

ゼブラフィッシュ仔魚における運動強度に
応じた速筋の活動パターンの解析

Spatially ordered recruitment of fast muscles in accordance with
movement strengths in larval zebrafish

総合研究大学院大学

生命科学研究科 基礎生物学専攻

基礎生物學研究所

神経行動学研究部門

清水 彩杏

目次

序論	3
結果	6
考察	13
結論	18
材料と方法	19
図の説明	24
参考文献	52
謝辞	56

序論

動物は様々な筋肉を使うことで、例えば、歩く、速足で歩く、走るなど、様々な強度の運動を行う。脊椎動物の骨格筋は、収縮速度が遅い遅筋線維と収縮速度が速い速筋線維という2種類の筋線維から構成されることが広く知られている[1, 2]。哺乳類では、速筋線維はさらに、より疲労しやすいFF型と、比較的疲労しにくいFR型の2つのサブタイプに分けられる[3]。異なるタイプのそれぞれの筋線維は、それぞれ異なるタイプの運動ニューロンによって支配され、一つの運動ニューロンとそれが神経支配する筋線維群をセットとして、運動単位を形成する（図1）。様々な運動単位の動員により、多様な強度と速度の運動が生み出される[4]。収縮が速い速筋型の運動単位は高速の運動や強度の高い力を発揮し、収縮が遅い遅筋型の運動単位は低速の運動や強度の低い力を発揮する[5, 6]。速筋型の運動単位は遅筋型の運動単位に比べて、運動ニューロンの大きさ、筋線維の大きさ、神経支配する筋線維の数のいずれもが大きいという傾向がある [7, 8]。多くの場合では、低強度の運動から高強度の運動というように、運動の強度や速度が増加すると、既に活動している運動単位に加えて新たな運動単位が動員される。また追加される運動単位の大きさは、元々活動しているものよりも大きいことが知られている（図2）。これはサイズの原理と呼ばれている[8, 9]。このことから、低強度の運動では主に遅筋線維が動員され、運動強度が高まるにつれて速筋線維の動員が増えていくといえる。

哺乳類では、速筋線維と遅筋線維が一つの筋肉の中で混在している（図3）[7]。それに対して、魚類の体幹筋の構造は全く異なっており、速筋線維と遅筋線維は空間的にはっきりと分かれている。薄い遅筋が分厚い速筋を覆うように位置しているため、魚類の体幹筋の大部分は速筋線維で構成されているといえる（図4）。低速遊泳時には遅筋が動員され、高速遊泳時にはそれに加えて速筋も動員されることが知られているため、魚類の筋肉の動員パターンもサイズの原理に従っているといえる[10, 11]。しかし、運

動の速度や強度は単純に「遅い・弱い」／「速い・強い」の2種類に分けることはできず、非常に連続的である。だが、そのような運動時の体幹筋の活動は明らかではない(図5)。低強度の運動では遅筋のみが動員されるが、運動強度を連続的に上げていくには、それまで活動していなかった新たな運動単位を徐々に追加で動員していく必要があると考えられる。そうであるなら、体幹筋の大部分を占める巨大な速筋は、運動強度に応じてどのように動員されていくのかというのは非常に重要な問題となる。

そこで本研究では、魚類における運動強度に応じた速筋の動員パターンはどのようなになっているのかということを明らかにする。速筋の動員パターンには、様々なものが考えられる(図6)。例えば、何も空間的なパターンは無くランダムに、速筋全体の中で動員される運動単位の数を増やすことによって運動強度を上げる場合や、低強度の運動では速筋のうち外側のみが活動し、運動強度が高まるにつれて徐々に内側まで動員される場合、あるいは、その逆の方向に動員範囲が増えていく場合というように、実に様々なものが考えられる。ここで、低強度の運動では外側にある遅筋のみが活動し、高強度の運動では内側にある速筋までもが活動するということから、外側の遅筋が最も頻度よく使われるといえる。そうすると、体の一番外側を使うことには、遅い運動や弱い運動を生み出すためにエネルギー的あるいは力学的な何らかのメリットがある可能性が示唆される。もしそうであるならば、遅筋のみが活動するような低強度の運動よりも、やや強度の高い運動が必要なときには、遅筋に加えて、遅筋と隣り合っている最も外側に位置する速筋が最初に使われることが考えられる。この考えをさらに発展させると、さらにもう少し強度の高い運動が必要なときには、遅筋と先ほどの速筋に加えて、速筋のさらに内側が加勢していく、というように、速筋の中には空間的に秩序だった動員パターンが存在し、運動の速さや強度が高まるにつれて、外側から内側へと徐々に動員が増えていくことが予想される(図7)。実際に、ニジマスの成魚を用いて筋電図を記録した研究ではこの考えが支持されており、外側に位置する速筋は速い遊泳で活動するが、

最も内側に位置する速筋はこの遊泳時には活動せず、魚が生み出すことのできる最も強い運動である逃避運動のときにのみ活動することが実証されている[12]。

ゼブラフィッシュ仔魚の運動ニューロンにおける生理学的調査とともに、神経解剖学的研究もまた、筋肉における空間的に秩序だった動員パターンを支持している[13-15]。これらの研究では、運動ニューロンの大きさによって神経支配領域に空間的な順序があることが示されている。最も大きな運動ニューロンは速くて強い運動に関与し、内側から外側にかけての速筋の領域全体を支配する。運動ニューロンのサイズが小さくなると（したがって運動ニューロンが制御する運動の速さや強度が低くなると）、その神経支配領域は筋肉の外側部分に限定される傾向がある。これらの研究は、速筋における空間的な動員パターンの存在を示唆しているが、あくまで運動ニューロンの結果であるため、様々な速度と強度の運動における動員パターンを、筋肉側から直接的かつ体系的に分析することは未だ行われていない。そこで本研究では、ゼブラフィッシュ仔魚を用いた Ca^{2+} イメージング記録と電気生理学的手法という2つの相補的なアプローチでこの問題に取り組んだ。そして両手法から得られた結果は、速筋における空間的に秩序だった動員パターンの考えを支持するものであった。

結果

様々な強度の運動中の速筋の Ca^{2+} イメージング記録

様々な強度の運動中の速筋の空間的な活動パターンを調べるために、遺伝的にコードされたカルシウムインジケータ-jGCaMP7f [16]を速筋で発現する Tg(*actc1b*:jGCaMP7f)トランスジェニック魚を作製した (*actc1b* プロモーターは速筋でのみレポーター遺伝子の発現を駆動し、遅筋では駆動しない; 図 4)。5dpf(受精後 5 日目)の Tg(*actc1b*:jGCaMP7s)の仔魚を、シャーレにアガロースゲルで包埋した。このシャーレを、振動刺激を与えるためのオーディオスピーカーを取り付けたプレートの上に置いた (図 8A)。さらに、プレートの下にスクリーンを置き、プロジェクターで視覚刺激 (縦横方向に動く白黒模様) を映し出した (図 8A および図 9)。プレートを共焦点顕微鏡の下に置き、魚の背側から筋肉を垂直に観察した (図 8B)。魚の尾部はアガロースから切り出して解放し、尾の運動をハイスピードカメラで下から撮影できるようにした (図 8B および図 9)。本研究では 3 つの異なる種類の運動中の速筋の空間的な活動パターンを解析することを目的とした: (1)突然の振動刺激によって誘発される逃避運動 [17-19]、(2)横方向に動く縞模様の視覚刺激によって誘発されるターン運動 [20]、(3)前方に動く縞模様の視覚刺激によって誘発される低速度遊泳 [20]。これまでの行動研究から、尾部運動の角速度がこれらの運動の種類によって大きく異なることが示されている [21]。まず、この実験装置が期待される運動を確実に誘発できるかどうかを確認した。突発的な振動刺激は常に強い尾の運動を誘発し (図 10A)、逃避運動の誘発に成功した。横方向に動く縞模様を用いた視覚刺激では、時折大きな尾の運動が見られ (図 10B)、ターン運動の発生が示唆された。ターン運動の角速度は逃避運動の角速度よりも小さかった (図 10D)。前方に動く縞模様を用いた視覚刺激では、数百ミリ秒持続する周期的な尾部振動を特徴とする低速度遊泳がしばしば誘発された。これらの尾部運動の角速度は、3 種類の運動

の中で最も小さかった（図 10C と D）。これらの結果は、実験装置が逃避運動、ターン運動、低速度遊泳をうまく誘発したことを示している。観察された角速度から、体幹筋の運動強度は、逃避運動、ターン運動、低速度遊泳の順に高いことが分かった。図 11A1 は、逃避運動の Ca^{2+} イメージング実験の代表例である。頭部から 12-14 番目の筋節部分の脊髄とともに、左右両方の筋肉を 10fps で撮影した（図 8B 参照）。上段（t1）は逃避前の画像。中段（t2）は逃避運動が起こったときの画像。共焦点顕微鏡の X-Y 画像は、上（吻側）から下（尾側）へ順次移動する水平走査線（X 軸）で構成されている。逃避運動は、フレームの上部～20%がスキャンされた時点で開始された（「escape」と表示）。逃避運動の際、右の筋肉の広い範囲で大きな蛍光強度の変化が観察され、速筋領域全体が活動していることが示された。下のパネル（t3）は、右の筋肉の蛍光強度がベースライン付近に戻ったときの画像である。空間的な活動パターンを定量化するために、速筋を外側、中間、内側の 3 つの領域に分け（図 11A1、上）、それぞれの領域について蛍光強度を測定した。図 11A2 は、外側、中間、内側領域の蛍光強度の時間変化を示している。逃避運動時には、3 つの領域とも蛍光強度が明らかに増加した。内側領域は最も大きな変化（ $\Delta F/F_0$ で 1.8）を示し、外側領域は最も小さな変化（ $\Delta F/F_0$ で 0.4）を示した。この傾向は集団データでも一貫していた（図 12A1）。グラフの点は個体ごとに異なる色を使って示している。すべての試行（8 匹で $n=8$ ）において蛍光強度は 3 つの領域すべてで増加し、変化（ $\Delta F/F_0 \text{ Max}$ ）は内側領域で最も大きく、外側領域で最も小さかった。図 11B1 は、ターン運動の代表例を示している。ターンは 2 コマ目（t2）のスキャン終了間際に発生した（「turn」と表示）。ターン運動の持続時間が約 30ms であることから（図 10）、「ターン」は次のフレーム（t3）にも及んだ。ターン運動の際、右の筋肉の外側領域で蛍光強度の明らかな増加が観察された（図 11B1、t3）。定量化の結果、外側領域に加え、中間領域でも蛍光強度のわずかな増加が認められた（図 11B2）。対照的に、内側領域では強度の変化はわずかであった。この傾向は集団データでも一貫

していた（図 12A2）。すべての試行（8 匹でそれぞれ 1 回ずつ）において、蛍光強度の有意な増加が外側領域で認められた。中間領域は中程度の増加を示したが、内側領域は 8 試行中 3 試行で非常に小さな増加（0.2～0.4）を示した。残りの 5 つの試行では、強度の変化はノイズレベル（0.1 程度）であった。図 11C1 に遊泳の代表例を示す。2 枚目のパネル（t2）は、魚がスキャン中に一貫して遊泳を行った画像で、「swimming」と表示している。この画像では、筋肉の両側の外側領域で蛍光強度が増加した（図 11C1、t2）。図 11C2 は、蛍光強度の時間経過を示したもので、2 回の遊泳が起こった（図の下部に swimming と表示）。各遊泳中、蛍光強度の増加は外側領域で見られた。対照的に、中間領域と内側領域では蛍光強度の変化はほとんど見られなかった。この傾向は集団データでも一貫していた（図 12A3）。すべての試行（8 匹でそれぞれ 1 回ずつ）において、蛍光強度の増加は外側領域では見られたが、中間領域と内側領域の強度変化はノイズレベル（0.1 程度）にとどまり、これらの領域の速筋は低速度遊泳中に動員されなかったことが示唆された。これまでの結果では、運動の種類ごとの筋肉の空間的な活動パターンを説明しただけで、異なる運動の種類にまたがる筋肉の活動の振幅については触れていない。このことを明らかにするために、3 つの運動タイプにわたって各筋肉部位の蛍光強度変化をプロットした（図 12A1-A3 では縦軸の目盛りが異なるため、運動間の活動の振幅を直接比較することが難しいことに注意）。図 12B1-B3 に示すように、筋肉活動の振幅は 3 つの筋領域すべてにおいて逃避運動時に最も大きかった。さらに、これは外側領域でも同様であり、逃避運動中（図 11A2 および 12A1）には 3 つの領域の中で最も低い活性を示したものの、それでもターン運動中や低速度遊泳中に観察された活動振幅よりも高い振幅を示した（図 12B1）。まとめると、Ca²⁺イメージング実験により、速筋における明確な空間的動員パターンが明らかになった（図 13）。低速度遊泳時には、速筋の外側領域のみが活動した。ターン運動時には中間領域と外側領

域の両方が活動し、逃避運動時にはすべての領域が活動した。さらに、それぞれの領域において、筋肉の活動レベルは運動の強度とともに増加する傾向があった。

仮想遊泳中の速筋の電気生理学的解析

Ca²⁺イメージング実験では、仔魚の吻部をアガロースゲルに埋め込んだ。この状態では、魚は最大尾部振動周波数（以下、遊泳周波数と呼ぶ）が通常 30Hz 程度のゆっくりとした遊泳しか行わない[22]。一方、自由な条件下では、仔魚は 65Hz を超えるような非常に高い遊泳周波数で泳ぐことができる[14, 21-23]。Ca²⁺イメージングのセットアップにはこのような技術的制約があるため、高周波数で遊泳中の速筋の活動パターンを調べることはできなかった。この制約を回避するために、不動化された状態で遊泳に関連する神経細胞や筋肉の活動を示す、仮想遊泳中の速筋の電気生理学的解析を行った。仔魚は仮想遊泳状態において、幅広い遊泳周波数を示す[14, 24]。筋活動の記録には、カルシウムチャネルであるジヒドロピリジン受容体（DHPR）の欠損により、Ca²⁺イオンを放出することができないため筋肉が不動である *relaxed* 変異体を用いた [25, 26]。DHPR の欠損は筋の膜電位ダイナミクスに影響を与えないため[27]、仮想遊泳中の筋肉の電気的な活動を調べることもできた。*relaxed* 魚の筋細胞は 4dpf で退化し始めるため、3dpf の仔魚を用いて電気生理学的実験を行った。筋肉の空間的な活動パターンを調べるために、異なる深さ（表層と、より内側）に位置する 2 つの筋細胞について、同時にホールセルパッチクランプ記録を行った。しかし、ペアのパッチ記録の結果を説明する前に、まず最も表層にある速筋細胞（layer 1 または L1；3dpf 仔魚の速筋の構造については図 14 を参照）からの単一記録について示し、遊泳中の電気生理学的記録に速筋の電気的な活動がどのように現れるかを説明する。図 15 に記録例を示した。外部刺激がない場合、仔魚は周期的な膜電位振動を特徴とする自発遊泳を時々行っていた（図 15A、上段）。拡大図（下段）では、周期的活動電位（最初の 4 つの鋭いピーク）と閾値に達

さない終板電位（EPP；矢尻で示す）が明らかである。これらの EPP には、隣接する速筋細胞から発生する電氣的結合電位が寄与している可能性がある [28]。速筋が閾値以下の EPP を示す間、魚は泳ぎ続けることが速筋と遅筋からのペア記録によって確認された（図 16、矢尻）。速筋が周期的な EPP 振動を示すとき、遅筋ははっきりとした電氣的活動を示した。遊泳周波数に対応する膜電位振動周波数は、遊泳のはじめに高くなり、遊泳が進むにつれて徐々に低下する傾向があった。これに対応して、速筋活動はスパイクから閾値以下の EPP にシフトした。例えば、図 15A の下段では、最初の 4 サイクルで筋肉活動が急上昇し、残りのサイクルで閾値以下の EPP に移行した。自発遊泳中の遊泳周波数は通常 25～40Hz の範囲であるが、より高い遊泳周波数を誘発するために仔魚の尾に電気刺激を加え、自発的な遊泳よりも活発な遊泳を誘発し（誘発された遊泳;図 15A と図 15B で筋肉スパイク活動を比較）、周波数を 40～70Hz に達させた（図 15B、下段）。自発的な遊泳と誘発された遊泳の両方からデータを収集することにより、幅広い遊泳周波数にわたる速筋の動員パターンを分析することができた。図 17 には、表層（L1）と深層（L2、L3、L4）の速筋からのペア記録の代表的な例を示した。左のパネルには自発的な遊泳時の記録を示し、右のパネルには誘発された遊泳時の記録を示した。すべてのパネルで、より深い層(L2、L3、および L4)の筋肉は、L1 の筋肉よりも早くスパイクから閾値以下の EPP に移行したことが示された。例えば、図 17A(左パネル)では、L1 の筋肉は最初の 5 サイクルでスパイク活動を示したが、L2 の筋肉は最初の 4 サイクルでスパイクした。これは遊泳周波数が徐々に低下するにつれて、L2 が L1 の前に活動終了することを示唆している。また L1 と L3(図 17B)、L1 と L4(図 17C、右パネル)のペア記録でも同様の傾向が見られた。さらにより深層の速筋は徐々に高い遊泳周波数で活動終了していくという、整然とした動員パターンが見られた(比較のために、各層が活動終了した遊泳周波数を各パネルの下に記載した)。特に、自発的な遊泳中には L4 がまったく活動しなかった(図 17C、左パネル)。これらの結果は、速筋の中に連

続的な活動パターンが存在することを強く示唆しており、遊泳周波数が低下するにつれて筋動員が整然と減少していくことが考えられる。速筋の動員パターンを定量的に解析するために、各筋肉層における遊泳周波数とスパイク活動の確率との関係を系統的に調べた。遊泳周波数を 10Hz ごとにグループ化し、各周波数範囲でのスパイクの確率を筋肉の層ごとにプロットした(図 18)。9 つのペア記録(L1 と L2 を 3 つ、L1 と L3 を 3 つ、L1 と L4 を 3 つ)の結果、明確なパターンが明らかになった。最も低い遊泳周波数(20-30Hz)では、L1 のみがスパイク活動を示した(L1 がすべてのサイクルで EPP を示すわけではないため、図 18 の Y 軸値は、20~30Hz での L1 の動員率の絶対値を表してはいない。(図 16 参照))。30-40Hz の範囲では、L1 のサイクルあたりのスパイク率が増加し、L2 および L3 も一部のサイクルでスパイク活動を示した。スパイク率は L1 で最も高く、次に L2、L3 と続き、その結果、層全体での下降勾配が生じた(図 18)。40-50Hz の範囲では、L4 がスパイク活動を示し始め、下り坂傾向がさらに強まった。この傾向は 50~60Hz の範囲でも続き、各筋肉層のスパイク活動は増加した。60~70Hz では、すべての層の筋肉がほぼすべてのサイクルでスパイク活動を示した。これらの結果から、速筋の整然とした動員パターンが明確に示された(図 19)。

内側-外側軸に沿った速筋細胞の断面積解析

サイズの原理によれば、より速い/より強い運動単位は、より大きな運動ニューロンと筋線維を持つ傾向がある[8、9]。この原理に基づき、 Ca^{2+} イメージングと電気生理学の結果から、速筋線維の大きさは、内側-外側軸に沿って内側に配置されるにつれてより大きくなる可能性があるという仮説を立てた。これを検証するために、 Ca^{2+} イメージング実験で使用した光学切片(図 8、図 11)に対応する、5dpf 仔魚の中心管の背腹深さレベルでの速筋線維の断面積を調べた(図 20A)。15 の筋節(5 匹の魚からそれぞれ 3 つずつのセグメントを調べた)の分析により、仮説通り、速筋においてより内側の領域の筋肉

は、一般的に外側の領域の筋肉よりも大きいという傾向が明らかになった(図 20B)。このことから、魚類の筋肉は、遅筋と速筋だけでなく、速筋の中の筋線維すらもサイズの原理に従っているということが明らかになった。

考察

方法論的な考慮事項

Ca²⁺イメージングと電気生理学を用いて、様々な強度の運動中の速筋の空間的な活動パターンを研究した。それぞれの方法には明確な利点と限界がある。Ca²⁺イメージングの利点は以下の通りである。第一に、実際に運動している仔魚に対してイメージングを行うことができ、不動化させることに伴う副作用がない。第二に、Ca²⁺イメージングにより、広範囲の筋肉組織における筋肉の空間的活動パターンを直接観察することができる。第三に、いくつかの運動タイプを誘発し、解析することができる。しかし、Ca²⁺イメージングにもいくつかの制約がある。第一に、時間分解能が低い。例えば、逃避運動のような非常に強い運動が起こると Ca²⁺信号は 1 秒以上持続し、筋収縮そのものをはるかに超えて持続する。第二に、魚はアガロースゲルに埋め込むと高速遊泳を行わないため[22]、高周波数遊泳での Ca²⁺イメージングデータを取得することができない。さらに、このような条件下で仔魚が高速遊泳を行えたとしても時間分解能が低いため、サイクルごとの筋活動パターンを分析することは困難なままである。例えば、逃避反応（無拘束の魚でよく観察される）の後に高速遊泳が起こった場合、逃避からの Ca²⁺シグナルが高速遊泳からのシグナルを覆い隠してしまう可能性がある。そのため、Ca²⁺イメージングは逃避運動やターン運動などの単体運動や、低速度遊泳のような比較的安定した力を伴う行動における活動パターンを研究するのに適している。電気生理学にもいくつかの利点がある。第一に、非常に高い時間分解能が得られるため、幅広い周波数にわたって遊泳中のサイクルごとの正確な解析が可能である[14]。第二に、様々な周波数の仮想遊泳を確実に誘発できるため、様々な遊泳強度における活動パターンを包括的に解析できる。しかし、電気生理学にも限界がある。第一に、これらの記録のためには魚を麻痺させなければならない。仮想運動の研究では、 α -ブンガロトキシンやツボクラリンなどの神経

筋遮断剤を用いて神経活動を調べることが多いが [18, 29]、これらの遮断剤は筋の活動を妨げるため、本研究には適していない。そのため筋肉が不動である *relaxed* 変異体を使用する必要があったが、4dpf 以降の変異体仔魚では健康上の問題があるため、より若い仔魚 (3dpf) を使用する必要があるなどいくつかの制約があった。この時期のゼブラフィッシュ仔魚は視覚や前庭誘発行動を一貫して示さないため、解析に利用できる行動が制限される。またもうひとつの制約は、1 回の試行で記録できる細胞の数が限られていることである。例えば本研究では 1 回の試行あたりの記録は 2 細胞に限定されたため、空間的な活動パターンを評価するためには、複数の記録にわたるデータを集約する必要があった (図 18)。さらにより深い層の筋細胞からの記録は、各ターゲット細胞の上の筋層を注意深く取り除かなければならないため、技術的な課題がある。その結果、本研究で分析した最深層は L4 であり、より内側の速筋領域は分析対象外となった (図 14)。Ca²⁺イメージングと電気生理学の長所と限界は、多くの点で相補的である。電気生理は高い時間分解能を有し、Ca²⁺イメージングは筋組織全体を広く空間的にカバーする。さらに、Ca²⁺イメージングは自由に動く仔魚を用いた記録が可能で、電気生理学で必要な麻痺による潜在的な副作用を避けることができる。両手法から互いに補完的な結果が得られたことで、速筋の動員は運動の速度や強度が高まるにつれて外側から内側へと進行していくという、本研究での重要な結論が補強されたのである。

筋収縮力を高めるための戦略

高速または高強度な運動を生み出すためには筋収縮力を高める必要がある。そのために、脊椎動物は主に 2 つの戦略を採用している。1 つは、低強度の運動では活動しない運動単位を追加で動員する方法である。もう 1 つは、すでに活動している運動単位の活動レベルを高める方法である。哺乳類はこの両方の戦略を用いることが知られている [7]。本研究では特に速筋の空間的な動員パターンに注目し、2 つ目の戦略については詳

細な分析を行わなかった。しかしこれは、魚類にはすでに活動的な運動単位の活動レベルを調節する能力がないことを意味するものではない。Ca²⁺イメージング実験では、逃避運動がすべての速筋領域で最も高いCa²⁺応答を引き起こすことが示された（図 12B1-B3）。これは、逃避運動が急激な体の屈曲を伴うため、逃避屈曲中に速筋が複数のスパイクを生成している可能性が高いことを示唆している。電気刺激直後の仮想遊泳では、速筋が1サイクルにつき複数のスパイクを生成することが観察された（図 21）。このように、ゼブラフィッシュは哺乳類と同様に、運動単位を増やし、すでに活動的な運動単位の発火頻度も高めるという両方の戦略を用いて、高速かつ高強度な運動のための筋収縮力を高めている可能性が高いと考えられる。

空間的に秩序だった動員の生理学的意義

ゼブラフィッシュの仔魚を用いた本研究では、運動強度が高まるにつれて速筋の動員が外側から内側へと進行するという空間的に秩序だった動員パターンが明らかになった。このパターンは最も外側の遅筋にまで継続的に及んでいる。哺乳類では、遅筋と速筋はそのサブタイプも含めて混在しているため、このような空間的に整然とした動員パターンは存在しない。以下では、このような内側-外側の動員パターンの生理学的意義と、魚類がこのような配置を採用する可能性のある理由を探る。魚類と哺乳類の筋配置の違いは、おそらく力の伝達システムの違いを反映している。哺乳類では、典型的な筋（上腕二頭筋のような平行筋など）は小径の腱を介して骨に連結している（図 22）。このような場合、力は最終的に小さな腱の部分を通して収束するため、限られた筋領域を収縮させることに力学的な利点はほとんどないように見える。これと対照的に、魚では筋肉の収縮は主に体を曲げるが、これには大きな筋肉塊、脊髓、脊索（成魚では脊椎）が含まれる。筋節は、筋節間の大きな付着領域に広がる筋隔膜と呼ばれるコラーゲンが豊富でシート状の結合組織に付着する（図 23）。筋隔膜の内側は脊髓と脊索（成魚で

は脊椎)に固定され、外側は皮膚に接続されている。このような構造により、頭部から尾部にかけての筋肉活動の波が遊泳中に体に沿って尾の滑らかな屈曲を生み出すため、非常に複雑で三次元的な力の伝達を可能にしている。シート状の筋隔膜が重要な役割を果たしていることから、異なる筋領域の収縮が体の運動に異なる効果をもたらすと考えられる。ほぼすべての魚類において遅筋が外側に位置していることから、力学的あるいはエネルギー的な利点が示唆されるが、本研究で得られた知見はこの利点が速筋全体にも及んでいる可能性を示している。力の伝達をこのようなシステムで考えれば、体の外側に位置する筋肉は正中線からの距離が長いため、その収縮は、より大きな力のモーメントを生み出す。そうすると、外側から内側への筋収縮の順番は、きめ細かく調整されたエネルギー効率のよい体の屈曲をもたらすことになる。より小さく、より外側に位置する速筋は、よりきめ細かいコントロールを可能にし、より大きく、より内側に位置する速筋は、より大きな力を発揮する。ゼブラフィッシュ仔魚の速筋は、哺乳類に見られる FF 筋と FR 筋のような特殊なタイプに細分化されるのだろうか？現在のデータでは速筋領域を特定する遺伝子マーカーがないため、これを支持することはできない。さらに、内側-外側軸に沿った連続的な動員パターンとサイズ勾配 (図 18 と図 20) は、明確なサブタイプではなく、連続的な筋特性を示唆している。したがって、筋の特性はこの軸に沿って連続的に変化するという考え方が有力である。ゼブラフィッシュ仔魚における速筋のこれらの空間的な動員とサイズ勾配は、成魚や他の魚類にも関連するのだろうか？空間的に秩序だった動員に関しては、ニジマスの成魚を使った研究が 1 つだけある。 Ellerby と Altringham [12] は、外側に位置する速筋は高速遊泳時に活動し、最も内側に位置する速筋はこの遊泳時には活動せず、逃避反応時にのみ活動することを示した。このことから、空間的に秩序だった筋動員は、魚類種を横断する一般的な戦略であると考えられる。しかし、成魚では速筋のサイズ勾配はまだ報告されていない。また、ゼブラフィッシュを含む多くの成魚は、遅筋と速筋の特徴を併せ持つ中間的な筋繊維を

発達させており、それは大きさも中間的である[30]。よって、たとえ速筋の中に筋サイズの勾配がなくても、成魚では中・外側軸に沿った筋サイズの勾配（速筋＞中間筋＞遅筋）が存在する。もし代謝やその他の生理的な制約によって筋繊維の大きさに上限がある場合は、成魚の速筋繊維はこの上限に達する可能性があり、その結果、より均一なサイズ分布になるだろう。成魚におけるこれらの側面を明らかにするためには、さらなる研究が必要である。

結論

本研究では、 Ca^{2+} イメージングと電気生理学的解析の両方を用いて、様々な速度と強度の運動中のゼブラフィッシュ仔魚の速筋の活動パターンを調べた。これらの独立した方法から得られた知見は、速筋線維には空間的に秩序だった動員パターンが存在するという一貫した結論に収束した（図 24）。具体的には、弱い運動や遅い運動のときには速筋線維の外側部分のみが活動する。運動の速さや強度が高まるにつれて、外側から内側へと明確な空間的順序に従って、さらなる速筋線維の漸進的な動員が観察される。さらに解剖学的研究から、筋繊維の大きさは外側から内側に向かって徐々に大きくなることが明らかになった（図 24）。したがって、速筋が外側から内側へと空間的に秩序だっただけで動員されることは、筋繊維サイズの増大と関連している。これらの知見は、ゼブラフィッシュ仔魚における速筋の組織と機能に関する重要な見識を深め、空間的な動員と筋繊維サイズがどのように相互作用して運動のパフォーマンスを最適化するのかを示している。

材料と方法

魚の飼育と系統

ゼブラフィッシュの成魚、胚、仔魚は28.5°Cで飼育した。魚は受精後日数 (dpf) に従って区別した。Tg(smyhc1:tdTomato)およびTg(actc1b:Ace2N-4aa-mNeonGreen)は、Tol2を介した形質導入法を用いて作製した。前者にはsmyhc1プロモーター[31]を、後者にはactc1b (正式には α -アクチンと呼ばれる) プロモーター[32]とAce2N-4aa-mNeonレポーター[33]を用いた。Tg(actc1b:GFP)zf13 (正式にはTg(α -actin:GFP)と呼ばれる) はHigashijima et al. [32]に記載されている。Ca²⁺イメージングには、速筋にtdTomato-jGCaMP7f融合タンパク質を発現させたTg(actc1b:tdTomato-jGCaMP7f)[34] (正式にはTg(α -actin:tdTomato-jGCaMP7f)) を用いた。本文中では、Ca²⁺イメージングにtdTomatoシグナルではなく、jGCaMP7f由来の緑色蛍光シグナルのみを利用したため、この系統をTg(actc1b:jGCaMP7f)と呼ぶ。形態観察とCa²⁺イメージングの両方の共焦点イメージングを、黒色色素細胞を欠く *nacre* 変異体を用いて行った。電気生理学的研究には、*relaxed* 変異体 (*red^{mi90}* [26]) を用いた。

遅筋と速筋の形態学的観察と筋サイズの測定

Tg(actc1b:GFP);Tg(smyhc1:tdTomato)またはTg(actc1b:Ace2N-4aa-mNeonGreen);Tg(smyhc1:tdTomato)の複合トランスジェニック系統を、ガラス底 35mm のプラスチックディッシュに低融点アガロース(1.5%; Thermo Fisher Scientific)で包埋した。共焦点撮影は、40 倍の水浸対物レンズ (NA,1.1) と 488 nm のレーザーを装備した SP8 Leica 顕微鏡で行った。緑色 (GFP または mNeonGreen) と赤色 (tdTomato) の蛍光はプリズムで分離し、HyD 検出器で検出した。断面図は Imaris (Bitplane) ソフトウェアを用いて共焦点画像から作成した。筋サイズの測定は、

Tg(actc1b:Ace2N-4aa-mNeonGreen) の蛍光画像を用いて速筋で行った。個々の細胞膜を ImageJ/Fiji ソフトウェアを用いて手作業でトレースし、筋サイズを決定した。図 20 では 緑チャンネル (Ace2N-4aa-mNeonGreen シグナル) のみを示す。

逃避運動、ターン運動、低速度遊泳中の速筋の Ca^{2+} イメージング

逃避運動を誘発するためのセットアップは、先に記述した[17-19]。アクリル板にオーディオスピーカーを取り付けた音／振動刺激システムを使用し、刺激信号 (500Hz、2 サイクル) をスピーカーに送ることで振動を発生させた。アクリル板の下にはスクリーンを設置し、下から視覚刺激を与えられるようにした (図 8 および図 9)。ターン運動と低速度遊泳を誘導するために、Orger ら[20]が記述したように、縞模様の動く視覚刺激を用いた。GCaMP の緑色蛍光シグナルによる Ca^{2+} イメージングへの干渉を防ぐため、ロングパスフィルター (Olympus, BA580IF) をプロジェクター (Philips) の光の出口に取り付けた。プロジェクターで動く縞模様を生成するためのコマンドは、OpenGL ライブラリと C++ で書かれたカスタムソフトウェアを用いてコンピュータで作製した。

Tg(actc1b:jGCaMP7f) 系統の受精後 5 日目 (5dpf) の仔魚を、ガラス底 35mm プラスチックディッシュに 1.5% の低融点アガロースで包埋した。尾部を覆っていたアガロースは除去し、尾部が動くようにした。切断位置は筋節 18 または 19 とした。その後、ディッシュをアクリル板に取り付けた。このセットアップを FV1200 共焦点正立顕微鏡 (オリンパス) にセットした。尾の運動は、図 9 に記載されている設定で、赤外線 LED 照明を用いて下から観察し、ハイスピードカメラ (acA640-750um、Basler) を用いて 1,000 フレーム／秒で記録した。LED 照明を偏向させる小型ミラーのサイズは 4×5mm であった。尾の運動の角速度を測定するために、正中線に沿った 2 つの位置の間の尾の屈曲度を記録した。位置 #1 はアガロースの端 (筋節 18 または 19)、位置 #2 は自由に動く尾部の長さの 30% 地点とし (図 10)、最大屈曲時のこれらの 2 つの位置を通る線と運動

前の体の線の間の角度を計算した。屈曲が最大になるフレームにおける#2の位置の決定は、赤外照明で見える黒色素の位置を参考にした。遊泳の途中での角速度の測定については、位置#2が正中線を通過したときを0タイムとした。それ以外は、同様の解析を行った。 Ca^{2+} イメージング画像は、16倍の水浸対物レンズ(CFI75 LWD 16X W、NA0.8、Nikon)と473nmレーザーを使用してFV1200共焦点顕微鏡で行った。490~540nmのバンドパスフィルターを吸収フィルターとして用いた。脊髓の中心管に焦点面を設定し、筋節12~14の速筋に焦点を合わせた。ピンホールを完全に開いた状態で10フレーム/秒で12~33秒間(150~400フレーム)にわたって連続画像(128 x 48ピクセル)を撮影した。共焦点スキャナーによって生成されたトリガー信号を使用して、共焦点画像とハイスピードカメラ画像を同期した。また同じトリガー信号を使用して、仔魚に時間を同期した音/振動刺激を与えた。刺激のタイミングは、スキャンラインが画像の上部領域で移動しているときに逃避運動が発生するように設定した(図11A1を参照)。逃避運動またはターン運動については、尾を一方向に曲げる運動のみが行われた試行だけを解析した。

Ca^{2+} イメージングデータの解析

速筋の左右の端は目視により手動で決定した。また上端から下端まで縦線を引いて、速筋領域を区切った。次に、ImageJ/Fijiを用いて、枠で囲まれた領域を縦に9分割した。真ん中の3つの区画(左から4、5、6番目の領域)は脊髓を表しているため解析から除外した。残りの区画を速筋領域とし、外側、中間、内側の左右3つずつに細分化した。蛍光強度を定量化する前に、サンプルの外側の領域の平均画素強度を用いて背景差分を行った。その後、各速筋区画の平均画素強度を算出した。すべての解析はImageJ/Fijiを用いて行った。

電気生理学

筋肉からのホールセル記録は *relaxed* 遺伝子ホモ接合体の 3dpf 仔魚を用いて行った。*relaxed* 遺伝子はジヒドロピリジン受容体(DHPR)をコードしており[26]、リアノジン受容体と直接相互作用して筋小胞体(SR)から細胞質に Ca^{2+} を放出する。ホモ接合性の *relaxed* 変異体ではこの Ca^{2+} 放出機構が欠損しており、完全に麻痺している [25]。DHPR の機能欠損は筋細胞の膜電位動態には影響しない[27]。パッチクランプによる電気生理学的記録は、いくつかの変更を加えながらも先行研究 [24, 35, 36]に記載されたとおりに行った。仔魚は短いタングステンピンを使ってシルガードコーティングを施したガラス底ディッシュに脊索を通して固定し、NaCl 134mM、KCl 2.9mM、MgCl₂ 1.2mM、CaCl₂ 2.1mM、HEPES 10mM、グルコース 10mM (NaOH で pH 7.8 に調整)を含む細胞外溶液に浸して、筋節 15-19 周辺の皮をピンセットで取り除いた。微分干渉正立顕微鏡 (BX51WI ; オリンパス) で水浸対物レンズ (40x ; NA 0.80 ; オリンパス) を用いて標本を観察した。2 つの筋細胞の活動を同時に記録し、背腹軸においては、記録する細胞は脊索の腹側に配置するものを選んだ。吻側-尾側軸においては、一方の記録は筋節 16 のうち表層に位置する筋細胞を対象とし、もう一方の記録はより内側に位置する筋細胞を対象とした。記録する内側の筋細胞は外側の筋細胞の 2 節分尾側に設定した。L1 の速筋細胞の記録では、その上にある遅筋をガラスピペットで注意深く取り除いた。同様に、より深層にある速筋の記録では、目的の速筋を覆っている遅筋と速筋の両方を剥がした。例えば、L4 の速筋にアクセスするには、その上にある遅筋と L1、L2、L3 速筋を取り除いた。ホールセル記録は MultiClamp700B アンプを用いて取得し、Digidata1390 (Molecular Devices) を用いてデジタル化した。パッチ電極 (抵抗 5-10 M Ω) は、K-グルコン酸 119mM、KCl 6mM、MgCl₂ 2mM、HEPES 10mM、EGTA 10mM、Na₂ATP 4mM、mOsm 290mM を含む細胞内溶液で満たし、KOH で pH 7.2 に調整した。遊泳周波数の低

い仮想遊泳は自然に起こったが、高周波数の仮想遊泳を誘発するために、短時間の電気ショック（7-20V、0.2-1.0 ms）を時々尾に与えた。

電気生理学的データの解析

電気生理学的データは、DataView（William Heitler, University of St. Andrews によるソフトウェア）と Microsoft Excel を用いて解析した。記録された速筋のスパイク活動のうち、スパイクの山が高い上位 10 イベントを平均した値の 70%を閾値とし、ピークがそれを越えたイベントを解析対象とした。遊泳周波数を決めるために解析対象のスパイク（または終板電位、EPP）から次のサイクルのスパイク（または EPP）までの期間をサイクル期間と定義した。そして、遊泳周波数はサイクル周期の逆数として計算した。各スパイク（または EPP）について、谷からピークまでの 70%の立ち上がり時点をスパイク（または EPP）のタイミングとして記録した。速筋の中で合計 9 回のペア記録を行った（L1 と L2 を 3 回、L1 と L3 を 3 回、L1 と L4 を 3 回）。さらに、遅筋と速筋 L1 のペア記録を 3 回行った。各ペア記録からのデータは約 30 秒ごとに保存し、1 ファイルとした。各ファイルにつき電気刺激を 1 回ずつ加えた。遊泳周波数とスパイク活動の確率の関係を調べるために(図 18)、各ペア記録から少なくとも 40 サイクルを以下の方法で分析した。自発遊泳については、記録を始めてから最初の遊泳のうち、少なくとも 5 回のスパイク活動を含む連続した 10 回以上のサイクルがある部分を解析した。誘発した高速遊泳の場合は、電気刺激後 2 回目の遊泳を解析した。この手順を各ペア記録について解析サイクル数が 40 を超えるまで、ファイルを区別せずに繰り返した。周波数 20~30Hz と 30~40Hz のデータは自発遊泳から得られたもので、40~50Hz のデータは自発遊泳と誘発遊泳の両方から、それぞれ半分ずつ収集した。周波数 50-60Hz と 60-70Hz のデータは誘発遊泳から得られたものである。

図の説明

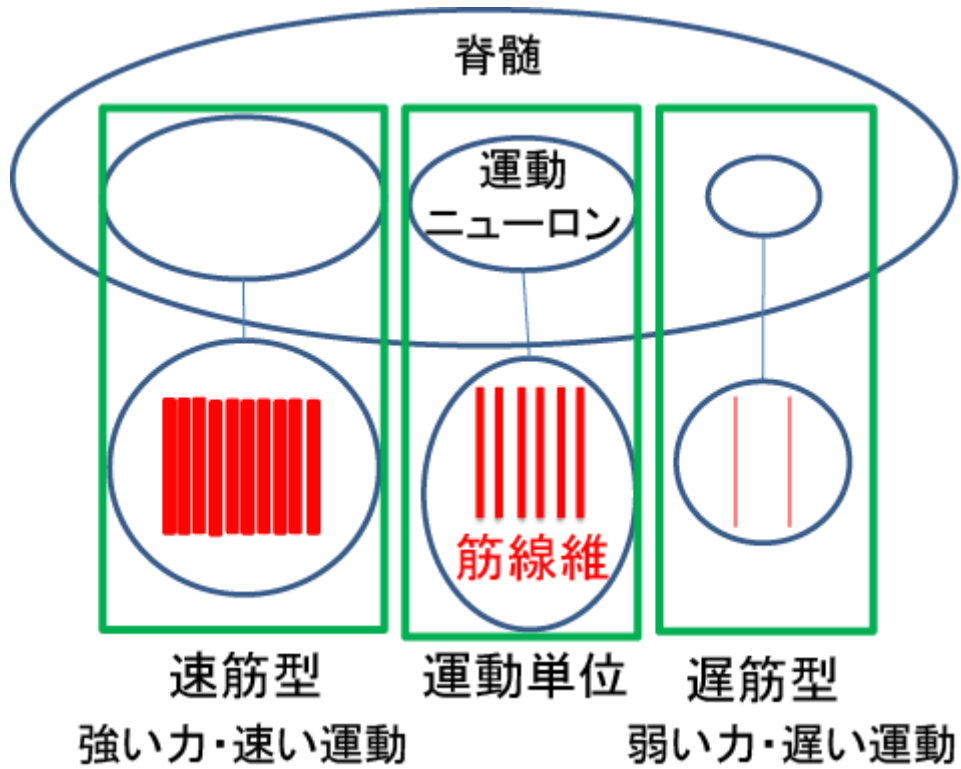
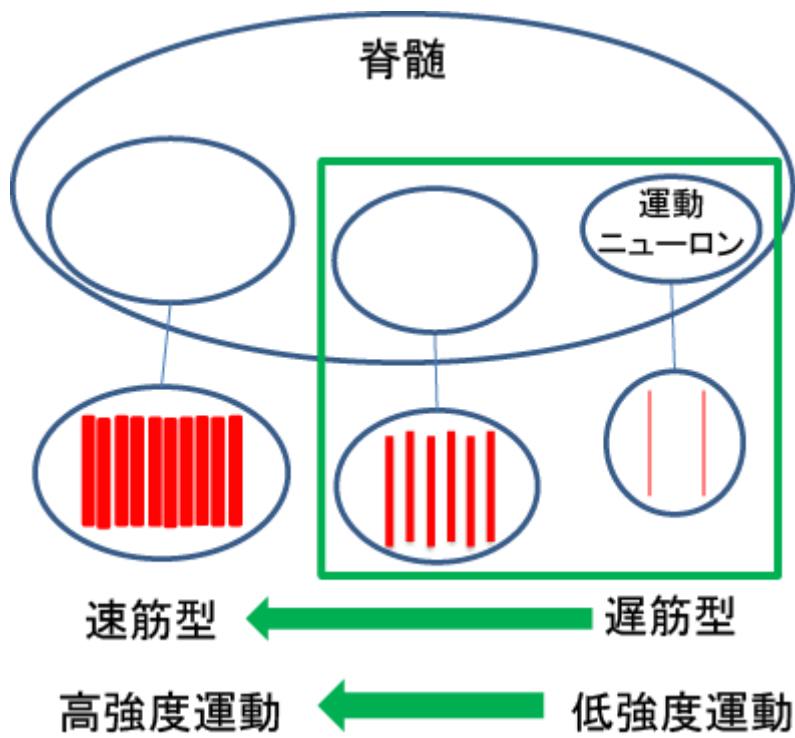
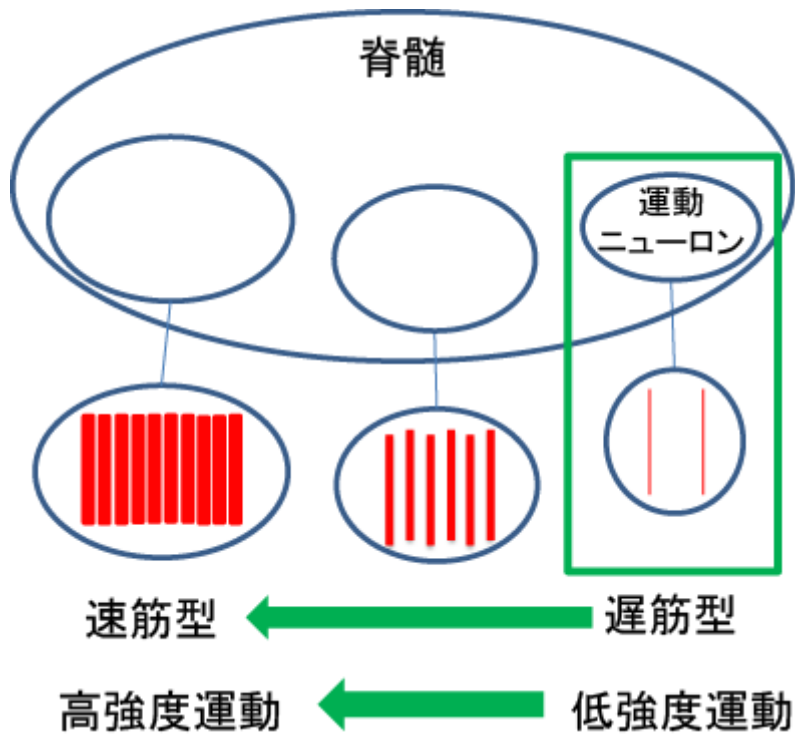


図 1 運動単位の様式図

緑色の四角がそれぞれ運動単位を示しており、左の運動単位は速筋型、右の運動単位は遅筋型を示す。速筋型の運動単位は運動ニューロン（青色の丸）の大きさ、筋線維（赤色の線）の大きさ、筋線維の数がいずれも大きい。



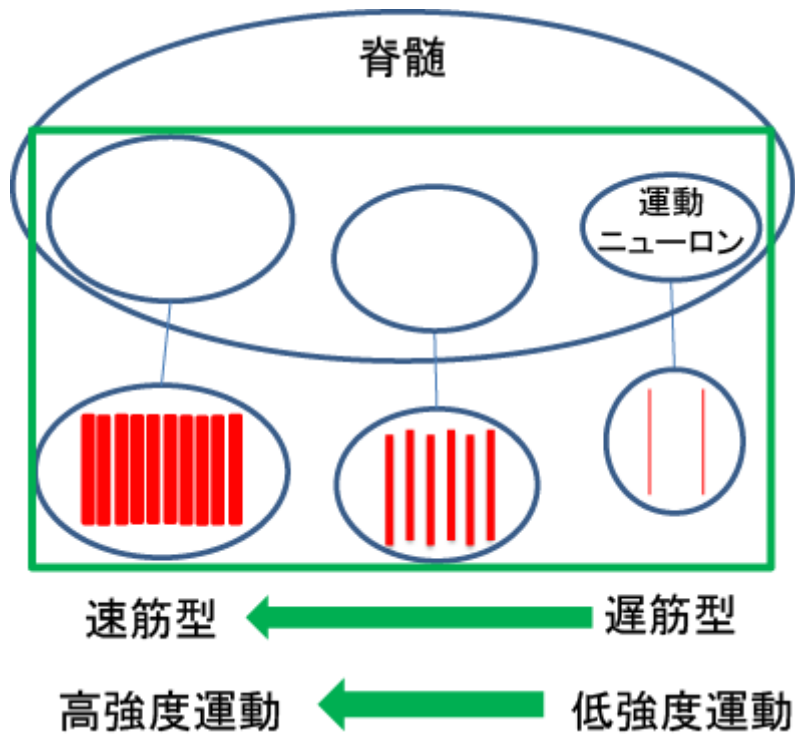


図2 サイズの原理の模式図

緑色の四角は動員される運動単位の範囲を示す。運動強度が増加すると、既に活動している運動単位に加えて、より大きな運動単位が新たに動員される。

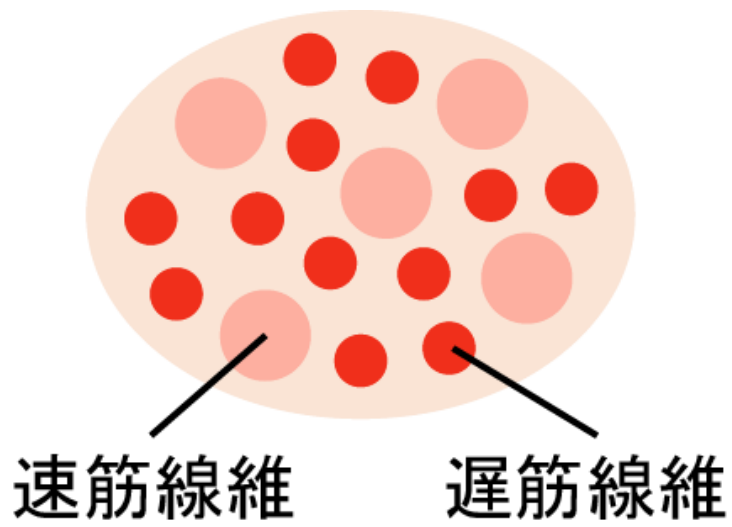


図3 哺乳類の筋肉の模式図

図の全体は筋肉、桃色の丸は速筋線維、赤色の丸は遅筋線維をそれぞれ示す。哺乳類では、速筋線維と遅筋線維が一つの筋肉の中で混在している。

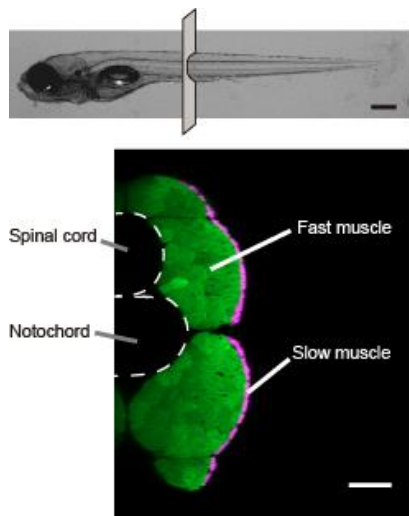


図4 ゼブラフィッシュ仔魚の速筋と遅筋の構造

上段：5dpf 仔魚ゼブラフィッシュの側面図で下段の断面の位置を示す。スケールバーは 300 μ m。

下段：Tg(actc1b:GFP);Tg(smyhc1:tdTomato)魚の共焦点画像から作成した断面図。この複合トランスジェニック魚では、GFP（緑）と tdTomato（マゼンタ）がそれぞれ速筋と遅筋で発現している。筋肉の右半分のみ示した。スケールバーは 30 μ m。

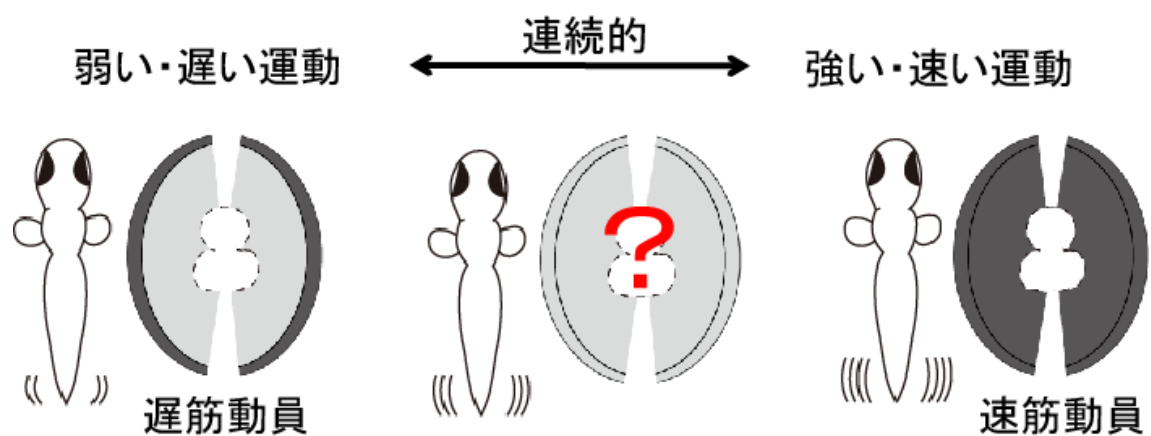


図5 魚類の運動強度による体幹筋の使い方

灰色の楕円は魚類の体幹筋を示し、濃灰色の部分はそのうちの活動している部分を示す。運動強度は2種類に限らず連続的であるが、そのような運動時の体幹筋の活動は明らかではない。

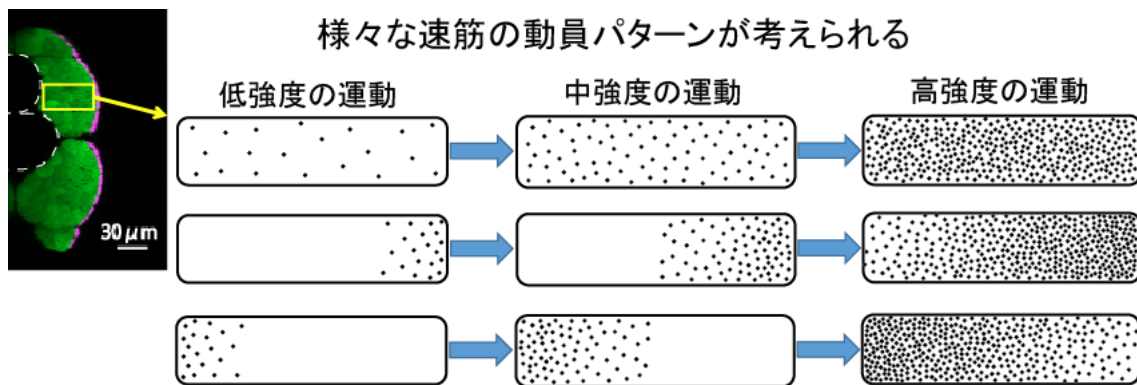


図 6 考えられる様々な速筋動員パターン

四角はそれぞれ速筋を、黒点は動員される運動単位を示す。上段は、運動強度が高まるにつれて、何も空間的なパターンは無くランダムに、動員される運動単位の数が増える場合、中段は、低強度の運動では速筋の外側のみが活動し、運動強度が高まるにつれて徐々に内側まで動員される場合、下段は、低強度の運動では速筋の内側のみが活動し、運動強度が高まるにつれて徐々に外側まで動員される場合。

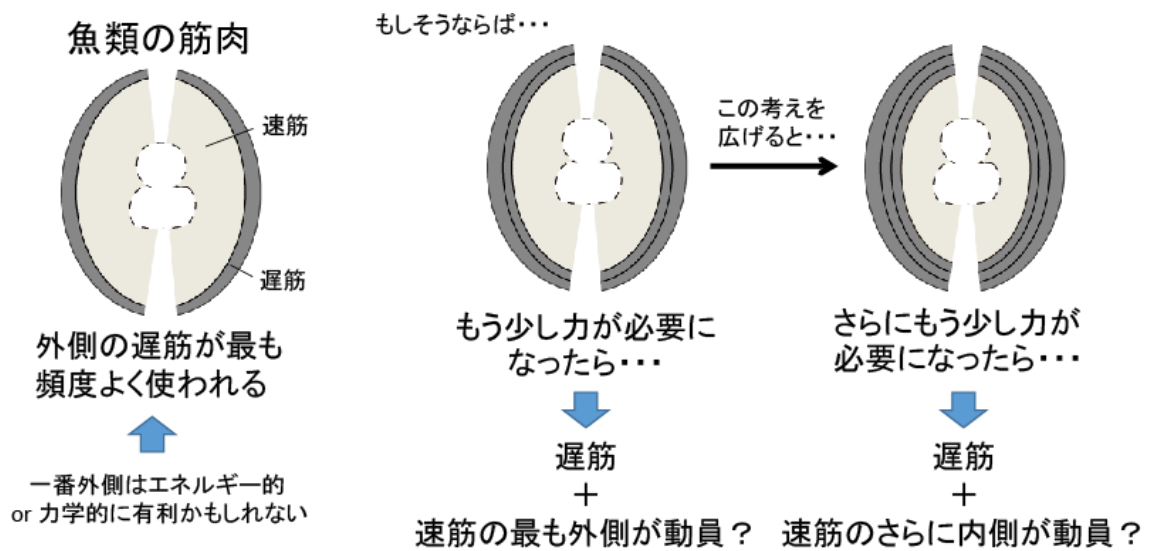


図7 速筋の中に存在する空間的な動員パターンの仮説

最も外側に位置する遅筋が最も頻度よく使われることから、体の外側を使うことに何らかのメリットがあると示唆される。もしそうであるならば、やや強度の高い運動が必要ときには最も外側に位置する速筋が最初に使われ、さらにもう少し強度の高い運動が必要ときには速筋のさらに内側が加勢していくというように、速筋の中には空間的な動員パターンが存在し、運動強度が高まるにつれて外側から内側へと徐々に動員が増えていくことが予想される。

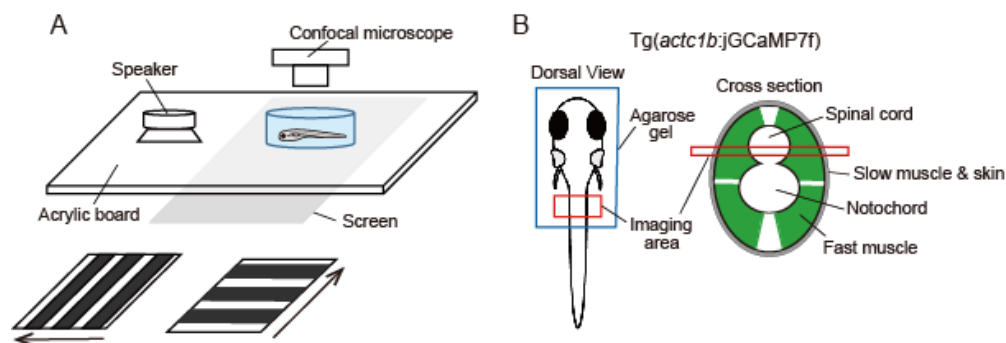


図 8 速筋における Ca^{2+} イメージング法の模式図

A：イメージングのセットアップの模式図。アガロースゲルで包埋した仔魚をディッシュに入れる。ディッシュは逃避運動を誘発する振動刺激を与えるために、オーディオスピーカーが取り付けられたプレートの上に置く。ディッシュの下にあるスクリーンは視覚刺激を与える。前方に動く縞模様は低速度遊泳を誘発し（左下図）、横方向に動く縞模様はターン運動を誘発する（右下図）。体幹中部の速筋は共焦点顕微鏡を用いて背側から観察する。

B：速筋をイメージングするための模式図。魚は速筋に jGCaMP7f（遺伝的にコードされた Ca^{2+} インドケーター）を発現している。左は背面図、右は断面図。背面図では、吻側がアガロースゲルで固定されており尾は自由に動く。赤い四角は撮影範囲を示す。断面図の緑色は速筋を示す。赤い長方形は共焦点イメージングで撮影した光学切片の深さを示す。

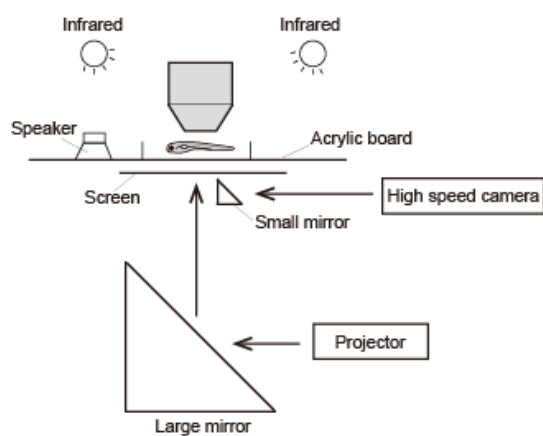


図9 撮影セットアップ概略図

仔魚を赤外線ライトで照らし、ハイスピードカメラで尾のシルエットを撮影する。赤外光を反射させるために、光路に小さな鏡を設置した。プロジェクターで生成した動く縞模様は大きな鏡で反射し、魚の下のスクリーンに投影される。

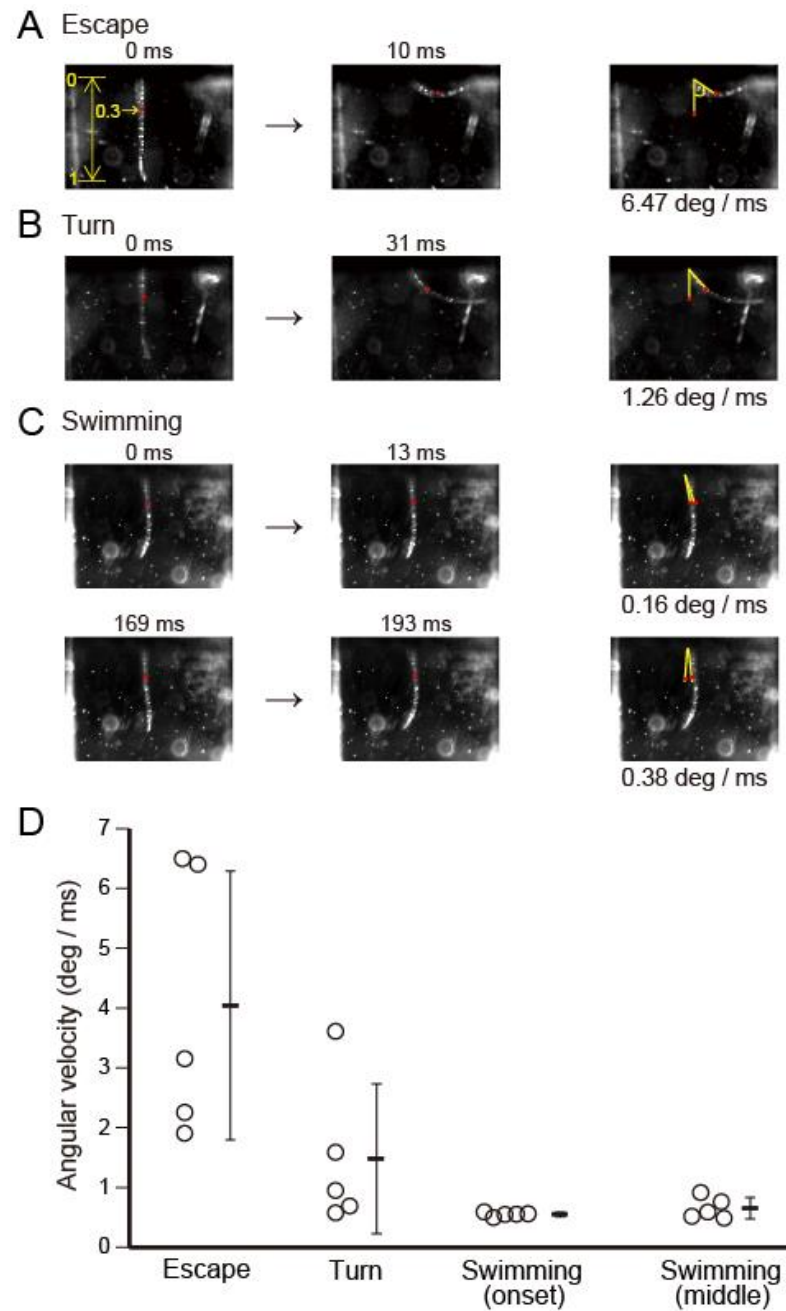


図 10 振動刺激と視覚刺激に対する仔魚の運動

A：振動刺激による逃避運動の一例。左図は運動開始直前の初期位置（0 ms）。アガロースの終点を 0、尾の先端を 1 とし、角速度を計算するための基準点を 0.3（赤い点）

としている。中央のパネルは、基準点のずれが最も大きいフレームを示している。右図は角速度の計算結果。

B：横方向に動く縞模様によって誘発されるターン運動の一例。

C：前方に動く縞模様によって誘発される遊泳行動の例。上段は遊泳開始時の画像、下段は遊泳途中の画像。

D：逃避、ターン、遊泳の各試行における角速度を示すグラフ。太線は平均値、細線は $\pm$ SD（標準偏差）を表す。

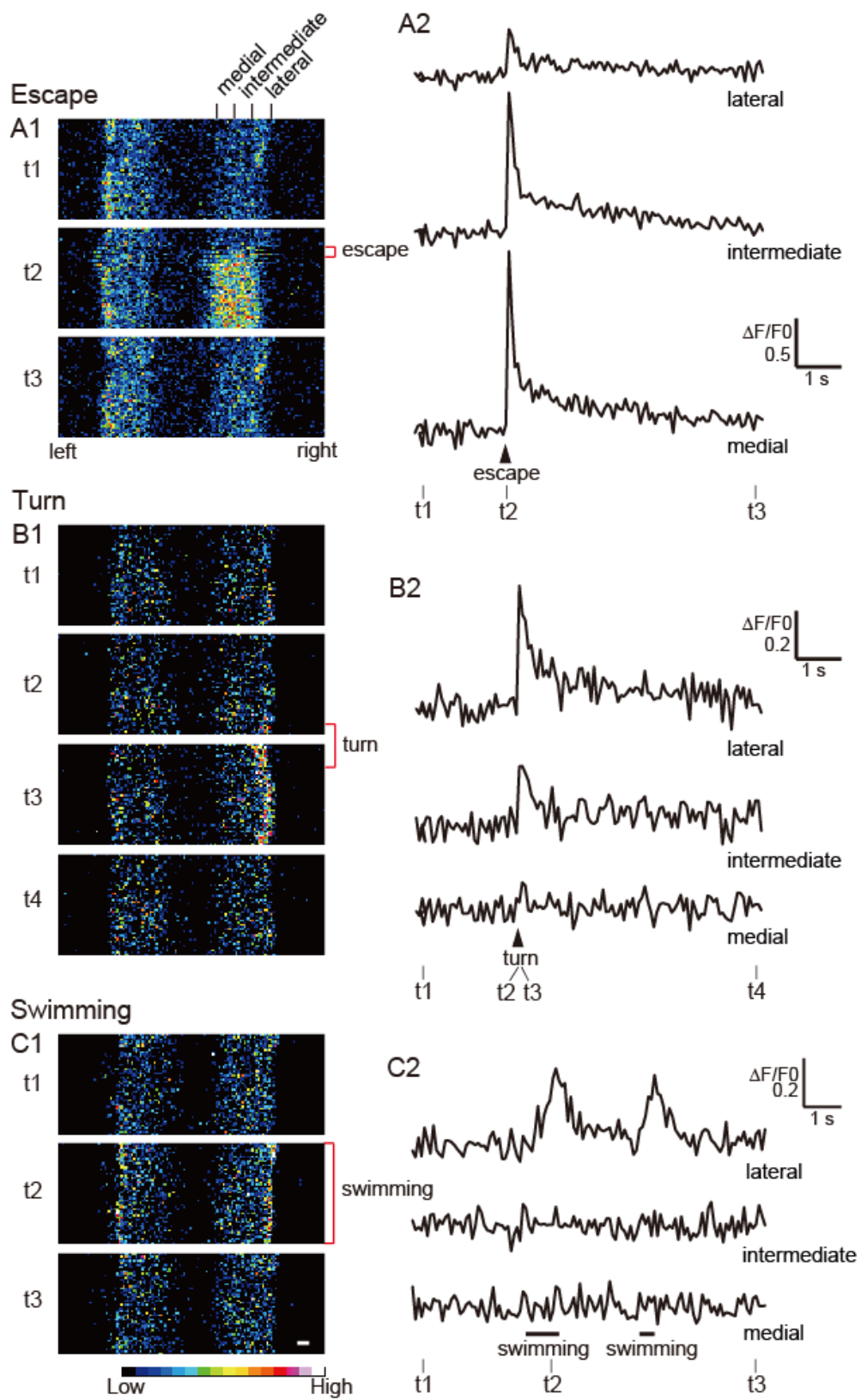


図 11 逃避運動、ターン運動、低速度遊泳時の速筋の蛍光反応

A1：逃避中の速筋における GCaMP の蛍光を示す擬似カラー画像。1 枚あたりそれぞれ 10fps で撮影した。上段（t1）；逃避前のベースライン画像。中段（t2）；一部の走査線に運動による変位が見られる。下段（t3）；運動終了後、蛍光がベースライン付近に戻ったときの画像。筋肉は領域ごとに蛍光強度を定量化するために、横軸に沿って 3 つの区画に分割されている（上部に表示）。A2：A1 の右の筋肉の各領域における蛍光強度のプロット。赤括弧で示すスキャン期間中、魚は体を曲げて逃避している。A1 の画像に対応する時点を t1、t2、t3 と示す。

B1：右へのターン運動中の速筋における GCaMP の蛍光を示す擬似カラー画像。1 枚あたりそれぞれ 10fps で撮影した。ターン運動は 2 フレーム目（t2）の終わりから始まり、2 フレーム（t2 と t3）にまたがる。持続時間は～30ms。B2：B1 の右の筋肉の各領域における蛍光強度のプロット。赤括弧で示すスキャン期間中、魚は体を反らせてターンしている。B1 の画像に対応する時点を t1、t2、t3、t4 と示す。

C1：低速度遊泳中の速筋における GCaMP の蛍光を示す擬似カラー画像。1 枚あたりそれぞれ 10fps で撮影した。魚は 2 フレーム目（t2）の間中泳いでいる。C2：C1 の右の筋肉の各領域における蛍光強度のプロット。遊泳は t2 フレームのスキャン期間全体を通して起こる（赤い括弧で示す）。C1 の画像に対応する時点を t1、t2、t3 と示す。スケールバーは 10 μ m。

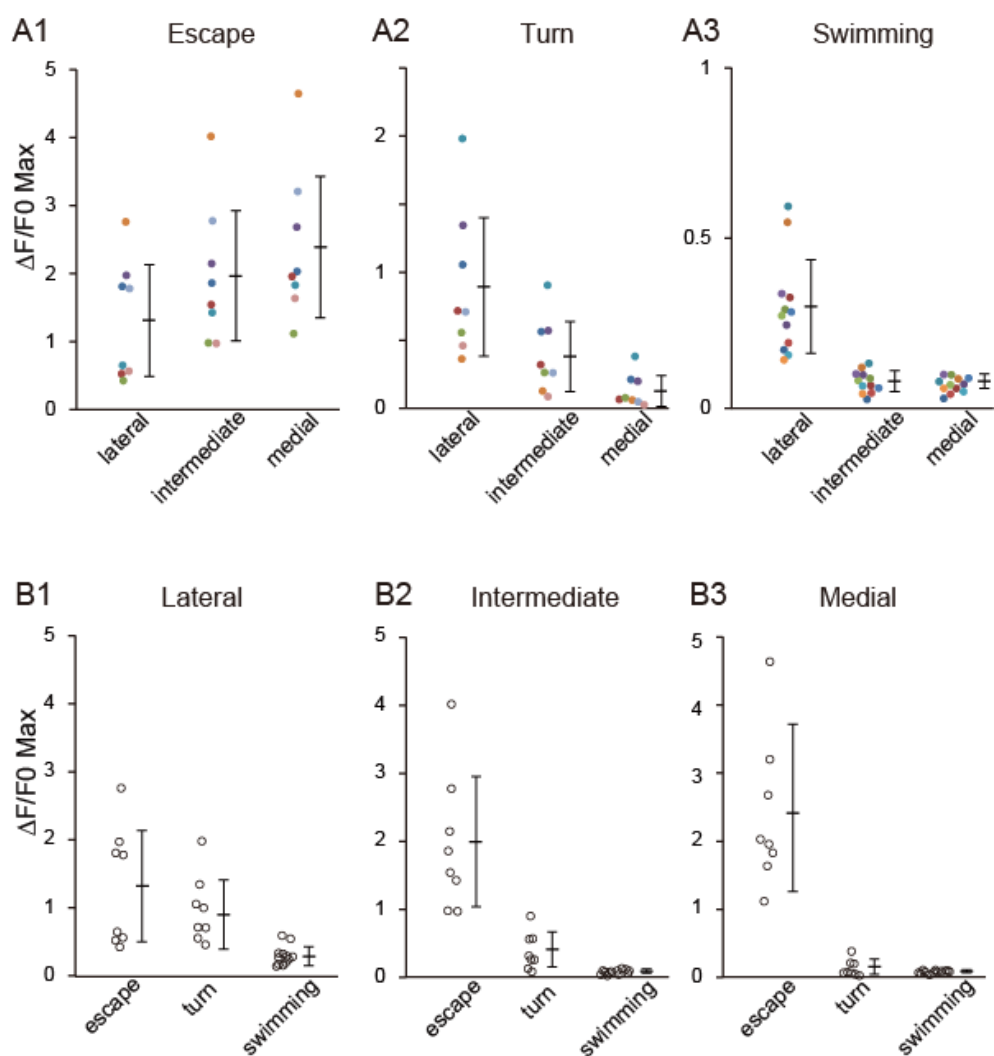


図 12 逃避運動、ターン運動、低速度遊泳中の速筋各部の蛍光強度

A1～A3：各パネルは運動タイプごとのデータを示す。A1;逃避運動、A2;ターン運動、A3;低速度遊泳。Y 軸の目盛りは、蛍光強度の違いを強調するためにそれぞれの運動タイプごとに調整されている。同じ試行からのデータごとに色分けをした。

B1～B3：各パネルは速筋の領域ごとのデータを示す。B1;外側、B2;中間、B3;内側。ここでは Y 軸の目盛りがパネル間で一貫しているため、筋領域間の直接的な比較が可能である。太線は平均蛍光強度を、細線は $\pm$ SD（標準偏差）を示す。

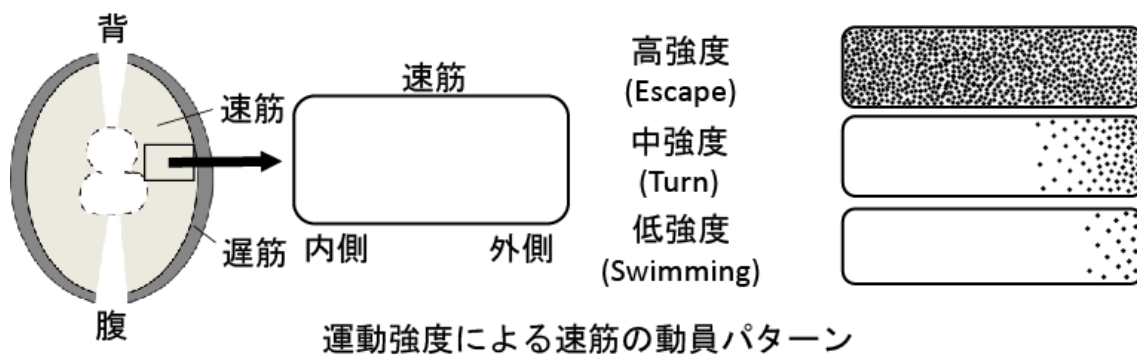


図 13 Ca^{2+} イメージング実験のまとめ図

Ca^{2+} イメージング実験によって得られた、各運動強度における速筋の動員パターン。四角はそれぞれ速筋を示す。速筋は、低強度運動では外側のみが動員され、運動強度が高まるにつれてより内側の筋線維まで徐々に動員された。

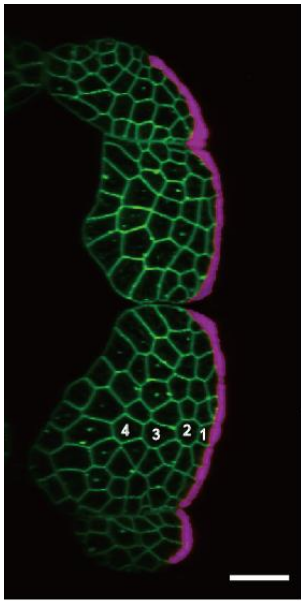


図 14 3dpf 仔魚の速筋と遅筋の断面図

3dpf の $Tg(actc1b: Ace2n-4aa-mNeonGreen); Tg(smyhc1: tdTomato)$ トランスジェニック魚の共焦点画像から合成した。この魚では mNeonGreen（緑色）が速筋細胞膜で、tdTomato（マゼンタ色）が遅筋細胞で特異的に発現している。番号（1、2、3、4）は深さの異なる速筋層を示す。これらは速筋 L1、L2、L3、L4 で電気生理学的記録を行った領域に対応する。スケールバーは 30 μm 。

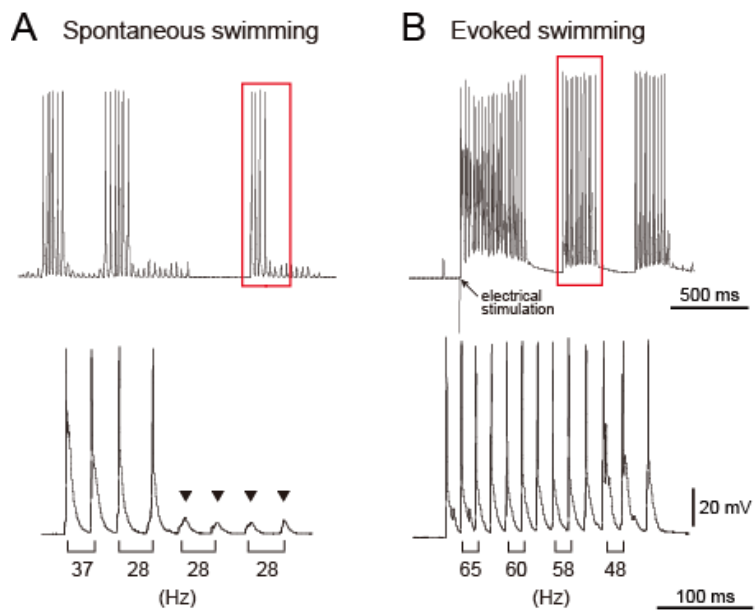


図 15 速筋の L1(第 1 層)を用いた仮想遊泳中の電気生理学的記録

A：自発遊泳の記録。下図は赤枠で囲んだ部分の拡大図で、個々の遊泳サイクルを強調している。各サイクルの遊泳周波数はトレースの下に記載している。矢尻は終板電位（EPP）を示し、これは活動電位を誘発する閾値に達しなかった信号である。

B：誘発した高速遊泳の記録。矢印で示した時点で電気刺激を与えた。下のパネルは赤枠で囲んだ部分の拡大図で、個々の遊泳サイクルを強調している。

Spontaneous swimming

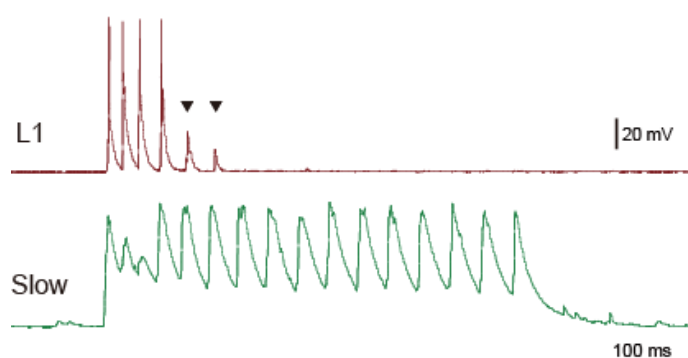


図 16 遅筋と速筋 L1 の電気生理学的記録

遅筋のトレースの各ピークは、自発的な仮想遊泳の際の筋活動を示す。遊泳の初期段階において速筋 L1 はスパイク活動を示し、矢尻で示したように閾値に達さない終板電位 (EPP) に移行した。遊泳の後期には、速筋 L1 は EPP を示さなくなった。

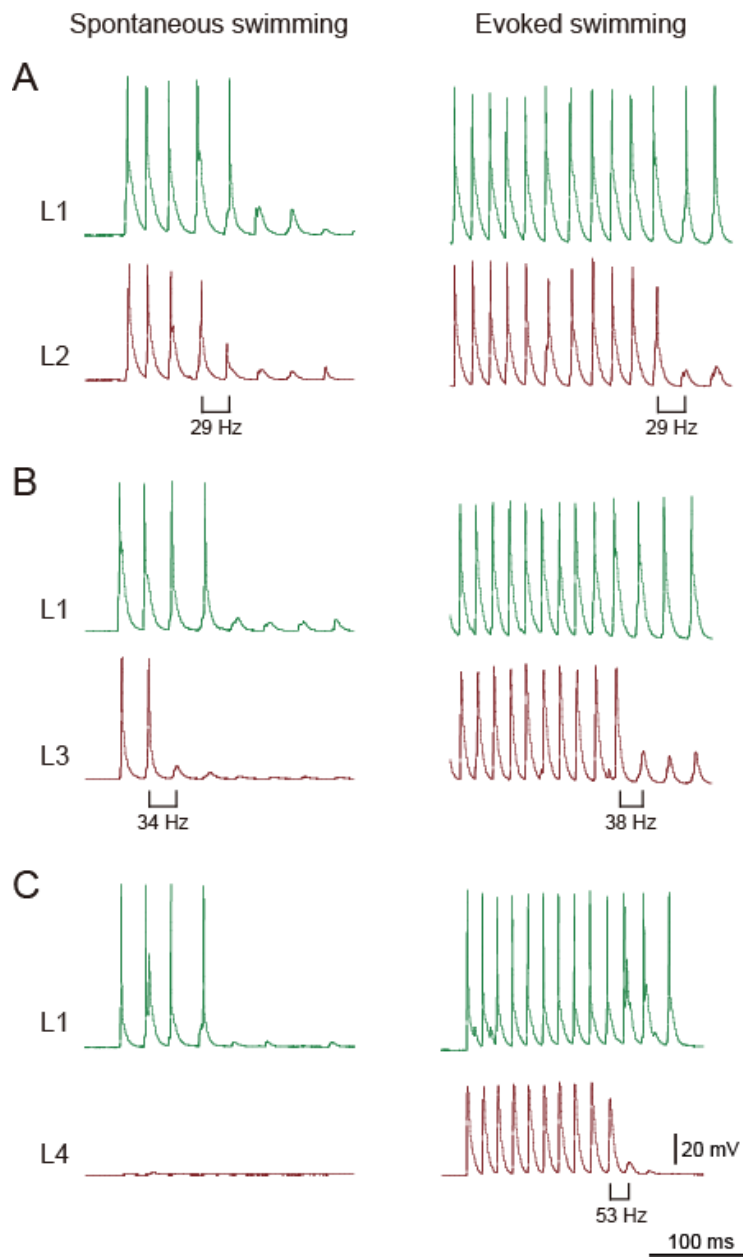


図 17 L1 と深層の筋肉 (L2、L3、L4) の電気生理学的記録

A : L1 と L2 のペア記録。左は自発的な仮想遊泳時の L1 と L2 の記録、右は誘発した高速遊泳時の同じペアの記録。スパイクから閾値に達さない EPP への移行が起こった遊泳周波数はトレースの下に記載している。

B : A と同様に L1 と L3 のペア記録。

C : A と同様に L1 と L4 のペア記録。

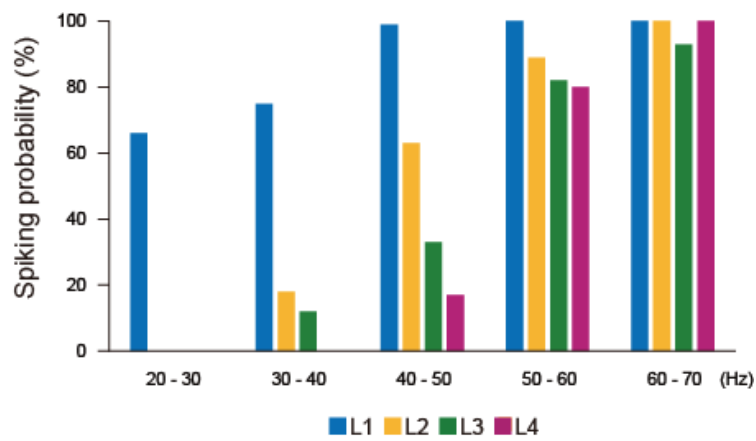


図 18 遊泳周波数とスパイク発生確率の関係

遊泳周波数（X 軸）と速筋におけるスパイクイベント発生の確率との関係を示す。データは、L1 と L2、L1 と L3、L1 と L4 の 3 組をそれぞれ 3 つずつ、合計 9 組のペア記録から収集した。

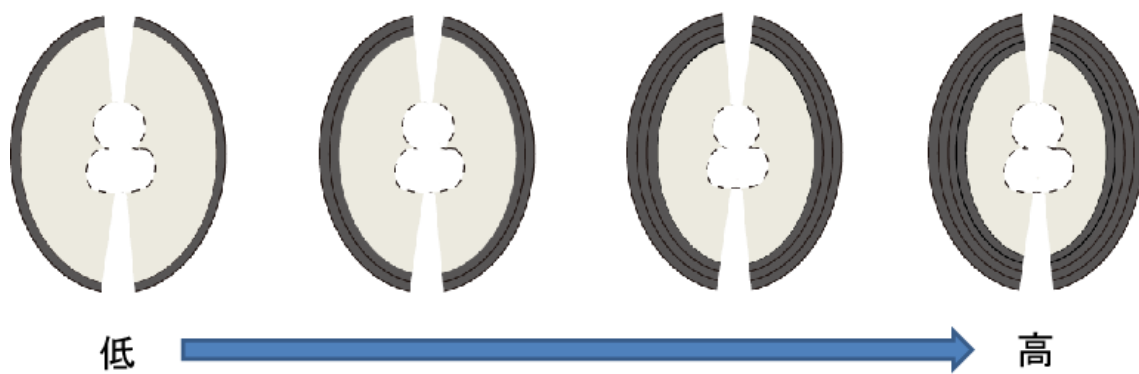


図 19 電気生理学的解析のまとめ図

電気生理学的解析によって得られた、遊泳速度に応じた速筋の動員における階層性。橢円はそれぞれ速筋を示す。遊泳周波数が高まるにつれて、速筋のより深層まで活動した。

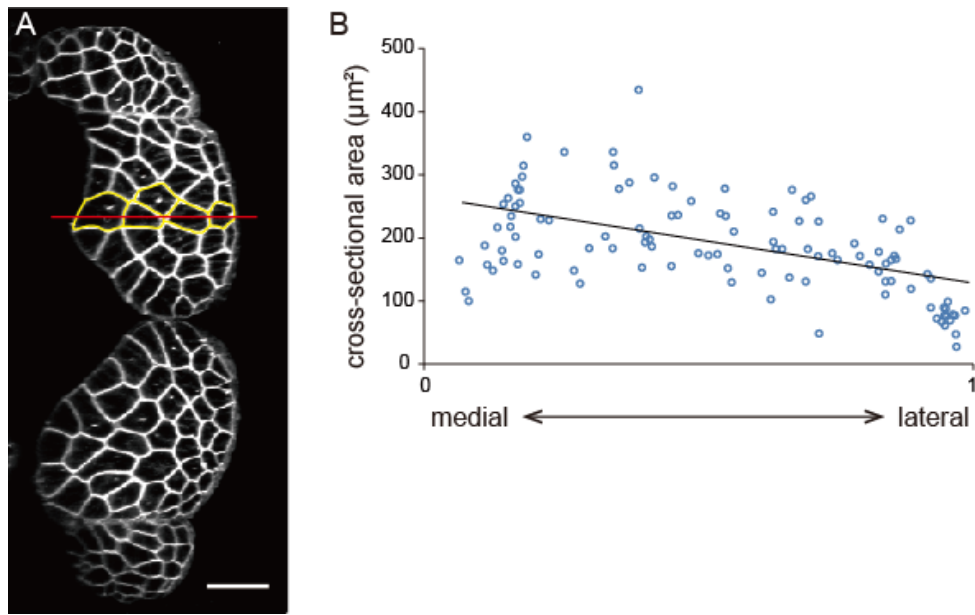


図 20 内側-外側軸に沿った速筋線維の大きさ

A : 5dpf の Tg(actc1b:Ace2N-4aa-mNeonGreen)仔魚の速筋の断面蛍光画像。速筋に特異的に膜結合型 mNeonGreen が発現している。ここでは筋肉の右側のみを示す。赤線と交差する速筋線維(黄色で示す)を解析用に選択した。スケールバーは 30μm。

B : 速筋の断面積。速筋の内側の端を 0、外側の端を 1 とした (X 軸)。グラフ上の直線は回帰直線を示す。データは 5 匹の魚それぞれの筋節 12~14 から得て、合計 15 セグメントを分析した。

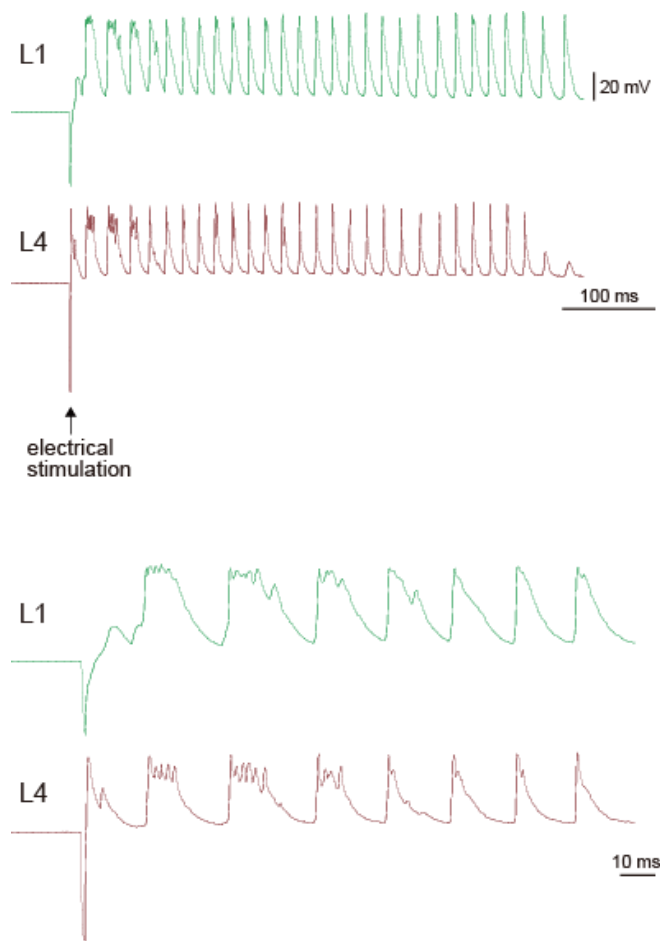


図 21 速筋 L1 と速筋 L4 の電気生理学的記録

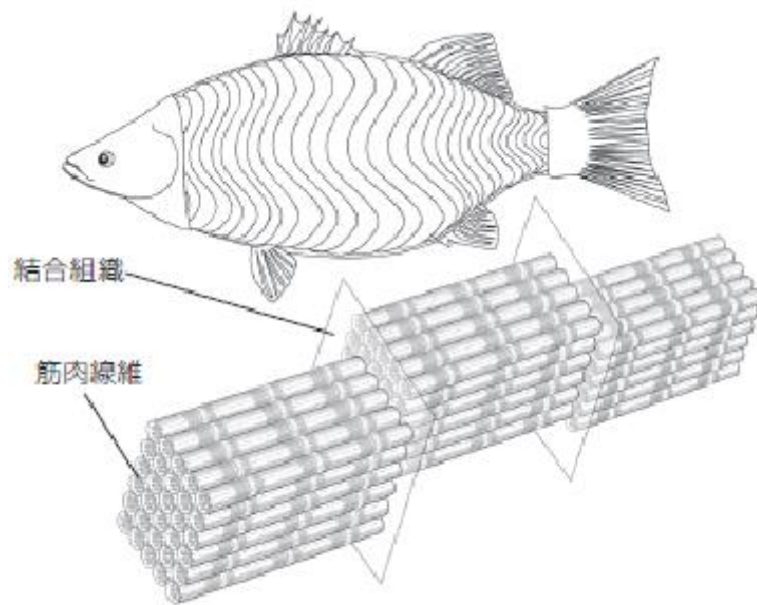
下図は拡大図。電気刺激直後のいくつかの遊泳サイクルにおいて、L1 と L4 の両方とも、1 サイクルの中で複数のスパイクを示す。



howto-flexbody01 肘の解剖図:筋肉と骨と腱を解説 | ヨガジェネレーション
yogageneration (<https://www.yoga-gene.com/yoga>)

図 22 哺乳類における力の伝達システム

哺乳類では、筋肉は小径の腱を介して骨に連結している。このような場合、力は最終的に狭いエリアに収束する。



https://kyoritsu-pub.sakura.ne.jp/app/file/goods_contents/290.pdf

図 23 魚類における力の伝達システム

魚類では、筋肉はシート状の結合組織に付着している。このような場合、力は膜のような広いエリアに伝わる。

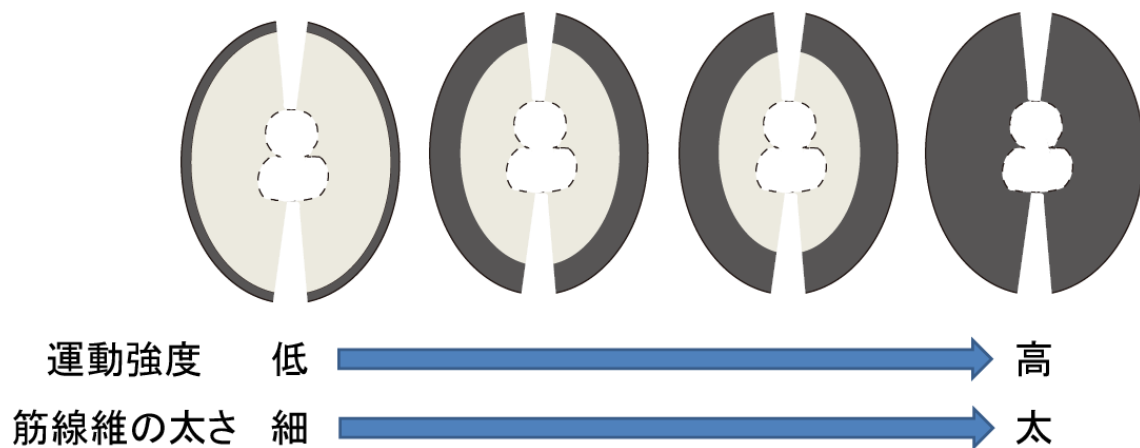


図 24 本研究の結論

本研究の結論の模式図。運動強度に応じた速筋の動員範囲と筋線維の太さ。楕円はそれぞれ速筋を示す。運動強度が高まるにつれて、速筋の外側からより内側まで徐々に動員された。また動員パターンと対応するように、筋線維の断面積にも外側から内側へと大きくなるというパターンが存在した。

参考文献

1. Hess, A., *Vertebrate slow muscle fibers*. Physiol Rev, 1970. **50**(1): p. 40-62.
2. Luna, V.M., E. Daikoku, and F. Ono, "Slow" skeletal muscles across vertebrate species. Cell Biosci, 2015. **5**: p. 62.
3. Schiaffino, S. and C. Reggiani, *Fiber types in mammalian skeletal muscles*. Physiol Rev, 2011. **91**(4): p. 1447-531.
4. Eccles, J.C., R.M. Eccles, and A. Lundberg, *The action potentials of the alpha motoneurons supplying fast and slow muscles*. J Physiol, 1958. **142**(2): p. 275-91.
5. Fetcho, J.R., *The spinal motor system in early vertebrates and some of its evolutionary changes*. Brain Behav Evol, 1992. **40**(2-3): p. 82-97.
6. Heckman, C.J. and R.M. Enoka, *Motor unit*. Compr Physiol, 2012. **2**(4): p. 2629-82.
7. Burke, R.E., *Motor units: anatomy, physiology and functional organization*, in *Handbook of Physiology. Section I. The Nervous System. Vol. II Motor Systems*, V.B. Brooks, Editor. 1981, American Physiological Society: Washington. p. 354-422.
8. Henneman, E. and L.M. Mendell, *Functional organization of motoneuron pool and its inputs*, in *Handbook of Physiology. Section 1: The Nervous System. Vol. II Motor Control, Part 1*, V.B. Brooks, Editor. 1981, American Physiological Society: Bethesda. p. 423-507.
9. Zajac, F.E. and J.S. Faden, *Relationship among recruitment order, axonal conduction velocity, and muscle-unit properties of type-identified motor units in cat plantaris muscle*. J Neurophysiol, 1985. **53**(5): p. 1303-22.
10. Jayne, B.C. and G.V. Lauder, *How swimming fish use slow and fast muscle fibers: implications for models of vertebrate muscle recruitment*. Journal of Comparative Physiology a-Sensory Neural and Behavioral Physiology, 1994. **175**(1): p. 123-31.
11. Tsukamoto, K., *Contribution of the Red and White Muscles to the Power Output*

Required for Swimming by the Yellowtail. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, 1984. **50**(12): p. 2031-2042.

12. Ellerby, D.J. and J.D. Altringham, *Spatial variation in fast muscle function of the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* during fast-starts and sprinting*. J Exp Biol, 2001. **204**(Pt 13): p. 2239-50.

13. Bello-Rojas, S., et al., *Central and peripheral innervation patterns of defined axial motor units in larval zebrafish*. J Comp Neurol, 2019. **527**(15): p. 2557-2572.

14. McLean, D.L., et al., *Continuous shifts in the active set of spinal interneurons during changes in locomotor speed*. Nat Neurosci, 2008. **11**(12): p. 1419-29.

15. Menelaou, E. and D.L. McLean, *A gradient in endogenous rhythmicity and oscillatory drive matches recruitment order in an axial motor pool*. J Neurosci, 2012. **32**(32): p. 10925-39.

16. Dana, H., et al., *High-performance calcium sensors for imaging activity in neuronal populations and microcompartments*. Nat Methods, 2019. **16**(7): p. 649-657.

17. Kohashi, T. and Y. Oda, *Initiation of Mauthner- or non-Mauthner-mediated fast escape evoked by different modes of sensory input*. J Neurosci, 2008. **28**(42): p. 10641-53.

18. Satou, C., et al., *Functional role of a specialized class of spinal commissural inhibitory neurons during fast escapes in zebrafish*. J Neurosci, 2009. **29**(21): p. 6780-93.

19. Shimazaki, T., et al., *Behavioral Role of the Reciprocal Inhibition between a Pair of Mauthner Cells during Fast Escapes in Zebrafish*. J Neurosci, 2019. **39**(7): p. 1182-1194.

20. Orger, M.B., et al., *Control of visually guided behavior by distinct populations of spinal projection neurons*. Nat Neurosci, 2008. **11**(3): p. 327-33.

21. Budick, S.A. and D.M. O'Malley, *Locomotor repertoire of the larval zebrafish: swimming, turning and prey capture*. J Exp Biol, 2000. **203**(Pt 17): p. 2565-79.

22. Severi, K.E., et al., *Neural control and modulation of swimming speed in the larval*

zebrafish. *Neuron*, 2014. **83**(3): p. 692-707.

23. Burgess, H.A. and M. Granato, *Sensorimotor gating in larval zebrafish*. *J Neurosci*, 2007. **27**(18): p. 4984-94.

24. Kimura, Y. and S.-i. Higashijima, *Regulation of locomotor speed and selection of active sets of neurons by V1 neurons*. *Nature Communications*, 2019. **10**(1): p. 2268.

25. Granato, M., et al., *Genes controlling and mediating locomotion behavior of the zebrafish embryo and larva*. *Development*, 1996. **123**: p. 399-413.

26. Zhou, W., et al., *Non-sense mutations in the dihydropyridine receptor beta1 gene, CACNB1, paralyze zebrafish relaxed mutants*. *Cell Calcium*, 2006. **39**(3): p. 227-36.

27. Ono, F., et al., *Paralytic zebrafish lacking acetylcholine receptors fail to localize rapsyn clusters to the synapse*. *J Neurosci*, 2001. **21**(15): p. 5439-48.

28. Luna, V.M. and P. Brehm, *An electrically coupled network of skeletal muscle in zebrafish distributes synaptic current*. *J Gen Physiol*, 2006. **128**(1): p. 89-102.

29. Kimura, Y., Y. Okamura, and S. Higashijima, *alx, a zebrafish homolog of Chx10, marks ipsilateral descending excitatory interneurons that participate in the regulation of spinal locomotor circuits*. *J Neurosci*, 2006. **26**(21): p. 5684-97.

30. Mascarello, F., M.G. Romanello, and P.A. Scapolo, *Histochemical and immunohistochemical profile of pink muscle fibres in some teleosts*. *Histochemistry*, 1986. **84**(3): p. 251-5.

31. Elworthy, S., et al., *Expression of multiple slow myosin heavy chain genes reveals a diversity of zebrafish slow twitch muscle fibres with differing requirements for Hedgehog and Prdm1 activity*. *Development*, 2008. **135**(12): p. 2115-26.

32. Higashijima, S., et al., *High-frequency generation of transgenic zebrafish which reliably express GFP in whole muscles or the whole body by using promoters of zebrafish origin*.

Dev Biol, 1997. **192**(2): p. 289-99.

33. Gong, Y., et al., *High-speed recording of neural spikes in awake mice and flies with a fluorescent voltage sensor*. Science, 2015. **350**(6266): p. 1361-6.

34. Sugioka, T., M. Tanimoto, and S.I. Higashijima, *Biomechanics and neural circuits for vestibular-induced fine postural control in larval zebrafish*. Nat Commun, 2023. **14**(1): p. 1217.

35. Buss, R.R. and P. Drapeau, *Physiological properties of zebrafish embryonic red and white muscle fibers during early development*. J Neurophysiol, 2000. **84**(3): p. 1545-57.

36. Hirata, H., et al., *accordion, a zebrafish behavioral mutant, has a muscle relaxation defect due to a mutation in the ATPase Ca²⁺ pump SERCA1*. Development, 2004. **131**(21): p. 5457-68.

37. yogageneration, 2019, 「ヨガで身体が柔らかくなる理由、説明できる？解剖学的に仕組みを解説！」, yogageneration ホームページ, (2025 年 2 月 5 日取得, <https://www.yoga-gene.com/>)

38. 「魚の生体構造と品質」, (2025 年 2 月 5 日取得, https://kyoritsu-pub.sakura.ne.jp/app/file/goods_contents/290.pdf)

謝辞

本研究を遂行するにあたり、多くの方のお世話になりました。ここに深く感謝の意を評します。まず、研究活動から日々の生活に至るまで、熱心にご指導を賜りました東島眞一教授に心からお礼を申し上げます。研究を遂行する面白さと難しさ、研究者としての姿勢などを常に正面から向き合って教えていただきました。また、貴重なご教授を賜りました基礎生物学研究所の渡辺英治准教授、椎名伸之准教授にも深く御礼申し上げます。

自然科学研究機構神経行動学研究部門の木村有希子助教、谷本昌志助教をはじめとする方々には多くのご助言と実験や解析のご支援をいただきました。誠にありがとうございました。また同部門の研究員さん、支援員さん、先輩、後輩、友人にも心から感謝いたします。

最後に、博士課程に進学する機会を与え、いつも見守り続けてくれた家族に深く感謝いたします。

皆さま、本当にありがとうございました。