

Site-specific Mutagenesis에 의한 PRD1 DNA Polymerase의 활성부위 결정

황정원 · 정구홍

서울대학교 사범대학 생물교육학과

Determination of Active Site in PRD1 DNA Polymerase by Site-specific Mutagenesis

Hwang, Jungweon and Guhung Jung

Department of Biology Education, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

ABSTRACT: The PRD1 DNA polymerase is a small multi-functional enzyme containing conserved amino acid sequences shared by family B DNA polymerases. Thus the PRD1 DNA polymerase provides an useful model system with which to study structure-functional relationships of DNA polymerase molecules. In order to investigate the functional and structural roles of the highly conserved amino acid sequences, we have introduced three mutations into a conserved amino acid of the PRD1 DNA polymerase. Genetic complementation study indicated that each mutation inactivated DNA polymerase catalytic activity.

KEY WORDS □ DNA Polymerase, Structure-Function Analysis, Conserved Amino Acid

DNA내에는 유전정보가 저장되어 있으므로 DNA를 충실하게 복제하는 능력은 생명체에게 있어서 매우 중요한 과정이다. DNA polymerase는 주형 DNA에 대해 상보적인 dNTP를 primer에 결합시키는 효소로서, 아직도 밝혀지지 않은 면들이 많다. DNA polymerase를 연구하는 방법 중의 하나가 여러 DNA polymerase들의 아미노산 서열을 비교하여 보존된 아미노산 서열을 찾는 방법이다. 이 방법에 의해 발견된 아미노산들이 DNA polymerase의 활성에 필요불가결한 중요한 부위라는 여러 보고가 site-specific mutagenesis 실험결과들에 의해 제시되었다(Jung, *et al.*, 1990; Dorsky and Crumpacker, 1990; Bernad *et al.*, 1990).

DNA polymerase들의 5'→3' polymerasing 활성 부위의 상동성에 의해서 DNA polymerase를 family A, B, C 와 D 등으로 분류하였다(Jung *et al.*, 1987). *E. coli* Pol I과 5개의 부위에서 상동성을 보이고, 특히 DNA 결합부위에서 잘 보존되어 있는 DNA

polymerase를 family A라고 칭하며, 이와는 전혀 다른 4개의 보존된 부위를 갖는 DNA polymerase를 family B로 분류한다. Family B의 conserved region은 보존된 정도에 따라 I, II, III, IV로 명명되었다. 이들은 human DNA polymerase α를 포함하며, virus로부터 진행생물에 이르는 다양한 영역의 생명체에서 관찰된다(Bernad *et al.*, 1990). 기존의 연구에 비추어 볼때, conserved region I은 polymerasing active site로, region II와 III는 dNTP binding site로 추정되고 있다(Argos, 1988; Gibbs *et al.*, 1988; Knopf, 1987; Larder *et al.*, 1987).

PRD1의 DNA polymerase는 Family B의 DNA polymerase들 중 가장 작다(Jung *et al.*, 1988; Knopf, 1987; Larder *et al.*, 1987) PRD1은 여러 종류의 그람 음성 박테리아를 감염시키는 박테리오파아지이다(Mindich and Bamford, 1988) PRD1은 유전적, 생화학적 조작이 매우 용이하기 때문에 DNA polymerase 분자의 구조-기능 관계 연구에 알맞은 모델 시스템이다(Jung *et al.*, 1990). 본 연구에서는 DNA polymerase가 가지는 보존된 부위의 기능을 결정하기 위해, PRD1 DNA polymerase를 site-

이 논문은 1990년도 문교부 지원 한국학술진흥재단의 자유공모과제 학술연구조성비에 의하여 연구되었음.

directed mutagenesis 하였고, 그 결과 보존부위에서 돌연변이가 일어나면 DNA polymerase의 complementation 능력이 없어짐을 밝혔다.

재료 및 방법

사용균주

재조합 plasmid의 숙주로 *E. coli* NM522와 *E. coli* RZ1032[HfrK16, PO/45{*lysA*(61-61)}, *dut*, *ung1*, *thi1*, *relA1*](Kunkel, 1985)가 사용되었다. Phagemid expression vector인 pEMBLex3은 European Molecular Biology Laboratory로부터 얻었으며, *E. coli* HB94(*ram* A7, HfrH, Gal⁻, pLM2)와 mutant PRD1(*sus2*)는 Public Health Research Institute of the city of New York의 Dr. L. Mindich로부터 얻었다. Helper phage인 M13K07은 IBI로부터 구입하였다.

Computer 분석

핵산과 단백질 서열 분석 software system인 PC /Gene 내의 program PESEARCH를 사용하여 보존된 아미노산 지역을 찾았으며, 또한 보존된 아미노산을 직접 육안으로도 조사하였다(Moore *et al.*, 1988).

Site-directed Mutagenesis

Uracil을 포함한 single-stranded plasmid DNA (200 ng)와 인산화시킨 oligonucleotide를 20 mM Tris-HCl pH 7.4, 2 mM MgCl₂, 50 mM NaCl 완충액에 1:20의 비율로 섞었다. 이 혼합액을 65°C에서 30°C까지 1시간동안 점차적으로 식혀 annealing하였다. Kunkel(1985)의 방법에 따라 두번째 strand를 합성하였고, *E. coli* NM522에 형질전환시켰다. Plaque를 무작위로 선택한 후, 직접 염기서열을 조사하여 돌연변이체를 찾아 내었다.

Complementation Test

보존된 아미노산에 돌연변이가 일어난 DNA polymerase 유전자를 가진 plasmid들을 *E. coli* HB94 (pLM2)에 형질전환시켰다. pLM2 plasmid와 돌연변이된 DNA polymerase 유전자를 가진 plasmid, 두가지 모두를 가지는 대장균을 kanamycin (100 µg/ml)과 ampicillin (100 µg/ml)를 함유한 배지에서 선별하였다. Plasmid pLM2는 kanamycin으로 그리고 pEMBLex3는 ampicillin으로 선별된다. 돌연변이된 DNA polymerase 유전자를 가진 plasmid가 PRD1 (*sus2*)를 complement하는 능력을 조사하기 위해, PRD1 야생형 또는 PRD(*sus2*)를, pLM2와 여러 재조합 돌연변이 plasmid를 가지는 숙주위에 plating하였다. 이때, 모든 배지에 kanamycin (100 µg/ml)과 ampicillin (100 µg/ml)를 첨가하였다.

결 과

Family A와 B에서 공통적인 Conserved Region 발견

		Conserved region III	
Family A			
<i>E. coli</i> pol I	(749)	VTSEQRRS-	DA-1GQ-LIIMSAFQLA
<i>S. pneumoniae</i> pol I	(698)	VTANDRRN-	DA-VGTVVVISDFLS
<i>T. aquaticus</i> pol I	(654)	VDPLARR-	AI-TI-GVVLMSAHRLS
T5	(557)	LFPALR-	AI-DA-ITFLLIIM-SAPKVAHS
T7	(516)	D-TR-DN-	DTFI-YDFLLI-ADEKIL
SPO2	(432)	KGSPLR-	KG-VAEL-ALGQI-SGAL
yeast HIP1	(744)	SR-NE-	EIF-DYRILIM-AKAFAS
Family B			
maize S-1	(606)	AKGKALDFIY	ITM--LIRFII-SI
<i>A. immersus</i> pAI2	(940)	TPDDPNFYFI	ILLN--LIRFII-MDI
<i>C. purpurea</i> , pCIK1	(787)	NNVTEK-NI	ILLN--LIRFII-NIN
<i>K. lactis</i> pGK11	(775)	NNKVKR-NV-	ILIM--LWQFAQKVV
<i>K. lactis</i> pGK12	(760)	QPCCR-MV-	ILAL--GGQKE-VQKI
<i>S. cerevisiae</i> REV3	(1076)	RLLNK-LI-	LLAL-VT-IVYTSASFS
<i>S. cerevisiae</i> CDC2	(688)	DVLNGR-	LI-SISAS--VDFITATV
<i>S. cerevisiae</i> pol I	(934)	VQCDIR-	LI-LLTAS--M-VCLIVYNS
human pol α	(940)	LQYDIR-	KI-LLTAS--M-VCLIVSYS
HSV- I	(800)	AVLLDK-	QAIIVVCS--VDFITVQH
VZV	(764)	AVLLDK-	QAIIVVCS--VDFITVAQI
EBV	(670)	RTILDK-	QALICTOR-A-VDFITVAN
HCMV	(800)	RMLLKE-	QIVTCS-AF-VDFITVNV
PPV	(637)	TLYDSL-	IYIILIAS--VDFITVNS
VacV	(626)	AIYDS-	IYIIVAN--VDFITVFRNS
AdoNPV	(596)	DLYDQ-	QNSV-RTIAS--IYIYIFK
AdenoV-2	(686)	KNQTLR-	SI-LLS-A-LV-SFATKLD
T4	(547)	TLANTN-	LNRILIL--LVALNIHF
PRD1	(329)	KAGDLHNI	FYLIL--S-LWQFAQ-NI
φ29	(374)	SEGAIK-	LI-LLML--LWQFA-SNI
M2	(371)	EKGAK-	LI-LLML--LWQFA-SNI

Fig. 1. The conserved region shared by family A and B DNA polymerases. The numbers in parentheses indicate the first residue in each sequence. Identical residues are indicated in white letters. Related residues are shaded letters. Groups of amino acids taken to have similar side chain properties are: D and E; Y and F; S and T; L, I and V. Dashes (-) represent the absent of corresponding residues. The amino acid sequences of *Escherichia coli* DNA polymerase I (*E. coli* pol I), maize linear mitochondrial plasmid S-1 DNA polymerase (maize S-1), *Kluyveromyces lactis* linear killer plasmid pGK11 DNA polymerase (*K. lactis* pGK11), human DNA polymerase α (human pol α), Herpes simplex virus type 1 DNA polymerase (HSV-I), Adenovirus type 2 DNA polymerase (AdenoV-2), T4 DNA polymerase (T4), PRD1 DNA polymerase (PRD1), φ29 DNA polymerase (φ29) and M2 DNA polymerase (M2) were obtained from Matsumoto *et al.* (1989). The amino acid sequences of *Saccharomyces cerevisiae* DNA polymerase I (*S. cerevisiae* pol I), Epstein-Barr virus DNA polymerase (EBV), Human cytomegalovirus DNA polymerase (HCMV) and Vaccinia virus DNA polymerase (VacV) were obtained from Wang *et al.* (1989). The amino acid sequences of *Thermus aquaticus* DNA polymerase I (*T. aquaticus* pol I) and T7 DNA polymerase (T7) were obtained from Lawyer *et al.* (1989). The amino acid sequences of *Claviceps purpurea* linear mitochondrial plasmid pCIK1 DNA

polymerase (*C. purpurea* pCIK1) and *Kluyveromyces lactis* linear killer plasmid pGKI2 DNA polymerase (*K. lactis* pGKI2) were obtained from Oeser and Tudzynski (1989). The amino acid sequences of the DNA polymerase were obtained from the sources indicated: *Streptococcus pneumoniae* DNA polymerase I (*S. pneumoniae* pol I)(Lopez et al., 1989); T5 DNA polymerase (T5)(Leavitt and Ito, 1989); SPO2 DNA polymerase (SPO 2)(Raden and Rutberg, 1984); yeast *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial DNA polymerase MIPI (yeast MIP I)(Foury, 1989); *Ascobolus immersus* linear mitochondrial plasmid pAI2 DNA polymerase (*A. immersus* pAI2) (Kempken et al., 1989); *Saccharomyces cerevisiae* REV3(*S. cerevisiae* REV3)(Morrison et al., 1989); *Saccharomyces cerevisiae* DNA polymerase III large subunit CDC2(*S. cerevisiae* CDC2)(Boulet et al., 1989); *Varicella-Zoaster* virus DNA polymerase (VZV)(Davison and Scott, 1986); *Fowlpox* virus DNA polymerase (FPV)(Binns et al., 1987); *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus DNA polymerase (AcMNPV)(Tomalski et al., 1988).

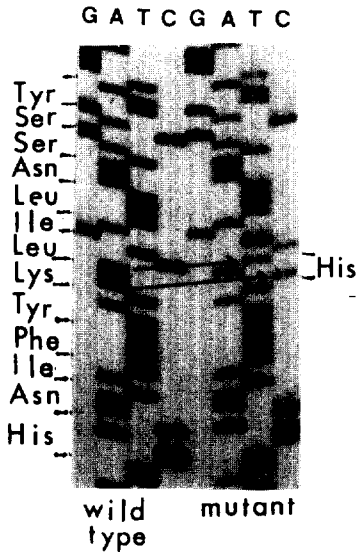


Fig. 2. DNA sequence of mutant (pEJG4) and wild-type clones in the region of mutation. Arrow indicates the mutated sequence.

Family A의 5개의 conserved region 중 N말단 으로부터 아미노산 서열상 세번째 부위와 family B 에서 conserved region III로 명명된 부위는 이제까지 서로 다른 family에서 다른 기능을 가지리라고 유추 되어 왔다. 그러나 이 두지역을 computer로 분석하였더니 같은 conserved region이라는 결과가 나왔다

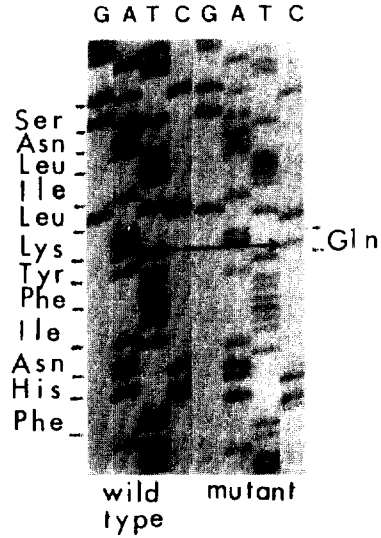


Fig. 3. DNA sequence of mutant (pEJG5) and wild-type clones in the region of mutation. Arrow indicates the mutated sequence.

(Fig. 1). 각각 다른 기작으로 family A와 B의 DNA polymerase가 DNA를 합성하리라고 기대되어 왔는데 두 family내에서 공유하는 conserved region의 발견은 두 family간의 DNA 합성기작에 공통점이 있다는 것을 시사한다.

Site-directed Mutagenesis에 의한 Mutant Polymerase 합성

Conserved region III가 family A와 B에 공통적으로 존재하므로 이 부위의 기능을 알아보기 위하여 이 부위에서 가장 보존된 lysine을 histidine, glutamine, glutamic acid로 치환하였다. Lysine은 (+)charge의 R group을 갖춘 아미노산인데 이것과 같은 charge를 갖는 것으로 histidine이 있다. 반면에 (-)charge를 가지는 아미노산으로 glutamic acid가 있으며 또한 charge는 없지만 polar인 R group을 가진 glutamine이 있다. 매우 잘 보존된 lysine을 histidine(Fig. 2), glutamine(Fig. 3), glutamic acid(Fig. 4)로 바꾸고 각각의 돌연 변이된 유전자를 가진 plasmid를 pEJG4(Lys→His), pEJG5(Lys→Gln), pEJG6(Lys→Glu)로 명명하였다.

Complementation Test

본 연구에서 만들어진 돌연변이 PRD1 DNA polymerase의 기능의 변화를 알아내기 위하여 돌연변이 DNA polymerase 유전자를 가진 plasmid가 bacteriophage PRD1(sus2)의 돌연변이를 complement하는 능력을 조사하였다. 이 PRD1(sus2) 돌연변이체는 DNA polymerase gene 안에 amber mutation을 가지고 있으므로 tRNA suppressor를 포함하지 않은 host cell내에서는 외부에서 PRD1 DNA polymerase가 제공되지 않는 한 viral

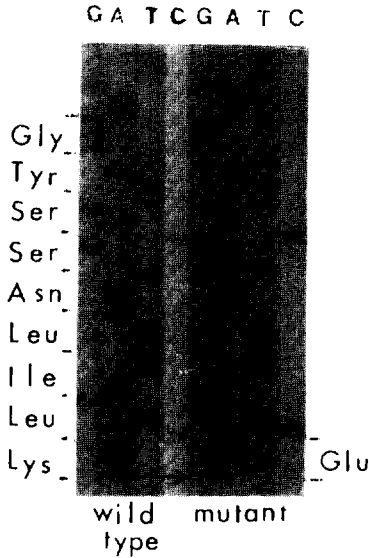


Fig. 4. DNA sequence of mutant (pEJG6) and wild-type clones in the region of mutation. Arrow indicates the mutated sequence.

replication을 할 수 없다. 이를 확인 하기 위하여 *sus*⁺ host인 *S. typhimurium* DB7156(pLM2)와 *sus*⁻ host *E. coli* HB94(pLM2)에 PRD1(*sus*2) 돌연변이체를 감염시켰다. 그 결과 *S. typhimurium* DB7156(pLM2)는 6.4×10^6 개의 plaque를 형성하는데 비하여 *E. coli* HB94(pLM2)는 9개의 plaque만을 형성하였다. 이러한 결과로부터 complementation test를 할 수 있음이 확인 되었다(Table 1). 한편 mutation의 효과에 대한 positive control로서 pEJG를 사용하였다. Plasmid pEJG는 DNA polymerase gene을 갖고 있는 expression vector이다(Jung *et al.*, 1990). PRD1 DNA polymerase의 conserved region에 mutation을 갖는 pEJG와 야생형의 DNA polymerase를 만드는 pEJG들을 각각 형질전환시켰을때 야생형의 DNA polymerase를 만드는 pEJG를 갖는 *E. coli* HB94(pLM2)에서만 PRD1(*sus*2) 돌연변이체가 많은 plaque를 형성하였고 pEJG4, pEJG5, pEJG6를 갖는 *E. coli* HB94(pLM2)에서는 plaque를 형성하지 못했다(Table 1).

이 실험에서 host는 모두 plasmid pLM2로 형질 전환되어있는 것을 사용했다. 그 이유는 PRD1은 pLM2를 포함하는 host cell만을 감염시키기 때문이다. 이것은 PRD1의 receptor가 이 plasmid 안의 유전자에 의하여 만들어지기 때문인 것으로 생각된다(Mindich and Bamford, 1988).

고 찰

현재까지 행한 DNA polymerase의 구조-기능 연

Table 1. Complementation of PRD 1 (*sus*2) Mutant Infection

Strain (Plasmid)	Number of plaque
<i>E. coli</i> HB94 (pLM2)	9
<i>S. typhimurium</i> DB7156 (pLM2)	6.4×10^6
<i>E. coli</i> HB94 (pEJG, pLM2)	7.6×10^7
<i>E. coli</i> HB94 (pEJG4, pLM2)	6
<i>E. coli</i> HB94 (pEJG5, pLM2)	4
<i>E. coli</i> HB94 (pEJG6, pLM2)	11

구에 의하면, 5'→3' polymerase 활성부위의 conserved region은 family A와 family B에서 각각 독자적으로 보존되어 있다고 알려져 왔다(Bernad *et al.*, 1989). Family A에 대한 연구는 주로 *E. coli* pol I에 의해 이루어졌다. Pol I과 dNTP analogue와의 결합연구로부터 Lys758과 Tyr766이 dNTP와의 결합 자리라는 것이 밝혀졌는데(Steitz *et al.*, 1987), 이 두 아미노산은 family A에서의 5개의 conserved region들 중 N말단으로부터 세번째의 지역내에 위치한 잘 보존된 아미노산들이다. Family B에서도 dNTP 결합에 관여하는 지역들이 존재한다는 사실이 drug에 대해 감수성이 변형된 Herpes simplex virus DNA polymerase 돌연변이체들의 유전적 분석에 의해 유추될 수 있었다. 즉, dNTP analogue에 대해 감수성 변화를 나타내는 point mutation들이 conserved region II와 III에 집중되어 나타나고 있음으로부터 이 지역들이 dNTP 결합에 관여한다는 것을 간접적으로 추측할 수 있었다(Gibbs *et al.*, 1988; Knopf, 1987; Larder *et al.*, 1987).

본 연구에서는 같은 기능을 갖는 family A에서의 세번째 conserved region과 family B의 conserved region III의 아미노산 서열을 비교한 결과, 이 두 지역이 공통된 하나의 conserved region임을 발견하였다(Fig. 1).

기능에 필수적인 부위는 관련된 단백질들내에서 변화에 대한 저항성을 가져 아미노산 서열이 보존되기 때문에, 고도로 보존된 지역일수록 그 단백질의 기능에 깊이 관계한다고 볼 수 있다. 이러한 개념에 근거하여, family A와 Family B의 DNA polymerase들내에서 모두 보존되어 나타나는 Lys(*E. coli* pol I에서의 Lys758)을 PRD1 DNA polymerase를 사용하여 site-directed mutation시켰다(Fig. 2-4). Complementation test 결과, 변형된 DNA polymerase들은 기능하지 못함을 알 수 있었다(Table 1).

하나의 아미노산만을 변형시키는 site-directed mutagenesis는 야생형과 돌연변이체 사이에서 3차원적인 구조의 차이를 거의 일으키지 못한다. 본 연구에서 Lys를 Lys과 같은 (+)charge를 갖는 His으로 변형시켰을 때에도 DNA polymerase가 자신의 기능을 나타내지 못했다는 것은, DNA polymerase의 기능 소멸이 전체적인 3차구조의 변형에 의해서가

아닌, 필요불가결한 아미노산의 변화로부터의 결과임을 입증한다.

Lys은 (+)charge를 띠어 (-)charge를 띠는 dNTP의 phosphate backbone과 정전기적 인력으로 작용할 수 있다. 이러한 이유로 Lys은 ATP, GTP, purine NTP binding motif내에 보존되어 나타난다 (Higgins *et al.*, 1986; Fry, 1986; Dever, 1987; Gorbalenya and Koonin, 1989). 또한 Tyrosine kinase의 경우, Lys이 phosphate group을 Tyr으로

phosphotransfer하는데 직접 참여한다는 보고가 있다 (Weinmaster *et al.*, 1986).

이로부터 Lys은 dNTP 결합에 필수적인 아미노산이며 본 연구에서 발견한 conserved region은 DNA polymerase와 dNTP 결합에 관여하는 기능자리임을 추측할 수 있다. 또한 이는 아미노산 서열 비교로부터 발견된 conserved region이 효소의 활성화에 필수불가결한 기능적인 자리임을 나타내는 증거가 될 수 있다.

적 요

PRD1 DNA polymerase는 다른 종류의 DNA polymerase에 비하여 크기가 매우 작고 여러 기능을 가진 효소로서, family B DNA polymerase들이 공유하는 보존된 아미노산 서열을 갖고 있다. 따라서 PRD1 DNA polymerase는 DNA polymerase의 구조-기능 관계 연구에 유용한 model system이다. 보존된 아미노산 서열의 기능과 구조적인 관계를 조사하기 위하여 PRD1 DNA polymerase에서 잘 보존된 아미노산을 3가지 다른 종류의 아미노산으로 돌연변이시켰다. Complementation 실험결과, 돌연변이된 DNA polymerase의 효소 활성이 제거되었다.

참 고 문 헌

1. Argos, P., 1988. A sequence motif in many polymerase. *Nucleic Acids Res.*, **16**: 9909-9916.
2. Bernard, A., L. Blanco, J.M. Lazaro, G. Martin and M.A. Salas, 1989. Conserved 3'→5' exonuclease active site in prokaryotic and eukaryotic DNA polymerases. *Cell* **59**: 219-228.
3. Bernad, A., J.M. Lazaro, M. Salas and L. Blanco, 1990. The highly conserved a.a. sequence motif Tyr-Gly-Asp-Thr-Asp-Ser in α -like DNA polymerase is required by phage ϕ 29 DNA polymerase for protein-primed initiation and polymerisation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **87**: 4610-4624.
4. Binns, M.M. and L. Stenzler, F.M. Tomley, J. Campbell and M.E.G. Bournnell, 1987. Identification by a random sequencing strategy of the fowlpoxvirus DNA polymerase gene, its nucleotide sequence and comparison with other viral DNA polymerase. *Nucleic Acids Res.*, **15**: 6563-6573.
5. Boulet, A., M. Simon, G. Foye, G. Bauer and P.M. J. Burgers, 1989. Structure and function of the *S. cerevisiae* CPC2 gene encoding the large subunit of DNA polymerase III. *EMBO J.*, **8**: 1849-1854.
6. Davison, A.J. and J.E. Scott, 1986. The complete DNA sequence of Varicella-Zoaster virus. *J. Gen. Virol.* **67**: 1759-1816.
7. Dever, T.E., M.J. Glynnias and W.C. Merrick, 1987. GTP-binding domain: Three consensus sequence elements with distinct spacing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **84**: 1814-1818.
8. Dorsky, D.I. and C.S. Crumpacker, 1990. Site-specific mutagenesis of a highly conserved region of the Herpes Simplex Virus typel DNA polymerase gene. *J. Virol.*, **64**: 1394-1397.
9. Foury, F., 1989. Cloning and sequencing of the nuclear gene *MIP1* encoding the catalytic subunit of the yeast mitochondrial DNA polymerase. *J. Biol. Chem.*, **264**: 20552-20560.
10. Fry, D.C., S.A. Kuby and A.S. Mildvan, 1986. ATP-binding site of adenylate kinase: Mechanistic implications of its homology with *ras*-encoded p21, F₁-ATPase and other nucleotide-binding proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **83**: 907-911.
11. Gibbs, J.S., H.C. Chiou, K.F. Bastow, Y-C. Cheng and C.M. Coen, 1988. Identification of amino acids in herpes simplex virus DNA polymerase involved in substrate and drug recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **85**: 6672-6676.
12. Gorbalenya, A.E. and E.V. Koonin, 1989. Viral proteins containing the purine NTP-binding sequence pattern. *Nucleic Acids Res.*, **17**: 8413-8441.
13. Higgins, C.F., I.D. Hiles, G.P.C. Salmond, D.R. Gill, J.A. Downie, I.J. Evans, B. Holland, L. Gray, S.D. Buckel, A.W. Bell and M.A. Hermodson, 1986. A family of related ATP-binding subunits coupled to many distinct biological processes in bacteria. *Nature*, **323**: 448-450.
14. Jung, G., M.C. Leavitt, J.C. Hsieh and J. Ito, 1987. Bacteriophage PRD1 DNA polymerase: Evolution of DNA polymerases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **84**: 8287-8291.
15. Jung, G., M.C. Leavitt, M. Schultz and J. Ito, 1990. Site specific mutagenesis of PRD1 DNA polymerase mutations in highly conserved region of the family B DNA polymerase. *J. Biochem. Biophys. Res. Com.*, **170**: 1294-1300.
16. Kempken, F., F. Meingardt and K. Esser, 1989. *In organello* replication and vital affinity of linear,

- extrachromosomal DNA of the ascomycete *Ascobolus immersus*. *Mol. Gen. Genet.* **218**: 523-530.
17. Knopf, C.W., 1987. The Herpes simplex virus type 1 DNA polymerase gene: site of phosphonoacetic acid resistance mutation in strain angelotti is highly conserved. *J. Gen. Virol.*, **68**: 1429-1433.
 18. Kunkel, T.A., 1985. Rapid and Efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **83**: 488-492.
 19. Larder, B.A., S.D. Kemp and G. Darby, 1987. Related functional domains in virus DNA polymerase. *EMBO J.* **6**: 169-175.
 20. Lawyer, F.C., S. Stoffel, R.K. Saiki, K. Myamno, R. Drummond and D. H. Gelfand, 1989. Isolation, Characterization and expression in *E. coli* of the DNA polymerase gene from *Thermus aquaticus*. *J. Biol. Chem.*, **264**: 6427-6437.
 21. Leavitt, M.C. and J. Ito, 1989. T5 DNA polymerase; structure-functional relationships of DNA polymerases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **86**: 4465-4469.
 22. Lopez, P., S. Martinez, A. Diaz, M. Espinosa and S.A. Lacks, 1989. Characterization of the polA gene of *Streptococcus pneumoniae* and comparison of the DNA polymerase I it encodes to homologous enzyme from *E. coli* and phage T7. *J. Biol. Chem.*, **264**: 4255-4263.
 23. Matsumoto, K., H. Takano, C.I. Kim and H. Hirokawa, 1989. Primary structure of bacteriophage M2 DNA polymerase: conserved segments within protein-priming DNA polymerases and DNA polymerase I of *E. coli*. *GENE*, **84**: 247-255.
 24. Mindich, L. and D.H. Bamford, 1988. "The bacteriophage" (Calender, R. Ed), Plenum Publishing Corp., New York. Vol II, pp. 149-262.
 25. Moore, J., A. Engelberg and A. Bairoch, 1988. Using PC/GENE for protein and nucleic acid analysis. *Biotechniques*, **6**: 566-572.
 26. Morrison A., R.B. Christensen, J. Alley, A.K. Beck, E.G. Bernstine, J.F. Lemontt and C.W. Lawrence, 1989. REV3 a *Saccharomyces cerevisiae* gene whose function is required for induced mutagenesis, is predicted to encode a nonessential DNA polymerase. *J. Bacteriology*, **171**: 5659-5667.
 27. Oeser, B. and P. Tudzynski, 1989. The linear mitochondrial plasmid pCIK1 of the phytopathogenic fungus *Claviceps purpurea* may code for a DNA polymerase and an RNA polymerase. *Mol. Gen. Genet.* **217**: 132-140.
 28. Raden, B. and L. Rutberg, 1984. Nucleotide sequence of the temperate *Bacillus subtilis* bacteriophage SPO2 DNA polymerase gene. *J. Virol.*, **52**: 9-15.
 29. Steitz, T.A., L. Beese, P.S. Freemont, J.M. Friedman and M. R. Sanderson, 1987. "Structure studies of klenow fragments an enzyme with two active sites", Cold spring harbor symposia on quantitative biology Vol. VII, pp. 465-470.
 30. Tomalski, M.D., J. Wu and L.K. Miller, 1988. The location, sequence, transcription and regulation of a baculovirus DNA polymerase gene. *Virology*, **167**: 591-600.
 31. Wang, T.S.F., S.W. Wong and D. Wong and D. Korn, 1989. Human DNA polymerase α : predicted functional domains and relationships with viral DNA polymerase. *FASEB Journal*, **3**: 14-21.
 32. Weinmaster, G., M.J. Zuller and T. Pawson, 1986. A lysine in the ATP-binding site of P130^{src-1ps} is essential for protein-tyrosine kinase activity. *EMBO J.* **5**: 69-76.

(Received September 2, 1991)

(Accepted September 13, 1991)