

## 単細胞緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* の鞭毛突然変異株 pf-18 の細胞分裂と 生じた娘細胞の母細胞からの放出に対するリン酸塩の抑制効果

三原佐代子\*・古田 裕子\*・小早川ゆり\*\*・長谷 栄二\*\*\*  
長 船 哲 齊\* \*\*\*・大 和 眞\*\*\*

(平成 9 年 10 月 13 日受付, 平成 9 年 11 月 12 日受理)

### Suppressive Effect of Phosphate on the Liberation of Daughter Cells from Mother Cells in Synchronized Culture of a Flagellar Mutant pf-18 of *Chlamydomonas reinhardtii*

Sayoko MIHARA, Hiroko FURUTA, Yuri KOBAYAKAWA, Eiji HASE,  
Tetsuaki OSAFUNE and Makoto YAMATO

Cells of a flagellar mutant (pf-18) of unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii* were synchronized by alternations of 12 h light and 12 h dark periods. The liberation of daughter cells produced by cytokinesis within mother cells were found to be suppressed by high concentrations of phosphate ( $H_2PO_4^-$ ). It was revealed that phosphate suppresses a certain process (e) involved in the rupture of mother cell wall by endogenous vegetative lytic enzyme.

**Key words:** *Chlamydomonas* flagellar mutant, Daughter cell liberation, Suppressive effect of phosphate

キーワード: クラミドモナス鞭毛突然変異株, 娘細胞放出, リン酸塩の抑制効果

#### 序 論

クラミドモナスは単細胞性の緑藻であり, その大きさは 10~15  $\mu m$  である。細胞内に 1 個の核, 1 個の葉緑体, 1 個の眼点と数個のミトコンドリアを持ち, 細胞の頂端から 2 本の等長の鞭毛が突出して, 野性株はその方向に遊泳運動を行う。クラミドモナス細胞は接合子以外は常に半数体で, 適当な栄養条件の下では, 無性的に有糸分裂によって増殖し, 細胞容積の増大に続いて細胞分裂が起こる。細胞分裂は細胞内に隔壁を形成して細胞を二分する高等植物や車軸藻類の分裂と異なり, 第一分裂に連続して第二第三の分裂が起こり, その結果 2 個, 4 個, 8 個の娘細胞が母細胞の細胞壁内に生じる。これらの複数個の娘細胞は母細胞壁が細胞壁溶解酵素によって溶解されたときに一斉に放出される [図 1A]。クラミドモナス細胞は環境要因の変化に対応して, 接合能力を獲得し有性生殖を行う。無性世代で雌雄両株はそれぞれ核相  $n$  の半数体状態で増殖し, 同調培養における経時変化は雌雄両株で差は認められない。また同調培養の細胞の発

達段階と接合能の獲得に関しては, 娘細胞放出直後が高いとの報告がある<sup>1)</sup>。無性生殖における娘細胞の一斉放出は, 自然界において雌雄両株が同時に接合能を獲得して接合する機会を増すことにつながると考えられる。

クラミドモナスの実験材料としての利点は, その増殖過程が明暗周期の繰り返しによって簡単に同調できることにある。明暗周期により分裂を同調した野生株において, 暗期に入ると核分裂, 葉緑体分裂, 細胞質分裂を起こした結果, 母細胞内に生じた娘細胞はその後数時間, 母細胞内に留まり, 暗期の終わりに細胞壁溶解酵素 (Vegetative Lytic Enzyme: VLE) の働きによって, 母細胞壁が破れ娘細胞が培養液中に泳ぎ出し, 同時にこの酵素も培養液中に放出される。放出された酵素は同じ細胞懸濁液中の未放出の母細胞壁に外から働き, その娘細胞の放出を誘起し, 培養液中の細胞群の娘細胞一斉放出を促進する。この娘細胞放出は特に同調性が高く光強度等に影響されることなく規則性が保たれている<sup>2)</sup>。

先に我々はクラミドモナス野性株の分裂同調の系を用

\* 自然科学研究室, \*\* 運動方法 (水泳研究室), \*\*\* 体育研究所

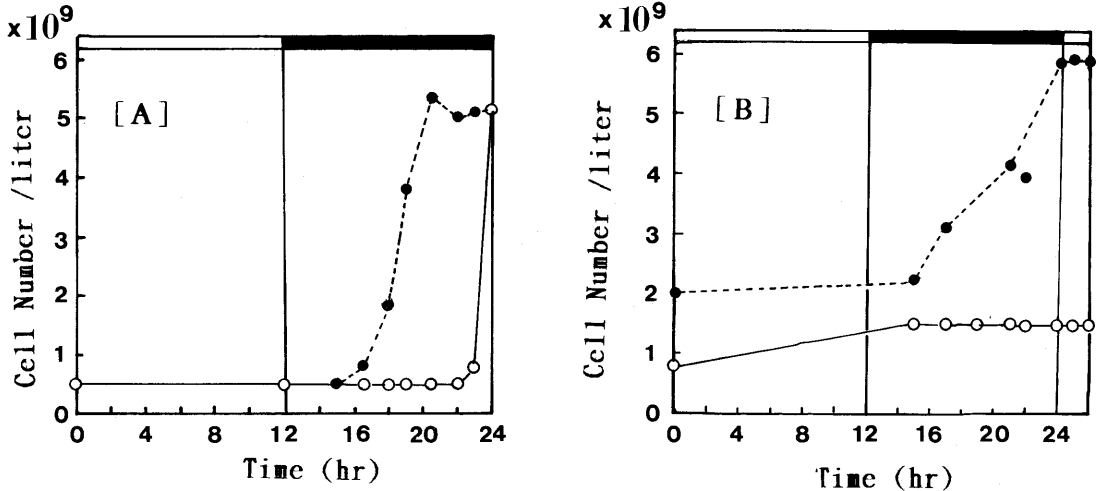


図1 クラミドモナス野性株(A)および鞭毛突然変異株 pf-18 (B)の明暗周期下の同調培養における細胞分裂および娘細胞放出の経時変化

図中の実線は母細胞より放出された娘細胞数を、点線は母細胞壁内の個々の娘細胞を1個と数えた数値(細胞分裂を表す)上欄の白色部分は明期を黒色部分は暗期を示す。

い、培養液中に放出された母細胞壁溶解酵素を同調培養各段階の細胞に添加することにより、自発的な娘細胞放出に先立つ娘細胞放出の誘起が可能なことを示した。これらの結果から母細胞壁の添加 VLE に対する感受性は自発的な娘細胞放出時より数時間早く達成させていることが明らかとなった<sup>3)</sup>。これらの結果は母細胞壁溶解酵素が外部から母細胞壁に働いて娘細胞が放出される過程と、酵素が内部から働く過程とは異なる(少なくとも部分的に)ことを示唆している。

クラミドモナスの鞭毛は運動器官であると同時に有性生殖時の接合反応の相手を認識する感覚器官としても働いている。また、細胞外に突出した鞭毛は環境要因の変化等で簡単に切断され、新たな鞭毛が短時間で再生されることも知られている。以上のような理由からクラミドモナスは鞭毛の形態形成、および機能の研究材料として、広く利用されており、長年の研究の成果として、鞭毛の形態および機能欠損の突然変異体も数多く知られている。

今回の研究材料である鞭毛機能欠損株 pf-18 は細胞頂端より硬直した鞭毛を V 字型に突出した変異株であり、運動性を欠くことが知られている<sup>4)</sup>。形態学的、生化学的研究の成果により、この変異株は中心小管の形成が不完全で、単離された鞭毛の軸糸(axoneme)には野生株の軸糸に存在する分子量 36~2 万の 18 種のポリペプチドが欠損している<sup>5)</sup>。

当研究室において、すでにこの変異株を用いた細胞の

運動性と活性酸素消去酵素(superoxide dismutase: SOD)含量の相関性の研究が行われている<sup>6)</sup>。この変異株は液体培養中しばしば分裂後の娘細胞が母細胞壁から放出されない、いわゆる孢子嚢(sporangia)のまま存在し、さらに互いに接着した塊が数多く観察される。この状態は細胞の生理・生化学的研究を行う上で、生育状態の指標となる正確な細胞数を把握するのを困難にする。本研究においては変異株の同調分裂時の娘細胞放出を追求し、種々の環境要因の効果を検討し、比較的高濃度のリン酸塩( $H_2PO_4^-$ )が変異株の娘細胞放出に対し抑制的効果をもつことを見いだした。

## 実験材料および方法

### 1. 実験材料

単細胞緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* 鞭毛変異株 pf-18 (paralyzed flagella-18): cc-1036 はアメリカ合衆国 Duke 大学の *Chlamydomonas* Genetic Center より入手、対照として用いた野生株 *Chlamydomonas reinhardtii* Dangeard : IAM C-9 は東京大学分子細胞生物学研究所 IAM カルチャー・コレクションより入手した。

### 2. 培養方法(前培養・同調培養)

寒天斜面上の藻株を 1 白金耳採り、直接、小型扁平プラスチック中の 50 ml 無機培液(SUEOKA 3/10 HSM<sup>7)</sup>)に放ち、直ちに 3,000 lux の白色蛍光灯で連続照射し、1.5%  $CO_2$  を含む空気で通気培養を実施。細胞濃度が 1 ml 当たり約  $1 \times 10^5$  に達した対数増殖期の細胞に 6,000

lux, 25°C 12 時間明期: 12 時間暗期を繰り返す。各明期の初めに細胞濃度が 1 ml 当たり  $2 \times 10^6$  を超えないよう新鮮培養液で希釈を行う。明暗周期を 3 回繰り返すと野生株の分裂は同調する。(図 1A)

### 3. 細胞数・細胞容積の測定

細胞数の経時的変化は、一定容量の培養液中の全細胞数をトーマ血球計算盤 (Thoma's hemacytometer) を用いて算出し、培養液 1 l または 1 ml 当たりとして表現した。

血液中の血球容積を求める方法を適用し、ヘマト・クリット (Hematocrit) と呼ばれる下部が目盛りのついた細管となっている遠心管を用い、細胞懸濁液の一定量を取り、 $1,300 \times g$  15 min (4°C) の遠心を行い薬体を細管部に詰め、目盛りの読みから試料液 1 l 当たりの総細胞容積 (packed cell volume: PCV) として表現した。

### 4. 母細胞壁溶解酵素 (vegetative lytic enzyme: VLE) 溶液の調製

(i) 変異株同調培養暗期後半の細胞懸濁液を (80% 以上が孢子嚢状態)  $1,000 \times g$ , 3 min, 遠心分離し、沈査の細胞を 10 mM トリス-酢酸緩衝液 (pH 7.5) に細胞濃度  $1 \times 10^7$ /ml に懸濁して、25°C, 3,000 lux で 30 min 通気しつつ照射する。顕微鏡で娘細胞放出の完了を確認の上、再び遠心 ( $1,300 \times g$ , 15 min, 4°C) により、上清液を集め、さらに、 $0.45 \mu\text{m}$  (孔径) のミリポア・フィルターでろ過して、混在物 (母細胞壁片) を除いたろ液を母細胞壁溶解酵素 (VLE) として 4°C に保存し以後の *in vitro* の実験に使用した。

(ii) 変異株同調培養暗期後半の細胞懸濁液を (80% 以上が孢子嚢状態)  $1,000 \times g$ , 3 min, 遠心分離し、沈査の細胞を新鮮培養液 (3/10HSM  $\text{PO}_4$  6 mM, pH 6.8) 中に細胞濃度  $1 \times 10^7$ /ml になるよう懸濁し、培養を継続し娘細胞放出の完了を顕微鏡で確認の上、再び遠心 ( $1,300 \times g$ , 15 min, 4°C) により、上清液を集め、更に、 $0.45 \mu\text{m}$  (孔径) のミリポア・フィルターでろ過して、混在物 (母細胞壁片) を除いたろ液を *in vivo* (培養中に VLE を添加し培養を継続する) の実験に用いた。

### 5. 母細胞壁溶解酵素 (VLE) の基質の調製

松田らの方法に従い、野生株、同調培養暗期 6~7 時間の細胞 (孢子嚢状態) 培養にグルタルアルデヒドを最終濃度 0.1% になるように加え、30 分間固定の後、 $1,000 \times g$ , 5 min の遠心を 5 回繰り返して、沈査の孢子嚢を滅菌蒸留水で遠心洗浄の後、 $1 \times 10^7$ /ml に調製して 4°C で保存する。

### 6. VLE 活性の検出

実験法 4(i) で調整した変異株娘細胞放出時の細胞懸

濁液遠心上清について VLE 活性の検出を試みた。実験法 5 で調整した 0.1% グルタルアルデヒドで固定した野性株の孢子嚢を酵素の基質とした。

反応液組成 (1 ml) は以下のとおり

10 mM トリス-酢酸緩衝液 (pH 7.5) 血清アルブミン (BSA): 1 mg/ml  $1.5 \times 10^6$  個・0.1% グルタルアルデヒド固定-孢子嚢 VLE-溶液: 100  $\mu\text{l}$  反応温度: 28°C

反応は酵素液の添加で開始し、0.1 ml の 100 mM EDTA $\cdot$ 2Na の添加により反応を停止後、溶解されずに残った孢子嚢の数および全細胞数を、トーマの血球計算盤を用いて計数し、経時的に記録した。

## 結 果

### 1. 鞭毛変異株: pf-18 の細胞分裂と娘細胞放出抑制

クラミドモナス野性株は無機培養液 (SUEOKA 3/10 HSM) 中 12 時間明期 12 時間暗期の明暗周期の下で、明期に細胞容積の増大、暗期に細胞分裂が起り [図 1A], 暗期の終わりに母細胞から娘細胞の放出が行われる。これに反し同じ培養条件の下に置いた鞭毛変異株 pf-18 の細胞分裂は暗期のみに起こるが、その後の娘細胞の放出が抑えられて母細胞中に娘細胞を保ったまま次の明期に入る [図 1B]。図から分かるように、0 時間細胞は 1 個当たり数個の娘細胞をすでに含んでいるが、次の細胞分裂は 12 時間明期中では起こらず、暗期に入って初めて起り、娘細胞の増加がみられる。変異株に娘細胞放出を誘起させるため、まず培養液の pH の影響を検討した。

### 2. 変異株娘細胞放出に対する水素イオン濃度 (pH) の効果

変異株同調培養の 21 時間細胞 ( $T_{21}$ ) を遠心分離し沈査の細胞を、次の 3 種の培養液に懸濁して培養を継続しその娘細胞放出を記録した。

[1] リン酸塩を緩衝液とする無機培養液 (リン酸塩濃度: 8.9 mM pH 6.8)

[2] 上記の培養液のリン酸塩濃度は変えず緩衝液の pH を 7.5 としたもの (リン酸塩濃度: 8.9 mM)。

[3] 培養液の緩衝液をトリス-塩酸緩衝液に変更し pH を 7.5 とし (20 mM Tris-HCl pH 7.5), リン酸塩は含まない。

図 2 に示したように、[1] の野性株と同じ培養液では娘細胞放出はほとんど起こらないが、pH を 7.5 に上げれば ([2] の培養液) 娘細胞放出が緩やかに起こる [図 2(2)]。これに対し同じ pH 7.5 の下でもリン酸緩衝液を含まない場合には培養液の置換から 1 時間以内に娘細胞の一斉放出が完了している [図 2(3)]。

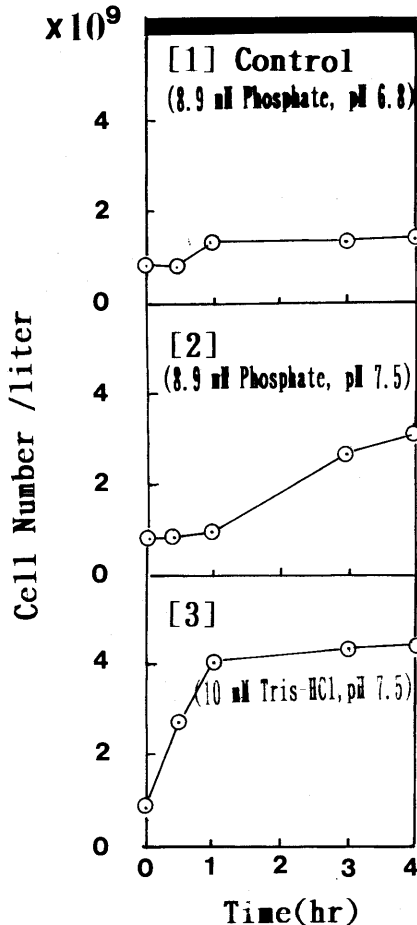


図2 培養液水素イオン濃度 (pH) 変化の変異株娘細胞放出に対する効果

変異株細胞を野生株と同じ培養液組成を用い明暗周期下で同調培養して得られた21時間細胞を次の3種の培養液に移し通気培養を継続し娘細胞の放出を追跡した。

- (1) 対照: 野生株と同じ培養液組成 (8.9 mM リン酸塩, pH 6.8)
- (2) 8.9 mM リン酸塩, pH 7.5
- (3) 20 mM トリス-HCl 緩衝液・pH 7.5

これらの結果は、同調培養21時間細胞にはすでに母細胞壁溶解酵素が存在しているが、その作用がリン酸塩のために抑えられており、その抑制効果は、pH 7.5におけるより pH 6.8 の場合の方が大きいことを示している。

### 3. 鞭毛変異株内の母細胞壁溶解酵素 (VLE) 活性の確認

変異株の母細胞壁溶解酵素の存在の確認を試みた。変

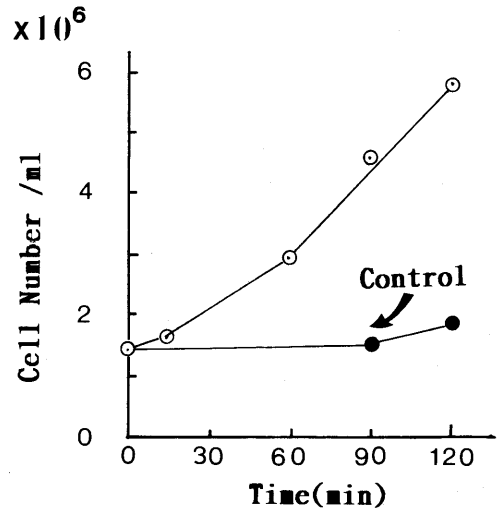


図3 鞭毛変異株 pf-18 の母細胞壁溶解酵素活性の検出

酵素活性を検出する試料として、変異株 pf-18 の同調培養暗期後半20時間細胞懸濁液を遠心分離し、その沈査細胞を10 mM トリス-酢酸緩衝液 (pH 7.5) に懸濁し (細胞濃度:  $1 \times 10^7$ /ml) 娘細胞放出後、再び遠心した上清液をミリポア・フィルター (孔径  $0.45 \mu\text{m}$ ) でろ過したものを用いた (実験法 4(i))。ろ液を0.1% グルタルアルデヒドで30分間固定した野生株同調培養母細胞 (胞子囊): 20時間細胞に添加して28°Cに保ち、放出される娘細胞数を経時的に記録した (実験法 5, 6)。対照にはろ液と等量の10 mM トリス-酢酸緩衝液を加えた。

異株から松田らの方法<sup>9)</sup>に従って粗酵素液を調製し (実験法 4(i) 参照), 0.1% グルタルアルデヒドで固定した野生株の胞子囊を基質とし (実験法 5), 放出される娘細胞数の経時変化を測定した (図3)。

娘細胞の放出は120分間直線的に継続し、VLEの代わりに同量のpH 7.5のトリス緩衝液を添加した対照には娘細胞放出が認められなかった。

以上の結果は、変異株に母細胞壁溶解酵素が存在し、娘細胞放出後の培養液中にその活性が保たれていることを示している。

### 4. 種々のリン酸塩濃度の培養液での変異株同調培養の試み

野生株と同様の培養液 (3/10HSM: pH 6.8・リン酸塩: 9 mM) で12時間明: 12時間暗の周期を3回繰返した変異株の24時間細胞 ( $T_{24}$ ) を遠心し、沈査の細胞をリン酸塩を除いた培養液で遠心洗浄の後、3~15 mM リン酸塩を含む培養液に懸濁して12時間明期: 12時間暗期の下で同調培養を行い細胞分裂と娘細胞の放出の経時変化

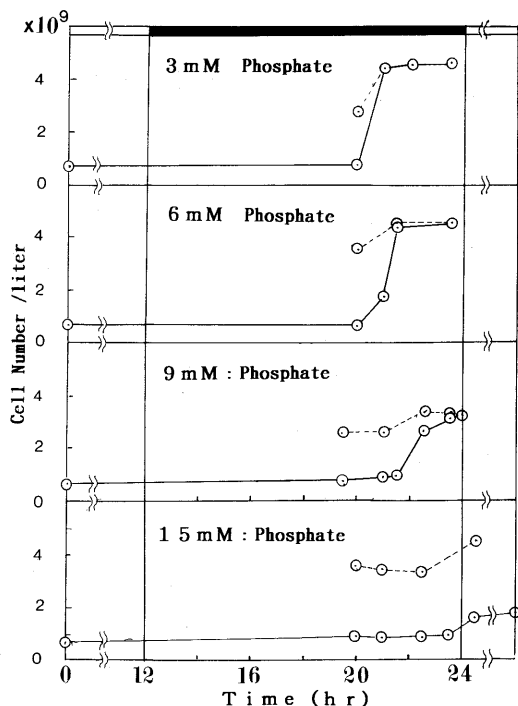


図4 種々のリン酸塩濃度の培養液での変異株の同調培養

野性株と同組成の培養液で、明暗周期を3回繰返し、分裂を同調させた変異株暗期終わりの細胞(24時間細胞)を図に示した濃度のリン酸塩を含む培養液に懸濁し、12時間明:12時間暗の明暗周期の下で同調培養を行い(6 klux, 25°C, 1.5% CO<sub>2</sub>)細胞分裂(母細胞壁内の娘細胞の数)と放出された娘細胞数の経時変化を比較した。

リン酸塩以外の培養液組成は野性株培養液と同じ。

を比較した。図4に示したように、リン酸塩の娘細胞放出抑制は3 mM, 6 mM では認められなかった。9 mM では遅延を含む抑制がみられ、15 mM では強い抑制が起こった。なお24時間細胞の細胞容積をヘマトクリットを用いて測定したところリン酸塩濃度: 3 mM, 6 mM, 9 mM では細胞容積の増加には変化がなく、用いた最低濃度のリン酸塩 3 mM でも生育に十分な濃度であることが判明した。15 mM リン酸塩培養液では娘細胞放出が抑制され塊状となった細胞がヘマトクリットに遠心充填されず測定値を得ることができなかった。

5. 変異株の娘細胞放出に対するリン酸塩の抑制的効果の機構に関する検討

上記の結果から、変異株の培養液リン酸塩濃度として、娘細胞放出を抑制しない6 mM を選択し、同調培養を行い、暗期後半の細胞(19~21時間)を用いて実験を

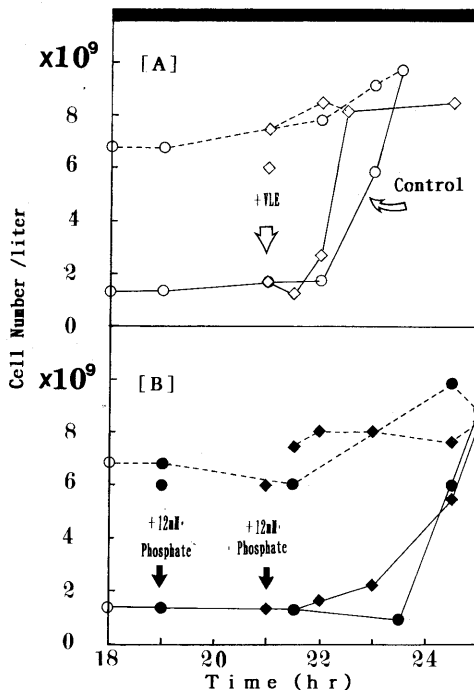


図5 変異株同調培養の細胞発達段階と外部より添加した母細胞壁溶解酵素(VLE)および高濃度リン酸塩の娘細胞放出に対する影響

(A) 6 mM リン酸塩を含む培養液で変異株を同調培養し21時間細胞懸濁液 50 ml に 5 ml の変異株由来 VLE (実験法 4(ii)) を添加(◇)したときの娘細胞放出の経時変化。

(B) (Aと同じ培養の19時間(●), 21時間細胞(◆)懸濁液に 100 mM リン酸緩衝液(pH 6.8)を添加して培養液のリン酸塩濃度を 12 mM とし、娘細胞放出の経時変化を追跡した。

行った。(図5)。(A)では変異株由来の母細胞壁溶解酵素(VLE: 実験法 4(ii))を外より21時間細胞に添加して娘細胞放出の促進を確認した。これはほぼこの時点で母細胞壁が細胞外からの酵素作用に対する感受性を持っていることを示す。

一方、(図5B)ではリン酸塩高濃度溶液(100 mM・pH 6.8)の添加によって培養液のリン酸塩濃度を 12 mM として娘細胞放出の経時変化を観察した。19時間細胞と21時間細胞に添加したリン酸塩はいずれも娘細胞放出に対し遅延効果を示した。図から分かるように、遅延の娘細胞放出はほとんど同時に起こり、しかも放出の速度は対照(A)と同様に速かった。これはリン酸塩の抑制効果が母細胞壁溶解酵素の活性阻害によるものでなく、また母細胞壁の外部からの作用酵素に対する感受性の獲得

阻害に由来するものでもないことを示している。

観察されたリン酸塩による娘細胞放出の遅延は変異株細胞内 VLE が内部より母細胞壁に作用する過程に対して何らかの抑制をすることによって考えられる。

## 考 察

クラミドモナスの鞭毛変異株 pf-18 の液体培養中しばしば細胞が互いに接着した細胞塊が観察され、細胞の均一な分散が損われている。この現象は細胞分裂後の娘細胞放出の抑制に由来し、またその抑制は培養液中のリン酸塩が原因であることが明らかとなった。培養液のリン酸緩衝液に存在する二つの塩基、リン酸二水素イオン ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ) とリン酸水素イオン ( $\text{HPO}_4^{2-}$ ) の量比を考慮すると (リン酸の電離定数を用いて計算)、pH 6.8 ではリン酸二水素イオンが pH 7.5 の状態の約 3 倍存在する。培養液の水素イオン濃度の低下が娘細胞放出に促進的に働くこと (図 2) から、鞭毛変異株の娘細胞放出を抑制するのがリン酸二水素イオンの形であると考えられる。

すでに述べたように、リン酸塩は変異株細胞内の VLE が内部から母細胞壁に作用する過程を抑制すると考えられる。細胞分裂後の娘細胞放出には母細胞壁溶解酵素 (VLE) と分解を受ける細胞壁の表面の変化とが関係することがすでに報告されている<sup>9)</sup>。娘細胞放出と同時に培養液中に放出された VLE を出発材料として、その精製を行った松田ら<sup>9)</sup> によれば、この酵素は分子量 125 kDa の塩基性糖タンパク質で、クラミドモナス母細胞壁のタンパク質を分解するセリン・プロテアーゼであると報告している。この酵素の基質はヒドロキシプロリンに富む糖タンパクの層状構造からなるクラミドモナス細胞壁のうち、W2 と呼ばれる内側の網目構造をなす層のタンパク質である。野生株の孢子嚢を基質として用いる彼らの方法により、この変異株 pf-18 の内部に VLE 活性が検出された (図 3)。しかし細胞壁が VLE に対して感受性を持つには基質となる部分を覆っている細胞壁表面の過塩素酸ナトリウム可溶性タンパク質が除去される必要があり<sup>9)</sup>、これに働く要因 (酵素?) はいまだ明らかにされていない。また娘細胞放出時の細胞を光学顕微鏡によって観察するとき、母細胞壁のごく一部が破れて娘細胞の放出される像が認められる。これより母細胞壁の特定の場所が酵素の作用を受けることが考えられる。細胞分裂時の母細胞は鞭毛を失っているが、母細胞壁の、もと鞭毛が突出していた位置がその特定の場所である可能性を考慮に入れて、今後検討を行う予定である。

一般に鞭毛に欠陥を持つ突然変異株の娘細胞放出が抑

えられ孢子嚢が塊状をなす、パルメロイド (palemeloid) を形成しやすいとの報告はあるが、原因の解析は行われていない<sup>10)</sup>。鞭毛の欠陥とリン酸塩による娘細胞放出の抑制の関係は今後の研究課題である。

## 謝 辞

本研究の一部は平成 9 年度文部省科学研究費・基盤研究 (C) 第 09640795 号、平成 7 年度、文部省科学研究費・総合研究 (A) 第 07304082 号、文部省科学研究費・基盤研究 (C) 第 07640884 号、日本体育大学・特別教育研究費および日本私学振興財団・学術研究振興資金の補助によって行われた。

## 引用文献

- 1) Zachleder, V., Jakobs, M. and van den Ende, H.: Relationship between gametic differentiation and the cell cycle in the green alga *Chlamydomonas eugametos*, J. Gen. Microbiol., **137**, 1333-1339 (1991).
- 2) Mihara, S. and Hase, E.: Studies on the vegetative life cycle of *Chlamydomonas reinhardtii* Dangeard in synchronous culture I. Some characteristics of the cell cycle, Plant and Cell Physiol., **12**, 225-236 (1971).
- 3) Mihara, S. and Hase, E.: Studies on the vegetative life cycle of *Chlamydomonas reinhardtii* Dangeard in synchronous culture III. Some note on the process of zoospore liberation, Plant and Cell Physiol., **16**, 371-375 (1975).
- 4) Warr J.R., McVittie, A., Sir Dandall, J. and Hopkins, J.M.: Genetic control of flagellar structure in *Chlamydomonas reinhardtii*, Genet. Res., **7**, 335-351 (1966).
- 5) Adams, G.M.W., Huang, B., Piperno, G. and Luck, J.L.: Central-pair microtubular complex of *Chlamydomonas* flagella: Polypeptide composition as revealed by analysis of mutants, J. Cell Biol., **91**, 69-76 (1981).
- 6) 津山 薫, 北山雅彦, 北山 薫, Robert K. Togasaki, 小早川ゆり, 浜田元輔, 清原伸彦, 長船哲齊, 大和 眞: *Chlamydomonas reinhardtii* の運動性と活性酸素消去酵素 (Fe-SOD) との相関性, 日本体育大学体育研究所雑誌, **22**, 15-24 (1997).
- 7) Sueoka, N., Chang, K.S. and Kates, J.R.: Deoxyribonucleic acid replication in meiosis of *Chlamydomonas reinhardtii* I. Isotopic tracer experiments with a strain producing eight zoospores, J. Mol. Biol., **25**, 47-66 (1967).
- 8) Matsuda, Y., Koseki, M., Shimada, T. and Saito, T.: Purification and characterization of a vegetative lytic enzyme responsible for lib-

- eration of daughter cells during the proliferation of *Chlamydomonas reinhardtii*, *Plant and Cell Physiol.*, **36**(4), 681-689 (1995).
- 9) Voigt, J., Hinkelmann, B., Liebich, I. and Mix, M.: Alteration of the cell surface during the vegetative cell cycle of the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*, *Plant and Cell Physiol.*, **37**(6), 726-753 (1996).
- 10) Harris, E. H.: *The Chlamydomonas Sourcebook: A Comprehensive Guide to Biology and Laboratory Use*, Chapter 3: Cell Architecture and Division, pp. 65-126, Academic Press Inc., San Diego, California, U.S.A. (1989).