4-Nitroquinoline 1-Oxide により誘発された呼吸欠損変異酵母のミトコンドリア DNA の異常

福長 将仁¹・森田 全²・三沢 一二²

¹産業医科大学医療技術短期大学微生物学教室 ²静岡薬科大学微生物学教室

要 旨: 発癌化合物 4-nitroquinoline 1-oxide によって誘発された呼吸欠損変異酵母のミトコンドリア DNA の変化について検討した. 変異株のミトコンドリア DNA の浮遊密度および融解温度はともに正常酵母の場合より低下しており, 融解曲線も単純であり, 再生率 (renaturation rate) は正常酵母のそれに対してかなり高い値を示した. 化学分析による塩基組成の測定では, 変異株ミトコンドリア DNA の GC 含量が 4 NQO の作用時間と相関して低下し, 最も低いものは正常酵母の約 1/4 であった.

(1980 年 3 月 31 日 受付)

序 論

酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) は好気条件下では呼吸, 嫌気条件下では解糖により増殖できる真核細胞であるが, 遺伝的に呼吸のみを欠いた呼吸欠損 (Respiration-deficient, RD) 変異酵母の存在が知られている. この RD 変異については古くから生化学的・遺伝学的研究が行われており, その結果 RD 変異には核性および細胞質性があり, 前者は核 DNA の変異後者は細胞質因子, つまりミトコンドリア遺伝子の変異によることが解っている (Bernardi *et al.*, 1968, 1970; Grossman *et al.*, 1968; Goldring *et al.*, 1970). 酵母はミトコンドリア遺伝子の変異あるいは, 欠損がおこっても解糖によって増殖可能であり, DNA と種々の化学物質との相互作用を研究するのに適している.

近年, 微生物を使つての変異誘発剤の一次スクリーニングが行われ効果をあげているが, そのほとんどが細菌の核性変異に関する実験で, 真核細胞, およびミトコンドリア DNA に関する研究は殆んどみられない.

Mifuchi *et al.* (1963), Morita (1971) は, 発癌剤である 4-nitroquinoline 1-oxide (4NQO) が酵母に細胞質性の呼吸欠損変異を誘発し, また 4NQO 関連化合物の変異誘発性は発癌性と平行関係があることを報告している. また細胞質性の抗生物質耐性 (ミト

コンドリア DNA の変異による) 変異株での実験から 4NQO はミトコンドリア DNA の部分的欠失または欠損をおこすこと (Fukunaga, 1977; Fukunaga *et al.*, 1978) が明らかである. このような事実に基づいて著者らは 4NQO の酵母ミトコンドリア DNA に対する損傷の過程を追究する目的で, 経時的な 4NQO の作用によって誘発された RD 変異酵母ミトコンドリア DNA の物理的性質を, DNA の融解, 密度および GC 含量等の変化の面から検討した.

材料および方法

1. 使用菌株

正常酵母として diploid の *Saccharomyces cerevisiae* IFO 0209 株を用いた. また RD 変異酵母として, 正常酵母に 10^{-6} M 4NQO を 1 時間作用させて得られた N-012, 016 株, 5 時間作用させて得られた N-051, 052 株および, 22 時間作用させた得られた N-221 株を用いた.

2. 培養およびミトコンドリア DNA の調製

酵母は Ogur 液体培地 (Ogur & John, 1956) 50 ml で 30°C 一夜前培養した後 20 l の同培地で通気培養 (1-2 日) を行った. 細胞は遠心集菌, 水洗後 saline EDTA (0.15 M NaCl, 0.1 M EDTA, pH 8.0) に懸濁し, Braun Homogenizer で菌体破壊を行った.

ミトコンドリア画分の調製, DNase 処理による核 DNA の分解除去およびミトコンドリア DNA の抽出については, 他に示した方法 (Nagly & Linnane, 1970; Morita *et al.*, 1975) によって行い, ミトコンドリア DNA は融解温度の測定および塩基組成の分析に用いた。

3. DNA の融解温度の測定

ミトコンドリア DNA を, SSC (0.15 M NaCl, 0.015 M sodium citrate, pH 7.0) に OD 260 nm が約 1.0 になるように溶解し, 減圧下抜気し, 栓付石英セルに入れ, 日立 EPS-3T により吸光度の変化を測定した (Fukunaga, 1977). 温度の上昇および下降は毎分 0.5°C とし, T_m (melting temperature) 値の算出には, calf-thymus DNA ($T_m=87.0^\circ\text{C}$, Marmur & Doty, 1962) を内部標準として用いた。

4. 塩基組成の分析

ミトコンドリア DNA 1 mg に 500 μl の 98% ギ酸を加え減圧封管し 175°C 30 分間加熱した後, 開管し内容物を減圧下蒸発乾固した。分解生成物は 1 N 塩酸 50 μl で抽出し, ペーパークロマトグラフィーによる分離に供した。ロ紙は, 0.1 N 塩酸であらかじめ洗浄した Whatman No. 1 (50×50 cm) を用い, メタノール: 35% 塩酸: 水 (70: 17: 13) で展開した。展開後ロ紙は風乾し, 紫外線を吸収する部位を切り取り, 0.1 N 塩酸 3 ml で抽出, 吸光度より塩基量を算出した (Chargaff & Davidson, 1955)。以上の実験においての塩基の回収率は全リン量の定量 (Allen, 1940) によってしるべ, 90% 以上の回収率の場合の結果のみを採用した。

5. ミトコンドリア DNA の密度の測定

Yeast Nitrogen Base 培地 (Difco) に 1% ブドウ糖を加えた培地 10 ml に酵母を 10^6 cell/ml となるように接種し, 対数増殖中期まで 30°C で培養した。DNA への ^3H -uracil ($6[^3\text{H}]$ -uracil, 28 Ci/mmol) の取り込みにはミトコンドリア DNA への取り込みを優先させるために Grossman *et al.* (1968) の方法によりシクロヘキシミド存在下で行った。この試料に ^3H -uracil でラベルした正常酵母培養液 ($[^3\text{H}]$ uracil 5 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ 存在下 30°C 12 時間培養) 0.3 ml を加えて以下の実験に供した。菌体は遠心集菌後, 細胞壁溶解酵素 Zymolyase (キリンビール) でプロトプラストとし (Wakabayashi, 1978), 1% Sarcosyl で溶菌させ塩化セシウム密度勾配遠心を行った後, 分画, 密度の測定および

各分画の放射活性の測定を行った。密度の測定には 5 分画ごとの 100 μl の重量を計り, 核 DNA (^3H 放射活性, 1.700 g/ml) と, *Micrococcus lysodeikticus* DNA (OD 260 nm, 1.731 g/ml) の 2 つのマーカーによって補正した。

実験結果

1. ミトコンドリア DNA の融解曲線および融解温度

正常酵母ミトコンドリア DNA の融解曲線を Fig. 1 に示した。DNA の融解は 75°C 付近から徐々に起こ

Fig. 1. Thermal absorbance profile of mitochondrial DNA from normal yeast.

Mitochondrial DNA from normal yeast was denatured (—) or renatured (----) in SSC. Relative absorbancy is the ratio of extinction of temperature T to extinction at 25°C.

Fig. 2. Thermal absorbance profiles of mitochondrial DNA from respiration-deficient mutants N-012 (A) and N-016 (B).

Mitochondrial DNA from respiration-deficient mutants N-012 (A) and N-016 (B) were measured. Comments are the same as in Fig. 1.

りほぼ 90°C 近くまで続いた. この正常酵母の 260 nm における吸光度の上昇は RD 変異株も含めて約 40% であったが, その上昇の過程にはかなりの差異が認められ, calf thymus DNA の場合のように対称な S 字型の融解曲線とはならなかった. RD 変異株についての結果の一例を Fig. 2 に示したが, この場合も融解は一様でなく徐々におこった. しかし, RD 変異株の場合には正常酵母に比べてかなり単純であり特に高い温度 (80°C 以上) で融解する部分が殆んど認められなかった.

DNA 溶液を徐々に冷却した場合の曲線 (renaturation) が破線で示してある. この renaturation の度合いは RD 変異株の方がその割合が大きく, ミトコンドリア DNA の単純化が推察された. . この再生率 (renaturation rate) をまとめて Table 1 に示した. この場合には, 全ての RD 変異株において正常酵母の場合よりも高く, また 4NQO の作用時間の長いもの程高くなっていく傾向が見られた. これらの融解曲線から 50% 融解温度, T_m 値を算出して Table 1 にまとめた. これらの数値はそれぞれの株について 5 回以上行い, calf thymus DNA を内部標準 (87°C in SSC) として補正したものである. これによると正常酵母の T_m 値は 79.0°C であり RD 変異株の場合は全てそれより低い値であり, この場合にも 4NQO の作用時間との相関が認められた.

2. ミトコンドリア DNA の密度の変化

塩化セシウム密度勾配遠心法による酵母ミトコンドリア DNA の密度測定の結果を Fig. 3, 4 に示した.

Table 1. Melting temperature and renaturation rate of mitochondrial DNA from normal yeast and cytoplasmic respiration-deficient mutants

Strain	$T_m^*(^{\circ}\text{C})$	Renaturation rate (%)
Normal yeast	79.0 $\pm$ 0.1	76
RD mutants		
N-012	76.0 $\pm$ 0.4	81
N-016	75.1 $\pm$ 0.3	82
N-051	74.7 $\pm$ 0.2	82
N-052	73.9 $\pm$ 0.0	89
N-221	74.0 $\pm$ 0.2	92

* T_m : Temperature at which half of the total absorbancy increase at 260 nm in SSC occurred.

正常酵母のミトコンドリア DNA の含量は 10–20% (全 DNA 量に対して) である (Bernardi *et al.*, 1968, 1970; Fukuhara, 1969) ので通常核 DNA に対して小さいピークとして検出される. ここに結果は示さないが, シクロヘキシミド存在下では, 核 DNA への ^3H -uracil の取り込みは抑えられて核, ミトコンドリア DNA の放射活性のピークは逆転した. 本実験では

Fig. 3. Cesium chloride density gradient profile of DNA from normal yeast.

Normal yeast DNA was labeled with ^3H -uracil in the presence of cyclohexamide for 4 hrs. Gradient is from left (bottom) to light (top). The arrow indicates the point of *Micrococcus lysodeikticus* DNA (1.731 g/ml) used as a density marker.

Fig. 4. Cesium chloride density gradient profile of DNA from respiration-deficient mutant N-012.

Respiration-deficient mutant N-012 was analyzed. Comments are the same as in Fig. 3.

Table 2. Buoyant density of mitochondrial DNA from normal yeast and cytoplasmic respiration-deficient mutants

Strain		Buoyant density (g/ml)
Normal yeast		1.683±0.000
RD mutants	N-012	1.680±0.001
	N-016	1.680±0.001
	N-051	1.678±0.001
	N-052	1.678±0.001
	N-221	1.680±0.001

M. lysodeikticus (1.731 g/ml at 260 nm) の他に核 DNA もマーカーとして使用するために、マイクロヘキシミド非存在下でラベルした酵母細胞を加えて実験を行った。この場合明確なミトコンドリア DNA のピークが検出され、密度をより正確に算出できる。塩化セシウム密度勾配遠心による密度測定の結果、正常酵母のミトコンドリア DNA の密度は 1.683 g/ml であったのに対し RD 変異酵母 N-012 株では 1.680 g/ml に低下していた。図中の 1.700 g/ml の放射活性を示すピークは核 DNA によるものであり、1.731 g/ml の矢印はマーカーとして加えた *Micrococcus lysodeikticus* DNA による 260 nm の吸収ピークを示したものである。このような正常酵母および RD 変異酵母ミトコンドリア DNA の密度測定の結果をまとめて Table 2 に示した。RD 変異酵母ミトコンドリア DNA の密度は正常酵母の場合より低下して 1.680 g/ml 前後の値を示したが、 T_m 値の場合のように 4NQO の作用時間との相関は認められず、全て標準偏差値内にとどまり、有意の差はみられなかった。

3. ミトコンドリア DNA の塩基組成の化学分析

正常酵母および 4NQO によって誘発された種々の RD 変異酵母のミトコンドリア DNA の GC 含量の測定を行い結果を Table 3 にまとめた。正確を期すために、各株についてそれぞれ培養、ギ酸分解、ペーパークロマトグラフィーによる分離を変えて実験を行った。また塩基の回収率が 90% 以下のものは除外した。

各株のミトコンドリア DNA の塩基組成は、培養、ギ酸分解、ペーパークロマトグラフィーによる分離の違いによって有意の差は認められず、プリン/ピリミジン比も誤差は 2% 以内であった。

正常酵母ミトコンドリア DNA の GC 含量は、核 DNA 38.2% (Marmur & Doty, 1962; Meyer & Phaff, 1969; Tewari *et al.*, 1966) に比べてかなり低く 22.3% であった。

一方 RD 変異酵母のミトコンドリア DNA では、4NQO 1 時間処理でえられた N-012 および N-016 株では、正常酵母の約 50% にあたる 12% 前後に低下していた。4NQO 5 時間処理で得られた N-051 株ではさらに低下し 8.6%, N-052 株では 5.9% であった。また 4NQO 22 時間処理で得られた N-221 株では 5.5% と正常酵母の約 1/4 に低下し、4NQO の作用時間が長くなるに従ってミトコンドリア DNA の GC 含量が低下していく傾向が認められた。

考 察

4NQO によって誘発された呼吸欠損変異酵母のミトコンドリア DNA の密度、融解温度の測定の結果、いずれの場合も正常酵母より低下し、また、化学分析では GC 含量の大幅な減少が認められた。これらの融解温度を Marmur-Doty (1962) の式に、密度は DeLey

Table 3. Summarized data of base composition of mitochondrial DNA from normal yeast and mutants

Strain		Ade	Thy	Gua	Cyt	A+T content	G+C content
Normal yeast		38.8±0.5	38.9±0.3	11.0±0.2	11.3±0.5	77.6±0.4	22.3±0.4
RD mutants	N-012	43.9±0.4	44.2±0.4	6.0±0.2	5.9±0.2	88.1±0.1	11.9±0.1
	N-016	44.0±0.6	44.1±0.5	5.9±0.2	6.1±0.2	88.0±0.1	12.0±0.1
	N-051	45.7±0.4	45.7±0.4	4.3±0.2	4.4±0.3	91.4±0.3	8.6±0.3
	N-052	47.1±0.4	47.0±0.4	2.8±0.3	3.0±0.2	94.2±0.2	5.9±0.2
	N-221	47.1±0.6	47.6±0.9	2.7±0.2	2.8±0.2	94.4±0.3	5.5±0.3

Table 4. Comparison of G+C contents of mitochondrial DNA calculated from melting temperature, buoyant density and chemical analysis

Strain		G+C contents calculated from		
		Melting temperature	Buoyant density	Chemical analysis
Normal yeast		23.7	22.9	22.3
RD mutants	N-012	16.3	19.8	11.9
	N-016	14.2	19.8	12.0
	N-051	13.2	17.8	8.6
	N-052	11.2	17.8	5.9
	N-221	11.5	19.8	5.5

(1970) の式にあてて GC 含量を計算し、化学分析の結果と比較するために Table 4 にまとめて示した。正常酵母ミトコンドリア DNA では三者共にほぼ同じ値であったが、変異株では大幅に違っていた。

密度については変異株ミトコンドリア DNA の GC 含量が異常に低いことやその立体構造の特殊性 (Hollenberg *et al.*, 1972) のために密度と GC 含量が相関しないものと考えられる。

正常酵母ミトコンドリア DNA の融解曲線は核 DNA や Calf-thymus DNA の場合と異なりいくつかの変換点が認められ、このことは DNA の GC 含量の不均等分布に起因するものと考えられる (Prunell & Bernardi, 1974; Prunell *et al.*, 1977; Piperno *et al.*, 1972)。変異株の融解曲線では同様の傾向が認められたが、正常酵母よりは単純であり、特に高い温度で融解する部分の消失とともに融解温度 (50% 融解) の低下が認められた。この融解温度から算出した GC 含量も化学分析の結果とかなり違っていたがその原因については不明である。また、DNA の再生率については変異株はいずれも高く、4NQO の作用時間と平行関係を示した。この再生率の上昇は GC 含量の減少のみならず塩基分布のかたよりにも関係している。

このような結果から、4NQO は酵母ミトコンドリア DNA の GC に富んだ部分の欠失を起こすものと考え

られる。4NQO が塩基のうちグアニンに作用し変異を起こすことがファージ (Ishizawa & Endo, 1970)、酵母の核 DNA (Prakash *et al.*, 1974) 等で確かめられており、また 4NQO を活性化して核酸、蛋白と結合させる酵素反応が Tada & Tada (1976) によって報告されている。

酵母の細胞質性呼吸欠損変異は種々の薬剤によって起こされるが、その殆んど全ての場合にミトコンドリア DNA の欠失を伴っており、しかも欠失した部分は他の遺伝子のくり返しが起こることによって元の分子量の DNA を維持するようなメカニズムの存在が知られている (Saccone & Kroon, 1976; Bandlow *et al.*, 1977; Gaillard & Bernardi, 1979; Zamaroczy *et al.*, 1979)。

また薬剤耐性酵母を用いた実験で、24 時間という長時間の 4NQO の作用によっても遺伝的に機能する遺伝子が残存しているという事実 (Fukunaga *et al.*, 1978) から、わずか 5.5% (N-221) という GC 含量しか持たないミトコンドリア DNA でも GC 対に富んだ部分と、AT 対よりなる部分のくり返しにより構成されていると考えられる。しかしながら、4NQO が酵母ミトコンドリア DNA をどのような機構で欠失させるのかについてはなお不明である。

References

- Allen, R. J. L. (1940): The estimation of phosphorus. *Biochem. J.*, 34: 858-865.
 Bandlow, W., Schweyen, R. J., Wolf, K. *et al.* (1977): *Mitochondria 1977, Genetics and biogenesis of mitochondria.* Walter de Gruyter, Berlin.
 Bernardi, G., Carnevali, F., Nicolaieff, A. *et al.* (1968): Separation and characterization of a

- satellite DNA from a yeast cytoplasmic "petite" mutant. J. Mol. Biol., 37: 493-505.
- Bernardi, G., Faures, M., Piperno, G. *et al.* (1970): Mitochondrial DNA's from respiratory-sufficient and cytoplasmic respiratory-deficient mutant yeast. J. Mol. Biol., 48: 23-42.
- Carnevali, F. & Leoni, L. (1972): Intramolecular heterogeneity of yeast mitochondrial DNA. Biochem. Biophys. Res. Commun., 47: 1322-1331.
- Chargaff, E. & Davidson, J. N., *ed.* (1955): The Nucleic Acids. Vol. I. Academic Press, New York.
- DeLey, J. (1970): Reexamination of the association between melting point, buoyant density, and chemical base composition of deoxyribonucleic acid. J. Bacteriol., 101: 738-754.
- Fukuhara, H. (1969): Relative proportions of mitochondrial and nuclear DNA in yeast under various conditions of growth. Eur. J. Biochem., 11: 135-139.
- Fukunaga, M. (1977): Abnormality of yeast mitochondrial DNA by 4-nitroquinoline 1-oxide. Thesis for the doctorate, Shizuoka College of Pharmacy, Shizuoka.
- Fukunaga, M., Morita, T. & Mifuchi, I. (1978): Loss and retention of mitochondrial drug resistance in rho-mutants of yeast induced by 4-nitroquinoline 1-oxide and ethidium bromide. J. Gen. Appl. Microbiol., 24: 215-222.
- Fukunaga, M. & Yielding, K. L. (1979): Fate during cell growth of yeast mitochondrial and nuclear DNA after photolytic attachment of the monoazid analog of ethidium. Biochem. Biophys. Res. Commun., 90: 582-586.
- Gaillard, C. & Bernardi, G. (1979): The nucleotide sequence of the mitochondrial genome of a spontaneous "petite" mutant of yeast. Molec. Gen. Genet., 174: 335-337.
- Goldring, E. S., Grossman, L. I., Krupnick, D. *et al.* (1970): The petite mutation in yeast. Loss of mitochondrial deoxyribonucleic acid during induction of petites with ethidium bromide. J. Mol. Biol., 52: 323-335.
- Grossman, L. I., Goldring, E. S. & Marmur, J. (1968): Preferential synthesis of yeast mitochondrial DNA in the absence of protein synthesis. J. Mol. Biol., 46: 367-376.
- Hollenberg, C. P., Borst, P., Flavell, R. A. *et al.* (1972): The unusual properties of mit DNA from a "low-density" petite mutant of yeast. Biochim. Biophys. Acta, 277: 44-58.
- Ishizawa, M. & Endo, H. (1970): Mutagenic effect of a carcinogen, 4-nitroquinoline 1-oxide in bacteriophage T4. Mutation Res., 9: 134-137.
- Marmur, J. & Doty, P. (1962): Denaturation of the base composition of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature. J. Mol. Biol., 5: 109-118.
- Meyer, S. A. & Phaff, H. I. (1969): Deoxyribonucleic acid base composition in yeasts. J. Bacteriol., 97: 52-56.
- Mifuchi, I., Morita, T., Yanagihara, Y. *et al.* (1963): Induction of respiration deficient mutant of *Saccharomyces cerevisiae* by carcinogenic agent, 4-nitroquinoline 1-oxide and the toxohormonelike factor in the mutant. Japan. J. Microbiol., 7: 69-79.
- Morita, T. (1971): Studies on induction of respiration-deficient mutants of yeast by 4-nitroquinoline 1-oxide. Fukuoka Acta Medica, 62: 760-777.
- Morita, T., Fukunaga, M. & Mifuchi, I. (1975): Loss of mitochondrial DNA in respiration deficient mutant of yeast induced by 4-nitroquinoline 1-oxide. Gann, 66: 697-700.
- Morita, T. & Yielding, K. L. (1978): Photolytic binding of the monoazide analog of ethidium to yeast mitochondrial DNA. Competition by ethidium. Mutation Res., 54: 27-32.
- Nagley, P. & Linnane, A. W. (1970): Mitochondrial DNA deficient petite mutants of yeast. Biochem. Biophys. Res. Commun., 39: 989-996.
- Ogur, M. & John, R. S. (1956): A differential and diagnostic plating method for population studies of respiration-deficiency in yeast. J. Bacteriol., 72: 500-504.
- Piperno, G., Fonty, G. & Bernardi, G. (1972): The mitochondrial genome of wild-type yeast cells. II. Investigations on the compositional heterogeneity of mitochondrial DNA. J. Mol. Biol., 65: 191-205.

- Prakash, L. & Sherman, F. (1974): Differentiation between amber and ochre mutants of yeast by reversion with 4-nitroquinoline 1-oxide. *Genetics*, 77: 245-254.
- Prakash, L., Stewart, J. W. & Sherman, F. (1974): Specific induction of transcriptions and transversions of G·C base pairs by 4-nitroquinoline 1-oxide in iso-1-cytochrome c mutants of yeast. *J. Mol. Biol.*, 85: 51-65.
- Prunell, A. & Bernardi, G. (1974): The mitochondrial genome of wild-type yeast cells. IV. Genes and spacers. *J. Mol. Biol.*, 86: 825-841.
- Prunell, A., Kopecka, H., Strauss, F. *et al.* (1977): The mitochondrial genome of wild-type yeast cells. V. Genome evolution. *J. Mol. Biol.*, 110: 17-52.
- Saccone, C. & Kroon, A. M., *ed.* (1976): *The Genetic Function of Mitochondrial DNA*. North-Holland Pub. Co., Amsterdam.
- Tada, M. & Tada, M. (1976): Seryl-tRNA synthetase and activation of the carcinogen 4-nitroquinoline 1-oxide. *Nature*, 255: 510-512.
- Tewari, K. K., Votsch, W. & Mahler, H. R. (1966): Biochemical correlates of respiratory deficiency. VI. Mitochondrial DNA. *J. Mol. Biol.*, 20: 453-481.
- Wakabayashi, K. (1978): Segments of mitochondrial DNA of yeast carrying antibiotic resistances. *Molec. Gen. Genet.*, 159: 229-238.
- Zamaroczy, M. D., Baldacci, G. & Bernardi, G. (1979): Putative origins of replication in the mitochondrial genome of yeast. *FEBS Letters*, 108: 429-432.

Abnormality of Mitochondrial DNA in Respiration-Deficient Mutants of Yeast Induced by 4-Nitroquinoline 1-Oxide

Masahito FUKUNAGA¹, Tamotsu MORITA² and Ichiji MIFUCHI²

¹*Division of Microbiology, School of Nursing and Medical Technology, University of Occupational and Environmental Health, Japan. Kitakyushu 807, Japan*

²*Department of Microbiology, Shizuoka College of Pharmacy. Shizuoka 422, Japan*

Abstract: 4-Nitroquinoline 1-oxide (4NQO) is known to induce respiration-deficient (RD) mutants in yeast. We have investigated some physico-chemical properties of mitochondrial DNA in several clones of RD mutants which had been isolated at various time periods of 4NQO treatment. The buoyant densities of all RD mutants DNA's were reduced, and those mitochondrial DNA showed reversible and simple melting profile and had lower melting temperature. In contrast with RD mutants, melting profile of normal yeast mitochondrial DNA was broad and asymmetric and markedly different from that of the DNA's from RD mutants. Chemical analysis of base composition in mitochondrial DNA showed considerable reduction of guanine-cytosine contents. Possible mechanisms in RD mutagenesis by 4NQO are discussed.

Key words: yeast, mitochondrial DNA, 4-nitroquinoline 1-oxide, respiration-deficient mutants.

J. UOEH, 2 (3): 301-307 (1980)