

■原 著■

ハエトリソウ捕虫葉の閉合に伴う構造変化と運動細胞内外のイオン動態

伊藤 葉¹ 小野真菜美¹ 広瀬裕子² 渡邊信彦² 歌川ちひろ² 前田奈美² 丸茂 幸²
下園奈津美² 塩澤拓実² 伊藤晋之介² 早津 学^{2,3} 鈴木季直^{1,2,4,5}

Structural Changes and Intra- and Extracellular Ion Movements in
Motor Cells during Leaf Closure of Insectivorous Venus Flytrap

Shiori Ito¹, Manami Ono¹, Yuko Hirose², Nobuhiko Watanabe², Chihiro Utagawa²,
Nami Maeda², Sachi Marumo², Natsumi Shimozone², Takumi Shiozawa², Shinnosuke Ito²,
Manabu Hayatsu^{1,3} and Suechika Suzuki^{1,2,4,5}

¹ Department of Biological Sciences, Graduate School of Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan

² Department of Biological Sciences, Faculty of Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan

³ Present Address: Division of Microscopic Anatomy, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Niigata University, Niigata City, Niigata 951-8150, Japan

⁴ Research Institute for Integrated Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan

⁵ To whom correspondence should be addressed. E-mail: suechika-bio@kanagawa-u.ac.jp

Abstract: To examine the regulatory mechanism of leaf closure in the insectivorous plant Venus flytrap, light and electron microscope studies on the distribution of motor cells, the ultrastructure of those cells, and the intra- and extracellular movement of various ions during leaf closure were performed in a specified region near the midrib at the middle of the blade. Light microscope observation revealed that one or two well-arrayed hypodermal cell layers were present beneath the epidermis. In hypodermal and epidermal cells, during leaf closure, the cell volume measured by the montage method decreased significantly on the adaxial side and increased significantly on the abaxial side, indicating their major contribution as motor cells to leaf closure. Electron microscope observation showed that motor cells of hypodermal and epidermal cell layers contained electron-dense materials located along the inner surface of tonoplasts. On the adaxial side, electron-dense materials found as flattened sheets changed shape to numerous small globules during leaf closure. An inverse change in electron-dense materials in the structure was found on the abaxial side. Since the structural change of electron-dense materials is correlated with the volume change of motor cells during leaf closure, they may play a significant role turgor variation in those cells. Quantitative X-ray microanalysis of cryosections showed that, during leaf closure, the concentration of K decreased significantly in the vacuolar electron-dense material, vacuolar lumen, and cell walls on the adaxial side, while it increased on the abaxial side. In the blade region near the midrib, K ions released from the vacuolar electron-dense material in the adaxial cells may cause the movement of water to the abaxial region, and eventually turgor movement by the swelling of abaxial motor cells. The reciprocal Ca movement between adaxial and abaxial motor cells during leaf closure indicates the possible role of Ca ions in regulating the turgor pressure.

Keywords: seismonastic leaf closure, Venus flytrap, cell volume change, vacuolar electron-dense material, ion movement, quantitative X-ray microanalysis

序論

北米原産の食虫植物ハエトリソウ *Dionaea muscipula* Ellis は、昆虫を捕獲するために捕虫葉を閉じる。この運動は、葉の中肋（主脈領域）を回転中心とする左右裂片の閉合運動であり、駆動力は中肋近傍の葉肉細胞で生ずる膨圧と考えられている。左右裂片それぞれの向軸面中央部には3本の棘状感覚毛が分布しており、これらの感覚毛に昆虫などが接触することが刺激となり、感覚毛基部にある感覚細胞で受容器電位が生じ、続いて発生する活動電位が葉身内を伝播し、主脈近傍に達してこの領域の細胞群が活性化され、膨圧運動が誘起されて機械的な葉裂片の閉合が引き起こされると考えられている¹⁻⁴⁾。このように、従来の研究により、捕虫葉閉合における刺激応答の生理学的機序の概要は示されているが、閉合に関わる運動細胞の形態変化やイオン動態についての知見は少ない。

ハエトリソウにおける刺激受容と興奮伝達およびそれに続く膨圧運動による運動細胞活性化の様式はオジギソウの振動傾性反応の機序⁵⁻⁹⁾に類似している。オジギソウの刺激応答である葉柄屈曲や小葉閉合を引き起こす葉枕細胞の膨圧変化はKイオンの移動を伴う水の流出入によって成され^{5, 9)}、その流動にはCaイオンが制御因子として関与している可能性が示されている^{9, 11)}。その類似性から、ハエトリソウの捕虫葉閉合でも、膨圧変化を駆動力とする運動細胞ではオジギソウと同様のイオン動態や運動調節機構が機能している可能性が高い。本研究では、この点を明らかにするために、光学顕微鏡を用い、膨圧変化に伴う運動細胞の形態変化および容積変化の解析を行ない、オジギソウで示されているCa動態へのタンニン関与^{9, 11, 12)}を検討するために硫酸鉄による細胞化学を試みた。また、電子顕微鏡を用い、膨圧変化に伴う運動細胞の微細構造変化の観察を行ない、凍結切片・元素分析法¹³⁻¹⁷⁾により、捕虫葉閉合に伴う運動細胞における各種イオンの動的分布変化を解析した。

材料と方法

材料

市販のハエトリソウ *Dionaea muscipula* Ellis を購入し、24°Cの温室で栽培し、葉身の長さが約2 cmの捕虫葉を研究材料として使用した。捕虫葉は、摘出や解剖などの物理的刺激や化学固定剤などの薬物刺激によって容易に閉じてしまうので、鉢植えのままのハエトリソウを密閉ガラス容器(24.5 × 11.5 × 25.0 cm³)内に静置し、ジエチルルエーテルでガス麻酔(1.5~2.0時間)することにより開いている状態

(開状態)を誘導した。一方、閉じている状態(閉状態)も、感覚毛を針で2回刺激して閉じさせた後に同条件のガス麻酔を施すことで誘導した。麻酔後、葉身を先端、中央、基部の3領域に分割し、先端部と基部は除外し、中央部のみを残した。捕虫葉の閉合は、葉の中肋付近の細胞の膨圧運動により引き起こされていると考えられる⁴⁾ので、葉身中央部から中肋部分は取り除き、その切断縁から葉縁方向へ2~3 mm巾となる帯状の葉片を摘出し、この中肋側中央部(駆動部)を研究対象試料とした。

顕微鏡観察試料の作製

通常の光学顕微鏡および電子顕微鏡観察のため、葉片を0.1 Mのリン酸緩衝液(pH 7.2)で希釈した6%グルタルアルデヒド液に浸し、4°Cで24時間前固定した。次に、同リン酸緩衝液と蒸留水で洗浄した後、2%四酸化オスミウム液に浸し、室温で3時間後固定した。固定試料はアセトン系列で脱水し、Epoxy樹脂への置換処理を施し、樹脂に包埋して熱重合させた。

ウルトラマイクローム(Reichert Ultracut N)で包埋樹脂ブロックから光学顕微鏡観察用の切片(厚さ~0.9 μm)を薄切し、トルイジンブルーで加温染色し、光学顕微鏡(OLYMPUS BH-2)で観察し、組織像をCCDカメラ(Pixera 600DL-CU)で撮影した。同様に、厚さ~70 nmの超薄切片を作製し、カーボン蒸着で補強したコロジオン支持膜を張ったCu-150のメッシュに載物し、酢酸ウランとクエン酸鉛でそれぞれ10分間ずつ染色し、透過型電子顕微鏡(JEOL JEM 2000EX, JEM1230 TEM)で観察した。

モンタージュ法による細胞容積の測定

捕虫葉の閉合に最も寄与する細胞群を特定するために、閉合に伴う膨圧変化を検出すべく、細胞容積変化を評価できるモンタージュ法^{9, 18-20)}を適用した。捕虫葉中肋側中央部(駆動部)に分布する全細胞の断面積を画像処理ソフトImage Jで測定し、開状態と閉状態の測定値間に有意の差があるか否かについてt検定を行った。

タンニン細胞化学

本研究の初期に、ハエトリソウの捕虫葉細胞の通常顕微鏡観察で、中肋側中央部の細胞内にはオジギソウの葉枕細胞に見られる液胞内タンニン粒^{9, 21)}と類似の高電子密度構造が観察された。この構造がタンニン粒であれば細胞の膨圧変化に関与している可能性があるため、同定のため、硫酸鉄(FeSO₄)細胞化学²²⁾を試みた。徒手切片法で作製した切片を

2%FeSO₄ 液で 2 時間染色し、光学顕微鏡 (OLYMPUS BH-2) で観察し、CCD カメラ (Pixera 600DL-CU) で撮影した。

含水量測定

後述の X 線マイクロアナリシスの元素定量では元素濃度を乾燥重量 (mmol/kg dry wt.) で表すが、この値を生体組織内での濃度に換算するには組織 (または細胞) の含水量の知見が必要となる¹³⁻¹⁶⁾。ハエトリソウ捕虫葉から中肋側中央部葉片を切り出し、電子天秤 (SHIMADZU AUW220) で生重量を測定した後、アセトン系列で脱水して再び試料の重量を測定し、試料塊としての含水量 (または含水率) を計算した。

急速加圧凍結と凍結超薄切片の作製

定量的 X 線マイクロアナリシスのため急速加圧凍結法により試料を凍結した。捕虫葉から摘出した葉片 (中肋側中央部) を細切し、直径 2.5 mm、高さ 1.0 mm の円盤状凍結用キャリアの試料装填孔内に向きを考慮して装填し、高圧凍結装置 (Leica EMPACT) で加圧凍結した。凍結試料はアルミ製専用コンテナに収納して液体窒素中で保存した。

クライオチャンバー内を -145°C、ガラスナイフを -140°C、試料回転移動軸を -140°C に冷却したクライオミクロトーム (Leica Ultra UCT/EM FCS) に凍結試料を装填し、厚さ約 200 nm の凍結超薄切片を作製した。アイラッシュスティックで切片をすくい取り、クライオチャンバー内でカーボン支持膜を張った Ni-200 メッシュに載物し、もう一枚のメッシュを支持膜が向かい合うように重ね合わせて圧迫した後、専用の冷却コンテナに収納した。次に、凍結乾燥装置 (VFD-300S) に冷却コンテナを装填し、高真空条件下で -110°C 以下から 30°C まで約 10 時間かけて徐々に温度を上げて凍結乾燥させた。乾燥後切片を乾燥器内に保存した。

定量的 X 線マイクロアナリシス

エネルギー分散型 X 線検出器 (JEOL EX-14033 JTP) を装着した透過型電子顕微鏡 (JEOL JEM 1230 TEM) の試料汚染防止コールドトラップを液体窒素で冷却し、凍結乾燥切片を装填したクライオトランスファーホルダー (Gatan model 626DH) を鏡筒内に挿入してから液体窒素で -130°C に冷却した。分析時の観察倍率を 15,000 倍、加速電圧 80 kV、試料ホルダーの傾斜角度を水平位から 15° に設定し、ビームスポットサイズを 4 に設定した。電子ビームを直径およそ 0.1 μm になるように集束させ、分析対

象領域に 200 秒間照射し、発生した X 線を検出器で検出した。

X 線スペクトルの各ピーク値に基づいて、元素の定性を行った²³⁾。X 線スペクトル解析ソフト (NORAN System SIX) を用い、定量測定の理論^{13-15, 23)} に従い、特性 X 線の X 線強度 (Px) と連続 X 線由来のバックグランド (4.5~5.5 keV) の X 線強度 (Bx) の強度比 (P/B 比) を求めた。これに、用いた分析電子顕微鏡における各元素のウェイトファクター (Wx)^{9, 16, 17)} を積算して各元素の濃度 (mmol/kg dry wt.) を算出した。

結果

捕虫葉の組織観察

捕虫葉の閉合に寄与する膨圧変化の大きい運動細胞の分布を組織学的に検討するために、樹脂包埋試料由来の切片 (厚さ約 0.9 μm) を光学顕微鏡で観察した。Fig.1 は、葉の表面に垂直な断面を示し、上部は向軸側、下部は背軸側である。向軸側表面には表皮のさらに外側に高頻度で分泌腺が局在しており、それらの形状は多細胞からなる楕円体であった。

向軸側も背軸側も共に表皮付近の細胞群は細胞壁も細胞質もトルイジンブルーで強く染色されていた。表皮直下の細胞は、向軸側でも背軸側でも、表皮細胞よりやや大きく、しかし、その形状は良く似ており、その細胞群は、水平方向に密に隣接して配列し、表皮第二層とも看做しうる細胞層を構成していた。背

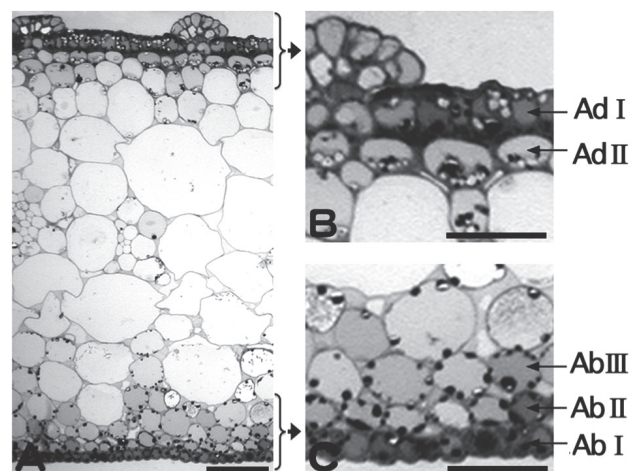


Fig.1. Light microscope images of a Venus flytrap leaf, cut transversely near the midrib at leaf opening state. A. Low magnification view, showing adaxial side in upper part and abaxial side in lower part. B. Enlarged view of adaxial side, showing epidermal (Ad I) and hypodermal (Ad II) cell layers. C. Enlarged view of abaxial side, showing epidermal (Ab I) and hypodermal (Ab II, Ab III) cell layers. Note secretory glands localized on the surface of adaxial epidermis. Scale bar, 200 μm (A) and 100 μm (B, C).

軸側では、さらにこの細胞層の下にそれより大きな細胞が配列して第三の層をなしていた。Fig.1 に示すように、これらの表皮細胞および表皮直下の細胞層の名称を、それぞれ、向軸側 I 層 (表皮細胞層; Ad I)、向軸側 II 層 (Ad II)、背軸側 I 層 (表皮細胞層; Ab I)、背軸側 II 層 (Ab II)、背軸側 III 層 (Ab III) とした。

捕虫葉細胞の断面積測定

葉の閉合が細胞の膨圧変化により誘起されるとすれば、葉の内奥部にある細胞間隙の多い葉肉細胞群より、層をなすように整然と配列している細胞群の方がより大きく関与すると考えられる。そこで、前述した、表皮および表皮下の 5 層を構成する細胞の容積変化を検出すべく、それらの細胞断面積をモンタージュ法^{9, 18-20)}を用いて測定した。測定値は各層ごとに、縦軸を例数 (細胞数)、横軸を階級幅 200 μm^2 とした細胞断面積で表した度数分布グラフにまとめたが、いずれのグラフもおおむね正規分布を示した。

表 1 は細胞層ごとの細胞断面積の平均値と標準偏差、ならびに捕虫葉の開閉両状態間の測定値についての t 検定結果を示している。向軸側 I 層 (表皮細胞) の細胞群では、閉状態の細胞断面積は開状態のそれより有意に小さく、閉合前の 84% であった。向軸側 II 層の細胞は、開状態では I 層の細胞より基本的に大きい、閉合に伴い有意に小さくなり、細胞断面積は開状態のその 71% であった。向軸側 I 層の細胞群より縮小率は大きく、閉合時にこれらの細胞の膨圧はより大きく減少することが示唆された。

背軸側 I 層 (表皮細胞) の細胞は向軸側 I 層の細胞より常に小さく、細胞断面積でおよそ半分程度の大きさであった。捕虫葉の閉合に伴い、細胞断面積はやや増加しており、開状態のおよそ 116% の値を示した。しかし、その変化は検定による有意の差としては認められなかった。背軸側 II 層の細胞も I 層と同様に小さかったが、細胞断面積は開状態のおよそ 117% の大きさとなり、両者の細胞の大きさは辛うじて有意の差があるものと認められた。背軸側 III 層の細胞は、背軸側 I 層や II 層の細胞よりかなり大

きかったが、向軸側の細胞よりは小さかった。しかし、閉状態の細胞断面積は開状態の 116% を示し、有意に増加しており、閉合に伴い、これらの細胞群の細胞の膨圧が増大している可能性が示された。

捕虫葉運動細胞の微細構造観察

捕虫葉の閉合に伴う中肋側中央部の表皮および表皮直下の細胞層を構成する細胞の構造変化を検出するために開および閉状態の組織について電子顕微鏡観察を行った (Fig. 2)。

向軸側表皮細胞外表面の細胞壁の厚さは 5~8 μm で、さらにその外表面は厚さ約 0.5 μm のクチクラ層で覆われていた。また、表面には、クチクラ層に密着して長径 65~75 μm 、短径 30~35 μm の楕円体状の分泌腺が観察された (Fig. 2B)。I 層の表皮細胞内では、色素体は殆ど見られず、あっても未発達の色素体であった。しかし、II 層の表皮下細胞では大きなデンプン粒を含む葉緑体が見られた (Fig. 2A)。I、II 層の細胞はいずれも液胞が良く発達しており、細胞の中央は殆ど液胞で占められていた。液胞内には高電子密度の構造が含まれており、それは、開状態では液胞膜の内表面に沿って広がる薄い帯状を呈し (Fig. 3A)、一方、閉状態では液胞膜内表面に沿って分布する多数の顆粒であった (Fig. 3B)。

背軸側表皮細胞外表面の細胞壁の厚さは 2~3 μm 程と向軸側のそれよりも薄かった (Figs. 2C, D)。更に、その表面を覆うクチクラ層も細胞壁の約 1/2 の厚さであった。向軸側では I 層の表皮細胞内に殆ど色素体は見られなかったが、背軸側では表皮細胞でも内膜系の発達した葉緑体が観察された。II 層と III 層の細胞では、向軸側と同様に、デンプン粒を含む葉緑体が含まれていた (Figs. 2C, 2D, 3C)。向軸側と同様に、液胞内に高電子密度構造が観察され、形状も開と閉の状態では異なっていたが、その違いは向軸側とは全く逆の鏡像的相関を示し、開状態で顆粒状、閉状態で帯状であった (Figs. 3C, 3D)。

Table 1. Cross-sectional areas of epidermal and hypodermal cells in leaf central regions near the midrib at opening and closing states of Venus flytrap leaves

Cell layers	Opening state (μm^2)	Closing state (μm^2)	Level of significance
Adaxial I	1,675.5 \pm 685.6 (n = 93)	1,413.2 \pm 641.1 (n = 94)	< 0.01
Adaxial II	2,048.5 \pm 1,307.9 (n = 104)	1,455.8 \pm 797.5 (n = 102)	< 0.01
Abaxial III	1,217.0 \pm 718.3 (n = 96)	1,409.3 \pm 666.2 (n = 92)	< 0.05
Abaxial II	748.7 \pm 386.6 (n = 99)	874.3 \pm 388.4 (n = 101)	< 0.05
Abaxial I	806.5 \pm 447.6 (n = 91)	935.3 \pm 678.7 (n = 90)	> 0.05

Values are mean \pm SD.

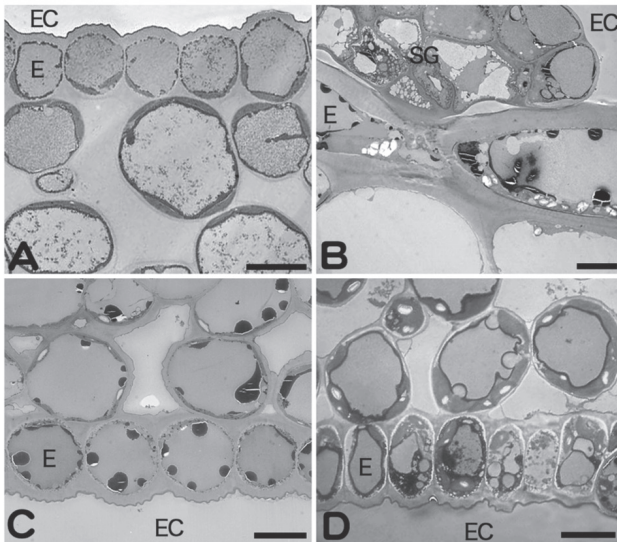


Fig.2. Electron microscope images of Venus flytrap leaves, showing epidermal and hypodermal cell layers. A and B. Cross-sectional view of adaxial side in leaf opening state (A) and closing state (B). C and D. Cross-sectional view of abaxial side in leaf opening state (C) and leaf closing state (D). EC: extracellular space, E: epidermis, SG: secretory gland. Scale bars, 10 μ m (A-D).

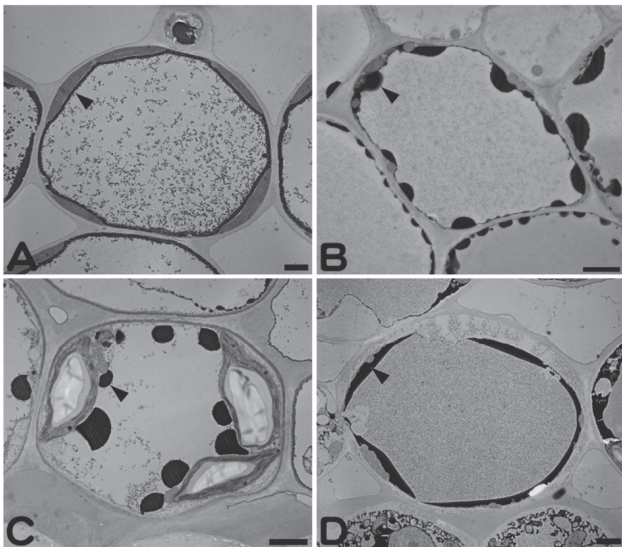


Fig.3. Electron microscope images of hypodermal cells in Venus flytrap leaves. A and B. Cells of adaxial side (Ad II) in leaf opening state (A) and closing state (B). C and D. Cells of abaxial side (Ab II) in leaf opening state (C) and leaf closing state (D). Note the inverse structural change of vacuolar electron-dense materials (arrow heads) localizing along the inner surface of tonoplast between adaxial and abaxial sides in addition to the leaf opening and closing states. Scale bars, 2 μ m (A-D).

光学顕微鏡によるタンニンの細胞化学

Fig.4 は、閉状態のハエトリソウ捕虫葉の中肋付近から徒手切片法により切削した横断切片の FeSO_4 処理前後の光学顕微鏡写真である。 FeSO_4 処理前 (Fig. 4A) に比べ、 FeSO_4 溶液で 2 時間処理した切片 (Fig.

4B) では、組織全域の細胞が黒褐色に強染色され、いずれの細胞にも多くのタンニンが含まれていることが確認された。これにより、電子顕微鏡で観察された液胞内の高電子密度構造がオジギソウで見られるタンニン粒と類似の成分で構成されている可能性が示された。

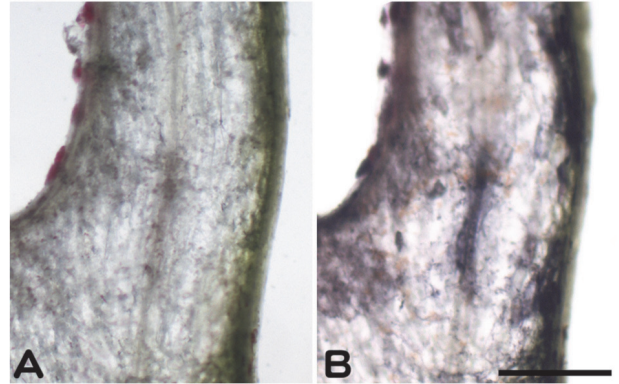


Fig. 4. Light microscope images of transverse sections, cut manually from living Venus flytrap leaves at leaf closing state, showing a part of leaves near the midrib. Left and right indicate adaxial and abaxial sides, respectively. A. Cross-sectional view before cytochemical FeSO_4 staining. B. Cross-sectional view after 2 hr from cytochemical FeSO_4 staining, showing structures well stained with FeSO_4 in epidermal and hypodermal cells. Scale bar, 0.5 mm.

含水量

乾燥重量で示される元素濃度を生体内の溶液濃度に換算するために必要となる組織の含水量を測定した。脱水前の質量が 0.0131g であった組織の脱水後の重量は 0.0035g であった。これは生重量の約 26% であり、ハエトリソウ捕虫葉の含水量 (率) は約 74% であった。

凍結切片の元素分析

Fig. 5 は、開状態と閉状態にある捕虫葉の中肋側中央部葉片を加圧凍結し、凍結葉片の向軸側および背軸側からそれぞれ薄切された凍結超薄切片の電子顕微鏡像を示している。水を多量に含む液胞の一部でアイスダメージの痕跡が認められるが、細胞壁や細胞質基質の領域は物質構成が滑らかであり凍結は良好であった。開状態捕虫葉の向軸側細胞では液胞内に分散した高電子密度構造が見られた。閉状態では、向軸側細胞内に高電子密度の大きな粒状構造が複数観察されたが、樹脂包埋切片像との比較より、これらは葉緑体に含まれるデンプン粒と思われた。開状態捕虫葉の背軸側細胞では液胞膜に沿って高電子密度構造が見られた (Fig. 5A)。閉状態では、背軸側

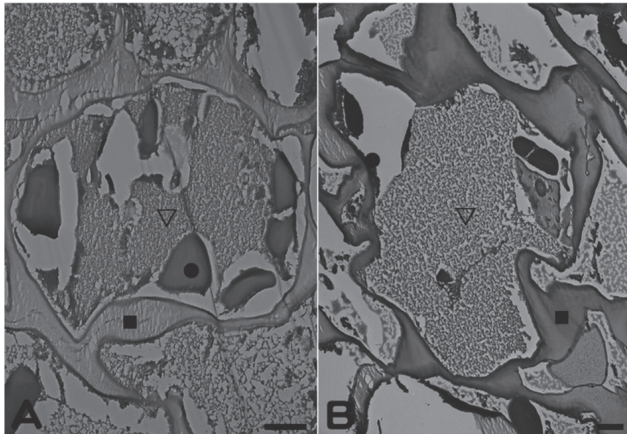


Fig. 5. Cryosection images of Venus flytrap leaves, showing abaxial hypodermal cells (Ab II) in leaf opening state (A) and leaf closing state (B). X-ray microanalyses are performed at points of the electron-dense material (●), the vacuole lumen (▽) and the cell wall (■). Scale bars, 2 μ m (A, B).

細胞の液胞内に高電子密度構造が、また、細胞質基質領域にはデンプン粒が見られた (Fig. 5B)。

ハエトリソウ捕虫葉の閉合に伴う、運動細胞と考えられる表皮および表皮下細胞内の各種イオン動態を調べるために、これらの凍結超薄切片を対象に、液胞内高電子密度構造、液胞、および細胞壁の X 線マイクロアナリシスを行った (Fig. 5 内標識 ●, ▽, ■)。Fig. 6 は、X 線マイクロアナリシスの一例で、開状態捕虫葉向軸側細胞内の高電子密度構造分析で得られた X 線スペクトルを 0.90 keV から 4.20 keV のエネルギー範囲で示したものである。低エネルギー領域から順に、Na-K α 線 (1,041 eV)、Mg-K α 線 (1,253 eV) Si-K α 線 (1,739 eV)、P-K α 線 (2,013 eV)、Cl-K α 線 (2,621 eV)、K-K α 線 (3,312 eV)、Ca-K α 線 (3,690 eV) のスペクトルピークが示されている。Si は、電子顕微鏡の真空排気系で必ず使用される物質の構成元素であり、装置からの混入を無視できず試料由来の元素としては特定できないため解析対象外とした。Ni も凍結切片を載物しているメッシュの素材であるため解析対象外とした。P は生体膜、核酸、蛋白質などに由来するものと考えられるが、運動細胞における膨圧変化の要因となる場合や、それによって引き起こされる濃度変化などがあるとは思われないので解析対象から除外した。Mg は分析で全く検出されないケースが多かったので解析対象から除外した。

捕虫葉の閉合に伴い、向軸側では、Na と Cl のピークパターンの変化は殆どなかった。しかし、K と Ca のピークは明らかな逆相関の変化が認められ、測定した三カ所とも閉合時に、K のピークは小さく、相対的に Ca のピークは大きかった。この K と Ca

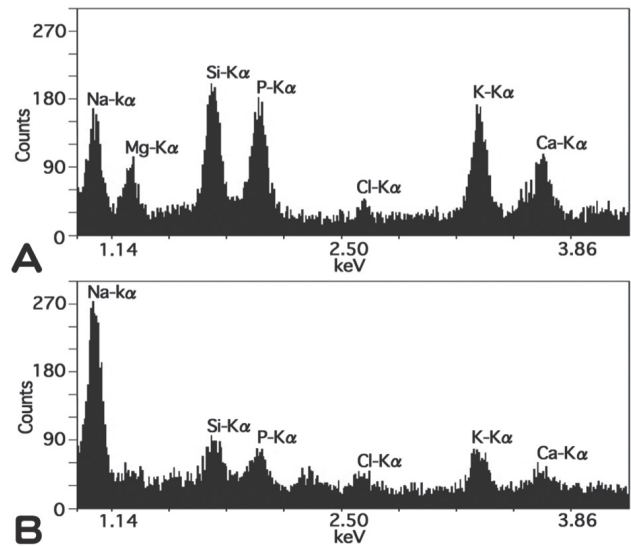


Fig. 6. Examples of X-ray spectra obtained from the vacuolar electron-dense material found in the adaxial motor cells of Venus flytrap, at the leaf opening state (A) and the leaf closing state (B). Labels indicate spectral peaks of respective element-line emission. The ordinate gives the number of X-ray events, and the abscissa shows the X-ray energy in keV (range 0.90~4.20 keV).

のピーク高の相対的な変化はおおむね濃度変化 (表 2) に反映されていた。しかし、実際に、閉合に伴い Ca 濃度が増加したのは液胞のみであった。なお、Na は閉合に伴って液胞内高電子密度構造と液胞で増大していたが細胞壁では殆ど変化していなかった。また、Cl はいずれの分析部位でも閉合時に殆ど濃度は変化していなかった。

捕虫葉の閉合に伴い、背軸側では、向軸側と同様に、Na と Cl のスペクトルパターンは殆ど変化しておらず、濃度も殆ど変化していなかった (表 2)。一方、K と Ca が逆相関となるピークパターン変化を示すことは向軸側と同様であったが、それぞれのピーク高の変化は向軸側とは逆になっており、閉合に伴い、K のピークは大きく、相対的に Ca のピークは小さくなった。この結果は明瞭に濃度の変化として示され、閉合に伴い、いずれの切片においても K 濃度は増加し、逆に、Ca 濃度は閉合前の濃度よりおよそ 1/2 に減少していた (表 2)。

討論

捕虫葉閉合運動細胞の容積変化

捕虫葉の閉合に関わる駆動部と思われる葉の領域 (中肋側中央部) で細胞層をなす細胞の断面積を捕虫葉の開状態と閉状態で測定した結果、閉合時に大きな容積変化を示したのは、向軸側 II 層の細胞群で、閉合時には元の大きさの 71 % まで小さくなっていた。

Table 2. Concentrations of various elements in the electron-dense structure in vacuole, the vacuole and the cell wall of epidermal and hypodermal cells in leaf central regions near the midrib at opening and closing states of Venus flytrap leaves

Insectivorous leaves	Element	Concentration (mmol/kg dry wt.)					
		Electron-dense structure		Vacuole		Cell wall	
		Open (13)	Close (12)	Open (13)	Close (12)	Open (12)	Close (12)
Adaxial cell	Ca	43.0	21.8	9.7	18.8	68.7	26.5
	K	118.2	52.1	35.0	20.2	177.5	26.3
	Cl	22.3	21.2	9.7	8.5	18.3	11.6
	Na	84.2	268.3	17.1	89.0	102.8	120.5
Abaxial cell	Ca	21.0	11.1	7.8	4.3	28.3	13.0
	K	25.3	43.7	12.4	15.3	22.9	47.4
	Cl	15.4	29.9	9.0	10.5	20.4	19.9
	Na	62.4	49.6	25.3	21.2	83.2	88.6

Values are mean of examples. Numbers of X-ray microanalyses are indicated in parenthesis.

一方、背軸側では、細胞断面積の変化率は小さいながらも、いずれの層の細胞も大きくなっていった。細胞断面積の変化は容積変化を反映しており^{9, 18-20}、捕虫葉の閉合を引き起こすに細胞（運動細胞）の膨圧増加は細胞容積増大と相関する^{24, 25}ので、捕虫葉中肋付近で、向軸側の主に表皮下細胞群が膨圧減少し、逆に、背軸側の主に表皮下細胞群が膨圧増大することが中肋を支点とする左右裂片の内側への屈曲を引き起こし、閉合が達成されると考えられる。このような、表裏（又は上下）双方の細胞の膨潤と縮小によって生ずる屈曲は、オジギソウの主葉枕⁶⁻⁹や小葉枕⁹で知られている。捕虫葉中肋側中央部の細胞層を形成する細胞は捕虫葉閉合の運動細胞であり、閉合時には主に向軸側Ⅱ層などの細胞内から水が流出して膨圧が低下し、流出した水は背軸側に移動し、Ⅱ層やⅢ層などの細胞内に流入して膨圧を増大させて捕虫葉を閉じさせると考えられる。

液胞内高電子密度構造の成分と機能

捕虫葉閉合に関わる運動細胞の液胞内には、オジギソウの運動細胞で観察されているタンニン液胞^{10, 11}や液胞内タンニン粒とよく似た高電子密度構造が見られた。この構造は液胞膜内表面に局在し、向軸側運動細胞では、開状態で薄い帯状で、閉状態では顆粒状であった。この形状の違いは背軸側では逆となり、開状態では顆粒状で、閉状態では薄い帯状であった（Fig. 3）。この構造の形状の違いは、捕虫葉閉合に伴う向軸側と背軸側の運動細胞の逆相関的な容積変化とよく対応しており、運動細胞の膨圧変化に大きく関わっていると考えられる。この考えは、オジギソウ主葉枕の膨圧減少時に大きな一つの塊であ

るタンニン液胞が数珠状の多数の小塊になる現象¹¹や小葉枕でも液胞内タンニン粒が膨圧減少時に小さくなる現象⁹が観察されていることによっても支持される。

FeSO₄によるタンニン細胞化学で運動細胞を含む組織全体が強く染色されたことから、捕虫葉の組織と細胞には多くのタンニンが含まれていると考えられる。運動細胞内での挙動はオジギソウの葉枕細胞内の挙動と類似しているため、液胞内高電子密度構造はタンニンで構成されている可能性が高い。類似の液胞内の顆粒がCaやKなどのイオンと結合し、液胞への水の出入りと相関し、あるいはそれを調節している可能性がオジギソウの小葉枕⁹やダイズの根のコルメラ細胞¹⁶で示されており、液胞内高電子密度構造は、液胞への水の出入りに重要な役割を果たしていることが示唆された。

捕虫葉閉合に伴う運動細胞内イオン動態

運動細胞が膨圧運動を引き起こす過程では、細胞内外への水の移動調節にKイオンやCaイオンなどが大きく関わっていることがオジギソウの振動傾性反応機構の研究で明らかにされている^{9-11, 26-28}。凍結切片の元素分析結果は、捕虫葉閉合時に、K濃度は、捕虫葉の向軸側では高電子密度構造、液胞内、細胞壁のいずれにおいても減少し、背軸側ではそれらのいずれにおいても増加することを示した。Fig. 7はこの結果に基づき運動細胞内のKイオン動態を説明する概念図である。運動細胞ではKイオン移動と水移動は連動している。捕虫葉閉合時には、背軸側の運動細胞は膨潤しており、液胞内の高電子密度構造のK濃度も増大していたが、これは細胞壁から細胞質

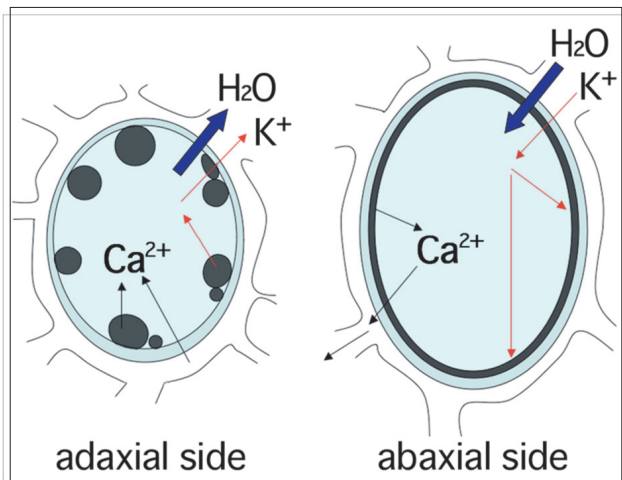


Fig. 7. Diagram showing the ion movement and water in the motor cells of Venus flytrap leaf at the leaf closure. As a result of movement, shrinkage is caused in adaxial cells and swelling is caused in abaxial cells. Dark granules and flattened sheets along the inner surface of tonoplast indicate electron-dense materials.

基質を経て液胞内へと流入した K イオンが液胞内で高電子密度構造に結合することを示していると考えられる。逆に、向軸側では運動細胞は縮小し、液胞内高電子密度構造の K 濃度は減少しており、K イオンがこの構造から遊離し、液胞内から細胞質基質を経て細胞外へと流出することを反映していると考えられる。恐らく、この時、水と K イオンはアポプラストを経由して背軸側へと向かうものと思われる。

Fig.7 には閉合時の運動細胞における Ca イオン動態も示している。Ca は、向軸側では高電子密度構造と細胞壁で減少し、液胞内では増加していた。液胞内の増加は、閉合に伴う高電子密度構造と細胞壁からの流入を示唆している。一方、背軸側では、Ca は高電子密度構造、液胞内、細胞壁のいずれにおいても減少していた。オジギソウでは、K イオンチャネルの開口に Ca イオンがトリガーとして関与している可能性が報告されており^{26,28)}、元素分析の結果もこれを支持し、K イオンと Ca イオンの連動移動が報告されている⁹⁾が、ハエトリソウでは、各測定部位で、K 濃度と Ca 濃度の増減は一致せず、むしろ背軸側では全く逆相関を示しているのと同じような機構を説明することは出来ない。K イオンと水の出入りに Ca イオンがどのように関与しているかは今後の課題である。

Cl イオンは電荷のバランスをとるように陽イオンと共に移動する可能性があることがオジギソウの主要葉枕の研究で指摘されている^{6, 10, 27)}が、ハエトリソウでは向軸側でも背軸側でも殆ど濃度の変化は見られず、膨圧運動に直接関与していないと考えられる。

一方、Na 濃度は、いずれの測定部位でも、閉合に伴い、向軸側では顕著に増加し、背軸側では減少していたが、この濃度変化の検討は今後の課題として残された。

文献

- 1) Haberlandt G (1906) *Sinnesorgane im Pflanzenreich zur Perzeption Mechanischer Reize, 2. Auflage*. Engelmann, Leipzig.
- 2) Jacobson SL (1965) Receptor response in Venus' s fly-trap. *J Gen Physiol.* **49**: 117-29.
- 3) Burdon-Sanderson J (1873) Note the electrical phenomena which accompany stimulation of the leaf of *Dionaea muscipula* Ellis. *Proc. Royal Soc. Lond.* **21**: 495-496.
- 4) Fagerberg WR and Allaian D (1991) A quantitative study of tissue dynamics in Venus's flytrap *Dionaea muscipula* Ellis. *Am. J. Bot.* **78**: 645-657.
- 5) Abe T and Oda K (1976) Resting and action potentials of excitable cells in the main pulvinus of *Mimosa pudica*. *Plant Cell Physiol.* **17**: 1343-1346.
- 6) Abe T (1981) Chloride ion efflux during an action potential in the main pulvinus of *Mimosa pudica*. *Bot. Mag. Tokyo* **94**: 379-383.
- 7) Allen RD (1969) Mechanism of the seismonastic reaction in *Mimosa pudica*. *Plant Physiol.* **44**: 1101- 1107.
- 8) Tamiya T, Miyazaki T, Ishikawa H, Iriguchi N, Maki T, Matsumoto JJ and Tsuchiya T (1988) Movement of water in conjunction with plant movement visualized by NMR imaging. *J. Biochem.* **104**: 5-8.
- 9) Aoki Y, Marumo S, Nishikata H, Kozuka M, Fukada M, Koura N, Hayatsu M and Suzuki S (2015) Ultrastructural changes and intracellular ion movements in tertiary pulvinous cells during the seismonastic response of *Mimosa pudica* L. *Sci. J. Kanagawa Univ.* **26**: 53-69.
- 10) Fleurat-Lessard P, Frangne N, Maeshima M, Ratajezak R, Bonnemain JL and Martinoia E (1997) Increased expression of vacuolar aquaporin and H⁺-ATPase related to motor cell function in *Mimosa pudica* L. *Plant Physiol.* **114**: 827-834.
- 11) Toriyama H and Jaffe MJ (1972) Migration of calcium and its role in the regulation of seismonasty in the motor cell of *Mimosa pudica* L. *Plant Physiol.* **49**: 72-81.
- 12) Fleurat-Lessard P (1988) Structural and ultrastructural features of cortical cells in motor organs of sensitive plants. *Biol. Rev.* **63**: 1-22.
- 13) Shuman H, Somlyo AV and Somlyo AP (1976) Quantitative electron probe microanalysis of biological thin sections: Methods and validity. *Ultramicroscopy* **1**: 317-339.
- 14) Suzuki S, Hino N and Sugi H (2004) Intracellular calcium translocations during the contraction-relaxation cycle in scorpionfish swimbladder muscle. *J. Exp. Biol.* **207**: 1093-1099.
- 15) Suzuki S, Hamamoto C and Shibayama R (2005) X-ray microanalysis studies on the calcium localization along the inner surface of plasma membranes in the anterior byssus retractor muscle of *Mytilus edulis*.

- Sci. J. Kanagawa Univ.* **16**: 9-17.
- 16) Hayatsu M, Ono M, Hamamoto C and Suzuki S (2012) Cytochemical and electron probe X-ray microanalysis studies on the distribution change of intracellular calcium in columella cells of soybean roots under simulated microgravity. *J. Electron Microsc.* **61**: 57-69.
 - 17) Hayatsu M (2015) Studies on intra- and extracellular calcium translocation during the gravitropic response of plant roots. *D.Sc. thesis, Kanagawa University, Japan.*
 - 18) Peachey LD (1965) The sarcoplasmic reticulum and transverse tubules of the frog's sartorius. *J. Cell Biol.* **25**: 209-231.
 - 19) Devine CE, Somlyo AV and Somlyo AP (1972) Sarcoplasmic reticulum and excitation-contraction coupling in mammalian smooth muscles. *J. Cell Biol.* **52**: 690-718.
 - 20) Suzuki S, Nagayoshi H, Ishino K, Hino N and Sugi H (2003) Ultrastructural organization of the transverse tubules and the sarcoplasmic reticulum in a fish sound-producing muscle. *J. Electron Microsc.* **52**: 337-347.
 - 21) Visnovitz T, Világi I, Varró P and Kristóf Z (2007) Mechanoreceptor cells on the tertiary pulvini of *Mimosa pudica* L. *Plant Signal. Behav.* **2**: 462-466.
 - 22) Ruzin SE (1999) *Plant Microtechnique and Microscopy*. Oxford University Press, New York.
 - 23) Hall TA (1971) The microprobe assay of chemical elements. In: Oster G (ed.), *Physical Techniques in Biological research*. Oster G, ed., Academic Press, New York. pp.157-275.
 - 24) Brown WH (1916) The mechanism of movement and the duration of the effect of stimulation in the leaves of *Dionaea muscipula*. *Amer. J. Bot.* **3**: 68-90.
 - 25) Fagerberg WR and Allaian D (1991) A quantitative study of tissue dynamics in Venus's flytrap *Dionaea muscipula* Ellis. *Amer. J. Bot.* **78**: 647-657.
 - 26) Satter RL and Galston AW (1981) Mechanisms of control of leaf movement. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **32**: 83-110.
 - 27) Moran N (1990) The role of ion channels in osmotic volume changes in *Samanea* motor cells analyzed by patch-clamp methods. In: *The Pulvinus: Motor Organ for Leaf Movement*. Satter RL, Gorton and Vogelmann T, eds., The American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD, USA. pp.101-129.
 - 28) Cote G (1995) Signal transduction and leaf movement. *Plant Physiol.* **109**: 722-734.