

## 学 位 論 文 要 旨

(Summary of the Doctoral Dissertation)

学位論文題目  
(Dissertation Title)

A study on dynamics of cell membrane during cell division  
(細胞分裂時の細胞膜の動態制御に関する研究)

氏 名 (Name)

田中 真仁 (Tanaka Masahito)

Cell division is essential to cell growth and development. When a cell divides into two daughter cells, the total cell surface area should increase. However, the many projections and wrinkles on the cell surface complicate the accurate measurement of cell surface area. The cell membrane must be supplied to increase the cell surface area. There are two models for membrane supply to support cell division: (1) unfolding of small surface membrane reservoirs such as microvilli or wrinkles and (2) exocytosis of intracellular vesicles, which remains controversial. Previous researches have focused either the decrease of endocytosis or the increase of exocytosis to explain the increase of cell surface area. However, both endocytosis and exocytosis have not been simultaneously discussed.

Here, we precisely measured the total cell surface area in dividing *Dictyostelium* cells, flattened by the agar overlay, which eliminated the complexity of unfolding surface membrane reservoirs. Because the cells divided normally under the agar-overlay, we concluded that unfolding of surface membrane reservoirs is not required for cell division. Under the agar overlay, we could precisely measure the cell surface area, without influence of surface membrane reservoirs. Under this condition, the total cell surface area slightly decreased from the interphase to the metaphase and then increased about 20% during cytokinesis, suggesting that this increase is due to the imbalance between exocytosis and endocytosis.

To measure the uptake of cell membranes in dividing *Dictyostelium* cells, they were stained with the fluorescent lipid analog, and the fluorescence images were acquired over time by confocal microscopy. The uptake of cell membrane was suppressed in the early mitotic phase but recovered during cytokinesis.

The change in cell surface area during cell division in animal cells has been explained by suppression of clathrin-mediated endocytosis (CME), although this is still controversial. We measured CME of dividing *Dictyostelium* cells by observing cells expressing GFP-clathrin light chain under a total internal reflection fluorescence microscope. CME remained suppressed during the entire cell division. Next, we examined the total cell surface area during cytokinesis in clathrin

heavy chain null cells. The total surface area of these null cells increased by about 20% similar to that of wild type cells. These results indicate clathrin-mediated endocytosis is also substantially suppressed during cytokinesis. However, contrary to previous reports in cultured animal cells, it does not significantly contribute to the regulation of the cell surface area.

Next, to further clarify the contribution of exocytosis to the increase of cell surface area, we used thiabendazole as an inhibitor of exocytosis or *secA* (encoding an exocytic protein) mutant cells. These cells failed in cytokinesis without furrowing and the total surface area did not increase. Therefore, exocytosis is necessary for cytokinesis.

To examine whether cytokinesis is required for the membrane surface area increase, we used myosin II null cells, which failed in cytokinesis and became multinucleate in suspension. The increase of surface area of myosin II null cells in suspension culture was not consistent with predicted increase of surface area in wild type cells. These results indicate that cytokinetic furrowing is required for the increase in the cell surface area.

Together, the total cell surface area increased by 20% during cytokinesis. This increase was not due to unfolding of surface membrane reservoirs, but was due to the imbalance between exocytosis and endocytosis. The furrowing observed during cytokinesis was indispensable for the increase in cell surface area, and vice versa. Both exocytosis and endocytosis are strictly regulated to control the cell shape changes during cell division.

## 学位論文審査の結果及び最終試験の結果報告書

山口大学大学院創成科学研究科

|         |   |
|---------|---|
| 氏 名     | 田中 真仁   |
| 審 査 委 員 | 主 査： 祐村 恵彦  |
|         | 副 査： 岩尾 康宏  |
|         | 副 査： 村上 柳太郎   |
|         | 副 査： 山中 明   |
|         | 副 査： 明石 真   |
| 論 文 題 目 | A study on dynamics of cell membrane during cell division<br>(細胞分裂時の細胞膜の動態制御に関する研究) |

### 【論文審査の結果及び最終試験の結果】

細胞分裂は、細胞増殖や生物の発生など生物にとって必須な現象である。細胞が2つの娘細胞に分裂するとき、分裂前後で細胞体積が変わらないので細胞表面積は増加することが想定される。細胞の表面積を制御するモデルとして、①細胞の表面にある数多くのしわや突起が展開することで膜が供給されるモデルと、②エキソサイトーシスによって細胞内部から膜が供給されるモデルが考えられる。本研究では、寒天ブロックを細胞に載せて、細胞性粘菌の細胞を平坦にして、しわや突起を伸ばした。この条件でも細胞は正常に分裂したことから、②のモデルが当てはまることが分かった。また、この寒天重層後、セクショニング蛍光顕微鏡で3次元像を解析することで、分裂過程での細胞表面積を正確に測定することができた。その結果、細胞表面積は間期から細胞分裂中期に微かに減少し、その後、細胞質分裂完了までにおよそ20%増加していた。以上から、細胞性粘菌の細胞分裂時に細胞表面積が増加することが初めて明らかになった。また、細胞膜のしわや突起が伸びたのではなく、細胞内部から膜が供給された結果であることが分かった。細胞内部から膜が供給されるには、膜の取り込み(エンドサイトーシス)の減少もしくは膜の供給(エキソサイトーシス)の増加の結果であると考えられたので、次に、上記のいずれが関与するかを阻害剤や変異体を用いることによって調べた。蛍光脂質アナログで細胞膜を染色し、分裂時に膜の取り込み(エンドサイトーシス)が減少することが分かった。エンドサイトーシスの1つであるクラスリン介在エンドサイトーシスについて詳細に調べたところ、クラスリン介在エンドサイトーシスも分裂時に減少していたが、クラスリン欠損細胞でも細胞表面積が野生型細胞と同様に増加することから、クラスリン介在エンドサイトーシスは分裂時の表面積の制御に重要ではないことが分かった。エキソサイトーシスについては、直接定量できていないが、阻害剤と変異体

(様式9号)

を使った実験により、細胞質分裂に必要であることがわかった。以上から、エンドサイトーシスとエクソサイトーシスの両者が関与することが分かった。さらに、分裂溝の形成は、表面積の増加に必要であり、また表面積の増加がなければ、細胞は分裂できないことがわかった。以上から、細胞分裂時のエンドサイトーシスとエクソサイトーシスが厳密に制御されることで、細胞は分裂に必要な表面積を調節していることが明らかになった。

公聴会における主な質問内容は、細胞周期全体では分裂後から次の分裂までに体積は2倍になるはずで、その時細胞表面積は、63%増加することになるが、この増加はどのように説明するのか、分裂溝でエクソサイトーシスが起こるのか、エクソサイトーシスを制御するシグナルは何か、膜成分は細胞内のどこで作られるのか、などであった。いずれの質問に対しても発表者からの的確な回答がなされた。

以上より、本研究は独創性、信頼性、有効性ともに優れ、博士（学術）の論文に十分値するものと判断した。

論文内容及び審査会、公聴会での質問に対する応答などから、最終試験は合格とした。

なお、主要な関連論文の発表状況は下記のとおりである。（関連論文 計1編）

Tanaka, M., K. Fujimoto, and S. Yumura (2020).

Regulation of the total cell surface area in dividing *Dictyostelium* cells.

Frontiers in Cell and Developmental Biology, 8:238. doi: 10.3389/fcell.2020.00238.