

氏名	Alessandro Di Maio
学位の種類	博士（体育学）
学位記番号	第4号
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位授与年月日	平成21年6月22日
学位論文題目	（主論文） T-tubule formation in cardiacmyocytes: two possible mechanisms? （副論文） T-tubule profiles in purkinje fibres of mammalia n myocardium （副論文） Ultrastructure of the sarcoplasmic reticulum in ca rdiac myocytes from Pacific bluefin tuna
論文審査委員	主査 教授 竹倉 宏明 副査 教授 齋藤 和人 副査 准教授 濱岡 隆文

論文概要

論文提出者のAlessandro Di Maio氏は、筋細胞の興奮収縮連関のメカニズムを明らかにすることを目的として、興奮収縮連関の機能発現に直接関与する筋細胞内膜系やCa²⁺チャンネルの構造様式と機能的特性の関係を検討している。加えて、発生・発育・加齢などが筋細胞の興奮収縮連関の機能発現様式に及ぼす影響についても、筋細胞内膜系の形態変化と機能的変化を指標として分子・細胞生物学的手法を用いて検討している。今回提出された3本の論文の中で、主論文は、心筋細胞を対象として、誕生以降のT管の形態的特徴が形成されるメカニズムを電子顕微鏡を用いて明らかにした論文であり、副論文は、数種類の動物（イヌ、ウサギ、ラット、マウス）を対象として心筋細胞のPurkinje線維におけるT管の形態的特徴を明らかにした論文と、クロマグロの心筋細胞を対象として筋小胞体及びミトコンドリアの形態的特徴を電子顕微鏡及び共焦点顕微鏡を用いて明らかにした論文である。いずれの論文も骨格筋細胞に比較して研究が遅れていた心筋細胞を対象とした研究であり、骨格筋細胞とは異なる機能発現機構を有する心筋細胞の興奮収縮連

関の機能解明に対して極めて貴重な基礎的資料を提供している。全ての論文がインパクトファクターを有する雑誌に掲載された原著論文であり、研究分野を同じくする関係者から高い評価を得ている。

(主論文)

1. Di Maio, A., Karko, K., Snopko, R.M., Mejia-Alvarez, R. and Franzini-Armstrong, C. (2007) T-tubule formation in cardiac myocytes: two possible mechanisms? *J. Muscle Res. Cell Motil.*, 28, 231-241.

本研究では、誕生直後から数週間後までのラット心室筋を対象として横行小管(T)管の分化、筋小胞体(SR)と筋原形質膜(peripheral coupling)あるいはT管(dyads)との融合を検討した。Dyadsとperipheral couplingはSRからのCa²⁺放出を担う構造体であるため、まとめてCa²⁺ Release Units(CRUs)と呼ばれている。生後初期の段階ではT管、caveolae及びdyadsの大部分は細胞の周辺部分に存在しているが、誕生2週後には細胞内部における頻度が増加した。フェリチン分子を用いて、細胞外部からT管の連続性を追ったところ、フェリチン分子が蓄積していないT管(6~25%)が、ジャンクションを形成していないT管やdyadsを形成しているT管の両者に観察された。フェリチン分子が蓄積していないT管の割合は生後発育に伴い漸次低下し、細胞周辺部分と細胞内部における違いは認められなかった。我々は、T管が膜脂質や特異的な蛋白質の発生によって引き起こされる筋原形質膜の陥入によって形成されると推察している。この現象は2重の機構によって発現する:①SRとT管の蛋白質が2種類の膜に分化する流れとは無関係に発現する、②dyadsに複数の小囊が融合して発現する。大部分のCRUs(~86%)は、peripheral couplingやフェリチン分子を含むdyadsから形成されており、細胞膜の脱分極に伴いSRからCa²⁺を放出するCRUsを形成する。残りのCRUsからのCa²⁺放出は他の機構に依存していると考えられる。

(副論文)

2. Di Maio, A., Ter Keurs, H.E. and Franzini-Armstrong, C. (2007) T-tubule profiles in Purkinje fibres of mammalian myocardium. *J. Muscle Res. Cell Motil.*, 28, 115-121.

プルキンエ線維は電氣的信号を速やかに伝達するために特化した心筋細胞

である。プルキンエ線維は下記のように、通常の心筋細胞とは異なった性質によって判別することが可能である:T管の欠如;細胞周辺部のジャンクションの頻度;境界板付近における深い窪み;ギャップジャンクション蛋白質のCX40アイソフォーム;不十分な筋原線維と多量のグリコーゲン。我々は、小(マウスとラット)、中(ウサギ)、大(イヌ)型哺乳類の右心室と左心室に自由走行するプルキンエ鎖の中のプルキンエ線維の超微細構造をT管の存在と分布に焦点を当てて電子顕微鏡により観察した。過去の研究に反して、我々は筋小胞体との間で通常のdyadを形成しているT管を発見し、その頻度は動物の大きさによって多様であった。T管とdyadsは、T管が全く観察されない個々のプルキンエ線維の短軸方向の側面部分に観察された。プルキンエ線維におけるT管の欠損は電気抵抗の減少に必要であり、これが活動電位の伝達を加速していると考えられる。これらは、小動物の心臓においては重要ではないと思われる。

(副論文)

3. Di Maio, A. and Block, B.A. (2008) Ultrastructure of the sarcoplasmic reticulum in cardiac myocytes from Pacific bluefin tuna. *Cell Tissue Res.*, 334, 121-134.

クロマグロは高い熱保護機構と吸熱能力を有する活動的な硬骨魚である。クロマグロの代謝は高いために、心筋層は広範囲に渡る温度において心拍出量を高く維持する必要がある。クロマグロの心筋細胞がその特徴的な心臓生理学にに対応する機構を明らかにするために、我々は心房細胞と心室細胞における内膜系とミトコンドリアの超微細構造を光学及び電子顕微鏡を用いて検討した。我々の研究の結果、青年期のクロマグロは2種類(compactとspongy)の心室筋の構成部分と心房筋において比較的、筋小胞体の量が多く、同時に多量のミトコンドリアを有することが明らかとなった。クロマグロの心筋におけるミトコンドリアの構造と分布は、心室筋のcompact層が心房と心室筋のspongy層に比較して大きな容量と低いクリステ密度を有することにより特異的な代謝領域を形成している。心筋細胞内においてジャンクションを形成している筋小胞体(SR)の存在とジャンクションを形成していないSRのネットワークの伸展は、筋原線維における速やかなCa²⁺供給を確実にしていると考えられる。細胞膜からのCa²⁺流入は、速やかな興奮収縮連関や、心筋の能力と心拍出の増加、低温での活動の維持に貢献していると考えられる。我々は、クロマグロの心筋におけるミトコンドリアの構

成と共に発達したSRの超微細構造の特性は、この硬骨魚において高い心拍数と吸熱機構を維持するために重要な進化のステップではないかと考えている。

1. Di Maio, A., Karko, K., Snopko, R.M., Mejia-Alvarez, R. and Franzini-Armstrong, C. (2007) T-tubule formation in cardiac myocytes: two possible mechanisms? *J. Muscle Res. Cell Motil.*, 28, 231-241.

We have followed the differentiation of transverse (T) tubules and of the associations between sarcoplasmic reticulum (SR) and either the plasmalemma (peripheral couplings) or the T tubules (dyads) in postnatal rat ventricular myocytes using electron microscopy. Dyads and peripheral couplings are collectively called Ca^{2+} Release Units (CRUs) because they are the sites at which Ca^{2+} is released from the SR. Profiles of T tubules, caveolae and dyads are mostly at the cell edge in early postnatal days and are found with increased frequency in the cell interior during the first two postnatal weeks. Using ferritin to trace continuity of T tubule lumen with the extracellular space, we find that some of T tubules (between ~6 and 25%), either singly or within dyads, lack ferritin in their lumen. The percentage of tubules that do not contain ferritin decreases slightly during postnatal differentiation and is not very different at the cells' edges and interior. We propose that T tubules form as invaginations of the plasmalemma that penetrate inward driven by accrual of membrane lipids and specific proteins. This occurs by a dual mechanism: either by the independent flow of SR and T tubule proteins into the two separate membranes or by the fusion of preformed vesicle tandems into the dyads.

Most of the CRUs (~86%) are constituted by peripheral couplings and ferritin containing dyads, thus constituting CRUs in which Ca^{2+} release from the SR is initiated by a membrane depolarization. In the remaining CRUs, activation of Ca^{2+} release must be dependent on some other mechanisms.

2. Di Maio, A., Ter Keurs, H.E. and Franzini-Armstrong, C. (2007) T-tubule profiles in Purkinje fibres of mammalian myocardium. *J. Muscle Res. Cell Motil.*, 28, 115-121.

Purkinje (P)-fibres are cardiac myocytes that are specialized for fast conduction of the electrical signal. P-fibres are usually defined as having the following identifying features: lack of T tubules; frequent lateral cell junctions; deep indentations at the intercalated discs level; the CX40 isoforms of gap junction proteins and, in large mammals, paucity of myofibrils and abundance of glycogen. We have examined the ultrastructure of P-fibres in free running P-strands from right and left ventricles of small (mouse and rat) intermediate (rabbit) and large (dog) size mammals focusing on presence and distribution of the T tubules. In contrast with previous studies, we find that P-fibres do have T tubules which form normal dyadic associations with the sarcoplasmic reticulum and that the frequency of tubules varies with the size of the animal. Profiles of T tubules and dyads are present over short segments of individual P-cells flanked by totally T tubule-free segments. It is thought that lack of T tubules in P-cells is necessary to reduce capacitance and thus accelerate action pot

ential spread. This may not be as important in a small heart.

3. Di Maio, A. and Block, B.A. (2008) Ultrastructure of the sarcoplasmic reticulum in cardiac myocytes from Pacific bluefin tuna. *Cell Tissue Res.*, 334, 121-134.

Pacific bluefin tuna are active teleost fish with a high capacity for heat conservation and endothermy. They have a high metabolism and hence the myocardium must be capable of sustaining elevated levels of cardiac output over a wide range of temperatures. To examine the way that the myocardial cells of bluefin tuna respond to their unique cardiac physiology, we have studied the ultrastructure of the internal membrane system and mitochondria of atrial and ventricular myocytes by the use of light and electron microscopy. Our results reveal that cardiomyocytes of juvenile bluefin tuna possess a relatively high content of sarcoplasmic reticulum (SR), together with a large volume of mitochondria within the two (compact and spongy) ventricular compartments and in the atrial myocardium.

The mitochondria structure and distribution in bluefin tuna myocardium follow specific metabolic zonation resulting in a higher volume and lower cristae density in the compact ventricular layer than in atrium and spongy layer. The presence of junctional SR profiles as well as an extensive network of free SR within cells may ensure a rapid delivery of Ca^{2+} to the myofibrils. This, in conjunction with the transsarcolemmal Ca^{2+} entry, might contribute to a faster excitation-contraction-relaxation cycle and thus enhance cardiac performances, cardiac outputs and the maintenance

e of excitability at low temperatures. We propose that the mitochondria configuration together with the developed SR ultrastructure of bluefin tunas myocardium, are important evolutionary steps for maintenance of high heart rates and endothermy in this teleost fish.

論文審査の要旨

論文提出者のAlessandro Di Maio氏は、筋細胞の興奮収縮連関のメカニズムを明らかにすることを目的として、興奮収縮連関の機能発現に直接関与する筋細胞内膜系やCa²⁺チャンネルの構造様式と機能的特性の関係を検討している。加えて、発生・発育・加齢などが筋細胞の興奮収縮連関の機能発現様式に及ぼす影響についても、筋細胞内膜系の形態変化と機能的変化を指標として分子・細胞生物学的手法を用いて検討している。今回提出された3本の論文の中で、主論文は、心筋細胞を対象として、誕生以降のT管の形態的特徴が形成されるメカニズムを電子顕微鏡を用いて明らかにした論文であり、副論文は、数種類の動物（イヌ、ウサギ、ラット、マウス）を対象として心筋細胞のPurkinje線維におけるT管の形態的特徴を明らかにした論文と、クロマグロの心筋細胞を対象として筋小胞体及びミトコンドリアの形態的特徴を電子顕微鏡及び共焦点顕微鏡を用いて明らかにした論文である。いずれの論文も骨格筋細胞に比較して研究が遅れていた心筋細胞を対象とした研究であり、骨格筋細胞とは異なる機能発現機構を有する心筋細胞の興奮収縮連関の機能解明に対して極めて貴重な基礎的資料を提供している。全ての論文がインパクトファクターを有する雑誌に掲載された原著論文であり、研究分野を同じくする関係者から高い評価を得ている。審査会においては、研究内容及び関連する研究について発表が行われ、続いて発表に対する質疑応答が行われた。研究内容に直接関係する質問に加え、心筋細胞の機能的特性の発育変化や、方法論に関する質問が出され、全ての質問に対して的確な回答を行った。なお、発表及び質疑応答は全て英語で行われた。