功能等问题。除上述所述NAD-RNA外, 生物体内还广泛存在着FAD, dpCoA, UDPGluc等其他非典型加帽修饰, 但是含量相比NAD-RNA较低, 目前亟待开发针对这些非典型加帽修饰RNA的高效测序技术, 并对它们的加帽过程和调控机制以及潜在的生物学功能进行更深入的探索。

2 m⁶A修饰

m⁶A是真核生物中mRNA上最丰富的内部修饰之一。m⁶A在转录组上分布并非随机, 而是倾向于出现在特定的序列模式DRACH中(D代表A, G或T; R代表A或G; H代表A, C或U), 并且在长内部外显子及3'非翻译区(尤其在终止密码子周围)显著富集^[40~42]。

m⁶A甲基化修饰是表观转录组调控机制中的一个重要组成部分。越来越多的证据表明, m⁶A修饰在多种生理和病理过程中扮演着重要的角色, 包括但不限于疾病发生发展、细胞命运决定等, 因此解析m⁶A修饰的基因表达调控机制至关重要。

2.1 m⁶A修饰的调控机制

从分子水平来看, m⁶A由经典的甲基转移酶复合物催化生成, 其中甲基转移酶样蛋白3(methyltransferase-like protein 3, METTL3)和甲基转移酶样蛋白14(methyltransferase-like protein 14, METTL14)为核心组

分, 此外还包含其他辅助调节因子, 如Wilms瘤1-相关蛋白(Wilms' tumor 1-associating protein, WTAP)、KIAA1429(也称VIRMA)、含锌指CCCH型13(zinc finger CCCH-type containing 13, ZC3H13)、Cbl原癌基因样1(Cbl proto-oncogene like 1, CBLL1, 也称HAKAI)及RNA结合域蛋白15(RBM15)和RNA结合域蛋白15B(RBM15B)等^[43]。此外, 还有其他较为独立的甲基转移酶, 包括甲基转移酶样蛋白16(methyltransferase-like protein 16, MTTL16)、甲基转移酶样蛋白5(methyltransferase-like protein 5, METTL5)和含锌指CCHC型4(zinc finger CCHC-type containing 4, ZCCH4), 分别催化一些结构化RNA(如U6 snRNA, 18S rRNA和28S rRNA等)上m⁶A的形成^[44~46]。而m⁶A的去除主要依赖于去甲基化酶脂肪肥胖相关蛋白(fat mass obesity-associated protein, FTO)和AlkB同源蛋白5(AlkB homolog 5, ALKBH5)的作用来实现^[47,48]。

细胞内存在一系列能够特异性识别并结合至含有m⁶A标记的RNA上的蛋白质, 这些蛋白通过影响pre-mRNA剪接^[49,50]、出核^[51]、翻译效率^[52]、RNA稳定性^[53]以及miRNA生成等^[54]多个环节, 广泛地参与到调控基因表达的过程中, 其中包括真核生物的神经系统发育、热休克反应^[55]、肿瘤转移和抗肿瘤免疫^[56]等众多重要的生理和病理学过程, 因此m⁶A修饰及其调控酶有望成为未来疾病治疗和生物技术应用的重要靶点。

2.2 m⁶A修饰RNA的高通量测序技术

m⁶A的效应蛋白及其调控的RNA底物在不同生物系统中表现出高度异质性, 这表明m⁶A修饰的调控机制具有多样性和可调节性, 且受特定细胞环境的影响。为全面解析转录组中的m⁶A修饰, 并深入理解其在不同生物系统中的生理和病理功能, 亟需开发更高灵敏度的高通量m⁶A检测方法。

2.2.1 基于m⁶A抗体的测序技术

最早采用m⁶A抗体进行高通量测序的技术是MeRIP-seq(或称m⁶A-seq)^[40,41], 该方法由于操作简便、成熟且商业化, 成为目前最常用的m⁶A测序技术。但其分辨率较低, 仅能提供大约100~200 nt分辨率的m⁶A修饰信息。为提高分辨率, 研究者们开发出了基于抗体/RNA光交联的新技术, 如PA-m⁶A-seq^[57], miCLIP^[58],

m⁶A-CLIP^[59]等, 这些技术能够更加精确地定位m⁶A修饰位点. 此外, 还出现了在转录组范围内区分甲基化与非甲基化转录本比例的m⁶A-LAIC-seq^[60]以及通过添加条形码(barcode)区分混合RNA样本的m⁶A-seq2(图4A)^[61]. 尽管如此, 基于抗体的检测方法仍然存在一些局限性, 如抗体质量难以控制、分辨率有限、难以精确定量, 以及抗体可能与某些特定RNA序列或结构非特异性结合等, 从而影响m⁶A修饰检测的准确性.

2.2.2 不依赖于m⁶A抗体的检测技术

近年来, 越来越多不依赖m⁶A抗体的检测技术被开发出来. 例如, MAZTER-seq^[62]和m⁶A-REF-seq^[63]利用MazF内切核糖核酸酶选择性地未甲基化的ACA基序处切割RNA, 从而实现对m⁶A修饰位点的单碱基分辨率检测. DART-seq通过将APOBEC1胞苷脱氨酶与m⁶A的YTH结构域融合, 并瞬时表达, 能够实现m⁶A残基邻近位点的胞嘧啶(C)脱氨形成尿嘧啶(U), 从而对较长读长和起始量低至10 ng的RNA的m⁶A位点进行准确鉴定(图4B)^[64]. 此外, m⁶A-SEAL^[65]和m⁶A-label-seq^[66]以及m⁶A-SAC-seq^[67]等方法也为m⁶A的转录组范围内的m⁶A修饰提供了新的解决方案. 然而, 这些方法仍受到样品输入量要求高、定量准确性有限、序列上下文偏好性以及实验流程复杂性等的制约. 直接RNA纳米孔测序为m⁶A检测提供了一种新的思路, 它能够基于RNA分子通过纳米孔时的电场强度变化直接识别单碱基分辨率下的m⁶A修饰^[68,69], 但其缺点包括成本较高、准确度较低, 并且对RNA质量和起始量要求较高等.

为了开发一种类似于重亚硫酸氢钠(bisulfite)检测DNA甲基化的金标准的测序方法, 本团队^[70]参照亚硫酸氢盐测序的原理, 开发了利用乙二醛和亚硝酸钠介导的脱氨反应的GLORI(glyoxal and nitrite-mediated deamination of unmethylated adenosine)技术. 反应中未被修饰的腺嘌呤(A)脱氨转化成肌苷(I), 在逆转录过程中与胞苷(cytidine)配对, 在测序过程中被读作鸟苷(guanosine), 而被修饰的m⁶A保持不变, 从而实现全转录组单碱基分辨率的m⁶A修饰位点的绝对定量检测. 与该方法类似, eTAM-seq(evolved TadA-assisted N⁶-methyladenosine sequencing)采用了一种温和的酶促反应, 利用定向进化的腺苷脱氨酶TadA 8.20高效率将未修饰的A转化为I, 同样实现了对m⁶A修饰位点的精准

定量测定^[71]. 这两种方法凭借其卓越的特异性, 仅针对腺嘌呤进行脱氨反应, 因此能够在全转录组范围内无序列偏好、高灵敏地识别m⁶A修饰位点, 特别适用于低丰度m⁶A修饰位点的精准定量(图4C). 因此, 它们被认为是目前所有m⁶A检测技术中偏差最低、精确度最高以及修饰位点检出最多的技术, 能够实现单碱基水平上m⁶A位点修饰水平的绝对定量.

2.3 m⁶A修饰的功能研究

m⁶A修饰参与基因转录后的调控作用已被广泛报道^[72]. 然而, 近年来的研究逐渐揭示了m⁶A在转录调控和染色质调控中的关键作用. 研究表明, 在共转录水平上, 组蛋白修饰与RNA上的m⁶A修饰可以相互作用, 形成驱动基因表达的正反馈回路. 一方面, 组蛋白修饰如H3K36me3修饰, 能够在共转录过程中促进新生mRNA上的m⁶A修饰, 从而协同转录^[73]; 另一方面, m⁶A也能够通过m⁶A识别蛋白YTHDC1在共转录过程中引导KDM3B去除染色质上的H3K9me2组蛋白修饰, 从而促进基因表达^[73].

m⁶A不仅在基因转录调控中发挥重要作用, 还与异染色质的形成与维持、组蛋白修饰的调节以及DNA甲基化密切相关. 本文将重点讨论细胞核内非编码RNA上的m⁶A如何调控基因组稳定性和染色质状态, 从而影响基因表达的分子机制.

2.3.1 m⁶A 参与DNA损伤修复和基因组稳定性维持

2017年的研究首次揭示了m⁶A表观转录组与DNA损伤之间的关联, 发现m⁶A在DNA损伤位点修复中通过招募DNA聚合酶(Pol κ)发挥作用^[74]. 后续研究进一步探讨了m⁶A在R-loop的积累和降解中的作用. R-loop是DNA-RNA异源双链与单链DNA组成的三链结构, 对DNA复制、修复和基因组稳定性至关重要. 一方面, m⁶A能促进R-loop的形成. 在共转录过程中, m⁶A通过其阅读蛋白YTHDC1促进基因转录终止位点(TES)周围的R-loop形成, 从而促进XRN2介导的转录终止. 这一过程依赖于DEAD-box解旋酶DDX21对R-loop的识别及其与METTL3的协同作用, 以减少DNA损伤, 维持基因组的稳定性(图5A)^[75,76]. YTHDF2则在有丝分裂过程中参与R-loop的降解, 防止RNA-DNA杂交链的过度积累, 从而在维持基因组稳定性方面发挥作用^[77].

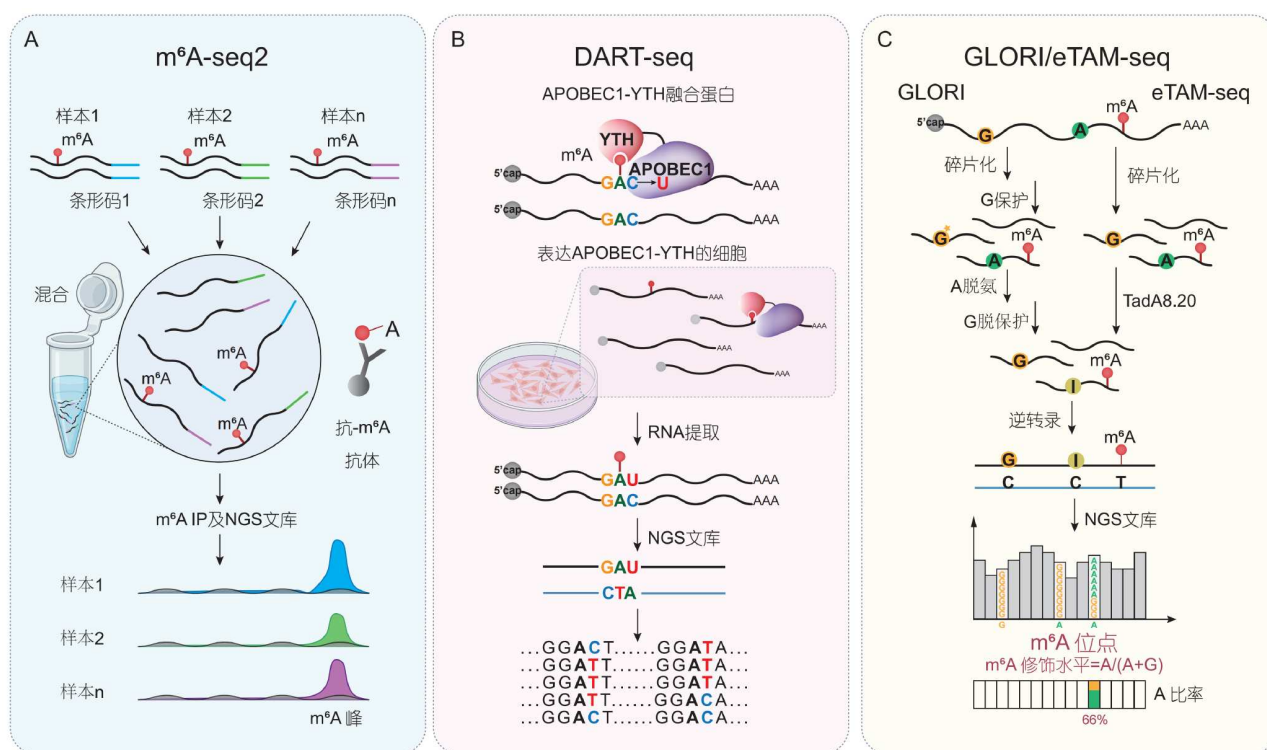


图4 m⁶A修饰的高通量测序检测技术. A: 基于抗体富集的方法m⁶A-seq2: 通过将不同样本进行条形码标记后混合, 利用m⁶A抗体进行免疫共沉淀, 捕获带有m⁶A修饰的RNA. 之后对样本构建二代测序文库进行分析识别出m⁶A富集的区域; B: DART-seq: 利用APOBEC1-YTH融合蛋白, 将m⁶A修饰邻近催化脱氨反应, 使RNA上的C变为U. 在表达该融合蛋白的细胞中提取RNA后, 构建二代测序文库并测序, 随后通过AC至AU碱基转换事件识别m⁶A位点; C: 单碱基绝对定量: 利用化学或酶方法将A转变为I, 经过逆转录识别为G, 通过统计单位点A的比例实现单碱基位点绝对定量

Figure 4 High-throughput sequencing technologies for detecting m⁶A modification. A: m⁶A-seq2 based on antibody enrichment: different samples are barcode-labeled and then mixed. m⁶A antibody is used for immunoprecipitation to capture RNA with m⁶A modifications. Afterward, next-generation sequencing libraries are constructed and analyzed to identify m⁶A-enriched regions; B: DART-seq: the APOBEC1-YTH fusion protein catalyzes deamination near the m⁶A modification site, converting C to U on RNA. RNA is extracted from cells expressing the fusion protein, followed by second-generation sequencing library construction. The m⁶A sites are identified through the AC to AU base conversion events; C: single-base absolute quantification: chemical or enzymatic methods convert A to I, which is then reverse-transcribed and recognized as G. The absolute quantification of single-base sites is achieved by statistically determining the proportion of A at specific positions

本团队近期的研究发现, 着丝粒RNA(cenRNA)也参与基因组稳定性调控. 癌细胞中, cenRNA表现出异常高水平的m⁶A修饰, 这些修饰被CENPA识别并稳定CENPA在S期的着丝粒定位. 去除cenRNA上的m⁶A修饰、耗竭METTL3或突变CENPA的m⁶A识别位点会导致CENPA从着丝粒上丢失, 破坏着丝粒的完整性, 导致染色体异常分离, 从而阻碍癌细胞增殖和肿瘤生长(图5B)^[78].

2.3.2 调控染色质状态和转录

异染色质的建立和维持对基因表达和基因组完整性至关重要, 并与m⁶A修饰密切相关. 在小鼠胚胎干细胞(mESC)模型中, 敲除METTL3或者YTHDC1能够以

m⁶A依赖机制阻止NEXT复合物的募集, 从而增加carRNA的表达和稳定性, 特别是在LINE1反转座子上. LINE1不仅直接调控染色质可及性, 还通过招募CBP/EP300和YY1促进染色质开放, 激活下游基因转录, 从而影响mESC的增殖、分化和早期胚胎发育(图5C)^[79]. 相应地, 敲除m⁶A的擦除器FTO引起LINE1 RNA的m⁶A水平显著上升, 伴随H3K4me3和H3K27ac修饰的下降以及H3K9me3修饰的增加^[80], 这与逆转录转座元件(如IAPs, ERVK和LINE1)的RNA通过m⁶A-YTHDC1机制招募SETDB1调控H3K9me3和2C基因沉默的机制相吻合^[81]. 此外, m⁶A修饰的IAPEz转座子被YTHDC1识别并招募METTL3, 并通过与SETDB1-TRIM28的相互作用形成调控异染色质的正反馈回路^[82]. 这些内源

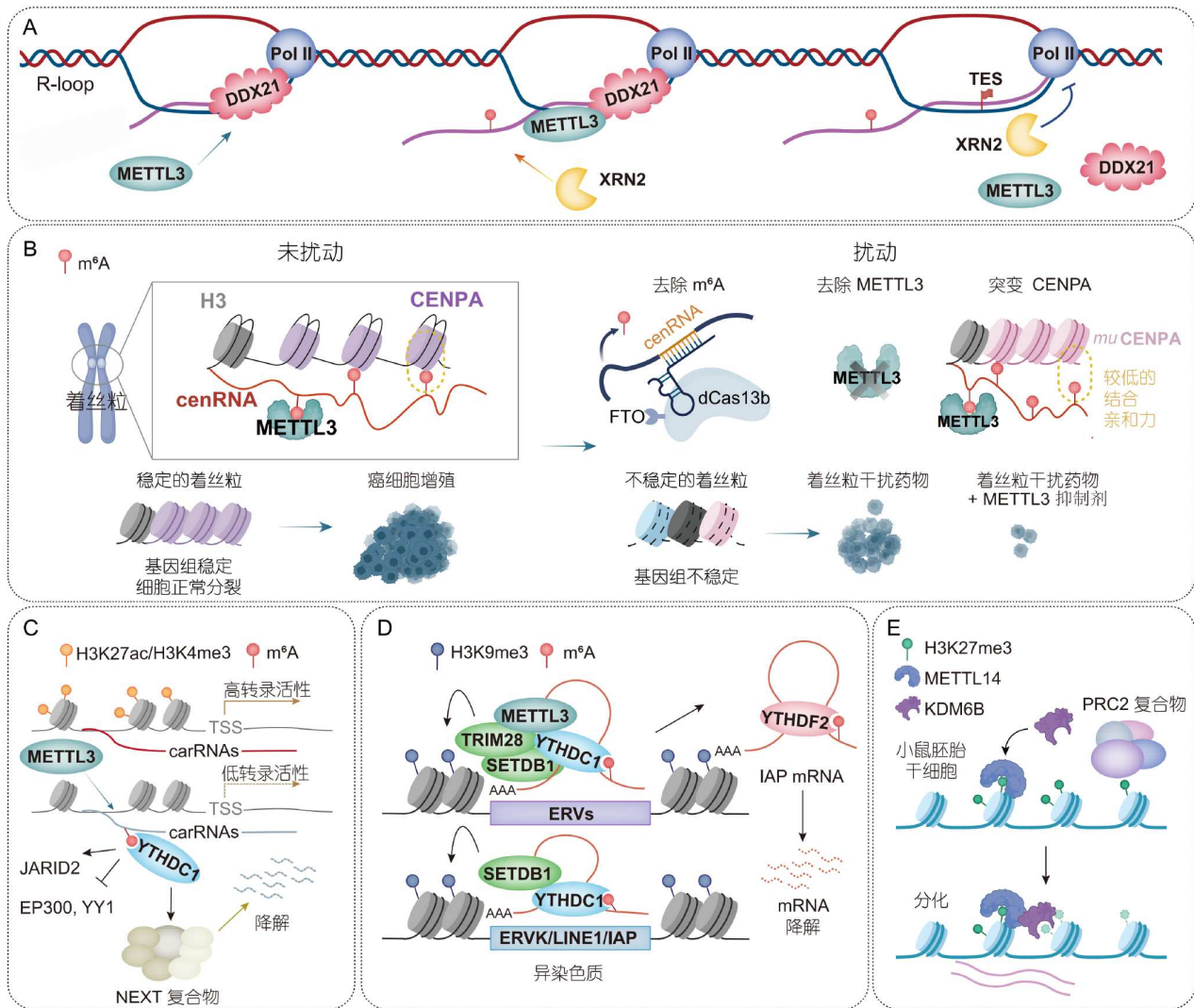


图 5 m⁶A 修饰及修饰酶对基因表达、基因组完整性及染色质状态调控中的作用机制。A: R-loop-DDX21-METTL3 介导的 m⁶A 共转录修饰调控转录终止, 确保基因功能和结构稳定性; B: m⁶A 修饰的着丝粒 RNA 稳定 CENPA 以调控癌细胞 S 期着丝粒稳态, 为癌症的靶向治疗提供了潜在的策略; C: 小鼠胚胎干细胞中染色质相关 RNA 上 m⁶A 甲基化的下调促进染色质开放和下游基因转录; D: YTHDC1 识别逆转录转座元件上的 m⁶A 修饰建立 H3K9me3 和转录抑制; E: METTL14 以不依赖 m⁶A 的方式直接识别 H3K27me3 并募集 KDM6B 对其进行去甲基化, 调控小鼠胚胎干细胞的干性维持和分化

Figure 5 Mechanisms of m⁶A modification and modification enzymes in regulating gene expression, genome integrity, and chromatin state. A: R-loop-DDX21-METTL3-mediated m⁶A co-transcriptional modification regulates transcription termination, ensuring gene function and stability; B: m⁶A-modified centromeric RNA stabilizes CENPA to regulate centromere homeostasis during the S-phase of cancer cells, providing potential strategies for targeted cancer therapy; C: downregulation of m⁶A methylation on chromatin-associated RNA in mouse embryonic stem cells promotes chromatin opening and transcription of downstream genes; D: YTHDC1 recognizes m⁶A modifications on retrotransposons, establishing H3K9me3 and transcriptional repression; E: METTL14 directly recognizes H3K27me3 in an m⁶A-independent manner and recruits KDM6B for demethylation, regulating stemness maintenance and differentiation in mouse embryonic stem cells

性逆转录病毒(ERVs)的转录本被YTHDF2识别并调控降解(图5D)^[83], YTHDF2参与了2~4细胞期短暂表达的转录本(如*Zscan4*和反转座子*MERV1*)的及时降解, 维持基因组的稳定^[84]。m⁶A还通过反式作用机制调控染色质状态。YTHDC1识别METTL3非敏感性m⁶A, 促进

含m⁶A的LINE1 scaffold复合物上NCL-KAP1蛋白的招募, 建立H3K9me3和转录抑制^[85]。

m⁶A表观转录组与DNA表观组学之间存在相互作用。m⁶A修饰通过招募DNA去甲基化酶TET1去除DNA的5mC甲基化。例如, m⁶A阅读蛋白FXR1在共转录过

程中能招募TET1至基因组5mC位点,促进DNA去甲基化。此外,YTHDC2能够结合m⁶A修饰的HERV-H RNA,并通过与TET1的相互作用去除LTR7/HERV-H区域的5mC,维持其转录激活状态^[86]。

其他m⁶A-carRNA转录调控机制也得以报道。在K562细胞中,富含m⁶A修饰的内含子LINE-1被证实通过m⁶A介导的SAFB识别,促进其转座活性,并通过转录阻碍机制抑制MIL基因的表达^[87]。此外,m⁶A修饰的增强子RNA(eRNA)可促进YTHDC1与乙酰化组蛋白阅读蛋白BRD4在增强子处形成混合凝聚物,从而正向调节增强子活性和转录激活^[88]。

近年来,m⁶A调节因子不依赖m⁶A的染色质调控途径也被揭示。例如,本团队发现,METTL14以不依赖METTL3或m⁶A的方式直接识别H3K27me3并招募KDM6B进行去甲基化,调控染色质状态,在小鼠胚胎干细胞的干性维持和分化中发挥重要作用(图5E)^[89]。

m⁶A介导调控机制为多种疾病提供了潜在的治疗途径。在前列腺癌(PCa)中,FTO-IT1长链非编码RNA(lncRNA)上调抑制m⁶A甲基转移酶复合物和p53通路,有望成为治疗靶点^[90]。与此同时,m⁶A减少导致YTHDC-NEXT复合物降解机制失效以及C9ORF72基因重复序列RNA积累,损害神经系统功能,提高m⁶A水平有望改善肌萎缩侧索硬化(ALS)和额颞叶痴呆(FTD)的表型^[91]。在髓系白血病中,RBFOX2通过RBFOX2-m⁶A-RBM15-YTHDC1-PRC2轴建立和维持H3K27me3修饰,抑制转录并阻断细胞分化^[92]。胰腺导管腺癌中,YTHDC2识别含m⁶A的seRNA,招募MLL1,增加H3K4me3的含量,导致染色质开放并上调癌基因表达^[93]。进一步研究m⁶A机制将推动表观基因组疗法的发展。

2.4 小结

当前研究深刻地揭示了m⁶A在核非编码RNA介导的转录和染色质调控中的机制。未来研究预计将会更深入地挖掘m⁶A与其他表观遗传修饰之间的精细调控网络和相互作用,特别聚焦于m⁶A如何精确地调控多样化的非编码RNA,包括小RNA(miRNA, siRNA等)的生物学功能。

3 Ψ修饰

假尿嘧啶(pseudouridine, Ψ),作为RNA中最早被

发现的转录后修饰之一,以其独特的化学结构和广泛的生物学功能,成为RNA表观遗传学领域研究的焦点,因其在RNA中的普遍存在而被誉为“第五核苷酸”^[94,95]。Ψ是尿苷的C5-糖苷异构体,它的形成涉及将尿嘧啶的C5原子与核糖的C1原子之间建立一个特殊的C-C糖苷键,区别于常规的N1-C1连接方式。Ψ的异构化使得它在非沃森-克里克(Watson-Crick)边缘有一个额外的氢键供体,从而提高了碱基配对的稳定性。Ψ广泛存在于各种类型的RNA中,包括rRNA, tRNA, snRNA, snoRNA以及mRNA,在人类细胞的mRNA中,Ψ的丰度仅次于m⁶A,约占总尿嘧啶的0.2%~0.6%^[96,97]。这种修饰不仅影响RNA的结构稳定性,还在多种生物学过程中发挥着重要作用,如翻译调控、RNA剪接及稳定性等。因此,深入研究Ψ修饰对于理解RNA的功能及其在细胞过程中的作用具有重要意义。

3.1 Ψ修饰的调控机制

Ψ的形成由一系列假尿苷合成酶(PUSs)催化。在人类细胞中,已经鉴定出13种PUS蛋白,它们在不同的RNA分子中催化Ψ的形成^[98,99]。这些PUS蛋白通常不依赖RNA分子的辅助,能够直接识别底物,并在特定的环境下催化假尿苷的形成反应。DKC1是另一种RNA依赖性的PUS家族合成酶,需要H/ACA snoRNA作为引导来指导其在rRNA和mRNA的假尿苷化活性。相比之下,TRUB1和PUS7分别倾向于在具有GUUC-NANNC和UGUAR核心序列的mRNA上进行修饰,而其他PUSs则缺乏明显的序列或二级结构偏好性。

3.2 Ψ修饰RNA的高通量测序技术

随着高通量测序技术的发展,Ψ的检测和定位技术也在不断创新。早期的测序技术,如Pseudo-seq^[100],Ψ-seq^[101]和PSI-seq^[102],通过使用CMC(*N*-cyclohexyl-*N'*-β-(4-methylmorpholinium) ethylcarbodiimide)来特异性标记Ψ。CMC可以在Ψ的N3位置特异且不可逆地结合,Ψ-CMC加合物会导致逆转反应对NAD-RNA进行生物素酰化与后续分离录在Ψ下游的一个碱基处停止,从而能够以单碱基分辨率对Ψ进行检测。CeU-seq^[97]技术进一步改进了这一方法,通过使用CMC衍生物azido-CMC(N3-CMC)预富集含Ψ的片段,实现了数千个Ψ位点的检测(图6Aa)。然而,低的标记效率和二级结构导致的逆转录终止可能会导致基于CMC标

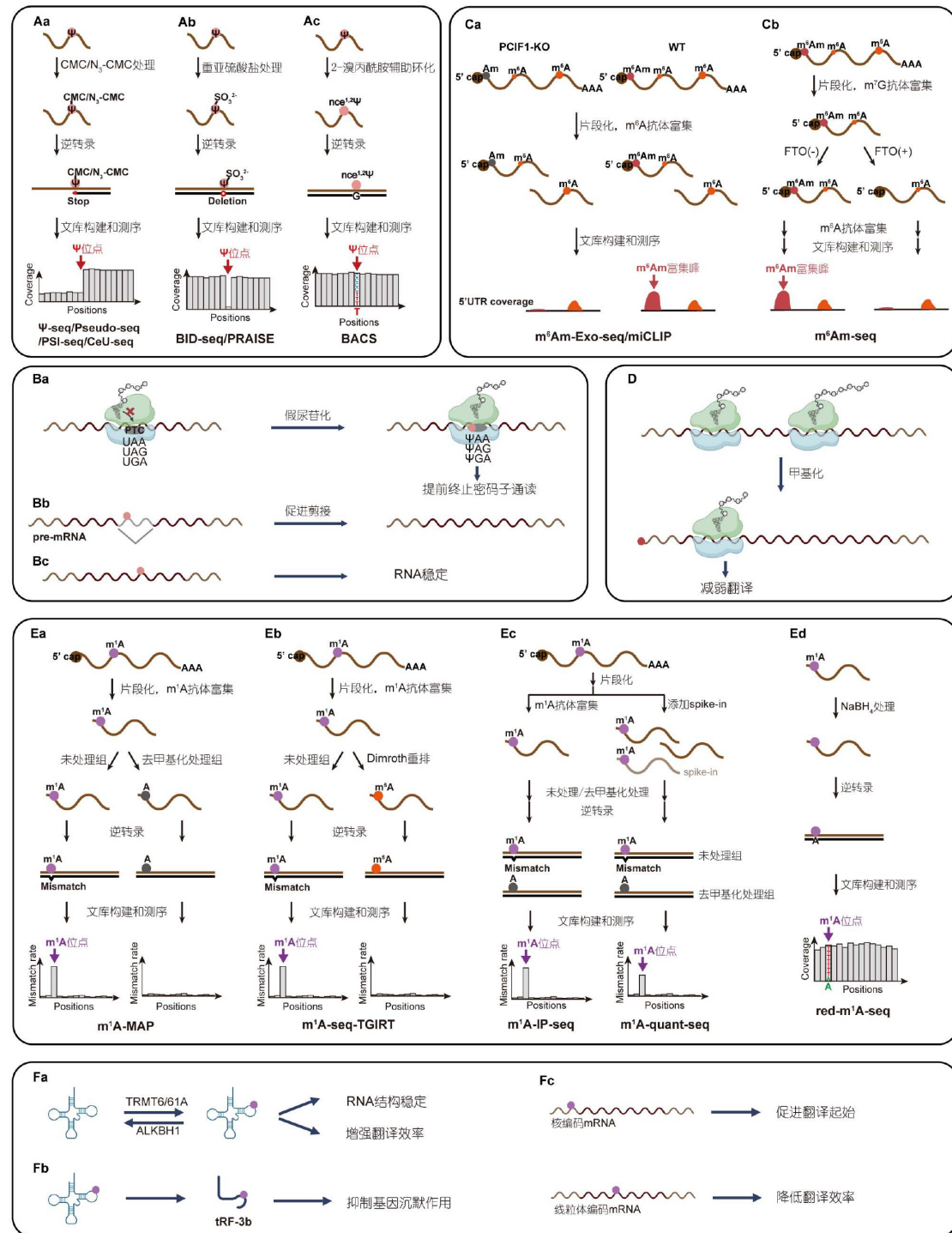


图 6 Ψ, m⁶Am和m¹A修饰的检测技术及生物学功能. A: Ψ的高通量检测技术; B: Ψ对翻译、RNA剪接和RNA稳定性的调节机制; C: m⁶Am的高通量检测技术; D: m⁶Am对翻译的调节机制; E: m¹A的高通量检测技术; F: m¹A对tRNA稳定性、翻译和基因表达的调节机制

Figure 6 Ψ, m⁶Am and m¹A detection technologies and biological functions. A: High-throughput detection technology for Ψ; B: regulation mechanism of Ψ on translation, RNA splicing and RNA stability; C: high-throughput detection technology for m⁶Am; D: regulation mechanism of m⁶Am on translation; E: high-throughput detection technology for m¹A; F: regulation mechanism of m¹A on tRNA stability, translation and gene expression

记的检测方法出现假阴性或假阳性位点, 这是以上不同方法检测到的 Ψ 位点重复性差的主要原因。

重亚硫酸盐反应也被用于 Ψ 的标记和测序。 Ψ 经过重亚硫酸盐处理后会形成一个核糖开环加合物, Ψ -重亚硫酸盐加合物在逆转录过程中可以诱导缺失信号, 在测序过程中通过检测缺失信号即可鉴定 Ψ 修饰位点。RBS-seq^[103]利用这个原理在HeLa细胞的mRNA中检测到322个 Ψ 修饰位点。但是, 重亚硫酸盐的标记效率有限, 并且会导致严重的胞嘧啶脱氨现象。最近, 两个独立的检测方法BID-seq^[99]和PRAISE^[98]分别通过优化反应条件, 显著提高了 Ψ 的检测效率。BID-seq利用更高的pH反应条件, 而本团队研发的PRAISE则采用更高的有效离子浓度, 这两种方法都有效地抑制了重亚硫酸盐反应中胞嘧啶的脱氨, 并大大提高了对 Ψ 的反应效率, 从而实现了全转录组范围内 Ψ 的绝对定量(图6Ab)。

此外, 一项名为BACS^[104]的新技术进一步推动了 Ψ 修饰位点的检测方法。BACS利用2-溴丙烯酰胺介导的环化反应, 最终导致逆转录时 Ψ 与G形成互补配对, 在测序中体现为C的突变信号, 以此来对 Ψ 修饰位点的定量检测。这一创新不仅提供了不同于重亚硫酸盐处理的新途径, 而且增强了 Ψ 修饰检测的多样性和准确性(图6Ac)。

不同类型的检测技术给 Ψ 修饰的功能研究提供了多种工具。然而, 现有的方法在灵敏度和特异性方面仍有提升的空间。未来的研究仍需要继续优化现有技术和开发新方法, 以实现在更小量甚至单细胞水平的样本中精准地捕捉 Ψ 修饰的目标。此外, 跨平台的数据比较和整合也将有助于提高 Ψ 修饰检测的一致性和可靠性, 推动相关领域的深入发展。

3.3 Ψ 修饰的功能研究

3.3.1 Ψ 修饰的分子功能

Ψ 在mRNA中最明确的功能之一是促进 Ψ 修饰的终止密码子的翻译通读。早期的研究表明, 将终止密码子进行 Ψ 修饰可以促进酵母细胞中终止密码子的通读^[105](图6Ba)。近期的研究工作发现, Ψ 修饰也存在于哺乳动物mRNA的内源性终止密码子中^[99]。在HeLa细胞中, 敲低PUS1显著降低了NDUFS2 mRNA终止密码子处的 Ψ 修饰水平, 从而抑制了翻译通读。相反, 将 Ψ 靶向引入终止密码子则增加了通读的可能性。除了翻译

调控, Ψ 还可以通过调节mRNA剪接和稳定性来影响基因表达(图6Bb和Bc)。研究已证实, Ψ 在mRNA中共转录引入, 并在与剪接相关的元件和RNA结合蛋白的结合位点中富集。体外试验进一步验证了单个 Ψ 修饰可以直接增强体外剪接过程^[106]。此外, dCas13d-TRUB1融合表达的研究证明, Ψ 修饰可以显著增加TRUB1靶向的mRNA的半衰期^[99]。然而, 在敲除PUS7和TRUB1后, 并未观察到对PUS依赖性 Ψ 修饰的mRNA稳定性的影响^[98]。在tRNA中, T环中的 Ψ 修饰则对tRNA折叠成倒L形的三级结构具有重要作用^[107], 而反密码子区的 Ψ 修饰影响着tRNA的密码子选择偏好性。例如, 在多形胶质母细胞瘤(GBM)患者中, PUS7表达水平的提高与不良预后相关。PUS7可调节tRNA上的 Ψ 修饰, 进而通过tRNA介导的密码子偏好性蛋白翻译调控来调节GBM中重要的信号通路, 促进肿瘤的生长和发展^[108]。这些研究表明, Ψ 修饰不仅在mRNA的翻译、剪接和稳定性中发挥重要作用, 还在tRNA的功能和癌症进展中具有重要意义。未来的研究将进一步揭示 Ψ 修饰在不同生物过程中的具体机制及其潜在的临床应用价值。

3.3.2 Ψ 修饰的生物学功能

Ψ 在生物学领域的应用潜力逐渐被挖掘出来, 尤其是在mRNA疫苗和RNA编辑技术方面。科学家发现, 在mRNA疫苗中引入 Ψ 的衍生物 $m^1\Psi$, 能够降低因抗原表达而引发的免疫反应强度, 同时保持mRNA的高效的翻译能力, 这使得RNA疫苗成为了抗击病毒性疾病的有力武器^[109]。目前已获批的mRNA疫苗有两种, 分别是辉瑞(BioNTech)的BNT162b2和莫德纳(Moderna)的mRNA-1273, 它们都使用了 $m^1\Psi$ 来提高mRNA疫苗的安全性和有效性。然而, 最近的一项研究指出, $m^1\Psi$ 可能会对mRNA的翻译准确性产生影响^[110]。他们发现, 当mRNA带有 $m^1\Psi$ 修饰时, 翻译过程中会出现+1核糖体移码的现象。这一发现对于开发基于mRNA的治疗手段具有重要的意义, 提示可以通过采用同义密码子的策略来减少异常蛋白质的产生从而提高治疗的安全性和效果。另一项引人注目的应用是RESTART(RNA editing for site-specific targeting and recognition by transcriptome analysis)技术, RESTART利用优化的核仁RNA(snoRNA)招募细胞内源的假尿苷合成酶, 在发生无义突变的提前终止密码子(PTC)处进行精准的

Ψ 修饰, 以实现PTC的通读, 恢复功能蛋白的表达. 这种技术在治疗由无义突变引起的疾病, 如囊性纤维化和Hurler综合征等的疾病治疗中展现出巨大潜力^[111,112]. 总之, Ψ 修饰不仅在基础生物学研究中发挥重要作用, 还在临床应用领域展现出广泛的应用前景. 未来的研究将进一步优化这些技术, 并探索更多潜在的应用场景, 以更好地利用 Ψ 修饰在医疗和生物技术中的价值.

3.4 小结

关于 Ψ 的研究正在逐步深入, 但仍有几个关键问题亟需进一步探索. 比如, Ψ 的识别蛋白的鉴定, 以及不同识别蛋白介导的不同功能的研究. 随着新技术和新方法的不断涌现, 预计未来几年内, 这些问题将逐步得到解决, 从而为 Ψ 修饰的功能研究和应用带来更加深远的影响.

4 m⁶Am修饰

N⁶,2'-O-二甲基腺嘌呤(m⁶Am)是一种位于转录起始位置的末端修饰, 主要存在于mRNA和snRNA中, 与m⁷G帽结构相邻^[96]. m⁶Am修饰含量丰富, 大约50%~80%以A起始的mRNA可以被修饰为m⁶Am^[113].

4.1 m⁶Am修饰的调控机制

2017年, 科学家发现, m⁶A的去甲基化酶FTO可以去除m⁶Am的N6位甲基, 将其转化为Am, 从而证明了m⁶Am是一个动态可逆的化学修饰^[114]. 2019年, 包括本团队在内的四个研究团队独立报道了PCIF1作为m⁶Am甲基转移酶的作用, 进一步揭示了m⁶Am的形成机制^[113,115~117]. 在RNA聚合酶II转录的早期阶段, RNA的5'末端会形成“m⁷GpppNm”帽结构, PCIF1可以在“m⁷GpppAm”的腺苷第六位氮原子上进一步添加甲基化修饰, 形成m⁶Am.

4.2 m⁶Am修饰RNA的高通量测序技术

由于m⁶Am和m⁶A的结构相似, 目前对m⁶Am的检测方法主要依赖于m⁶A的抗体. m⁶A主要分布在终止密码子附近, 但也存在于5'UTR区域, 这使得与m⁶Am的区分变得复杂. miCLIP^[118]利用m⁶Am位于转录起始位点的特性, 结合现有的转录起始位点注释信息, 来区分m⁶Am和m⁶A.

此外, 在PCIF1被鉴定为m⁶Am的甲基转移酶之后, 利用PCIF1敲除的细胞系, 通过比较PCIF1敲除和野生型细胞的样本, m⁶Am-Exo-seq^[117]和miCLIP^[116]进一步验证了mRNA上的m⁶Am位点(图6Ca).

然而, 构建PCIF1敲除细胞系并不适用于大多数样本的检测. 本团队研发的m⁶Am-seq^[119]通过优化去甲基化酶FTO的体外去甲基化反应, 使FTO只对m⁶Am选择性地甲基化, 而对m⁶A的反应活性很低, 实现了对m⁶Am的准确鉴定(图6Cb).

这些策略有助于提高m⁶Am检测的准确性和特异性, 但仍存在一定的局限性, 例如抗体带来的非特异性和序列结构偏好性, 以及无法实现单碱基分辨率的定量检测.

4.3 m⁶Am修饰的功能研究

m⁶Am所在的mRNA帽结构在调控mRNA的降解和翻译过程中扮演重要角色. 但是, 关于m⁶Am修饰在mRNA帽结构中的具体功能仍存在一定的争议. 一些研究发现, 相较于cap-Nm帽结构, 带有m⁶Am的帽结构能够更好地保护mRNA不被DCP2酶降解, 从而增强了RNA的稳定性, 并且体内实验也支持这一观点, 显示这类mRNA的半衰期更长^[114]. 然而, 也有研究提出了不同的看法. 例如, 敲除PCIF1后, 含有cap-m⁶Am的mRNA表达水平略有增加^[113], 或者m⁶Am起始的基因在转录水平和稳定性上没有显著变化^[117], 表明m⁶Am对mRNA稳定性有轻微的抑制作用或影响较小.

关于m⁶Am对mRNA翻译效率的调控, 研究结果仍存在争议. 有的研究指出, m⁶Am可以促进翻译, 通过对比PCIF1敲除前后的mRNA转录本的翻译效率, 发现含有m⁶Am修饰的转录本在PCIF1敲除后翻译效率显著降低, 并且观察到翻译起始因子eIF4E对m⁶Am的亲合性没有显著的影响, 认为m⁶Am介导的翻译调控可能是由eIF4E非依赖性的机制介导^[113]. 然而, 另一些研究表明, m⁶Am可能抑制翻译^[117](图6D). 2020年一项研究发现, 在人类和小鼠的多种组织中, 含有m⁶Am的基因的蛋白质水平显著低于不含m⁶Am的基因, 表明m⁶Am抑制了翻译效率^[114,120]. 在胃癌中, m⁶Am修饰水平和PCIF1表达显著增加, PCIF1通过m⁶Am抑制自噬相关基因TM9SF1的翻译, 从而增强胃癌细胞的恶性程度^[121]. 总之, m⁶Am在mRNA翻译效率调控中的具体作用仍需进一步研究.

4.4 小结

m⁶Am修饰的功能研究目前仍处在初级阶段, 尽管m⁶Am修饰的研究已经取得了一些进展, 但仍有许多关键问题亟待解决. 未来的研究将通过开发更精确的检测技术和鉴定识别蛋白, 进一步揭示m⁶Am在RNA生物学中的多方面功能及其在健康与疾病中的作用, 为其在临床应用中的潜力提供坚实的理论基础.

5 m¹A修饰

N¹-甲基腺苷(m¹A)作为一种可逆的转录后RNA修饰, 自首次在酵母的苯丙氨酸tRNA中被发现以来^[122], 已成为RNA修饰研究领域中的一个重要主题. m¹A广泛且保守地存在于真核生物的tRNA中, 在mRNA上的丰度较低, 约0.015%~0.054%, 也可见于核糖体RNA和线粒体RNA中^[123].

5.1 m¹A修饰的调控机制

m¹A的形成是由特定的甲基转移酶复合体催化完成的^[123], tRNA甲基转移酶6/61A(TRMT6/61A)复合物负责催化tRNA和部分具有tRNA T环结构和GUUCNA基序中mRNA中的m¹A的形成, 在这个复合物中, TRMT61A作为催化亚基, 而TRMT6则参与底物选择. 值得注意的是, 线粒体RNA中的m¹A修饰是由两种不同的酶独立催化的: TRMT61B负责催化某些线粒体tRNA上的m¹A形成, 而TRMT10C则负责其他线粒体RNA的m¹A修饰. 作为一种可逆的RNA修饰, m¹A可以被AlkB家族蛋白质ALKBH1, ALKBH3和FTO去除. 具体来说, ALKBH1和FTO介导tRNA上的m¹A去甲基化, 而ALKBH3负责mRNA和tRNA上的m¹A去甲基化. 此外, 体外数据表明, 含有YTH结构域的m⁶A识别蛋白, 如YTHDF1-3和YTHDC1, 也可以识别mRNA中的m¹A^[124,125]. 这些修饰酶和去甲基化酶的存在表明, m¹A修饰是一个高度动态的过程, 可能在多种生物学过程中发挥重要作用. 未来的研究将进一步揭示这些酶的具体作用机制及其在细胞调控网络中的功能.

5.2 m¹A修饰RNA的高通量测序技术

m¹A的生物学位效应源于1号位氮原子上甲基化修饰对Watson-Crick碱基配对的干扰, 导致逆转录过程中cDNA合成的错配或提前终止. m¹A-seq^[126]和本团队研

发的m¹A-ID-seq^[127]利用m¹A的这一特点, 在m¹A特异性抗体富集后的片段中实现了m¹A的检测. 为了排除假阳性信号, m¹A-seq使用Dimroth重排将m¹A转换为m⁶A, m¹A-ID-seq则利用AlkB将m¹A去甲基化为A, 通过比较未处理组和处理组之间错配或提前终止信号的差异, 可以得到高可信度的m¹A位点. 本研究团队研发的m¹A-MAP^[128]和m¹A-seq-TGIRT^[129]进一步优化了逆转录酶, TGIRT(thermostable group II intron reverse transcriptase)在m¹A位点表现出了优异的通读效率和高突变频率, 实现了mRNA上m¹A的单碱基分辨率检测(图6Ea和Eb). m¹A-IP-seq和m¹A-quant-seq^[130]则成功改造了HIV-1逆转录酶, 使其对m¹A具有高通读能力和高突变效率(图6Ec).

最近, red-m¹A-seq^[131]利用NaBH₄还原m¹A, 提高了多种商品化逆转录酶对修饰位点的通读率和突变率, 并结合Dimroth重排将m¹A转化为m⁶A构建对照, 开发了tRNA中m¹A检测的新方法(图6Ed). 这种方法不仅提高了检测的灵敏度, 还提供了更为可靠的对照手段, 从而增强了结果的可信度.

综上所述, 这些先进的检测技术为m¹A修饰的研究提供了强有力的支持, 使得研究人员能够更准确地定位和定量m¹A修饰位点, 进而深入理解其在各种生物过程中的功能和调控机制. 未来的研究将进一步优化这些技术, 并探索更多潜在的应用场景, 以更好地揭示m¹A修饰在健康与疾病中的作用.

5.3 m¹A修饰的功能研究

m¹A作为一种关键的RNA修饰, 在多种生物过程中发挥着重要作用, 特别是在tRNA中. m¹A位于tRNA的第9, 14, 58号位, 其中m¹A9主要出现在线粒体tRNA, 在22种线粒体tRNA中有19种在该位置携带m¹A修饰^[132], 这对其结构稳定性的保持尤为关键. m¹A14较为罕见, 仅存在于几种哺乳动物细胞质的苯丙氨酸tRNA上. m¹A58则在多种生物中保守存在, 并且对于维持tRNA的结构稳定性和确保高效翻译解码效率至关重要. 在酵母的起始tRNA(tRNAⁱMet)中, m¹A58通过与A54和A60形成氢键来稳定tRNA的结构^[133](图6Fa). ALKBH1, 作为m¹A58的去甲基化酶, 其表达的下调导致tRNA中m¹A58修饰水平普遍上升, 同时伴随tRNAⁱMet表达水平的显著提升, 这一现象凸显了m¹A58对于维持tRNA结构稳定性和成熟tRNA正常表

达的重要性^[134]. 在肝细胞癌中, tRNA-m¹A58的修饰水平与患者生存率呈负相关. TRMT6/61A复合体通过m¹A修饰增强PPAR δ 的翻译效率, 进而激活胆固醇合成途径, 驱动肝癌干细胞的自我更新和肝细胞癌的发生发展^[135]. 这表明m¹A58修饰在肿瘤发生和发展中具有重要的调控作用. 在免疫应答中, TRMT61A通过m¹A58修饰加速CD4⁺ T细胞激活后关键蛋白的翻译, 确保CD4⁺ T细胞的快速免疫响应^[136]. 体内外实验均证明, TRMT61A缺失导致CD4⁺ T细胞中tRNA的m¹A58修饰显著减少, 削弱了翻译延伸中tRNA的解码能力, 最终导致多种关键蛋白的翻译受阻, 细胞无法顺利地由G0/G1期过渡至S期, 引发增殖能力的显著下降^[136].

综上所述, m¹A修饰对tRNA结构稳定性、蛋白质翻译效率以及多种生物学过程有着不可忽视的影响. 它在癌症发展和免疫应答中的调控机制为研究提供了新的视角, 并暗示其可能是治疗相关疾病的一个潜在目标. 随着研究的深入, 我们有望更全面地理解m¹A修饰如何参与其他细胞活动, 及其背后的调控机制.

除了完整的tRNA, tRNA衍生片段(tRFs)同样继承了母体tRNA的m¹A修饰. 具体而言, m¹A修饰常出现在由tRNAs衍生的22 nt长3'端片段(tRF-3b)的第四个核苷酸位置, 与tRNA上的m¹A58位置相对应. 在膀胱癌环境中, TRMT6/61A的高表达促使tRF-3b上的m¹A修饰水平增加, 进而阻止了tRF-3b对未折叠蛋白响应途径中基因表达的沉默作用, 影响了癌细胞的生物学行为^[137](图6Fb).

此外, 研究显示, 核编码mRNA中的m¹A修饰主要集中在5'帽结构和5'非翻译区(5'UTR), 在翻译起始阶段发挥促进作用, 而线粒体mRNA(mt-mRNA)编码区(CDS)中的m¹A修饰通过破坏Watson-Crick碱基配对规则, 影响了翻译的正常进程^[128,129](图6Fc).

另外的研究表明, CAG重复序列中同样存在m¹A修饰, 且随着重复序列的延长, m¹A修饰水平增加. TDP-43能直接与CAG重复序列中的m¹A结合, 导致TDP-43在细胞质中异常聚集, 形成类似神经退行性疾病中观察到的蛋白聚集体^[138].

m¹A修饰在RNA生物学中扮演多重角色, 不仅影响tRNA和mRNA的结构与功能, 还在疾病状态下展示出潜在的病理功能, 成为理解RNA修饰调控网络和疾病机制的关键环节. TRMT6/61A复合体作为m¹A修饰

的关键酶, 其作为疾病治疗的潜在靶点, 已经引起了广泛关注. 通过对FDA批准的药物库进行筛选, 已经发现了能够有效抑制TRMT6/61A活性的化合物, 为肝癌等疾病的治疗提供了新的策略^[135]. 未来的研究将进一步揭示m¹A修饰的具体机制及其在健康与疾病中的作用, 为开发新的治疗策略提供理论基础.

5.4 小结

随着m¹A在不同类型的RNA分子中功能的逐渐明确, 未来的研究将更关注于其具体的生物学功能, 进一步的研究有望揭示m¹A在调控基因表达、参与细胞应激反应、免疫调节等方面的具体机制, 从而为疾病诊断和治疗提供新的思路.

6 总结与展望

除本文重点讨论的几种重要修饰外, 还有许多其他RNA修饰因其在RNA代谢、免疫和发育中的重要作用而被广泛关注. 例如, m⁵C, m⁷G, N⁴乙酰胞苷(ac⁴C)和RNA的糖基化等. m⁵C是由NSUN家族成员NSUN1~7以及DNMT2催化的, 在RNA稳定、出核和翻译中发挥至关重要的作用. m⁵C被报道通过识别蛋白Ybx1招募Pabpc1a调控母源mRNA的稳定性, 进而调控斑马鱼母源-合子转换及早期胚胎发育进程有序进行^[139]. m⁷G由METTL1/WDR4复合体添加, 能够在各种tRNA可变环的G46位点上添加m⁷G修饰, 从而稳定tRNA三级结构, 在肿瘤发生和各种癌症的进展中起着重要作用^[140]. ac⁴C由乙酰转移酶NAT10添加, 能够促进mRNA的稳定和蛋白质的翻译^[141,142]. 近年来, RNA糖基化修饰逐渐受到越来越多的关注. 研究发现, RNA可以作为脂质和蛋白质之外的第三种糖基化载体. 唾液酸化的N-多糖能够附着在一些microRNA上, 并通过Sidt转运到细胞表面, 充当Siglec受体的配体, 从而在免疫反应中发挥作用^[143]. 另外, 糖基化RNA(glycoRNA)在中性粒细胞表面的存在, 能够影响中性粒细胞与内皮细胞之间的相互作用, 并在中性粒细胞的招募过程中发挥关键作用^[144]. 尽管如此, 目前对糖基化RNA的研究仍处于初步阶段, 其来源、加工机制以及在不同生物体系中的具体功能还有待进一步探索.

本文已详细讨论了不同RNA修饰的独立生理功

能及其在转录调控中的重要性。随着研究的深入,越来越多的证据表明, RNA修饰之间并非单独发挥作用,而是通过复杂的相互作用共同调控RNA的命运。例如,已有NanoSPA技术实现人类转录组中的m⁶A和Ψ的同时检测,揭示了m⁶A和Ψ在转录组中互相排斥共存模式,以及它们在mRNA翻译过程中的协同和分级效应。未来的研究应进一步探讨不同RNA修饰之间的相互作用机制,尤其是在不同生理和病理状态下的协同调控作用^[145]。

未来RNA修饰检测技术的发展将致力于降低样本起始量,实现单细胞分辨率、单分子全长转录本分析及单碱基水平的高精度检测,同时朝着实时动态监测和多组学整合的方向推进。这些技术进步将深化对细胞异质性及其修饰在发育与疾病进展中的作用的理

解,推动RNA修饰在临床诊断和个性化医疗中的应用。

RNA修饰作为表观遗传学研究的重要领域,近年来在农学、神经科学、肿瘤学以及其他医学领域飞速发展。随着生命科学技术的不断进步,新的RNA修饰不断被发现,这不仅丰富了我们对于RNA修饰多样性的认识,也为理解这些修饰在基因表达调控中的作用提供了新的视角。未来, RNA修饰研究有望揭示更多关于其在作物农艺性状,人类生理和病理过程中的作用机制。这些发现将为作物品种改良,人类疾病的诊断、治疗和预防提供新的策略。特别是在神经退行性疾病和肿瘤治疗领域, RNA修饰可能成为新的治疗靶点或生物标志物,为患者提供更有效的治疗方案。我们相信,随着RNA修饰领域的不断发展和进步,其在临床应用中的潜力将得到进一步的挖掘和利用。

参考文献

- 1 He C. Grand challenge commentary: RNA epigenetics? *Nat Chem Biol*, 2010, 6: 863–865
- 2 Boccaletto P, Stefaniak F, Ray A, et al. MODOMICS: a database of RNA modification pathways. 2021 update. *Nucleic Acids Res*, 2022, 50: D231–D235
- 3 Ramanathan A, Robb G B, Chan S H. mRNA capping: biological functions and applications. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44: 7511–7526
- 4 Huang F. Efficient incorporation of CoA, NAD and FAD into RNA by *in vitro* transcription. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31: 8e–8
- 5 Chen Y G, Kowtoniuk W E, Agarwal I, et al. LC/MS analysis of cellular RNA reveals NAD-linked RNA. *Nat Chem Biol*, 2009, 5: 879–881
- 6 Walters R W, Matheny T, Mizoue L S, et al. Identification of NAD⁺ capped mRNAs in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114: 480–485
- 7 Shao X, Zhang H, Yang Z, et al. NAD tagSeq for transcriptome-wide identification and characterization of NAD⁺-capped RNAs. *Nat Protoc*, 2020, 15: 2813–2836
- 8 Jiao X, Doamekpor S K, Bird J G, et al. 5' End nicotinamide adenine dinucleotide cap in human cells promotes RNA decay through DXO-mediated deNADding. *Cell*, 2017, 168: 1015–1027.e10
- 9 Wang Y, Li S, Zhao Y, et al. NAD⁺-capped RNAs are widespread in the *Arabidopsis* transcriptome and can probably be translated. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, 116: 12094–12102
- 10 Julius C, Yuzenkova Y. Bacterial RNA polymerase caps RNA with various cofactors and cell wall precursors. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45: 8282–8290
- 11 Möhler M, Jäschke A. Future perspectives for the identification and sequencing of nicotinamide adenine dinucleotide-capped RNAs. *Acc Chem Res*, 2023, 56: 3000–3009
- 12 Shuman S. RNA capping: progress and prospects. *RNA*, 2015, 21: 735–737
- 13 Bird J G, Zhang Y, Tian Y, et al. The mechanism of RNA 5' capping with NAD⁺, NADH and desphospho-CoA. *Nature*, 2016, 535: 444–447
- 14 Bird J G, Basu U, Kuster D, et al. Highly efficient 5' capping of mitochondrial RNA with NAD⁺ and NADH by yeast and human mitochondrial RNA polymerase. *eLife*, 2018, 7: e42179
- 15 Wiedermannová J, Babu R, Yuzenkova Y. Stochastic nature and physiological implications of 5'-NAD RNA cap in bacteria. *Nucleic Acids Res*, 2024, 52: 11838–11852
- 16 Vvedenskaya I O, Bird J G, Zhang Y, et al. CapZyme-Seq comprehensively defines promoter-sequence determinants for RNA 5' capping with NAD⁺. *Mol Cell*, 2018, 70: 553–564.e9
- 17 Pan S, Li K, Huang W, et al. *Arabidopsis* DXO1 possesses deNADding and exonuclease activities and its mutation affects defense-related and

- photosynthetic gene expression. *J Integr Plant Biol*, 2020, 62: 967–983
- 18 Zhang D, Liu Y, Wang Q, et al. Structural basis of prokaryotic NAD-RNA decapping by NudC. *Cell Res*, 2016, 26: 1062–1066
 - 19 Grudzien-Nogalska E, Wu Y, Jiao X, et al. Structural and mechanistic basis of mammalian Nudt12 RNA deNADding. *Nat Chem Biol*, 2019, 15: 575–582
 - 20 Ogawa T, Yoshimura K, Miyake H, et al. Molecular characterization of organelle-type nudix hydrolases in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2008, 148: 1412–1424
 - 21 Wang X, Yu D, Yu J, et al. Toll/interleukin-1 receptor (TIR) domain-containing proteins have NAD-RNA decapping activity. *Nat Commun*, 2024, 15: 2261
 - 22 Abele F, Höfer K, Bernhard P, et al. A novel NAD-RNA decapping pathway discovered by synthetic light-up NAD-RNAs. *Biomolecules*, 2020, 10: 513
 - 23 Xiao C, Li K, Hua J, et al. *Arabidopsis* DXO1 activates RNMT1 to methylate the mRNA guanosine cap. *Nat Commun*, 2023, 14: 202
 - 24 Cahová H, Winz M L, Höfer K, et al. NAD captureSeq indicates NAD as a bacterial cap for a subset of regulatory RNAs. *Nature*, 2015, 519: 374–377
 - 25 Hu H, Flynn N, Zhang H, et al. SPAAC-NAD-seq, a sensitive and accurate method to profile NAD⁺-capped transcripts. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2021, 118: e2025595118
 - 26 Sharma S, Yang J, Favate J, et al. NADcapPro and circNC: methods for accurate profiling of NAD and non-canonical RNA caps in eukaryotes. *Commun Biol*, 2023, 6: 406
 - 27 Zhang H, Zhong H, Zhang S, et al. NAD tagSeq reveals that NAD⁺-capped RNAs are mostly produced from a large number of protein-coding genes in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, 116: 12072–12077
 - 28 Zhang H, Zhong H, Wang X, et al. Use of NAD tagSeq II to identify growth phase-dependent alterations in *E. coli* RNA NAD⁺ capping. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2021, 118: e2026183118
 - 29 Niu K, Zhang J, Ge S, et al. ONE-seq: epitranscriptome and gene-specific profiling of NAD-capped RNA. *Nucleic Acids Res*, 2023, 51: e12
 - 30 Li D, Ge S, Liu Y, et al. Epitranscriptome analysis of NAD-capped RNA by spike-in-based normalization and prediction of chronological age. *iScience*, 2023, 26: 108558
 - 31 Frindert J, Zhang Y, Nübel G, et al. Identification, biosynthesis, and decapping of NAD-Capped RNAs in *B. subtilis*. *Cell Rep*, 2018, 24: 1890–1901.e8
 - 32 Sharma S, Yang J, Grudzien-Nogalska E, et al. Xrn1 is a deNADding enzyme modulating mitochondrial NAD-capped RNA. *Nat Commun*, 2022, 13: 889
 - 33 Zhang Y, Kuster D, Schmidt T, et al. Extensive 5'-surveillance guards against non-canonical NAD-caps of nuclear mRNAs in yeast. *Nat Commun*, 2020, 11: 5508
 - 34 Kiledjian M. Eukaryotic RNA 5'-end NAD⁺ capping and DeNADding. *Trends Cell Biol*, 2018, 28: 454–464
 - 35 Yu X, Willmann M R, Vandivier L E, et al. Messenger RNA 5' NAD⁺ capping is a dynamic regulatory epitranscriptome mark that is required for proper response to abscisic acid in *Arabidopsis*. *Dev Cell*, 2021, 56: 125–140.e6
 - 36 Wolfram-Schauerte M, Moskalchuk A, Pozhydaieva N, et al. T4 phage RNA is NAD-capped and alters the NAD-cap epitranscriptome of *Escherichia coli* during infection through a phage-encoded decapping enzyme. *bioRxiv*, 2024, 2024.04.04.588121
 - 37 Wolfram-Schauerte M, Pozhydaieva N, Grawenhoff J, et al. A viral ADP-ribosyltransferase attaches RNA chains to host proteins. *Nature*, 2023, 620: 1054–1062
 - 38 Benoni B, Potužník J F, Škríba A, et al. HIV-1 infection reduces NAD capping of host cell snRNA and snoRNA. *ACS Chem Biol*, 2024, 19: 1243–1249
 - 39 Morales-Fillooy H G, Zhang Y, Nübel G, et al. The 5' NAD cap of RNAPIII modulates toxin production in *Staphylococcus aureus* isolates. *J Bacteriol*, 2020, 202: e00591–19
 - 40 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: 201–206
 - 41 Meyer K D, Saletore Y, Zumbo P, et al. Comprehensive analysis of mRNA methylation reveals enrichment in 3' UTRs and near stop codons. *Cell*, 2012, 149: 1635–1646
 - 42 He P C, He C. m⁶A RNA methylation: from mechanisms to therapeutic potential. *EMBO J*, 2021, 40: e105977

- 43 Su S, Li S, Deng T, et al. Cryo-EM structures of human m⁶A writer complexes. *Cell Res*, 2022, 32: 982–994
- 44 Pendleton K E, Chen B, Liu K, et al. The U6 snRNA m⁶A methyltransferase METTL16 regulates SAM synthetase intron retention. *Cell*, 2017, 169: 824–835.e14
- 45 Rong B, Zhang Q, Wan J, et al. Ribosome 18S m⁶A methyltransferase METTL5 promotes translation initiation and breast cancer cell growth. *Cell Rep*, 2020, 33: 108544
- 46 Ma H, Wang X, Cai J, et al. N⁶-methyladenosine methyltransferase ZCCHC4 mediates ribosomal RNA methylation. *Nat Chem Biol*, 2019, 15: 549
- 47 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: 885–887
- 48 Zheng G, Dahl J A, Niu Y, et al. ALKBH5 is a mammalian RNA demethylase that impacts RNA metabolism and mouse fertility. *Mol Cell*, 2013, 49: 18–29
- 49 Xiao W, Adhikari S, Dahal U, et al. Nuclear m⁶A reader YTHDC1 regulates mRNA splicing. *Mol Cell*, 2016, 61: 507–519
- 50 Zhou K I, Shi H, Lyu R, et al. Regulation of co-transcriptional pre-mRNA splicing by m⁶A through the low-complexity protein hnRNP G. *Mol Cell*, 2019, 76: 70–81.e9
- 51 Roundtree I A, Luo G Z, Zhang Z, et al. YTHDC1 mediates nuclear export of N⁶-methyladenosine methylated mRNAs. *eLife*, 2017, 6: e31311
- 52 Shi H, Wang X, Lu Z, et al. YTHDF3 facilitates translation and decay of N⁶-methyladenosine-modified RNA. *Cell Res*, 2017, 27: 315–328
- 53 Wang X, Lu Z, Gomez A, et al. N⁶-methyladenosine-dependent regulation of messenger RNA stability. *Nature*, 2014, 505: 117–120
- 54 Alarcón C R, Lee H, Goodarzi H, et al. N⁶-methyladenosine marks primary microRNAs for processing. *Nature*, 2015, 519: 482–485
- 55 Zhou J, Wan J, Gao X, et al. Dynamic m⁶A mRNA methylation directs translational control of heat shock response. *Nature*, 2015, 526: 591–594
- 56 Han D, Liu J, Chen C, et al. Anti-tumour immunity controlled through mRNA m⁶A methylation and YTHDF1 in dendritic cells. *Nature*, 2019, 566: 270–274
- 57 Chen K, Lu Z, Wang X, et al. High-resolution N⁶-methyladenosine (m⁶A) map using photo-crosslinking-assisted m⁶A sequencing. *Angew Chem Int Ed*, 2015, 54: 1587–1590
- 58 Bodi Z. Detection and quantification of N⁶-methyladenosine in messenger RNA by TLC. *Methods Mol Biol*, 2017, 1562: 79–87
- 59 Ke S, Alemu E A, Mertens C, et al. A majority of m⁶A residues are in the last exons, allowing the potential for 3' UTR regulation. *Genes Dev*, 2015, 29: 2037–2053
- 60 Molinie B, Wang J, Lim K S, et al. m⁶A-LAIC-seq reveals the census and complexity of the m⁶A epitranscriptome. *Nat Methods*, 2016, 13: 692–698
- 61 Dierks D, Garcia-Campos M A, Uzonyi A, et al. Multiplexed profiling facilitates robust m⁶A quantification at site, gene and sample resolution. *Nat Methods*, 2021, 18: 1060–1067
- 62 Garcia-Campos M A, Edelheit S, Toth U, et al. Deciphering the “m⁶A Code” via antibody-independent quantitative profiling. *Cell*, 2019, 178: 731–747.e16
- 63 Zhang Z, Chen L Q, Zhao Y L, et al. Single-base mapping of m⁶A by an antibody-independent method. *Sci Adv*, 2019, 5: eaax0250
- 64 Meyer K D. DART-seq: an antibody-free method for global m⁶A detection. *Nat Methods*, 2019, 16: 1275–1280
- 65 Wang Y, Xiao Y, Dong S, et al. Antibody-free enzyme-assisted chemical approach for detection of N⁶-methyladenosine. *Nat Chem Biol*, 2020, 16: 896–903
- 66 Shu X, Cao J, Cheng M, et al. A metabolic labeling method detects m⁶A transcriptome-wide at single base resolution. *Nat Chem Biol*, 2020, 16: 887–895
- 67 Hu L, Liu S, Peng Y, et al. m⁶A RNA modifications are measured at single-base resolution across the mammalian transcriptome. *Nat Biotechnol*, 2022, 40: 1210–1219
- 68 Gao Y, Liu X, Wu B, et al. Quantitative profiling of N⁶-methyladenosine at single-base resolution in stem-differentiating xylem of *Populus trichocarpa* using Nanopore direct RNA sequencing. *Genome Biol*, 2021, 22: 22
- 69 Leger A, Amaral P P, Pandolfini L, et al. RNA modifications detection by comparative Nanopore direct RNA sequencing. *Nat Commun*, 2021, 12: 7198
- 70 Liu C, Sun H, Yi Y, et al. Absolute quantification of single-base m⁶A methylation in the mammalian transcriptome using GLORI. *Nat Biotechnol*, 2023, 41: 355–366

- 71 Xiao Y L, Liu S, Ge R, et al. Transcriptome-wide profiling and quantification of *N*⁶-methyladenosine by enzyme-assisted adenosine deamination. *Nat Biotechnol*, 2023, 41: 993–1003
- 72 Liu Y, Yang D, Liu T, et al. *N*⁶-methyladenosine-mediated gene regulation and therapeutic implications. *Trends Mol Med*, 2023, 29: 454–467
- 73 Huang H, Weng H, Zhou K, et al. Histone H3 trimethylation at lysine 36 guides m⁶A RNA modification co-transcriptionally. *Nature*, 2019, 567: 414–419
- 74 Xiang Y, Laurent B, Hsu C H, et al. RNA m⁶A methylation regulates the ultraviolet-induced DNA damage response. *Nature*, 2017, 543: 573–576
- 75 Hao J D, Liu Q L, Liu M X, et al. DDX21 mediates co-transcriptional RNA m⁶A modification to promote transcription termination and genome stability. *Mol Cell*, 2024, 84: 1711–1726.e11
- 76 Yang X, Liu Q L, Xu W, et al. m⁶A promotes R-loop formation to facilitate transcription termination. *Cell Res*, 2019, 29: 1035–1038
- 77 Abakir A, Giles T C, Cristini A, et al. *N*⁶-methyladenosine regulates the stability of RNA:DNA hybrids in human cells. *Nat Genet*, 2020, 52: 48–55
- 78 Kang Z, Li R, Liu C, et al. m⁶A-modified cenRNA stabilizes CENPA to ensure centromere integrity in cancer cells. *Cell*, 2024, 187: 6035–6054.e27
- 79 Liu J, Dou X, Chen C, et al. *N*⁶-methyladenosine of chromosome-associated regulatory RNA regulates chromatin state and transcription. *Science*, 2020, 367: 580–586
- 80 Wei J, Yu X, Yang L, et al. FTO mediates LINE1 m⁶A demethylation and chromatin regulation in mESCs and mouse development. *Science*, 2022, 376: 968–973
- 81 Liu J, Gao M, He J, et al. The RNA m⁶A reader YTHDC1 silences retrotransposons and guards ES cell identity. *Nature*, 2021, 591: 322–326
- 82 Xu W, Li J, He C, et al. METTL3 regulates heterochromatin in mouse embryonic stem cells. *Nature*, 2021, 591: 317–321
- 83 Chelmicki T, Roger E, Teissandier A, et al. m⁶A RNA methylation regulates the fate of endogenous retroviruses. *Nature*, 2021, 591: 312–316
- 84 Wu Y, Xu X, Qi M, et al. *N*⁶-methyladenosine regulates maternal RNA maintenance in oocytes and timely RNA decay during mouse maternal-to-zygotic transition. *Nat Cell Biol*, 2022, 24: 917–927
- 85 Chen C, Liu W, Guo J, et al. Nuclear m⁶A reader YTHDC1 regulates the scaffold function of LINE1 RNA in mouse ESCs and early embryos. *Protein Cell*, 2021, 12: 455–474
- 86 Sun T, Xu Y, Xiang Y, et al. Crosstalk between RNA m⁶A and DNA methylation regulates transposable element chromatin activation and cell fate in human pluripotent stem cells. *Nat Genet*, 2023, 55: 1324–1335
- 87 Xiong F, Wang R, Lee J H, et al. RNA m⁶A modification orchestrates a LINE-1-host interaction that facilitates retrotransposition and contributes to long gene vulnerability. *Cell Res*, 2021, 31: 861–885
- 88 Lee J H, Wang R, Xiong F, et al. Enhancer RNA m⁶A methylation facilitates transcriptional condensate formation and gene activation. *Mol Cell*, 2021, 81: 3368–3385.e9
- 89 Dou X, Huang L, Xiao Y, et al. METTL14 is a chromatin regulator independent of its RNA *N*⁶-methyladenosine methyltransferase activity. *Protein Cell*, 2023, 14: 683–697
- 90 Zhang J, Wei J, Sun R, et al. A lncRNA from the FTO locus acts as a suppressor of the m⁶A writer complex and p53 tumor suppression signaling. *Mol Cell*, 2023, 83: 2692–2708.e7
- 91 Li Y, Dou X, Liu J, et al. Globally reduced *N*⁶-methyladenosine (m⁶A) in C9ORF72-ALS/FTD dysregulates RNA metabolism and contributes to neurodegeneration. *Nat Neurosci*, 2023, 26: 1328–1338
- 92 Dou X, Xiao Y, Shen C, et al. RBFOX2 recognizes *N*⁶-methyladenosine to suppress transcription and block myeloid leukaemia differentiation. *Nat Cell Biol*, 2023, 25: 1359–1368
- 93 Li R, Zhao H, Huang X, et al. Super-enhancer RNA m⁶A promotes local chromatin accessibility and oncogene transcription in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nat Genet*, 2023, 55: 2224–2234
- 94 Cerneckis J, Cui Q, He C, et al. Decoding pseudouridine: an emerging target for therapeutic development. *Trends Pharmacol Sci*, 2022, 43: 522–535
- 95 Li X, Ma S, Yi C. Pseudouridine: the fifth RNA nucleotide with renewed interests. *Curr Opin Chem Biol*, 2016, 33: 108–116
- 96 Sun H, Li K, Liu C, et al. Regulation and functions of non-m⁶A mRNA modifications. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2023, 24: 714–731
- 97 Li X, Zhu P, Ma S, et al. Chemical pulldown reveals dynamic pseudouridylation of the mammalian transcriptome. *Nat Chem Biol*, 2015, 11:

- 592–597
- 98 Zhang M, Jiang Z, Ma Y, et al. Quantitative profiling of pseudouridylation landscape in the human transcriptome. *Nat Chem Biol*, 2023, 19: 1185–1195
- 99 Dai Q, Zhang L S, Sun H L, et al. Quantitative sequencing using BID-seq uncovers abundant pseudouridines in mammalian mRNA at base resolution. *Nat Biotechnol*, 2023, 41: 344–354
- 100 Carlile T M, Rojas-Duran M F, Zinshteyn B, et al. Pseudouridine profiling reveals regulated mRNA pseudouridylation in yeast and human cells. *Nature*, 2014, 515: 143–146
- 101 Schwartz S, Bernstein D A, Mumbach M R, et al. Transcriptome-wide mapping reveals widespread dynamic-regulated pseudouridylation of ncRNA and mRNA. *Cell*, 2014, 159: 148–162
- 102 Lovejoy A F, Riordan D P, Brown P O, et al. Transcriptome-wide mapping of pseudouridines: pseudouridine synthases modify specific mRNAs in *S. cerevisiae*. *PLoS One*, 2014, 9: e110799
- 103 Khoddami V, Yerra A, Mosbrugger T L, et al. Transcriptome-wide profiling of multiple RNA modifications simultaneously at single-base resolution. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, 116: 6784–6789
- 104 Xu H, Kong L, Cheng J, et al. Absolute quantitative and base-resolution sequencing reveals comprehensive landscape of pseudouridine across the human transcriptome. *Nat Methods*, 2024, 21: 2024–2033
- 105 Karijolich J, Yu Y T. Converting nonsense codons into sense codons by targeted pseudouridylation. *Nature*, 2011, 474: 395–398
- 106 Martinez N M, Su A, Burns M C, et al. Pseudouridine synthases modify human pre-mRNA co-transcriptionally and affect pre-mRNA processing. *Mol Cell*, 2022, 82: 645–659.e9
- 107 Arnez J G, Steitz T A. Crystal structure of unmodified tRNA^{Gln} complexed with glutamyl-tRNA synthetase and ATP suggests a possible role for pseudo-uridines in stabilization of RNA structure. *Biochemistry*, 1994, 33: 7560–7567
- 108 Cui Q, Yin K, Zhang X, et al. Targeting PUS7 suppresses tRNA pseudouridylation and glioblastoma tumorigenesis. *Nat Cancer*, 2021, 2: 932–949
- 109 Nance K D, Meier J L. Modifications in an emergency: the role of *N*¹-methylpseudouridine in COVID-19 vaccines. *ACS Cent Sci*, 2021, 7: 748–756
- 110 Mulrone T E, Pöry T, Yam-Puc J C, et al. *N*¹-methylpseudouridylation of mRNA causes +1 ribosomal frameshifting. *Nature*, 2024, 625: 189–194
- 111 Song J, Dong L, Sun H, et al. CRISPR-free, programmable RNA pseudouridylation to suppress premature termination codons. *Mol Cell*, 2023, 83: 139–155.e9
- 112 Luo N, Huang Q, Dong L, et al. Near-cognate tRNAs increase the efficiency and precision of pseudouridine-mediated readthrough of premature termination codons. *Nat Biotechnol*, 2024, 43: 114–123
- 113 Akichika S, Hirano S, Shichino Y, et al. Cap-specific terminal *N*⁶-methylation of RNA by an RNA polymerase II-associated methyltransferase. *Science*, 2019, 363: eaav0080
- 114 Mauer J, Luo X, Blanjoie A, et al. Reversible methylation of m⁶Am in the 5' cap controls mRNA stability. *Nature*, 2017, 541: 371–375
- 115 Sun H, Zhang M, Li K, et al. Cap-specific, terminal *N*⁶-methylation by a mammalian m⁶Am methyltransferase. *Cell Res*, 2019, 29: 80–82
- 116 Boulas K, Toczyłowska-Socha D, Hawley B R, et al. Identification of the m⁶Am methyltransferase PCIF1 reveals the location and functions of m⁶Am in the transcriptome. *Mol Cell*, 2019, 75: 631–643.e8
- 117 Sendinc E, Valle-Garcia D, Dhall A, et al. PCIF1 catalyzes m⁶Am mRNA methylation to regulate gene expression. *Mol Cell*, 2019, 75: 620–630.e9
- 118 Linder B, Grozhik A V, Olarerin-George A O, et al. Single-nucleotide-resolution mapping of m⁶A and m⁶Am throughout the transcriptome. *Nat Methods*, 2015, 12: 767–772
- 119 Sun H, Li K, Zhang X, et al. m⁶Am-seq reveals the dynamic m⁶Am methylation in the human transcriptome. *Nat Commun*, 2021, 12: 4778
- 120 Liu J, Li K, Cai J, et al. Landscape and regulation of m⁶A and m⁶Am methylome across human and mouse tissues. *Mol Cell*, 2020, 77: 426–440.e6
- 121 Zhuo W, Sun M, Wang K, et al. m⁶Am methyltransferase PCIF1 is essential for aggressiveness of gastric cancer cells by inhibiting TM9SF1 mRNA translation. *Cell Discov*, 2022, 8: 48
- 122 RajBhandary U L, Stuart A, Faulkner R D, et al. Nucleotide sequence studies on yeast phenylalanine sRNA. *Cold Spring Harb Symp Quant*

- Biol*, 1966, 31: 425–434
- 123 Zhang M, Zhang X, Ma Y, et al. New directions for Ψ and m^1A decoding in mRNA: deciphering the stoichiometry and function. *RNA*, 2024, 30: 537–547
- 124 Dai X, Wang T, Gonzalez G, et al. Identification of YTH domain-containing proteins as the readers for N^1 -methyladenosine in RNA. *Anal Chem*, 2018, 90: 6380–6384
- 125 Seo K W, Kleiner R E. YTHDF2 recognition of N^1 -methyladenosine (m^1A)-modified RNA is associated with transcript destabilization. *ACS Chem Biol*, 2020, 15: 132–139
- 126 Dominissini D, Nachtergaele S, Moshitch-Moshkovitz S, et al. The dynamic N^1 -methyladenosine methylome in eukaryotic messenger RNA. *Nature*, 2016, 530: 441–446
- 127 Li X, Xiong X, Wang K, et al. Transcriptome-wide mapping reveals reversible and dynamic N^1 -methyladenosine methylome. *Nat Chem Biol*, 2016, 12: 311–316
- 128 Li X, Xiong X, Zhang M, et al. Base-resolution mapping reveals distinct m^1A methylome in nuclear- and mitochondrial-encoded transcripts. *Mol Cell*, 2017, 68: 993–1005.e9
- 129 Safra M, Sas-Chen A, Nir R, et al. The m^1A landscape on cytosolic and mitochondrial mRNA at single-base resolution. *Nature*, 2017, 551: 251–255
- 130 Zhou H, Rauch S, Dai Q, et al. Evolution of a reverse transcriptase to map N^1 -methyladenosine in human messenger RNA. *Nat Methods*, 2019, 16: 1281–1288
- 131 Pajdzik K, Lyu R, Dou X, et al. Chemical manipulation of m^1A mediates its detection in human tRNA. *RNA*, 2024, 30: 548–559
- 132 Suzuki T, Yashiro Y, Kikuchi I, et al. Complete chemical structures of human mitochondrial tRNAs. *Nat Commun*, 2020, 11: 4269
- 133 Basavappa R, Sigler P B. The 3 A crystal structure of yeast initiator tRNA: functional implications in initiator/elongator discrimination. *EMBO J*, 1991, 10: 3105–3111
- 134 Liu F, Clark W, Luo G, et al. ALKBH1-mediated tRNA demethylation regulates translation. *Cell*, 2016, 167: 1897
- 135 Wang Y, Wang J, Li X, et al. N^1 -methyladenosine methylation in tRNA drives liver tumorigenesis by regulating cholesterol metabolism. *Nat Commun*, 2021, 12: 6314
- 136 Liu Y, Zhou J, Li X, et al. tRNA- m^1A modification promotes T cell expansion via efficient MYC protein synthesis. *Nat Immunol*, 2022, 23: 1433–1444
- 137 Su Z, Monshaugen I, Wilson B, et al. TRMT6/61A-dependent base methylation of tRNA-derived fragments regulates gene-silencing activity and the unfolded protein response in bladder cancer. *Nat Commun*, 2022, 13: 2165
- 138 Sun Y, Dai H, Dai X, et al. m^1A in CAG repeat RNA binds to TDP-43 and induces neurodegeneration. *Nature*, 2023, 623: 580–587
- 139 Yang Y, Wang L, Han X, et al. RNA 5-methylcytosine facilitates the maternal-to-zygotic transition by preventing maternal mRNA decay. *Mol Cell*, 2019, 75: 1188–1202.e11
- 140 Orellana E A, Liu Q, Yankova E, et al. METTL1-mediated m^7G modification of Arg-TCT tRNA drives oncogenic transformation. *Mol Cell*, 2021, 81: 3323–3338.e14
- 141 Arango D, Sturgill D, Alhusaini N, et al. Acetylation of cytidine in mRNA promotes translation efficiency. *Cell*, 2018, 175: 1872–1886.e24
- 142 Dominissini D, Rechavi G. N^4 -acetylation of cytidine in mRNA by NAT10 regulates stability and translation. *Cell*, 2018, 175: 1725–1727
- 143 Flynn R A, Pedram K, Malaker S A, et al. Small RNAs are modified with N-glycans and displayed on the surface of living cells. *Cell*, 2021, 184: 3109–3124.e22
- 144 Zhang N, Tang W, Torres L, et al. Cell surface RNAs control neutrophil recruitment. *Cell*, 2024, 187: 846–860.e17
- 145 Huang S, Wylder A C, Pan T. Simultaneous nanopore profiling of mRNA m^6A and pseudouridine reveals translation coordination. *Nat Biotechnol*, 2024, 42: 1831–1835

Mechanism, detection, and functional application of RNA chemical modifications

XIAO Ye^{2,3†}, DENG QiDong^{1,2†}, LIN HuiYuan^{1,2†}, CHEN XueMei^{1,2,3}, HU Hao^{1,2,3*},
LIU Jun^{1,2,3*} & YI ChengQi^{1,2,3*}

¹ State Key Laboratory of Gene Function and Modulation Research, School of Life Sciences, Peking University, Beijing 100871, China

² Beijing Advanced Center of RNA Biology (BEACON), Peking University, Beijing 100871, China

³ Peking-Tsinghua Center for Life Sciences, Beijing 100871, China

† Contributed equally to this work

* Corresponding authors, E-mail: hao.hu@pku.edu.cn; junliu1223@pku.edu.cn; chengqi.yi@pku.edu.cn

Regulation of gene expression is a crucial means to influence the growth and development of both plants and animals. RNA modifications, which result in various epitranscriptomes, affect gene expression by subtly regulating the destiny of RNA molecules without altering the genetic sequence information, and are implicated in every stage of an RNA's lifetime, such as synthesis, transport, turnover, and decay. This review thoroughly encapsulates the latest advances over the past five years concerning noncanonical 5' caps (such as NAD⁺) and internal modifications (m⁶A, m⁵C, Ψ, m¹A, m⁶Am) on RNA. It explores their regulatory mechanisms, detection methods, molecular mechanisms, biological activities, and prospective future research directions. This article examines the potential applications of RNA modification in improving crop varieties and in the diagnosis, treatment, and prevention of human diseases, given their increasingly significant involvement in cellular processes and physiological regulation. The review highlights the potential breakthroughs in the investigation of novel modifications, including RNA glycosylation, regarding their mechanisms and roles. Comprehensive studies on novel RNA modifications and their functions, coupled with advances in sequencing technologies, are anticipated to significantly enhance the use of RNA modifications in disease therapy and bioengineering.

RNA, chemical modifications, noncanonical caps, internal modifications, regulation mechanism, detection methods, biological function

doi: [10.1360/SSV-2024-0283](https://doi.org/10.1360/SSV-2024-0283)