

“An ancient bottleneck in the Lost Pines of central Texas”

富田 基史*

2005年2月28日

要旨

過去の気候変動にともなって分布域を縮小してきた種は、強度の bottleneck を経て、最終的には個体群レベルで絶滅していくであろうと予想されている。しかしながら、*Pinaceae* のように広範囲に分布する種では、有効個体群サイズ N_e が大きいため、bottleneck を直接検出することは困難である。そこで Al-Rabab'ah and Williams (2004) は、近年提唱されたいくつかの推定法により、北アメリカに広範囲に分布する *P. taeda* で bottleneck を検出することを試みた。

分布の西端にあたる Lost Pines の群落では、過去の bottleneck を検出できたが、より広範囲に分布している East Texas の群落では、用いたすべての検定で bottleneck は検出できなかった。対立遺伝子頻度の分布は、Lost Pines の群落でより歪んでいたことから、集団の縮小の段階で、機会的に少数対立遺伝子が失われていった可能性が示唆されたが、対立遺伝子数などのパラメータは、ほとんど変わらなかった。

この review では、おもに長期的な時間スケールでの集団の縮小による、集団の遺伝的多様性の低下を、数理モデルから推定した例を紹介するとともに、その推定方法も簡単に解説する予定である。また、同時に集団の多様性を基本的な方法についても解説する。

1 Introduction

気候変動にともなって分布域を縮小してきた種の辺縁にある個体群では、集団サイズの縮小と、集団間の分断化にともなって、強度の bottleneck を経て、次第に絶滅していくと考えられている。北アメリカに広範囲に分布する *Pinus taeda* の分布域の西端に位置する、Lost Pines は更新世^{*1}から完新世^{*2}にかけて分布域を縮小してきたことが様々な記録からわかっており、この仮説の検証に適しているといえる。そこで Al-Rabab'ah and Williams (2004) は、DNA 情報から、過去に集団が縮小してきたという仮説を検証してみた。

しかしながら、集団サイズの変化が必ずしも遺伝構造の変化を伴うとは限らない。Ledig et al. (1999) は、Mexican piñon (*Pinus maximartinezii*) の集団の対立遺伝子頻度から直接的に bottleneck の痕跡を検出したが、このように *Pinaceae* のような有効個体群サイズ N_e が大きい種で bottleneck を検出した例は非常に稀である。

1.1 Climate change in central Texas during and after the Pleistocene

更新世の冷涼・湿潤な気候から、かつて *P. taeda* は Texas 中部に現在よりも広範囲に分布していたと思われる。現在の分布の西端よりもさらに西側では、氷河期に冷温帯から亜熱帯までの動植物相が共存していたと

* 造林学分野 3 年, motoshi@sea.plala.or.jp

*1 地質時代のひとつ。160–180 万年前から 1 万年前くらいまでの期間をさす。この時代の大半が氷河期であった。

*2 1 万年前から現在に至る、比較的温暖な期間。

考えられており，*P. taeda* の分布域の縮小は，更新世の種構成の変化によるものと思われる．氷河期以降，Texas の気候は徐々に温暖になってゆき，最終的に現在のような分布域 (Fig.1) を形成したと思われる．

Lost Pines の集団は，後退している分布の境界線というだけではなく，更新世には現在 Mississippi River Valley 西岸に分布している集団の refugia となっていたと考えられる．更新世における *P. taeda* の refugia に関しては，Texas 中部と Florida 中部の 2 箇所が存在したという説と，Florida の 1 箇所のみであったという 2 つの説がある．もし後者の場合，Mississippi River Valley 西岸に分布している個体群は，Florida の refugia に由来することになる．

1.2 Detecting genetic bottleneck events with DNA signature

DNA 情報から，地史的な時間スケールでの bottleneck の存在を推測することができる．また，過去の bottleneck の存在から，更新世から完新世にかけて *P. taeda* が Texas 中部に広範に分布しており，現在にいたるまでに徐々に後退してきたという仮説を議論することができる．仮説によれば，Lost Pines の集団では過去に有効個体群サイズ N_e が急激に減少してきたが，Western Gulf Region と呼ばれる広範で連続している集団の一部である，Texas 東部の集団では，集団サイズの減少はみられないだろう．

1.3 Timeframe for DNA signature

P. taeda の平均的な 1 世代の間隔は 10–15 年くらいであるが，Texas の火災が多い地域ではもう少し長いようである．ここでは，世代の間隔を 15–30 年とした．核マイクロサテライトの突然変異率 $\mu = 10^{-3}$ ，bottleneck が起こったときの有効個体群サイズを $N_e = 500$ とすると ($\theta = 4N_e\mu > 2.0^{*3}$)，だいたい 3000–60000 年前くらいの時間スケールで bottleneck の有無を検証することができる．今回用いる 3 つの検定方法のうち，excess heterozygosity test (Cornuet and Luikart, 1996) は $0.2-4N_e$ 世代 (3000–60000 年前) くらい，mode-shift indicator (Luikart et al. (1998) は $2-4N_e$ 世代 (15000–60000 年前) くらい，*M*-ratio test (Garza and Williamson (2001) は 1000 世代 (15000–30000 年) くらいの時間スケールで bottleneck の有無を議論できる．

現代になって，開拓者たちにより伐採に起因する bottleneck は，せいぜい 170 年前以降なので，検定結果には影響しないと思われる．

2 Principles of population genetics (a review)

2.1 集団内の遺伝的多様性を評価する

2.1.1 対立遺伝子の多様性

ある特定の遺伝子座に複数の遺伝子が存在するとき，それを対立遺伝子という．対立遺伝子同士には，優性・劣性の関係を用いるものもあるが，集団遺伝学では通常，選択的に中立な遺伝子を用いる．

対立遺伝子の多様度は，一般的にその数で評価され，これをすべての遺伝子座で平均したものを，1 遺伝子座あたりの平均対立遺伝子数 (*A*, Mean Number of Allele per locus, MNA) という．しかしながら，これはサンプルサイズに大きく影響される量であるので，サンプルサイズに影響されない，有効対立遺伝子数

*3 集団内の任意の対立遺伝子を抽出したとき，両者の塩基が違う数．よくでてくるが...

(n_a , effective number of allele) を代わりに使うこともある．これは p_i を i 番目の対立遺伝子頻度とすると以下の式 (1) で表され，すべての対立遺伝子頻度が等しいときに， A と一致する (Nei, 1987) .

$$n_a = \sum_{i=1}^n 1/p_i \quad (1)$$

2.1.2 遺伝子多様度 (期待ヘテロ接合度) H_e , 観測ヘテロ接合度 H_o

集団内の遺伝的な多様性をはかる指標のひとつが遺伝子多様度 (gene diversity, 期待ヘテロ接合度, expected heterozygosity, H_e) である．これは，特定の遺伝子座について，集団内からランダムに遺伝子を抽出したときに，その 2 つが異なる確率と定義されており，2 倍体の場合は Hardy-Weinberg 平衡*4下での期待ヘテロ接合度となる． n 個の対立遺伝子をもつ遺伝子座に対する遺伝子多様性は，以下の式 (2) で定義される (Nei, 1987) .

$$H_e = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2 \quad (2)$$

これに対して，2 倍体のある特定の遺伝子座の 2 つの遺伝子が異なる確率を観測ヘテロ接合度 (observed heterozygosity, H_o) と呼び， P_{ij} を遺伝子型 $p_i p_j$ の遺伝子型頻度とすると，以下の式 (3) で定義される (Nei, 1987) .

$$H_o = 1 - \sum_{i=1}^n P_{ii} \quad (3)$$

2.1.3 Mutation-drift 平衡下での期待ヘテロ接合度 H_{eq}

2.1.2 で述べた期待ヘテロ接合度は，Hardy-Weinberg 平衡を仮定した場合のヘテロ接合度を表すことから，遺伝子の多様度を表す指標としては有効であり，これは対立遺伝子の数と割合で決まる．一方，mutation-drift 平衡下でのヘテロ接合度の期待値 H_{eq} は，有限集団において突然変異による遺伝子供給と，機会的浮動による遺伝子消失がつりあったときのヘテロ接合度の期待値であり，個体群のサイズと突然変異率から求めることができる．

突然変異のモデルには，無限対立遺伝子モデル (Infinite Allele Model, IAM) と Stepwise-mutation Model (SMM) という 2 つのモデルがある．前者は，突然変異によって生じた遺伝子は，これまで集団が保持している遺伝子とはまったく違う遺伝子であるというモデルであり，RFLP マーカや，DNA シーケンスなどによく当てはまる．このとき， H_{eq} は，以下の式 (4) から求めることができる．ただし， $M = 4N_e\nu$ (N_e :有効個体群サイズ， ν :遺伝子座あたりの総突然変異率)(Nei, 1987) .

$$H_{eq} = \frac{M}{M+1} \quad (4)$$

これに対して後者は，ある遺伝子の突然変異は段階的におこり (厳密に段階を踏むわけではないが)，各段階を移動する確率は等しいというモデルである．これは，マイクロサテライトマーカのような，単純繰り返し配

*4 (i) ランダム交配，(ii) 集団間での移住はない，(iii) 遺伝子は選択的に中立，(iv) 突然変異は起こらないと仮定したときに，確率的に期待される遺伝子頻度

列の繰り返し単位の長さの変化を指標にするようなマーカに当てはまる．このとき， H_{eq} は以下の式 (5) から求められる．ここで， M はランダムに抽出した 2 つの対立遺伝子の塩基の違いの平均値であり，突然変異率が一定のときはサンプルサイズで決まる (Nei, 1987)．しかしながら，実際には step-wise mutation のモデルはより複雑であり，Al-Rabab'ah and Williams (2004) は two-phase mutation model というモデルを使って，シミュレーションの平均値から H_{eq} を求めた．

$$H_{eq} = 1 - \frac{1}{\sqrt{1 + 2M}} \quad (5)$$

2.2 Bottleneck

2.2.1 集団サイズの縮小による遺伝構造の機会的浮動

Bottleneck とは，集団のサイズが一時的に大幅に縮小することをいう．“Bottleneck” という名前は，ある一定の構成比をもつ母集団から少数のサンプルを抽出したときに，母集団の構成比と大幅にずれることが，びんの首から少しだけ中身を取り出すことに似ていることに由来する．

また，集団サイズが小さくなると，機会的に対立遺伝子の比率が変化し，もともと少数であった対立遺伝子が失われる可能性がある．この現象を，“genetic drift” という．対立遺伝子が 2 つしかない場合を考えると，次世代の対立遺伝子比率は，2 項分布に従うと考えられる．2 項分布するサンプルの分散は， N 個の 2 倍体の場合 (対立遺伝子 $2N$ 個)， $\sigma^2 = p(1-p)/2N$ であるから，サンプルサイズが小さいほど，ばらつきが大きくなるのがわかる．

2.2.2 Excess heterozygosity test (Cornuet and Luikart, 1996)

有効個体群サイズが減少すると，2.2.1 で述べたように頻度の低い対立遺伝子が機会的に失われていくので，mutation-drift 平衡下で期待される対立遺伝子数よりも実際の対立遺伝子数が小さくなる．実際の検定では，期待ヘテロ接合度の差 $H_e - H_{eq}$ を検定するわけだが，これはヘテロ接合度から対立遺伝子数*5をする段階で推定値にバイアスがかかるからである (Cornuet and Luikart, 1996)．

Cornuet and Luikart (1996) の excess heterozygosity test は，3 種類の独立した検定から構成されている．1 番目の検定である sign-test は， $H_e - H_{eq}$ の符号のみに着目した検定である． $H_e - H_{eq}$ が 2 項分布にしたがうと仮定して，サンプルのうち， $H_e - H_{eq}$ が正になるものが有意に全体の遺伝子座の半分以上になるとき，帰無仮説は棄却されて，集団に bottleneck があったと結論する．これに対して，standardized difference test と Wilcoxon's signed rank test は， $H_e - H_{eq}$ の平均が 0 よりも大きいかが，それぞれ parametric/non-parametric な片側検定を行う．

2.2.3 Mode-shift indicator (Luikart et al., 1998)

2 つ目の方法は，厳密な意味での検定ではないが，bottleneck を検出する方法として有効である．Mutation-drift 平衡状態にある集団では，対立遺伝子頻度の小さい遺伝子ほど数は多くなり，ヒストグラムは L 字型分布をしめす．一方で，bottleneck の影響を受けた集団では，頻度が小さい遺伝子は失われていくので，一番下の階級 (0-0.05 or 0-0.1) の数が，次の階級にくらべて小さくなる．対立遺伝子の頻度分布を与えるような確率密度関数は提唱されていないが，視覚的に bottleneck の有無を確認することができる．

*5 実際には，その前段階として $\theta = 4N_e\mu$ が推定される

2.2.4 M -ratio test (Garza and Williamson, 2001)

最後の方法は、 M -ratio test と呼ばれる検定で、これはマイクロサテライトマーカのような、単純繰り返し配列 $((CA)_n)$ の長さに違いが表れるマーカに有効である。集団サイズが減少すると、頻度の小さい対立遺伝子は機会的に失われていくため、遺伝子座全体の対立遺伝子数 k は次第に減少する。これに対して、マイクロサテライトマーカのサイズの幅 r (マーカの分子量の最大値と最小値の差) は、 k に比べて減少しにくい。それで、この検定では $M = k/r$ という検定量が、突然変異のモデル、突然変異率、集団サイズから推定される M 値のシミュレーションを行い、観測値よりも低い M を得る確率が有意水準以下なら集団に bottleneck があったと推測する。

3 Material and Methods

3.1 Study organism

P. taeda は、アメリカ合衆国の南部に広く分布しており、Lost Pines の集団はこの分布域の西端に位置している。花粉・種子の散布距離が長いので、通常は集団内の遺伝的多様性は高く、集団間の分化の程度は小さい。また、Mississippi River Valley より東の個体群で固有の対立遺伝子が多いことから、集団間の遺伝子流動は西から東方向へ偏っていると思われる。

3.2 Population sampling

解析に用いたサンプルは、すべて 1952–1970 に野生個体群から採集して、接木で保全していた個体由来し、栽培前の野生個体群の遺伝構造を持っていると考えられる。Lost Pines は、2 つの地域個体群からサンプリングを行い、そのうち 14 個体が Bastrop State Park 内の Bastrop Country から採集され (以下 LP₁₄)、さらにこれに Fayette Country の 4 個体を加えたものを全体とした (以下 LP₁₈)。

対照群は、Texas 東部のより広範な分布域から、Bastrop Country と面積が似ている Polk Country から 14 サンプルを採集した。また、Lost Pines に特徴的な対立遺伝子 (private allele^{*6}, diagnostic allele^{*7}) を調べるために、Texas 東部全体から広範に 60 個体を採集した (以下 WesternGulf)。

3.3 Nuclear microsatellites

DNA の抽出は、針葉樹の凍結乾燥プロトコル (Doyle and Doyle, 1987) に基づいて行われ、合計で 34 個のマイクロサテライトマーカを用いた。PCR 産物は polyacrylamide gel で電気泳動を行い、分子量を決定した。

3.4 Statistical analysis of DNA signatures

集団の遺伝的多様性の指標として、各サンプルに対して、遺伝子座あたりの平均対立遺伝子数 A 、遺伝子多様度 (期待ヘテロ接合度) H_e 、観測ヘテロ接合度 H_o 、mutation-drift 平衡下での期待ヘテロ接合度 H_{eq} が

*6 ある集団に固有の対立遺伝子

*7 private allele のうち、頻度が 10% 以上のもの

GENETIX を用いて計算され、それぞれの差を t -検定を用いて検定した。集団の bottleneck の検出は、2.2 で述べた 3 種類の検定により行った。

H_{eq} の計算には、two-phase model を用いて、single-step : multi-step = 70% : 30% とした。excess heterozygosity test と mode-shift indicator の 2 つの検定は、BOTTLENECK を、 M -ratio test は、M.P_VAL.EXE というソフトウェアを用いて行った。

4 Results

4.1 集団の遺伝的多様性と遺伝子流動

各サンプルの遺伝的多様性のパラメータは、Table 3 に示したとおりになった。後述するとおり、Lost Pines で bottleneck が検出された一方、Polk Country では bottleneck の痕跡は検出されなかったが、対立遺伝子数、allelic richness^{*8}には大きな差は見られなかった。通常、bottleneck が起こると、相対的に頻度の小さい対立遺伝子数は機会的に失われていくため、対立遺伝子数が減少していくのだが、ここではそのような傾向は見られなかった (Table 3)。

Western Gulf と Lost Pines を比較すると、Lost Pines には private allele^{*6}、diagnostic allele^{*7} がほとんどなかった (Table 4)。このことから、この地域の遺伝子流動は、Lost Pines から、より連続的な Western Gulf の分布域に偏っているということが推察された。

4.2 Bottleneck の痕跡

Cornuet and Luikart (1996) の excess heterozygosity tests では、Lost Pines の集団で 3 つの検定のうちのいくつかは過去の bottleneck を検出したのに対して、Polk Country の対照群では、統計的に有意な bottleneck は検出できなかった。Lost Pines のサンプル-検定の組み合わせで、唯一有意ではなかったのは、LP₁₄ の sign test の結果のみであった (Table 1)。

Luikart et al. (1998) の mode-shift indicator でも、上と同様の結果を示した。Lost Pines の集団では、少数対立遺伝子が機会的に失われていくことで、対立遺伝子頻度の分布のずれが確認された (Figure 3)。平衡状態に達している集団では、対立遺伝子頻度は、Polk Country (Figure 3 の斜線のバー) のように L 字型分布を示すが、Lost Pines では、 $q < 0.05$ のクラス (19.9%) よりも $0.05 < q < 0.10$ のクラス (24%) の割合のほうが大きかった。

Garza and Williamson (2001) の M -ratio test においても、 $N_e = 100,500$ と広範囲のパラメータで有意な結果を示したことから、過去の bottleneck の存在はほぼ確実であろうと思われる (Table 2)。一方で、Polk Country の集団においては 5% 水準で有意な bottleneck の痕跡が検出されなかった。

*8 1 遺伝座あたりの平均対立遺伝子数をサンプルサイズで補正したもの

5 Discussion

5.1 Timeframe for one or more bottleneck events in the Lost Pines population

4.2の結果から、*P. taeda*の1世代を15–30年とすると、Lost Pinesでは3000–30000年前にbottleneckが起こったことがわかった。地史的な要素を考慮すると、bottleneckの上限は最終氷期ごろ(–20000年前)で、下限は更新世中期のAltithermal期^{*9}ごろであると思われる。より詳しい年代の推定には、DNAシーケンスに基づいた解析が必要であろう。

かつてEdwards Plateauまで分布していた*P. taeda*の分布域を現在のBastrop Country周辺まで後退させた原因の1つは、氷河期に亜寒帯–温帯の植生が亜熱帯地域まで降下してきたことだと考えられる(Table 5)。年代の下限値(3000年前)の周辺では、Altithermal期の非常に強度の乾燥気候が主な原因になったと考えられる。2500–1000年前ごろになると、気候が温暖・湿潤になって、集団サイズは徐々に安定してきたと思われる。

Lost Pinesの群落は、後退している*P. taeda*の分布域の境界線であるといえるが、対立遺伝子数だけは対照群とほぼ変わらなかった。これは、bottleneck後のLost Pinesの集団から、Texas東部、さらにはWestern Gulf全体へと集団が拡大していったためかも知れない。

5.2 Lost Pines: a refugial Pleistocene population with a post bottleneck diaspora

もしTexas東部の個体群が、Lost Pinesのrefugiaに由来するのであれば、両者は同程度の対立遺伝子多様性をもつはずである。この予想が正しければ、Lost Pinesはbottleneckを受ける以前には、より高い対立遺伝子多様性を持っていたと思われるが、これを検証することはできない。*P. taeda*がLost PinesからWestern Gulfまで回復してきたとすれば、Mutation-drift平衡下での期待ヘテロ接合度 H_{eq} に対して、期待ヘテロ接合度 H_e は低下して^{*10}、bottleneckの影響を弱める、または相殺してしまったのかもしれない。

Texas東部、さらにはWestern Gulfの集団がLost Pinesのrefugiaに由来するという説は、これまでの系統解析の結果とも一致するが、一方でこの地域では遺伝子流動が西–東と偏っているので、Lost Pinesの集団で生まれた突然変異遺伝子が、比較的短い時間でWestern Gulfに浸透してしまったために、系統的に非常に近縁であるという結果が出たのかもしれない。

他には、Lost Pinesで強度のbottleneckが起こった段階で、林分密度の低下により近隣の分集団との遺伝子交流が活性化したため、相対的にbottleneckの影響が弱まったということが考えられる。Dyer and Sork(2001)は、*Pinus echinata*の群落で、林分密度が低下し分断化が進んだ集団のほうが、花粉プールの対立遺伝子多様性が増加したということを報告しているが、*P. taeda*でも同様の現象が起こったのかもしれない。

今回の研究から、Mississippi River Valleyよりも西側に分布する*P. taeda*は、これまでの仮説と同様に、30000–3000年前に数回、強度のbottleneckを経てきたことがわかった。また、Texas東部の対照群とLost Pinesの対立遺伝子多様度が似ていることから、Lost Pinesは氷河期に*P. taeda*のrefugiaであった可能性が示唆された。この仮説に従えば、bottleneck以前の遺伝構造を持っている、本当の対照群は存在しないだろう。*P. taeda*は、急激な環境変動に対して非常に強い種であり、将来起こるであろう、急速な温暖化環境の下

*9 更新世中期の非常に気候が乾燥した時期

*10 集団サイズの縮小と逆

でも耐えうると思われる。

参考文献

- Al-Rabab'ah, M. A. and C. G. Williams. 2004. An ancient bottleneck in the Lost Pines of central Texas. *Molecular Ecology* **13**:1075–1084.
- Cornuet, J. M. and G. Luikart. 1996. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* **144**:2001–2014.
- Dyer, R. J. and V. L. Sork. 2001. Pollen pool heterogeneity in shortleaf pine, *Pinus echinata* Mill. *Molecular Ecology* **10**:859–866.
- Garza, J. C. and E. G. Williamson. 2001. Detection of reduction in population size using data from microsatellite loci. *Molecular Ecology* **10**:305–318.
- Ledig, F. T., M. T. Conkle, B. Bermejo-Velazquez, T. Eguiluz-Piedra, P. D. Hodgskiss, D. R. Johnson, and W. S. Dvorak. 1999. Evidence for an extreme bottleneck in a rare mexican pinyon: Genetic diversity, disequilibrium, and the mating system in *Pinus maximartinezii*. *Evolution* **53**:91–99.
- Luikart, G., F. W. Allendorf, and J.-M. Cornuet. 1998. Distortion of allele frequency distributions provides a test for recent population bottlenecks. *Journal of Heredity* **89**:238–247.
- Nei, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York, USA.