

综述

核酸脱氨酶的研究进展

张宇, 高瞻*

(中国海洋大学海洋生命学院, 海洋生物多样性与进化研究所, 青岛 266003)

摘要: 核酸脱氨酶是一类以DNA或RNA为底物, 催化其胞嘧啶或腺嘌呤脱氨基的锌离子依赖酶, 可引起碱基的改变, 在生物体的免疫防御、神经调控等多种生理过程中扮演重要角色, 并且已有多种脱氨酶被开发为精准高效的碱基编辑器。该文就核酸脱氨酶的结构与功能特征进行系统概述, 并探讨了该类酶的起源与演化, 为后续有关研究与应用提供参考。

关键词: 胞苷脱氨酶; 腺苷脱氨酶; 胞嘧啶单碱基编辑器; 腺嘌呤单碱基编辑器; 进化

Research progress of nucleic acid deaminases

ZHANG Yu, GAO Zhan*

(College of Marine Life Sciences, Ocean University of China,
Institute of Evolution & Marine Biodiversity, Qingdao 266003, China)

Abstract: Nucleic acid deaminases are zinc-dependent enzymes that can deaminate cytosine or adenine in both DNA and RNA substrates, and therefore induce conversion of the base. The deaminases play important roles in the regulation of immune and nervous system in organisms, and several of them have been developed into precise and efficient base editors. This paper reviews the structure, function and evolution of nucleic acid deaminases, which will shed more light on the research and application of deaminases.

Key Words: cytidine deaminase; adenosine deaminase; cytosine base editor; adenine base editor; evolution

核酸脱氨酶包括腺苷脱氨酶(adenosine deaminase)和胞苷脱氨酶(cytidine deaminase)两大类(表1)。其中, 腺苷脱氨酶包括双链RNA腺苷脱氨酶(adenosine deaminase acting on RNA, ADAR)和tRNA特异性腺苷脱氨酶(tRNA-specific adenosine deaminase, TadA或ADAT), 分别作用于双链RNA或tRNA上的腺嘌呤, 使其脱氨基成为次黄嘌呤; 胞苷脱氨酶主要包括活化诱导胞苷脱氨酶(activation-induced cytidine deaminase, AID)和载脂蛋白B mRNA编辑酶(apolipoprotein B editing complex, APOBEC)以及双链DNA脱氨酶(double-stranded DNA deaminase A, DddA), 可使DNA或

RNA底物上的胞嘧啶脱氨基成为尿嘧啶。

核酸脱氨酶参与机体的多项生理生化过程。例如, tRNA特异性腺苷脱氨酶与翻译过程中密码子的简并性有关, 双链RNA脱氨酶通过编辑mRNA、siRNA和miRNA前体而影响基因调控过程, 亦可通过突变病毒RNA使其失活; 胞苷脱氨酶AID/APOBEC家族与限制逆转录病毒和逆转录转座子、增加巨噬细胞的转录多样性以及增加抗体多样性等过程有关^[1]。近几年, 核酸脱氨酶因其基因诱变活性而被开发成碱基编辑器, 用于在体内或体外细胞内进行单碱基的定向突变。随着相关研究的不断深入, 越来越多具有新功能的核酸

收稿日期: 2023-03-01

基金项目: 国家自然科学基金项目(32070514)

第一作者: E-mail: zhangyu8918@stu.ouc.edu.cn

*通信作者: E-mail: gaozhan@ouc.edu.cn

表1 核酸脱氨酶成员功能简介

名称	类别	功能	物种分布	参考文献
腺苷脱氨酶	tRNA腺苷脱氨酶 (TadA/ADAT)	增强简并密码子的解码能力	原核生物、真核生物	[9,10]
		稳定密码子-反密码子的相互作用		[1,4]
	双链RNA腺苷脱氨酶 (ADAR)	ADAR1: mRNA转录后修饰	后生动物	[17]
		ADAR2: 中枢神经系统的选择性调节		[18,19]
		ADAR3: 体外抑制其他ADAR的活性		[13]
胞苷脱氨酶	活化诱导胞苷脱氨酶 (AID)	体细胞高频突变	有颌类脊椎动物	[23]
		抗体类别转换		[23]
	载脂蛋白BmRNA编辑酶 (APOBEC)	APOBEC1: 与脂类的运输和代谢有关	有颌类脊椎动物	[27,28]
		APOBEC2: 低表达于心脏和骨骼肌, 功能未知		[31]
		APOBEC3: 抑制逆转录病毒的复制和逆转录元件的移动		[22,32,33]
		APOBEC4: 功能未知		[22]
	七鳃鳗胞苷脱氨酶 (PmCDA1/PmCDA2)	参与可变淋巴细胞受体VLR A和VLR B的基因重排过程	无颌类脊椎动物	[34]
	海胆活化诱导胞苷脱氨酶 (SpAID)	具有催化DNA上胞嘧啶脱氨活性, 参与宿主的先天免疫应答	无脊椎动物	[38]
	海豆芽活化诱导胞苷脱氨酶 (LaAID)	具有催化DNA上胞嘧啶脱氨活性, 参与宿主的先天免疫应答	无脊椎动物	[38]
	双链DNA脱氨酶 (DddA)	通过将该酶分泌至受体菌致其双链DNA断裂或基因突变	细菌	[39]
	单链脱氨酶毒素A (SsdA)	通过将该酶分泌至受体菌致其双链DNA断裂或基因突变	细菌	[40]

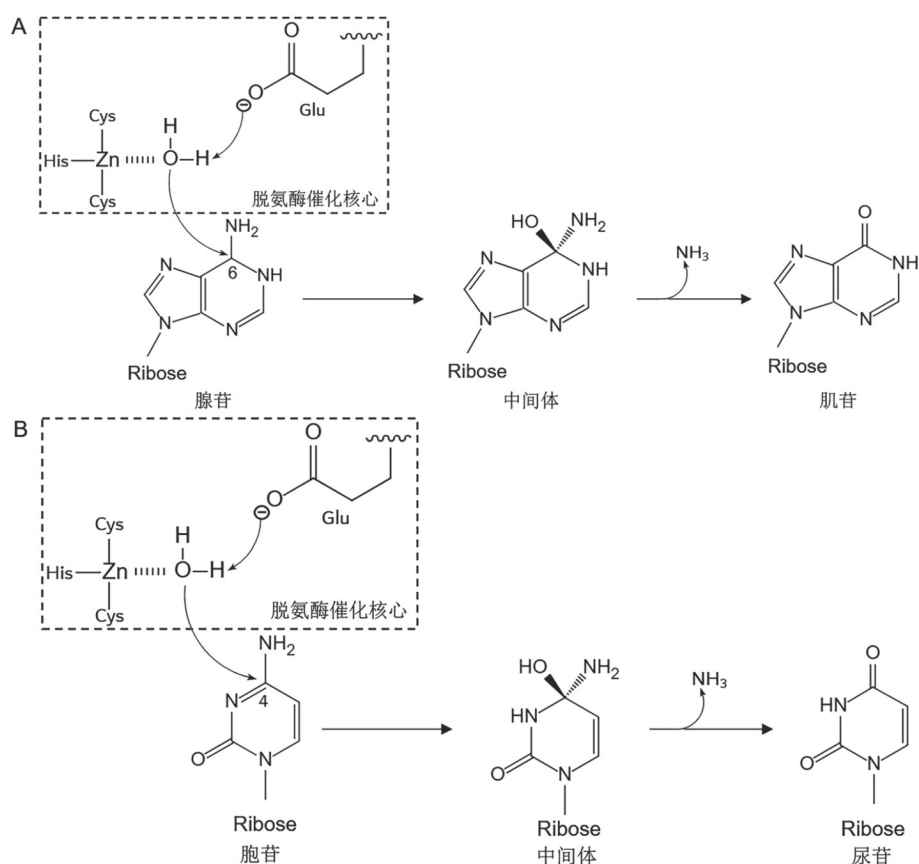
脱氨酶被发掘, 受到生物与医学界的高度关注。因此, 本文对目前已报道的众多脱氨酶的结构与功能进行比对分析, 描绘出脱氨酶的功能及演化图景, 为后续探索该类酶新的生理功能和作用机制提供参考。

1 腺苷脱氨酶的结构及功能

腺苷脱氨酶的核心结构包括: 位于中心的1个β片层(由β1-β5链组成)以及位于两侧的3个α-螺旋(一侧为α1, 方向大致与β片层垂直; 另一侧为α2和α3, 方向与β片层平行), 相互之间由loop环连接(图2)。催化位点为高度保守的HxE和PCxxC基序^[2-7], 其中组氨酸与半胱氨酸残基参与锌离子配位, 谷氨酸残基能够从亲核水分子中接受质子, 脯氨酸可能起到限制构象的作用^[8]。腺苷脱氨酶通过使用锌配位的水分子作为亲核试剂来催化碱基水解脱氨。在该反应过程中, 由保守的谷氨酸残基接受来自亲核的水的质子, 活性氢氧根离子攻击底物腺苷的第6位碳原子^[8](图1A)。

1.1 tRNA腺苷脱氨酶

在原核与真核生物中均存在一种靶向tRNA的腺苷脱氨酶, 催化tRNA反密码子“摆动”位置(即反密码子第一位碱基)的腺嘌呤脱氨基为次黄嘌呤^[9,10]。因为次黄嘌呤可与胞嘧啶、尿嘧啶、腺嘌呤等碱基配对, 所以脱氨后的tRNA反密码子可与mRNA上的多种密码子配对, 增强了细胞的解码能力。在细菌中, tRNA腺苷脱氨酶是由2个TadA亚基组成的同源二聚体, 其中一个亚基行使催化功能, 另一个亚基可能起维持结构稳定的作用。在真核生物中, 该酶由ADAT2和ADAT3亚基构成异源二聚体, 其中ADAT2是催化亚基, 具有完整的HxE和PCxxC催化基序, 而ADAT3因其HxE基序中的E位点为其他氨基酸而不具有催化活性^[4], 该亚基主要功能为识别tRNA底物。人类和酵母的tRNA腺苷脱氨酶也参与tRNA第37位腺嘌呤的脱氨, 这是稳定密码子-反密码子相互作用所必需的^[1,4]。此外, 布氏锥虫(*Trypanosoma brucei*)的ADAT2/3既可靶向tRNA的腺嘌呤, 亦可催化单链DNA上的胞嘧啶脱氨基成为尿嘧啶^[6], 体现了该酶对RNA和



A: 腺苷脱氨酶催化机制; B: 胞苷脱氨酶催化机制

图1 脱氨酶催化机制

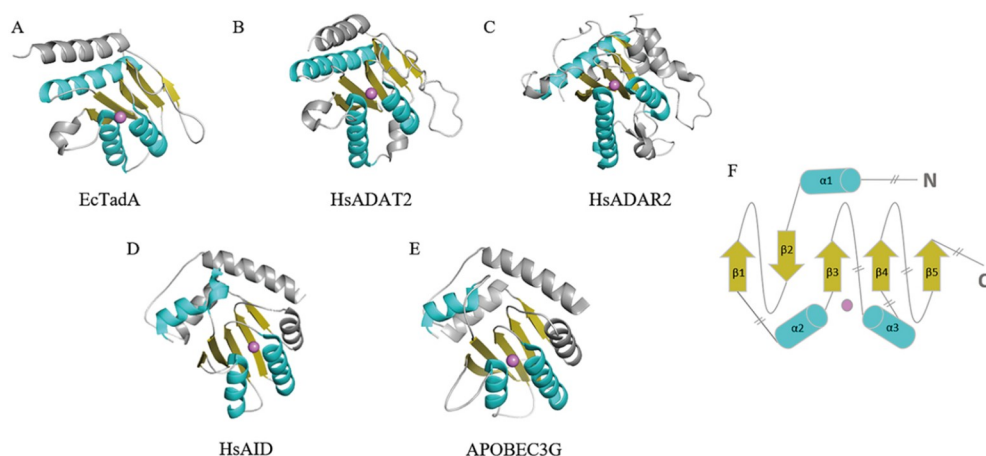
A: 大肠杆菌EcTadA催化基序(PDB: 1Z3A)。B: 人ADAT2的催化基序(PDB: 3DH1)。C: 人ADAR2的催化基序(PDB: 1ZY7)。D: 人AID的催化基序(PDB: 5W0Z)。E: 人APOBEC3G催化基序(PDB: 3E1U)。F: 核酸脱氨酶共有的脱氨酶基序的拓扑图。二级结构颜色与左边结构相似; 青色代表 α 螺旋; 黄色表示 β 折叠; 粉色表示锌离子; 双斜线表示其他未标出的二级结构元素

图2 核酸脱氨酶成员催化基序

DNA底物的兼容性。

1.2 双链RNA腺苷脱氨酶

在后生动物中存在一类能够靶向双链RNA的腺苷脱氨酶——ADAR, 该酶参与神经系统、免疫

系统功能调控等多个生理过程。研究显示, ADAR仅存在于后生动物中^[11], 在古菌、细菌、真菌和植物中尚未发现该基因^[12]。ADAR分为ADAR1、ADAR2、ADAR3, 均有位于N-末端的双链RNA结

合结构域和位于C-末端催化底物反应的脱氨酶结构域。此外, ADAR1还具有2个Z-DNA结合域^[13], 而ADAR3具有一个富含精氨酸的单链RNA结合域^[12,14]。免疫系统区别自我与非我双链RNA的重要机制是基于ADAR1的碱基编辑作用^[15]。当RNA形成双链结构时, ADAR1识别并催化其腺嘌呤脱氨为次黄嘌呤, 作为一种转录后修饰方式, 引起mRNA在翻译过程中的变化, 增加了蛋白质多样性。ADAR1常见的作用底物除了mRNA编码区的特定位点外, 还有前体miRNA以及转录本中的重复序列, 通过识别并编辑前体miRNA成熟之前的双链结构, 影响miRNA、siRNA和lncRNA的加工或功能, 从而影响基因表达。ADAR2主要在神经系统表达, 通过诱导mRNA腺嘌呤向次黄嘌呤转变, 改变所编码蛋白质的活性, 参与中枢神经系统的选择性调节, 如编辑神经元受体*GluR-B*基因的mRNA, 使其Q/R位点谷氨酰胺变为精氨酸, 造成GluR离子通道改变而阻止Ca²⁺渗透^[16]。ADAR3可能仅存在于脊椎动物中^[11], 不具有编辑酶活性, 但它可以结合双链RNA并在体外抑制其他ADAR的活性^[12]。人体细胞内的RNA上存在大量潜在的ADAR编辑位点, 目前已有证据表明, ADAR驱动肿瘤的发生^[17]。

2 胞苷脱氨酶的结构及功能

胞苷脱氨酶主要包括AID/APOBEC家族以及在伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia cenocepacia*)中发现的双链DNA脱氨酶(double-stranded DNA deaminase A, DddA)。AID/APOBEC家族成员具有的核心结构由位于中心的1个 β -片层(5股链)及其周围的6或7个 α -螺旋组成, 之间由loop环连接^[18], 活性中心由HxE和PCxxC基序构成^[19]。胞苷脱氨酶通过使用锌配位的水分子作为亲核试剂来催化水解脱氨反应, 在该反应中, 保守的谷氨酸残基接受来自亲核的水的质子, 活性氢氧根离子攻击底物胞苷的第四位碳原子^[8](图1B)。

2.1 AID/APOBEC家族

AID是有颌类脊椎动物特有的一种B淋巴细胞特异性表达蛋白, 作用于免疫球蛋白基因, 在该基因转录过程中催化其单链DNA上的胞嘧啶脱氨, 生成的尿嘧啶被细胞内复杂的DNA损伤修复

系统识别, 最终修复结果存在多种可能: 恢复为胞嘧啶或突变为其他碱基。如果脱氨产物未被识别修复, 在下一轮DNA复制过程中尿嘧啶将与腺嘌呤配对, 从而造成该位点由胞嘧啶转变为胸腺嘧啶。AID具有较高的催化活性, 是介导免疫球蛋白基因发生体细胞高频突变和抗体类别转换的关键酶, 是抗体具有高度多样性的重要原因。B细胞在淋巴组织生发中心经过体细胞高频突变、抗体类别转换等过程, 实现抗体亲和力的成熟^[20]。在体细胞高频突变过程中, AID作用于成熟B细胞免疫球蛋白基因的可变区, 使该区外显子的胞嘧啶脱氨基, 产生点突变或低频率的插入缺失。在抗体类别转换过程中, AID作用于免疫球蛋白重链C_H外显子上游长的重复非编码S区, 该区域的胞嘧啶脱氨常引发DNA双链断裂, 造成部分序列被切除, 断裂处重新连接后实现所编码蛋白由IgM向其他类别抗体的转换^[21,22]。AID功能受到多种因子的调控, 如Spt5可招募AID到RNA聚合酶II处, 使其接近DNA靶位点^[20]; 复制蛋白A以及RNA外泌体能稳定AID对单链DNA的脱氨基, 而AID脱靶则会通过突变或易位激活致癌基因导致癌症发生^[20]。

APOBEC家族包含APOBEC1、APOBEC2、APOBEC3和APOBEC4。APOBEC1与ACF因子形成的复合物可介导RNA胞嘧啶脱氨基成为尿嘧啶, 这是哺乳动物中最早发现的碱基编辑现象^[23]。APOBEC1主要在肠道表达, 某些哺乳动物肝脏亦有表达, 作用于载脂蛋白B前体mRNA的第6 666位上的胞嘧啶该位置编码谷氨酰胺的密码子突变为终止密码子, 从而产生两种不同长度的载脂蛋白, 其中截短体ApoB100^[24]可以在体内运输三酰甘油和内源性胆固醇, ApoB48可以代谢膳食脂类^[25]。体外重组表达的APOBEC1还可以作用于单链DNA底物^[26,27]。APOBEC2主要在心脏和骨骼肌中表达, 但表达水平较低, 其功能还需要进一步研究^[28]。APOBEC3蛋白能够抑制逆转录病毒的复制和逆转录元件的移动, 在先天性免疫过程中发挥重要作用^[19]。近些年, 有证据表明, APOBEC3作用于细胞自身基因组, 与多种癌症的发生密切相关^[29,30]。APOBEC4是通过生物信息学分析发现的^[19], 其含有APOBEC蛋白中保守的氨基酸残基, 暗示APOBEC4亦能使核苷酸底物发生脱氨基作

用,但目前还没有研究验证其脱氨活性。

在无颌类脊椎动物中存在与AID/APOBEC类似的胞苷脱氨酶。目前已有研究表明,七鳃鳗的胞苷脱氨酶1(*Petromyzon marinus* cytidine deaminase 1, PmCDA1)和胞苷脱氨酶2(*Petromyzon marinus* cytidine deaminase 2, PmCDA2)分别参与可变淋巴细胞受体VLR A和VLR B的基因重排过程^[31]。其中PmCDA1有DNA底物高亲和力、高催化速率等类似AID的特征^[32,33], PmCDA2与AID具有序列同源性,因此七鳃鳗胞苷脱氨酶具有与AID/APOBEC家族蛋白类似的DNA编辑功能,并通过介导可变淋巴细胞受体基因的重排参与无颌类特有的适应性免疫过程^[34]。在少数无脊椎动物中亦发现, AID/APOBEC类似基因的存在:棘皮动物巨紫球海胆(*Strongylocentrotus purpuratus*)的SpAIDL1和腕足动物鸭嘴海豆芽(*Lingula anatina*)的LaAIDL1均具有催化脱氨活性,体外实验表明,这些酶在大肠杆菌中重组表达可以催化细菌基因组DNA上的胞嘧啶脱氨,进而引起基因突变。这些基因参与机体的先天免疫应答,具体机制尚待探究^[35]。

2.2 细菌中的胞苷脱氨酶

在伯克霍尔德氏菌中发现了一种能够催化双链DNA胞苷脱氨的酶,被称为双链DNA脱氨酶(double-stranded DNA deaminase A, DddA)。该酶可经伯克霍尔德氏菌的VI型分泌系统(T6SS)分泌至受体细菌内,并作用于受体菌的双链DNA,使其胞嘧啶脱氨成为尿嘧啶,最终导致双链断裂或基因突变。DddA的蛋白结构由1个 β -片层(5股链)和支撑其催化残基的 α -螺旋组成,与APOBEC的结构相比, DddA有一个额外的中间环^[36]。此外,丁香假单胞菌(*Pseudomonas syringae*)中的单链DNA脱氨酶毒素A(SsdA)和马生殖道泰勒氏菌(*Taylorella equigenitalis*)中的脱氨酶毒素被证明具有单链DNA胞苷脱氨活性^[37]。

3 脱氨酶的应用

近年来,核酸脱氨酶被重点应用于DNA和RNA单碱基编辑工具的研发,该技术在动植物的基因功能研究、遗传改良和疾病治疗等领域具有重要意义。基因编辑技术的发展经历了锌指核酸

酶(Zinc-finger nuclease, ZFN)基因编辑系统^[38]、转录激活因子样效应物核酸酶(transcription activator-like effector nuclease, TALEN)基因编辑系统^[39]和由成簇的规则间隔短回文重复及其相关核酸酶蛋白(clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR/Cas)组成的基因编辑系统^[40]三个阶段。利用脱氨酶和CRISPR/Cas系统设计开发的碱基编辑器,实现了在不产生DNA双链断裂情况下对单个碱基的精准替换。

3.1 DNA单碱基编辑器

自2016年Komor等^[41]首次报道不依赖DNA双链断裂的DNA单碱基编辑器(base editor, BE)以来,单碱基编辑器的研究迅速发展,目前的单碱基编辑器主要包括胞嘧啶碱基编辑器(cytosine base editor, CBE)、腺嘌呤碱基编辑器(adenine base editor, ABE)、嘧啶嘌呤双转换碱基编辑器(dual adenine and cytosine base editor, A&CBE)等(表2)。

胞嘧啶碱基编辑器是由胞苷脱氨酶与Cas蛋白或转录激活因子样效应物核酸酶(transcription activator-like effector nuclease, TALEN)相结合而精准定位到C:G并将其转换为T:A的碱基编辑系统。胞嘧啶碱基编辑器的发展至今为止经历了四代。第一代胞嘧啶碱基编辑器被称为胞嘧啶碱基编辑器1(cytosine base editor 1, CBE1),是由胞苷脱氨酶APOBEC1与无内切酶活性的Cas9蛋白融合而成,并通过单链引导RNA(single guide RNA, sgRNA)将融合蛋白带到靶位点,由脱氨酶完成胞嘧啶脱氨基,实现单个碱基的精准替换^[41]。第二代胞嘧啶碱基编辑器2(cytosine base editor 2, CBE2)是在第一代的基础上,通过添加尿嘧啶DNA糖基酶抑制因子抑制尿嘧啶DNA糖基酶的功能,以提高单碱基编辑的效率和准确性^[42]。第三代胞嘧啶碱基编辑器3(cytosine base editor 3, CBE3)中的Cas9具有内切酶活性,该内切酶作用于磷酸二酯键从而产生了一个DNA链缺口,以此提高了CBE3的编辑效率^[43]。第四代胞嘧啶碱基编辑器4(cytosine base editor 4, CBE4)在第三代的基础上融合2个尿嘧啶DNA糖基化酶抑制因子,既提高了碱基编辑效率,同时也降低了碱基编辑的错误率^[44]。此外,基于TALEN和DddA开发出来的线粒体基因编辑技术也有较快发展。科学家将细菌

DddA与类转录激活因子(transcription activator-like effectors, TALE)相连接,研发出线粒体胞嘧啶碱基编辑器DdCBE^[36,45](DddA-derived cytosine base editors)。

腺嘌呤碱基编辑器是将A:T替换成G:C的基因编辑系统。最初的腺嘌呤碱基编辑器是由源自大肠杆菌的tRNA腺嘌呤脱氨酶TadA与Cas9切口酶结合而成,并经过多轮优化,设计出碱基编辑器ABE7.10^[2](adenine base editor 7.10)。紧接着,科学家们针对腺嘌呤碱基编辑器尚未解决的问题,通过多种技术方法不断更新升级,开发出了ABEmax^[46](adenine base editor max)、ABE8e^[47](adenine base editor 8e)、ABE9^[48](adenine base editor 9)等更加精准、高效的碱基编辑器。2022年,Cho等^[49]开发出转录激活因子样效应物连接的脱氨酶(transcription-activator-like effector-linked deaminases, TALEN),可诱导线粒体中的腺嘌呤至鸟嘌呤的编辑。2023年,Tong等^[50]研发的腺嘌呤碱基颠换编辑器(adenine transversion base editor, AYBE, Y=C或T),在腺嘌呤碱基编辑器的基础上增加了N-甲基嘌呤DNA糖基化酶(N-methylpurine DNA glycosylase, MPG),实现由腺嘌呤至胞嘧啶或胸腺嘧啶的高效颠换。

以单碱基编辑器为基础,双碱基编辑器也逐渐完善,科学家将胞嘧啶脱氨酶和腺嘌呤脱氨酶进行整合优化,开发出A&C-BE max^[51](adenine and cytosine base editor)和SPACE^[52](synchronous programmable adenine and cytosine editor)等胞嘧啶与腺嘌呤双碱基编辑器。研究人员还将腺嘌呤碱基编辑器(adenine base editor, ABE)与一种糖基酶碱基编辑系统(glycosylase base editor, CGBE)融合,构建了AGBE^[53]。AGBE可以同时引入4种类型的碱基转换(C至G、C至T、C至A和A至G)以及哺乳动物细胞中具有单个sgRNA的插入缺失。目前基于TadA构建的编辑器的新版本CABE-T^[54](cytosine and adenine base editors)、Td-CGBE^[55](TadA-8e-derived C-to-G base editor)和TadDE^[56](TadA dual base editor),实现了对双碱基同等效率的编辑。

3.2 RNA单碱基编辑器

相较于DNA碱基编辑系统, RNA碱基编辑对

细胞遗传物质进行可逆修改或RNA表观转录修饰,风险较小,更有利于在基因治疗领域应用。2017年,Cox等^[57]基于Cas13和ADAR2开发出的可编程腺嘌呤到次黄嘌呤替换的RNA编辑器(RNA editing for programmable A to I replacement, REPAIR),后续进化版本REPAIRv1(RNA editing for programmable A to I replacement version 1)碱基编辑效率得到提升^[57]。针对RNA腺嘌呤的碱基编辑系统还有REPAIRx^[58]、xABE、mxA^[59](mini dCas13X-based adenosine base editor)以及非基于Cas13的LEAPER^[60](leveraging endogenous ADAR for programmable editing on RNA)、LEAPER2.0 (leveraging endogenous ADAR for programmable editing on RNA 2.0)、RESTORE(RNA editing for specific C to U exchange)和cadRNA(circular ADAR-recruiting guide RNA)^[61]等。2019年,Abudayyeh等^[62]又在REPAIR(RNA editing for programmable A to I replacement)基础上开发出针对C到U转变的RNA编辑器(RNA editing for specific C to U exchange, RESCUE),其双链RNA脱氨酶2的催化结构域经过定向进化和理性设计,获得胞嘧啶脱氨活性,后续版本有xCBE、mxCBE^[63](mini dCas13X-based cytosine base editor)等。针对RNA胞嘧啶的编辑器目前还有CURE^[64](由APOBEC3A与dCas13b融合形成)及其衍生版本CURE-C、CURE-X、CURE-N等(表2)。

4 展望

作为具有遗传诱变活性的关键酶类,核酸脱氨酶在机体中参与多种生理过程的调控,同时也在基因编辑工具的开发中大放异彩。本文在核酸脱氨酶的分类、结构、功能以及应用等方面进行了系统阐述,同时探讨了该类酶的进化历程。从细菌到人类,目前已知的所有核酸脱氨酶都有着相近的核心催化结构以及高度保守的HxE-PCxxC基序,表明高等生物中用于编辑DNA和RNA以调控诸多生理机能的核酸脱氨酶,起源于细菌中用于诱导其他细菌基因组突变的一类毒素蛋白。

多数天然存在的核酸脱氨酶的底物类型较单一,如ADAR、TadA、AID等,这些酶通常在进化过程中功能也较为保守。APOBEC家族的部分成员

表2 碱基编辑器的特点

名称	类别	编辑窗口及序列偏好	特点	参考文献
DNA单碱基编辑器	CBE1	PAM上游-13到-17, TC、CC	编辑效率低, HEK293T细胞内编辑效率仅0.8%~7.7%	[41]
	CBE2	PAM上游-13到-17, TC、CC	细胞内C:G至T:A编辑效率为20%	[42]
	CBE3	PAM上游-13到-17, TC、CC	与CBE2相比, C至T编辑效率提高了2~6倍, 约37%	[43]
	CBE4	PAM上游-13到-17, TC、CC	碱基编辑效率为CBE3的1.5倍, 且减少了一半的非C至T副产物	[44]
	DdCBE	mtDNA, TC	催化线粒体DNA中目的序列G:C至A:T的编辑, 细胞内的编辑效率为5%~50%	[36,45]
	ABE7.10	PAM上游-14到-17, A3-A8	细胞内A:T至G:C的平均编辑效率约为58%	[2]
	ABE8e	NGG	碱基编辑活性比ABE7.10增加了590倍	[47]
	ABE9	NG, A5/A6, 1-2 nt	编辑效率高于其他38种ABE变体	[48]
	TALED	A至G或C至T	线粒体DNA的转换编辑, 编辑效率约为40%	[49]
	AYBE	A7/A8, A至T、A至C	细胞中A至T、A至C的编辑效率高达72%	[50]
	A&C-BE _{max}	C2-C17, A至G、C至T	与ABE和CBE相比, 编辑效率提高, 脱靶率降低	[51]
	SPACE	A4-A7, C2-C7, A至G、C至T	细胞中A至G的平均编辑效率为13%, C至T的平均编辑效率为22%	[52]
	AGBE	A4-A8和C3-C13, C至G/T/A、A至G	碱基编辑效率均高与单碱基编辑器	[53]
RNA单碱基编辑器	CABE-T	A至G、C至T	细胞中编辑效率约为50%	[54]
	REPAIR	RNA的A至G	碱基编辑效率最高可达51%	[57]
	RESCUE	RNA的A至G、C至U	编辑效率为28%~42%	[62]
	CURE	UCC、AC	编辑效率为30%~50%	[64]

具有对单链DNA和单链RNA的底物兼容性, 该家族主要存在于脊椎动物中, 成员较多, 以适应生理机能的复杂化。布氏锥虫的ADAT的底物包括tRNA单链区的腺嘌呤和DNA单链区的胞嘧啶, 经过人工改造的TadA同系物对单链DNA兼具胞苷和腺苷脱氨活性, 改造后的ADAR同系物获得对RNA胞苷的脱氨活性, 不过目前未有能够兼容单链和双链底物的脱氨酶的报道。最适底物类型由底物结合区决定, 从进化的角度分析核酸脱氨酶的底物结合及催化机制, 将对新类型脱氨酶的发现以及应用提供重要参考。

碱基编辑技术致力于改造或修饰遗传信息, 在生物学基础研究、遗传疾病治疗和作物遗传改良等方面具有广阔前景。近几年该技术的更新迭代速度惊人, 虽然依旧存在脱靶、靶向范围受限、产生碱基编辑副产物、体内编辑的未知性等瑕疵, 相信通过定向进化、理性设计等策略, 该技术未来将助力基因治疗、农业育种等领域取得突破性进展。

参 考 文 献

- [1] Krishnan A, Iyer LM, Holland SJ, et al. Diversification of AID/APOBEC-like deaminases in metazoa: multiplicity of clades and widespread roles in immunity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115(14): E3201-E3210
- [2] Gaudelli NM, Komor AC, Rees HA, et al. Programmable base editing of A•T to G•C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature*, 2017, 551(7681): 464-471
- [3] Iyer LM, Zhang D, Rogozin IB, et al. Evolution of the deaminase fold and multiple origins of eukaryotic editing and mutagenic nucleic acid deaminases from bacterial toxin systems. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(22): 9473-9497
- [4] Liu X, Chen R, Sun Y, et al. Crystal structure of the yeast heterodimeric ADAT2/3 deaminase. *BMC Biol*, 2020, 18(1): 189
- [5] Robert X, Gouet P. Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42(W1): W320-W324
- [6] Rubio MAT, Pastar I, Gaston KW, et al. An adenosine-to-inosine tRNA-editing enzyme that can perform C-to-U deamination of DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(19): 7821-7826
- [7] Shi K, Carpenter MA, Banerjee S, et al. Structural basis for targeted DNA cytosine deamination and mutagenesis by APOBEC3A and APOBEC3B. *Nat Struct Mol Biol*, 2017, 24(2): 131-139
- [8] Pfaller CK, George CX, Samuel CE. Adenosine deaminases acting on RNA (ADARs) and viral infections. *Annu*

- Rev Virol, 2021, 8(1): 239-264
- [9] Gerber AP, Keller W. An adenosine deaminase that generates inosine at the wobble position of tRNAs. *Science*, 1999, 286(5442): 1146-1149
- [10] Wolf J, Gerber AP, Keller W. TadA, an essential tRNA-specific adenosine deaminase from *Escherichia coli*. *EMBO J*, 2002, 21(14): 3841-3851
- [11] Jin Y, Zhang W, Li Q. Origins and evolution of ADAR-mediated RNA editing. *IUBMB Life*, 2009, 61(6): 572-578
- [12] Yang Y, Zhou XX, Jin YF. ADAR-mediated RNA editing in non-coding RNA sequences. *Sci China Life Sci*, 2013, 56(10): 944-952
- [13] Herbert A, Alfken J, Kim YG, et al. A Z-DNA binding domain present in the human editing enzyme, double-stranded RNA adenosine deaminase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(16): 8421-8426
- [14] Chen CX, Cho DSC, Wang Q, et al. A third member of the RNA-specific adenosine deaminase gene family, ADAR3, contains both single- and double-stranded RNA binding domains. *RNA*, 2000, 6(5): 755-767
- [15] Liddicoat BJ, Piskol R, Chalk AM, et al. RNA editing by ADAR1 prevents MDA5 sensing of endogenous dsRNA as nonself. *Science*, 2015, 349(6252): 1115-1120
- [16] Higuchi M, Single FN, Köhler M, et al. RNA editing of AMPA receptor subunit GluR-B: a base-paired intron-exon structure determines position and efficiency. *Cell*, 1993, 75(7): 1361-1370
- [17] Wang C, Zou J, Ma X, et al. Mechanisms and implications of ADAR-mediated RNA editing in cancer. *Cancer Lett*, 2017, 411: 27-34
- [18] King J, Larijani M. A novel regulator of activation-induced cytidine deaminase/APOBECs in immunity and cancer: Schrödinger's catalytic pocket. *Front Immunol*, 2017, 8: 351
- [19] Chen Y, Luo L, Deng L, et al. New insights into the lineage-specific expansion and functional diversification of lamprey AID/APOBEC family. *Front Immunol*, 2022, 13: 822616
- [20] Hwang JK, Alt FW, Yeap LS. Related mechanisms of antibody somatic hypermutation and class switch recombination. *Microbiol Spectr*, 2015, 3(1): Mdn3-0037-2014
- [21] Chaudhuri J, Basu U, Zarrin A, et al. Evolution of the immunoglobulin heavy chain class switch recombination mechanism. *Adv Immunol*, 2007, 94: 157-214
- [22] Matthews A, Zheng S, Dimenna L, et al. Regulation of immunoglobulin class-switch recombination: choreography of noncoding transcription, targeted DNA deamination, and long-range DNA repair. *Adv Immunol*, 2014, 122: 1-57
- [23] Mehta A, Driscoll DM. Identification of domains in apobec-1 complementation factor required for RNA binding and apolipoprotein-B mRNA editing. *RNA*, 2002, 8(1): 69-82
- [24] Navaratnam N, Bhattacharya S, Fujino T, et al. Evolutionary origins of apoB mRNA editing: Catalysis by a cytidine deaminase that has acquired a novel RNA-binding motif at its active site. *Cell*, 1995, 81(2): 187-195
- [25] Navaratnam N, Fujino T, Bayliss J, et al. *Escherichia coli* cytidine deaminase provides a molecular model for ApoB RNA editing and a mechanism for RNA substrate recognition 1 Edited by A. R. Fersht. *J Mol Biol*, 1998, 275(4): 695-714
- [26] Richardson N, Navaratnam N, Scott J. Secondary structure for the apolipoprotein B mRNA editing site. *J Biol Chem*, 1998, 273(48): 31707-31717
- [27] Sowden MP, Lehmann DM, Lin X, et al. Identification of novel alternative splice variants of APOBEC-1 complementation factor with different capacities to support apolipoprotein B mRNA editing. *J Biol Chem*, 2004, 279(1): 197-206
- [28] Conticello S, Thomas C, Petersen-Mahrt S, et al. Evolution of the AID/APOBEC family of polynucleotide (deoxy)cytidine deaminases. *Mol Biol Evol*, 2005, 22(2): 367-377
- [29] Bakhoum SF. APOBEC3A drives STING-dependent metastasis. *Nat Cancer*, 2021, 2(12): 1293-1295
- [30] Petljak M, Dananberg A, Chu K, et al. Mechanisms of APOBEC3 mutagenesis in human cancer cells. *Nature*, 2022, 607(7920): 799-807
- [31] Rogozin IB, Iyer LM, Liang L, et al. Evolution and diversification of lamprey antigen receptors: evidence for involvement of an AID-APOBEC family cytosine deaminase. *Nat Immunol*, 2007, 8(6): 647-656
- [32] Quinlan EM, King JJ, Amemiya CT, et al. Biochemical regulatory features of activation-induced cytidine deaminase remain conserved from lampreys to humans. *Mol Cell Biol*, 2017, 37(20): e00077-00017
- [33] Holland SJ, Berghuis LM, King JJ, et al. Expansions, diversification, and interindividual copy number variations of AID/APOBEC family cytidine deaminase genes in lampreys. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115(14): E3211-E3220
- [34] Morimoto R, O'Meara CP, Holland SJ, et al. Cytidine deaminase 2 is required for *VLRB* antibody gene assembly in lampreys. *Sci Immunol*, 2020, 5(45): eaba0925
- [35] Liu MC, Liao WY, Buckley KM, et al. AID/APOBEC-like cytidine deaminases are ancient innate immune mediators in invertebrates. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 1948

- [36] Mok BY, de Moraes MH, Zeng J, et al. A bacterial cytidine deaminase toxin enables CRISPR-free mitochondrial base editing. *Nature*, 2020, 583(7817): 631-637
- [37] Moraes MH, Hsu F, Huang D, et al. An interbacterial DNA deaminase toxin directly mutagenizes surviving target populations. *eLife*, 2021, 10: e62967
- [38] Geurts AM, Moreno C. Zinc-finger nucleases: new strategies to target the rat genome. *Clin Sci*, 2010, 119(8): 303-311
- [39] Joung JK, Sander JD. TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2013, 14(1): 49-55
- [40] Pickar Oliver A, Gersbach CA. The next generation of CRISPR-Cas technologies and applications. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2019, 20(8): 490-507
- [41] Komor AC, Kim YB, Packer MS, et al. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature*, 2016, 533(7603): 420-424
- [42] Kim YB, Komor AC, Levy JM, et al. Increasing the genome-targeting scope and precision of base editing with engineered Cas9-cytidine deaminase fusions. *Nat Biotechnol*, 2017, 35(4): 371-376
- [43] Rees HA, Komor AC, Yeh WH, et al. Improving the DNA specificity and applicability of base editing through protein engineering and protein delivery. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 15790
- [44] Komor AC, Zhao KT, Packer MS, et al. Improved base excision repair inhibition and bacteriophage Mu Gam protein yields C:G-to-T:A base editors with higher efficiency and product purity. *Sci Adv*, 2017, 3(8): eaao4774
- [45] Lim K, Cho SI, Kim JS. Nuclear and mitochondrial DNA editing in human cells with zinc finger deaminases. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 366
- [46] Rees HA, Wilson C, Doman JL, et al. Analysis and minimization of cellular RNA editing by DNA adenine base editors. *Sci Adv*, 2019, 5(5): eaax5717
- [47] Richter MF, Zhao KT, Eton E, et al. Phage-assisted evolution of an adenine base editor with improved Cas domain compatibility and activity. *Nat Biotechnol*, 2020, 38(7): 883-891
- [48] Chen L, Zhang S, Xue N, et al. Engineering a precise adenine base editor with minimal bystander editing. *Nat Chem Biol*, 2022, 19: 1-10
- [49] Cho SI, Lee S, Mok YG, et al. Targeted A-to-G base editing in human mitochondrial DNA with programmable deaminases. *Cell*, 2022, 185(10): 1764-1776.e12
- [50] Tong H, Wang X, Liu Y, et al. Programmable A-to-Y base editing by fusing an adenine base editor with an N-methylpurine DNA glycosylase. *Nat Biotechnol*, 2023. doi: 10.1038/s41587-41022-01595-41586
- [51] Zhang X, Zhu B, Chen L, et al. Dual base editor catalyzes both cytosine and adenine base conversions in human cells. *Nat Biotechnol*, 2020, 38(7): 856-860
- [52] Grünewald J, Zhou R, Lareau CA, et al. A dual-deaminase CRISPR base editor enables concurrent adenine and cytosine editing. *Nat Biotechnol*, 2020, 38(7): 861-864
- [53] Liang Y, Xie J, Zhang Q, et al. AGBE: a dual deaminase-mediated base editor by fusing CGBE with ABE for creating a saturated mutant population with multiple editing patterns. *Nucleic Acids Res*, 2022, 50(9): 5384-5399
- [54] Lam DK, Feliciano PR, Arif A, et al. Improved cytosine base editors generated from TadA variants. *Nat Biotechnol*, 2023, 41(5): 686-697
- [55] Chen L, Zhu B, Ru G, et al. Re-engineering the adenine deaminase TadA-8e for efficient and specific CRISPR-based cytosine base editing. *Nat Biotechnol*, 2022, 41(5): 663-672
- [56] Neugebauer ME, Hsu A, Arbab M, et al. Evolution of an adenine base editor into a small, efficient cytosine base editor with low off-target activity. *Nat Biotechnol*, 2022, 41(5): 673-685
- [57] Cox DBT, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, et al. RNA editing with CRISPR-Cas13. *Science*, 2017, 358(6366): 1019-1027
- [58] Hochstrasser ML, Doudna JA. Cutting it close: CRISPR-associated endoribonuclease structure and function. *Trends Biochem Sci*, 2015, 40(1): 58-66
- [59] Katrekar D, Chen G, Meluzzi D, et al. *In vivo* RNA editing of point mutations via RNA-guided adenosine deaminases. *Nat Methods*, 2019, 16(3): 239-242
- [60] Matsui M, Corey DR. Non-coding RNAs as drug targets. *Nat Rev Drug Discov*, 2017, 16(3): 167-179
- [61] Yi Z, Qu L, Tang H, et al. Engineered circular ADAR-recruiting RNAs increase the efficiency and fidelity of RNA editing *in vitro* and *in vivo*. *Nat Biotechnol*, 2022, 40(6): 946-955
- [62] Abudayyeh OO, Gootenberg JS, Franklin B, et al. A cytosine deaminase for programmable single-base RNA editing. *Science*, 2019, 365(6451): 382-386
- [63] Ullah M, Akbar Khan A, Yannarelli G. Clinical applications of RNA editing technology for the early detection of cancer and future directions. *Technol Cancer Res Treat*, 2020, 19: 153303382096419
- [64] MacDonald BT, Tamai K, He X. Wnt/ β -Catenin Signaling: Components, Mechanisms, and Diseases. *Dev Cell*, 2009, 17(1): 9-26