

オオセンチコガネにおける翅の構造と地域的な色の違いの理由

奈良県立奈良高等学校 2年 9組 福島 滯月

2年 9組 松山 蓮奈

指導教諭 西原 絵里

1. 要約

食糞性コガネムシであるオオセンチコガネ (*Phelotrupes auratus*) は地域によって3つの構造色(赤・緑・青)を示す。これらの構造色は前翅外表皮の多層膜構造によるもので、地理的な色の差異は遺伝的な要因を反映しないことが報告されている。そこで、私たちは色の差異が生じる要因を明らかにするため、入射光の条件を変えた反射スペクトルの計測、透過型電子顕微鏡による観察や元素分析を行った。その結果、私たちは地理的な色の差異は明確な前翅外表皮の構造的違いによることを明らかにすることができた。

Abstract

The Japanese horned beetle, *Phelotrupes auratus*, exhibits three structural colors (red, green, and blue) in different regions. These structural colors are attributed to the multi-layered structure of the forewing cuticle, and it has been reported that the geographical variation in color do not reflect genetic factors. To identify the factors causing these color differences, we conducted measurements of reflectance spectra with varying conditions, as well as observations of the vertical and elemental analyses using transmission electron microscopy. As a result, we were able to show that the variations in color are due to distinct structural differences in the forewing cuticle.

Keywords, 構造色, オオセンチコガネ, SEM, TEM, 反射スペクトル, 転送行列

2. 緒言

オオセンチコガネ (*Phelotrupes auratus*) は体長2 cm前後のコガネムシの仲間で、東アジアに生息し、日本では全国各地の平野部や山間部に分布する。フンコロガシのように糞を転がすことはないが、シカやキツネの糞をエサにするため、糞虫と呼ばれている。メスは地中へ糞を埋めこんで産卵し、幼虫は糞を食べて育つ。

オオセンチコガネの体表面は構造色を示し、前翅外表皮のある多層構造に光が反射し、入射光と反射光が干渉することによって考えられ、地域によって大きく3つの型、赤色、緑色、青色が報告されている⁽¹⁾。特に近畿地方での変異は顕著であり、奈良県でみられる青色のオオセンチコガネは全国的に珍しく瑠璃色に輝くため、ルリセンチコガネと呼ばれている。そこで、近畿圏でのオオセンチコガネの色の分布を確認するとともに採集を試みた。奈良県奈良公園近辺、曾爾高原、大台ヶ原では青色、三重県伊賀市の霊山では緑色、京都府宝が池公園や三国岳では赤みがあった個体が確認できた。さ

らに、滋賀県伊吹山や岐阜県池田山では赤色が確認できた。

近畿地方各地から採集したオオセンチコガネそれぞれのゲノム解析の結果、遺伝的に3系統に分類することができたが、大変興味深いことに、その遺伝的な3系統の分布は色彩的な分布を反映せず、遺伝的系統(西、東、南)と色彩型(赤色型、緑色型、青色型)の組み合わせにより5つの集団(西/赤、東/赤、南/赤、南/緑、南/瑠璃)に分類されることが報告されている⁽¹³⁾。つまり、遺伝的な要因が色の差異に影響を与えている可能性は低いという結果が示された。したがって、私たちはオオセンチコガネの色の違いの原因は他の要因にあると考え、まずその前翅の構造に注目した。

甲虫の前翅は、タンパク質とキチンを主成分とする固いクチクラでできており、その組成の違いからいくつかの層にわけられる。多くの甲虫の構造色は外表皮にある層状構造によって生じており、オオセンチコガネの構造色は、外表皮部分にある多層構造によるもので、3色それぞれ層の厚さが異なると

報告されている⁽⁴⁾。しかし、層の厚さが異なる原因は解明されていない。

3. 目的

地域により色の差異が生じる要因を明らかにする。

4. 研究内容

4.1 走査型電子顕微鏡(SEM)観察

4.1.1 目的

オオセンチコガネの構造色の原因とされている多層構造を走査型電子顕微鏡(SEM)で観察する。

4.1.2 方法

1. オオセンチコガネ(青色)から前翅をはずした。
2. 前翅を液体窒素で凍結した後、ピンセットにより切断した。
3. 切断面を、SEM(Hitachi High-Tech, TM4000 Plus II)により観察した。

4.1.3 結果

SEM による前翅外表皮の観察を行った結果、白っぽくみられ、層構造を観察することはできなかった。(図1)。前翅が帯電したことが原因であると考えられた。

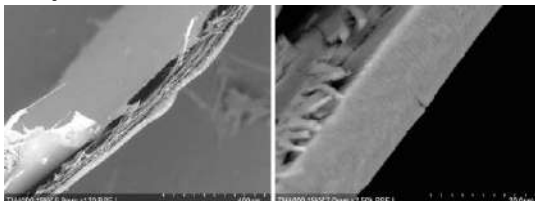


図1 前翅外表皮のSEM観察像
(左:120倍,右:2500倍)

4.2 透過型電子顕微鏡(TEM)観察

4.2.1 目的

走査型電子顕微鏡で観察できなかった多層膜構造を確認する。

4.2.2 方法

サンプルは青色のオオセンチコガネ(Sample1)、緑色のオオセンチコガネ(Sample2)、赤みがかった緑色のオオセンチコガネ(Sample3)、赤色のオオセンチコガネ(Sample4)をそれぞれ1個体ずつ使用した。

4.2.2.1 サンプル作成方法

1. 各色のオオセンチコガネから前翅をはずし、観察する部分を1mm程度に切り取った。
2. 1をプレパラートにのせ、帯電防止に有効なカーボンテープで固定した。
3. 2のプレパラートを集束イオンビーム加工装置(FIB)に入れ、サンプルをトリミングして薄片を作製した。
4. 3の薄片を、針によりピックアップし、銅の試料台にのせた。



図2 TEM観察に用いた個体

4.2.2.2 観察方法

1. サンプルを透過型電子顕微鏡(TEM)の試料台にのせた。
2. 各色それぞれの層構造にピントを合わせ、観察した。

4.2.2.3 結果

TEM 観察により、濃い色と薄い色が交互になって多層構造を形成していることが確認できた(図3)。また、今回の観察において外表皮多層構造の層は青が11層、緑が11層、赤みがかった緑が9層、赤が9層であった。

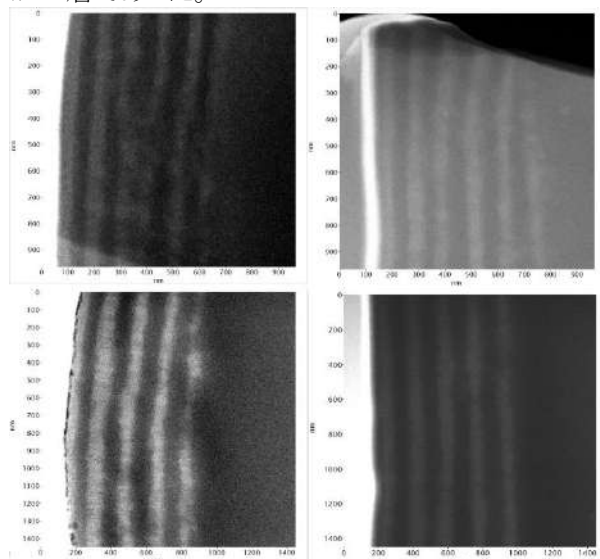


図3 前翅外表皮のTEM観察像(左上, 青;右上, 緑;左下, 赤みがかった緑;右下, 赤)

4.3 層の厚みの測定

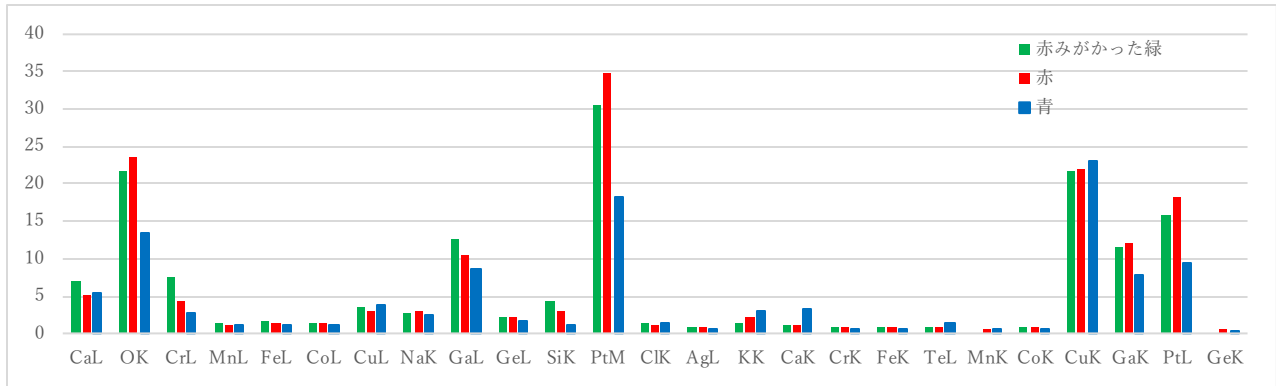


図4 各色の元素量のグラフ

4.3.1 目的

オオセンチコガネの3色それぞれにおいて、多層構造の層の厚みを観察し、比較する。

4.3.2 方法

- 1.得られたSTEM-EDSの結果を基に、DigitalMicrographの機能を用いて、[層状に分布する元素]の空間分布を求めた。
- 2.空間分布の画像を基に、目視で層の厚みを調べた。

4.3.3 結果

多層構造それぞれの層の厚みを測定した結果、青色は平均57.7 nm、緑色は平均55.6 nm、赤みがかった緑は平均88.8 nm、赤色は平均83.1 nmで、それぞれ層の厚みが異なっていることが確認できた(表1)。

層	青	緑	赤みがかった緑	赤
1	60.5	37.8	65.2	73.6
2	52.9	60.4	79.3	82.1
3	60.5	56.6	99.2	93.5
4	41.6	41.5	93.5	90.6
5	64.3	60.4	76.5	76.5
6	60.5	60.4	107.6	90.5
7	52.9	64.2	79.3	70.8
8	68.1	60.4	113.3	93.5
9	60.5	45.3	85.0	76.5
10	45.4	68.0	-	-
11	68.0	56.6	-	-
平均	57.7	55.6	88.8	83.1
合計	635.2	611.6	798.9	747.6

表1 4個体(青、緑、赤みがかった緑、赤)それぞれの層の厚み(nm)

層	青	緑	赤みの緑	赤
白	61.1	53.5	81.0	78.2
黒	53.7	58.1	98.4	89.2

表2 白い層と黒い層それぞれの厚みの平均(nm)

4.4 元素分析

4.4.1 目的

各色の多層構造に含まれる元素の種類や量を比較する。

4.4.2 方法

1. 4.2と同じサンプルを使用した。4.2のTEM観察を行った後、元素分析モードで計測した。
2. DigitalMicrographを用いて、それぞれの元素含有量を示すグラフを作成した。
3. CのK線のカウントによりEDSスペクトルを規格化し、各含有元素の含有量を比較した。

4.4.3 結果

青、緑、赤みがかった緑、赤のオオセンチコガネ前翅外表皮に含まれる元素の量を図4に示す。緑の個体の元素の相対値はPtMやGaLではほかのオオセンチコガネの数値の2倍以上というように、多くの元素で他の数値より異常に高かったため、外れ値として取り除いた。主な元素は青ではC, O, Cl, K, Ca, Mn, Fe, Co, Cu, Ga, Ag, Te, Pt、緑ではC, O, Na, Cl, K, Ca, Fe, Co, Cu, Ge, Pt、赤みがかった緑ではC, O, Al, Si, Cl, K, Ca, Fe, Co, Cu, Ga, Te, Ptであった。顕著な量の違いが確認できた元素はCa, O, Cr, Ga, Si, Pt, Cuであった。その含有量は、Caは赤<青<赤みがかった緑、Oは青<赤みがかった緑<赤、Gaは青<赤<赤みがかった緑、Siは青<赤<赤みがかった緑<赤、Ptは青<赤みがかった緑<赤、Cuは赤みがかった緑<赤<青であった。

4.5 転送行列による反射スペクトル計算

4.5.1 目的

層の厚さによって色が異なることを数値計算により確認する。また、実測した反射スペクトルと数値計算での反射スペクトルがどの程度、一致するかを調べる。

4.5.2 方法

転送行列による反射スペクトル計算⁽⁸⁾を用いて、プログラミングコードをJupyter Labにて作成する。層の枚数は10層、Entomological Science (2011) 14, 291-296より、多層膜構造の屈折率は $n_1=1.4, n_2=1.7$ で交互に重なっていると定めた。

また、真空層、多層膜構造、真空層で並んでいるとし、オオセンチコガネの外原表皮の屈折率は考慮しなかった。そして、各層の厚みを 30, 50, 70, 90 (nm) に変えてコードを実行し、それぞれと比較する。以下はコード (30nm) である。

```
import numpy as np
import matplotlib.pyplot as plt

# r: 振幅反射率を定義
# 入射領域、基板を真空とする
def reflectance(M, theta_inc, n_inc=1, n_sbst=1):
    return (-M[1,0] - n_sbst * M[0,0] + n_inc *
            np.cos(np.radians(theta_inc)) * (M[1,1]
            + n_sbst * M[0,1])) / (M[1,0] + n_sbst * M[0,0] +
            n_inc * np.cos(np.radians(theta_inc)) * (M[1,1]
            + n_sbst * M[0,1]))

# M: 転送行列を定義
def transfer(wl, n_i, d_i, theta_inc, n_inc=1):
    k_iz = np.sqrt((n_i**2 * np.pi / wl)**2 -
                  ((n_inc**2 * np.pi / wl) * np.sin(np.radians(theta_inc)))**2)

    M00 = np.cos(k_iz * d_i)
    M01 = 1j * np.sin(k_iz * d_i) * (2 * np.pi / wl) / k_iz
    M10 = 1j * np.sin(k_iz * d_i) * k_iz / (2 * np.pi / wl)
    M11 = np.cos(k_iz * d_i)

    return np.array([[M00, M01], [M10, M11]])

# 入射角 (deg)
theta_inc = 0

# 誘電体多層膜
d_layers = 30
n1 = 1.4
n2 = 1.7
n_layers = [n1, n2, n1, n2, n1, n2, n1, n2, n1, n2]

# 波長範囲
wl_range = np.arange(400, 800)
```

```
# 振幅反射率の値を格納する
r_vals = []

# 計算
for wl in wl_range:
    M_tot = np.identity(2)
    for n in n_layers:
        M = transfer(wl, n, d_layers, theta_inc)
        M_tot = M @ M_tot
    r_vals.append(reflectance(M_tot, theta_inc))

# plot
plt.figure(figsize=(10, 5))
plt.plot(wl_range, np.abs(r_vals)**2,
         label='Reflectivity', color='blue')

plt.xlabel('Wavelength (nm)')
plt.ylabel('Reflectivity (%)')
plt.grid(True)
plt.legend()
plt.show()
```

また、4.3にて測定した青、緑、赤みがかった緑、赤の層の厚みの平均値と層数をコードに代入して、グラフを比較する。

4.5.3 結果

各層の厚みによって反射スペクトルが変わったため、各層の厚さが異なると色が異なることが数値計算で示された。(図5-8) また、実測した反射スペクトルのグラフと数値計算による反射スペクトルのグラフを比較しても完全に一致しなかった。(図9-12)

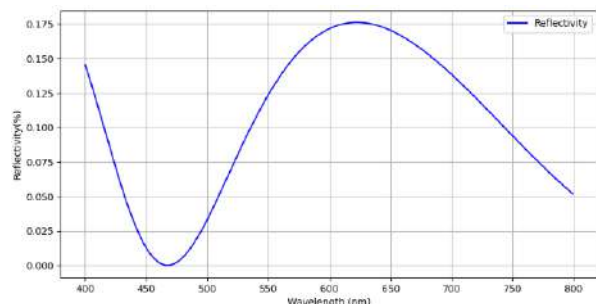


図5 各層の厚みが30 nm

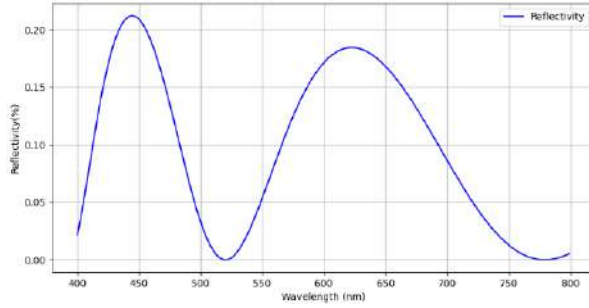


図6 各層の厚みが50 nm

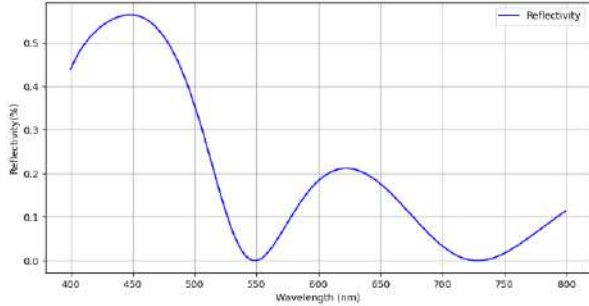


図7 各層の厚みが70 nm

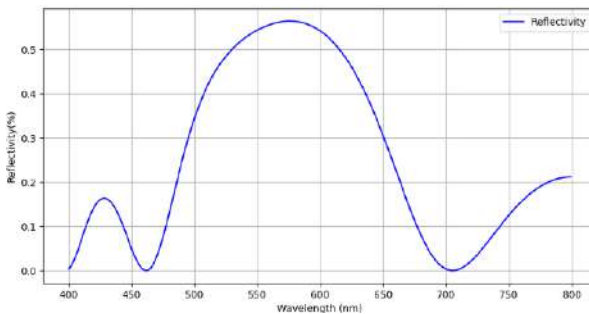


図8 各層の厚みが90 nm

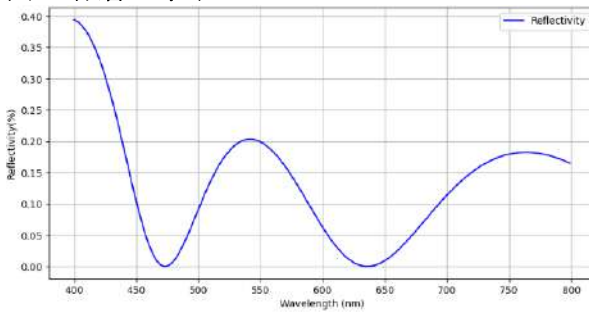


図9 青

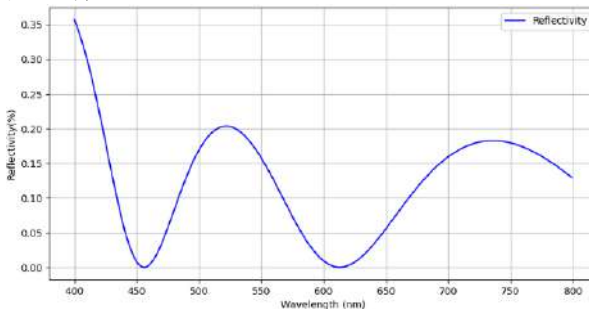


図10 緑

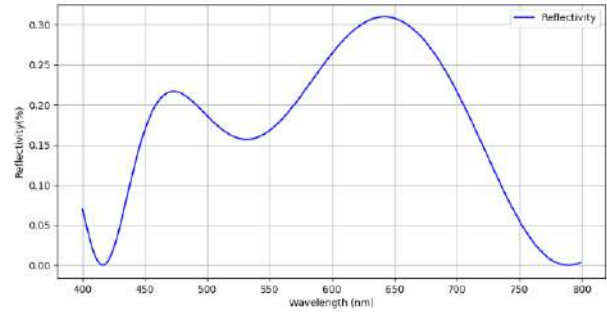


図11 赤みがかった緑

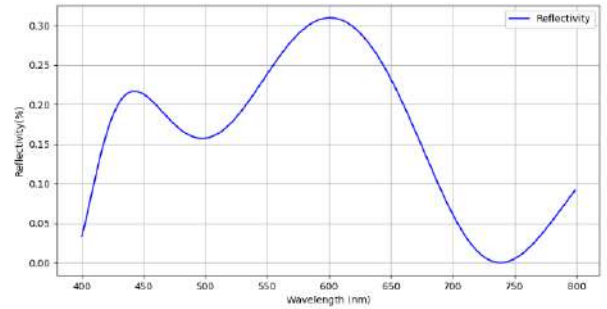


図12 赤

4.6 分光光度計による各色のスペクトルの定義づけと入射光の条件変更による比較

4.6.1 目的

反射スペクトルを実測し、各色を数値で定義づける。また、入射光の条件を変えることで、実際に視覚で識別する際の状況に近づけて、様々な状況での反射スペクトルを調べる。

4.6.2 方法

近畿地方で採取した個体を用いて実験を行った。それぞれの個体の色は以下のとおりである。ただし、緑_p偏光以外は、s偏光で測った。

緑_p偏光(Sample5)

緑(Sample6)

赤みがかった緑(Sample7)

くすみのある青(Sample8)

青(Sample9)

くすみがあり、緑がかった青(Sample10)

赤(Sample11)

UV-3600i Plus - 紫外・可視・近赤外分光光度計を用いてオオセンコガネの前翅に光を当て、反射スペクトルを計測した。偏光や入射角を変更した実験以外では基本的に偏光はS偏光、入射角は45度とした。JupyterLabによりグラフを作成して数値化し、比較した。

4.6.3 結果

オオセンコガネ(青,緑,赤)の翅の反射スペクトルのグラフを図9に示した。また、表2は各色の波長

のピークである。

色の違いは波長の差によって生じており、波長 430-490 nmは青、490-550 nmは緑、550-590 nmは黄、590-640 nmは橙、640-770 nmは赤として認識される⁽¹⁴⁾。図にある通り、緑、青は一般的な波長の範囲にあり、赤みがかかった緑、緑がかかった青はピークの幅が広く、先に述べた色範囲の複数に及ぶ。

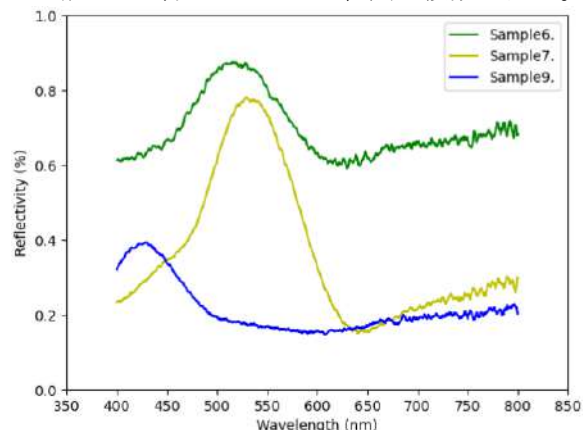


図13 3色（緑、赤みがかかった緑、青）の反射スペクトル

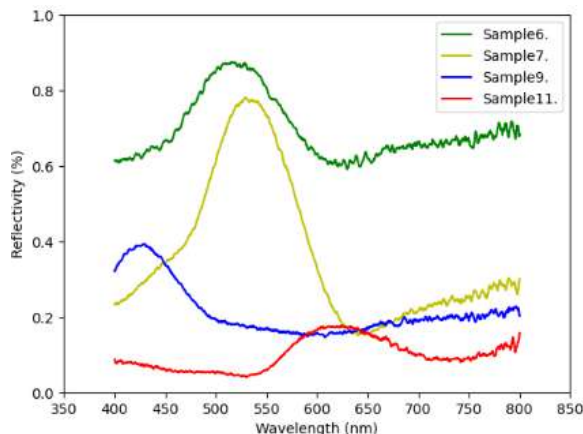


図14 4色（緑、赤みがかかった緑、青、赤）の反射スペクトル

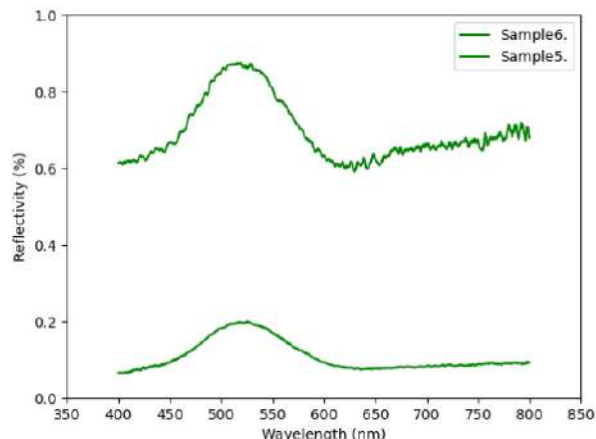


図15 偏光を変更して測った反射スペクトル

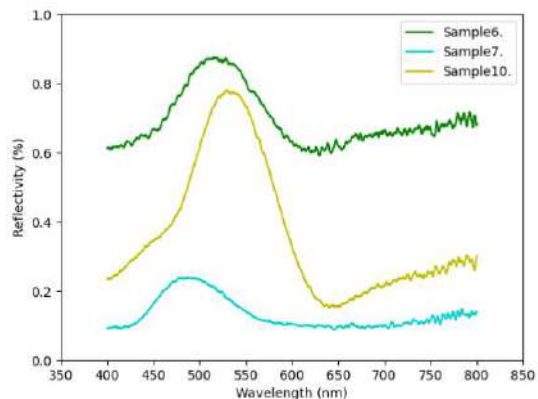


図16 緑色を含む色の個体の反射スペクトル

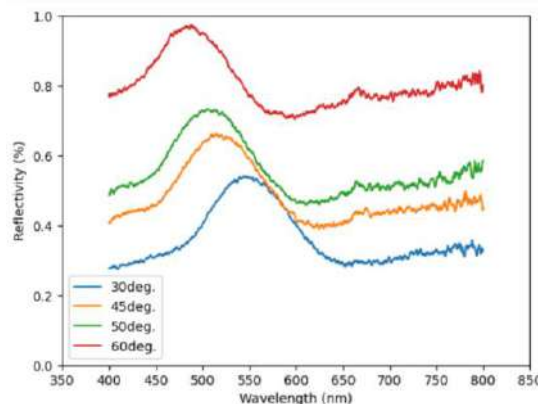


図17 緑_p 偏光の入射角を変更して測った反射スペクトル

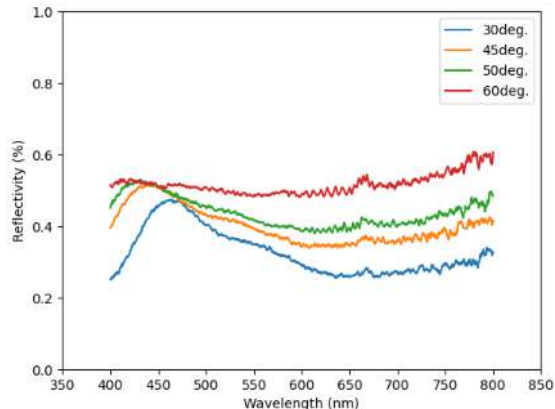


図18 くすみがあり、緑がかかった青の入射角を変更して測った反射スペクトル

色(Sample)	ピークの波長(nm)
緑_p偏光(Sample5)	525.0
緑(Sample5)	515.0
緑(Sample6)	486.5
赤みがかかった緑(Sample7)	529.0
くすみのある青(Sample8)	423.5

青(Sample9)	428.5
くすみがあり、緑がかつた青(Sample10)	442.5
緑(Sample6) (30deg)	545.0
(45deg)	514.0
(50deg)	505.0
(60deg)	487.5
くすみがあり、緑がかつた青(Sample10)(30deg)	462.5
(45deg)	440.0
(50deg)	431.0
(60deg)	779.5
赤(Sample11)	623.5

表3

5.考察

4.2の実験結果からオオセンチコガネは前翅に多層構造を持ち、層の数は青、緑、赤みがかつた緑、赤で異なっていた。層の数が多いほど青、少ないほど赤に近い色であるのではないかと考えられた。また、この結果は先行研究に示されていたオオセンチコガネの層の枚数が青色の個体では12枚、緑色の個体では10枚、赤みがかつた緑色の個体では10枚だったという結果と一致しなかった。

4.3の結果では層の厚みは青色では平均57.7 nm、緑色では平均55.6 nm、赤みがかつた緑では平均88.8 nm、赤色は平均83.1 nmで、それぞれ層の厚みが異なっていることが確認できた。また、青、緑がかつた青と緑、赤で偏りがあった。この偏りは4.2の結果と類似していた。

4.4の結果より、色により含まれている元素の種類とその量が異なっていたことから、元素の違いと層の厚みには相関があるのではないかと考えた。オオセンチコガネの前翅にはFe, Co, Cr, Cu, Te, Ptなどの質量の大きい元素が含まれていることが分かったが、これらは試料台が銅であったことや実験装置が金属であったことから装置由来のものではないかと考えられた。また、GaはFIB加工の影響によるものだと考えられる。そのため、実際に差があった元素はCa, O, Siと考えられる。

また、4.5の反射スペクトルと数値計算の反射スペクトルが完全に一致していないのは、測定する際の誤差や、数値計算において、基板を考慮しなかったなどといった点が挙げられる。

4.6.3の図10-15は入射光の条件を変えた結果である。入射角を変えた図14や図15ではピーク構造が、単調に変化しており、反射率のピーク波長は入射角に依存している。

6.まとめと今後の展望

今後は元素分析の結果に基づいて、元素と地理やオオセンチコガネの食物との関係性などを調査していく。また、研究の結果からオオセンチコガネの構造色の再現を3Dプリンターなどで試みたい。

7.参考文献・サイト

- 京都市青少年科学センター。「オオセンチコガネ」.
- <http://www.edu.city.kyoto.jp/science/online/nature/44/index.html>(2023/7/25)
- Techno Synergy。「構造色とは」.
http://www.technosynergy.co.jp/opt_lectures/about_SColor02.html(2023/7/25)
- Mayumi AKAMINE, Ken ISHIKAWA, Kiyoto MAEKAWA, Masahiro KON.
- The physical mechanism of cuticular color in *Phelotrupes auratus* (Coleoptera, Geotrupidae). *Entomological Science* (2011) 14, 291-296
- HOGA。「ミドリセンチコガネ(オオセンチコガネ)」.
hoga-kyoto.com/midorisenchikogane.html(2023/6/8)
- 姫路科学館。「科学の眼」.
https://www.city.himeji.lg.jp/atom/research/manako/538_s.pdf(2023/5/20)
- 転送行列による多層膜構造の反射スペクトル計算.
<http://www.yoshiokalab.com/document/opticalresponse/multilayer/transfermat.pdf>(2023/8/5)
- 吉岡伸也。「薄膜干渉を繰り返し用いて多層膜反射スペクトルを計算する方法」
<http://syoshi-lab.sakura.ne.jp/excelde/principle.pdf>(2023/8/5)
- 中村圭一.たくましくて美しい 糞虫図鑑.創元社.2021
- 館野鴻.月刊たくさんのふしぎ うんこ虫を追い.福音館書店.2022.
- 川井信矢・堀繁久・河原正和・稲垣政志(コガネムシ研究会監修).日本産コガネムシ上科図説 第一巻 食糞群. 昆虫文献 六本脚.2008.
- Ecology and Evolution - 2023 - Araki - Whole-genome resequencing reveals recent divergence of geographic populations of the.pdf*
- 可視光線 | 生物分子科学科 | 東邦大学 (toho-u.ac.jp) https://www.toho-u.ac.jp/sci/biomol/glossary/chem/visible_light.html
- Entomological Science* (2011) 14, 291-296

8. 謝辞

糞虫についてご教授頂いたならまち糞虫館中村圭一館長、集束イオンビーム加工装置や透過型電子顕微鏡の使用を許可して頂いた京都大学三宅亮教授、京都大学との連携研究という貴重な機会をご用意して頂いた京都大学常見俊直教授、分光光度計の使用を許可して頂いた京都大学田中耕一郎教授、貴重なご示唆を頂きました京都大学大学院理学研究科院生森本克己さんに感謝いたします。また、本研究の一部は、京都大学北部キャンパス機器分析拠点の支援を受けたものです。

