

# The Layer of Epicuticle Produces a Wide Range of Colour Variation in Coleoptera

Takahiko Hariyama , Masashi Kurachi\* , Mantaro Hironaka ,  
Hiroko Horiguchi , Yosihaki Komiya\* & Yasuharu Takaku\*\*

## 構造色をつくる甲虫の翅

針山孝彦 , 倉知正\* , 弘中満太郎 , 堀口弘子 , 小宮義璋\* , 高久康春\*\*

連絡先 ; [hariyama@hama-med.ac.jp](mailto:hariyama@hama-med.ac.jp)

Department of Biology, Hamamatsu University School of Medicine, 1-20-1 Handayama, Hamamatsu 431-3192, Japan

\* Department of Molecular and Cellular Neurobiology, Gunma University School of Medicine, 3-39-22 Shouwa-machi, Maebashi 371-8511, Japan

\*\* National Institute of Genetics, Mishima 411-8540, Japan

### Abstract

Colors manifested by the majority of animals have their origin in the physical and chemical foundations. In the case of physical colour, there are several well-known reports that the surface of several beetles (Hinton, 1976; Nevill, 1975; Neville, 1977) develops metallic colours by interference. Most of the reports concerning the interference colour discussed extensively the structure composed of multilayer of alternative high and low refractive index materials within the exocuticle in their integument (Parker, 1998).

*Plateumaris sericea* widely distributed in the Palaearctic region from Europe to Japan, shows a wide variation of metallic colour within a single species, from blue individual to red one, covering whole range of visible wavelength for human. The structural basis for producing such a wide range of wavelength of colour variation has never been examined except for a relatively narrow ranged metallic golden or silver colour (Parker, 1998). Here we show the fact for the first time that only five layers within epicuticle of elytron work as an interference reflector producing colour variation of *P. sericea* over whole visible range.

### 要旨

玉虫の厨子を装飾するためにタマムシが選ばれたのは、その翅が美しいだけでなく作者の前で色を失わなかったからだろう。生物の色には大きく分けて、化学的に色が作られているものと構造的に色がつけられているものに分けることができる。化学的に色が作られているものは、生物の死後代謝が止ると色を失う。一方、構造的に作られているものは、代謝が止ってもその構造が維持されている間は、物理現象としての色が失われることなく、あたかも永遠に色を留めている。この、タマムシの翅のように色が変わらない、色が生み出されるものが物理現象であるものをここでは構造色と呼ぶ。

高層湿原に棲むハムシの一種 *Plateumaris sericea* は同種内の各個体の翅に、青から赤までそれぞれ反射スペクトルを持ち、死後もその色を変えない。これは翅が層状構造をしていることによる構造色である。これまでこの色を作り出している層状部分は、数百の層で作られている exocuticle によると考えられてきたが、我々はこのスペクトルが最外の 5 層 (epicuticle) のみで決定されており、残りの多くの層 (exocuticle) はスペクトルには関係していないことを見出した。また詳細な形態学的観察から、epicuticle は単に層の重なりから形成されているが、exocuticle はらせん状のファイバーが層を形成していることが分かった。

タマムシでも同様の構造が観察されたが、epicuticle はハムシと異なり 20 層の epicuticle からなっている。この epicuticle が反射する光は、直線偏光成分の偏りをもつことが確かめられた。

## 概要

多くの動物はその体表や特別の器官などに色をもっている (Herring, 1994 年参照)。体表の色は、動物の行動に種々の影響を与えており (Eible-Eibesfeldt, 1975 年参照)、生物が進化化学的に獲得してきた重要なシグナルとして働いている。

これらの色のスペクトルを産生しているのは、化学的な物質による吸収や反射によるものと、その物質自身は色を出さないが屈折率の違う物質がある構造を形成することによって物理的に色を作り出しているものとに大別できる。化学的な物質としては、メラニン・フォメラニン・オモクローム・カロチノイドなどなど、多種類の色素物質が動物の色を形成しており (藤井良三, 1976 年; 梅鉢幸重, 2000 年参照) 驚かされる。構造的な色としては蝶のモルフォ属の鱗粉が美しい青色の光沢で有名であり、色の起源は鱗粉の ridge にある多層構造による干渉色である (梅鉢幸重, 2000 年)。

甲虫の翅の色は、化学的な色と構造的な色との両方が使われている。甲虫の翅は Neville (1977) が電子顕微鏡を用いて詳細に報告してきた。その結果 exocuticle に多層構造が観察され、その多層構造が干渉色の起源であるとこれまで考えられてきた (Parker et al. 1998)。

我々が、ハムシとタマムシを用いてこれらの甲虫の翅の色の起源を探ったところ、これまで考えられてきた exocuticle が翅のスペクトルの起源ではなく、epicuticle であることが分かったので、その詳細な構造とともに報告する。

## 材料と方法

ハムシ (*Plateumaris sericea*); 玉原湿原 (群馬県) にてサンプリング。

タマムシ (*Chrysochroa fulgidissima*); 浜松医科大学構内にてサンプリング。

### 反射スペクトル

翅の表面の反射スペクトルは、スペクトロメータ (Shimadzu MSP-5000, Japan) を用い紫外部から近赤外部 (340~740nm) まで測定した。酸化マグネシウムを白のスタンダードにしてスペクトル波長を求めた。マイクロスペクトルフォトメトリ (反射 MSP) は 380nm から 760nm にかけて顕微鏡に設置した MPM800 (Carl Zeiss, Germany) を用いて、Darkfield epi-illumination で測定した。その際の、測定した面積は  $0.2 \times 0.2 \text{ mm}^2$  とした。Barium Sulphate を白のスタンダードとした。

### 電子顕微鏡観察

#### 透過型電子顕微鏡観察

甲虫の翅を 1 次固定液 (2% paraformaldehyde, 2% glutaraldehyde in 0.1M cacodylate-buffer solution) 中ではずし、約 5mm 四方に切除し固定液中に氷温で約 2 時間静置する。その後リンスをカコジル酸溶液 (0.1M cacodylate-buffer solution) で 2 度行い、2 次固定液 (1% OsO<sub>4</sub> in 0.1M cacodylate-buffer) に入れる。再びリンスした後、アルコール濃度を徐々に上昇させ、最終的に 100% プロピレンオキサイドに置換する。徐々に Araldite resin の濃度を上げたものに置換し、100% 溶液にしたものを 60 で一昼夜放置し固める。薄切して、透過型電子顕微鏡 (Hitachi H-300) で観察する。

薄切は、翅の内部を観察するために、翅に対して直交した面と、平行した面の両方に対して行った。

#### 走査型電子顕微鏡観察

同様に 1 次固定したものを臨界点乾燥し走査型電子顕微鏡 (Hitachi S430) で観察する。その際、翅の断面を観察するものは固定液中でカミソリの刃を翅に直交してあて切断したものをを用いた。

## 結果と考察

### 1. 翅の反射スペクトル

左の図1に示されるように、ハムシの反射スペクトルは、青・銅金・赤の3種に分けられる(図 a,b,c)。図のdは図の a,b,cで得られた最大ピークによってその個数を縦軸に、波長を横軸にしてプロットしたものである。図の a の点線で示したほとんどスペクトル反射が一定な個体は、図の b の矢印の頭で示したものに对应する。これは肉眼ではほとんど黒に見える。図の e では b と c のスペクトル反射の肩の部分のプロットした。銅金と赤のスペクトル反射の肩はそれぞれおよそ 400nm 付近と 540nm 付近にある。スペクトル反射率は青に比べて銅金と赤の方が高い。青く反射する個体はほとんどが雄であり、銅金と赤は雌雄両方で観察された。

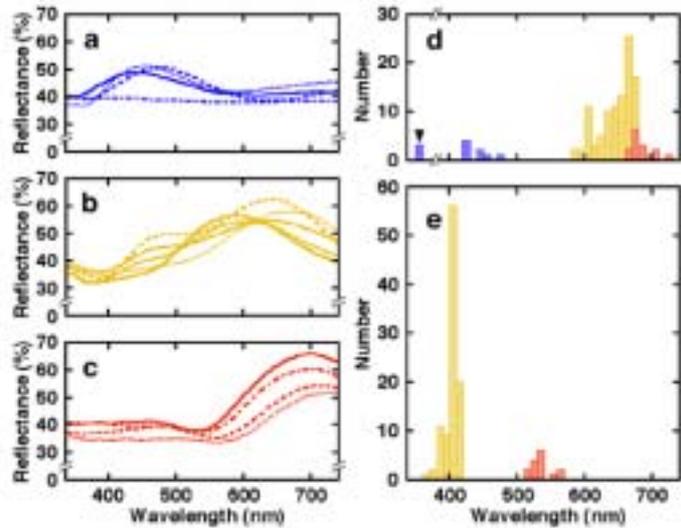


図1

### 2. 翅の構造

これらの翅の反射スペクトルの起源を調べるために、ハムシの翅の構造を調べた。

#### ハムシ銅金色SEM

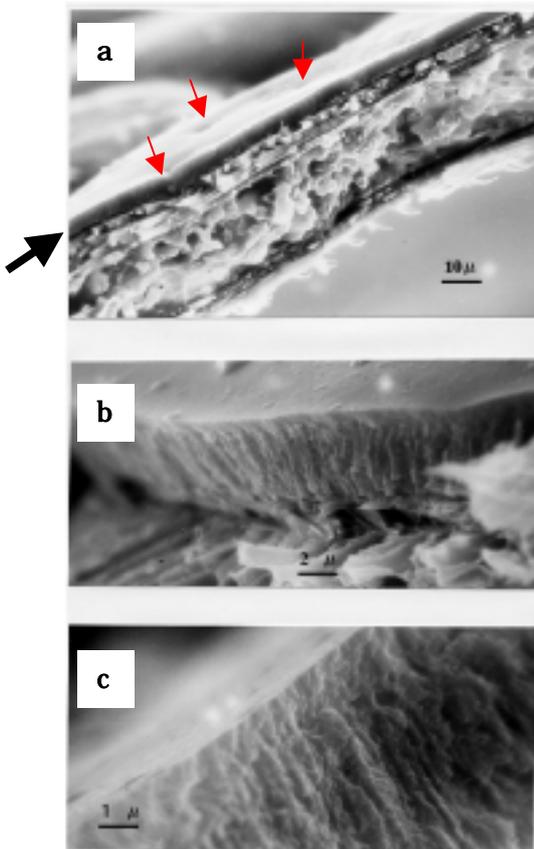


図2

図2の a は、固定液中で割ったハムシの翅を走査型電子顕微鏡で観察したものである。矢印で示した部分が翅の外側の層で、この黒く見える層が epicuticle と exocuticle の両方から形成されている。図の b は、a の黒く見える部分を拡大したものである。カラム状の凸凹が見える。これは、後で示す図3の透過型電子顕微鏡像と比較して、exocuticle が割られた結果凸凹に観察されていると考えられる。この場所をより拡大すると、図の c のようになり、層状構造が顕著に見える。

図の a の中で赤い矢印で示したところは、ハムシの翅の表面の中で、窪みが見られた場所である。

### ハムシ銅金色 TEM

左図は、銅金の個体の翅を体軸に対して垂直に切った透過型電子顕微鏡像である。上の5層が epicuticle で、下の多数の層が見えるところが exocuticle である。Exocuticle の多数の層が見えるところには、図の縦方向に向かって進む層が見える。これらが、走査型電子顕微鏡で観察したカラム状の一つずつの単位に対応していると考えられる。

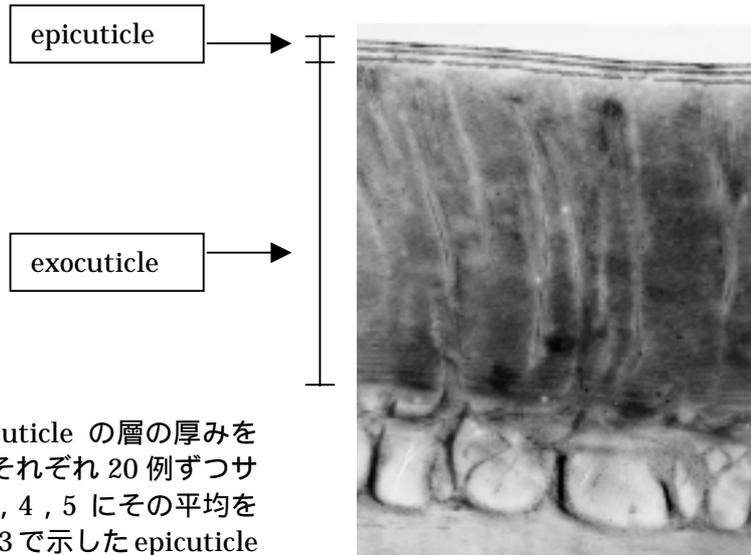


図 3

各スペクトル応答を示す個体の epicuticle の層の厚みを測定すると下の図 4 のようになった。それぞれ 20 例ずつサンプルを測定して、図の横軸 1, 2, 3, 4, 5 にその平均を示した。2 と 4 は透過型電子顕微鏡の図 3 で示した epicuticle のうち白く抜けた電子密度の低い層を示している。

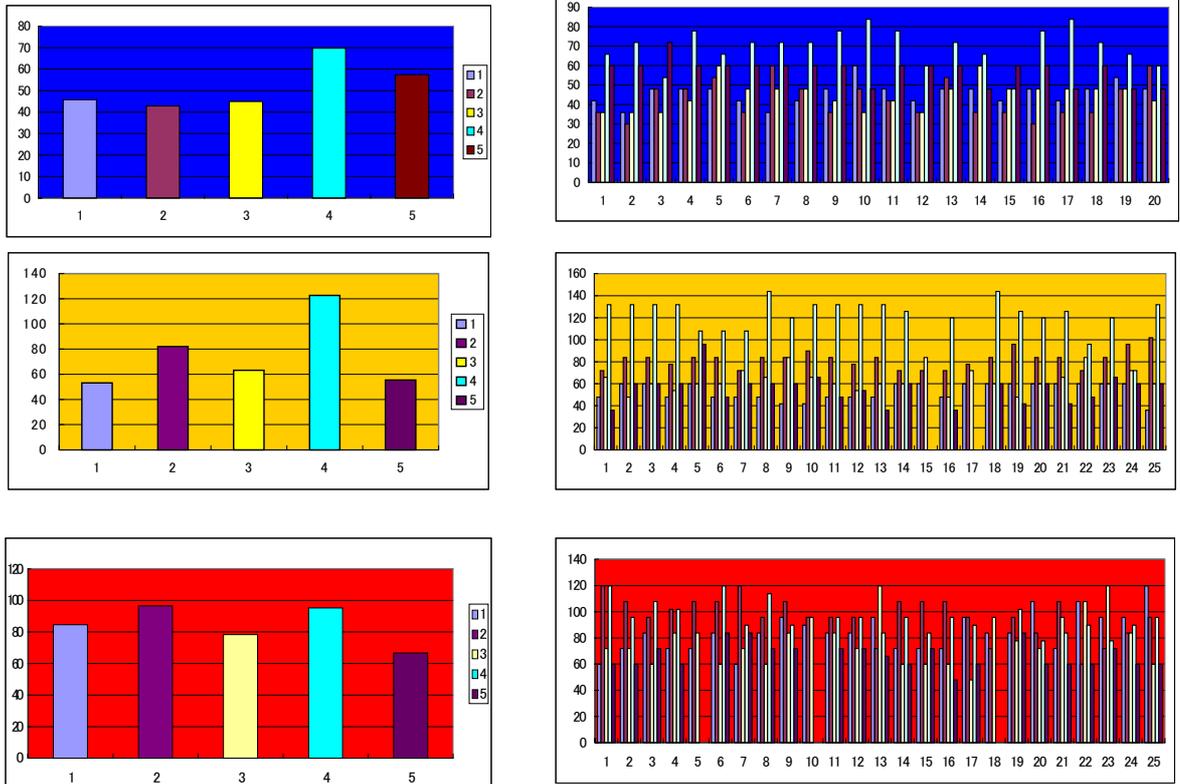


図 4

図 4 の右側のデータは横軸に測定したポイントの番号を記しており、各測定地点の生データを縦軸に記した。縦軸の単位は nm である。

次に、exocuticle の厚みを測定すると図 5 のようになった。横軸の 1 から 121 にかけて翅の上部から中への方向を示す。深くなるに従って徐々に層の厚みが増して、はじめは数 nm であった厚みが 100nm 近くになる。

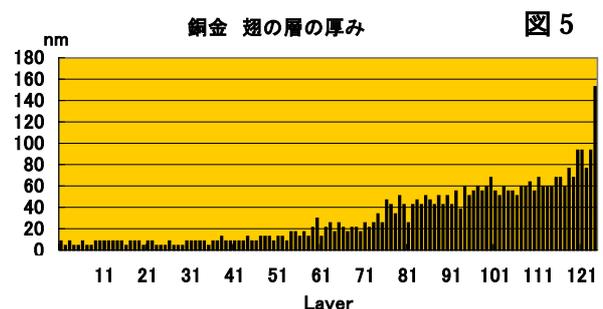


図 5

### 3. 翅の構造から計算したスペクトル反射曲線とスペクトルに關与する層の検証実験

翅の層の厚みを測定した結果から反射スペクトルを計算によってシミュレーションした。計算には Macleod (1969) が示した薄層の干渉によるスペクトルを用いた。各層の屈折率は、電子密度の高い方を 1.73 とし、薄い方を 1.40 (Bernard and Miller, 1968) として計算した。

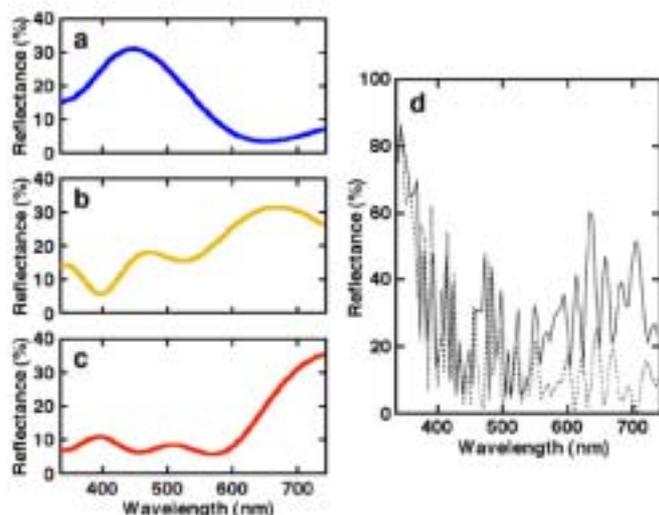


図 6

そこで、これらの結果をさらに検証するために、翅の一部を外側から削り、削る前と削ったあとの反射スペクトルを反射 MSP を用いて測定し、図 7 に示した。

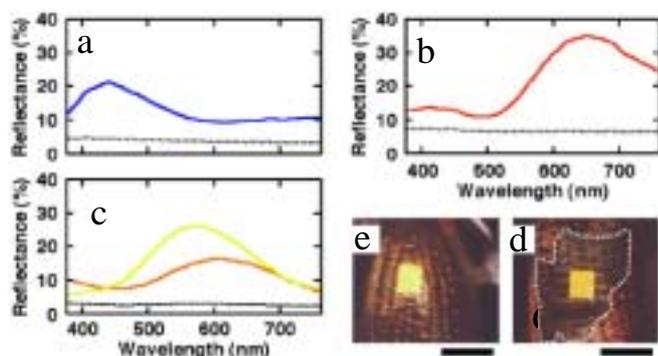


図 7

これらの結果から、可視領域にスペクトル反射を作っているハムシの翅の部分は、これまで信じられてきた exocuticle によっているという結果と異なり、epicuticle が決定しているということが明らかになった。

### 4. 層構造の単位

epicuticle と exocuticle の基本的構造を明らかにするために翅の長軸方向に向かって水平断で薄切を作製し、それぞれの層構造がどのような単位からなっているかを観察した。

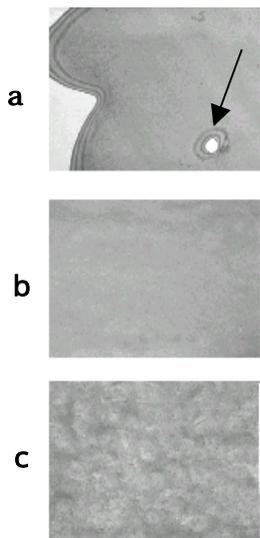
これまで層の縦断面を作製し観察した方法と同様の手順で電子顕微鏡用試料を作成し、水平断で切片を作った。その結果を図 8 に示す。図の a は極表面の epicuticle の層である。図中下部に矢印で示した部分は翅の窪みの部分であり左側と窪みの部分には明暗の層の並びが観察され、これは図 3 で示した epicuticle の層が観察されているものと考えられる。その後、層を切り込み epicuticle の明るい層を観察するとほぼ均一の構造が観察された (b)。exocuticle の層を観察すると渦状(らせん状)の構造が観

その計算結果は、右の図 6 に示す。図 a, b, c はそれぞれ青、銅金、赤のスペクトル反射を示す個体の電子顕微鏡観察による epicuticle の層の厚さ (図 4) からシミュレーションした結果である。b, c で見られるように銅金と赤の結果はそれぞれのピークに加えて、小さな肩が現れた。

図の d は exocuticle の層の厚みから計算した結果である。紫外部に高い結果が得られ、実際の反射スペクトルの形 (図 1) からはかなり離れていた。これらの結果から epicuticle がハムシの反射スペクトルを決定しているのではないかと強く示唆されたことになる。

図 7 の e と d はそれぞれ削る前と削ったあとの翅の写真を示す。図の d の中にある白い点線で囲まれた部分は翅の表面を削り取ったあとの黒く見える部分である。それぞれの色をもつサンプルで同様に削り取った後と前のスペクトル反射を測定した結果が、a, b, c である。図中の黒い点線は d のように削り取ったあとのスペクトル反射を測定したものである。表面の epicuticle の部分のみ削り取ると、この測定領域の反射スペクトルはほとんど消失し、直線に近づく。

察され、図3の exocuticle に存在していた縦の線が一つの渦の単位を形成していることが想像される。



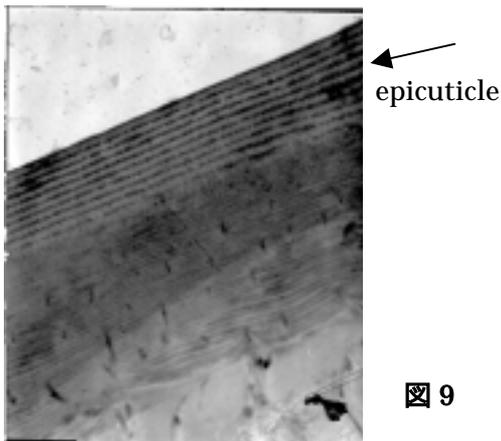
これまでクチクラがコレステリック結晶構造を持っており、円偏光を反射していると言われていた (Neville and Caveney, 1969) 部分が exocuticle であること、epicuticle は円偏光には関与していないと考えられる結果が得られたことになる。

そこで、epicuticle が平面性を持つものであれば、直線偏光成分の偏りをもつのではないかと考え、より個体のサイズが大きく実験に使いやすいタマムシを用いて実験を行った。

図 8

### 5. タマムシの翅の構造と直線偏光

これまで述べてきたハムシと同様の実験をタマムシで行うと図9のような 20 層におよぶ epicuticle の層 (図9矢印とそれに続く exocuticle の層が観察された)。



翅からの反射に直線偏光の偏りが無いか否かを調べるために直線偏光板を回転させてカメラで撮影した。その結果、偏光板の角度によって反射光の透過率が変わることを示され、タマムシの翅の反射には直線偏光成分の偏りがあることが分かった (図10)。

図 9

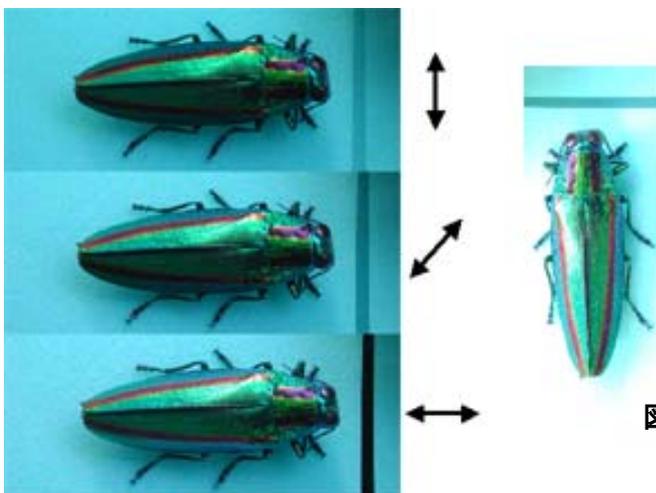


図 10

## 参考文献

- Bernard, G.D. and Miller, W.H. (1968) Interference filters in the corneas of Diptera. *Invest. Ophthalmol.* **7**, 416-434
- Eible-Eibesfeldt, I. (1975) *Ethology-The Biology of Behavior*; Second Edition, Holt, Rinehart and Ainston, Inc
- 藤井良三 (1976) UP BIOLOGY 色素細胞 東京大学出版会年
- Herring, P. J. (1994). Reflective systems in aquatic animals. *Comp. Biochem. Physiol.* **109A(3)**, 513-546.
- Hinton, H. E. (1976) in *The Insect Integument* (ed. Hepburn, H R.) Ch. 25, 475-496 (Elsevier Scientific publishing Company, Amsterdam).
- Macloed, H.A. (1969) *Thin film optical filters.* Adam Hilger, London
- Neville, A.C. and Caveney, S. (1969) Scarabaeid beetle exocuticle as an optical analogue of cholesteric liquid crystals. *Biol. Rev.* **44**, 531-562
- Neville, A. C. (1975) *Biology of the Arthropod Cuticle* (Springer-Verlag, Berlin).
- Neville, A. C. (1977). Metallic gold and silver colours in some insect cuticles. *J. Insect Physiol.* **23**, 267-274.
- Parker, A. F., McKenzie, D. R. and Large, M. C. (1998). Multilayer reflectors in animals using green and gold beetle as contrasting examples. *J. Exp. Biol.* **201**, 1307-1313.
- 梅鉢幸重 (2000) 動物の色素 - 多様な色彩の世界 内田老鶴園