

RNA 表观遗传修饰—— N^6 -甲基腺嘌呤与植物的生长发育

魏连环 贾桂芳*

(北京大学化学与分子工程学院, 北京 100871)

摘要: RNA 表观遗传修饰 N^6 -甲基腺嘌呤(m^6A)是真核生物信使 RNA(mRNA)上存在的最为广泛的中间化学修饰。它在哺乳动物中存在较为广泛, 证实 m^6A 为 mRNA 上的动态可逆化修饰, 它由甲基转移酶复合物(编码器)催化形成, 同时可以被去甲基酶(消码器)氧化去甲基; m^6A 可以被结合蛋白(读码器)识别, 进而调控 mRNA 的剪接、稳定性、翻译、出核等。相较之下, m^6A 在植物中的研究较少。本文将简要回顾目前 m^6A 的研究进展, 重点综述 m^6A 在植物中的研究结果, 展望 m^6A 在植物生长发育和应对外界刺激时的潜在重要功能。

关键词: N^6 -甲基腺嘌呤(m^6A); RNA 表观遗传学; m^6A 甲基转移酶; m^6A 去甲基酶; m^6A 结合蛋白
中图分类号: G64; O6

Epitranscriptomic Modification- N^6 -Methyladenosine (m^6A) and Plant Development

WEI Lian-Huan JIA Gui-Fang*

(College of Chemistry and Molecular Engineering, Peking University, Beijing 100871, P. R. China)

Abstract: Epitranscriptomic modification- N^6 -methyladenosine (m^6A) is the most prevalent internal modification in eukaryotic mRNA. m^6A has been well studied in mammals and proved to be dynamic and reversible. In mammals, it is installed by the m^6A methyltransferase complex (writers) and can be reversed by demethylases (erasers); it can be recognized by m^6A -binding proteins (readers) to regulate RNA processing, such as splicing, stability, translation efficiency, nuclear export and so on. However, the research of m^6A in plants is less limited. Here we summarize the latest progresses of m^6A , especially m^6A study in plants, and further discuss the potential impacts of m^6A on plant growth and development, and responses to external stimuli.

Key Words: N^6 -Methyladenosine(m^6A); Epitranscriptome; m^6A Methyltransferase; m^6A Demethylase; m^6A Binding protein

1 背景介绍

中心法则提出, 遗传信息从 DNA 转录为 RNA, 再从 RNA 翻译为具有不同功能的蛋白质。表观遗传学指出, 基因表达的每个环节都是被严密调控的, 相同的核苷酸序列, 可表达出可遗传的不同遗传信息, 其中以 DNA 甲基化和组蛋白翻译后修饰为代表。如 DNA 甲基化修饰 5-甲基胞嘧啶(5-methylcytosine, 5mC)^[1,2], 它存在于基因的启动子区时, 会抑制基因的转录, 进一步影响细胞的分

*通讯作者, Email: guifangjia@pku.edu.cn

基金资助: 国家重点研发计划“精准医学研究”重点专项(2016YFC0900300)

化生长。DNA上的5-羟甲基胞嘧啶(5-hydroxymethylcytosine, 5hmC)有促进基因表达的功能,它在白血病细胞中含量升高^[3,4]。组蛋白也可以通过甲基化、乙酰化、磷酸化、泛素化等抑制或激活基因表达^[5-7]。由于RNA结构的复杂、性质的不稳定及研究方法的限制等,人们一直忽略了RNA在表观遗传学中的重要作用,直到2011年发现首个RNA化学修饰 N^6 -甲基腺嘌呤(N^6 -methyladenosine, m^6A)的去甲基酶^[8],才发现RNA的转录后修饰也是表观遗传学的重要环节^[9]。

RNA上已鉴定出的100多种化学修饰中^[10], m^6A 是真核生物mRNA上存在的最为保守、广泛的中间修饰(0.1%–0.4% m^6A/A),相当于平均每条mRNA含有3–5个 m^6A ^[11-13]。自20世纪70年代被发现以来,它在病毒^[14,15]、哺乳动物细胞^[13,16-19]、果蝇^[20]、植物^[21,22]以及酵母^[23]中都陆续被鉴定出来。按RNA的种类分类, m^6A 还发现于tRNA^[24]、rRNA^[25]、小核RNA (small nuclear RNA, snRNA)^[26]以及长非编码RNA (long non-coding RNA, lncRNA)中。由于 m^6A 不会干扰碱基互补配对,在反转录时不会产生突变,致使其检测比较困难,长久以来研究比较缓慢。直到第一个RNA去甲基酶肥胖蛋白FTO (fat-mass and obesity associated protein)的发现,揭示 m^6A 是动态可逆的,预示着具有调控基因表达的潜在功能^[8]。自此开启了全新研究领域——RNA表观遗传学(亦称表观转录组学)。

mRNA上携带着编辑蛋白序列的密码子, m^6A 像密码子之上多出的旁注,要解析 m^6A 所携带的信息,需要开发 m^6A 的检测技术,发现和研究 m^6A 甲基转移酶复合物(编码器)、去甲基酶(消码器)和结合蛋白(读码器)的功能。目前,人们已经在哺乳动物细胞中找到 m^6A 甲基转移酶复合物的四个组分METTL3 (methyltransferase like 3)^[27]、METTL14 (methyltransferase like 14)^[28]、WTAP (wilms' tumor 1-associating protein)^[29]和KIAA1429^[30],两个去甲基酶FTO^[8]和ALKBH5^[31],和一系列结合蛋白,并发展了利用抗体富集的 m^6A 高通量测序技术^[32,33]。在植物中, m^6A 同样被很早发现,1979年Kennedy和Lane^[34]在小麦中发现了 m^6A ,1980年Haugland和Cline^[21]发现在燕麦胚芽鞘mRNA内部存在 m^6A ,1981年Nichols和Welder^[22]在玉米中发现 m^6A 。但是 m^6A 在植物中的研究还比较滞后,主要还停留在对 m^6A 甲基转移酶的研究阶段^[35-37]。

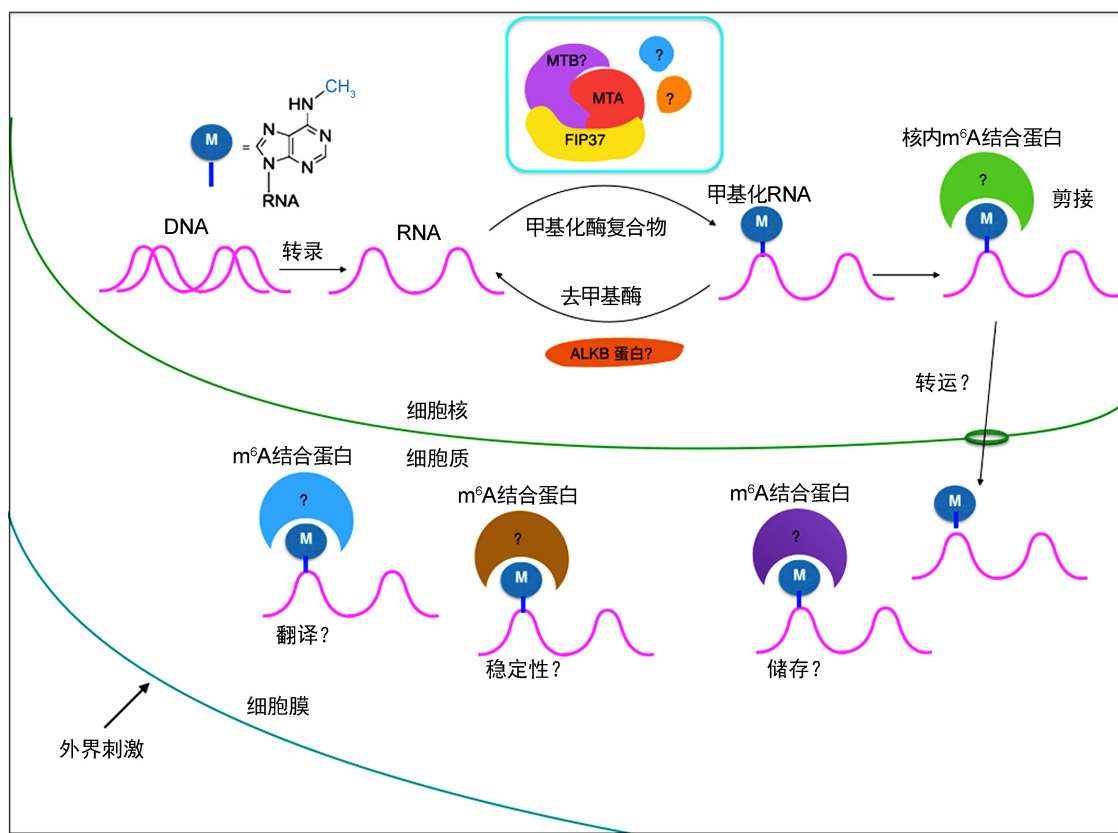
本文从 m^6A 全转录组分布特征、 m^6A 相关的甲基转移酶、去甲基酶及结合蛋白方面综述研究进展,通过对比其他物种中的研究结果来总结和预测 m^6A 在植物的生长发育、应对外界刺激时的重要作用,阐述植物中的研究对于我们更加深刻地理解 m^6A 功能的重要作用(图1)。

2 m^6A 在转录组上的分布及检测技术

想要研究 m^6A 的功能,首先要发展各种检测方法来确认它在RNA上的位置。由于 m^6A 并不影响碱基互补配对原则,与正常的A一样与U配对,所以不能用正常测序或杂交的方法来检测,增加了对它检测的难度。

早期在RNA中鉴定 m^6A 的方法采用同位素标记^[13,38,39]、薄层色谱^[40,41]等方法,研究发现 m^6A 出现在特定的序列GAC (70%)或AAC (30%)中^[19,42],并且这个保守序列是mRNA上 m^6A 特有的,并没有出现在rRNA、tRNA和snRNA^[24-26]中。之后 m^6A 保守序列被进一步拓展成RRACH (R = G/A, G > A; H = A、C、U)^[11,32,33,40],后来的全转录组 m^6A 高通量测序结果也证实了这一保守序列^[31,33]。 m^6A 甲基转移酶和结合蛋白也都倾向于识别这个序列。但是由于这个保守序列的数量远大于 m^6A 的数量,所以 m^6A 的形成并不是 m^6A 甲基转移酶简单地识别这个保守序列,应该存在更复杂的机理指导 m^6A 的生成。

由于检测方法的局限, m^6A 的研究长时间没有取得重大进步。高效液相色谱三重四级杆质谱联用技术(HPLC-LC/MS/MS)可以更加精确地定量 m^6A 并监测其动态变化^[8,31]。 m^6A 抗体免疫印迹方法(dot-blot)^[8,31,33]也可以更方便灵敏地检测出 m^6A 的含量。 m^6A 广泛分布在各种组织中,尤其富集在大脑、肝脏、肾脏中,并且在大脑的发育中, m^6A 的含量逐渐升高^[33]。 m^6A 在各种癌细胞系中含量也不同^[32]。在不同的拟南芥株系中, mRNA上 m^6A 含量也是动态变化的^[43]。这些 m^6A 的动态变化也说明 m^6A 发挥

图1 植物中 m^6A 对拟南芥转录组可能的调控机理

着重要的调控功能。

2012年,两个课题组^[32,33]分别同时开发了 m^6A 的高通量测序技术(m^6A -seq或MeRIP),极大推动了 m^6A 的研究。该技术是将mRNA切成100个核苷酸(100 nt)左右的片段,采用 m^6A 抗体亲和富集沉淀的方法,将富集出来的携带有 m^6A 的RNA片段和对照(input)分别建库,可以得到分辨率在200 nt左右的全转录组 m^6A 分布图。研究发现,在人和老鼠中,转录组 m^6A 分布在mRNA和non-coding RNA(ncRNA),主要富集在3'非翻译区(3'UTR),其次是长的外显子(exon)上。 m^6A 也在内含子(intron)上出现,说明 m^6A 是在剪接前或剪接时被加到转录本上。从人类到老鼠细胞,从正常细胞到癌症细胞,到受外界各种刺激的细胞,测序结果显示很多 m^6A 位点都是保守的,但也有很多 m^6A 位点是物种特异、细胞系特异,以及细胞受到外界胁迫会出现特异的 m^6A 位点。

酵母只在减数分裂期才会出现 m^6A ,说明 m^6A 对于酵母的减数分裂十分重要。2013年酵母中进行了分辨率更高(约50 nt)的 m^6A 高通量测序^[44]。并且用敲除IME4甲基化转移酶的酵母作为负对照,得到更加确信的结果。测序结果发现 m^6A 在酵母中与人和老鼠模式相同,主要富集在3'UTR区。在酵母中计算甲基化的转录本得到的保守序列中心也是GAC。

拟南芥上的 m^6A 与动物细胞中的含量水平相当^[32,35,43]。2014年拟南芥Can-0和Hen-16两个品种转录组RNA上 m^6A 的高通量测序^[43]结果显示,与哺乳动物细胞相比, m^6A 在mRNA上的分布具有特异性, m^6A 不仅集中在终止密码子及3'UTR,还集中在起始密码子(start codon)附近,意味着 m^6A 可能在植物中存在独特的功能。此外,研究发现在起始密码子附近含有 m^6A 的基因很多都是叶绿体相关蛋白基因,并且一些光合作用相关的基因mRNA上也含有 m^6A ,这说明 m^6A 也与光合作用相关。在植物中 m^6A 的保守序列与哺乳动物相同,都是RRACH(R = G/A, G > A; H = A、C、U)。拟南芥中位于

3'UTR 区的 m⁶A 倾向于与基因表达量负相关,而在 5'端的 m⁶A 与基因表达正相关。植物上 mRNA 的起始密码子附近的 m⁶A 功能需要我们进一步探索。

2014 年水稻中 mRNA 上 m⁶A 的测序也被报道^[45]。研究也发现 m⁶A 不仅集中在翻译终止点附近,也集中在翻译起始位点。水稻的愈伤组织和叶片相比, m⁶A 大部分的位点比较保守,但仍有相当一部分呈现组织特异性。

为了追求更高的分辨率,2014 年开发了光交联辅助 m⁶A 测序技术(photo-crosslinking-assisted m⁶A sequencing strategy, PA-m⁶A-seq)^[46],在细胞培养时掺加 4-硫代尿苷(4-thiouridine, 4SU),365 nm 紫外光照下带有 4SU 的 RNA 可以与 m⁶A 抗体发生交联,从而在 m⁶A 位点附近引入突变,将 m⁶A 的位置定位到单碱基水平。但是该方法须引入 4SU,目前只能在细胞中使用。

2015 年发展了 m⁶A 碱基分辨率交联共沉淀技术(m⁶A individual-nucleotide-resolution cross-linking and immunoprecipitation, miCLIP)^[47],用 254 nm 波长紫外光诱导 m⁶A 抗体与 RNA 交联,逆转录时会产生转录停止或突变,从而确定 m⁶A 精确位点。但是这种方法抗体的依赖性高,不同质量的抗体会得到不同的效率。

m⁶A 的测序方法虽然正在一步步完善,但是也要看到, m⁶A 的单碱基分辨率高通量测序仍然面临很多挑战,这仍然将是 m⁶A 研究需要解决的一个关键问题。

3 植物中 m⁶A 的编码器

早在 1988 年 Narayan 和 Rottman^[12]就利用 HeLa 细胞核裂解液中包含的甲基化转移酶体外对腺嘌呤进行甲基化的实验。1994 年人们分离出来与 m⁶A 甲基化相关的 30、200 和 875 kDa 复合物^[48],1997 年从 200 kDa 甲基化酶复合物中鉴定出 70 kDa 的第一个哺乳动物甲基化酶 METTL3^[27]。序列分析发现它与已知的酵母中的调节减数分裂和孢子形成的 IME4 基因是同源蛋白^[49],并通过实验证实确为 m⁶A 甲基转移酶组分^[23]。此外先后在多个物种中找到 METTL3 的同源蛋白,如拟南芥中的 MTA^[35],果蝇中的 IME4^[50],均发现 m⁶A 甲基化对生物体生长发育具有重要的调控功能。对 METTL3 家族进行进化分析^[51]和实验^[52]发现了 m⁶A 甲基转移酶复合物第二个活性组分,它是与 METTL3 不同家系但高度同源的 METTL14 基因。2008 年拟南芥中发现 MTA 时,通过酵母双杂交发现它与 FIP37 有相互作用^[35]。2014 年证明 FIP37 在哺乳动物细胞中的同源蛋白 WTAP^[53]是 m⁶A 甲基化转移酶复合物中第三个组分。人们又通过 WTAP 发现了能与其相互作用的 KIAA1429 为第四个组分^[30]。

在哺乳动物细胞中研究发现, METTL3^[27]和 METTL14^[52]能形成一个十分稳定的异源二聚体, METTL3 作为催化中心, METTL4 主要结合 RNA 底物^[54]。分别敲除 METTL3 和 METTL14 都能引起 mRNA 上的 m⁶A 显著降低。WTAP 是和 mRNA 的剪接有关的蛋白,对 METTL3-METTL14 复合物在富集着 pre-mRNA 剪接因子的核小斑点的定位有重要作用,敲除 WTAP 同样能引起 mRNA 上 m⁶A 的显著降低^[53]。近来发现, KIAA1429 也是甲基化转移酶复合物的重要成分^[55],但是具体功能还未有详细报道。

在酵母中,甲基化转移酶复合物是 MIS 复合物,定位在核仁中^[56],由 Ime4 (METTL3 同源蛋白),Mum2 (WTAP 同源蛋白),Slz1 (sporulation specific with a leucine zipper motif protein 1)和其他未知蛋白成分组成。Mum2、Slz1 是酵母中跟减数分裂有关的两个蛋白,他们与 Ime4 都有相互作用。敲除 Mum2 会显著影响 Ime4 的甲基化能力,但敲除 Slz1 并没有直接影响 Ime4 的甲基化能力。哺乳动物和植物细胞内没有 Slz1 的同源蛋白,它们的甲基化转移酶主要定位在核小斑而不是核仁中。

植物中 m⁶A 相关的蛋白酶研究较少,只在拟南芥中研究了它的甲基化转移酶组分 MTA (At4g10760, METTL3 同源蛋白)和 FIP37 (At3g54170, WTAP 同源蛋白)(图 1)。拟南芥 MTA 最早被命名为 EMB1706 (Embryo-Defective1706),是在筛选胚胎发育损伤的基因时发现并命名。MTA 主要分布

在分裂组织中,特别是生殖器官,顶端分生组织及新生的根毛等,相应的 m^6A 在这些组织中含较高,花苞中含最高。在拟南芥中敲除MTA会使种子停留在球形胚阶段不能继续发育^[35]。在 mta 突变体中部分回补胚发育期的特定启动子ABI3启动的MTA,可以使 mta 突变体种子度过胚胎发育初期继续发育,而进入之后的成长阶段后不再表达MTA,使拟南芥植株的 m^6A 水平下降。可以看到 m^6A 水平的下降会导致拟南芥顶端优势的降低,花序节间长度变短,莲座叶变得更小但是更浓密。毛状体分叉数目增多,而毛状体分叉是植物核内复制的指示标,说明 m^6A 可能与调控DNA的复制相关。

FIP37与MTA有相互作用^[35-37]。FIP37也表达在活跃分裂的组织中,如顶端分生组织、幼嫩的叶、成长的花器官等。FIP37的缺失导致转录组在靠近终止密码子的位置及3'UTR区域的 m^6A 发生缺失,5'UTR及蛋白编码区的影响较小。FIP37的缺失还会使拟南芥顶端分生组织过度分化。FIP37与动物当中的WTAP的功能有所区别。WTAP定位在核斑点中,影响mRNA的剪接,而FIP37均匀地分布在除核仁以外的核质中,没有发现其影响RNA的剪接。

目前大家对MTB还知之甚少。对植物中其他 m^6A 甲基化转移酶复合物中的成分的鉴定也将有助于对 m^6A 功能的理解。

4 植物中 m^6A 消码器

目前发现的 m^6A 的去甲基酶只有哺乳动物细胞的FTO^[8]及ALKBH5^[31]。它们同属于二价铁和 α -酮戊二酸依赖的双加氧酶AlkB家族,人体中发现有9个AlkB家族蛋白,包括ALKBH1-8和FTO。降低FTO在细胞内的表达量会引起RNA上 m^6A 水平的升高。FTO主要定位在细胞核中。ALKBH5与RNA的相互作用力比FTO强,因为直接用免疫共沉淀的方法就发现了其作用的RNA底物。此外在小鼠的睾丸中ALKBH5有很高的表达量,敲除ALKBH5的小鼠精子发育出现异常。

拟南芥中没有FTO的同源蛋白,但是有13个AlkB家族同源蛋白^[57]。可以用ALKBH5与这13个潜在的去甲基酶作序列对比,预测拟南芥中RNA的去甲基酶(图2)。

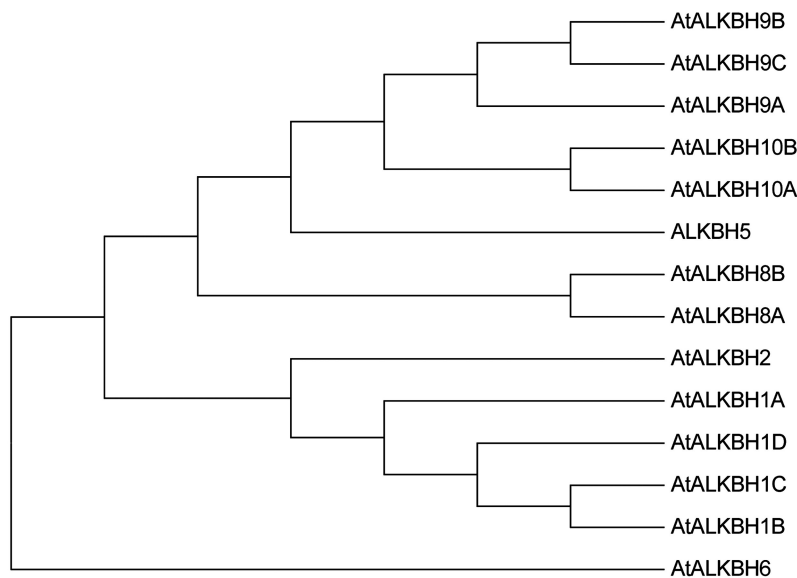


图2 人类ALKBH5和拟南芥中ALKB结构域家族蛋白系统发育树

植物中 m^6A 的去甲基酶的鉴定还是十分重要的,它将直接证明 m^6A 在植物中也是动态可逆发挥重要的调控功能的。但是由于植物中AlkB家族同源蛋白较多,目前相关研究很少。而且AlkB家族蛋白的功能十分广泛,有可能识别单链或双链DNA^[58,59]、单链RNA^[8,31]或双链RNA,也有可能作为蛋白

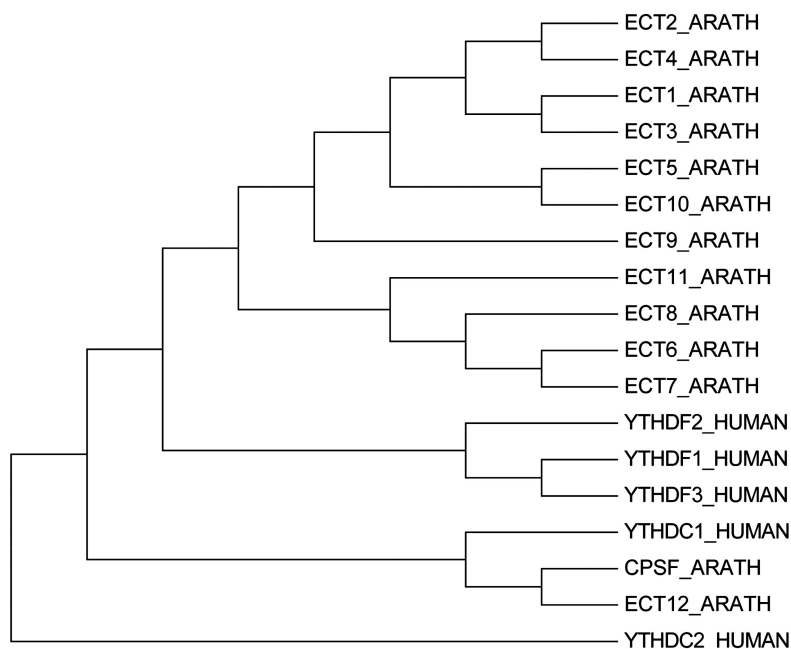


图3 人类和拟南芥中YTH结构域家族蛋白系统发育树

此外,植物中研究 m^6A 相关结合蛋白与去甲基蛋白有同样的问题,就是它的同源蛋白比较多。这些同源蛋白是每个都有其特异的功能,还是存在功能的冗余,或者功能上的协调,这些都是研究者所面临的挑战。

6 总结与展望

目前,人们在细胞水平对 m^6A 发挥RNA表观遗传学调控功能的研究已经取得了非常多的进展。

m^6A 调节细胞的分化。在老鼠胚胎干细胞(embryonic stem cell, ESCs)中敲除METTL3,会使细胞处于初始多能性状态,而不向活化多能性状态转化,从而抑制进一步分化。相反,在老鼠另一个更易分化的外胚层干细胞(mouse epiblast stem cells, mEpiSCs)细胞系中,敲除METTL3会导致细胞稳定性减弱,使细胞快速分化或者细胞死亡^[74]。

m^6A 调节细胞的节律^[75]。很多跟昼夜节律相关的基因上都含有 m^6A ,通过敲除细胞中的甲基化酶METTL3,降低 m^6A 的水平会导致真核细胞生物钟周期变长。

m^6A 在细胞应对各种外界刺激时发挥重要作用。一些外界刺激如热击会改变YTHDF2在细胞中的定位,由细胞质转移到细胞核,保护特定基因mRNA 5'UTR区的 m^6A 不被FTO去甲基化,从而发生cap-independent translation^[76]。在拟南芥中敲除MTA和FIP37都会导致跟刺激相关的很多通路基因发生变化^[35,37]。ECT1也会响应各种刺激,表达水平上升^[72]。所以可以看出, m^6A 在细胞应对外界刺激时,发挥不可忽视的作用。

动物细胞系虽然是最理想的用来研究各种细胞通路机理的工具,但由于细胞群不能组成一个生物个体,所以不能显示出个体遇到各种刺激损伤时所显现的表型,从而不能更深入一步研究。植物个体如拟南芥将是最理想的用来研究 m^6A 在生命体应对外界刺激时所发挥作用的机理的模式生物。它具有强大的基因敲除数据库,同时目前为止较为成熟的实验方法可以使我们观察各种 m^6A 或 m^6A 相关蛋白酶受干扰后出现的性状,从而更深刻地理解 m^6A 发挥RNA表观遗传学调控对个体生长发育的影响。

此外植物体作为自养生物与异养的动物体区别很大。目前测序结果也证明 m^6A 在植物和动物中存

在的模式有很大不同,因而发挥功能的方式也有很大不同。 m^6A 在不同模式的生命个体如病毒、动物、植物mRNA上都发挥着广泛的作用,从而说明它的重要性。这也是一个我们需要在植物体中研究 m^6A 的重要原因。

参 考 文 献

- [1] Suzuki, M. M.; Bird, A. *Nat. Rev. Genet.* **2008**, *9*, 465.
- [2] Bhutani, N.; Burns, D. M.; Blau, H. M. *Cell* **2011**, *146*, 866.
- [3] Chapman, C. G.; Mariani, C. J.; Wu, F.; Meckel, K.; Butun, F.; Chuang, A.; Madzo, J.; Bissonette, M. B.; Kwon, J. H.; Godley, L. A. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 17568.
- [4] Huang, H.; Jiang, X.; Li, Z.; Li, Y.; Song, C. X.; He, C.; Sun, M.; Chen, P.; Gurbuxani, S.; Wang, J.; Hong, G. M.; Elkahoul, A. G.; Arnovitz, S.; Wang, J.; Szulwach, K.; Lin, L.; Street, C.; Wunderlich, M.; Dawlaty, M.; Neilly, M. B.; Jaenisch, R.; Yang, F. C.; Mulloy, J. C.; Jin, P.; Liu, P. P.; Rowley, J. D.; Xu, M.; He, C.; Chen, J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2013**, *110*, 11994.
- [5] Strahl, B. D.; Allis, C. D. *Nature* **2000**, *403*, 41.
- [6] Klose, R. J.; Kallin, E. M.; Zhang, Y. *Nat. Rev. Genet.* **2006**, *7*, 715.
- [7] Shi, Y. *Nat. Rev. Genet.* **2007**, *8*, 829.
- [8] Jia, G.; Fu, Y.; Zhao, X.; Dai, Q.; Zheng, G.; Yang, Y.; Yi, C.; Lindahl, T.; Pan, T.; Yang, Y. G.; He, C. *Nat. Chem. Biol.* **2011**, *7*, 885.
- [9] He, C. *Nat. Chem. Biol.* **2010**, *6*, 863.
- [10] Cantara, W. A.; Crain, P. F.; Rozenski, J.; McCloskey, J. A.; Harris, K. A.; Zhang, X.; Vendeix, F. A. P.; Fabris, D.; Agris, P. F. *Nucleic Acids Res.* **2011**, *39*, D195.
- [11] Harper, J. E.; Miceli, S. M.; Roberts, R. J.; Manley, J. L. *Nucleic Acids Res.* **1990**, *18*, 5735.
- [12] Narayan, P.; Rottman, F. M. *Science* **1988**, *242*, 1159.
- [13] Dubin, D. T.; Taylor, R. H. *Nucleic Acids Res.* **1975**, *2*, 1653.
- [14] Krug, R. M.; Morgan, M. A.; Shatkin, A. J. *J. Virol.* **1976**, *20*, 45.
- [15] Wei, C. M.; Moss, B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1975**, *72*, 318.
- [16] Adams, J. M.; Cory, S. *Nature* **1975**, *255*, 28.
- [17] Furuichi, Y.; Morgan, M.; Shatkin, A. J.; Jelinek, W.; Salditt-Georgieff, M.; Darnell, J. E. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1975**, *72*, 1904.
- [18] Desrosiers, R.; Friderici, K.; Rottman, F. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1974**, *71*, 3971.
- [19] Wei, C. M.; Moss, B. *Biochemistry* **1977**, *16*, 1672.
- [20] Levis, R.; Penman, S. *J. Mol. Biol.* **1978**, *120*, 487.
- [21] Haugland, R. A.; Cline, M. G. *Eur. J. Biochem.* **1980**, *104*, 271.
- [22] Nichols, J. L.; Welder, L. *Plantence Letters* **1981**, *21*, 75.
- [23] Clancy, M. J.; Shambaugh, M. E.; Timpte, C. S.; Bokar, J. A. *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, 4509.
- [24] Saneyoshi, M.; Harada, F.; Nishimura, S. *BBA Section Nucleic Acids And Protein Synthesis* **1969**, *190*, 264.
- [25] Iwanami, Y.; Brown, G. M. *Arch. Biochem. Biophys.* **1968**, *126*, 8.
- [26] Bringmann, P.; Lührmann, R. *FEBS Lett.* **1987**, *213*, 309.
- [27] Bokar, J. A.; Shambaugh, M. E.; Polayes, D.; Matera, A. G.; Rottman, F. M. *RNA* **1997**, *3*, 1233.
- [28] Liu, J.; Yue, Y.; Han, D.; Wang, X.; Fu, Y.; Zhang, L.; Jia, G.; Yu, M.; Lu, Z.; Deng, X.; Dai, Q.; Chen, W.; He, C. *Nat. Chem. Biol.* **2014**, *10*, 93.
- [29] Fu, Y.; Dominissini, D.; Rechavi, G.; He, C. *Nat. Rev. Genet.* **2014**, *15*, 293.
- [30] Schwartz, S.; Mumbach, M. R.; Jovanovic, M.; Wang, T.; Maciag, K.; Bushkin, G. G.; Mertins, P.; Ter-Ovanesyan, D.; Habib, N.; Cacchiarelli, D.; Sanjana, N. E.; Freinkman, E.; Pacold, M. E.; Satija, R.; Mikkelsen, T. S.; Hacohen, N.; Zhang, F.; Carr, S. A.; Lander, E. S.; Regev, A. *Cell reports* **2014**, *8*, 284.
- [31] Zheng, G.; Dahl, J. A.; Niu, Y.; Fedorcsak, P.; Huang, C. M.; Li, C. J.; Vagbo, C. B.; Shi, Y.; Wang, W. L.; Song, S. H.; Lu, Z.; Bosmans, R. P.; Dai, Q.; Hao, Y. J.; Yang, X.; Zhao, W. M.; Tong, W. M.; Wang, X. J.; Bogdan, F.; Furu, K.; Fu, Y.; Jia, G.; Zhao, X.; Liu, J.; Krokan, H. E.; Klungland, A.; Yang, Y. G.; He, C. *Mol. Cell* **2013**, *49*, 18.
- [32] Dominissini, D.; Moshitch-Moshkovitz, S.; Schwartz, S.; Salmon-Divon, M.; Ungar, L.; Osenberg, S.; Cesarkas, K.; Jacob-Hirsch, J.; Amariglio, N.; Kupiec, M.; Sorek, R.; Rechavi, G. *Nature* **2012**, *484*, 201.

- [33] Meyer, K. D.; Saletore, Y.; Zumbo, P.; Elemento, O.; Mason, C. E.; Jaffrey, S. R. *Cell* **2012**, *149*, 1635.
- [34] Kennedy, T. D.; Lane, B. G. *Can. J. Biochem.* **1979**, *57*, 927.
- [35] Zhong, S.; Li, H.; Bodi, Z.; Button, J.; Vespa, L.; Herzog, M.; Fray, R. G. *The Plant Cell* **2008**, *20*, 1278.
- [36] Bodi, Z.; Zhong, S.; Mehra, S.; Song, J.; Graham, N.; Li, H.; May, S.; Fray, R. G. *Frontiers in Plant Science* **2012**, *3*, 48.
- [37] Shen, L.; Liang, Z.; Gu, X.; Chen, Y.; Teo, Z. W.; Hou, X.; Cai, W. M.; Dedon, P. C.; Liu, L.; Yu, H. *Dev. Cell* **2016**, *38*, 186.
- [38] Sommer, S.; Salditt-Georgieff, M.; Bachenheimer, S.; Darnell, J. E.; Furuichi, Y.; Morgan, M.; Shatkin, A. J. *Nucleic Acids Res.* **1976**, *3*, 749.
- [39] Canaani, D.; Kahana, C.; Lavi, S.; Groner, Y. *Nucleic Acids Res.* **1979**, *6*, 2879.
- [40] Kane, S. E.; Beemon, K. *Mol. Cell. Biol.* **1985**, *5*, 2298.
- [41] Keith, G. *Biochimie* **1995**, *77*, 142.
- [42] Rottman, F. M.; Desrosiers, R. C.; Friderici, K. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol.* **1977**, *19*, 21.
- [43] Luo, G. Z.; MacQueen, A.; Zheng, G.; Duan, H.; Dore, L. C.; Lu, Z.; Liu, J.; Chen, K.; Jia, G.; Bergelson, J.; He, C. *Nat Commun* **2014**, *5*, 5630.
- [44] Schwartz, S.; Agarwala, S. D.; Mumbach, M. R.; Jovanovic, M.; Mertins, P.; Shishkin, A.; Tabach, Y.; Mikkelsen, T. S.; Satija, R.; Ruvkun, G.; Carr, S. A.; Lander, E. S.; Fink, G. R.; Regev, A. *Cell* **2013**, *155*, 1409.
- [45] Li, Y.; Wang, X.; Li, C.; Hu, S.; Yu, J.; Song, S. *RNA Biol.* **2014**, *11*, 1180.
- [46] Aguilo, F.; Zhang, F.; Sancho, A.; Fidalgo, M.; Di Cecilia, S.; Vashisht, A.; Lee, D. F.; Chen, C. H.; Rengasamy, M.; Andino, B.; Jahouh, F.; Roman, A.; Krig, S. R.; Wang, R.; Zhang, W.; Wohlschlegel, J. A.; Wang, J.; Walsh, M. J. *Cell Stem Cell* **2015**, *17*, 689.
- [47] Linder, B.; Grozhik, A. V.; Olarerin-George, A. O.; Meydan, C.; Mason, C. E.; Jaffrey, S. R. *Nat. Methods* **2015**, *12*, 767.
- [48] Rottman, F. M.; Bokar, J. A.; Narayan, P.; Shambaugh, M. E.; Ludwiczak, R. *Biochimie* **1994**, *76*, 1109.
- [49] Shah, J. C.; Clancy, M. J. *Mol. Cell. Biol.* **1992**, *12*, 1078.
- [50] Hongay, C. F.; Orr-Weaver, T. L. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2011**, *108*, 14855.
- [51] Bujnicki, M. J.; Feder, M.; Radlinska, M.; Blumenthal, M. R. *J. Mol. Evol.* **2002**, *55*, 431.
- [52] Liu, J.; Yue, Y.; Han, D.; Wang, X.; Fu, Y.; Zhang, L.; Jia, G.; Yu, M.; Lu, Z.; Deng, X.; Dai, Q.; Chen, W.; He, C. *Nat. Chem. Biol.* **2014**, *10*, 93.
- [53] Ping, X. L.; Sun, B. F.; Wang, L.; Xiao, W.; Yang, X.; Wang, W. J.; Adhikari, S.; Shi, Y.; Lv, Y.; Chen, Y. S.; Zhao, X.; Li, A.; Yang, Y.; Dahal, U.; Lou, X. M.; Liu, X.; Huang, J.; Yuan, W. P.; Zhu, X. F.; Cheng, T.; Zhao, Y. L.; Wang, X.; Danielsen, J. M. R.; Liu, F.; Yang, Y. G. *Cell Res.* **2014**, *24*, 177.
- [54] Wang, X.; Feng, J.; Xue, Y.; Guan, Z.; Zhang, D.; Liu, Z.; Gong, Z.; Wang, Q.; Huang, J.; Tang, C.; Zou, T.; Yin, P. *Nature* **2016**, *534*, 575.
- [55] Schwartz, S.; Mumbach, M. R.; Jovanovic, M.; Wang, T.; Maciag, K.; Bushkin, G. G.; Mertins, P.; Ter-Ovanesyan, D.; Habib, N.; Cacchiarelli, D.; Sanjana, N. E.; Freinkman, E.; Pacold, M. E.; Satija, R.; Mikkelsen, T. S.; Hacohen, N.; Zhang, F.; Carr, S. A.; Lander, E. S.; Regev, A. *Cell reports* **2014**, *8*, 284.
- [56] Agarwala, S. D.; Blitzblau, H. G.; Hochwagen, A.; Fink, G. R. *PLoS Genet.* **2012**, *8*, e1002732.
- [57] Mielecki, D.; Zugaj, D. L.; Muszewska, A.; Piwowarski, J.; Chojnacka, A.; Mielecki, M.; Nieminszczy, J.; Grynberg, M.; Grzesiuk, E. *PLoS One* **2012**, *7*, e30588.
- [58] Dinglay, S.; Trewick, S. C.; Lindahl, T.; Sedgwick, B. *Genes Dev.* **2000**, *14*, 2097.
- [59] Ringvoll, J.; Nordstrand, L. M.; Vågbo, C. B.; Talstad, V.; Reite, K.; Aas, P. A.; Lauritzen, K. H.; Liabakk, N. B.; Bjørk, A.; Doughty, R. W.; Falnes, P. Ø.; Krokan, H. E.; Klungland, A. *The EMBO Journal* **2006**, *25*, 2189.
- [60] Li, M. M.; Nilsen, A.; Shi, Y.; Fusser, M.; Ding, Y. H.; Fu, Y.; Liu, B.; Niu, Y.; Wu, Y. S.; Huang, C. M.; Olofsson, M.; Jin, K. X.; Lv, Y.; Xu, X. Z.; He, C.; Dong, M. Q.; Rendtlew Danielsen, J. M.; Klungland, A.; Yang, Y. G. *Nat Commun* **2013**, *4*, 1832.
- [61] Li, X.; Xiong, X.; Wang, K.; Wang, L.; Shu, X.; Ma, S.; Yi, C. *Nat. Chem. Biol.* **2016**, *12*, 311.
- [62] Wang, X.; Lu, Z.; Gomez, A.; Hon, G. C.; Yue, Y.; Han, D.; Fu, Y.; Parisien, M.; Dai, Q.; Jia, G.; Ren, B.; Pan, T.; He, C. *Nature* **2014**, *505*, 117.
- [63] Xiao, W.; Adhikari, S.; Dahal, U.; Chen, Y. S.; Hao, Y. J.; Sun, B. F.; Sun, H. Y.; Li, A.; Ping, X. L.; Lai, W. Y.; Wang, X.; Ma, H. L.; Huang, C. M.; Yang, Y.; Huang, N.; Jiang, G. B.; Wang, H. L.; Zhou, Q.; Wang, X. J.; Zhao, Y. L.; Yang, Y. G. *Mol. Cell* **2016**, *61*, 507.
- [64] Wang, X.; Zhao, B. S.; Roundtree, I. A.; Lu, Z.; Han, D.; Ma, H.; Weng, X.; Chen, K.; Shi, H.; He, C. *Cell* **2015**, *161*, 1388.
- [65] Li, D.; Zhang, H.; Hong, Y.; Huang, L.; Li, X.; Zhang, Y.; Ouyang, Z.; Song, F. *Plant Mol. Biol. Rep.* **2014**, *32*, 1169.
- [66] Xu, C.; Wang, X.; Liu, K.; Roundtree, I. A.; Tempel, W.; Li, Y.; Lu, Z.; He, C.; Min, J. *Nat. Chem. Biol.* **2015**, *11*, 815.

- [67] Zhao, X.; Yang, Y.; Sun, B. F.; Shi, Y.; Yang, X.; Xiao, W.; Hao, Y. J.; Ping, X. L.; Chen, Y. S.; Wang, W. J.; Jin, K. X.; Wang, X.; Huang, C. M.; Fu, Y.; Ge, X. M.; Song, S. H.; Jeong, H. S.; Yanagisawa, H.; Niu, Y.; Jia, G. F.; Wu, W.; Tong, W. M.; Okamoto, A.; He, C.; Rendtlew Danielsen, J. M.; Wang, X. J.; Yang, Y. G. *Cell Res* **2014**, *24*, 1403.
- [68] Xiao, W.; Adhikari, S.; Dahal, U.; Chen, Y. S.; Hao, Y. J.; Sun, B. F.; Sun, H. Y.; Li, A.; Ping, X. L.; Lai, W. Y.; Wang, X.; Ma, H. L.; Huang, C. M.; Yang, Y.; Huang, N.; Jiang, G. B.; Wang, H. L.; Zhou, Q.; Wang, X. J.; Zhao, Y. L.; Yang, Y. G. *Mol Cell* **2016**, *61*, 507.
- [69] Patil, D. P.; Chen, C. K.; Pickering, B. F.; Chow, A.; Jackson, C.; Guttman, M.; Jaffrey, S. R. *Nature* **2016**, *537*, 369.
- [70] Chen, H. M.; Fitcher, B.; Leatherwood, J. *PLoS One* **2011**, *6*, e26804.
- [71] Harigaya, Y.; Tanaka, H.; Yamanaka, S.; Tanaka, K.; Watanabe, Y.; Tsutsumi, C.; Chikashige, Y.; Hiraoka, Y.; Yamashita, A.; Yamamoto, M. *Nature* **2006**, *442*, 45.
- [72] Ok, S. H.; Jeong, H. J.; Bae, J. M.; Shin, J. S.; Luan, S.; Kim, K. N. *Plant Physiol.* **2005**, *139*, 138.
- [73] Bruggeman, Q.; Garmier, M.; de Bont, L.; Soubigou-Taconnat, L.; Mazubert, C.; Benhamed, M.; Raynaud, C.; Bergounioux, C.; Delarue, M. *Plant Physiol.* **2014**, *165*, 732.
- [74] Geula, S.; Moshitch-Moshkovitz, S.; Dominissini, D.; Mansour, A. A.; Kol, N.; Salmon-Divon, M.; Hershkovitz, V.; Peer, E.; Mor, N.; Manor, Y. S.; Ben-Haim, M. S.; Eyal, E.; Yunger, S.; Pinto, Y.; Jaitin, D. A.; Viukov, S.; Rais, Y.; Krupalnik, V.; Chomsky, E.; Zerbib, M.; Maza, I.; Rechavi, Y.; Massarwa, R.; Hanna, S.; Amit, I.; Levanon, E. Y.; Amariglio, N.; Stern-Ginossar, N.; Novershtern, N.; Rechavi, G.; Hanna, J. H. *Science* **2015**, *347*, 1002.
- [75] Fustin, J. M.; Doi, M.; Yamaguchi, Y.; Hida, H.; Nishimura, S.; Yoshida, M.; Isagawa, T.; Morioka, M. S.; Kakeya, H.; Manabe, I.; Okamura, H. *Cell* **2013**, *155*, 793.
- [76] Zhou, J.; Wan, J.; Gao, X.; Zhang, X.; Jaffrey, S. R.; Qian, S. B. *Nature* **2015**, *526*, 591.