专论与综述

HGPRT 及其基因的研究

蔡济东　赵寿元
（上海　复旦大学　遗传学研究所）

HGPRT（亦作 HPRT）是次黄嘌呤—鸟嘌呤转磷酸核糖基酶（hypoxanthine—guanine phosphoribosyl transferase）的英文缩写。它与细胞里的嘌呤代谢过程有关，它的缺失会引起核酸代谢异常，导致出现遗传性疾病；同时，HGPRT 又是基因定位、基因突变和基因转移等实验研究中的一个重要标记。因此，HGPRT 在医学遗传学、分子遗传学的研究工作中有着重要作用；目前对这个酶和为这个酶编码的基因已作了广泛而深入的研究，积累了不少资料。

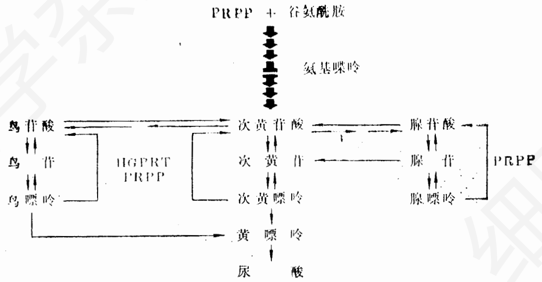
一、HGPRT 的基本特征

目前对 HGPRT 所作的研究大多是以人、仓鼠或小鼠细胞为材料。HGPRT 的作用底物有次黄嘌呤、鸟嘌呤、6-巯基嘌呤（6-MP）、6-硫代鸟嘌呤（6-TG）以及 8-氮鸟嘌呤（8-AG），但对 8-AG 的识别力较差，因此动物细胞对 6-TG 较敏感，而对 8-AG 不太敏感。天然 HGPRT是由相同亚基组成的多聚物。亚基无催化活性，其分子量经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳（PAGE）测定约为 24,000—26,000 道尔顿。根据仓鼠和小鼠的实验数据，原来认为 HGPRT是三聚体，但最近用交联剂对人的酶进行分析，认为是四聚体结构，因此还需深入研究。用等电聚焦和离子交换柱层析法测得 HGPRT 活性有几个峰，表明它由几个同功酶组成。同功酶的差异是否在于亚基或寡聚体结构的不同，现在还没有弄清楚。

正常哺乳动物体外培养细胞的 HGPRT活性变化不大，可认为其表现是组成型的。但不同器官的 HGPRT 活性差异很大。基底神经节、脑、卵巢、红血球和白血球中活性很高。酶活力的器官差异性的分子基础尚待进一步探明。

目前，我们可以用实验方法，选出 HGPRT 缺失的突变型（$HGPRT^-$）细胞。由于一些动物的突变细胞株对嘌呤类似物具有抗性，如不能利用 8-AG、6-TG 等来合成毒性核苷酸，这些细胞同时也没有 HGPRT 活性。因而只要在培养基中加入嘌呤结构类似物，由于正常细胞加以利用后，合成了毒性核苷酸而死亡，以致在这种培养基中生长的只有 $HGPRT^-$ 细胞。

根据 HGPRT 在嘌呤代谢中的作用，也可采用选择培养基从 $HGPRT^-$ 细胞中选出回复突变的 $HGPRT^+$ 细胞。我们知道，HGPRT 是核酸代谢中的一个嘌呤补救酶（purine salvage enzyme），能将预先合成的嘌呤碱基，即次黄嘌呤和鸟嘌呤，转化成相应的核苷酸——次黄苷酸（IMP）和鸟苷酸（GMP）。在嘌呤的从头合成（de novo synthesis）途径之外，它为 IMP 和 GMP 的合成提供了另一应急通路（见图）。



图：嘌呤生物合成和相互转换途径，粗线示从头合成途径。

根据这个特性，可用 HAT 选择培养基从 $HGPRT^-$ 细胞中选出 $HGPRT^+$ 细胞。HAT

培养基中含有次黄嘌呤（H，嘌呤源）、氨基喋呤（A，能遏制嘌呤和胸腺嘧啶的合成）和胸腺嘧啶（T，嘧啶源）。在这种培养基中，如图所示嘌呤从头合成被氨基喋呤所阻断，只有 $HGPRT^+$ 细胞能通过另一应急通路，利用培养基中的次黄嘌呤和鸟嘌呤合成IMP和GMP，得以在其中生长；而 $HGPRT^-$ 细胞既无法利用应急通路，又不能从头合成，受到双重阻塞，因而不能存活。当前在体细胞杂交、基因定位等研究工作中，广泛采用 $HGPRT^-$ 突变型细胞和胸腺嘧啶激酶缺失突变型细胞（TK^-）作为杂交亲本，以HAT培养基选出杂种细胞，可以大大提高工作效率。

二、HGPRT与遗传性疾病

HGPRT缺失是自毁容貌综合症（Lesch—Nyhan syndrome）患者最主要的生化缺陷。人类遗传学的研究表明，这是一种X连锁隐性遗传的先天性代谢缺陷；HGPRT结构基因位于X染色体上。自毁容貌综合症患者智力低下，不自主地咬破嘴唇和肌肉，手足肌肉不随意地扭动，起因于神经机能受到损伤，损伤的主要部位是基底神经节。正常个体中基底神经节的HGPRT活性最高，而从头合成嘌呤途径的第一个酶，磷酸核糖焦磷酸（PRPP）转酰胺酶活性最低，因此可以认为脑神经细胞必须依赖HGPRT来维持其嘌呤水平的恒定性，而不能以从头合成途径来合成所需的嘌呤。自毁容貌综合症患者是 $HGPRT^-$，因此大脑发育受到障碍，引起神经活动失调。

HGPRT缺失的病人还可患痛风性关节炎，分泌大量尿酸，蛋白尿增多，从头合成嘌呤速度加快。正常生长条件下，体外培养的这些病人的成纤维细胞从头合成嘌呤的速度也加快；如果培养在不含嘌呤的培养基中，它们从头合成嘌呤的速度与正常细胞相似，但分泌的嘌呤比正常细胞多7—10倍，大都为次黄嘌呤，分泌量占合成嘌呤总数的10%。这些研究表明，当培养基含嘌呤时，正常细胞和 $HGPRT^-$ 细胞对从头合成的调节有差别，而在没有嘌呤的条件下，$HGPRT^-$ 细胞摒弃一部分次黄嘌呤。一般认为 $HGPRT^-$ 细胞中PRPP浓度影响PRPP转酰胺酶的活力，从而影响嘌呤从头合成速度。但最近有报告认为从头合成速度与PRPP浓度无关[1]。$HGPRT^-$ 细胞不能利用次黄苷中的次黄嘌呤，结果使从头合成速度加快，同时使来自次黄苷的核糖部份的PRPP积累。

三、HGPRT基因与基因突变研究

HGPRT基因位于X染色体上。用小鼠 $HGPRT^-$ 细胞和人的X-常染色体易位（如X/9，X/22等）细胞杂交，进一步证明HGPRT基因两侧是葡萄糖-6-磷酸脱氢酶（G6PD）基因和磷酸甘油酸激酶（PGK）基因，HGPRT基因位于X染色体长臂22-端点的区段Xq22-qter）[2]。最近的第四届国际基因定位工作会议上又进一步确定HGPRT基因位于Xq26-qter，它和其它X连锁的基因顺序为PGK-αGAL-HGPRT-SAX-G6PD（αGAL：α半乳糖苷酶，SAX：X连锁表面抗原[3]。它还和单胺氧化酶（MAO）基因紧密连锁[4]。

由于HGPRT基因位于X染色体上，在雄性细胞中这个基因是半合子，在雌性细胞中一条X染色体失活，所以它在功能上也是半合子，突变即可表现出来；因此8-AG抗性（$8\text{-}AG^r$）的发生频率就比常染色体隐性突变的表现频率为高。可是，在仓鼠的二倍体、四倍体和八倍体细胞里观察到的 $8\text{-}AG^r$ 频率变化不大，只是随染色体组数目的增加而略微降低；如果根据隐性突变来解释，则 $8\text{-}AG^r$ 的频率应随染色体组数目的增加而显著降低。因此设想这是一种表型的变化，即基因表达的调控受到破坏的结果[5]。进一步研究表明，这是HGPRT突变的同时发生了染色体丢失的结果，而且丢失频率很高，X染色体亦随之发生丢失[6]。

各种类型细胞的 $8\text{-}AG^r$ 或 $6\text{-}TG^r$ 的自发

突变频率约为 1.5×10^{-8}。诱变剂可提高嘌呤类似物的抗性频率。甲基磺酸乙酯(EMS)和N-甲基 N′-硝基 N-亚硝基胍(MNNG)可使仓鼠、小鼠和人体细胞对嘌呤类似物的抗性提高50—500倍。EMS(可能是点突变诱变剂)、MNNG(可能为点突变和复制叉诱变剂)ICR-191(吖啶类化合物,可能是移码突变诱变剂)以及X和紫外线幅射(一般诱变剂),对仓鼠细胞的诱变作用呈剂量效应。

一些情况下,8-AG^r 和 6-TG^r 细胞杂交产生的杂种细胞为 HAT^r 和 HGPRT^+,根据这个实验可认为HGPRT的表达是调节基因作用或多顺反子相互作用的结果。另外观察到杂种细胞的HGPRT性质介于两个亲本之间,这一结果则可用酶的两个亚基相互作用以及等位基因表达的等显性来解释[7]。

HGPRT^+ 与 HGPRT^- 的种间细胞杂交实验表明,HGPRT^- 细胞株的基因被激活。如大鼠肝细胞瘤 HGPRT^- 细胞与人的 HGPRT^+ 成纤维细胞杂交,有一些 HAT^r 的杂种细胞具有大鼠HGPRT活力,但这些杂种细胞中都没有人的HGPRT和X染色体,这可能是人的细胞为大鼠HGPRT基因表达提供了调节因子。另外,小鼠 HGPRT^- 细胞和人的 HGPRT^- 细胞杂交后,杂种细胞中产生了人的HGPRT活性,因此可认为这是失活的X染色体上的某一部位去抑制作用的结果[8]。

分析各种HGPRT突变型对研究突变机制很有用处。现在发现的HGPRT的突变型有以下四种:

1. **渗漏(leaky)突变型**　8-AG^r 的仓鼠细胞株中,有一半细胞出现HGPRT活性。在正常条件下,它们不能很好利用次黄嘌呤,但用氨基喋呤或氮丝氨酸抑制嘌呤的从头合成时能很好利用次黄嘌呤。这些细胞的HGPRT对底物(次黄嘌呤或PRPP)的亲和性强弱不一,表明突变引起的遗传障碍不完全,酶活性有所下降但未完全丧失,这符合渗漏突变的情况。

1. **错义突变型**　一些仓鼠和小鼠细胞突变型的Km、温度敏感等参数不同于野生型细胞,没有HGPRT活性,但却合成分子量正常的亚基。它们表现为 CRM^+,即用免疫法鉴定存在交叉反应物质(CRM),说明酶蛋白仍是合成的,只是它的氨基酸组成由于一个密码子中的错义突变而发生改变,以致失去了酶的活性。

3. **移码和缺失突变型**　这类突变一般不产生蛋白质,或是产生的蛋白质结构变化很大,因此不能用免疫方法识别,而且回复突变频率很低。确有一些 HGPRT^-、CRM^-(即用免疫法查不出交叉反应物质)的仓鼠细胞突变型,用大量诱变剂处理仍不能获得回复的 HGPRT^+,因此可以认为属于移码和缺失突变型。

4. **肽链提前终止(PCT)突变或无义突变型**　这类突变是某一氨基酸的密码子突变成终止密码子,结果是 HGPRT^-,CRM^-,亚基分子量降低,不稳定。已在一些仓鼠和小鼠细胞中证实了PCT突变,其中有两个仓鼠细胞突变型研究得最为详尽[9]。突变型RJK3和RJK39的酶亚基分子量分别降低4%和2%。分子量降低较少的RJK39反而没有HGPRT活性。如果分子量降低是PCT的结果,那么降低较多的RJK3就不应是 HGPRT^+,因而不可能两者都是PCT突变型。对RJK39的研究正在深入,但由于目前还无法识别肽链的羧基端或氨基端,因此不能肯定它的突变发生在羧基端。

PCT突变还可通过校正tRNA(suppressor tRNA)的作用来确认[10]。所谓校正tRNA就是细菌和酵母菌的tRNA基因突变,产生的突变tRNA把终止密码当作某一氨基酸密码来翻译,校正了无义突变或PCT突变,从而产生完整的肽链。把分离得到的校正tRNA,用微量注射方法引入小鼠的一个PCT突变型细胞,观察到HGPRT活性得以恢复,并且证明HGPRT的表现是赭石校正tRNA作用的结果,因而这是一个UAA的

PCT 突变型。

四、HGPRT与基因转移

基因转移的途径包括转移(1)纯化的DNA，(2)由病毒传递的DNA，(3)分离的染色体，(4)细胞融合以及(5)完整细胞与细胞碎片融合等，其中(1)(3)(4)的基因转移，均已应用了HGPRT作为标记基因[11]。通过分离的染色体实现基因转移是一项较新的技术，最初HGPRT的转移频率仅为10^{-7}，后来使用了磷脂小泡包埋染色体的方法以及用二甲亚砜(DMSO)作促进剂，使转移频率提高到10^{-5}。DEAE-纤维素层析和PAGE可确证受体细胞表现的HGPRT具有供体的种族特异性，并且由于HGPRT自发突变频率大大低于转移频率，因此足以证明基因转移的效果。由于产生人体HGPRT的小鼠转移型(transferent)细胞中都不出现G6PD和PKG，而这两个基因间的距离不超过人的基因组的1％。因此认为转移的染色体片段很小(＜1％基因组)。

HGPRT的转移是HGPRT基因和受体染色体结合的结果，最后可能整合入受体基因组中；因此HGPRT的表达开始时不稳定，最后可能变得稳定。不稳定的转移型细胞在HAT培养基中逐渐消失，代之以稳定的转移型细胞。实验发现不稳定转移型细胞的HGPRT比活力提高约60倍，以后恢复到正常值，因而可认为这是由于转移早期的不稳定阶段存在着多份拷贝，而最终可能只有一份拷贝整合到受体染色体中；也可能是不稳定基因不受受体的正常调节机制的控制[12]。

HGPRT基因座位在诱发和研究哺乳动物细胞突变型，发展基因转移技术和研究嘌呤代谢的调节中起着重要作用，为体细胞遗传学的发展作出了重大贡献。可以预料，利用现有实验技术对这一基因座位的进一步研究，将为阐明核酸水平上的突变提供丰富的素材。随着实验手段的发展，必将在更精细的水平上解决基因转移、突变和调节等一系列重大课题[13]。

参考文献

[1] Hershfield, M. S., J. E. Seegmiller, 1977, *J. Biol. Chem.* 252: 6002.

[2] Shows, T. B., J. A. Brown, 1975, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 72: 2125.

[3] Miller, O.J.,R. Sanger, M. Siniicalco, 1978, *cytogenet Cell Genet.* 22:124.

[4] Skaper, S. D., I. A. Schafer, 1978 *Biochem. Genet.* 16: 1135.

[5] Harris, M,. 1971, *J. Cell. Physiol.* 78: 177.

[6] Chasin, L. A., G. Urlaub, 1975, *Science* 187: 1091.

[7] Chasin, L. A., G. Urlaub, 1976, *Somatic Cell Genet.* 2: 453.

[8] Kahan, B., R. DeMars, 1975, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 72: 1510.

[9] Fenwick, R. G. Jr., T. H. Sawyer, G. D. Kruh, K. H. Astrin, C. T. Caskey, 1977, *Cell.* 12: 383.

[10] Capecchi, M. R., R. A. Vonder Harr., N. E. Capecchi, M. M. Sveda, 1977 *Cell* 12: 371.

[11] Chu, F. H. Y., S. S. Powell, Advances in Human Genetics, ed. by Harris, H. Hirschhorn, K., 1976, Vol. 7: Chapter 5.

[12] Degnen, G. E., I. L. Miller, E. A. Adelberg, Estenstadt, J. M., 1977, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 74: 3956.

[13] Caskey, C. T., G. D., Kruh, 1979, *Cell*, 16: 1.