

剪接因子 SR-蛋白特异的激酶——SRPK 1 的发现*

桂建芳

(中国科学院水生生物研究所 武汉 430072)

1977年,当美国麻省理工学院的 Phillip Sharp 和冷泉港实验室的 Richard Roberts 分别领导的两个研究小组在研究腺病毒(adenovirus)和其 mRNA 之间的杂种分子发现了基因割裂(split)现象^[1,2]时,他们立刻感到诺贝尔已带着他的遗产敲开了他们的心扉。果然,一个新的称为 RNA 剪接 Splicing 的研究领域从此诞生了,16年后,随着这一领域的不断开拓,当时这一发现的领导者 Phillip Sharp 和 Richard Roberts 终于于 1993 年分享了诺贝尔生理和医学奖^[3,4]。

在 1992 至 1994 年两年间,笔者在美国加州大学圣迭戈校区(University of California, San Diego, UCSD)付向东(Xiang-Dong Fu)教授实验室从事博后和访问研究时,有幸涉足这一研究领域,并鉴定出一个特异于 RNA 剪接因子 SR-蛋白、并将 RNA 剪接和细胞周期调控联系起来的激酶^[5,6]。应本刊之邀,特在此将这一研究的背景、过程、结果及其意义简介于下。

一、SR-蛋白及其在 RNA 剪接中的功能作用

RNA 剪接研究中重大的发现之一是选择性剪接(alternative splicing),即在同一个基因中,其剪接位点和形式可以改变,从而导致一个基因能产生多个具有明显差异的蛋白产物^[7]。

选择性剪接是如何进行的呢?从 1990 年开始,一组称为 SR-蛋白的发现燃起了这一研究的热点。第一个被找到的 SR-蛋白是 SF 2/ASF,它是在分析组成性(constitutive)剪接和选择性剪接中发现的^[8,9]。迄今已发现并克隆

了这个蛋白家族的 8 个成员,它们是 SF 2/ASF, SC 35, SRp 20, SRp 55, U 2 AF 65, U 1 70 K 以及 tra 和 su 等^[10-13]。这个蛋白家族成员的氨基酸顺序具有两个共同的特征:(1)具有一个或多个 RNA 识别结构(RNA recognition motif,简称 RRM);(2)都含有一个或多个富含 SR(S-丝氨酸, R-精氨酸)二肽重复序列的区段。SR-蛋白就是因其含有 SR 区段而得名。

SR-蛋白是剪接的基本要素。在缺少 SR-蛋白无剪接活性的细胞组分中,加入 SR-蛋白可恢复剪接活性^[12]。它们在将 mRNA 前体组装进剪接体的起始阶段起了至关重要的作用^[11,13]。在体外剪接反应分析时,SR-蛋白具有类似的功用,也就是说,SR-蛋白家族的任何成员都能使缺少 SR-蛋白无剪接活性的细胞提取液恢复剪接功能^[12]。

体外剪接研究表明,SR-蛋白通过蛋白与蛋白以及蛋白与 RNA 间的相互合作可导致 RNA 剪接的功能完成^[14-15]。SR-蛋白是剪接体组装和 RNA 剪接的关键因子,特别是在剪接体形成的早期阶段,其作用更为显著,且这种功能作用很可能是通过蛋白间 SR 区段的相互作用而实践的。因此,揭示 SR-蛋白中 SR 区段的功能作用及其调控机制已开始成为 RNA 剪接研究中的主要热点之一。

二、剪接因子的组装和去组装现象及其与细胞周期调控和激酶的联系

用 snRNPs 的特异性抗体和 SR-蛋白的特

* 中国细胞生物学学会第六届学术大会大会报告。

异性抗体进行的亚核定位研究发现, 这些剪接因子在细胞核内聚集成 20—50 个斑点状 (speckles) 的结构^[15,17]。接着的许多研究皆表明, 这些核内斑点状结构是剪接因子集中的区域, 并发现当转录被抑制或病毒感染时, 剪接因子将重新分布^[17]。

有关这些核内斑点状结构的一个最有趣的发现是其在细胞周期过程中发生的组装和去组装现象。它们在细胞分裂间期, 成典型的斑点状结构; 随着细胞进入有丝分裂, 斑点逐渐分散, 到有丝分裂中期时, 斑点消失; 当分裂完成后, 斑点又在两个子细胞中重新出现^[18]。这一现象表明, 剪接因子聚集的核内斑点与那些在细胞周期中发生了组装和去组装的细胞器如染色体、核膜、纺锤体和核仁等类似, 可能与某些细胞周期调控因子有关。

90 年代初期, 正值细胞周期调控研究的峰期。当 80 年代末一批发育生物学家、生物化学家、遗传学家、细胞生物学家和分子生物学家分别采用不同的研究系统, 从不同的角度鉴定出早在 20 年前由 Masui 和 Markert 首先确认的存在于成熟卵母细胞中的成熟促进因子 (MPF) 就是 p 34^{cdc2} 这一调控细胞周期的主要激酶后, 大量的研究很快发现, 有丝分裂过程中细胞器和细胞内结构的去组装和重新组装大多是由于特定蛋白的磷酸化和去磷酸化引起的^[19,20], 即是激酶 (kinase) 和磷酸酶 (phosphatase) 作用的结果。

p 34^{cdc2} 激酶是导致细胞有丝分裂时一系列事件发生从而打开有丝分裂之门的主要激酶。许多与有丝分裂有关的蛋白, 如结合于 DNA 的组蛋白 H 1、核膜的主要成份核层蛋白 (lamin) 和核仁的主要成份核仁蛋白 (nucleolin) 等都是 p 34^{cdc2} 激酶的直接底物。比较发现, 这些蛋白底物磷酸化位置的氨基酸序列具有很强的同源性, 其共有序列 (consensus sequences) 为 S/T*-P-X-R/K (* 标明磷酸化的氨基酸位点)^[21]。因而, 一些含有这一同源序列的蛋白有可能是 p 34^{cdc2} 激酶的磷酸化底

物。

从对发表文献的比较分析中发现, 非 snRNP 的剪接因子 SR-蛋白可能是磷酸化蛋白, 因为其 SR 重复区域含有类似于 p 34^{cdc2} 激酶 (即 MPF) 磷酸化底物的共有序列。为了证实 SR-蛋白为磷酸化蛋白并鉴定出催化其磷酸化的蛋白激酶, 为了揭示 RNA 剪接与细胞周期调控的联系以及剪接因子在细胞周期中组装和去组装的分子机制及其磷酸化的生理意义, 我们开展了下列的一系列研究。

三、SR-蛋白特异的激酶 ——SRPK 1 的鉴定过程

1. 有丝分裂中期细胞提取液中存在促使核内斑点去组装的活性因子

由于 SR-蛋白中含有类似于 p 34^{cdc2} 激酶磷酸化底物的共有序列, 开始时, 我们比较简单地认为 SR-蛋白可能也是 p 34^{cdc2} 激酶的磷酸化底物。为了验证上述设想, 我们在获得了同步的有丝分裂中期细胞和间期细胞并制备出有丝分裂中期细胞提取液和间期细胞提取液^[22]的基础上, 首先比较分析了有丝分裂中期细胞提取液和间期细胞提取液中 p 34^{cdc2} 激酶的活性差异, 确证有丝分裂中期细胞提取液中 p 34^{cdc2} 激酶的活性要比间期细胞提取液中高得多; 接着采用体外诱导有丝分裂事件的方法^[23], 发现中期细胞提取液不但能诱导核膜破裂和染色质凝集, 而且诱导核内斑点发生了去组装。这说明我们制备的有丝分裂中期细胞提取液中不但存在能使核膜破裂和染色质凝集的活性物质, 也存在促使核内斑点去组装的活性因子。

2. 导致核内斑点去组装的活性因子不是 p 34^{cdc2} 激酶

有丝分裂中期细胞提取液中导致核膜破裂和染色质凝集的主要成份是 p 34^{cdc2} 激酶^[19], 促使核内斑点去组装的活性因子会不会也是 p 34^{cdc2} 激酶呢? 如果 SR-蛋白是

p 34^{cdc2} 激酶的直接底物, 则 SR-蛋白可以被 p 34^{cdc2} 激酶磷酸化。为了验证这一设想, 我们从原核细胞和真核细胞杆状病毒表达系统中表达并纯化了 SR-蛋白中的 SC 35、SF 2/ASF 和 P 55。接着, 利用 p 13-Sepharose beads 与 p 34^{cdc2} 激酶亲和性结合的特性^[19,24], 分别从有丝分裂中期细胞提取液和间期细胞提取液中沉淀出 p 34^{cdc2} 激酶, 然后进行激酶测定。结果出于所料, 与 p 13-Sepharose beads 结合的 p 34^{cdc2} 激酶对组蛋白 H 1 具有很高的激酶活性, 而对 SR-蛋白没有激酶活性, 不能使 SR-蛋白磷酸化。

为了确信上述结果, 我们购买了纯化的 MPF。在用 H 1 作为底物对照的条件下, 用它来磷酸化 SC 35 和 P 55, 所获得的结果与用 p 13-Sepharose beads 进行亲和性沉淀所得到的结果一样, 纯化的 MPF 也不能使 SR-蛋白磷酸化。此外, 用 p 34^{cdc2} 单克隆抗体进行免疫沉淀所进行的激酶测定也获得了相同的结果。接着我们发现, 缺失了 p 34^{cdc2} 激酶的中期细胞提取液仍能诱导核内斑点发生去组装, 也就是说 p 34^{cdc2} 激酶的缺失对核内斑点去组装没有影响。同时, 用纯化的 MPF 处理通透细胞, 虽可观察到诱导核膜破裂的作用, 但对核内斑点没有诱导功能。这些实验一致表明, p 34^{cdc2} 激酶没有直接参与 SR-蛋白的磷酸化, 它不是催化 SR-蛋白磷酸化的激酶, 导致核内斑点去组装的活性因子不是 p 34^{cdc2} 激酶。

至此, 我们的研究结果虽突出了我们的预料之外, 但 SR-蛋白能被有丝分裂中期细胞提取液高度磷酸化的结果使我们坚信 SR-蛋白是磷酸化蛋白, 细胞提取液中必定存在催化其磷酸化的激酶, 也许该激酶是已知的, 也许是未知的。在反复思考和多次试探性实验之后, 进行了分级分离试验。结果发现, 促使 SC 35 磷酸化的激酶活性和 p 34^{cdc2} 激酶活性经 P 11 离子交换柱层析后, 两者完全分开了, H 1 激酶活性在 0.35 mol/L NaCl 时就洗了下来, 而

SC 35 的激酶活性在 0.6 mol/L NaCl 以后才被洗脱下来。接着, 我们将具有 H 1 激酶活性的组分以及具有 SC 35 激酶活性的组分分别结合在一起, 并在相同的条件下分别进行去组装诱导实验。结果发现, 含有 p 34^{cdc2} 激酶的组分能诱导核层蛋白去组装, 导致核膜破裂, 但对核内斑点没有影响; 与此相反, 含有 SC 35 激酶活性的组分能诱导核内斑点去组装, 但不能诱导核层蛋白去组装。

3. 催化底物特异性及激酶命名

磷酸化底物分析的结果表明, 这一新发现和鉴定的可促使 SC 35 磷酸化的激酶能使已作过测定的所有的包括 SRp 20、SC 35、SF 2/ASF、SRp 55 和 U 2 AF⁶⁵ 这 5 种含有 SR 重复序列的蛋白磷酸化, 但不能使其它蛋白如组蛋白 H 1、成视网膜细胞瘤基因产物 Rb 蛋白和原癌基因产物 c-Jun 发生磷酸化。因而可以认为它是一种特异性催化 SR-蛋白磷酸化的激酶, 具有很强的专一性, 因而我们将这一激酶命名为 SR-蛋白特异的激酶(SR-protein-specific kinase), 简称为 SRPK 1。

磷酸化氨基酸分析显示, 这是一种丝氨酸激酶; 其磷酸化发生在 SR-蛋白中重复的 SR 区域。至此, 一个与 RNA 剪接有关催化 SR-蛋白磷酸化且调控剪接因子于细胞周期不同时期在细胞内定位的丝氨酸激酶被发现和鉴定出来了。可谓“山穷水复疑无路, 柳暗花明又一村”了。

4. SRPK 1 的细胞周期调节

在 SRPK 1 被鉴定及其底物特异性明朗之后, 我们很自然地将注意力转向了 SRPK 1 与细胞周期相关的研究, 并试图通过这一研究, 重新架起 RNA 剪接与细胞周期调控的桥梁, 寻找到新的线索。

首先, 我们通过同步诱导、³²Pi 活细胞标记和采用盐两步沉淀分离 SR-蛋白的方法^[25,26], 比较研究了活体细胞中 SR-蛋白的磷酸化程度。研究结果表明, 与间期细胞相比, 中期细胞中的 SR-蛋白被高度磷酸化, 其

磷酸化程度要比间期高3—5倍,且其磷酸化的氨基酸残基也是丝氨酸。因此,活体中的SR-蛋白磷酸化是细胞周期调节的。

活体中SR-蛋白的磷酸化是细胞周期调节的,它是SRPK 1导致的吗?显然,分析细胞在细胞周期不同时期相的SRPK 1活性可以找到这一答案。SRPK 1能与P 11交换树脂(resin)紧密结合的特性为测定细胞周期不同时期相的SRPK 1活性提供了极为便利的条件。为此,我们采用细胞同步培养的方法^[22,25],诱导并制备出处于细胞周期不同时期相包括G 0、G 1/S、S、G 2和M期5种细胞提取液,然后从这5种提取液中分别取等量的样品,用等量的P 11树脂分别与之结合并用0.5 mol/L的NaCl在相同的条件下洗相同的次数(3—4次)洗去其它激酶以减少杂质污染后,再将与之结合的SRPK 1用SC 35和SF 2/ASF为底物,来测定其激酶活性。结果表明,中期细胞提取液中的SRPK 1活性要比间期细胞中高3—5倍。

SR-蛋白在活体中的磷酸化差异和SRPK 1在不同时期相细胞提取液中的活性差异是一致的,都是中期比间期高,且高出的倍数也基本相同。这两个实验的趋同性强烈意味着活体中SR-蛋白的磷酸化可能是由SRPK 1导致的,且都是细胞周期调控的。

四、SRPK 1蛋白的纯化及其基因的cDNA克隆

1. 蛋白纯化

至此,SRPK 1可能为一种新激酶的立论已趋明朗。但要想进一步揭示这一激酶的特性和生理功能,关键是要克隆分离出其基因。而在对这一激酶的分子性能尚一无所知的情况下,关键的关键是要获得纯化的蛋白。当时,一想到MPF的纯化和分子鉴定几乎花了20年的时间,并为多家实验室共同努力的结果时,我们对纯化SRPK 1着实感到没有多大的把握。然而,我们没有止步,也舍不得止步。为

此,在阅览并借鉴包括MPF等激酶纯化经验的基础上,开始了纯化SRPK 1的尝试。在经过10多种不同层析柱的分离试探和纯化条件的摸索之后,我们总结出了一个纯化方案。该方案由4个连续的分离步骤组成。

纯化的第一步是P 11离子交换柱。细胞抽提液上样到P 11柱后,绝大多数蛋白没有与之结合,流了出来;结合于柱上的蛋白经NaCl梯度洗脱后,又获得了一定的分离纯化,SRPK 1的活性存在于约0.7 mol/L NaCl的洗脱液中。经这第一步分离之后,总蛋白量减少了约50倍,而其SRPK 1的激酶活性提高了约18倍,获得了约900倍的纯化效果。激酶活性的提高可能是抽提液中含有SRPK 1的抑制子,P 11柱分离后,其抑制子被分开,因而活性提高。这一假设已为我们后来的研究所证实(Gui & Fu,未报道的研究结果)。

第二步是硫酸胺沉淀与高性能的苯-琼脂糖疏水性层析柱结合分离。P 11柱分离后具有SRPK 1活性峰值的组分经加有1.5 mol/L的硫酸胺沉淀去掉一部分杂蛋白后,用缓冲液B将沉淀离心后的上清液稀释至硫酸胺浓度为1.25 mol/L,上样到高性能的苯-琼脂糖疏水性层析柱,然后用从含有1.25 mol/L硫酸胺的缓冲液B到无硫酸胺的缓冲液B进行线性梯度分离,结果发现SRPK 1的活性峰值在约0.6 mol/L的硫酸胺浓度时洗脱出来,经这一结合分离步骤后,总蛋白量又减少了10倍以上,但总活性也有所丢失,与P 11柱分离后拥有的总活性相比,其恢复率为24%。

纯化的第三步是Mono Q阴离子交换柱。经这一步分离后,总蛋白量又减少了10倍左右,而总活性略有降低。激酶测定和蛋白银染揭示,SRPK 1活性在0.35 mol/L NaCl洗脱下来。

纯化的最后步骤是Mono S阳离子交换柱。至此,SRPK 1获得了完全纯化,在0.75 mol/L NaCl时洗脱出来。通过连续的4步纯化之后,从1250 mg蛋白样品中,获得了15 μg

纯净的 SRPK 1。总的纯化倍数为 230,000, 相对于过 P 11 柱后(因过 P 11 柱后, 去掉了抑制子, 总活性提高了)的恢复率为 16%。采用上述方案, 先后进行了 4 次这种大规模的纯化, 结果一致, 具有很好的重复性。

2. cDNA 克隆

纯化的 SRPK 1 经电泳转移到 PVDF 膜上后, 切下这一 92 KD 的蛋白带, 经胰酶原位消化并经反相 HPLC 分离后, 我们选取了三个肽进行了氨基酸测序, 获得了这三个肽的氨基酸顺序。将这三个肽的氨基酸顺序输入基因银行, 查寻结果发现, 肽链 2 和肽链 3 与已发表激酶的保守区具有很强的同源性, 而肽链 1 在基因银行中找不到与之对应的同源顺序。

由于肽链 1 在基因银行中查寻不到与之对应的同源顺序, 说明该段对 SRPK 1 蛋白来说具有很强的特异性。因而在寻找和分离 SRPK 1 基因的 cDNA 克隆时, 首先以肽链 1 “STAGNFLVNPPEPK”的氨基酸信息, 根据遗传密码, 设计合成了长为 38 个碱基、共 64 个变化的寡聚核苷酸 “5'-ACI-GCI-GGI-AAT/C-TTT/C-T/CTI-GTI-AAT/C-CCI-T/CTI-GAA/G-CCI-AA-3'”。接着, 将这寡聚核苷酸的末端用 ^{32}P 标记后, 以它作为探针, 从 HeLa 细胞的 cDNA 文库中筛选并纯化了 30 多个阳性克隆, 且找到了一个含有完整序列的 cDNA 克隆。

该 cDNA 全长为 4346 个 bp, 其编码序列长 1965 个 bp, 编码蛋白含有 655 个氨基酸。由此 cDNA 推演出的氨基酸顺序中, 含有 SRPK 1 经氨基酸测序所获得的三个肽链完全一致的氨基酸顺序, 并含有丝氨酸/苏氨酸激酶催化区域所共有的保守性的催化残基^[27]。此外, 还含有两段主要由赖氨酸(K)组成的碱性氨基酸顺序, 它们可能具有核内定位信号(nuclear targeting signals)的功能作用。

由 SRPK 1 基因 cDNA 的编码序列表达出来的蛋白与从细胞中纯化出来的一致, 都为 92 KD。接着, 我们还对 SRPK 1 的特征和功

能进行了系列研究, 限于篇幅, 这里就不详述。

五、激酶 SRPK 1 发现的意义

RNA 剪接因子聚集的核内斑点 在细胞周期中发生组装和去组装的现象已早有发现, 并被认为其调控机制可能与那些在细胞周期中发生了组装和去组装的细胞器如染色体和核膜类似。然而, 是什么因子在起关键的调控作用呢? 直到本研究之前, 还一直处于猜测阶段。正如美国冷泉港国家实验室的 Spector 教授在评述 SRPK 1 发现的意义时所写的那样: “尽管已有的一些研究使我们窥见了(RNA 剪接)这支乐队的许多演员(指剪接因子), 但指挥一直没有露面。桂等的登台上场——当测试 p 34 cdc 2 作为这一指挥的可能性时, 他们引荐出了一位新的艺术能手——SRPK 1, 一种新的其活性为细胞周期调控的激酶。”; Spector 教授还说: “桂等的研究首次阐述了在剪接因子的细胞周期调控和组织中的磷酸化意义”^[28]。

SRPK 1 的发现, 不但揭示了 SRPK 1 特异性地催化 SR-蛋白磷酸化在调节剪接因子在细胞周期中定位的生理意义, 而且解释了由剪接因子聚集的核内斑点在细胞周期中发生去组装和再组装的原因和机制。因而, SRPK 1 作为联系 RNA 剪接和细胞周期调控的关键因子自它被发现时起, 就受到科学界的高度重视。就在我们的研究结果发表^[5, 6]后不久, 位于德国和英国的两家实验室很快就联合报道了磷酸化在调节剪接体组装和 RNA 剪接中的意义^[29]。一些有关 RNA 剪接和细胞核亚核结构的综述和评论也很快引用了我们的结果^[30, 31]。

SRPK 1 的发现将 RNA 剪接、细胞周期和激酶这三个热门的分子和细胞生物学主题联系在一起, 正如 Spector 教授在评论中所写的那样, “桂等的这些发现将剪接因子怎样保持在特定的亚核区域和它们的分布又是如何协调和谐起来发挥功能这些难题带到了最前沿。全部的故事还没有完, 但启开的序幕是发人深思

的,我们能够预料到今后几年内必定有振奋人心的发展。”^[28]。

参 考 文 献

- [1] Berget, S. M., Moore, C. & Sharp, P. A., 1977, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74: 3171—3175.
- [2] Chow, L. T., Gelinis, R. E., Broker, T. R. & Roberts, R. J., 1977, *Cell*, 12: 1—8.
- [3] Sharp, P. A., 1994, *Cell*, 77: 805—815.
- [4] Travis, J., 1993, *Science*, 262: 506.
- [5] Gui, J. -F., Lane, W. S. & Fu, X. -D., 1994 a, *Nature*, 369: 678—682.
- [6] Gui, J. -F., Tronchere, H., Chandler, S. D. & Fu, X. -D., 1994 b, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 10824—10828.
- [7] Horowitz, D. S., & Krainer, A. R., 1994, *Trends in Genetics*, 10: 100—106.
- [8] Krainer, A. R., Conway, G. C., & Kozak, D., 1990, *Cell*, 62: 35—42.
- [9] Ge, H., & Manley, J. L., 1990, *Cell*, 62: 25—34.
- [10] Fu, X. -D., & Maniatis, T., 1992, *Science*, 256: 535—538.
- [11] Fu, X. -D., 1993, *Nature*, 365: 82—85.
- [12] Zahler, A. M., Neugebauer, K. M., Lane, W. S., & Roth, M. B., 1993, *Science*, 260: 219—222.
- [13] Kohtz, J. D., Jamison, S. F., Will, C. L., Zuo, P., Luhrmann, R., Garcia -Blanco, M. A., & Manley, J. L., 1994, *Nature*, 368: 119—124.
- [14] Wu, J. Y., & Maniatis, T., 1993, *Cell*, 75: 1061—1070.
- [15] Amrein, H., Hedley, M., & Maniatis, T., 1994, *Cell*, 76: 735—746.
- [16] Fu, X. -D., & Maniatis, T., 1990, *Nature*, 343: 437—441.
- [17] Spector, D. L., 1993, *Annu. Rev. Cell Biol.*, 9: 265—315.
- [18] Spector, D. L., Fu, X. -D., & Maniatis, T., 1991, *EMBO J.*, 10: 3467—3481.
- [19] Pfaller, R., Smythe, C., & Newport, J. W., 1991, *Cell*, 65: 209—217.
- [20] Stearns, T., & Kirschner, M., 1994, *Cell*, 76: 623—551.
- [21] Moreno, S., & Nurse, P., 1990, *Cell*, 61: 549—551.
- [22] Dulic, V., Lees, E., & Reed, S. I., 1992, *Science*, 257: 1958—1961.
- [23] Hogner, D., Lepper, K., Seibold, G. & Jost, E., 1988, *Exp. Cell Res.*, 176: 281—296.
- [24] Dunphy, W. G., Brizuela, L., Beach, D., & Newport, J., 1988, *Cell*, 54: 423—431.
- [25] Lew, D. J. Dulic, V., & Reed, S. I., 1991, *Cell*, 66: 1197—1212.
- [26] Zahler, A. M., Lane, W. S., Stalk, J. A., & Roth, M. B., 1992, *Genes & Dev.*, 6: 837—847.
- [27] Hanks, S. K., & Quinn, A. M., 1991, *Meth. Enzym.*, 200: 38—62.
- [28] Spector, D. L., 1994, *Nature*, 369: 604.
- [29] Mermoud, J. E., Cohen, P. T. W., & Lamond, A. I., 1994, *EMBO J.*, 13: 5679—5688.
- [30] Wansink, D. G., van Driel, R. & de Jong, L., 1995, *Molecular Biology Reports*, 20: 45—55.
- [31] Hendzel, M. J. & Bazett-Jones, D. P., 1995, *Chromosoma*, 103: 509—516.
- (上接第 67 页)
- 220—226.
- [8] H. J. Yost., 1992, *Science*, vol. 357: 158—161.
- [9] F. M. Watt., 1986, *TIBS*, vol. 11: 482—485.
- [10] C. Q. Lin and M. J. Bissell., 1993, *FA-SB*, vol. 7: 737—743.
- [11] C. H. Streuli et al., 1991, *J. Cell Biochem.*, vol. 115: 1383—1395.
- [12] J. P. Bidwell, 1993, *PNAS*, vol. 90: 3162—3166.
- [13] J. N. Gordon., 1993, *Cancer Res.*, vol. 53: 4971—4977.
- [14] K. Burridge., 1988, *Ann. Res. Cell Biology.*, vol. 4: 487—525.
- [15] A. A. Reszka et al., 1992, *J. Cell Biochem.*, vol. 117: 1321—1330.
- [16] R. L. Juliano and S. Haskill., 1993, *J. Cell Biochem.*, vol. 120: 577—585.
- [17] C. E. Turner 1994, *Bioassays*, vol. 16: 47—52.
- [18] M. D. Schaller and J. T. Parsons., 1994 *Current Opinion in Cell Biology*, vol. 6: 705—710.
- [19] R. L. Juliano and S. Haskill., 1993, *J. Cell Biochem.*, vol. 120: 577—585.
- [20] A. Richardson and J. T. Parsons., 1995, *Bioassays*, vol. 17: 229—236.
- [21] R. H. Singer 1992, *Current Opinion in Cell Biology*, vol. 4: 15—19.
- [22] D. E. Ingber 1993, *Cell*, vol. 75: 1249—1252.
- [23] G. Zambetti et al., 1991, *Exp. Cell Res.*, vol. 192: 93—101.
- [24] K. J. Pienta and D. S. Coffey., 1992, *J. Cell Biochem.*, vol. 94: 357—365.