

Bacteriophage M13 DNA 복제 개시점(replication origin)의 활성화에 대한 2 차 돌연변이 기작

김 명 희

한국과학기술원 유전공학센터

I. 서론

박테리오파지 M13은 fd, f1 과 더불어 filamentous coliphage (Ff) 에 속하며 (Marvin and Hohn, 1969; Ray, 1977), 이들 바이러스들은 F-type sex pilus를 통하여 숙주 세포 안으로 침입을 하고, cell lysis가 일어나지 않은 상태에서 virion들이 성숙되어 세포 밖으로 나온다 (Hofschneider and Preuss, 1963; Hoffmann-Berling and Maze, 1964). M13은 6407개의 염기로 형성된 (van Wezenbeek *et al.*, 1980) 단사상태의 circular DNA 분자를 갖고 있으며 10개의 유전자를 함유하고 있는데 (Horiuchi *et al.*, 1978; Schaller *et al.*, 1978) Genes II 와 V가 DNA 복제에 관여하는 것으로 알려져 있다 (Pratt and Erdahl, 1968). 다른 유전자들은 바이러스의 morphogenesis와 packaging에 관여하는 것으로 알려져 있으며, 특히 genes VIII, III, VII, VI, 그리고 IX 산물들이 성숙 virion

Table 1. The gene products of filamentous bacteriophage

Gene	Mr (kilodalton)	Function
II	46.1	Initiation of replication of viral strand DNA; nicks the plus strand of RF DNA at the specific site.
X	12.7	Unknown.
V	9.7	Single strand specific DNA binding protein; concentration in cell (about 10^5 copies) determines the fraction of viral DNA that replicates or is packaged into capsid protein.
VII	3.6	Minor capsid protein (Webster <i>et al.</i> , 1981).
IX	3.7	Minor capsid protein.
VIII	pre. 7.6 mat. 5.2	Major capsid protein; about 2700 copies per phage.
III	pre. 44.7 mat. 42.7	Minor capsid protein; essential for adsorption to the F-pilus.
VI	12.4	Minor capsid protein.
I	39.5	Morphogenesis.
IV	45.8	Morphogenesis.

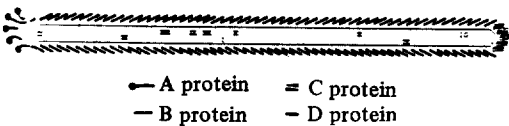


Fig. 1 Schematic representation of the DNA orientation inside the phage particle (from Webster *et al.*, 1981). The DNA is presented as a long loop within the virion, coated along its length with B protein (product of gene VIII), A protein (product of gene III), D protein (product of gene VI), and C protein (products of genes VII and IX). The Roman numerals refer to the viral genes. IG refers to the intergenic region.

상에 존재하고 있음이 밝혀졌다 (Simons *et al.*, 1979; Grant *et al.*, 1981).

M13 바이러스는 직경 약 $0.06\mu\text{m}$, 길이 $1\mu\text{m}$ 되는 nucleoprotein rod로써, 그것의 DNA는 2700개의 major coat 단백질 분자로 둘러 쌓여져 있으며 rod의 끝에는 소량의 minor coat 단백질들로 이루어져 있고 (Fig. 1) (Lin *et al.*, 1980; Grant *et al.*, 1981), DNA는 virion 내에서 특정한 orientation으로 고정되어 있다 (Shen *et al.*, 1979; Webster *et al.*, 1981).

유전자들은 genome 상에서 3 개의 functional

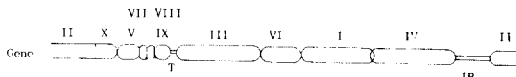


Fig. 2 Genetic map of bacteriophage M13 DNA. The circular genome is presented in a linear form with the unique endonuclease HindIII cleavage site as zero point. The Roman numerals refer to the M13 genes. T stands for rho-independent termination site of transcription. IR refers to the intergenic region in which the origin of replication of viral and complementary strands is located. (from van Wezenbeek *et al.*, 1980).

group으로 나뉘어서 배열되어 있는데 DNA 복제 (genes II와 V), capsid (genes VII, IX, VIII, III, 그리고 VI), 그리고 morphogenesis (genes I과 IV)에 관여하고 있고 각각의 function은 Table 1에 요약하였다(Beck and Zink, 1981). Fig. 2에서 보여주듯이 대부분의 유전자들은 서로 매우 근접하게 위치하고 있는데(van Wezenbeek *et al.*, 1980) gene II 내에 위치하는 intragenic한 "X" 유전자 외에도 gene I과 IV의 overlap, 그리고 genes VII, IX와 VIII의 translational start, stop signal에 있어서의 single nucleotide의 overlap이 있다. 또 genome 상에는 어떤 단백질도 encode하고 있지 않은 약 570개의 염기(전체 genome의 약 9%)가 존재하는데 가장 긴 intergenic region이 유전자 VIII과 III, 그리고 IV와 II 사이에 위치하고 이들 두 부위는 M13 DNA복제와 유전자 발현에 있어 매우 중요한 역할을 한다.

II. Replication Origin. (복제 개시점)

유전인자 IV와 II사이의 intergenic region (IR)은 507개의 염기로 이루어져 있으며(van den Hondel *et al.*, 1976), complementary ("-") 그리고 viral("+") strand DNA replication origin을 포함하고 있으므로 하여 오랫동안 DNA복제에 관하여 연구를 하고 있는 팀들에 의해 관심의 대상이 되어 왔다(Tabak *et al.*, 1974; Horiuchi and Zinder, 1976;

Suggs and Ray, 1977).

이 부위는 potential secondary structure를 갖고 있으며(Fig. 3) 3개의 functional domain으로 나뉘어진다. Gene IV에 근접해있는 긴 hairpin "A"는 유전자 IV 바로 다음에 rho-independent termination signal이 존재한다는 실험적 증거와 함께, 중요한 전사 조절 signal을 갖고 있음이 밝혀졌고(Edens, 1978; Smits *et al.*, 1980), hairpin "B"와 "C"는 *E. coli* RNA polymerase에 의해 인지됨과 동시에 primer-RNA 합성이 시작되는 부위 (*Ori_c*)이며(Geider *et al.*, 1978), gene II initiator 단백질에 의하여 viral strand nicking이 일어나는 부위 (*Ori_v*)는 hairpin "D"에 위치하고 있다. 3개의 functional domain들이 각각 plasmid에 cloning되어 독자적으로 function을 할 수 있음이 밝혀졌는데(Dotto *et al.*, 1981; Zagursky and Berman, 1984), 그것들은 gene II 근접부위는 male-specific phage adsorption과 penetration에 IR의 중간 부위는 functional한 replication origin(Cleary and Ray,

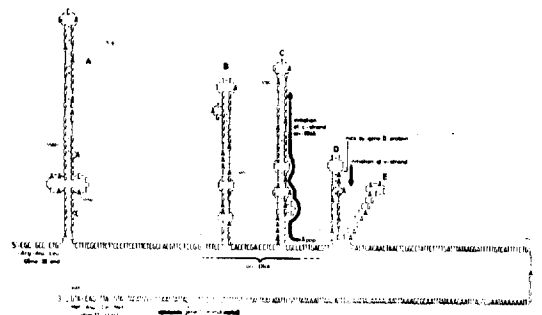


Fig. 3 Proposed secondary structure of the filamentous phage fd DNA in the intergenic region between genes IV and II. The positions of the RNA polymerase protected fragment (*ori-DNA*), and the primer RNA for complementary strand, and the gene II protein nicking site for the viral strand replication are indicated. Base exchange for f1 and M13 are indicated: no bracket = exchange is common for f1 and M13; parentheses () = exchange exists for f1 only; bracket [] = exchange exists for M13 only (from Beck and Zink, 1981).

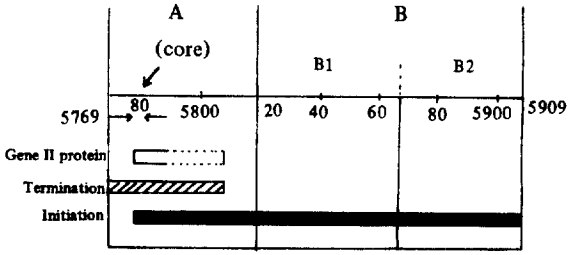


Fig. 4 The f1 functional origin, its signals and domains. Numbers indicate nucleotide positions on the f1 map. →, Gene II protein nicking site; → ←, palindromic region around the gene II protein nicking site. The location of the gene II protein recognition sequence and of the signals for initiation and termination of plus strand synthesis are indicated. Also shown are the domains into which the f1 functional origin can be divided.

1980, 1981) 에 그리고 gene IV 근접부위는 phage morphogenesis에 관여함이다.

또, replication origin 부위는 viral strand 합성에 없어서는 안될 “core region” (domain A) - 3 개의 overlapping signal을 포함한다: initiation과 termination에 꼭 필요한 gene II 단백질 인지 sequence; termination signal; initiation signal - 과 viral strand initiation만을 위한 “replication enhancer sequence (domain B)의 2 domain으로 나뉘어진다 (Fig. 4) (Dotto *et al.*, 1984; Johnston and Ray, 1984).

III. DNA Replication

Small *E. coli* 바이러스인 M13은 $\phi \times 174, G4$ 와 함께 DNA 복제에 관한 연구를 위해 매우 유용한 model system으로 이용되어져 왔다 (Denhardt *et al.*, 1978). 복제에 관련된 효소들과 그들의 활동 기작에 관해 많은 정보들이 알려져 있지만 (Kornberg, 1980), 아직까지 미흡한 점은 바이러스 genome에 존재하고 있는 DNA 복제에 관한 signal과 또 어떻게 이들 signal이 인지되어져서 function을 하는가에 대한 세밀한

지식들이다.

박테리아 세포안으로 들어간 후 M13 viral (“+”) strand는 complementary (“-”) strand 합성을 위한 template로 사용이 되며 이 반응은 세포의 inner-membrane에서 일어난다고 알려져 있다 (Jazwinski *et al.*, 1973). 이 반응이 cell-free extracts와 이들 extracts로부터 분리해낸 protein들로 재조성된 system에서 재현이 되어졌는데 (Wickner *et al.*, 1972; Geider and Kornberg, 1974) 이 replication processing model이 Fig. 5에 도시되었다 - (a) preinitiation; single-stranded DNA binding protein (SSB)이 specific start를 위해 template에 붙는다: (b) initiation; RNA polymerase가 짧은 특이 부위를 전사한다: (c) chain growth; DNA polymerase III holoenzyme이 RNA priming fragment를 연장하며 template에 따라 거의 전체 genome 길이만큼 DNA를 합성한다 (RF II): (d) gap filling and closure; DNA polymerase I이 primer RNA fragment를 잘라 없앴과 동시 RF II에 있는 DNA gap을 DNA 합성 (nick translation)으로 채우며, 마지막으로 ligase가 봉하여 closed-double stranded DNA molecule (RF I)로 만든다 (parental RF I). Parental RF I분자는 그 다음에 있을 RF DNA복제와 더 나중에 있을 전사, viral single-stranded (SS) DNA 합성을 위한 매체가 된다.

RF 복제를 위하여 바이러스의 gene II 단백질이 필수적으로 필요하고, 그 외의 관련 효소들은 모두 숙주 세포로부터 제공을 받는데, 이것들은 rep 단백질 (Fidanian and Ray, 1972), RNA polymerase (Brutlag *et al.*, 1971; Fi-

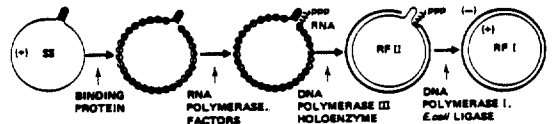


Fig. 5 Model showing the stages and proteins required for the in vitro conversion of M13 viral single-stranded DNA (SS) to the duplex replicative form (RF I) (from Kornberg, 1980).

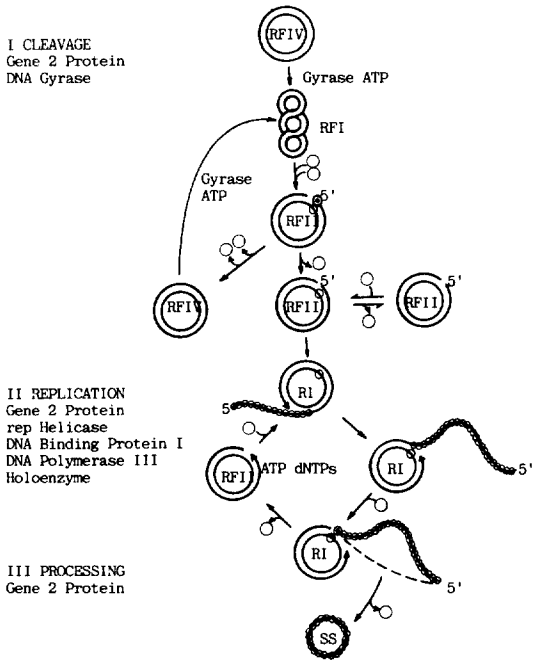


Fig. 6 A model for enzymatic synthesis of bacteriophage fd viral DNA and the involvement of fd gene II protein (from Meyer and Geider, 1982).

danian and Ray, 1974), DNA polymerase I (Mitra and Stallion, 1976)과 III (Staudenbauer *et al.*, 1973; Haldenwang and Walker, 1977)이다. Gene II 단백질이 site- 그리고 strand specific endonuclease (Meyer and Geider, 1979)라는 것이 생물학적으로 활성이 있는 정제된 gene II 단백질의 분리로 밝혀졌는데 RF to RF, RF to SS 합성에 꼭 필요할 효소이다. Viral-strand DNA 합성에 대한 자세한 기작은 아직 완전히 알려져 있지 않지만, rolling-circle mechanism에 의한다는 것이 EM (Electron microscopy)을 통하여 관찰되었다 (Gilbert and Dressler, 1968; Ray, 1969).

Viral DNA 합성 기작을 살펴보면 Fig. 6에서 보는 바와같이 우선 viral-strand replication origin이 gene II 단백질에 의해 인지되어 저서 3'-hydroxy group과 5'-phosphate group을 만들고 이 단백질의 존재하에 *rep* helicase가 strand를 unwind함과 동시에 (Geider *et al.*, 1982) DNA polymerase III holoenzyme이 3'

-OH로부터 염기를 하나씩 더 해가고 원래 존재하고 있던 5' 쪽은 template로부터 떨어져 나오면서 rolling-circle 모양으로 DNA가 복제된다. 이때 displaced된 5' 쪽의 viral DNA가 *E. coli*의 single-stranded DNA binding protein (SSB)에 의해 커버가 되면 곧바로 다시 complementary strand DNA 합성이 시작되어 결국 RF to RF 합성이 일어나고, 바이러스의 gene V 단백질 (single-stranded DNA binding protein)로 붙게되면 RF to SS의 경로가 되면서 나아가서는 coat 단백질들과 morphogenesis 단백질들에 의해 바이러스 particle로 되어 세포 밖으로 나오게 된다.

IV. Qualitative and Quantitative changes of an initiator protein (gIIp).

DNA replication origin에 있어서 DNA 합성은 단백질과 DNA의 복잡한 상호작용에 의하여

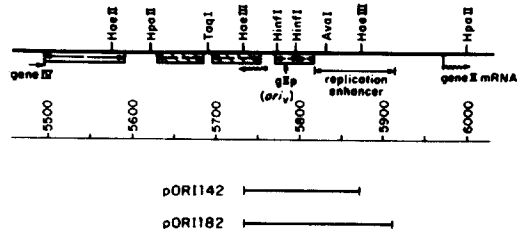


Fig. 7 Physical map of the M13 intergenic region and the M13 fragments present in oriM13 plasmids.

The replication enhancer sequence is indicated by a double arrow. The cleavage sites for various restriction enzymes are shown above the M13 sequence. Also included on the map are the start of M13 gene II messenger RNA and its promoter region, and the site of viral strand cleavage (ori_v) by the gene II protein (gIIp). Possible hairpin structures in the single-stranded viral DNA are indicated by boxes. The hatched boxes represent hairpins protected by RNA polymerase at the origin of complementary strand synthesis. The RNA primer for complementary strand synthesis is indicated by a squiggled arrow. The lower line is a scale of the M13 sequence in base-pairs using the nucleotide coordinates of van Wezenbeek *et al.* (1980).

일어나는데, 몇개의 단백질들 (예를들어 gene II 단백질)은 rate-limiting 역할을 하는 initiation 과정을 조절하는 필수적인 것으로 알려져 있다. Replication origin에서 이 gene II 단백질의 정상적, 정량적 변화가 protein-DNA interaction에 지대한 영향을 미침이 최근 밝혀졌고, 또 initiation을 위해 필요한 최소 DNA sequence가 매우 감소되었음이 알려졌다.

우선 정성적 변화(qualitative change)를 보기 위하여 Fig. 7에서 보여주는 ori M13 chimeric 플라스미드(M13 origin 단편이 pBR 322 vector에 cloning된 molecule)를 사용하였다. Functional한 M13 replication origin을 갖고 있는 PORI 182는 helper M13 바이러스의 존재하에 replication을 할 수 있지만, PORI142는 replication enhancer의 일부가 포함되어있지 않으므로 M13-dependent replication이 불가능하다. 그러나 spontaneous mutant (M13

UK)들이 (rare) PORI142 transformants로부터 분리되었고 M13UK helper 바이러스들은 PORI142의 transformation efficiency를 PORI182의 그것과 동일하게 올려주었으며, *E. coli polA*⁺ 균주에서는 M13UK의 성장을 크게 저하시켰다(interference phenotype). Marker-rescue experiment에 의해 (Hutchison III and Edgell, 1971) gene II에서 돌연변이가 일어

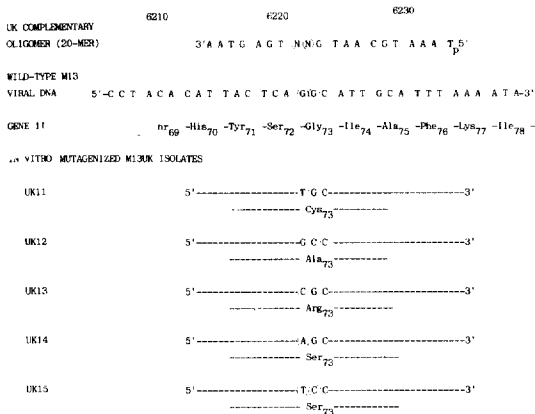


Fig. 8 M13UK mutants isolated from in vitro oligonucleotide-directed mutagenesis.

Nucleotides 6207 to 6239 of wild-type M13 viral DNA and the synthetic oligodeoxyribonucleotide complementary to the region around the Gly₇₃ codon are shown. The mutant positions are circled together with the corresponding nucleotides in the complementary oligodeoxyribonucleotide. "N" stands for any of the four deoxyribonucleotides (dA, dG, dC or dT). Substituted nucleotides responsible for the UK phenotype are marked with dotted circles.

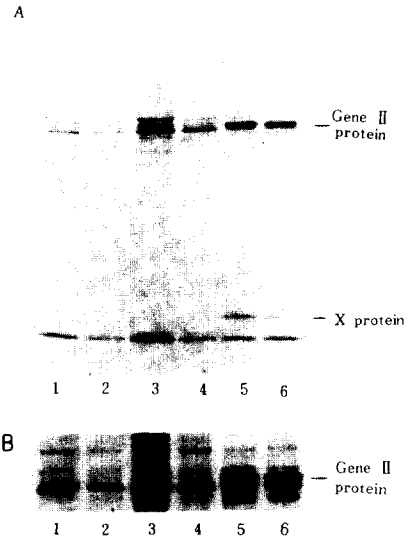


Fig. 9 Gene II protein production in cells infected with various phages. Exponentially growing K-38 cells were infected with various phages at a multiplicity of infection of 100. After 20 min, cells (0.2 ml) were labelled for 2 min with 10 μ Ci (1 Ci = 37 GBq) of [³⁵S] methionine (10³ Ci/mmol). After precipitation with trichloroacetic acid, samples were immunoprecipitated with gene II protein antiserum. Samples were then analyzed by electrophoresis in NaDodSO₄/12.5% acrylamide gels (A). The same samples were also electrophoresed in a NaDodSO₄/7% acrylamide gel to better resolve the region around the gene II protein (B). The positions of the gene II and X proteins are indicated. Lanes: 1, uninfected control; 2, infection with R132 (gene II amber mutant); 3 and 4, infection with wild type (lane 3 contains twice the amount of sample used in lane 4); 5, infection with R13 (gene V amber mutant); 6, infection with R218.

난 것을 알 수 있었고 dideoxy - substitution technique (Sanger *et al.*, 1977)을 통해 DNA sequence를 읽은 결과, point mutation-GCC (Gly₇₃) to TGC (Cys₇₃) 혹은 GCC (Ala₇₃)-이 일어났음을 알 수 있었다. 이들 point mutation들이 "UK phenotype"의 발현에 충분한 것인지 확인함과 동시에 cysteine과 alanine 만이 glycine₇₃을 대체해서 replication enhancer deletion mutation을 suppress 하는지 알아보기 위하여 20-mer oligonucleotide를 준비하여 *in vitro* oligonucleotide mutagenesis (Hutchison III *et al.*, 1978; Wallace *et al.*, 1981)를 하였고 Cys₇₃과 Ala₇₃뿐만 아니라 Arg₇₃, Ser₇₃ 또한 UK phenotype을 나타내는 것으로 밝혀졌다. (Fig. 8).

또한 최근 gene V mutation에 의해 replication enhancer가 제거된 molecule이 rescue될 수 있다는 것이 보고 되었는데 (Dotto and Zinder, 1984) 이것은 gene II 단백질 생성을 억제할 수 있는 작용(일종의 repressor)을 갖고 있는 gene V 단백질 유전자상에 돌연변이가 일어남(R218)으로 해서 세포내의 gene II 단백질의 양이 증가하였고(Fig. 9), 그로인하여 enhancer deletion molecule이 rescue됨을 볼 수 있었다. 또 다른 예는, gene II mRNA leader (U₅G₄CU₄)에 속해있는 염기 하나가 돌연변이에 의해 다른 염기로 대체됨으로써 일어난 경우인데, 이 leader sequence는 아마도 gene V 단백질에 의한 translational repression의 target 부위라고 생각되어진다.

V. Discussion

살아있는 세포내에서 일어나는 반응중 가장 정확하게 조절되고 있는 것 중의 하나가 DNA 복제를 위한 initiation 과정인데 이것은 "replication origin"이라고 불리는 곳에서 일어나고, 가장 근본적인 조절 기작은 origin에 위치하고 있는 nucleotide sequence와 이곳을 인지하는 특이 단백질간의 상호작용에 기인한다.

여기서 지금까지 서술한 것은 특이 단백질(gene II protein)의 정성적 또는 정량적 변

화에 의해 DNA 복제에 필요한 replication origin sequence의 일부분이었던 replication enhancer (Fig. 4, 7)를 불필요하게 함으로써 minimum replication origin을 core region 만으로 국한 되게 함이었다.

끝으로 지적하고 싶은 것은 mutant M13 origin과 *ras* proto-oncogene의 활성화 기작이 매우 비슷하다는 점이다.

Proto-oncogene의 발현 증가에 의한 활성화 예로써는 다음과 같다: retrovirus의 Leukemogenesis시의 *myc* proto-oncogene의 활성화 (Neel *et al.*, 1981; Payne *et al.*, 1981); retrovirus LTR (long terminal repeat)의 fusion에 의한 rat와 human에서의 c-Ha-*ras* proto-oncogenes의 활성화 (De Feo *et al.*, 1981; Chang *et al.*, 1982). *Ras* proto-oncogene의 두번째 활성화 기작은 12번째 아미노산인 glycine의 다른 여러 아미노산으로의 치환에 의하는데 그 예로는 다음과 같다: Human EJ 그리고 T24 bladder carcinoma cell line에서의 valine으로의 치환 (Tabin *et al.*, 1982; Reddy *et al.*, 1982); human lung과 colon carcinoma cell line에서의 valine 혹은 cysteine으로의 치환 (Capon *et al.*, 1983). 게다가 Harvey, B-ALB/C 그리고 Kirsten murine sarcoma virus (MSV)들의 homologous transforming protein (P21)들 역시 arginine (Dhar *et al.*, 1982), lysine (Reddy *et al.*, 1982), 그리고 serine (Tsuchida *et al.*, 1982)을 12번째 아미노산 위치에 각각 갖고있는 것으로 알려졌다.

이와같이 정성적, 정량적 변화에 의하여 서로 연관이 전혀 없는 *ras* protein과 bacteriophage initiator protein의 활성화 기작은 일반적인 단백질 활성화 기작의 일부일 지도 모른다는 중요한 의미를 갖는다고 할 수 있겠다.

REFERENCES

1. Beck, E., and Zink, B. (1981). *Gene* 16, 35-58.
2. Brutlag, D., Schekman, R., and Kornberg, A. (1971). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68, 2826-2829.
3. Capon, D. J., Seeburg, P. M., McGrath, J. P.,

- Hayflick, J. S., Edman, U., Levinson, A. D., and Goedel, D. V. (1983). *Nature* 304, 507-513.
4. Chang, E. H., Furth, M. E., Scolnick, E. M., and Lowy, D. R. (1982). *Nature* 297, 479-483.
 5. Cleary, J. M., and Ray, D. S. (1980). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 4638-4642.
 6. Cleary, J. M., and Ray, D. S. (1981). *J. Virol.* 40, 197-203.
 7. De Feo, D., Gonda, M. A., Young, H. A., Chang, E. H., Lowy, D. R., Scolnick, E. M., and Ellis, R. W. (1981). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 3328-3332.
 8. Denhardt, D. T., Dressler, D., and Ray, D. S. (eds.) (1978). *The single-stranded DNA phages*, Cold Spring Harbor Lab. Cold Spring Harbor, New York.
 9. Dhar, R., Ellis, R. W., Shih, T. Y., Oroszlan, S., Shapiro, B., Maizel, J., Lowy, D., and Scolnick, E. (1982). *Science* 217, 934-937.
 10. Dotto, G. P., Enea, V., and Zinder, N. D. (1981). *Virology* 114, 463-473.
 11. Dotto, G. P., Horiuchi, K., and Zinder, N. D. (1984). *J. Mol. Biol.* 172, 507-521.
 12. Dotto, G. P., and Zinder, N. D. (1984a). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 1336-1340.
 13. Dotto, G. P., and Zinder, N. D. (1984b). *Nature* 311, 279-280.
 14. Edens, L. (1978). Ph. D. Thesis, Univ. of Nijmegen, the Netherlands.
 15. Fidanian, H. M., and Ray, D. S. (1972). *J. Mol. Biol.* 72, 51-63.
 16. Fidanian, H. M., and Ray, D. S. (1974). *J. Mol. Biol.* 83, 63-82.
 17. Geider, K., Beck, E., and Schaller, H. (1978). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 645-649.
 18. Geider, K., and Kornberg, A. (1974). *J. Biol. Chem.* 249, 3999-4005.
 19. Gilbert, W., and Dressler, D. (1968). *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 32, 473-484.
 20. Grant, R. A., Lin, T.-C., Konigsberg, W., and Webster, R. E. (1981). *J. Biol. Chem.* 256, 539-546.
 21. Haldenwang, W. G., and Walker, J. R. (1977). *J. Virol.* 22, 23-30.
 22. Hoffmann-Berling, H., and Maze, R. (1964). *Virology* 22, 305-313.
 23. Hofschneider, P. H., and Preuss, A. (1963). *J. Mol. Biol.* 7, 450-451.
 24. Horiuchi, K., Vovis, G. F., and Model, P. (1978). *The single-stranded DNA phages* (Denhardt *et al.*, eds.), Cold Spring Harbor Lab. Cold Spring Harbor, New York, pp. 113-137.
 25. Horiuchi, K., and Zinder, N. D. (1976). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73, 2341-2345.
 26. Hutchison III, C. A., and Edgell, M. H. (1971). *J. Virol.* 8, 181-189.
 27. Hutchison III, C. A., Phillips, J., Edgell, M. H., Gillam, S., Jahnke, P., and Smith, M. (1978). *J. Biol. Chem.* 253, 6551-6560.
 28. Jazwinski, S. M., Marco, R., and Kornberg, A. (1973). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70, 205-209.
 29. Johnston, S., and Ray, D. S. (1984). *J. Mol. Biol.* 177, 685-700.
 30. Kornberg, A. (1980). *DNA Replication*, W. H. Freeman, Co. Freeman, San Francisco, California.
 31. Lin, T.-C., Webster, R. E., and Konigsberg, W. (1980). *J. Biol. Chem.* 255, 10331-10337.
 32. Marvin, D. A., and Hohn, B. (1969). *Bacteriol. Rev.* 33, 172-209.
 33. Meyer, T. F., and Geider, K. (1979). *J. Biol. Chem.* 254, 12642-12646.
 34. Mitra, S., and Stallions, D. R. (1976). *Eur. J. Biochem.* 67, 37-45.
 35. Neel, B. C., Hayward, W. S., Robinson, H. L., Fang, J., and Astrin, S. M. (1981). *Cell* 23, 323-334.
 36. Payne, G. S., Courtneidge, S. A., Crittenden, L. B., Fadly, A. M., Bishop, J. M., and Varmus, H. E. (1981). *Cell* 23, 311-322.
 37. Pratt, D., and Erdahl, W. S. (1968). *J. Mol. Biol.* 37, 181-200.
 38. Ray, D. S. (1969). *J. Mol. Biol.* 43, 631-643.
 39. Ray, D. S. (1977). *Comprehensive Virology* 7, (Fraenkel - Conrat, H., and Wagner, R. R., eds.), Plenum Publishing Co., New York, pp. 105-178.
 40. Reddy, E. P., Reynolds, R. K., Santos, E., and Barbacid, M. (1982). *Nature* 300, 149-152.
 41. Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463-5467.
 42. Schaller, H., Beck, E., and Takamami, M. (1978). *The single-stranded DNA phages* (Denhardt *et al.*, eds.), Cold Spring Harbor Lab. Cold Spring Harbor, New York, pp. 139-163.
 43. Shen, C.-K. J., Ikoku, A., and Hearst, J. E. (1979). *J. Mol. Biol.* 127, 163-175.
 44. Simons, G. F. M., Konings, R. N. H., and Schoenmakers, J. G. G. (1979). *FEBS Lett.* 106, 8-12.
 45. Smits, M. A., Schoenmakers, J. G. G., and Konings, R. N. H. (1980). *Eur. J. Biochem.* 112, 309-321.

46. Staudenbauer, W. L., Olsen, W. L., and Hofschneider, P. H. (1973). *Eur. J. Biochem.* **32**, 247-253.
47. Suggs, S. V., and Ray, D. S. (1977). *J. Mol. Biol.* **110**, 147-163.
48. Tabak, H. F., Griffith, J., Geider, K., Schaller, H., and Kornberg, A. (1974). *J. Biol. Chem.* **249**, 3049-3054.
49. Tabin, C. J., Bradley, S. M., Bergmann, C. I., Weinberg, R. A., Papageorge, A. G., Scolnick, E. M., Dhar, R., Lowy, D. R., and Chang, E. H. (1982). *Nature* **300**, 143-149.
50. Tsuchida, N., Ryder, T., and Ohtsubo, E. (1982). *Science* **217**, 937-939.
51. Van Den Hondel, C. A., Pennings, L., and Schoenmakers, J. G. G. (1976). *Eur. J. Biochem.* **68**, 55-70.
52. Van Wezenbeek, P. M. G. F., Hulsebos, T. J. M., and Schoenmakers, J. G. G. (1980). *Gene* **11**, 129-148.
53. Wallace, R. B., Schold, M., Johnson, M. J., Demberk, P., and Itakura, K. (1981). *Nucl. Acids Res.* **9**, 3647-3656.
54. Webster, R. E., Grant, R. A., and Hamilton, L. A. W. (1981). *J. Mol. Biol.* **152**, 357-374.
55. Wickner, W., Brutlag, D., Schekman, R., and Kornberg, A. (1972). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69**, 965-969.
56. Zagursky, R. J., and Berman, M. L. (1984). *Gene* **27**, 183-191.