

氏 名 清水 彩杏

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 2584 号

学位授与の日付 2025 年 3 月 24 日

学位授与の要件 生命科学研究科 基礎生物学専攻
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 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

論文審査委員 主 査 渡辺 英治
基礎生物学コース 准教授
東島 眞一
基礎生物学コース 教授
藤森 俊彦
基礎生物学コース 教授
小野 富三人
大阪医科薬科大学 医学部 生理学教室 教授

博士論文の要旨

氏 名： 清水 彩杏

論文題目： 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)

Vertebrate skeletal muscles are composed of slow and fast contracting muscles. Each muscle is innervated by a distinct type of motor neuron and forms a motor unit. The motor unit of fast muscles generates strong force or fast movement, while the motor unit of slow muscles produces weaker force or slower movement. Motor units in fast muscles tend to be larger in terms of the size of motor neurons and muscle fibers. In many cases, as the strength or speed of movement increases, new motor units are recruited in addition to those already active. The newly recruited motor units are typically larger than the initially active ones.

In mammals, fast and slow muscle fibers are intermingled within the muscle. In contrast, in the trunk muscles of fish, these fibers are spatially separated. Slow muscle fibers are present only in the superficial layers of the muscle, while the majority of the muscle is composed of fast muscle fibers. During slow swimming, only the slow muscles are active, while the fast muscles are recruited during faster swimming. However, the speed and strength of movement cannot be simply categorized as "slow/weak" and "fast/strong"; instead, they follow a continuous spectrum. This suggests that within the fast muscle fibers, which make up most of the trunk muscles, there may be a recruitment pattern that depends on the strength of the movement.

Neuroanatomical studies have shown that the largest motoneurons innervate the entire area of the fast muscle, from medial to lateral. As motoneuron size decreases, their innervation tends to be more restricted to the lateral areas of the muscle. This suggests that there is a graded recruitment pattern in muscles, from the lateral to the

medial side. However, direct analysis of spatial recruitment patterns in fast muscles has not yet been conducted. In this study, I addressed this question using Ca^{2+} imaging and electrophysiological techniques in larval zebrafish.

I generated transgenic fish expressing Ca^{2+} indicators in fast muscle to study muscle activity during different types of movements. I induced three movement types with varying strengths: escape, turn, and slow swimming. Among these, the angular velocity of the tail was highest during escape, followed by turn, and then slow swimming. I conducted Ca^{2+} imaging by observing the left and right fast muscles from the dorsal side. For analysis, each fast muscle was divided into three sections: lateral, intermediate, and medial. The fluorescent intensity of each region was then measured to assess muscle activity. The results revealed distinct patterns of muscle activation depending on the movement type. During escapes, all regions of the fast muscle were active. During turns, activity was observed in both the intermediate and lateral regions, while during slow swimming, only the lateral region was active. Furthermore, within each region, the level of muscle activity increased in proportion to the strength of the movement.

While Ca^{2+} imaging allows spatial observation of fast muscle activity from lateral to medial areas simultaneously, its low temporal resolution prevents analysis of continuously changing movements. Furthermore, since larval fish do not swim at high speeds in agarose gels, it is not possible to study their activity patterns during high-frequency swimming. To overcome this limitation, I performed electrophysiological analysis of fast muscles during fictive swimming. Larval fish exhibit a wide range of swimming frequencies that vary continuously during fictive swimming. To examine spatial patterns of muscle activity, whole-cell patch-clamp recordings were made simultaneously from two muscle cells located at different depths (superficial and more medial). The firing rates of each layer were examined to quantify the results. For each frequency, the firing rate was highest in layer 1, followed by layer

2, layer 3, and layer 4, indicating a hierarchical structure. As the frequency increased, the firing rates of all muscle layers increased.

I also conducted anatomical studies to examine the size of fast muscle fibers. Measurements of the cross-sectional area of fast muscle fibers revealed that their size gradually increased from the lateral to the medial side.

In summary, the present study revealed the existence of a spatially ordered recruitment pattern among fast muscle cells. Specifically, during weaker or slower movements, only the lateral portions of fast muscle cells are activated. As movement speed or strength increases, additional fast muscle cells are progressively recruited from lateral to medial regions. Furthermore, the spatially ordered recruitment of fast muscles from lateral to medial is associated with a corresponding increase in muscle fiber size. These findings provide significant insights into the organization and function of fast muscles in larval zebrafish, illustrating how spatial recruitment and fiber size interact to optimize movement performance.

Results of the Doctoral Thesis Defense

博士論文審査結果

Name in Full

氏 名 清水 彩杏

T i t l e

論文題目 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

哺乳類では、速筋線維と遅筋線維が筋肉内で混在しています。対照的に、魚類の体幹筋では、これらの線維は空間的に分離しています。遅筋線維は筋肉のごく表層にのみ存在し、筋肉の大部分は速筋線維で構成されています。遅い遊泳時、あるいは弱い運動時には遅筋だけが活動し、速い遊泳時、あるいは強い運動時には速筋が動員されます。しかし、動きの速さや強さは単純に「遅い弱い」と「速い強い」に分類できるものではなく、連続的なスペクトラムに沿っています。これは、体幹筋の大部分を占める速筋線維内で、動きの強さに応じた動員パターンが存在しうる可能性を示唆しています。しかし、速筋における空間的な動員パターンについての直接的な解析はまだ行われていません。清水さんは、この課題に取り組むため、幼生期のゼブラフィッシュを用いて Ca^{2+} イメージングおよび電気生理学的手法を用いて研究を行いました。

Ca^{2+} イメージング実験においては、逃避、ターン、遅い遊泳という 3 つの異なる運動を誘発し、これらの運動に伴う速筋の空間的な活動パターンを調べました。これら 3 つの運動においては、尾の角速度は逃避行動時が最も高く、次にターン、最後に遅い遊泳の順であり、この順に運動強度が高いと考えられます。速筋を外側、中間、内側の 3 つの領域に分け、それぞれの領域の蛍光強度を測定して筋活動を評価しました。その結果、逃避行動時には速筋のすべての領域が活動すること、ターン時には中間および外側の領域で活動すること、遅い遊泳時には外側領域のみが活動することを見いだしました。

電気生理学的解析においては、連続的に広範囲に周波数に変化する仮想遊泳中の、異なる深さ（表層および内側）に位置する 2 つの筋細胞の電気活動記録を行いました。各層の発火率を調べることで定量化した結果、周波数ごとに、層 1（もっとも表層）で最も高い発火率が見られ、次に層 2、層 3、層 4 の順に減少し、外側から内側にかけて、速筋細胞の活動には明確な階層構造が存在することを示しました。

さらに、速筋線維のサイズを調べる解剖学的研究も行いました。速筋線維の断面積を測定した結果、線維のサイズ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りました。

まとめますと、清水さんの研究により、速筋細胞間に空間的に秩序立った動員パターンが存在することが明らかになりました。具体的には、弱いまたは遅い動きでは速筋細胞の外側部分のみが活性化され、動きの速度や強度が増すと、外側から内側へと追加の速筋細胞が段階的に動員されます。さらに、この外側から内側への速筋の秩序だった動員は、筋線維サイズの増加と関連しています。これらの発見は、ゼブラフィッシュ幼魚における速筋の構造と機能に関する重要な洞察を提供するものです。この観点から、本論文は同分野における重要な貢献であり、学位授与にふさわしいと審査委員全員が一致して結論しました。