

最終講義 3

當瀬 規嗣 教授 (医学部医学科基礎医学部門細胞生理学講座)



略歴

[生年月日]

昭和 34 年 2 月 北海道滝川市に生まれる

[学歴・職歴]

- 昭和 52 年 3 月 札幌北高等学校卒業
- 昭和 59 年 3 月 北海道大学医学部医学科卒業
- 昭和 63 年 3 月 北海道大学大学院医学研究科修了
- 昭和 63 年 4 月 日本学術振興会 特別研究員 (PD) (～昭和 63 年 8 月)
- 昭和 63 年 9 月 北海道大学医学部薬理学第二講座 助手
- 平成 元年 8 月 米国シンシナティ大学医学部 客員研究員 (～平成 3 年 5 月)
- 平成 3 年 9 月 米国シンシナティ大学医学部 客員助教授 (～平成 8 年 8 月)
- 平成 6 年 4 月 札幌医科大学医学部医学科生理学第一講座 助教授
- 平成 10 年 10 月 札幌医科大学医学部医学科生理学第一講座 教授
- 平成 16 年 4 月 札幌医科大学国際交流部 部長 (～平成 18 年 2 月 28 日)
- 平成 18 年 3 月 札幌医科大学医学部 学部長 (～平成 22 年 3 月 31 日)  
札幌医科大学医学部附属臨海医学研究所 所長 (～平成 22 年 3 月 31 日)
- 平成 19 年 4 月 札幌医科大学監査室 室長 (～平成 20 年 3 月 31 日)
- 平成 20 年 4 月 札幌医科大学医学部医学科細胞生理学講座 教授  
札幌医科大学附属総合情報センター 所長 (～平成 26 年 3 月 31 日)
- 平成 21 年 4 月 札幌医科大学学生部 部長 (～平成 22 年 3 月 31 日)
- 平成 26 年 4 月 札幌医科大学国際交流部 部長 (～平成 30 年 3 月 31 日)
- 平成 30 年 4 月 札幌医科大学医学部教育研究機器センター センター長 (～令和 4 年 3 月 31 日)  
札幌医科大学医学部教育研究機器センターシステム管理部門 部門長  
(～令和 4 年 3 月 31 日)
- 令和 6 年 3 月 札幌医科大学医学部医学科基礎医学部門細胞生理学講座 定年退職

[資格・免許]

昭和 59 年 5 月 医師免許

昭和 63 年 3 月 医学博士

[主な研究分野]

生理学、薬理学、心臓電気生理学、イオンチャネル学

[所属学会・主な学会活動等]

日本循環器学会（北海道支部監事）、日本不整脈心電学会（北海道支部運営委員）、  
日本薬理学会、日本生理学会（大会主催 2 回）、北海道医学会（評議員）、American  
Association for the Advancement of Science、Biophysical Society

[受賞歴]

平成 5 年 北海道心臓協会伊藤記念研究助成

平成 7 年 第 16 回日本心電学会木村栄一賞

平成 7 年 日本心臓財団研究助成

平成 17 年 北海道医師会賞

平成 17 年 北海道知事賞

平成 24 年 札幌医科大学 ベストティーチャー賞

抄録

## 医学の基盤としての生理学の確立

當瀬規嗣

医学部医学科基礎医学部門細胞生理学講座

1994年、札幌医科大学の助教授に着任し、ちょうど30年間となる。その間に生理学研究を展開するにあたって、常に意識していたことは、医学の中での生理学の位置づけである。医学分野に与えられるノーベル賞の正式名称は「Nobel Prize in Physiology or Medicine」であり、生理学は医学と対等に扱われるべきものである。その生理学を医学部で教育研究を行うのであれば、生理学を攻究するだけでなく、医学へ全面的な貢献が必要不可欠である。

札幌医科大学で行ったイオンチャネル学の研究は、心筋細胞の興奮性の解明という範囲にとどまらず、血管平滑筋、子宮筋、脊髄神経、軟骨組織、そしてイオンチャネルの普遍的な構造活性連関、そして発生的アプローチからのイオンチャネル機能の解明と展開することとなった。つまり体全体で「動き」の源であるイオンチャネルの意義を知ることであった。

そして、その手法はより客観的で精密なものへシフトして、パッチクランプによるイオンチャネル活性の測定に始まり、フーリエ変換を用いた noise analysis、遺伝子工学によるイオンチャネルの構造活性連関、遺伝子改変による分析的イオンチャネル活性研究、カルシウム蛍光指示薬と共焦点レーザー顕微鏡による顕微測光法、in situ hybridization 法によるイオンチャネル分布分析、心筋細胞の RNA ライブラリーの作成、細胞外フラックスアナライザーを用いた細胞機能の分

析などを展開した。これらの研究においては常に細胞、組織レベルでの検討を意識し、生体機能への還元を追求し続けた。結果として、「カルシウムチャネルβサブユニットの機能」「ラット新生児でのT管と筋小胞体機能の変遷」「ラット胎児心拍動開始時期の同定と機能変化」などの研究を発表し、学界において高い評価を得るに至った。

そして、生理学の医学への貢献として生理学教育の充実を図った。生体機能を常に意識した生理学の授業を構築し、その一端を「clinical 生体機能学」として発刊することができた。また、南山堂医学大辞典の生理学分野での編集協力者に列していただいた。また、医学コアカリキュラムの札幌医科大学への導入に際し、対応したカリキュラムを構築し、その中に症候学として生理学と臨床医学のハイブリッドな講義を導入することができた。

大学全体での仕事としては、自己点検評価の開始、大学院再編計画の立案、地方独立行政法人化の作業調整、医学部長としての業務、教育研究機器センターでの大型研究機器整備予算の増額などにあたり、医学教育研究の場である大学の維持整備に努力した。

生理学の医学への貢献という観点では、まだまだ不足の面も大きいですが、後進に大いに期待し、一旦、不活性化しようと思うところである。

## 講義内容

令和6年3月末をもって、札幌医科大学を定年退職するにあたり、これまでの札幌医科大学での研究を中心に、振り返ってみたい。縁あって同じ電気生理学を専門されていた札幌医科大学医学部生理学第一講座の藪英世教授に招かれて、平成6年に札幌医科大学に移動した。そして、平成10年に藪教授の後任として生理学第一講座の教授に昇任した。30年間にわたる札幌医大での教育研究生活を振り返ると、あつという間の30年であった。

研究テーマは、研究生活の大半において「イオンチャネルの機能と構造の連関」である。イオンチャネルは、細胞の電気活動、すなわち興奮現象の源となるタンパク機能分子である。今でこそ、生物のあらゆる活動に大なり小なりかかわりがあることが分かっているが、私が北海道大学大学院医学研究科で研究を始めた頃は、イオンチャネルの存在が実体としてわかり始めた頃であった。イオンチャネルは電気を流すもので、証拠はまだないがタンパク分子らしい、という理解であった。したがって、動物、つまり神経や筋肉が動くのはこの分子のせいであるという期待があった。生理現象の根本をなすのはイオンチャネルではないかと考えた訳である。そこで、イオンチャネルの存在を私に教えてください、北海道大学医学部薬理学第二講座の菅野盛夫教授にお願いし、大学院で研究を始めた。新しい研究方法として開発されたパッチクランプ法を習得する道を開いてくださったのも菅野教授であった。教授のご紹介により、岡崎国立共同研究機構・生理学研究所の入澤宏教授のもとに大学院生の身分のまま、国内留学することができ、実際にパッチクランプ法を習得することが出来た。当時、世界でも数えることができる程度の限られた研究室でしか行われていなかった最先端の研究技術を大学院生のうちに修得できたことは、きわめて幸運であったと考えている。パッチクランプ法を含めた心臓電気生理学的手法により、その頃注目を集めていたプロテインキナーゼCやアドレナリン $\alpha$ 受容体刺激の心筋イオンチャネルに対する作用の検討を行い、学位論文をまとめることができた。プロテインキナーゼCを活性化するホルボールエステル (TPA) をモルモット心室筋細胞に投与すると、遅延整流性カリウム電流が増大した。(図1) この作用は細胞内還流法で心室筋細胞内にプロテインキナーゼCを直接投与することで再現された。(図2) 一方、このカリウム電流は細胞内カルシウムイオンを還流法で増加させると増大することから、プロテインキナーゼCとカルシウムイオンは相乗効果を示すことも分かった。(図3) イオンチャネルとプロテインキナーゼCという巨大分子同士の相互作用の一端を知ることができた訳である。

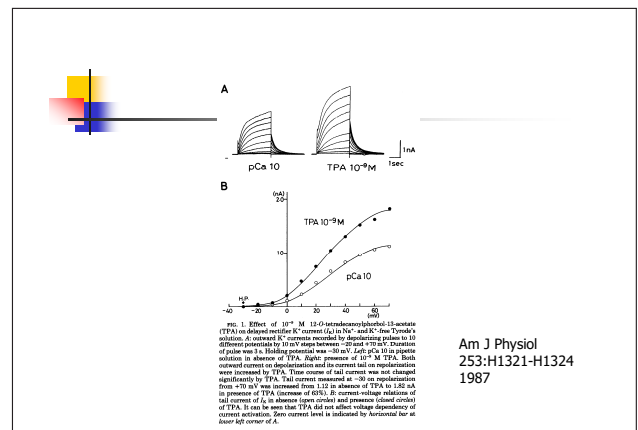


図1

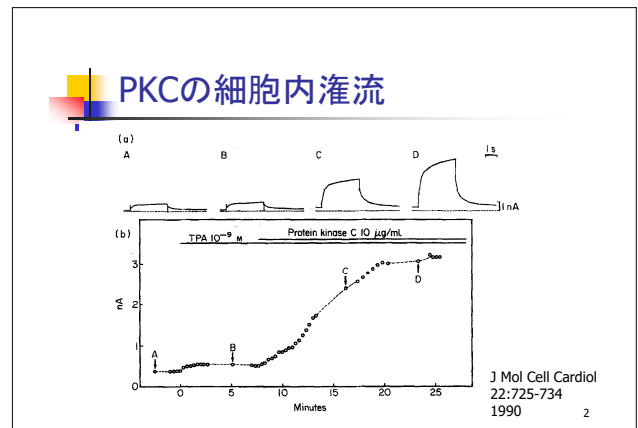


図2

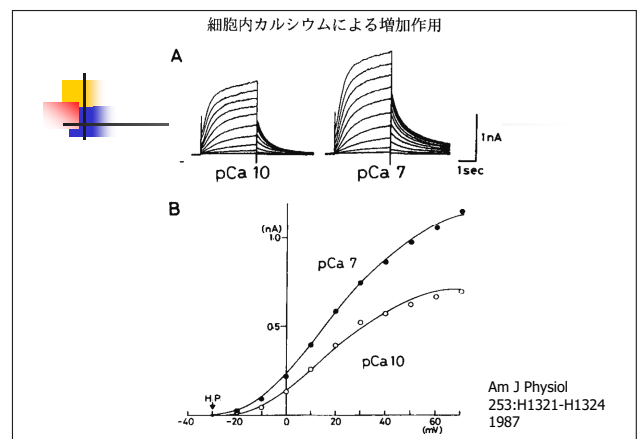


図3

その後、入澤先生のご紹介により、アメリカ合衆国シンシナチ大学生理学生物物理学講座に留学することになった。講座を主宰するチェアマンである Nicholas Sperelakis 教授のもとで、心臓電気生理学の研究を進めた。本格的なパッチクランプ実験装置をシンシナチ大学に導入して、発生期心筋のイオンチャネルの性質についての研究を行った。Sperelakis 教

授の全面的協力により、約二年間の留学中に7編のファーストオーサー論文をJ Physiol, Am J Physiol, Circ Resなどのコアジャーナルに発表することが出来た。その代表的な研究として、ラット胎児心筋で発見した、いわば胎児型といえるカルシウム電流のデータを示す。(図4)

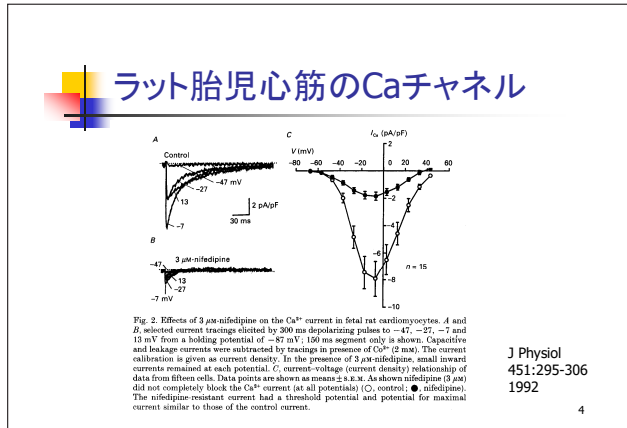


図 4

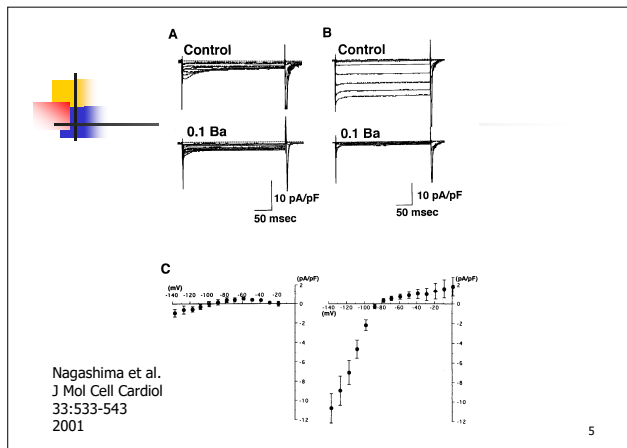


図 5

札幌医科大学に移動後、イオンチャンネルの機能をタンパク構造と関連づけて研究することの必要性を実感し、イオンチャンネル遺伝子のクローニング、細胞への遺伝子の導入、など分子生物学的手法を取り入れ、これとパッチクランプ法による機能解析を組み合わせ、イオンチャンネルの実像に迫ることを考えた。とりわけ、米国で得た発生期心筋細胞へのアプローチを材料として、発生期心筋の興奮収縮連関の成立過程や心臓自動能開始機構の解明に挑むこととした。興奮収縮連関や心臓自動能においてイオンチャンネルがどのような役割を果たしているのか明らかにしようと考えた訳である。

まず、ラット発生期心筋において大きく変化する内向き整流性カリウムチャンネルの遺伝子発現と電流量を比較して、特定のサブタイプ (Kir2.1) のみ発生期に増大することを発見した。(図5、6) また、ラット発

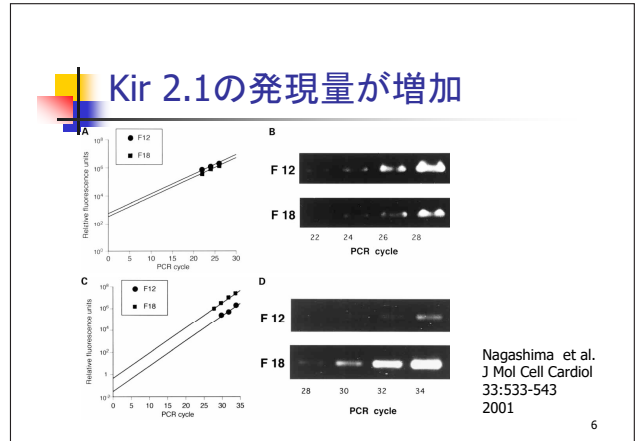


図 6

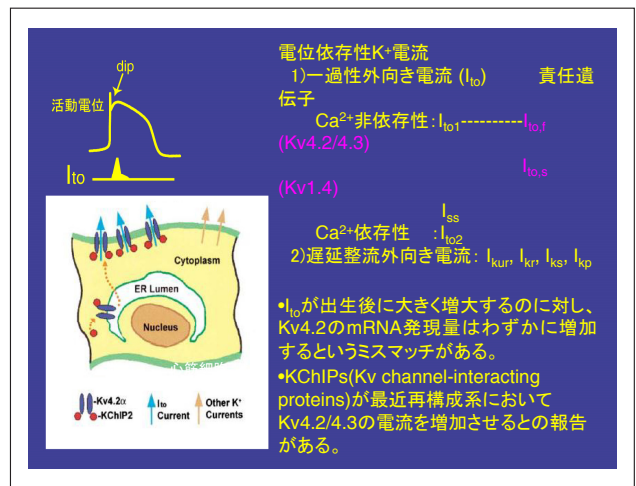


図 7

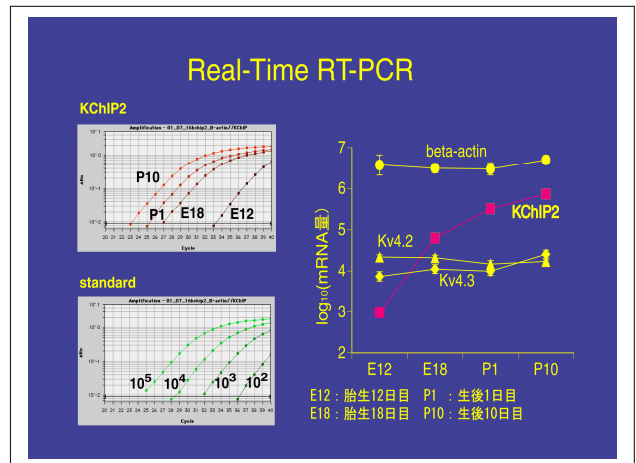


図 8

生期に比較的長い活動電位幅が誕生後に急速に短くなることが分かっていたが、その理由が、活動電位幅を規定する一過性カリウムチャンネルの増大であると考えられていた。(図7) しかし、このチャンネルの $\alpha$ サブユニットをコードする遺伝子の発現量は誕生前後で変



化していないことが分かった。(図8) 一方、同じチャンネルのβサブユニットの発現が、誕生後に急速に増大することが分かった。(図8) そこで、誕生前の心筋細胞にアデノウイルスを用いてβサブユニットの遺伝子を導入すると一過性カリウムチャンネルの電流が測定できるようになり、βサブユニットの発現が誕生後の活動電位短縮の原因であることを証明した。(図9)

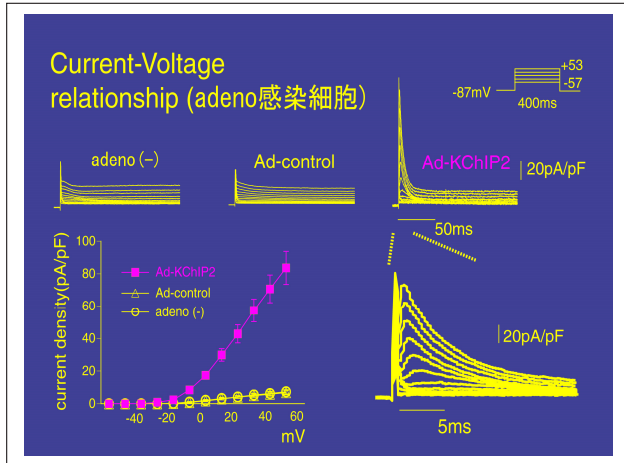


図9

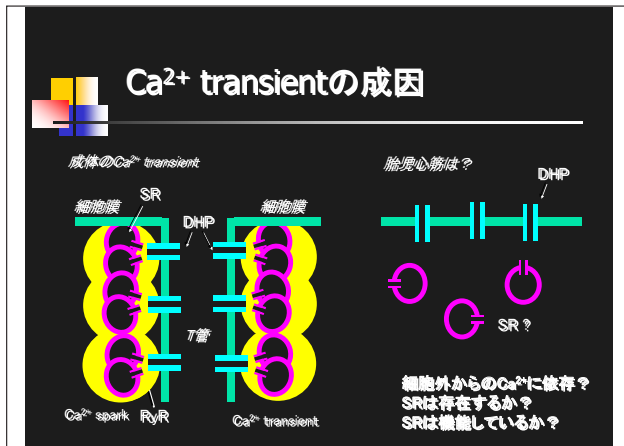


図10

一方、ラット胎生期から新生児期にかけて、興奮収縮連関に大きな変化があることが細胞の構造から予想された。成体の細胞内カルシウムの急激な増大、すなわちカルシウムトランジェントはT管のジヒドロピリジン受容体(カルシウムチャンネル)と筋小胞体のリアノジン受容体の連関によって起こるのであるが、誕生前の心筋細胞ではT管も筋小胞体も明確には観察できず、カルシウムトランジェントが起こるのかも分かっていなかった。(図10) そこで、カルシウムトランジェントをカルシウムイオン蛍光指示薬の顕微測光による直接的な観察を行った。カルシウムトランジェントが胎生期は比較的ゆっくりとした変化であるのに、誕生後の1週間の間に急速な変化に転じて

いくことを明らかにした。(図11) ジヒドロピリジン受容体とリアノジン受容体の連関は、カルシウムイオンの局所的増加(カルシウムスパーク)を観察することでわかるのであるが、このカルシウムスパークは、胎生の心筋細胞では観察できず、成体では通常に観察できる。(図12) そして、カルシウムスパークは、誕生後1週間で観察できるようになり、その後、増大することも明らかになった。(図13) これは、筋小胞体およびT管の発達が誕生後1週間の間に起こることが原因であると明らかにした。(図14, 15)

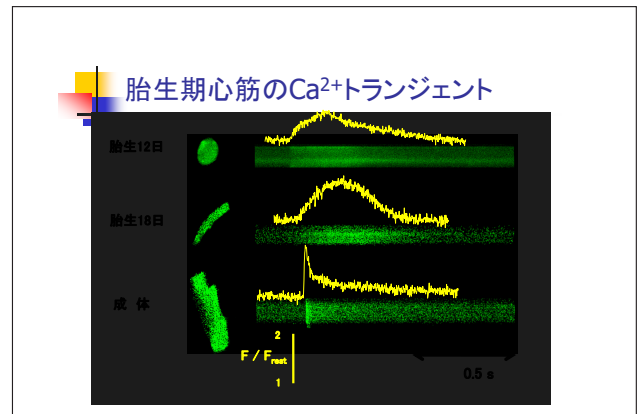


図11

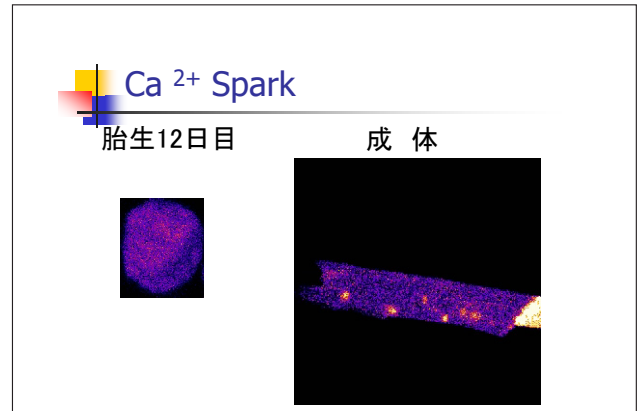


図12

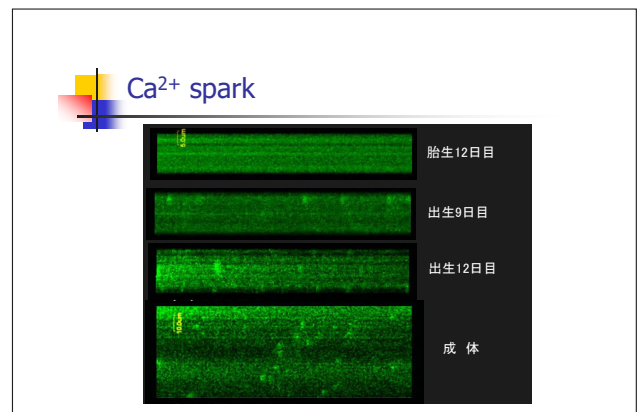


図13

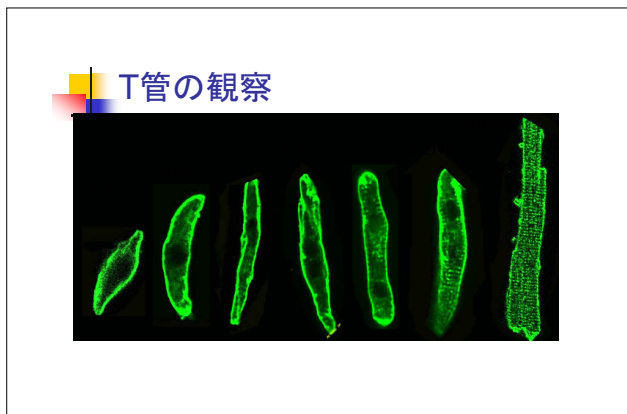


図 14

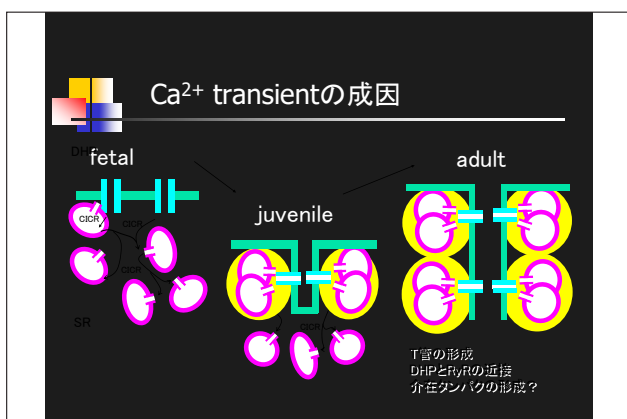


図 15

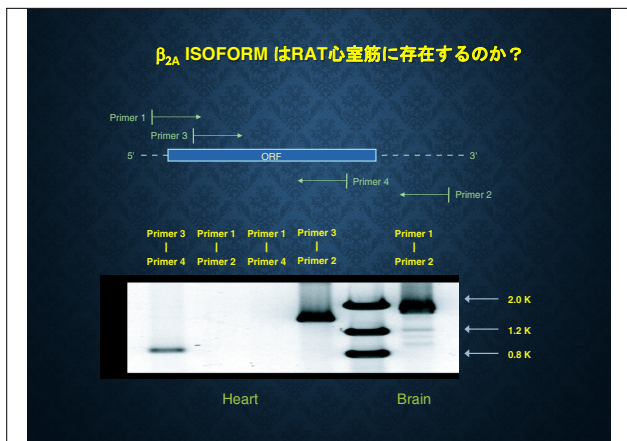


図 16

発生期の現象とは直接関係はないが、ラット心筋のL型カルシウムチャンネルが、これまで言われていたβ2aサブユニットでは説明できないことに気づいた。(図16) ノーザンブロット等の解析により、β2cサブユニットがL型カルシウムチャンネルの構成サブユニットであることを見出しました。(図17) そこで、培養細胞への発現とパッチクランプ法により、このサブユニットが実際に働いていることを証明した。(図18) さらに、シングルチャンネルの活動を記録し、

β2cサブユニットがNativeのチャンネル活動を再現できることも証明した。(図19)



図 17

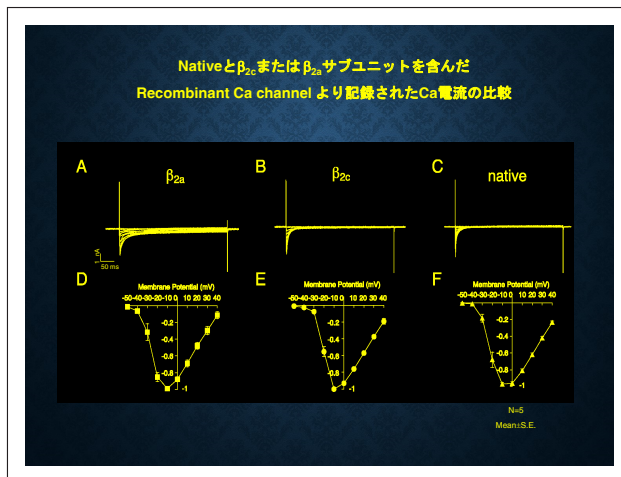


図 18

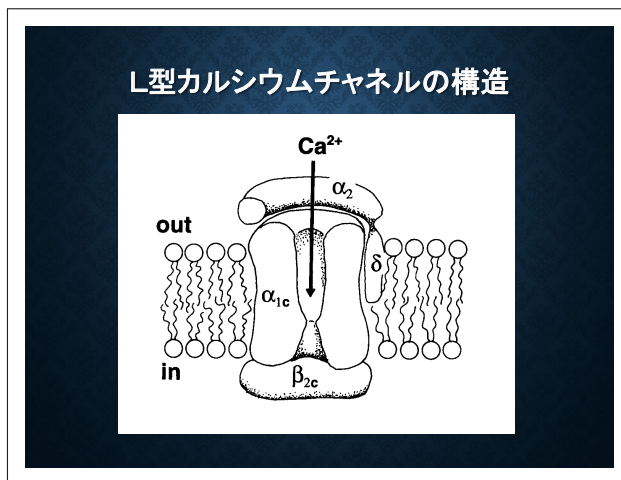


図 19

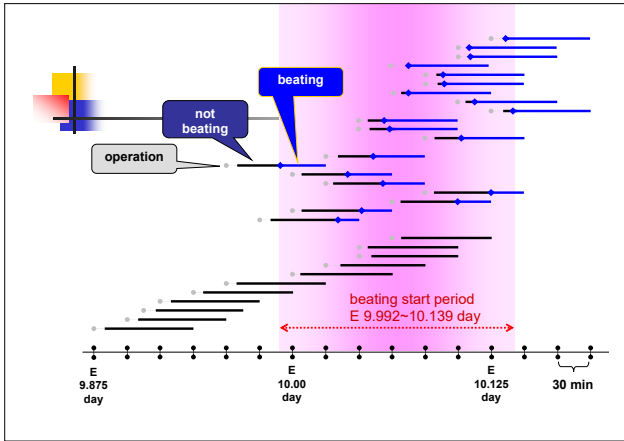


図 20

こうした研究成果は、共同研究者である教室員のメンバーの多大なる努力により実現したことは言うまでもない。また、臨床の各講座から学位研究のために多くの研究者が参加してくれた。その成果は、麻酔学講座との微小血管における内皮依存性拡張反応の研究、外科学第二講座との肺高血圧症での肺動脈収縮機構の解明、整形外科学講座との神経根結紮モデルによる神経根性疼痛における痛覚神経の過敏性に関するパッチクランプによる電気生理学的検討、内科学第二講座との糖尿病モデルラット心筋での一過性外向きカリウムチャネルの減少の発見など、多くの博士論文となって発表された。

最近では、ラット心拍動開始機構の解明に着手した。旧来から心臓の発生のごく初期に心拍動が開始されることは分かっていたが、それがいつなのか、正確には観察されていなかった。そこでまず、これを明らかにするために長時間の顕微鏡下での心臓発生領域のビデオ撮影を繰り返した。その結果、受精後10日目 (E10.0) のごく初期の時間帯に心拍動が開始されることが分かった。(図 20) そこで、カルシウム蛍光指示薬を心臓発生領域に負荷して観察すると、やはり、同時期にカルシウムトランジェントが生じていることが分かった。(図 21) 双方の実験を併用すると、まず、カルシウムトランジェントが心臓原基全体に起こり、その後に実際の筋収縮、すなわち拍動が心臓原基の中央部分から起こり、次第に原基全体に広がっていくことが明らかになった。(図 22) この研究は、哺乳類動物の心臓拍動開始時期を正確に解明した初めての研究となった。

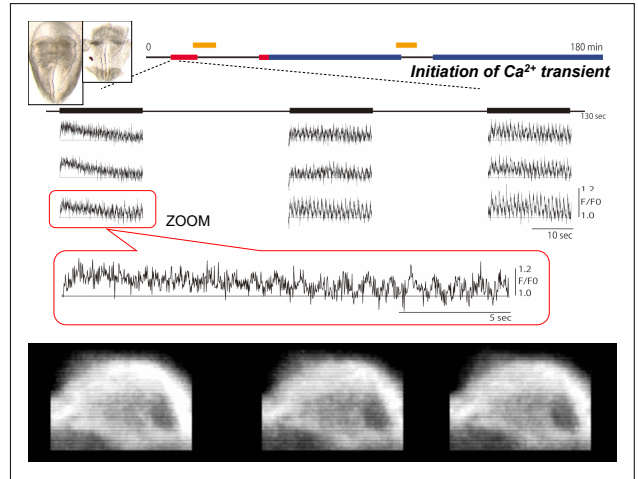


図 21

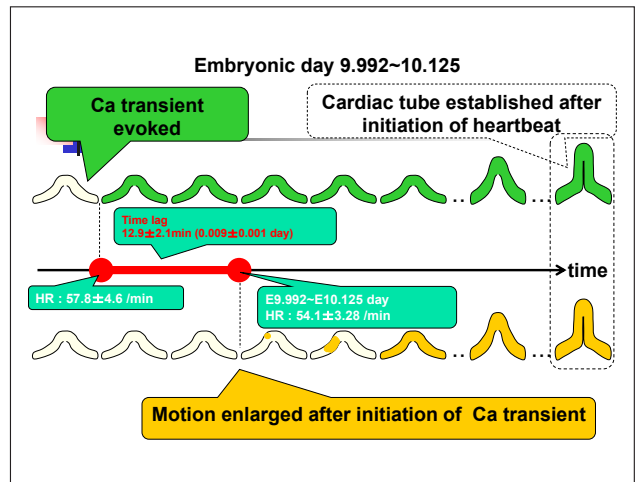


図 22

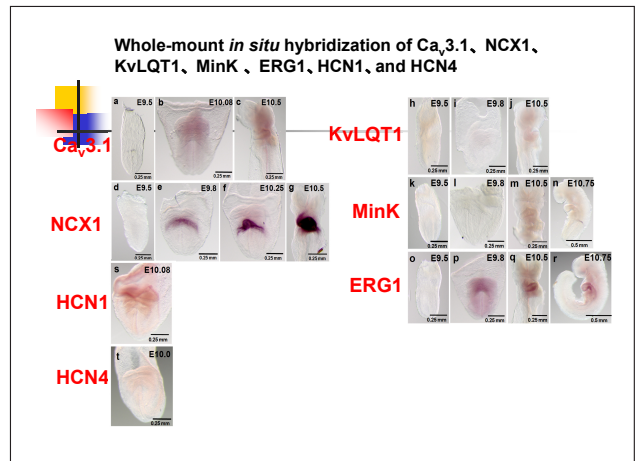


図 23



次に、この拍動開始にかかわるイオンチャネルを明らかにするために、候補になりうるイオンチャネルの遺伝子発現を、心臓原基における *in situ* ハイブリダイゼーション法で検討した。(図 23) これまで、成体で心臓の自動能に関連するとされている T 型カルシウムチャネル Cav3.1、ナトリウム-カルシウム交換系 NCX1、遅延整流性カリウムチャネル KvLQT1 とその  $\beta$  サブユニット MinK、遅延整流性カリウムチャネルの rapid 型 ERG1、過分極誘発性内向きチャネル HCN1 および HCN4 の遺伝子発現を発生期の心臓全体で染めてみたが、心拍動開始 (E10) 前後に急激に発現が増える遺伝子はなく、そのことは RT-PCR 法による。RNA の定量でも確かめられた。(図 25、26)

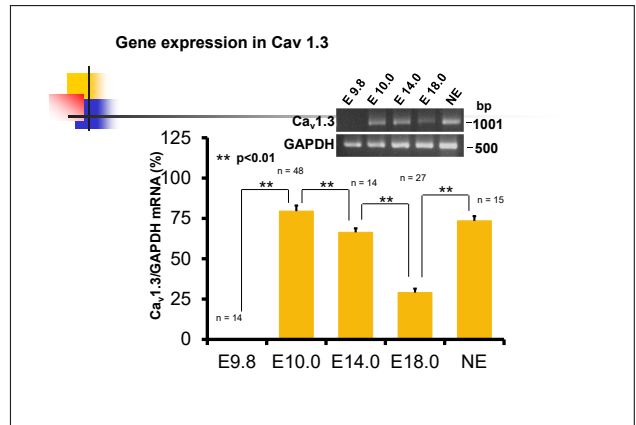


図 27

一方、L 型カルシウムチャネルのサブタイプである Cav1.3 の遺伝子発現だけ、心拍動開始時期の E10 前後で極端な発現の増大が、*in situ* ハイブリダイゼーションと RT-PCR 法で確認された。(図 24、27) 検討したすべての遺伝子の心臓発生領域での遺伝子発現の変化を図 28 にまとめる。こうして、拍動開始の主導権を握っているのは、L 型カルシウムチャネルの Cav1.3 であることを見出し、T 型カルシウムチャネルや過分極誘発内向きチャネルの変動には、拍動開始に対する説明力はないことも明らかになった。

そこで、心拍動開始直後の心臓発生領域の心臓原基細胞を単離し、パッチクランプ法にて Cav1.3 が存在するかどうか確認をした。図 29 のように Cav1.3 は他の L 型カルシウムチャネル (Cav1.2) に比べて、閾電位が過分極側によっており、自動能に対する関与がより大きいと考えられるチャネルである。パッチクランプにより、小さいながらカルシウム電流が観察された。(図 30) この電流の電流-電圧特性は Cav1.3 と一致しており。(図 31) Cav1.3 に特異的に抑制効果を示す低濃度の  $\text{Ca}^{2+}$  イオンにより消失した。(図 32) 以上の結果により、心拍動開始を引き起こすカギになるイオンチャネルは L 型カルシウムチャネル Cav1.3 である可能性が非常に高くなった。

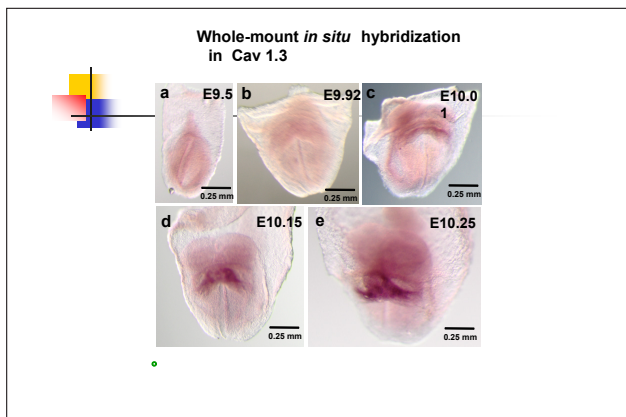


図 24

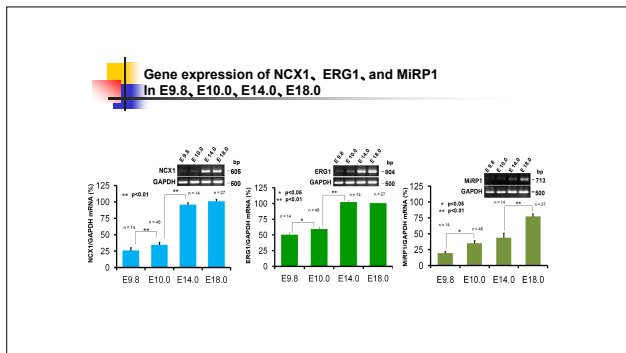


図 25

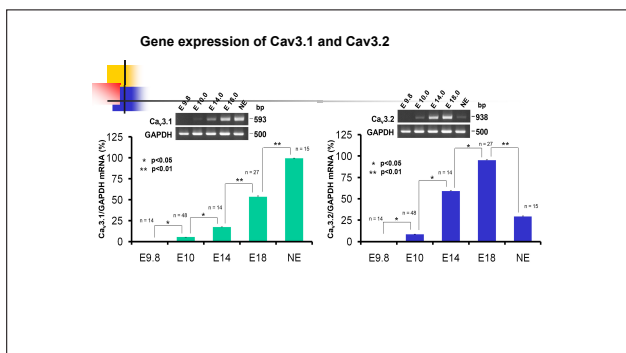


図 26

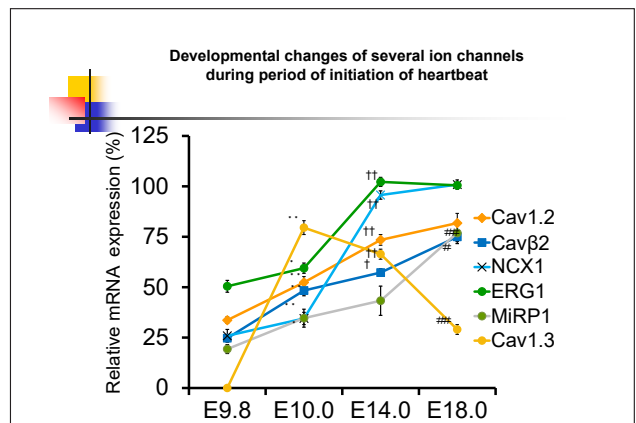


図 28

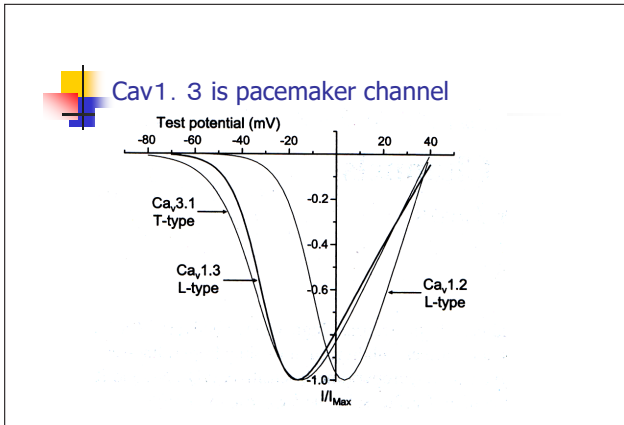


図 29

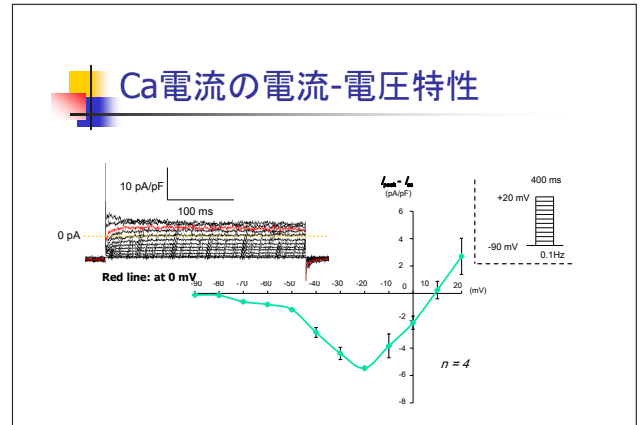


図 31

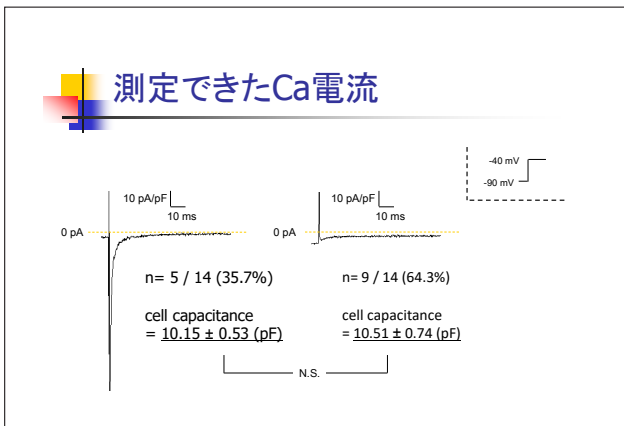


図 30

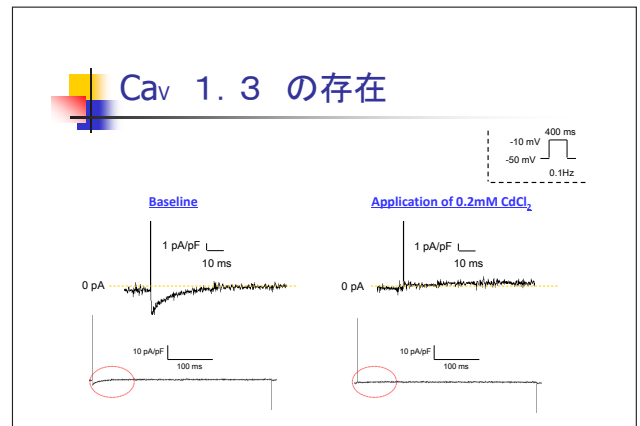


図 32

これまでの研究により巨大分子であり、かつ、非常に速く動く機能分子であるイオンチャネルと他の酵素などの機能分子との相互作用を多くの生命現象におい

て証明することができた。巨大分子の相互作用は、人を初めとする多くの動物の生命現象の根幹を担うものであると考えている。