

2009 年度 修士論文

日本人トップアスリートの身体運動能力を規定する  
ミトコンドリア DNA 多型の探索

Identification of mitochondrial DNA polymorphisms  
associated with elite Japanese athlete status

早稲田大学 大学院スポーツ科学研究科  
スポーツ科学専攻 身体運動科学研究領域

5008A055-5

三上 恵里

Mikami, Eri

研究指導教員: 樋口 満 教授

## 目次

第1章 はじめに	…1
第2章 文献研究	
I. ゲノム, DNA, 遺伝子	…4
II. 遺伝子多型	…5
III. 核 DNA 多型と身体運動能力	…7
IV. ミトコンドリア DNA と身体運動能力	…9
第3章 研究課題1「日本人トップアスリートに関連するミトコンドリアハプログループ」	
I. 目的	…19
II. 対象および方法	…20
III. 結果	…23
IV. 考察	…24
第4章 研究課題2「日本人トップアスリートにおけるミトコンドリアゲノム全塩基配列の決定」	
I. 目的	…33
II. 対象および方法	…34
III. 結果	…37
IV. 考察	…40
第5章 総括	…60
参考文献	…62
謝辞	…68
資料	…69

## 第1章 はじめに

金メダル遺伝子は存在するのか？という問いは長い間議論され続けている。自らの肉体を極限まで鍛え抜くトレーニング、適切な栄養摂取、勝利を信じ孤独な戦いに耐えうる精神力などが競技者としての成功に重要な因子であることは明らかである。一方、それぞれの競技で頂点を極めた選手達の身体的、生理学的特徴にはしばしば共通点が認められる。例えば、ヒトの外側広筋や腓腹筋の速筋線維と遅筋線維の割合は一般的に1:1であるのに対し、一流のスプリンターにおいては速筋線維が、一流長距離ランナーにおいては遅筋線維が70~80%以上を占めているといった事実は(8)、そこに遺伝が関与していることを示している。多くの家族研究は、身体運動能力に対する、遺伝要因および環境要因の相対的な寄与率を検討しており、最大酸素摂取量(11, 15)や筋力(7, 32)などには、遺伝要因が強く寄与していることが示されている。したがって、一流競技者という極めて優れた身体運動能力が要求される表現型において、遺伝要因は競技能力を規定する因子の一つである。競技能力に関連する遺伝子多型を明らかにすることで、隠れた才能の発掘のみならず、関連遺伝子をターゲットにした運動パフォーマンス向上のためのトレーニング方法の開発や、個人の遺伝的特性を考慮したオーダーメイドトレーニング実現のための基礎を築くことができる。

これまでに、身体運動能力や健康関連体力に影響を及ぼすとされる約200種の遺伝子多型が報告されており(12)、その大部分は核DNA多型であるが、近年身体運動能力に関連するミトコンドリアDNA多型も報告されている。ミトコンドリアは、ほとんどの真核生物が持つ細胞内小器官であり、その内部に組み込まれている電子伝達系およびATP合成酵素における酸化的リン酸化反応は、生命活動や身体活動に不可欠なエネルギーの大部分を供給している。ミトコンドリアは核とは別に独自の遺伝情報を持ち、それらはミトコンドリアDNA (mitochondrial DNA, mtDNA)と呼ばれている。16,569塩基対からなる環状二

重鎖の mtDNA は、酸化リン酸化に不可欠な 13 個のタンパク質遺伝子および、それらの翻訳に必要な 2 種のリボソーム RNA、22 種のトランスファー RNA 遺伝子をコードしており(3)、母系遺伝するという性質を持つ(19)。疫学研究により、有酸素性運動能力は父親よりも母親の影響を受けるということが報告されている(10、23)。また、ある種の mtDNA 変異は運動不耐能と関連することが知られている(33)。これらのことから、mtDNA 多型は、身体運動能力に影響を及ぼしている可能性が考えられる。そこで本研究では、mtDNA 多型が身体運動能力に及ぼす影響について着目した。

先行研究において、mtDNA 多型のセットにより規定されるミトコンドリアハプログループは、持久的運動能力と関連することがアフリカ人(34)およびヨーロッパ人(13、28)において報告されている。また、ミトコンドリアハプログループは、メタボリックシンドローム(37)や糖尿病(18)といった代謝性の疾患と関連することも報告されている。これらのことから、ある種の mtDNA 多型は、ミトコンドリアにおけるエネルギー代謝系の機能に何らかの変化を生じさせ、身体運動能力や代謝性の疾患に関連すると考えられる。ミトコンドリアハプログループは地域特異性を有しているため、ヨーロッパ人およびアフリカ人で得られた運動能力に関する知見をアジア人へ応用することは難しい。したがって、日本人(アジア人)を対象として独自にミトコンドリアハプログループと身体運動能力との関係を検討する必要がある。

そこで、本研究ではまず第 2 章において文献研究を行い、ゲノム、DNA、遺伝子やミトコンドリアに関する基礎的な知見から、遺伝子多型と身体運動能力についてこれまでに報告されている研究結果についてまとめる。その後、第 3 章の研究課題 1 において、日本人トップアスリートを対象として、ミトコンドリアハプログループと持久系競技能力および瞬発系・パワー系競技能力との関連性を検討する。また、第 4 章の研究課題 2 では、研究課題 1 で関連性の認められたハプログループの責任候補遺伝子多型を明らかにすることを目的として、日本人トップア

スリートの mtDNA 全塩基配列の決定を行うこととした。

## 第2章 文献研究

### 1. ゲノム, DNA, 遺伝子

ゲノム (genome) は “gene (遺伝子)” と “-ome (全体)” を合わせた造語であり、生物のもつすべての遺伝情報 (DNA の全体) を表している。ヒトゲノムは、核ゲノムとミトコンドリアゲノムという2種類のゲノムから成り立っている (図 1)。生物のゲノムは、ウイルスを除いてすべてデオキシリボ核酸 (deoxyribonucleic acid, DNA) から成る。DNA は、ヌクレオチド (nucleotide) という分子をつなげてできたひも状の分子で、ヌクレオチドは、糖、リン酸基、塩基の3つの部分からそれぞれ構成されている。DNA における糖はデオキシリボースであり、塩基はアデニン (A)、シトシン (C)、グアニン (G)、チミン (T) のいずれかである。DNA は、必ず A と T、C と G の塩基が対となり、それぞれが水素結合することにより非常に安定した塩基対、すなわち、二本鎖 (double strand) を形成している。

遺伝子は、DNA の中でもタンパク質の設計情報を担う領域や、転写調節領域などを指す。タンパク質のコード領域では、DNA のヌクレオチド (A, G, C, T) のさまざまな3文字ずつの組み合わせ ( $4^3=64$  通り) が、アミノ酸を表す暗号 (コード) として用いられている。DNA からタンパク質が生成される過程は、大きく分けて転写 (transcription) と翻訳 (translation) という二つの過程からなる。転写は二本鎖 DNA の必要な部分を鋳型として、一本鎖 RNA を合成するという作業である。DNA の一部を写し取ってできた分子をメッセンジャー RNA (mRNA) と呼ぶ。次に、mRNA の配列をアミノ酸の並びに置き換える翻訳という作業が行われる。翻訳では mRNA の配列は3文字ごとに一つのアミノ酸と対応し、この3文字の並びはコドン (codon) と呼ばれている。例えば、「A-U-G」というコドンはタンパク質の合成を開始する合図になるのと同時にメチオニンというアミノ酸に対応している。核 DNA と mtDNA のそれぞれのコドンとアミノ酸の対応表を表 1-1、表 1-2 に示した。なお、核 DNA と mtDNA はアミノ酸に対応するコドンが多少異なっており、mtDNA は

ATA がイソロイシンでなくメチオニンをコードし, TGA が終止コドンでなくトリプトファンをコードし, AGA と AGG がアルギニンではなく終止コドンとなっている点で核 DNA と異なる。

## II. 遺伝子多型

DNA は非常に安定した物質であり, 塩基配列の変化は生じにくい, それでもある頻度で塩基配列は変化する。したがって, 個人間の塩基配列には多様性があり, DNA の塩基配列上の同じ場所でも, 個人毎に異なる配列となっている部位がある。このような塩基配列の変化が 100 人に 1 人 (1%) 以上の頻度で見出される場合, この塩基配列の違いを遺伝子多型と呼ぶ。また, 100 人に 1 人 (1%) 未満の頻度で見られるまれなものは変異と定義されている。塩基配列の違いには, 次に述べるようにいくつかの種類がある。

**一塩基多型 (SNP, single nucleotide polymorphism):** 1 個の塩基が他の塩基に置き換わっているもの。SNP は数百塩基対から 1000 塩基対に一箇所程度の割合で存在しているため, ゲノム中には, 300 万から 1000 万の SNP があると考えられている。

**挿入 / 欠失 (insertion/deletion):** 1 から数十塩基 (数千のこともある) が欠失や挿入をしているもの。

**縦列反復配列多型 (VNTR, variable number of tandem repeat):** 2 塩基から数十塩基を 1 単位とする配列が繰り返し存在する部位において, その繰り返し回数が個人間で異なるもの。

**コピー数多型 (CNV, copy number variation):** 通常ヒトの細胞には父親由来と母親由来の染色体にそれぞれ 1 コピーずつ, 計 2 コピー遺伝子が存在するが, 個人によっては遺伝子が 1 コピーしかなかったり, 3 個以上あったりする。このように個人間でコピー数が異なる 1000 塩基以上のゲノム領域のこ

と.

DNA 上の遺伝子領域外に存在する塩基置換は、機能的な影響はないと考えられるが(最近では遺伝子と考えられていなかった領域からもたくさんの miRNA が転写されており、これらが遺伝子発現を調節していると考えられている)、遺伝子のコード領域に存在する塩基置換は遺伝子の機能に影響を及ぼす場合がある。以下に遺伝子上に生じた場合の塩基置換の種類と影響を示す。

**同義置換**：置換前と置換後でコドンが指定しているアミノ酸が変化しない塩基置換で、作られるタンパク質に影響はない。例えば、ACI(スレオニン)というコドンが ACC(スレオニン)へ置換したとしても、指定しているアミノ酸は両方ともスレオニンであるため、タンパク質の構造に影響はない。

**非同義置換**：塩基置換が生じることでコドンが指定しているアミノ酸が変化する場合、これを非同義置換と呼ぶ。作られるタンパク質のうち、一つのアミノ酸が変化することで、機能に影響を及ぼす可能性がある。例えば、β3 アドレナリンレセプター遺伝子の Trp64Arg 多型は IGG(トリプトファン)というコドンが CGG(アルギニン)に変化することによって、β3 アドレナリンレセプタータンパク質の 64 番目のアミノ酸がトリプトファンからアルギニンへと変化する。したがって、このタンパク質の構造に若干の変化が生じると考えられる。この多型は肥満や 2 型糖尿病と関連することが報告されている。

**ナンセンス変異**：アミノ酸を指定していたコドンが塩基置換によって終止コドンに変わる場合、これをナンセンス変異と呼ぶ。ここで mRNA の翻訳が止まってしまうため、結果的に短いタンパク質が作られる。しかしながら、大抵この変異はタンパク質の機能に大きな影響を与えるため、mRNA の時点で分解され翻訳されないことが多い。例えば、α-アクチニン 3 遺伝子の Arg577Ter 多型は、正常型の CGAというアルギニン(Arg)を指定するコドンが IGAという終止コドン(Ter)へと置換する。このために、変異型のホモ接合体は α-アクチニン 3 タ

ンパク質を発現していない。

### III. 核 DNA 多型と身体運動能力

1998 年に Montgomery ら (26) によって、アンジオテンシン変換酵素 (Angiotensin I-converting enzyme, ACE) 遺伝子多型が初めて運動パフォーマンスに関連する遺伝子多型として報告されて以来、身体運動能力に関連する数多くの遺伝子多型が報告され始めた。2001 年には身体運動能力や健康体力に関連する約 50 種の遺伝子多型を示した遺伝子地図の第一報が米国スポーツ医学会誌に報告された(31)。それ以降、欧米人のデータを中心に、身体運動能力に関連する遺伝子多型の報告は増え続け、2009 年に報告された最新の遺伝子地図 2006 - 2007 アップデートでは身体運動能力や健康体力に関連する、核およびミトコンドリアゲノムの 200 を超える遺伝子多型が報告されている(12)。現在までに報告されている遺伝子多型の中で、特に持久系運動能力もしくは瞬発系・パワー系運動能力に強く関連すると考えられる遺伝子多型を文献検索により抽出した。米国国立医学図書館 (NLM) 提供の医学・生命科学系 2 次情報データベースの PubMed において、exercise performance, physical performance, sprint performance, endurance performance, muscle power, muscle strength, muscle damage, fat free mass, lean body mass もしくは maximal oxygen consumption と polymorphism もしくは variant というキーワードで検索すると、持久系運動能力に関連する遺伝子多型が 30 個、瞬発系・パワー系運動能力に関連する遺伝子多型が 35 個抽出された。これらの遺伝子多型を核ゲノムおよびミトコンドリアゲノムの模式図上に示した(図 1 - 2)。

最も報告が多いのは ACE 遺伝子多型であり、少なくとも 60 本の論文が ACE 遺伝子多型と体力や運動パフォーマンスとの関連性を検討している。ACE は、

アンジオテンシン I を活性型のアンジオテンシン II に変換する酵素であり、循環調節に重要な役割を演じている。ACE 遺伝子は、第 16 イントロンに 287 bp の挿入、欠失が認められ、野生型を I (Insertion) 型、欠失しているものを D (Deletion) 型としている。1998 年 Montgomery ら(26)によって報告された登山家における ACE 遺伝子多型の研究では、8,000m 以上の登山における無酸素登頂者では DD 型が認められず、無酸素登頂者の全員が I アリルを保持していたことから、I アリルが持久性運動能力を規定する遺伝子多型である可能性を報告した。その後、Alvarez ら(2)の一流持久系競技者を対象とした研究においても、Montgomery らの報告と同様に ACE 遺伝子多型の I アリルの頻度が一流持久系競技者群で高いことが報告された。一方で、この現象を否定する報告も多数ある。

また、 $\alpha$ -アクチニン 3 (Alpha-actinin-3, ACTN3) 遺伝子多型も身体運動能力に関連する有力な候補遺伝子多型の一つである。アクチン結合蛋白である  $\alpha$ -アクチニン 2 と  $\alpha$ -アクチニン 3 は骨格筋の構造維持に重要な役割を果たしている。 $\alpha$ -アクチニン 2 は全ての骨格筋線維 (Type I, IIA, IIB, IIX) に発現するが、 $\alpha$ -アクチニン 3 は Type II 線維、すなわち速筋にのみ発現している。 $\alpha$ -アクチニン 3 (Alpha-actinin-3, ACTN3) の遺伝子多型 (Arg577Ter) は第 16 エクソンの C→T の塩基置換により、577 番目のアミノ酸を Arg (アルギニン) から Ter (終止コドン) へと変化させ  $\alpha$ -アクチニン 3 の翻訳を停止させる。したがって、この多型の XX 型を持つ人は速筋に  $\alpha$ -アクチニン 3 を発現していない。オーストラリアのトップアスリートを対象とした研究では、パワー系競技の選手に XX 型を持つ人は少なく、パワー系のオリンピック選手に限ってみると XX 型を有する人は一人も存在しなかったことが報告されている(40)。フィンランドのトップアスリートを対象とした研究においても同様の結果が示されており、トップスプリンターには XX 型が一人もいなかったことを報告している(28)。これらの研究から、ACE 遺伝子多型、および

ACTN3 遺伝子多型は競技能力に強く影響していると考えられている。

その他にも、NRF1 ( nuclear respiratory factor 1 ) , PPARGC1A ( peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 alpha ) , ADRB2 (  $\beta_2$ -adrenergic receptor ) , NOS3 ( nitric oxide synthase 3 ) , END1 ( endothelin 1 ) , MSTN ( myostatin ) などの遺伝子多型と運動能力などとの関連性が報告されている(30)。一方で、このようなトップアスリートを対象とした遺伝子多型の研究が世界各国で進む中、日本人トップアスリートを対象とした遺伝子多型の研究は未だに報告されていないのが現状である。

#### IV. ミトコンドリア DNA と身体運動能力

##### 1. ミトコンドリアの構造と機能

ミトコンドリアは、生物の生命維持に不可欠なエネルギーを産生する細胞内小器官である。その大きさは多様であるが、直径は約 1  $\mu\text{m}$  であり、網目状や糸状の形をしている。ミトコンドリアは、外膜と内膜という 2 枚の膜から形成され、内膜はクリステというひだ状の構造を持つ。生体内のエネルギー源である ATP の合成に重要な電子伝達系のタンパク質や ATP 合成酵素は、すべて内膜に局在している。ミトコンドリアの中心部をマトリックスと呼び、TCA 回路の酵素および脂肪酸の  $\beta$  酸化に関わる酵素やその他の酵素、そして mtDNA が含まれる。

ミトコンドリアにおける ATP の生成は、マトリックスにおける TCA 回路および内膜における酸化リン酸化系によって行われている。細胞質の解糖系によって生成されたピルビン酸はミトコンドリアに運び込まれ、マトリックス内のピルビン酸脱水素酵素の働きによりアセチル CoA となる。アセチル CoA は脂肪酸の酸化においても供給される。TCA 回路はオキサロ酢酸とアセチル CoA が縮合しクエン酸を生ずる反応から始まる。TCA 回路の反応が進むことによって、基質から取り出された水素が NAD や FAD に供給され、NADH や FADH<sub>2</sub> が生成される。電子伝

達系は、これらの電子担体から電子を酸素に転移すると同時に、マトリックス側から膜間腔に  $H^+$  をくみ出す。この結果ミトコンドリア内膜に生じる電気化学的勾配に蓄えられた自由エネルギーを利用して、ADP を  $P_i$  によりリン酸化して ATP を合成する(図 1-3)。細胞質における解糖系がグルコース 1 分子あたり正味 2 分子の ATP を生成するのに対して、ミトコンドリアはグルコース 1 分子あたり 36 分子の ATP を生成することから、ミトコンドリアはエネルギー代謝において極めて重要な役割を果たしている。

また、ミトコンドリア内膜の電気化学的勾配は、細胞質の  $Ca^{2+}$  濃度が増加した場合、ミトコンドリア内に  $Ca^{2+}$  を取り込むことを可能にしている。 $Ca^{2+}$  は細胞死を引き起こすことが知られている。また、細胞内の  $Ca^{2+}$  濃度の変化は、筋収縮の開始シグナルをはじめとして様々な細胞内シグナルとして利用されており、ミトコンドリアの持つ細胞質  $Ca^{2+}$  濃度の調節機能は非常に重要な意味を持つ。

## 2. mtDNA と核 DNA の比較

細胞の大部分の DNA は 22 対の常染色体と性染色体 (XX/XY) として核に局在しているが、ミトコンドリアのマトリックスには独自の DNA、すなわちミトコンドリア DNA (mitochondrial DNA: mtDNA) が存在する(図 1-4)。mtDNA は 16569 塩基対からなる環状二重鎖の小さな DNA であり、核ゲノムが約 30 億塩基対であると比較するとその長さは 18000 分の 1 でしかない。しかしながら、ヒト細胞には通常 mtDNA 分子が数千コピー含まれており、全 mtDNA の総量は体細胞 DNA のおよそ 0.5% にまで達する。さらに、核 DNA が遺伝子として利用している領域は核 DNA 全体の約 5% 未満である。一方で、mtDNA はその 95% を遺伝子として利用していることから、mtDNA の遺伝子として機能している領域は核 DNA の約 10% にまで達する。

核 DNA は父親と母親から 1 セットずつ受け継ぐが、父親の mtDNA は次世代

に伝達されず, mtDNA は母系遺伝するという性質を持つ(19). mtDNA は, 活性酸素種の主な生成部位であるミトコンドリア内に存在しているだけでなく, 核 DNA のようにヒストンで保護されたクロマチン構造を持たないために塩基置換が生じやすい. また, DNA 組み換え修復機構がないため, 生殖細胞系(卵子)において生じた塩基置換が固定されやすく, 核 DNA と比較して塩基置換速度が 5~10 倍速い. したがって, mtDNA の塩基配列は多様性が大きい.

mtDNA はミトコンドリア内のタンパク質の合成に不可欠な 2 つのリボソーム RNA および 22 種のトランスファー RNA をコードしていると同時に, ATP の生成に重要な役割を果たしている電子伝達系の呼吸鎖酵素複合体である NADH 脱水素酵素複合体のサブユニット 1-6, 4L (ND1-6, 4L) や, ユビキノール-チトクロム c 酸化還元酵素のサブユニット Cytochrome *b* (Cyt*b*), チトクロム c 酸化酵素 (COX) のサブユニット 1-3 (COI-III), また, ATP 合成酵素のサブユニット 8, 6 (ATPase 8, 6) をコードしている (図 1-4, 5).

### 3. mtDNA 多型と運動能力に関する先行研究

1991 年に Dionne ら(14)は初めて, mtDNA 多型と運動パフォーマンスの関連性を報告した. 彼らは 46 名の若年成人男性において 12~20 週間の持久性トレーニングを行い, mtDNA 多型を 22 種の制限酵素の切断パターンから決定した. その結果, 特定の mtDNA 多型を有するもので, トレーニング前の  $\dot{V}O_{2max}$  が低く, 他の多型を有するものは  $\dot{V}O_{2max}$  に対するトレーニング効果が低いということを報告している. その後, Murakami ら(27)が 55 名の成人男性を対象に 8 週間の持久性トレーニングを行い, トレーニング前の  $\dot{V}O_{2max}$  および  $\dot{V}O_{2max}$  のトレーニング効果と関連する mtDNA の制御領域の多型を報告している.

### 4. ミトコンドリアハプログループと運動能力に関連する先行研究

片親由来の DNA 配列の遺伝子型をハプロタイプと呼ぶ。mtDNA は母性遺伝するため、個人の持つ mtDNA 多型はハプロタイプである。古い祖先において生じた多型は、多くの個体で共通に認められる。このように類似したハプロタイプをまとめたものをハプログループと呼ぶ。したがって、ミトコンドリアハプログループは特定の mtDNA 多型のセットにより規定されている。

アフリカ人およびヨーロッパ人において持久系競技能力とミトコンドリアハプログループの関連性が検討されている。アフリカ人を対象とした研究では、2004 年に Scott ら(35)が、エチオピア人の一流長距離ランナー76 名と、一般のエチオピア人 108 名の間でハプログループの頻度比較を行い、エチオピア人長距離ランナーとミトコンドリアハプログループの間に関連性は認められないと報告した。しかしながら、最近 Scott ら(34)は、ケニア人の国際大会レベルの長距離ランナー70 名と国内レベルの長距離ランナー221 名、および 85 名の一般のケニア人を対象としてハプログループの頻度比較を行い、国際大会レベルの長距離ランナーは一般のケニア人と比較して、ハプログループ L0 の頻度が有意に高く、L3 の頻度が有意に低いことを報告した。ヨーロッパ人を対象とした研究では、2005 年に Niemi ら(28)が、フィンランド人一流持久系競技者 52 名と一流瞬発系競技者 89 名を対象としてミトコンドリアハプログループの頻度比較を行い、一流持久系競技者においてハプログループ K とサブハプログループ J2 に属する人がいなかったと報告した。その後、一般のヨーロッパ人においても、ハプログループ J に属する人は他のハプログループに属する人と比較して、最大酸素摂取量が低かったと報告されている(24)。また、Castro ら(13)のスペイン人の一流持久系競技者 95 名を対象とした研究では、ハプログループ T の頻度が一般のスペイン人と比較して、一流持久系競技者で低いことを報告している。

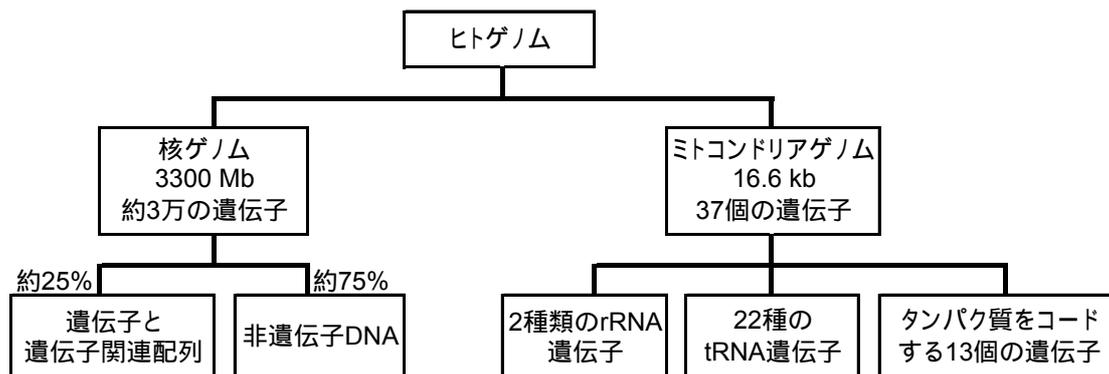


図 1 - 1. ヒトゲノムの構成 [文献(41)より改変]

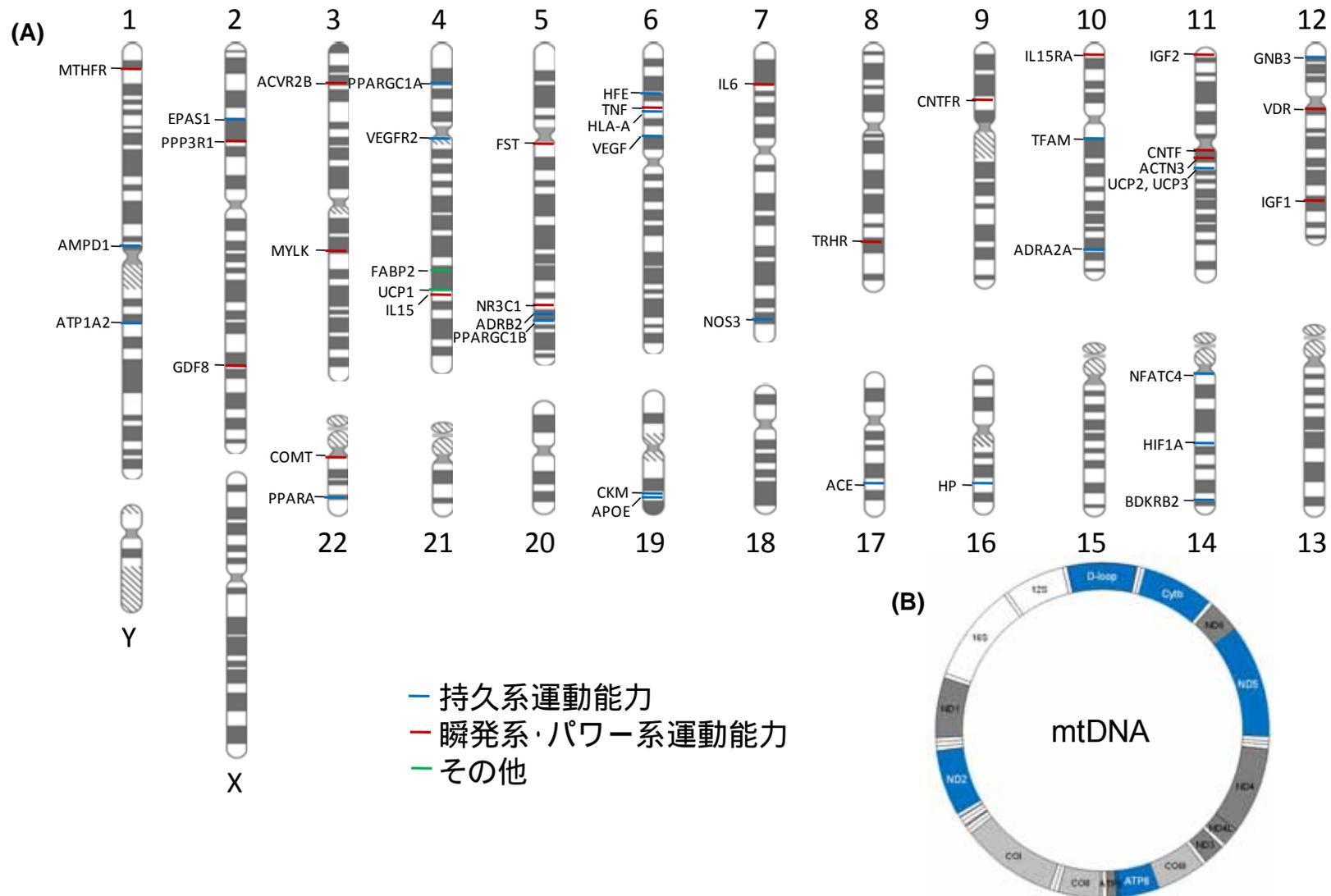


図 1 - 2 . 運動能力に関連する遺伝子多型 (A)核ゲノム (B)ミトコンドリアゲノム

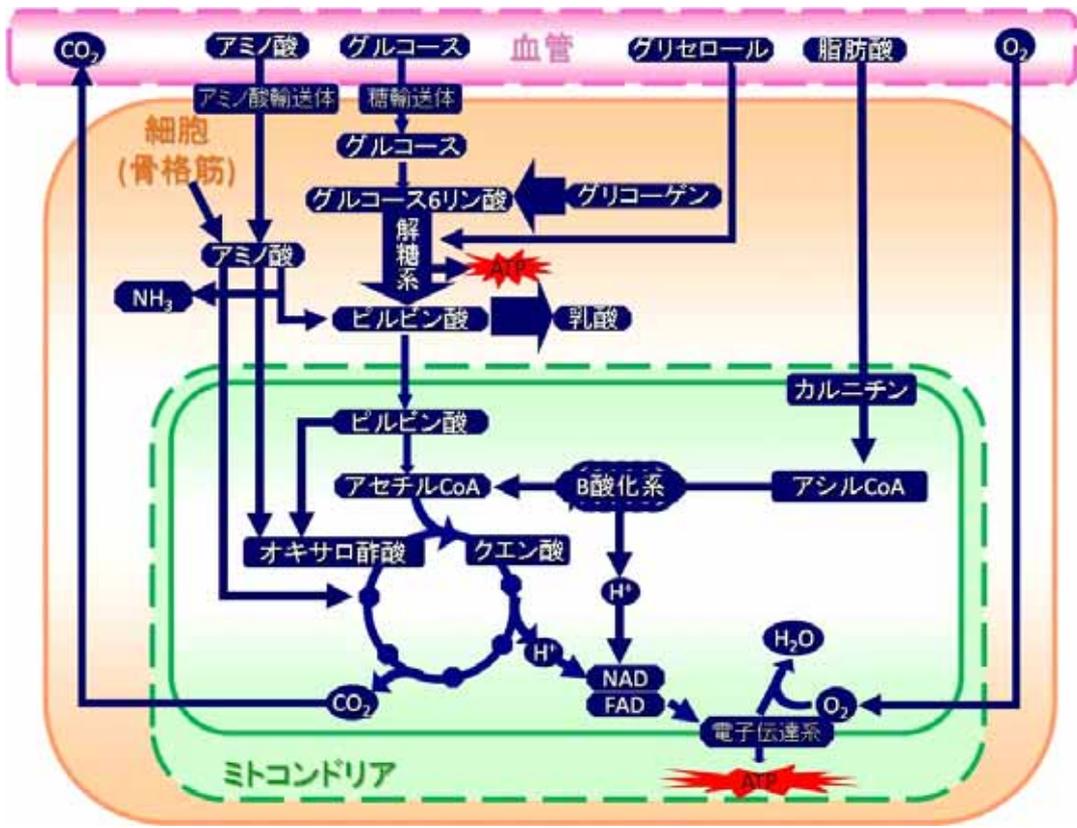


図 1 - 3 . 細胞内のエネルギー代謝

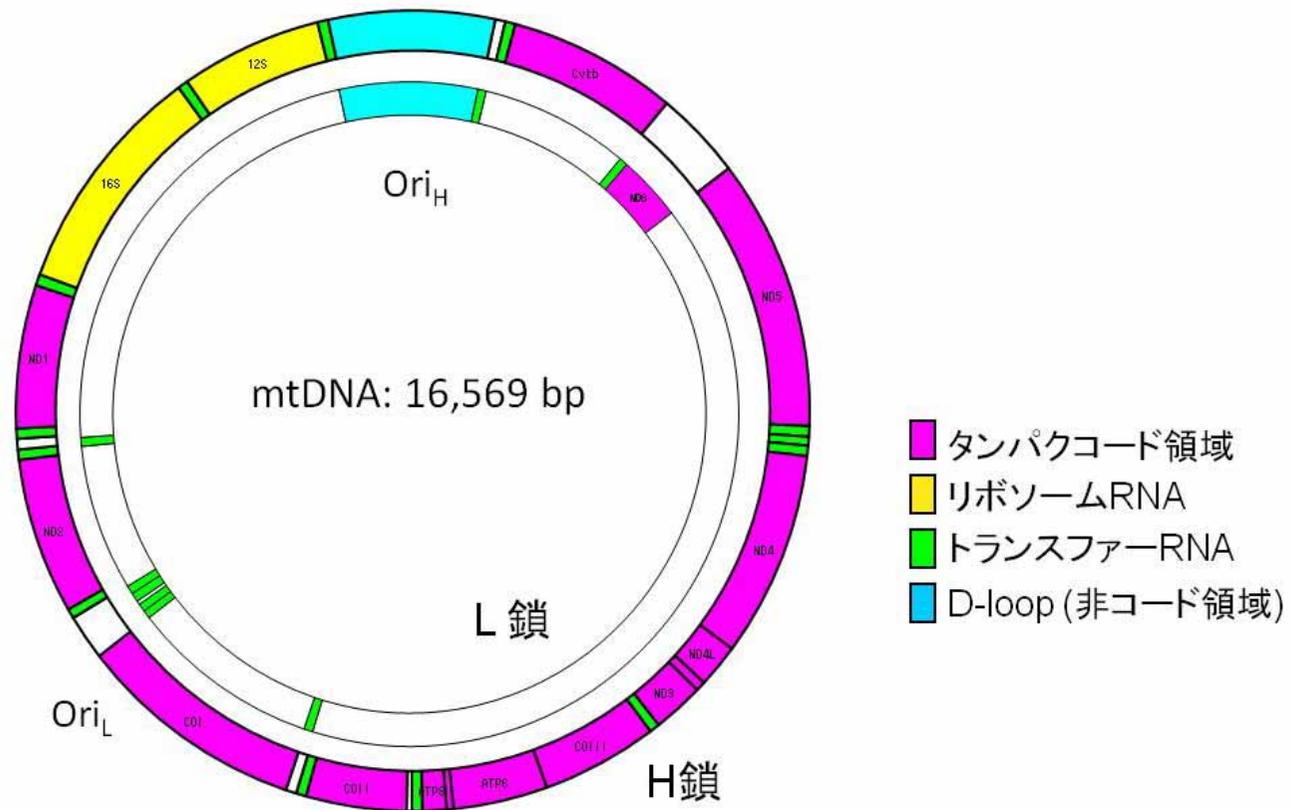


図 1 - 4 . ミトコンドリア DNA (mtDNA) の模式図

L 鎖: 軽鎖, H 鎖: 重鎖, Ori<sub>H</sub>: 重鎖複製開始点, Ori<sub>L</sub>: 軽鎖複製開始点

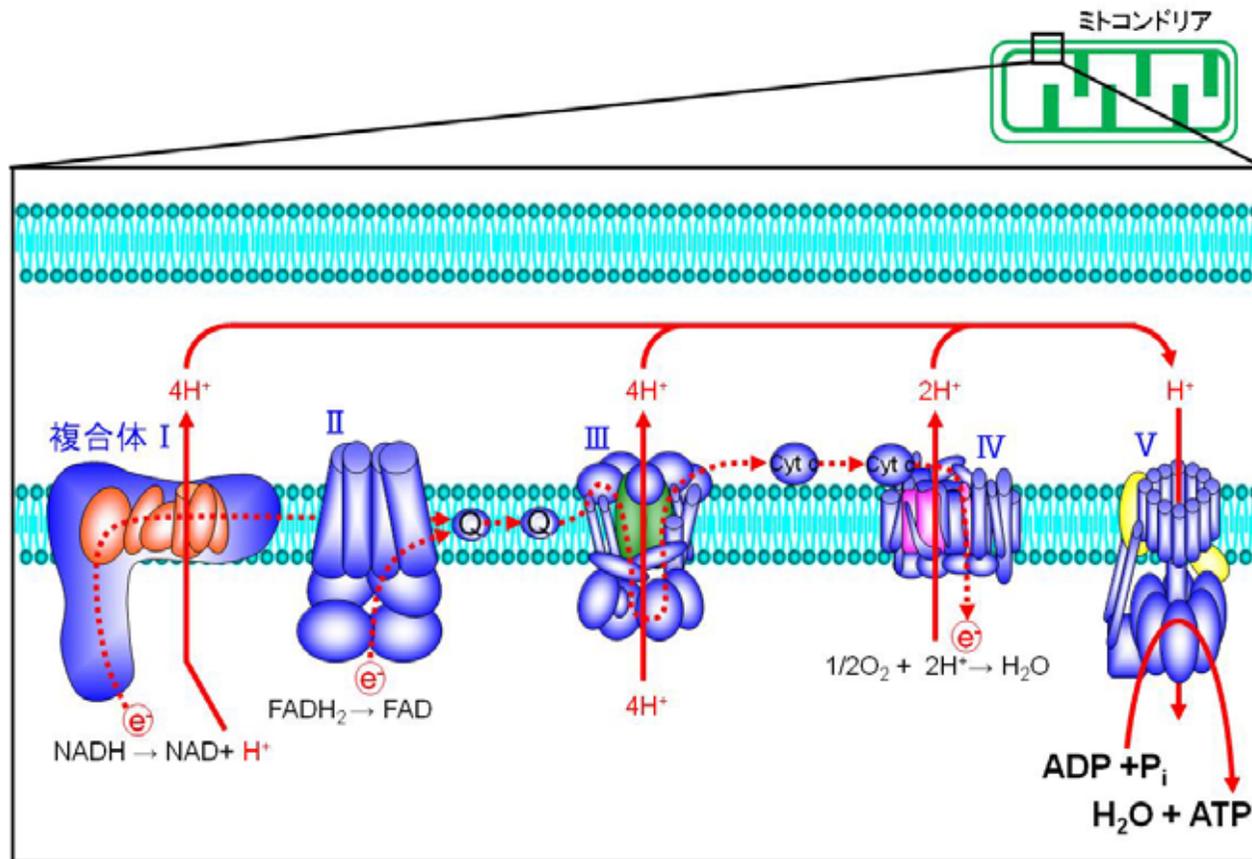


図 1 - 5. 酸化的リン酸化系の模式図

オレンジ, 緑, ピンク, 黄色で示したサブユニットが mtDNA にコードされている。

表 1-1 . 核 DNA コドン表

第1塩基	第2塩基				第3塩基
	T	C	A	G	
T	フェニルアラニン	セリン	チロシン	システイン	T
	ロイシン		翻訳終了	翻訳終了 トリプトファン	C A G
C	ロイシン	プロリン	ヒスチジン	アルギニン	T
			グルタミン		C A G
A	イソロイシン	スレオニン	アスパラギン	セリン	T
	メチオニン		リジン	アルギニン	C A G
G	バリン	アラニン	アスパラギン酸	グリシン	T
			グルタミン酸		C A G

注：U(ウラシル)を T(チミン)として表記している。

表 1-2 . ミトコンドリア DNA コドン表

第1塩基	第2塩基				第3塩基
	T	C	A	G	
T	フェニルアラニン	セリン	チロシン	システイン	T
	ロイシン		翻訳終了	トリプトファン	C A G
C	ロイシン	プロリン	ヒスチジン	アルギニン	T
			グルタミン		C A G
A	イソロイシン	スレオニン	アスパラギン	セリン	T
	メチオニン		リジン	翻訳終了	C A G
G	バリン	アラニン	アスパラギン酸	グリシン	T
			グルタミン酸		C A G

注：U(ウラシル)を T(チミン)として表記している。

## 第3章

### 研究課題1

#### 「日本人トップアスリートに関連するミトコンドリアハプログループ」

##### 1. 目的

ミトコンドリアはほとんどの真核生物にある細胞内小器官であり、ミトコンドリア内膜にある酸化的リン酸化系は生命活動や身体活動に不可欠なエネルギーを絶えず供給している。ミトコンドリアは核とは別に独自のDNAを持ち、それらはミトコンドリアDNA(mtDNA)と呼ばれている。16569塩基対からなる小さな環状二重鎖のmtDNAは、核DNAとは異なり母性遺伝するという性質を持ち(19)、酸化的リン酸化に不可欠な13種のタンパク質遺伝子をコードしている。したがって、mtDNAに生じた多型は、ミトコンドリアにおける酸化的リン酸化系の機能になんらかの変化を生じさせ、エネルギー代謝に影響を及ぼす可能性がある。興味深いことに、家族研究により有酸素性運動能力は父親より母親の影響を受けることが報告されている(10, 23)。さらに、ある種のmtDNA変異は運動不耐能と関連することが知られていることから(5)、mtDNAにおける塩基配列の多様性は、身体運動能力に影響を及ぼしている可能性が考えられる。

実際に、ある種のmtDNA多型が、最大酸素摂取量やそのトレーニング効果と関連しているということが報告されている(14, 27)。mtDNAは母性遺伝し、組み換えも起こらないと考えられているので、mtDNA多型は互いに連鎖して存在している。したがって、個々の多型を個別に検討したのでは、関連性の認められた多型から、機能的意義を検討することは難しい。そこで、個々の多型を個別に評価するのではなく、まず、連鎖している多型をセットとして捉え、表現型との関連性を検討する必要がある。

類似したmtDNAのハプロタイプをまとめたものをミトコンドリアハプログループと

呼ぶ。近年このミトコンドリアハプログループが、ヨーロッパ人(13, 28)およびアフリカ人(34)において、一流持久系競技者の競技能力と関連していることが報告されている。しかしながら、アジア人においてミトコンドリアハプログループと身体運動能力との関連性は明らかとなっていない。ミトコンドリアハプログループの分布には地理的な多様性が存在し、特定のハプログループは地域特異性を示す。実際に、アフリカ人やヨーロッパ人で認められるほとんどのミトコンドリアハプログループは、日本人を含むアジア人においては存在しない(資料1)。

アフリカ人の mtDNA の系統は約 200,000 年の歴史を持つことから配列の多様性が大きい(39)。東アジアの人々の mtDNA の分岐年代はアフリカ人と比較すると新しいが、30,000 から 55,000 年の歴史を持つ。さらに、日本人は寒冷な気候に適応した北方のルートからの移住者と、南方からの移住者が混合している(36)。mtDNA の多様性は、我々の祖先に寒冷や飢餓などの厳しい環境への適応をもたらしたが、現代社会においては、その多様性がエネルギー代謝に関連した様々な疾患の易罹患性に対して、重要な役割を果たしていると考えられている(25)。実際に日本人において、ある種のミトコンドリアハプログループは肥満(17)や2型糖尿病(16, 18, 20)、メタボリックシンドローム(16, 37)などと関連していることが報告されている。特定のミトコンドリアハプログループはミトコンドリアの機能不全だけでなく、ミトコンドリア機能の亢進とも関連している可能性があるため、日本人におけるミトコンドリアハプログループは、運動能力にも関連するという仮説を立てた。そこで研究課題1の目的は、日本人トップアスリートの運動能力とミトコンドリアハプログループとの関連性を明らかにすることとした。

## II. 対象および方法

### 1. 対象

過去にオリンピック出場経験のある日本人 141 名(男性:110 名, 女性:31 名)

を一流競技者群とした。一流競技者群をさらに、専門種目の競技特性により、一流持久系競技者(EA)群 81名、および一流瞬発系・パワー系競技者(SPA)群 60名へと分類した(表 2-1)。コントロール(CON)群として、mtDNA 全塩基配列が明らかになっているヒトミトコンドリアゲノム多型データベース(<http://mtsnp.tmig.or.jp/mtsnp/index.shtml>)上の日本人 672名(男性:385名,女性:285名)のデータを用いた。

本研究は東京都健康長寿医療センター研究所、および国立スポーツ科学センター倫理委員会の承認を得て、被験者にはあらかじめ実験の目的と内容を説明し、文書により同意を得て諸検査を実施した。

## 2. 方法

### i. DNA の抽出

QIAamp DNA Blood Maxi Kit (QIAGEN 社製)を使用し、一流競技者群の静脈血より総 DNA を抽出した。

### ii. DNA の増幅

PCR(polymerase chain reaction)法にて mtDNA 制御領域の Hypervariable sequence I(HVS-I: m.16024-m.16383)および 5178 番目の塩基部位を含む二つの DNA 断片を増幅した。増幅に用いたプライマーのセットを表 2-2 に示した。フォワードプライマーは、特異的な 20 塩基の配列と、その 5'側の 18 塩基のユニバーサル配列(-21M13: 5'-TGTAACGACGGCCAGT-3')からなる合計 38 塩基のオリゴヌクレオチドから構成されていた(表 2-2)。PCR 法による DNA の増幅は、20 ng の総 DNA, 0.25 unit の *Takara Ex Taq<sup>TM</sup> HS* (タカラバイオ株式会社製), 1  $\mu$ l の 10 $\times$  Ex Taq Buffer, 0.2 mM の各 dNTP, そしてそれぞれのプライマーを 0.5  $\mu$ M ずつ含む合計 10  $\mu$ l の反応液で行われた。P

CR の条件は、94 における熱変性が 5 分間、その後、熱変性 (94 -15 秒)、アニーリング (60 -15 秒)、伸長反応 (72 -1 分間) の 3 ステップを 40 サイクルとした。最後に伸長反応を 72 で 10 分間行った。プライマーダイマーなどの除去のために、PCR 産物を MultiScreen-PCR プレート (Millipore 社製) を用いて精製した。その後、1% のアガロースゲルを用いて PCR 産物の電気泳動を行い、エチジウムブロマイドで染色した後、UV 照射によって DNA の有無や質、濃度を確認した。

### iii. DNA 塩基配列の解析と多型の同定

シーケンス反応には、BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit version 3.1 (Applied Biosystem 社製) を用いた。シーケンス反応は、3 ~ 10 ng の PCR 産物、0.5  $\mu$ l の BigDye Terminator Ready Reaction Mix v3.1、1  $\mu$ l の -21M13 プライマー (3.2 pmol/ $\mu$ l)、1.75  $\mu$ l の 5 $\times$  Sequencing Buffer を含む合計 10  $\mu$ l の反応液で行われた。PCR の条件は、96 における熱変性を 10 分間、その後熱変性 (96 -10 秒)、アニーリング (50 -5 秒)、伸長反応 (60 -4 分間) の 3 ステップを 25 サイクルとした。シーケンス反応後、過剰な Dye Terminator を除去するためエタノール沈殿を行い、真空乾燥機で乾燥させた後、ホルムアミドに溶解した。溶解した DNA サンプルを変性のために 95 で 2 分間熱し、すぐに氷上で冷却した。その後、塩基配列の決定を自動シーケンサー Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystem 社製) を用いて行った。得られたすべての mtDNA 配列を、オリジナル(3)および改訂版(6) のケンブリッジ参照配列と比較し、DNA Sequencing Software Sequencher<sup>TM</sup> version 4.2.2 (Gene Codes Corporation 社製) を用いて、視覚的に多型を確認した。多型は、オーバーラップする 2 本以上の異なる断片で確認された。

#### iv. ハプログループの分類

対象者を、HVS-I およびその近傍の多型と、ハプログループ D を規定する 5178G>A 多型の組み合わせ(表 2 - 3)から、日本人に主要な 12 のハプログループ(F, B, A, N9a, N9b, M7a, M7b, M\*, G2, G1, D5 または D4)に分類した(36)。141 名中 2 名はハプログループへの分類ができなかったため解析から除外した。

#### v. 統計解析

EA 群と CON 群, もしくは SPA 群と CON 群の間におけるハプログループの頻度比較を行うため, 各群間で、それぞれのハプログループの頻度と、それ以外のハプログループの合計頻度を比較した。統計学的処理は JMP version 8 (SAS Institute Japan)にて  $\chi^2$  検定を用い, 危険率 5%未満を有意とした。

### III. 結果

EA 群と CON 群間, および SPA 群と CON 群間におけるハプログループの分布比較を図 2 に示した。それぞれのハプログループについて, その頻度とそれ以外のハプログループの合計頻度を群間で比較すると, EA 群のハプログループ G1 の頻度 (8.9%) は CON 群 (3.7%) と比較して有意に高かった(オッズ比: 2.52 [95% 信頼区間: 1.05-6.02],  $P=0.032$ ; 表 2 - 4)。また, 有意ではないものの, EA 群のハプログループ B の頻度 (6.3%) は CON 群 (13.1%) と比較して低い傾向があった(オッズ比: 0.45 [95% 信頼区間: 0.18-1.14],  $P=0.084$ ; 表 2 - 4)。

一方, SPA 群のハプログループ F の頻度 (15.0%) は, CON 群 (6.0%) と比較して有意に高かった(オッズ比: 2.79 [95% 信頼区間: 1.28-6.07],  $P=0.007$ ; 表 2 - 4)。

本研究の CON 群が, 日本人全体のハプログループの分布と差がないことを確

認するため、東京都健康長寿医療センター研究所でハプログループの解析を終えていた、一般の日本人合計 6131 名のデータと比較を行った。6131 名のデータにおいて、ハプログループ F およびハプログループ G1 の頻度はそれぞれ 7.0% (434 名) および 3.5% (209 名) であった。地域ごとに分類すると、群馬県は 6.7% と 3.0% (1418 名中 95 名と 43 名)、岐阜県は 7.6% と 3.8% (2748 名中 208 名と 104 名)、東京都は 6.1% と 3.4% (1493 名中 95 名と 51 名)、佐賀県は 8.3% と 2.9% (480 名中 40 名と 11 名) であった。本研究の CON 群と一般の日本人 6131 名の間で、ハプログループ F およびハプログループ G1 の頻度に有意な差は認められなかった。

#### IV. 考察

本研究では、一流競技者群とコントロール群の間で、あるハプログループの頻度が有意に異なることが明らかとなった。一流持久系競技者群はコントロール群と比較してハプログループ G1 の頻度が有意に高く、一流瞬発系・パワー系競技者群はコントロール群と比較してハプログループ F の頻度が有意に高かった。これは、アジア人において、ミトコンドリアハプログループと一流競技者との関連性を検討した最初の報告である。本研究のコントロール群におけるハプログループ F および G1 の頻度は、日本各地から集められた一般の日本人 6131 名における頻度と差がなかった。したがって、本研究における一流競技者群とコントロール群の間のハプログループ F と G1 の頻度の差は、地域によるハプログループの分布の違いでなく、運動能力に関連するハプログループを反映していると考えられる。

最近、ケニア人において一流長距離ランナーの競技能力と関連するミトコンドリアハプログループが報告された(34)。一流ケニア人長距離ランナーは一般のケニア人と比較して、ハプログループ L0 の頻度が有意に高く、ハプログループ L3 の頻度が有意に低かった。また、Niemi ら(28)はフィンランド人において、一流の瞬発

系競技者と持久系競技者の間でハプログループの頻度が異なることを報告した。すなわち、一流持久系競技者においてハプログループ K およびサブハプログループ J2 は検出されなかったとしている。さらに、Castro ら(13)は、スペイン人の一流持久系競技者においてハプログループ T の頻度が一般のスペイン人と比較して有意に低いということを示した。これらの一流競技者の競技能力とミトコンドリアハプログループとの関連性は、これらのハプログループが身体運動能力や、そのトレナビリティに影響を及ぼす多型を含んでいるということを示唆している。

### **ハプログループ G1 と一流持久系競技者**

本研究では、一流持久系競技者群においてハプログループ G1 の頻度がコントロール群と比較して有意に高かった。ミトコンドリアの主な機能は酸化的リン酸化による ATP の生成であるが、一方で酸化的リン酸化の脱共役は熱を産生し、その結果として ATP の生成効率が減少する(21)。逆に、より強く共役した酸化的リン酸化は熱産生を減少させ、結果として ATP の生成効率が増加すると考えられる。このような ATP 生成効率は、ハプログループ G1 と優れた有酸素性運動能力を持つ一流持久系競技者との関連性を部分的に説明できるかもしれない。このようなミトコンドリアにおけるエネルギーの節約効果は、座りがちな生活を送った場合、肥満を誘発する可能性がある。実際に、Okura ら(29)は、中高年の男女においてハプログループ G1 を規定する多型の一つである m.15497G>A 多型が肥満と関連していることを報告している。このように、ハプログループ G1 は、ATP 産生効率の良い遺伝子型であり、エネルギーの節約効果の結果として、高い有酸素性運動能力と関連する可能性がある。一方で、このハプログループの不活発な個人においては、肥満に関連する可能性がある。

## ハプログループ F と瞬発系・パワー系競技者

本研究では、一流瞬発系・パワー系競技者群においてハプログループ F の頻度がコントロール群と比較し有意に高いことが明らかになった。瞬発系・パワー系のパフォーマンスは、酸化的リン酸化による ATP 生成と比較して、解糖系による ATP 生成により依存しているということが知られている。ミトコンドリアの主な機能は酸化的リン酸化による ATP の生成であり、これまでの先行研究において、瞬発系・パワー系パフォーマンスと mtDNA との関連性は報告されていない。しかしながら、ミトコンドリアは細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$  の貯蔵庫でもあり、細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を調節する。最近、Kazuno ら(22)は、ミトコンドリアマクロハプログループ N のサイブリットが、マクロハプログループ M のサイブリットと比較してヒスタミン刺激後の細胞質  $\text{Ca}^{2+}$  レベルのピーク値が高いことを報告している。このヒスタミン刺激は、イノシトール 3 リン酸を介して、小胞体から  $\text{Ca}^{2+}$  を放出させる。この結果はマクロハプログループ N のサイブリットにおいて、細胞質の  $\text{Ca}^{2+}$  応答が高まっていることを示唆している。一流瞬発系・パワー系競技者に関連が認められたハプログループ F は、マクロハプログループ N の構成要素であるため、ハプログループ F が骨格筋などの細胞内における  $\text{Ca}^{2+}$  動態と関連している可能性が考えられる。

$\text{Ca}^{2+}$  は骨格筋におけるグリコーゲンの分解を調節している。骨格筋の収縮は、神経刺激により筋小胞体から  $\text{Ca}^{2+}$  が放出され、細胞質内の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が一時的に上昇することで生じるが、その  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇は、同時にホスホリラーゼキナーゼを活性化する。活性化されたホスホリラーゼキナーゼは、グリコーゲン分解活性を有するホスホリラーゼを活性化するため、グリコーゲン分解と筋収縮は連動して起こる。骨格筋のグリコーゲンは解糖系の主要な基質であるので、 $\text{Ca}^{2+}$  によるグリコーゲンホスホリラーゼ活性の調節は高強度運動中の骨格筋における ATP の需要を満たす上で非常に重要であると考えられる。それゆえ、本研究において一流の瞬発系・パワー系競技者に関連していたミトコンドリアハプログループ

F は、細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の調節を介して、解糖系による ATP 生成速度もしくは筋収縮の速度に関連しているかもしれない。

以上、研究課題 1 をまとめると、日本人一流持久系競技者においてミトコンドリアハプログループ G1 の頻度が有意に高かった。また、日本人一流瞬発系・パワー系競技者においてミトコンドリアハプログループ F の頻度が有意に高かった。これらの結果は、日本人において、mtDNA 多型が持久系競技能力だけでなく、瞬発系・パワー系競技能力にも影響を及ぼしている可能性を示している。

表 2 - 1. 競技特性

競技種目	EA群	SPA群	合計
ウエイトリフティング	0	4	4
カヌー	7	0	7
競泳	7	9	16
近代五種	1	0	1
サッカー	4	0	4
自転車	5	2	7
柔道	0	2	2
水球	4	0	4
体操	0	7	7
飛込み	0	6	6
バスケットボール	6	0	6
バレーボール	9	0	9
フェンシング	0	7	7
ボート	7	0	7
ボクシング	2	0	2
ホッケー	6	0	6
ヨット	10	0	10
陸上	13	18	31
レスリング	0	5	5
合計	81	60	141

EA: 一流持久系競技者, SPA: 一流瞬発系競技者

表 2 - 2 . 解析 に用いたプライマーセット

フォワードプライマー		リバースプライマー		長さ (bp)
名前	配列 (5'-to-3')	名前	配列 (5'-to-3')	
FL4827	TGTA AACGACGGCCAGTCAAGGCACCCCTCTGACATC	H5528	TTGAAGGCTCTTGGTCTGTA	739
FL15696	TGTA AACGACGGCCAGTTTCGCCCACTAAGCCAATCA	H81	CAGCGTCTCGCAATGCTATC	992

表 2 - 3 . ハプログループの分類に用いた多型

ハプログループ	主要多型	補助多型
F	16304T>C	16129G>A or 16189T>C or 16207A>G or (16203A>G and 16291C>T)
B	16183A>C, 16189T>C, 16519T>C	16217T>C or (15851A>G [Cytb] and 16140T>C)
A	16223C>T, 16290C>T, 16319G>A	16187C>T or 16519T>C or 16362T>C or (16129G>A and 16213G>A)
N9a	16172T>C, 16223C>T, 16257C>A, 16261C>T	
N9b	16183A>C, 16189T>C, 16223C>T, 16519T>C	
M7a	16209T>C, 16223C>T	16140T>C or 16324T>C
M7b	16129G>A, 16189T>C, 16223C>T, 16297T>C, 16298T>C	
M*	16223C>T	16497A>G or (16184C>T and 16298T>C and 16319G>A) or (16234C>T and 16316A>G and 16362T>C) or (16311T>C and 16519T>C)
G2	16223C>T, 16278C>T, 16362T>C	16269A>G or 16519T>C
G1	16223C>T, 16362T>C, 16519T>C	(15860A>G [Cytb] and 16325T>C) or (16184C>T and 16214C>T)
D5	5178C>A [ND2], 16189T>C, 16223C>T, 16362T>C	16167C>T or 16390G>A or (16092T>C and 16266C>T)
D4	5178C>A [ND2], 16223C>T, 16362T>C	16129G>A or 16291C>T or 16319G>A or 16245C>T or 15874A>G [Cytb] or 16278C>T or 16174C>T or 16294C>T or (16274G>A and 16290C>T and 16319G>A) or (16145G>A and 16368T>C)

主要多型と補助多型のいずれか一つの組み合わせによりハプログループに分類した。ハプログループ B, G1, D4, D5 を決定するために, 4 つのタンパクコード領域の多型 (15851A>G [Cytb], 15860A>G [Cytb], 15874A>G [Cytb], 5178C>A [ND2]) をそれぞれ用いた。

Cytb: Cytochrome *b*, ND2: NADH dehydrogenase subunit 2.

表 2 - 4 . 各群におけるミトコンドリアハプログループの分布比較

ハプログループ	CON群	EA群			SPA群		
	N (%)	N (%)	P値	オッズ比 (95%信頼区間)	N (%)	P値	オッズ比 (95%信頼区間)
<b>F</b>	<b>40 (6.0)</b>	6 (7.6)	0.565	1.3 (0.53-3.17)	<b>9 (15.0)</b>	<b>0.007</b>	<b>2.79 (1.28-6.07)</b>
B	88 (13.1)	5 (6.3)	0.084	0.45 (0.18-1.14)	9 (15.0)	0.677	1.17 (0.56-2.46)
A	48 (7.1)	7 (8.9)	0.589	1.26 (0.55-2.90)	4 (6.7)	0.891	0.93 (0.32-2.67)
N9a	34 (5.1)	1 (1.3)	0.13	0.24 (0.03-1.78)	3 (5.0)	0.984	0.99 (0.29-3.32)
N9b	18 (2.7)	2 (2.5)	0.939	0.94 (0.21-4.15)	0 (0.0)	0.199	-
M7a	44 (6.5)	5 (6.3)	0.941	0.96 (0.37-2.51)	3 (5.0)	0.639	0.75 (0.23-2.50)
M7b	29 (4.3)	3 (3.8)	0.829	0.88 (0.26-2.94)	5 (8.3)	0.157	2.02 (0.75-5.42)
M*	34 (5.1)	7 (8.9)	0.16	1.82 (0.78-4.26)	2 (3.3)	0.554	0.65 (0.15-2.76)
G2	32 (4.8)	5 (6.3)	0.543	1.35 (0.51-3.57)	0 (0.0)	0.084	-
<b>G1</b>	<b>25 (3.7)</b>	<b>7 (8.9)</b>	<b>0.032</b>	<b>2.52 (1.05-6.02)</b>	1 (1.7)	0.41	0.44 (0.06-3.30)
D5	29 (4.3)	4 (5.1)	0.759	1.18 (0.40-3.46)	3 (5.0)	0.804	1.17 (0.34-3.95)
D4	233 (34.7)	24 (30.4)	0.447	0.82 (0.50-1.36)	20 (33.3)	0.834	0.94 (0.54-1.65)
Others	18 (2.7)	3 (3.8)	0.568	1.43 (0.41-4.98)	1 (1.7)	0.637	0.62 (0.08-4.69)
合計	672	79			60		

CON:コントロール, EA:持久系競技者, SPA:瞬発系・パワー系競技者, M\*: ハプログループ M7a, M7b 以外のハプログループ M

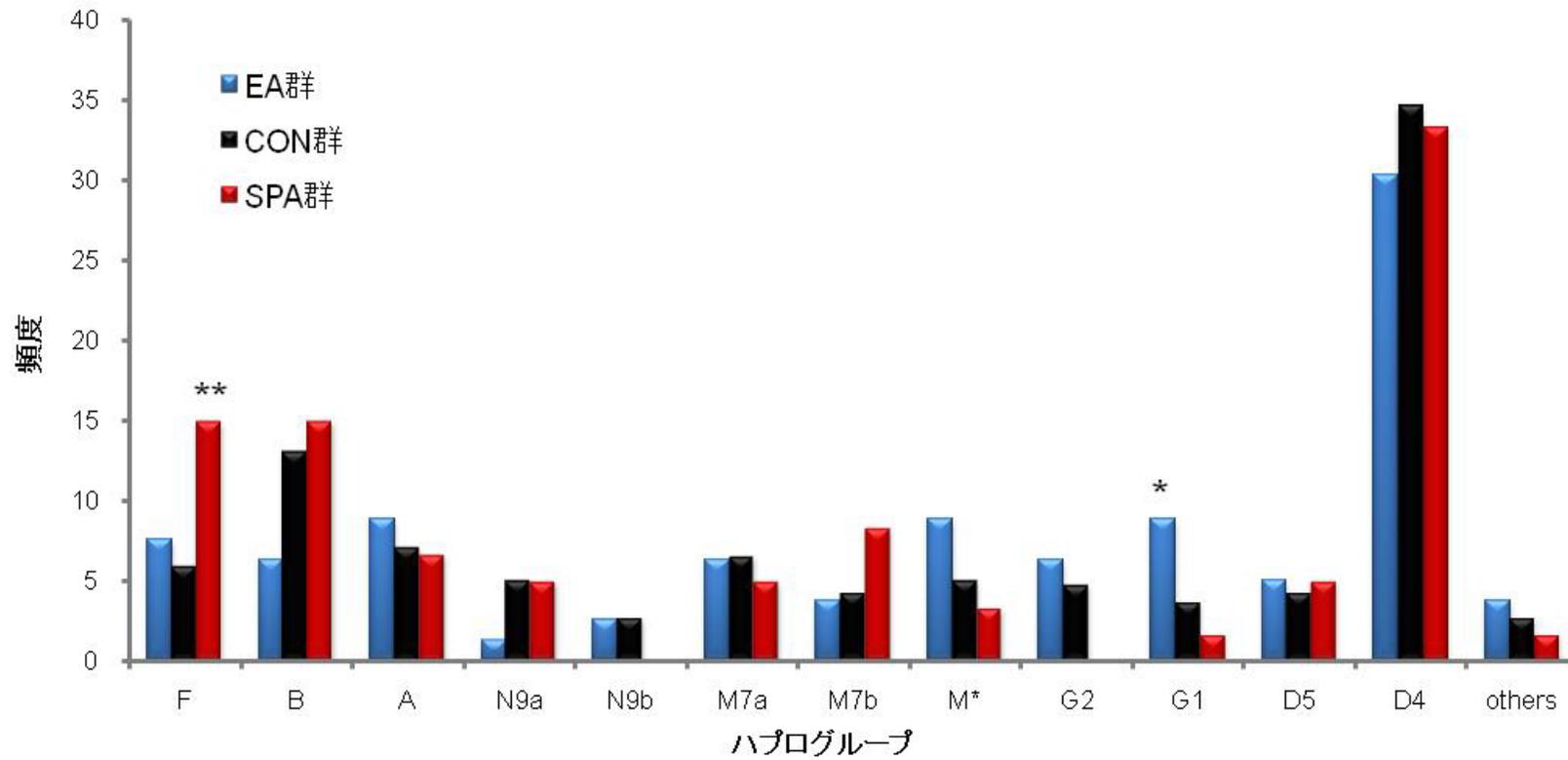


図 2. ミトコンドリアハプログループの分布  
 \*  $P < 0.05$  vs CON 群, \*\*  $P < 0.01$  vs CON 群

## 第4章

### 研究課題2

#### 「日本人トップアスリートにおけるミトコンドリアゲノム全塩基配列の決定」

##### 1. 目的

研究課題1では、mtDNAの中でも遺伝子をコードしておらず、塩基配列の多様性に富む Hypervariable sequence 1 (HVS-I) とその近傍の限られた領域のみの解析から、各個体の mtDNA をミトコンドリアハプログループに分類し、ハプログループと競技能力との関連性を検討した。その結果、一流持久系競技者群においてハプログループ G1 の頻度はコントロール群と比較して有意に高く、一流瞬発系・パワー系競技者群においてハプログループ F の頻度はコントロール群と比較して有意に高いことが明らかとなった。HVS-I の塩基配列を元にしたハプログループの分類は、簡便で迅速な方法ではあるが、関連性の認められたハプログループが有する機能的に重要な多型までを明らかにすることはできない。先行研究により、日本人のハプログループを規定する遺伝子コード領域の多型は示されているが(36)、研究課題1において、HVS-I の解析によりそれぞれのハプログループに分類された人々が、実際にそれらの多型を有しているかは確かではない。そこで本研究課題では、日本人トップアスリートの mtDNA 全塩基配列の決定を行うことにより、競技能力と関連していたハプログループが有する、機能的に重要な多型を明らかにすることを第一の目的とした。

また、日本人は 12 の主要なミトコンドリアハプログループ、すなわち F, B, A, N9a, N9b, M7a, M7b, M\*, G2, G1, D5, または D4 に分類されるが、それらのミトコンドリアハプログループを更に詳細に解析すると、約 110 のサブハプログループまで分類することができる(36)(資料 2 - 1 ~ 3)。先行研究において、ハプログループ D4 をさらに細分化したサブハプログループのうち、サブハプログループ D4a が

長寿と関連することが報告されている(9)。研究課題1の結果からも明らかなように(図2),日本人の多くはハプログループD4に分類される。このハプログループD4をさらに細分化して詳細に解析するためにも,mtDNA全塩基配列の決定が必要である。したがって,本研究課題の第2の目的は,日本人トップアスリートのmtDNA全塩基配列の決定を行うことにより,競技者群96名をサブハプログループにまで分類し,競技能力との関連性を検討することであった。

## II. 対象および方法

### 1. 対象

研究課題1の競技者群141名から無作為に選出した96名(男性:77名,女性:19名)を対象とした。競技特性により分類すると一流持久系競技者(EA)群が52名,一流瞬発系・パワー系競技者(SPA)群が44名であった。コントロール(CON)群として,mtDNA全塩基配列が明らかとなっているヒトミトコンドリアゲノム多型データベース(<http://mtsnp.tmig.or.jp/mtsnp/index.shtml>)上の日本人672名(男性:385名,女性:285名)のデータを用いた。

本研究は東京都健康長寿医療センター研究所および国立スポーツ科学センターの倫理審査委員会の承認を得て,被験者にはあらかじめ実験の目的と内容を説明し,文書により同意を得て諸検査を実施した。

### 2. 方法

#### i. DNAの抽出

QIAamp DNA Blood Maxi Kit (QIAGEN社製)を使用し,競技者群の静脈血より総DNAを抽出した。

## ii. DNA の増幅

### **First PCR**

16569 bp の mtDNA を、それぞれが約 3000 bp となるように A から F の計 6 本の DNA 断片として増幅した。増幅に用いたプライマーのセット(L プライマー, H プライマー)を表 3-1 に示した。PCR 法による DNA の増幅は、20 ng の総 DNA, 0.5 unit の *Takara Ex Taq<sup>TM</sup> HS*(タカラバイオ株式会社製), 2  $\mu$ l の 10 $\times$  Ex Taq Buffer, 0.4 mM の各 dNTP, そしてそれぞれのプライマーを 1  $\mu$ M ずつを含む合計 20  $\mu$ l の反応液で行った。PCR の条件は、94 $^{\circ}$ C における熱変性を 5 分間、その後、熱変性 (94 $^{\circ}$ C -15 秒), アニーリング (52-62 $^{\circ}$ C -15 秒), 伸長反応 (72 $^{\circ}$ C -3 分間) の 3 ステップを 40 サイクルとし、最後に伸長反応を 72 $^{\circ}$ C で 10 分間行った。プライマーダイマーなどの除去のために、増幅した PCR 産物を MultiScreen-PCR プレート (Millipore 社製) を用いて精製した。その後、1% のアガロースゲルを用いて PCR 産物の電気泳動を行い、エチジウムブロマイドで染色した後、UV 照射によって DNA の有無や質、濃度を確認した。

### **Second PCR**

1<sup>st</sup> PCR で増幅した PCR 産物を、互いにオーバーラップする 1 から 60 の計 60 本の DNA 断片 (600 ~ 1000 bp) として増幅した。増幅に用いたプライマーのセットを表 3-2, 3 に示した。PCR 法による増幅は、20 ng の 1<sup>st</sup> PCR 産物, 0.25 unit の *Takara Ex Taq<sup>TM</sup> HS*(タカラバイオ株式会社製), 1  $\mu$ l の 10 $\times$  Ex Taq Buffer, 0.2 mM の各 dNTP, そしてそれぞれのプライマーを 0.5  $\mu$ M ずつを含む合計 10  $\mu$ l の反応液で行われた。PCR の条件は、94 $^{\circ}$ C における熱変性を 5 分間、その後熱変性 (94 $^{\circ}$ C -15 秒), アニーリング (60 $^{\circ}$ C -15 秒), 伸長反応 (72 $^{\circ}$ C -1 分間) の 3 ステップを 40 サイクルとし、最後に伸長反応を 72 $^{\circ}$ C で 10 分間行った。1<sup>st</sup> PCR 後と同様に増幅した PCR 産物の精製および質の確認を行った。

### iii. DNA 塩基配列の解析と多型の同定

シーケンス反応には, BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit version 3.1 (Applied Biosystem 社製)を用いた。シーケンス反応は, 3~10 ng の PCR 産物, 0.5  $\mu$ l の BigDye Terminator Ready Reaction Mix v3.1, 1  $\mu$ l の -21M13 プライマー (3.2 pmol/ $\mu$ l), 1.75  $\mu$ l の 5 $\times$  Sequencing Buffer を含む合計 10  $\mu$ l の反応液で行われた。PCR の条件は, 96 $^{\circ}$ C における熱変性を 10 分間とし, その後, 熱変性 (96 $^{\circ}$ C -10 秒), アニール (50 $^{\circ}$ C -5 秒), 伸長反応 (60 $^{\circ}$ C -4 分間) の 3 ステップを 25 サイクル行った。シーケンス反応後, 過剰な Dye Terminator を除去するためエタノール沈殿を行い, 真空乾燥機で乾燥させた後, ホルムアミドに溶解した。溶解した DNA サンプルを変性のために 95 $^{\circ}$ C で 2 分間熱し, すぐに氷上で冷却した。塩基配列の決定は, 自動シーケンサー Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystem 社製) を用いて行った。得られたすべての mtDNA 断片の塩基配列は, オリジナル(3)および改訂版(6)のケンブリッジ参照配列と比較し, DNA Sequencing Software Sequencher<sup>TM</sup> version 4.2.2 (Gene Codes Corporation 社製)を用いて, 視覚的に多型を確認した。それぞれの多型は, オーバーラップする 2 本以上の異なる断片で確認された。

### iv. ハプログループ(サブハプログループ)の分類

ミトコンドリアゲノム全塩基配列の決定により得られた, mtDNA 全塩基配列上の多型の組み合わせにより, 競技者群 96 名をそれぞれ日本人に主要な 12 のハプログループおよび, ハプログループをさらに細分化したサブハプログループへ分類した(36)(資料 2 - 1~3)。

## v. 統計解析

統計学的処理は JMP version 8 (SAS Institute Japan)にて  $\chi^2$  検定を用い、危険率 5%未満を有意とした。

## III. 結果

### 1. 異なる分類法によるハプログループ分類結果の比較

研究課題1では、mtDNA の HVS-I およびいくつかのタンパクコード領域の多型の有無によってハプログループへの分類を行った。この簡便な分類法によるハプログループの分類結果の信頼性を確認するため、研究課題1の分類結果と、本研究課題の mtDNA 全塩基配列上の多型によるハプログループ分類結果を比較した(表 3-4)。その結果、96 検体中 94 検体において、両分類法により分類されたハプログループは一致し、分類結果の一致率は 98%であった。以上の結果から、研究課題1におけるハプログループの分類結果は比較的信頼性が高いと考えられる。したがって、研究課題1の結果をもとに、競技能力と関連性していたハプログループが有する機能的な多型を検討することとした。

### 2. ハプログループを規定する機能的な多型の検討結果

#### i. 持久系運動能力と関連するハプログループ G1 を規定する多型

ハプログループ G1 の系統樹を資料 3 - 1 に示した。研究課題1において、ハプログループ G1 は、一流持久系競技者群で高頻度であった。ハプログループ G1 の有する機能的な多型を明らかにするため、ハプログループ G1 を規定する 4 つの多型 (m.7867C>T, m.8200T>C, m.15323G>A, m.15497G>A)を、研究課題1においてハプログループ G1 に分類された競技者が実際に保有しているか否かを検討した(表 3 - 5)。その結果、ハプログループ G1 に分類される人は全員が必ずこれら 4 つの多型を保有しており、ハプログループ G1 以外に分類される競技

者でこれらの多型を保有しているものは一人もいなかった。これらの多型は全て EA 群で頻度が高い傾向があったが有意ではなかった(表 3 - 6)。

## ii. 瞬発系競技能力と関連するハプログループ F を規定する多型

ハプログループ F の系統樹を資料 3 - 2 に示した。研究課題 1 において、ハプログループ F は瞬発系・パワー系競技者において高い頻度で検出された。ハプログループ F の有する機能的な多型を明らかにするため、ハプログループ F を規定する 6 つの多型 ( m.248delA , m.3970C>T , m.6392T>C , m.10310G>A , m.13928G>C , m.16304T>C ) を、研究課題 1 において、ハプログループ F に分類された競技者が、実際に保有しているか否かを検討した(表 3-7)。その結果、ハプログループ F に分類された人は、全員が必ずこれらの多型を保有していた。さらに、 m.3970C>T , m.6392T>C , m.10310G>A , m.13928G>C , m.16304T>C は、ハプログループ F 以外に分類される競技者は一人も保有していなかった。また、これら 6 つの多型はすべて SPA 群において CON 群と比較し、有意に頻度が高かった(表 3-8)。

## 3. サブハプログループの分類結果

### i. ハプログループ D4 のサブハプログループ

ハプログループ D4 をさらに細分化したサブハプログループへ分類し、EA 群と CON 群および SPA 群と CON 群の間でサブハプログループの頻度比較を行った(表 3 - 9, 図 3 - 1)。その結果、EA 群は CON 群と比較し、サブハプログループ D4e の頻度が有意に高いことが明らかとなった(オッズ比 : 2.61 [95%信頼区間 : 1.04 - 6.56],  $P=0.035$ )。

## ii. ハプログループ G1 のサブハプログループ

持久系競技者において頻度が高かったハプログループ G1 はサブハプログループ G1a と G1b に分類することができる(資料 3 - 1)。CON 群と比較し、競技者群においてこれらのサブハプログループに頻度の偏りがないかを検討するため、EA 群と CON 群、および SPA 群と CON 群の間で、サブハプログループの頻度比較を行った。その結果、EA 群におけるこれらのサブハプログループの頻度は G1a が 5.7%、G1b が 1.9%、SPA 群におけるサブハプログループの頻度は G1a が 2.3%、G1b が 0%であり、CON 群の頻度 (G1a:3.3%、G1b:0.5%)と比較して有意な差は認められなかった。

## iii. ハプログループ F のサブハプログループ

瞬発系・パワー系競技者群で頻度が高かったハブルグループ F は、F1a1、F1b1a、F1b2、F1b3、F1c、F2a、F3、F4a、F4b という 9 つのサブハプログループに分類される(資料 3 - 2)。CON 群と比較し競技者群において、これらのサブハプログループの中で、特定のサブハプログループに頻度の偏りがないかを検討するため、EA 群と CON 群、および SPA 群と CON 群の間でそれぞれ頻度比較を行った(表 3 - 10)。その結果、SPA 群におけるサブハプログループ F1b1a の頻度 (9.1%)が CON 群 (2.8%)と比較して有意に高かった(オッズ比:3.44 [95%信頼区間:1.12-10.58],  $P=0.022$ )。

瞬発系・パワー系競技者群で頻度が高かったサブハプログループ F1b1a の有する機能的な多型を明らかにするため、サブハプログループ F1b1a を規定する 5 つの多型 (m.4732A>G、m.10976C>T、m.12633C>T、m.14476G>A、m.16232C>A)をサブハプログループ F1b1a に分類された競技者が実際に保有しているかどうか検討した(表 3 - 11)。その結果サブハプログループ F1b1a に分類された人は全員が必ずこれらの多型を保有しており、サブハプログループ

F1b1a 以外でこれらの多型を保有している人はいなかった。よってこれらの多型はサブハプログループ F1b1a に特異的な多型であることが明らかとなった。これらの 5 つの多型はすべて SPA 群において CON 群と比較し、有意に頻度が高かった(表 3 - 12)。

#### 4. 研究課題 1 で分類できなかった検体について

研究課題 1 において分類できなかった 2 検体のうち 1 検体は、全塩基配列の決定により得られたタンパクコード領域の多型から、ハプログループ F に分類されることが明らかとなった。この検体は HVS-I 領域にあるハプログループ F を規定する 16304T>C 多型を持っていなかったことから、HVS-I の解析からは分類することができなかったことが明らかとなった。残りの 1 検体は、研究課題 2 で解析を行った 96 名に含まれていなかった。

## IV. 考察

### ハプログループの分類法

研究課題 1 で行った HVS-I およびいくつかのタンパクコード領域の多型をもとにした簡便なハプログループの分類と、本研究課題で行った mtDNA 全塩基配列上の多型を元にしたより正確なハプログループの分類結果を比較すると、結果の一致率は 98%であった(表 3 - 4)。HVS-I の多型を元にした分類法は迅速により安価で行うことができるため、大規模な疫学研究等に用いる場合には有用であると考えられる。しかしながら、本研究のように比較的小集団で検討を行う場合には、より正確な mtDNA 全塩基配列の多型を元にした分類法が必要である。

### ハプログループ G1

研究課題 1 において持久系競技能力に関連していたハプログループ G1 は、4

つの多型, すなわち m.7867C>T, m.8200T>C, m.15323G>A, m.15497G>A によって規定されることが知られている(36). 本研究においても, これらの多型がハプログループ G1 に特異的な多型であることが確認された. 本研究課題では 96 名のみで解析を行ったため, 統計パワーが不足し有意差は得られなかったが, これらの多型はすべて EA 群で CON 群と比較し頻度が高い傾向があった. これらはすべてタンパクコード領域の多型であり, このうち m.15323G>A および m.15497G>A は電子伝達系の複合体 III のタンパク質であるシトクロム *b* にアミノ酸置換を引き起こす. m.15323G>A 多型は, シトクロム *b* の 193 番目のアミノ酸をアラニンからスレオニンへと置換する. アラニンとスレオニンのアミノ酸残基の間に生じる物理化学的な相違 (Grantham 値) は 58 と比較的高いことから, 影響の大きなアミノ酸置換である可能性がある. このアミノ酸置換はシトクロム *b* のタンパク二次構造において膜貫通領域に位置していた (図 3 - 2). m.15323G>A 多型は, 膜貫通領域において疎水性のアミノ酸であるアラニンから親水性のアミノ酸スレオニンへと置換することにより膜の安定性等に影響を及ぼしている可能性がある.

一方 m.15497G>A 多型は, シトクロム *b* の 251 番目のアミノ酸をグリシンからセリンへと置換する. グリシンとセリンの Grantham 値も 56 と比較的高かった. また, 251 番目のグリシンは哺乳類で良く保存されているアミノ酸であり, 機能的に重要なアミノ酸である可能性が考えられる. 複合体 III は還元型ユビキノンからシトクロム *c* に電子を移す働きをしているが, 251 番目のグリシンはシトクロム *b* のユビキノン結合部位に位置しており(38), グリシンからセリンへと置換することで, ユビキノンへの親和性が変化する可能性がある.

先行研究により, ミトコンドリアミオパチーや運動不耐能を示す患者において, シトクロム *b* の 251 番目のアミノ酸をグリシンからアスパラギン酸へと置換する m.15498G>A 変異 (Gly251Asp) が報告されている(4). また, 興味深いことに,

m.15497G>A 多型 (Gly251Ser) は, 中高年者において肥満と関連することが報告されている(29). これらの報告は Gly251Ser のアミノ酸置換が, シトクロム *b* の機能的変化を伴っていることを示唆している. Okura ら(29)は, 肥満に関わる表現型と m.15498G>A 多型との関連性を説明する 2 つの仮説を立てている. 一つめは, 複合体 III でのエネルギー節約効率の増加が結果としてエネルギー消費を減少させたというもの. そして二つめは, ユビキノン結合部位におけるユビキノンの還元を抑制することにより, 脂肪酸の  $\beta$  酸化が減少し, 脂肪の蓄積が促されたという仮説である. 本研究では, m.15497G>A 多型によって規定されるハプログループ G1 が, 一流持久系競技者と関連していた. したがって, m.15497G>A 多型は, ATP 産生効率が高まることで, エネルギー節約効率が増加する遺伝子型であるという仮説を支持する結果であった.

また, ハプログループ G1 はサブハプログループ G1a と G1b に分類することができるが, コントロール群と比較して, これらのサブハプログループに頻度の偏りは認められなかった. したがって, ハプログループ G1 と持久系競技能力の関連性における責任候補遺伝子多型はハプログループ G1 を規定する多型であると考えられる. 今後, ハプログループ G1 を規定する m.15323G>A および m.15497G>A 多型が, ミトコンドリアの機能に実際にどのような影響を及ぼしているのか明らかにするため, サイブリッド細胞等を用いて多型の機能解析を行う必要がある.

## ハプログループ F

研究課題 1 において, 瞬発系・パワー系競技能力に関連していたハプログループ F は 6 つの多型, すなわち m.248delA, m.3970C>T, m.6392T>C, m.10310G>A, m.13928G>C, m.16304T>C によって規定されることが知られている(36). 本研究において m.3970C>T, m.6392T>C, m.10310G>A, m.13928G>C, m.16304T>C はハプログループ F に特異的な多型であり, これら

の多型はすべて、SPA 群において CON 群と比較し有意に頻度が高いことが明らかとなった。このうち、m.3970C>T, m.6392T>C, m.10310G>A, m.13928G>C はタンパクコード領域の多型であり、特に m.13928G>C は電子伝達系複合体 I の NADH 脱水素酵素複合体サブユニット 5 (ND5) において、531 番目のアミノ酸をセリンからスレオニンへ置換する非同義置換である。このアミノ酸置換は ND5 のタンパク二次構造において、膜貫通領域に位置していた(図 3 - 3)。セリンとスレオニンのアミノ酸残基の間に生じる物理化学的な相違は 58 と比較的高いので、m.13928G>C 多型は複合体 I の機能に何らかの影響を及ぼすと推定される。複合体 I は NADH 脱水素酵素複合体であり、解糖系および TCA 回路より得られた NADH の電子をユビキノンに渡し、4 つのプロトンを膜間腔に放出することによって内膜にプロトン勾配を生じさせる。プロトン勾配はミトコンドリアによる  $Ca^{2+}$  の取り込みの原動力であるので、m.13928G>C 多型がミトコンドリア内膜のプロトン勾配や細胞内のカルシウム動態等に影響を及ぼしている可能性がある。細胞内の  $Ca^{2+}$  は筋収縮やグリコーゲンの分解調節において重要な役割を果たしていることから、m.13928G>C 多型は細胞内の  $Ca^{2+}$  濃度の調節を通して、瞬発系・パワー系パフォーマンスに影響を及ぼしている可能性が考えられる。

また、本研究では、SPA 群において、ハプログループ F をさらに細分化したサブハプログループのうち、サブハプログループ F1b1a の頻度が有意に高いことが明らかとなった。このことは、瞬発系・パワー系競技者とハプログループ F との関連性がサブハプログループ F1b1a に起因する可能性を示唆している。サブハプログループ F1b1a は 5 つの多型、すなわち m.4732A>G, m.10976C>T, m.12633C>T, m.14476G>A, m.16232C>A によって規定されている。m.4732A>G, m.10976C>T, m.12633C>T, m.14476G>A はタンパクコード領域の多型であり、この中で m.4732A>G 多型は、電子伝達系複合体 I の NADH 脱水素酵素複合体サブユニット 2 (ND2) において、88 番目のアミノ酸をアスパラ

ギンからセリンへ置換する非同義置換である。したがって、m.4732A>G 多型が瞬発系・パワー系パフォーマンスに影響を及ぼしている可能性もあり、今後競技者群の数を増やしてさらに検討していく必要がある。

## ハプログループ D4

日本人はハプログループ D4 の頻度が高く、本研究のコントロール群は 34.7%、競技者群は 31.7% がハプログループ D4 に属していた。ハプログループ D4 はさらに 14 のサブハプログループ (D4a, D4b, D4c, D4d, D4e, D4f, D4g, D4h, D4i, D4j, D4k, D4l, D4m, D4n) に分類することができる (資料 2 - 3)。本研究では EA 群におけるサブハプログループ D4e の頻度 (11.5%) が CON 群の頻度 (5.8%) と比較して有意に高いことが明らかとなった。サブハプログループ D4e はさらに D4e1 と D4e2 に分類される。CON 群におけるこれらのサブハプログループの頻度は 1.2% と 3.4% であるが、本研究の EA 群で D4e に分類された個体は全員が D4e2 に属しており、EA 群におけるサブハプログループ D4e2 の頻度は 11.5% であった。このサブハプログループは m.15874A>G 多型によって規定されることが知られている (36)。本研究においても、サブハプログループ D4e2 に分類された個体は全員が m.15874A>G 多型を持っており、他のハプログループでは見つからなかったことから、この多型はサブハプログループ D4e2 に特異的な多型であることが明らかとなった。しかしながら、m.15874A>G 多型は同義置換であり、この多型の機能的意義は不明である。そこで、サブハプログループ D4e2 と一流持久系競技者との関連性を説明する二つの仮説を立てた。一つめは Tanaka ら (38) が提案している中庸仮説で、アミノ酸置換が少ない mtDNA を有することがその固体に有利に働くという仮説である。二つめは Bilal ら (9) や Alexe ら (1) が提案しているヒッチハイク仮説であり、特定のハプログループを有していた祖先集団において生じた核ゲノム多型が存在するという仮説である。本研究課題は 96 名の

みの解析であったため、今後競技者群を増やして検討する必要があると共に、これらの仮説についても検討してゆく必要がある。

表 3 - 1. プライマー塩基配列 (1<sup>st</sup> PCR)

フラグメント	フォワードプライマー		リバースプライマー		長さ (bp)
	名前	配列 (5' to 3')	名前	配列 (5' to 3')	
A	L77	ACGCGATAGCATTGCGAGAC	H3538	AGAAGAGCGATGGTGAGAGC	3481
B	L2815	GGGCGACCTCGGAGCAGAAC	H6158	TATCGGGGGCACCATTATT	3358
C	L5545	ACAGCTAAGGACTGCAAAAC	H9133	ATTAAGGCGACAGCGATTTC	3571
D	L8281	CCCCCTCTAGAGCCCACTGT	H11571	TAGGCAGATGGAGCTTGTTA	3310
E	L10796	CCACTGACATGACTTTCCAA	H14378	TTAGTGGGGTTAGCGATGGA	3062
F	L13901	TCTCCAACATACTCGGATTC	H609	GCCCGTCTAAACATTTTCAG	3297

表 3 - 2 . FL プライマー塩基配列 (2<sup>nd</sup> PCR)

フラグメント	名前	配列 (5'-3')
1	FL100	TGAAAAACGACGGCCAGTGGAGCCGGAGCACCCCTATGT
2	FL398	TGAAAAACGACGGCCAGTTTTTATCTTTTGGCGGTATG
3	FL700	TGAAAAACGACGGCCAGTAGCATCCCCGTTCCAGTGAG
4	FL995	TGAAAAACGACGGCCAGTAAACTCCAGTTGACACAAA
5	FL1254	TGAAAAACGACGGCCAGTCTATATACCGCCATCTTCAG
6	FL1485	TGAAAAACGACGGCCAGTGCCCGTCACCCCTCCTCAAGT
7	FL1779	TGAAAAACGACGGCCAGTATAGTACCGCAAGGGAAAGA
8	FL2045	TGAAAAACGACGGCCAGTACTTTAAATTTGCCACAGA
9	FL2332	TGAAAAACGACGGCCAGTCGCATAAGCCTGCGTCAGAT
10	FL2616	TGAAAAACGACGGCCAGTAATAGGGACCTGTATGAATG
11	FL2864	TGAAAAACGACGGCCAGTTCACCAGTCAAAGCGAACTA
12	FL3119	TGAAAAACGACGGCCAGTCCCTGTACGAAAGGACAAGA
13	FL3455	TGAAAAACGACGGCCAGTCTGACGCCATAAACTCTTC
14	FL3712	TGAAAAACGACGGCCAGTGTAGCCCAAACAATCTCATA
15	FL4008	TGAAAAACGACGGCCAGTAAACACCCCTCACCACACAA
16	FL4250	TGAAAAACGACGGCCAGTCCCCTCAAACCTAAGAAATA
17	FL4529	TGAAAAACGACGGCCAGTAGCGCTAAGCTCGCACTGAT
18	FL4827	TGAAAAACGACGGCCAGTCAAGGCACCCCTCTGACATC
19	FL5110	TGAAAAACGACGGCCAGTCCGCATTCTACTACTCAAC
20	FL5362	TGAAAAACGACGGCCAGTACTCCACCTCAATCACACTA
21	FL5602	TGAAAAACGACGGCCAGTCCCCTCTGCATCAACTGAA
22	FL5890	TGAAAAACGACGGCCAGTCCCTCACCCCACTGATGTT
23	FL6186	TGAAAAACGACGGCCAGTCCCGCATAAAACAATAAG
24	FL6452	TGAAAAACGACGGCCAGTCTTCGTCTGATCCCGTCTAA
25	FL6716	TGAAAAACGACGGCCAGTAGGTATGGTCTGAGCTATGA
26	FL6957	TGAAAAACGACGGCCAGTGGCCTGACTGGCATTGTATT
27	FL7245	TGAAAAACGACGGCCAGTACCACATGAAACATCCTATC
28	FL7497	TGAAAAACGACGGCCAGTGGCCTCCATGACTTTTTCAA
29	FL7762	TGAAAAACGACGGCCAGTGGAATAGAAACCGTCTGAA
30	FL8053	TGAAAAACGACGGCCAGTACAAGACGCTTTGCATCAT
31	FL8345	TGAAAAACGACGGCCAGTCCAACACCTCTTTACAGTGA
32	FL8635	TGAAAAACGACGGCCAGTCTCATCAACAACCGACTAAT
33	FL8913	TGAAAAACGACGGCCAGTACCACAAGGCACACCTACAC
34	FL9213	TGAAAAACGACGGCCAGTCAACCAATCACATGCCTATCA
35	FL9484	TGAAAAACGACGGCCAGTCTTCGCAGGATTTTTCTGA
36	FL9747	TGAAAAACGACGGCCAGTACTTTCGAGTCTCCCTTCAC
37	FL10028	TGAAAAACGACGGCCAGTAACTAGTTTTGACAACATTC
38	FL10297	TGAAAAACGACGGCCAGTAAACAATAACCTGCCACTA
39	FL10616	TGAAAAACGACGGCCAGTCAACACCCACTCCCTCTTAG
40	FL10910	TGAAAAACGACGGCCAGTAGCTGTTCCCAACCTTTTC
41	FL11183	TGAAAAACGACGGCCAGTGCCTGAACGCAGGCACATA
42	FL11467	TGAAAAACGACGGCCAGTAAACTAGGCGGTATGGTA
43	FL11766	TGAAAAACGACGGCCAGTGCCTCACAGTCGCATCATA
44	FL12057	TGAAAAACGACGGCCAGTAAACACCCCTCATGTTTATA
45	FL12357	TGAAAAACGACGGCCAGTAAACACCCCTAACCCCTGACTT
46	FL12600	TGAAAAACGACGGCCAGTATTCATCCCTGTAGCATTGT
47	FL12889	TGAAAAACGACGGCCAGTGCCTTAGCATGATTTATCCT
48	FL13188	TGAAAAACGACGGCCAGTCACTCTGTTTCGCAGCAGTCT
49	FL13479	TGAAAAACGACGGCCAGTAGGAATACCTTTTCTCACAG
50	FL13721	TGAAAAACGACGGCCAGTATTCGCAGGATTTCTCATT
51	FL13986	TGAAAAACGACGGCCAGTACTCCTCCTAGACCTAACCT
52	FL14279	TGAAAAACGACGGCCAGTGACCCCTCTCCTTCATAAAT
53	FL14559	TGAAAAACGACGGCCAGTGCACACACCGCTAACACTC
54	FL14837	TGAAAAACGACGGCCAGTTGAAACTTCGGCTCACTCCT
55	FL15126	TGAAAAACGACGGCCAGTCCCTCATAGGCTATGTCCTC
56	FL15405	TGAAAAACGACGGCCAGTTCACCCCTTACTACACAATC
57	FL15696	TGAAAAACGACGGCCAGTTTCGCCCACTAAGCCAATCA
58	FL15948	TGAAAAACGACGGCCAGTAGGACAAATCAGAGAAAAAG
59	FL16221	TGAAAAACGACGGCCAGTCCCTCAACTATCACACATCA
60	FL16504	TGAAAAACGACGGCCAGTGTTCCTACTTCAGGGTCATA

表 3 - 3 . H プライマー塩基配列 (2<sup>nd</sup> PCR)

フラグメント	名前	配列 (5'-3')
1	H1014	AGCCACTTTCGTAGTCTATT
2	H1591	TACTACTCTGGTTCGTCCAAG
3	H1696	GGTTGTCTGGTAGTAAGGTG
4	H1828	AGGTATAGGGGTTAGTCCTT
5	H2060	GGGGATTTAGAGGGTTCTGT
6	H2385	ACTTGTTGGTTGATTGTAGA
7	H2669	GGCAGGTCAATTTCACTGGT
8	H3082	TAGAAACCGACCTGGATTAC
9	H3370	AGAATTTTTCGTTCGGTAAG
10	H3538	AGAAGAGCGATGGTGAGAGC
11	H3538	AGAAGAGCGATGGTGAGAGC
12	H3876	GGGTTTCGGTTGGTCTTGCT
13	H4222	GAGATTGTAATGGGTATGGA
14	H4552	TTCTAGGCCTACTCAGGTAA
15	H4854	TTTTGTCATGTGAGAAGAAG
16	H5528	TTGAAGGCTCTTGGTCTGTA
17	H5528	TTGAAGGCTCTTGGTCTGTA
18	H5759	TCAAACCTGCCGGGGCTTCT
19	H6009	CCCAGCTCGGCTCGAATAAG
20	H6158	TATCGGGGGCACCGATTATT
21	H6454	GATTAGGACGGATCAGACGA
22	H6757	ATGGTGTGCTCACACGATAA
23	H7005	ACAACGTAGTACGTGTCGTG
24	H7613	ATAGGGGAAGTAGCGTCTTG
25	H7613	ATAGGGGAAGTAGCGTCTTG
26	H7758	GACGGTTTCTATTTCTGAG
27	H8144	TAGTATACCCCGGTCGTGT
28	H8395	GTATGGGGGTAATTATGGTG
29	H9133	ATTAAGGCGACAGCGATTTT
30	H9133	ATTAAGGCGACAGCGATTTT
31	H9235	TCATGGGCTGGGTTTTACTA
32	H9483	CAGAAAAATCCTGCGAAGAA
33	H10137	TTTTCTATGTAGCCGTTGAG
34	H10137	TTTTCTATGTAGCCGTTGAG
35	H10629	GGCACAATATTGGCTAAGAG
36	H10629	GGCACAATATTGGCTAAGAG
37	H10913	GAGGAAAAGGTTGGGGAACA
38	H11179	TGCCTGCGTTCAGGCGTTCT
39	H11519	GGGTAGGCTATGTGTTTTGT
40	H11571	TAGGCAGATGGAGCTTGTTA
41	H12000	GGTGAGTGAGCCCCATTGTG
42	H12451	ATAAAGGTGGATGCGACAAT
43	H12451	ATAAAGGTGGATGCGACAAT
44	H12818	TGCTGTGTTGGCATCTGCTC
45	H13492	TTGGAGTAGAAACCTGTGAG
46	H13492	TTGGAGTAGAAACCTGTGAG
47	H13767	GGGGGATTGTTGTTTGAAG
48	H14102	GAGTGGGAAGAAGAAAGAGA
49	H14321	GTGGTGGTTGTGGTAAACTT
50	H14378	TTAGTGGGGTTAGCGATGGA
51	H14754	GGGGTTAATTTGCGTATTG
52	H15162	TACTGTGGCCCTCAGAATG
53	H15340	ATCCCGTTTCGTGCAAGAAT
54	H15755	ACTGGTTGCTCCGATTCA
55	H16016	CCCATGAAAGAACAGAGAAT
56	H81	CAGCGTCTCGCAATGCTATC
57	H81	CAGCGTCTCGCAATGCTATC
58	H81	CAGCGTCTCGCAATGCTATC
59	H342	TTTTTGGGGTTTGGCAGAGA
60	H581	TTTGAGGAGGTAAGCTACAT

表 3 - 4 . 分類法の違いによるハプログループ分類結果の比較

ID	ハプログループ分類法	
	HVR-Iおよびいくつかの タンパクコード領域の多型 (研究課題1)	全塩基配列の多型 (本研究課題)
J10001	G1	G1a
J10002	A	A1a
J10003	D4	D4b2b
J10004	D4	D4b2b
J10005	D4	D4e2
J10006	D4	D4a
J10007	D5	D5a1
J10008	F	F1b1a
J10009	D4	D4b1a
J10010	other	Z2
J10011	M7b	M7b2
J10012	D4	D4g
J10013	D4	D4g
J10014	M7b	M7b2
J10015	A	A1a
J10016	N9a	N9a2a1
J10017	M*	M8a2
J10018	B	B4b1a1
J10019	G1	G1b
J10020	M*	M9a1
J10021	A	A3
J10022	B	B5b3
J10023	B	B5b2
J10024	D4	D4b1b
J10025	F	F4a
J10026	D4	D4k2
J10027	D4	D4a
J10028	M7a	M7a2
J10029	F	F1b1a
J10030	N9a	N9a2a1
J10031	D4	D4e2
J10032	M7b	M7b2
J10033	D4	D4d1b
J10034	B	B4f
J10035	N9a	N9a2a1
J10036	M7b	M7b2
J10037	F	F1b1a
J10038	G1	G1a
J10039	D5	D5a2a
J10040	D4	D4a
J10041	B	B4d
J10042	F	F1b1a
J10043	other	G3
J10044	D4	D4g
J10045	G2	G2a1
J10046	D4	D4e2
J10047	M7a	M7a1b
J10048	D4	D4a

表 3 - 4 . 続き

ハプログループ分類法		
ID	HVR-Iおよびいくつかの タンパクコード領域の多型 (研究課題1)	全塩基配列の多型 (本研究課題)
J10049	F	F2a
J10050	D4	D4b2b
J10051	G2	G2a1b
J10052	M*	M11
J10053	D4	D4e2
J10054	M*	M8a2a
J10055	M7b	M7b2
J10056	D4	D4e2
J10057	D4	D4b2b
J10058	A	A1a
J10059	F	F1b2
J10060	A	A2
J10061	B	B4b1a1
J10062	D4	D4a
J10063	B	B4b1a1
J10064	A	A1a
J10065	G1	G1a
J10066	D4	D4e2
J10067	F	F1a1
J10068	D4	D4d1a
J10069	D4	D4b2b
J10070	M7a	M7a1a
J10071	F	F1b1a
J10072	F	F1b1a
J10073	B	B4a
J10074	D4	D4b1b
J10075	D4	D4e2
J10076	A	A1a1a
J10077	G1	G1a
J10078	D4	D4g
J10079	分類不能	F3
J10080	other	Z4
J10081	D4	D4a
J10082	B	B5b2
J10083	M7b	M7b2
J10084	N9a	M7a1a
J10085	D4	D4l
J10086	B	B5b1a
J10087	D4	D4a
J10088	F	F1b
J10089	D4	D4b2a
J10090	M*	M10a
J10091	D4	D4a
J10092	D4	D4b2b
J10093	M7b	M7b2
J10094	D4	D4a
J10095	N9b	N9b1b
J10096	D5	D5a2

表 3 - 5. ハプログループ G1 を規定する多型の保有率

ID	ハプログループ	m.7867C>T	m.8200T>C	m.15323G>A	m.15497G>A
J10001	G1	+	+	+	+
J10019	G1	+	+	+	+
J10038	G1	+	+	+	+
J10065	G1	+	+	+	+
J10077	G1	+	+	+	+
備考					

+ : 多型を持っている, - : 多型を持っていない

表 3 - 6. ハプログループ G1 を規定する多型の頻度比較

塩基置換	遺伝子	アミノ酸置換	Grantham値	EA群		CON群		オッズ比 (95%信頼区間)	P値
				頻度	%	頻度	%		
m.7867C>T	CO2	-	-	4/52	7.69	25/672	3.72	2.2 (0.72-6.45)	0.159
m.8200T>C	CO2	-	-	4/52	7.69	25/672	3.72	2.2 (0.72-6.45)	0.159
m.15323G>A	Cytb	Ala193Thr	58	4/52	7.69	25/672	3.72	2.2 (0.72-6.45)	0.159
m.15497G>A	Cytb	Gly251Ser	56	4/52	7.69	25/672	3.72	2.2 (0.72-6.45)	0.159

EA: 持久系競技者, CON: コントロール, CO2: Cytochrome c oxidase subunit 2, Cyt b: Cytochrome b

Grantham 値: 置換前と置換後のアミノ酸残基の間に生じる物理化学的な相違を数値で示したもの. 平均値は 50.

表 3 - 7. ハプログループ F を規定する多型の保有率

ID	ハプログループ	m.248delA	m.3970C>T	m.6392T>C	m.10310G>A	m.13928G>C	m.16304T>C
J10008	F	+	+	+	+	+	+
J10025	F	+	+	+	+	+	+
J10029	F	+	+	+	+	+	+
J10037	F	+	+	+	+	+	+
J10042	F	+	+	+	+	+	+
J10049	F	+	+	+	+	+	+
J10059	F	+	+	+	+	+	+
J10067	F	+	+	+	+	+	+
J10071	F	+	+	+	+	+	+
J10072	F	+	+	+	+	+	+
J10088	F	+	+	+	+	+	+
備考		Z2, Z4					

+ : 多型を持っている, - : 多型を持っていない, del: 欠失

備考: ハプログループ F 以外で多型を保有していたハプログループ

表 3 - 8 . ハプログループ F を規定する多型の頻度比較

塩基置換	遺伝子	アミノ酸置換	Grantham値	SPA群		CON群		オッズ比 (95%信頼区間)	P値
				頻度	%	頻度	%		
m.248delA	MNCR1	-	-	8/44	18.2	50/672	7.4	2.76 (1.22-6.27)	0.011
m.3970C>T	ND1	-	-	7/44	15.9	40/672	6.0	2.99 (1.25-7.13)	0.010
m.6392T>C	CO1	-	-	7/44	15.9	41/672	6.1	2.91 (1.22-6.93)	0.012
m.10310G>A	ND3	-	-	7/44	15.9	50/672	7.4	2.35 (1.00-5.55)	0.044
m.13928G>C	ND5	Ser531Thr	58	7/44	15.9	42/672	6.3	2.84 (1.19-6.75)	0.014
m.16304T>C	MNCR2	-	-	7/44	15.9	42/672	6.3	2.84 (1.19-6.75)	0.014

SPA : 瞬発系・パワー系競技者 , MNCR : Major non-coding region , ND : NADH dehydrogenase subunit , CO : Cytochrome c oxidase subunit , del : 欠失 , Grantham 値 : 置換前と置換後のアミノ酸残基の間に生じる物理化学的な相違を数値で示したもの . 平均値は 50 .

表 3 - 9 . ハプログループ D4 のサブハプログループ頻度比較

サブハプログループ	CON群		EA群		SPA群	
	頻度	%	頻度	%	頻度	%
D4a	43/672	6.4	5/52	9.6	4/44	9.1
D4b	79/672	11.8	3/52	5.8	6/44	13.6
D4c	1/672	0.1	0/52	0.0	0/44	0.0
D4d	22/672	3.3	3/52	5.8	0/44	0.0
<b>D4e</b>	<b>32/672</b>	<b>4.8</b>	<b>6/52</b>	<b>11.5 *</b>	1/44	2.3
D4f	5/672	0.7	1/52	1.9	0/44	0.0
D4g	16/672	2.4	3/52	5.8	0/44	0.0
D4h	7/672	1.0	0/52	0.0	0/44	0.0
D4i	4/672	0.6	0/52	0.0	0/44	0.0
D4j	5/672	0.7	0/52	0.0	0/44	0.0
D4k	9/672	1.3	0/52	0.0	1/44	2.3
D4l	2/672	0.3	0/52	0.0	1/44	2.3
D4m	2/672	0.3	0/52	0.0	0/44	0.0
D4n	5/672	0.7	0/52	0.0	0/44	0.0

\* :  $P < 0.05$  vs CON 群

表 3 - 10 . ハプログループ F のサブハプログループ頻度比較

サブハプログループ	CON群		EA群		SPA群	
	頻度	%	頻度	%	頻度	%
F1a1	13/672	1.9	1/52	1.9	0/44	0.0
F1b1a	19/672	2.8	2/52	3.8	4/44	9.1*
F1b2	1/672	0.1	1/52	1.9	0/44	0.0
F2a	2/672	0.3	0/52	0.0	1/44	2.3
F3	0/672	0.0	1/52	1.9	0/44	0.0
F4a	2/672	0.3	0/52	0.0	1/44	2.3

\* :  $P < 0.05$  vs CON 群

表 3 - 11 . サブハプログループ F1b1a を規定する多型の保有率

ID	サブハプログループ	m.4732A>G	m.10976C>T	m.12633C>T	m.14476G>A	m.16232C>A
JI0008	F1b1a	+	+	+	+	+
JI0029	F1b1a	+	+	+	+	+
JI0037	F1b1a	+	+	+	+	+
JI0042	F1b1a	+	+	+	+	+
JI0071	F1b1a	+	+	+	+	+
JI0072	F1b1a	+	+	+	+	+
備考						

+ : 多型を持っている , - : 多型を持っていない

表 3 - 12 . サブハプログループ F1b1a を規定する遺伝子多型の頻度比較

塩基置換	遺伝子	アミノ酸置換	Grantham値	SPA群		CON群		オッズ比 (95%信頼区間)	P値
				頻度	%	頻度	%		
m.4732A>G	ND2	Asn88Ser	46	4/44	9.09	19/672	2.83	3.4 (1.12-10.58)	0.022
m.10976C>T	ND4	-	-	4/44	9.09	19/672	2.83	3.4 (1.12-10.58)	0.022
m.12633C>T	ND5	-	-	4/44	9.09	18/672	2.68	3.6 (1.17-11.24)	0.017
m.14476G>A	ND6	-	-	4/44	9.09	19/672	2.83	3.4 (1.12-10.58)	0.022
m.16232C>A	MNCR2	-	-	4/44	9.09	19/672	2.83	3.4 (1.12-10.58)	0.022

ND : NADH dehydrogenase subunit , MNCR : Major non-coding region , Grantham 値 : 置換前と置換後のアミノ酸残基の間に生じる物理化学的な相違を数値で示したもの . 平均値は 50 .

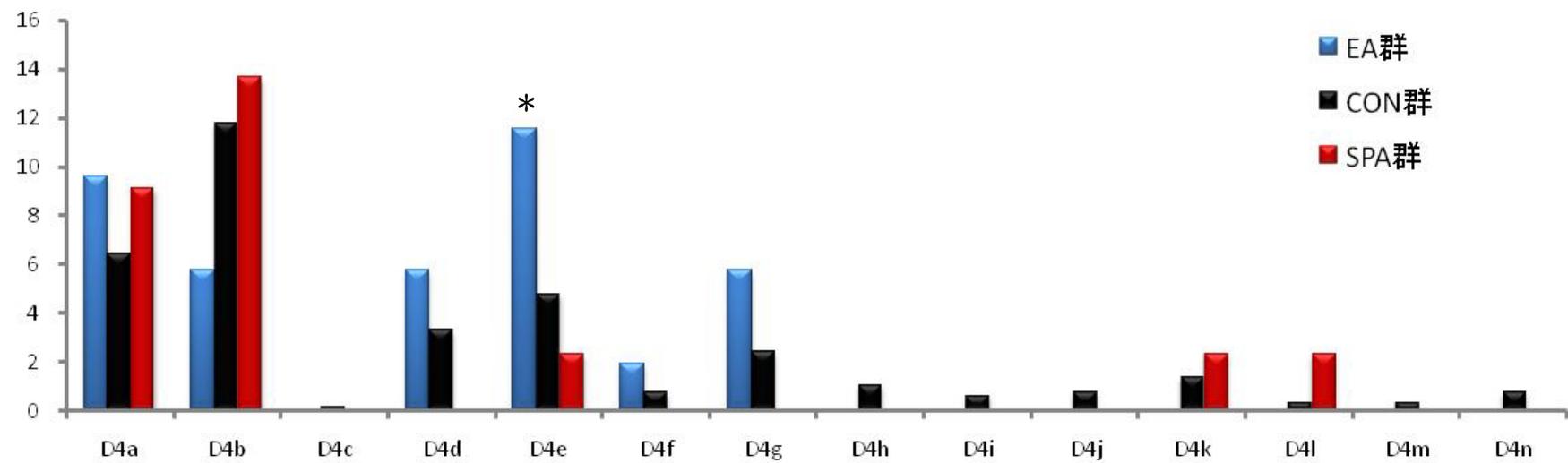


図 3 - 1. ハプログループ D4 のサブハプログループ分布比較

\*  $P < 0.05$  vs CON 群

**15323G>A**

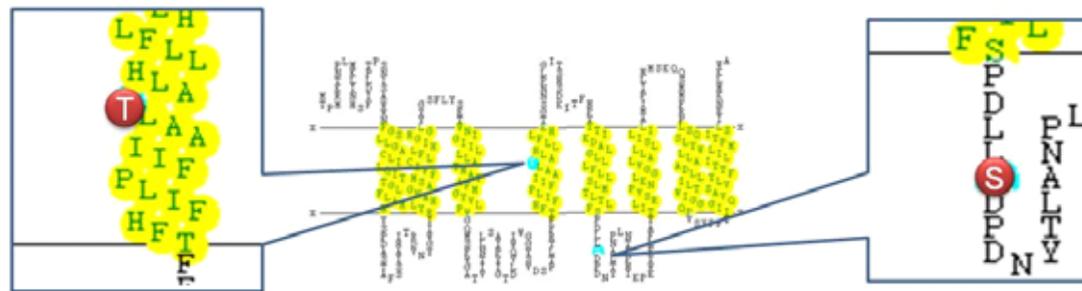
Cytb: Ala193**Thr**

Grantham値 = 58

**15497G>A**

Cytb: Gly251**Ser**

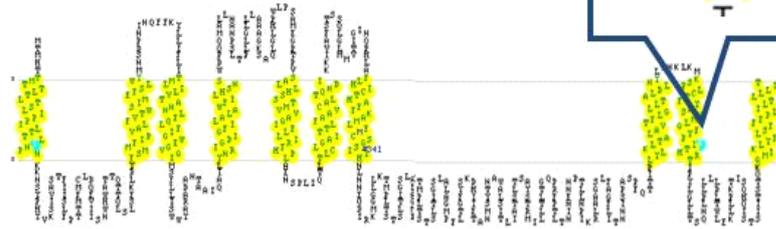
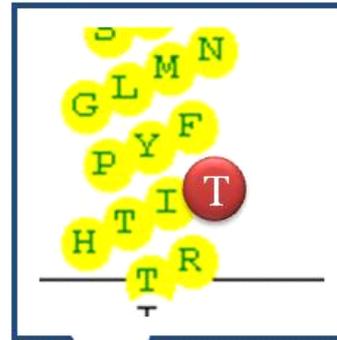
Grantham値 = 56



Cytochrome b のタンパク 2 次構造

図 3 - 2 . ハプログループ G1 に特異的なアミノ酸置換

**13928G>C**  
 ND5: Ser531**Thr**  
 Grantham値 = 58



NADH dehydrogenase subunit 5 のタンパク 2 次 構造

図 3 - 3 . ハプログループ F に特異的なアミノ酸置換

## 第5章 総括

本研究は、日本人トップアスリートの身体運動能力に対する mtDNA 多型の影響を明らかにすることを目的として、研究課題1では、日本人トップアスリートの競技能力に関連するミトコンドリアハプログループを検討した。研究課題1から得られた結果は以下の通りである。

- (1) 一流瞬発系・パワー系競技者群においてハプログループ F の頻度がコントロール群と比較し有意に高かった。
- (2) 一流持久系競技者群においてハプログループ G1 の頻度がコントロール群と比較し有意に高かった。

研究課題2では、日本人の一流競技者の競技能力と関連性が認められたハプログループが有する機能的な多型を明らかにすること、また、日本人に頻度の高いハプログループ D4 を詳細に検討することを目的として、mtDNA 全塩基配列の決定を行った。研究課題2より得られた結果は以下の通りである。

- (1) 日本人一流瞬発系・パワー系競技者と関連していたハプログループ F は、特異的で機能的に重要だと思われるアミノ酸置換を伴う多型 13928G>C (ND5: Ser531Thr) を有していた。
- (2) 日本人一流持久系競技者と関連していたハプログループ G1 は、特異的で機能的に重要だと思われるアミノ酸置換を伴う多型 15323G>A (Cytb: Ala193Thr) と 15497G>A (Cytb: 251Ser) を有していた。
- (3) 一流持久系競技者群においてサブハプログループ D4e の頻度がコントロール群と比較し有意に高かった。

本研究の結果をまとめると、日本人において、ミトコンドリアハプログループ F が有する 13928G>C 多型 (ND5: Ser531Thr) は瞬発系・パワー系競技能力に影響を及ぼしている可能性があり、ハプログループ G1 が有する 15323G>A 多型 (Cytb: Ala193Thr)、および 15497G>A 多型 (Cytb: Gly251Ser) は、持久系競技能力に影響を及ぼしている可能性が示された。今後は、これらの多型が、実際にミトコンドリアの機能にどのような影響を及ぼし、身体運動能力に寄与しているのか検討してゆく必要がある。また、本研究ではいくつかのサブハプログループと競技能力との関連性が認められたが、本研究の研究課題 2 は 96 名のみ の解析結果であり、十分なサンプル数であるとは言えない。したがって、今後サンプル数を増やし、サブハプログループと競技能力との関連性を検討してゆく必要がある。

本研究は、日本人トップアスリートを対象として遺伝子多型と競技能力との関連性を検討した最初の報告である。今後このような研究がすすみ、トップアスリートの身体運動能力を規定する遺伝子多型が明らかになれば、隠れた才能の発掘のみならず、競技能力に関連する遺伝子多型をターゲットとしたトレーニング方法の開発や、個人の遺伝的特性を考慮したオーダーメイドトレーニング実現のための基礎を築くことができる。また、トップアスリートの遺伝子解析を行うことで筋骨格系機能や循環器代謝系機能を規定する遺伝子が明らかになれば、一般の人々に対するサルコペニアやメタボリックシンドロームなどの予防を目的とした個別医療にも役立てられる可能性がある。

## 参考文献

1. Alexe G, Fuku N, Bilal E, Ueno H, Nishigaki Y, Fujita Y, Ito M, Arai Y, Hirose N, Bhanot G, and Tanaka M. Enrichment of longevity phenotype in mtDNA haplogroups D4b2b, D4a, and D5 in the Japanese population. *Hum Genet.* 2007;121(3-4):347-56.
2. Alvarez R, Terrados N, Ortolano R, Iglesias-Cubero G, Reguero JR, Batalla A, Cortina A, Fernandez-Garcia B, Rodriguez C, Braga S, Alvarez V, and Coto E. Genetic variation in the renin-angiotensin system and athletic performance. *Eur J Appl Physiol.* 2000;82(1-2):117-20.
3. Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJ, Staden R, and Young IG. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature.* 1981;290(5806):457-65.
4. Andreu AL, Checcarelli N, Iwata S, Shanske S, and DiMauro S. A missense mutation in the mitochondrial cytochrome b gene in a revisited case with histiocytoid cardiomyopathy. *Pediatr Res.* 2000;48(3):311-4.
5. Andreu AL, Hanna MG, Reichmann H, Bruno C, Penn AS, Tanji K, Pallotti F, Iwata S, Bonilla E, Lach B, Morgan-Hughes J, and DiMauro S. Exercise intolerance due to mutations in the cytochrome b gene of mitochondrial DNA. *N Engl J Med.* 1999;341(14):1037-44.
6. Andrews RM, Kubacka I, Chinnery PF, Lightowlers RN, Turnbull DM, and Howell N. Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nat Genet.* 1999;23(2):147.

7. Arden NK and Spector TD. Genetic influences on muscle strength, lean body mass, and bone mineral density: a twin study. *J Bone Miner Res.* 1997;12(12):2076-81.
8. Bergh U, Thorstensson A, Sjodin B, Hulten B, Piehl K, and Karlsson J. Maximal oxygen uptake and muscle fiber types in trained and untrained humans. *Med Sci Sports.* 1978;10(3):151-4.
9. Bilal E, Rabadan R, Alexe G, Fuku N, Ueno H, Nishigaki Y, Fujita Y, Ito M, Arai Y, Hirose N, Ruckenstein A, Bhanot G, and Tanaka M. Mitochondrial DNA haplogroup D4a is a marker for extreme longevity in Japan. *PLoS One.* 2008;3(6):e2421.
10. Bouchard C, An P, Rice T, Skinner JS, Wilmore JH, Gagnon J, Perusse L, Leon AS, and Rao DC. Familial aggregation of VO<sub>2</sub>max response to exercise training: results from the HERITAGE Family Study. *J Appl Physiol.* 1999;87(3):1003-8.
11. Bouchard C, Daw EW, Rice T, Perusse L, Gagnon J, Province MA, Leon AS, Rao DC, Skinner JS, and Wilmore JH. Familial resemblance for VO<sub>2</sub>max in the sedentary state: the HERITAGE family study. *Med Sci Sports Exerc.* 1998;30(2):252-8.
12. Bray MS, Hagberg JM, Perusse L, Rankinen T, Roth SM, Wolfarth B, and Bouchard C. The human gene map for performance and health-related fitness phenotypes: the 2006-2007 update. *Med Sci Sports Exerc.* 2009;41(1):35-73.
13. Castro MG, Terrados N, Reguero JR, Alvarez V, and Coto E. Mitochondrial haplogroup T is negatively associated with the status of elite endurance athlete. *Mitochondrion.* 2007;7(5):354-7.

14. Dionne FT, Turcotte L, Thibault MC, Boulay MR, Skinner JS, and Bouchard C. Mitochondrial DNA sequence polymorphism, VO<sub>2</sub>max, and response to endurance training. *Med Sci Sports Exerc.* 1991;23(2):177-85.
15. Fagard R, Bielen E, and Amery A. Heritability of aerobic power and anaerobic energy generation during exercise. *J Appl Physiol.* 1991;70(1):357-62.
16. Fuku N, Nishigaki Y, and Tanaka M. Mitochondrial haplogroup N9a confers resistance against metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus in Asian individuals. *Asia Pac J Endocrinol.* 2009;1(1):65-73.
17. Fuku N, Oshida Y, Takeyasu T, Guo LJ, Kurata M, Yamada Y, Sato Y, and Tanaka M. Mitochondrial ATPase subunit 6 and cytochrome B gene polymorphisms in young obese adults. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;290(4):1199-205.
18. Fuku N, Park KS, Yamada Y, Nishigaki Y, Cho YM, Matsuo H, Segawa T, Watanabe S, Kato K, Yokoi K, Nozawa Y, Lee HK, and Tanaka M. Mitochondrial haplogroup N9a confers resistance against type 2 diabetes in Asians. *Am J Hum Genet.* 2007;80(3):407-15.
19. Giles RE, Blanc H, Cann HM, and Wallace DC. Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1980;77(11):6715-9.
20. Guo LJ, Oshida Y, Fuku N, Takeyasu T, Fujita Y, Kurata M, Sato Y, Ito M, and Tanaka M. Mitochondrial genome polymorphisms associated with type-2 diabetes or obesity. *Mitochondrion.* 2005;5(1):15-33.
21. Kadenbach B. Intrinsic and extrinsic uncoupling of oxidative

- phosphorylation. *Biochim Biophys Acta*. 2003;1604(2):77-94.
22. Kazuno AA, Munakata K, Nagai T, Shimozono S, Tanaka M, Yoneda M, Kato N, Miyawaki A, and Kato T. Identification of mitochondrial DNA polymorphisms that alter mitochondrial matrix pH and intracellular calcium dynamics. *PLoS Genet*. 2006;2(8):e128.
23. Lesage R, Simoneau JA, Jobin J, Leblanc J, and Bouchard C. Familial resemblance in maximal heart rate, blood lactate and aerobic power. *Hum Hered*. 1985;35(3):182-9.
24. Marcuello A, Martinez-Redondo D, Dahmani Y, Casajus JA, Ruiz-Pesini E, Montoya J, Lopez-Perez MJ, and Diez-Sanchez C. Human mitochondrial variants influence on oxygen consumption. *Mitochondrion*. 2009;9(1):27-30.
25. Mishmar D, Ruiz-Pesini E, Golik P, Macaulay V, Clark AG, Hosseini S, Brandon M, Easley K, Chen E, Brown MD, Sukernik RI, Olckers A, and Wallace DC. Natural selection shaped regional mtDNA variation in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(1):171-6.
26. Montgomery HE, Marshall R, Hemingway H, Myerson S, Clarkson P, Dollery C, Hayward M, Holliman DE, Jubb M, World M, Thomas EL, Brynes AE, Saeed N, Barnard M, Bell JD, Prasad K, Rayson M, Talmud PJ, and Humphries SE. Human gene for physical performance. *Nature*. 1998;393(6682):221-2.
27. Murakami H, Ota A, Simojo H, Okada M, Ajisaka R, and Kuno S. Polymorphisms in control region of mtDNA relates to individual differences in endurance capacity or trainability. *Jpn J Physiol*. 2002;52(3):247-56.

28. Niemi AK and Majamaa K. Mitochondrial DNA and ACTN3 genotypes in Finnish elite endurance and sprint athletes. *Eur J Hum Genet.* 2005;13(8):965-9.
29. Okura T, Koda M, Ando F, Niino N, Tanaka M, and Shimokata H. Association of the mitochondrial DNA 15497G/A polymorphism with obesity in a middle-aged and elderly Japanese population. *Hum Genet.* 2003;113(5):432-6.
30. Ostrander EA, Huson HJ, and Ostrander GK. Genetics of athletic performance. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2009;10):407-29.
31. Rankinen T, Perusse L, Rauramaa R, Rivera MA, Wolfarth B, and Bouchard C. The human gene map for performance and health-related fitness phenotypes. *Med Sci Sports Exerc.* 2001;33(6):855-67.
32. Reed T, Fabsitz RR, Selby JV, and Carmelli D. Genetic influences and grip strength norms in the NHLBI twin study males aged 59-69. *Ann Hum Biol.* 1991;18(5):425-32.
33. Schmiedel J, Jackson S, Schafer J, and Reichmann H. Mitochondrial cytopathies. *J Neurol.* 2003;250(3):267-77.
34. Scott RA, Fuku N, Onywera VO, Boit M, Wilson RH, Tanaka M, W HG, and Pitsiladis YP. Mitochondrial haplogroups associated with elite Kenyan athlete status. *Med Sci Sports Exerc.* 2009;41(1):123-8.
35. Scott RA, Wilson RH, Goodwin WH, Moran CN, Georgiades E, Wolde B, and Pitsiladis YP. Mitochondrial DNA lineages of elite Ethiopian athletes. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 2005;140(3):497-503.

36. Tanaka M, Cabrera VM, Gonzalez AM, Larruga JM, Takeyasu T, Fuku N, Guo LJ, Hirose R, Fujita Y, Kurata M, Shinoda K, Umetsu K, Yamada Y, Oshida Y, Sato Y, Hattori N, Mizuno Y, Arai Y, Hirose N, Ohta S, Ogawa O, Tanaka Y, Kawamori R, Shamoto-Nagai M, Maruyama W, Shimokata H, Suzuki R, and Shimodaira H. Mitochondrial genome variation in eastern Asia and the peopling of Japan. *Genome Res.* 2004;14(10A):1832-50.
37. Tanaka M, Fuku N, Nishigaki Y, Matsuo H, Segawa T, Watanabe S, Kato K, Yokoi K, Ito M, Nozawa Y, and Yamada Y. Women with mitochondrial haplogroup N9a are protected against metabolic syndrome. *Diabetes.* 2007;56(2):518-21.
38. Tanaka M, Fuku N, Takeyasu T, Guo LJ, Hirose R, Kurata M, Borgeld HJ, Yamada Y, Maruyama W, Arai Y, Hirose N, Oshida Y, Sato Y, Hattori N, Mizuno Y, Iwata S, and Yagi K. Golden mean to longevity: rareness of mitochondrial cytochrome b variants in centenarians but not in patients with Parkinson's disease. *J Neurosci Res.* 2002;70(3):347-55.
39. Torroni A, Achilli A, Macaulay V, Richards M, and Bandelt HJ. Harvesting the fruit of the human mtDNA tree. *Trends Genet.* 2006;22(6):339-45.
40. Yang N, MacArthur DG, Gulbin JP, Hahn AG, Beggs AH, Easteal S, and North K. ACTN3 genotype is associated with human elite athletic performance. *Am J Hum Genet.* 2003;73(3):627-31.
41. 松村正實, 木南凌. ヒトの分子遺伝学. 第2版: メディカル・サイエンス・インターナショナル, 2001

## 謝辞

本研究を執筆するに当たり、ご懇篤なご指導をしてくださいました、主査の樋口満先生、副査を引き受けてくださいました、村岡功先生、磯繁雄先生、田中雅嗣先生に心より感謝申し上げます。

また、本研究に被験者として参加して下さった皆様に深く感謝いたします。

国立スポーツ科学センターの川原貴先生、高橋英幸先生、大岩奈青先生には、DNA サンプルの提供をはじめ本研究の作成にご協力いただきましたこと厚く御礼申し上げます。

本稿作成や大学院生活を様々な方面から支えて下さった樋口研究室の皆様、東京都健康長寿医療センター研究所・健康長寿ゲノム探索チームの皆様、深く感謝いたします。

本稿作成のための大学院生活を物心両面で支えて下さった両親・祖母に心より感謝いたします。

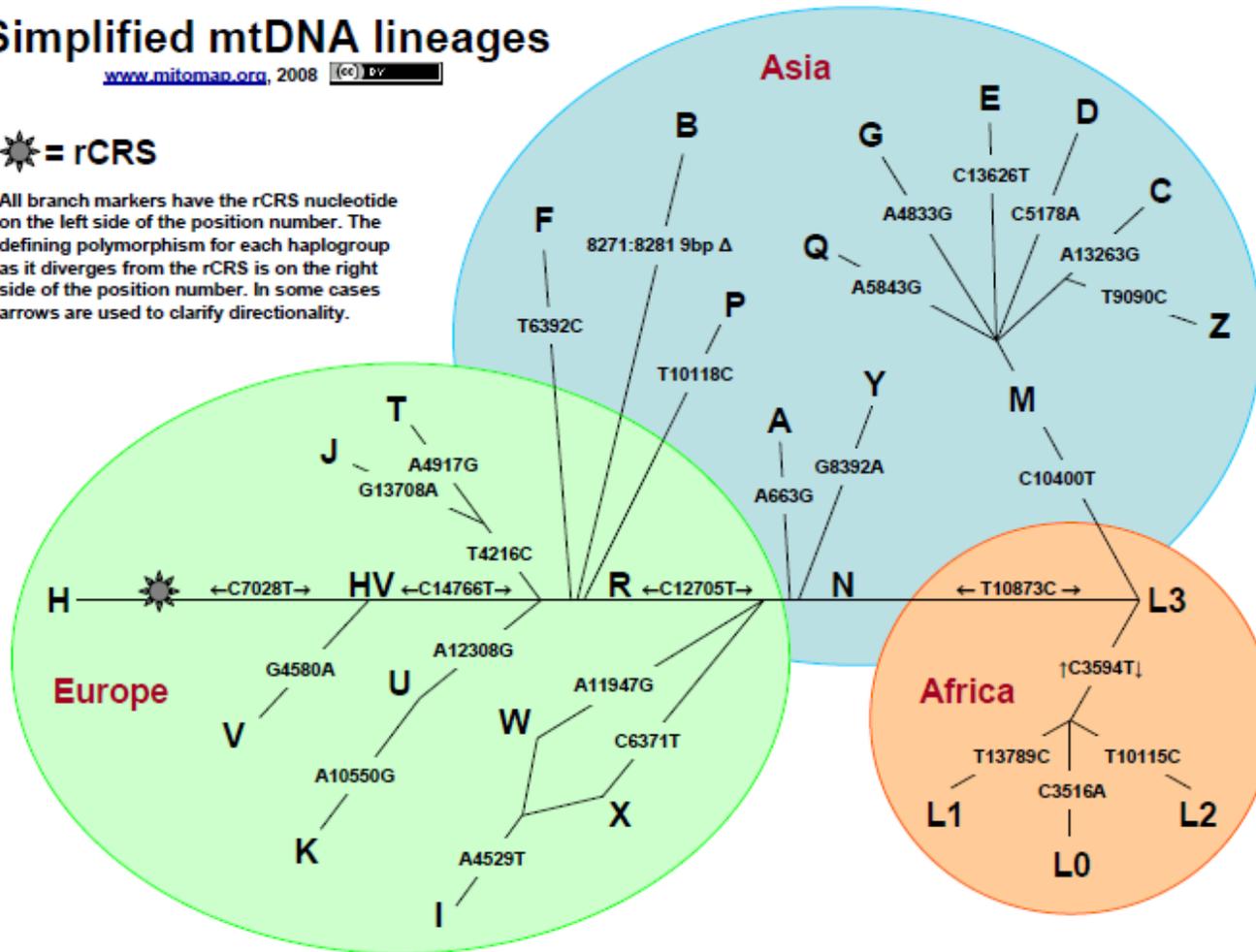
最後に、本研究の遂行に際して、東京都健康長寿医療センター研究所・健康長寿ゲノム探索チームの田中雅嗣先生、福典之先生にはご懇篤なるご指導ならびに御校閲を賜りました。ここに心から感謝の意を表します。

# Simplified mtDNA lineages

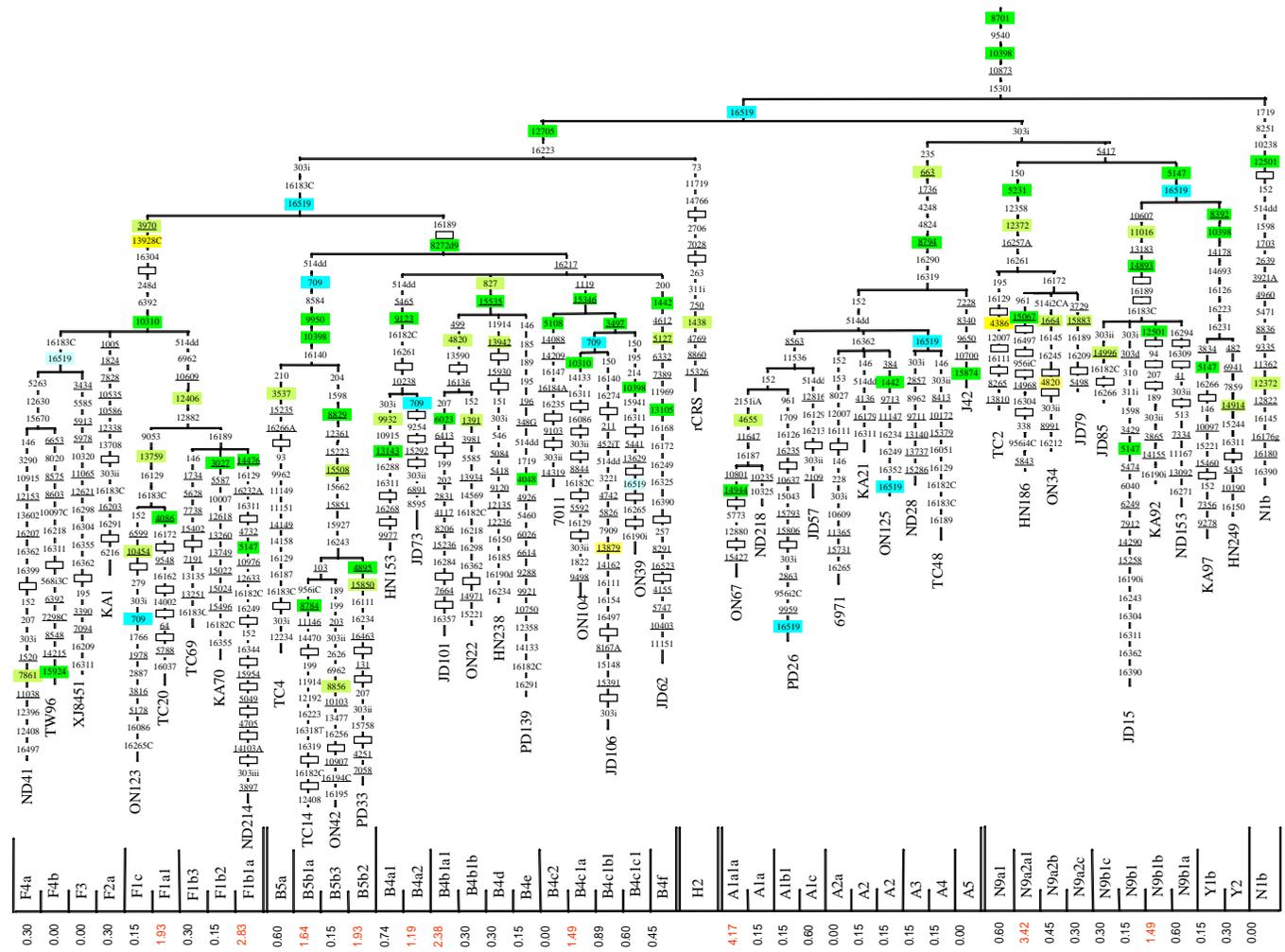
[www.mitomap.org](http://www.mitomap.org), 2008

= rCRS

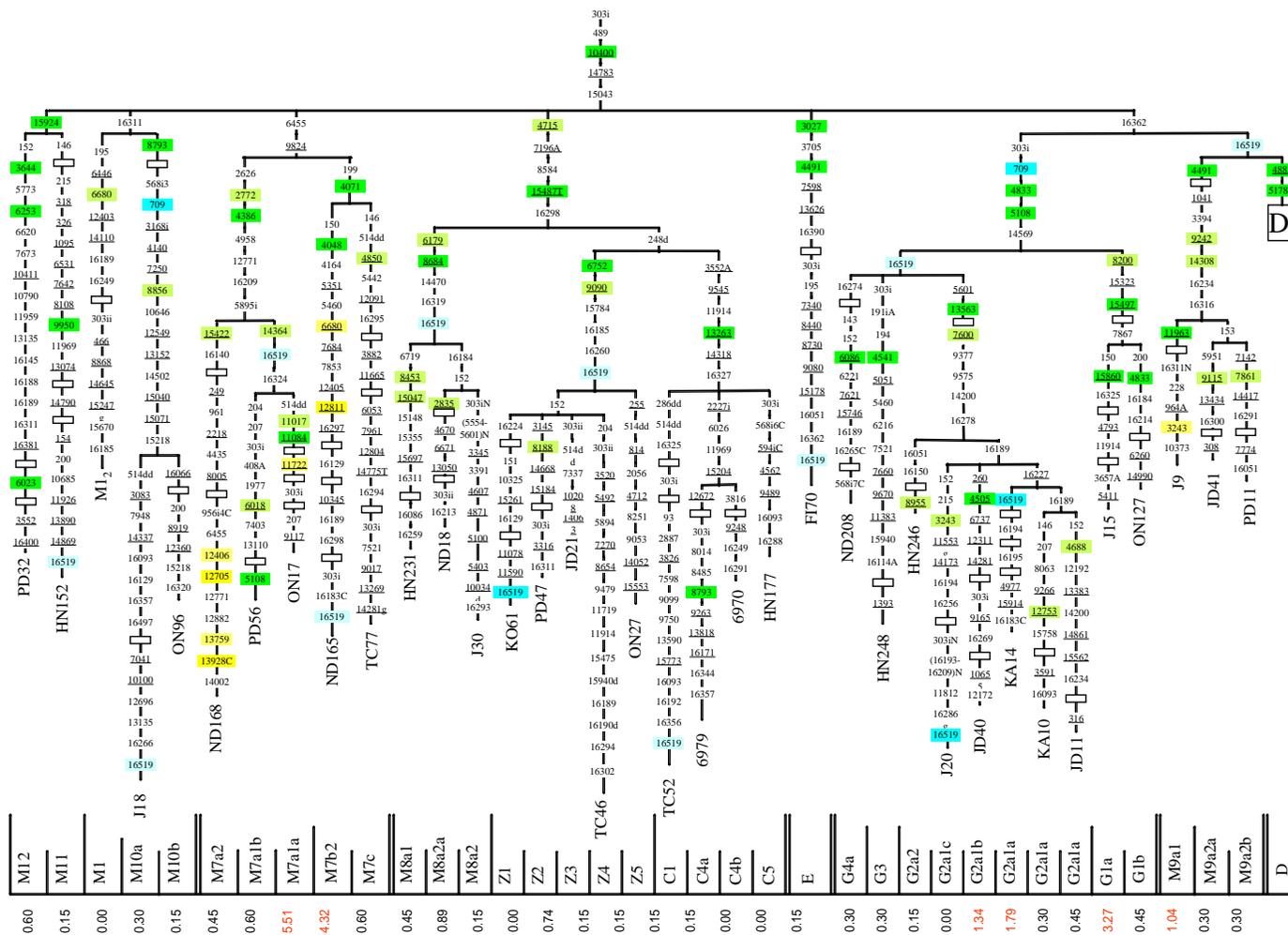
All branch markers have the rCRS nucleotide on the left side of the position number. The defining polymorphism for each haplogroup as it diverges from the rCRS is on the right side of the position number. In some cases arrows are used to clarify directionality.



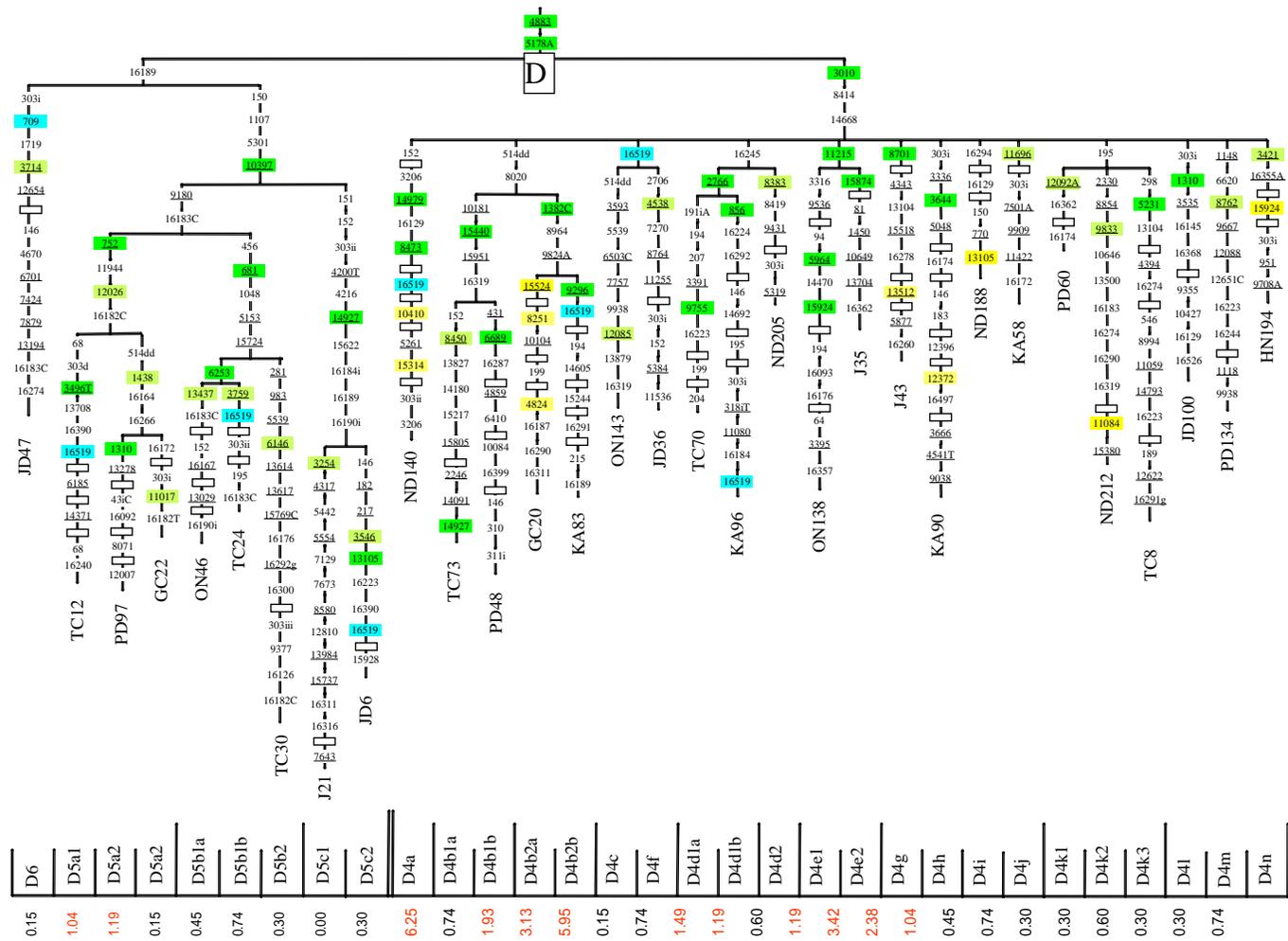
資料 1 . 世界の系統樹 [MITOMAP (<http://www.mitomap.org/bin/view/MITOMAP>)より引用]



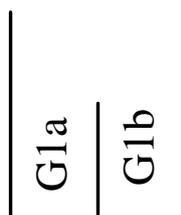
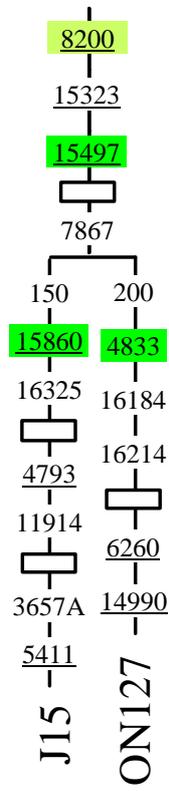
資料 2 - 1. マクロハプログループ N の系統樹 [文献(36)より引用改変]



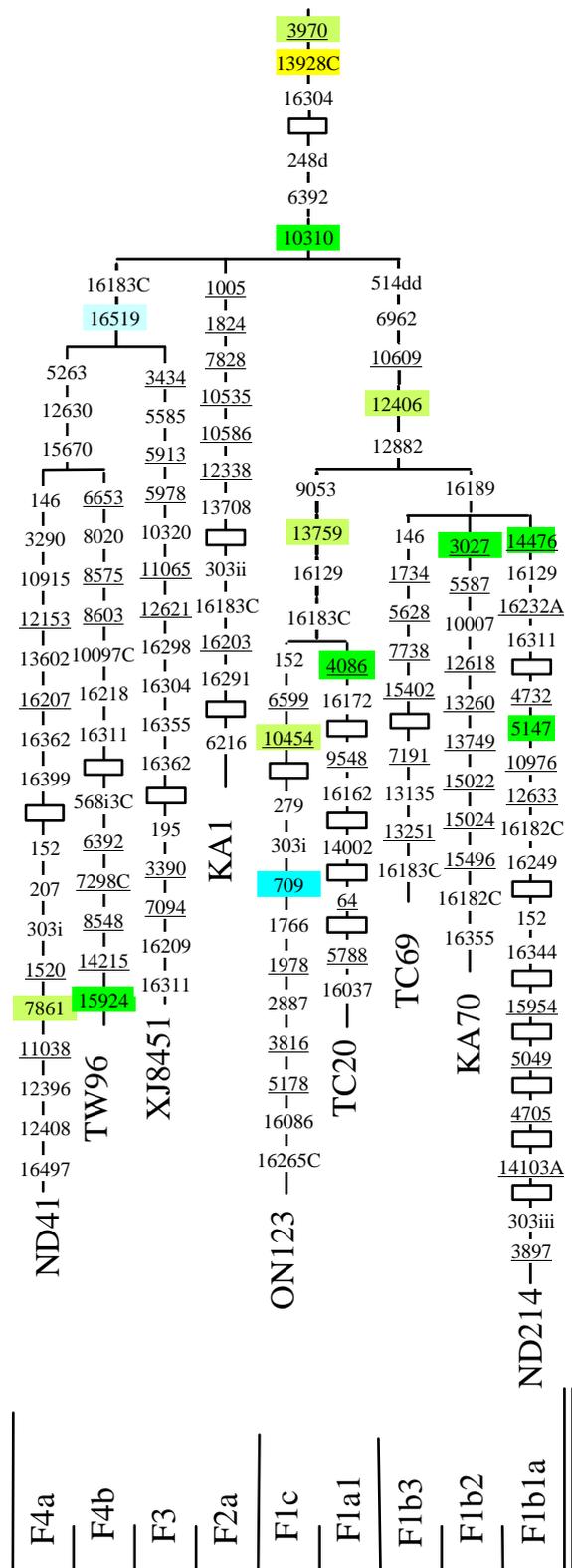
資料 2 - 2. マクロハプログループ M の系統樹 [文献(36)より引用改変]



資料 2 - 3. ハプログループ D の系統樹 [文献(36)より引用改変]



資料 3 - 1 . ハプログループ G1 の系統樹 [文献(36)より引用改変]



資料 3 - 2 . ハプログループ F の系統樹 [文献(36)より引用改変]