

陸上競技長距離走者の競技成績と
ミトコンドリア DNA の遺伝子多型との関連性
— ATP8/6, Cytochrome *b* 遺伝子および D-Loop の SNPs —

名古屋大学大学院 武 安 岳 史
(共同研究者) 名古屋大学 佐 藤 祐 造
名古屋大学 押 田 芳 治
丸紅東京本社診療所 山 澤 裕 文
岐阜県国際 田 中 雅 嗣
バイオ研究所

**Relationship between Performance of Long Distance Runners and Nucleotide
Polymorphisms of Mitochondrial DNA**

— SNPs in the ATP Synthase, Cytochrome *b* Genes and D-Loop —

by

Takeshi Takeyasu
Nagoya University Graduate School of Medicine
Yuzo Sato, Yoshiharu Oshida
*Nagoya University Research Center of Health,
Physical Fitness, and Sports*
Fumihiro Yamasawa
Marubeni Corporation
Masashi Tanaka
Gifu International Institute of Biotechnology

ABSTRACT

The purpose of this study was to identify mitochondrial polymorphisms associated with high endurance performance. We determined sequence of ATPase subunit 6 (ATP6), ATPase subunit 8 (ATP8), cytochrome *b*, and D-loop sequences of mitochondrial DNA

from elite runners (ER, n=31), non-elite runners (NER, n=108), other athletes (OA, n=43) and control (CON, n=112) by the direct sequencing method.

As a result of having compared frequency of gene polymorphism, as gene related to endurance performance, ATP6 was selected. In ATP6 gene, 59 single nucleotide polymorphisms (SNPs) were identified, and 31 of them were non-synonymous substitutions. The frequency of Mt8794C → T (His90Tyr) in the elite runners was significantly higher than that in other groups.

Cluster analysis of the ATP6 nucleotide sequences revealed that they could be classified into eight clusters. The proportion of runners in the members belonging to haplogroup VIII characterized by Mt8794C → T was significantly higher than that of runner in other individuals belonging to other haplogroups. These results suggest that Mt8794C → T (His90Tyr) is associated with high endurance performance.

要 旨

本研究は、優れた持久性能力に関連する遺伝子多型を明らかにすることを目的とした。被験者は、競技種目および競技成績より、Elite Runner 群 (ER 群, n=31), Non-elite Runner 群 (NER 群, n=108), Other Athlete 群 (OA 群, n=43) および対照群 (CON 群, n=112) に分類し、全員より informed consent を得た。陸上競技者のミトコンドリア DNA の ATP8/6 遺伝子, cytochrome *b* 遺伝子, および D-loop における塩基配列を決定し、競技成績との関連を解析した。

確認された遺伝子多型の中で、ER 群で出現頻度が高い非同義置換として、Mt8794C → T (His90Tyr) が見つかった。この一塩基多型 (SNPs) は、エリートランナーで出現頻度が有意に高いと同時に、この SNPs を含む Haplogroup にはランナーが有意に多く分布することが判った。これらの知見から、Mt8794C → T (His90Tyr) が優れた持久性能力と関連していると考えられた。

緒 言

陸上競技種目における競技成績は、十分にトレ

ーニングされていると考えられるトップクラスになればなるほど、他のスポーツ種目よりも遺伝的要因が強くなると考えられる^{3,6,10}。この中でもとりわけ長距離走種目では、長時間にわたり大きなエネルギー供給を行うための有酸素的作業能力、つまり酸化的リン酸化系によるアデノシン三リン酸 (ATP) の合成能力が重要となる。この ATP を産生しているのが細胞内に存在する小器官のミトコンドリアである。ミトコンドリアは、進化の過程で呼吸能を有する原核生物が真核生物の中に取り込まれ、共生を始めたのがその起源と考えられている。ミトコンドリアは独自の遺伝情報を持ち、核ゲノムとの相互関係を保ちながら遺伝情報を発現している。ミトコンドリアゲノムは 16,569 塩基対と核ゲノムの 60 億塩基対に比べれば小さいが、ATP 合成を担う酸化的リン酸化系を構成する 13 種のサブユニットをコードしている (図 1)。

このミトコンドリア DNA は活性酸素種によって損傷を受けやすく、遺伝子変異が蓄積しやすいとされている。これは第 1 に呼吸によって取り込まれた酸素の 90% 以上がミトコンドリアで代謝され、その数%が活性酸素種 (ROS, reactive

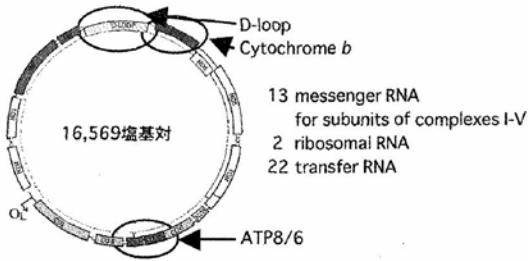


図1 ミトコンドリアDNAの遺伝子配置

ミトコンドリアDNAは環状二重鎖DNAで、酸化リン酸化系を構成する13種のmRNAとともに、2種のrRNA、22種のtRNAをコードしている。

oxygen species) となること。第2にミトコンドリアDNAが活性酸素種生成源の近傍に存在するため、損傷を受けやすいこと。これに加えてミトコンドリアDNAは情報密度が高いために、酸化損傷によって生じた変異が機能的異常に直結すると考えられる。ミトコンドリアは各細胞に数十個ないし数百個存在し、それぞれのミトコンドリアはミトコンドリアDNAを数コピー含んでいる。従って、1つの細胞にはミトコンドリアDNAが数千コピー存在する。これらのミトコンドリアDNAは高発現しているため、ミトコンドリアDNAの遺伝子多型がエネルギー産生系や細胞の活性酸素の動態に及ぼす生体への影響は大きく、核DNA多型全体の影響に匹敵すると考えられる。

そこで、本研究では、高い持久性能力に関連する遺伝子多型を明らかにするために、陸上競技の長距離走者およびそれ以外の種目の競技者を対象

として、ミトコンドリアDNAのATP8/6遺伝子、cytochrome b遺伝子、およびD-loopの塩基配列を決定し、競技種目、競技成績と遺伝子多型、特に、一塩基多型 (single nucleotide polymorphism, SNP) との関係を検討した。

1. 対象および方法

1.1 対象

被験者は、実業団および大学の陸上競技部に所属する男女182名、およびControl群としての健康な一般大学生112名 (CON群) であり、全員より informed consent を得た。競技者は専門種目により分類した上で、日本選手権参加標準記録を参考基準とし、競技成績により、Elite Runner群 (ER群, n=31)、Non-elite Runner群 (NER群, n=108)、Other Athlete群 (OA群, n=43) の3群に分類して検討した。

1.2 塩基配列の解析

血液細胞あるいは口腔粘膜をサンプルとし、総DNAを抽出した。Applied Biosystems社のGeneAmp[®] PCR System 9700を用い、PCR法により対象遺伝子領域 (ATP8/6: 塩基番号8,366~9,207, cytochrome b: 14,747~15,887, D-loop: 16,024~576) を増幅した (表1)¹²⁾。そして、Applied Biosystems社のABI PRISM[®] 310 Genetic

表1 使用したプライマーのリスト
3つの遺伝子のダイレクトシーケンスのためにPCR法を用いて対象領域を増幅した。

First PCR		Second PCR		
L1	H1	FL2	H2	
L8281	H11571	FL8345	H9133	ATP8/6
		FL8635	H9235	
		FL8913	H9483	
L13901	H609	FL14559	H15162	Cytochrome b
		FL14837	H15340	
		FL15126	H15755	
		FL15405	H16016	
		FL16221	H342	
L77	H3370	FL16504	H581	D-loop
		FL100	H742	
		FL398	H1014	

Analyzerを用い、蛍光色素ターミネーターを利用したダイレクトシーケンシング法により塩基配列を決定した。塩基配列が決定された各個体に対し、白人の1個体の配列である改訂版ケンブリッジ標準配列^{1,2)}と比較し、遺伝子多型を同定した。

1. 3 統計処理

群間でのSNPs保有数の比較はWelchのt検定を用い、各SNPsの出現頻度の違いは、Fisherの直接確率計算法を用いて検定した。有意水準は危険率5%以下とした。

分子系統樹の作成には、GENETYX-MAC Ver.11.2を利用し、クラスター解析の近隣接合法を用いた。

2. 結果

2. 1 候補遺伝子多型の選定

対象遺伝子多型を絞り込むために、第一段階として、ER群10名、NER群50名、CON群20名について、全対象遺伝子領域の解析を行った。

ATP8およびATP6遺伝子領域では39ヶ所にSNPsが確認された。このうちアミノ酸の変化を

伴う非同義置換は17ヶ所であった(表2)。このうちMt8860A→Gは、Mt8860A (adenine) 自体がケンブリッジ標準配列の中でrare polymorphismとされているので分析から除外した。一方、cytochrome b遺伝子領域では46ヶ所にSNPsが確認された。このうち非同義置換は16ヶ所であった(表3)。ここでも、Mt15326A→Gが全被検者で検出されたが、ケンブリッジ標準配列でMt15326Aがrare polymorphismとされているので除外した。これらのSNPsのなかから、5%~95%の出現頻度を示す、Mt8414C→T, Mt8563A→G, Mt8584G→A, Mt8701A→G, Mt8794C→T, Mt14979T→Cの6ヶ所のSNPsを選び出した。これらのSNPsについて競技成績群ごとにみるとER群でMt8794C→Tの頻度が50%と、その他の群に比べ有意に高く(vs. NER群: p<0.01, vs. CON群: p<0.01, 表4), ATP6遺伝子領域、とくにMt8794C→T多型の頻度について調査した。

また、観察されたSNPsに基づき、クラスター解析を用いて被検者を分類するためにD-loopの解析も並行して行った。D-loopで観察された遺伝子多型は多数にわたり、頻度も高かった(表5)。

表2 ATP8/6 遺伝子の非同義置換

ATP8				ATP6							
Nucleotide	AA	(%)	Nucleotide	AA	(%)	Nucleotide	AA	(%)			
8,414	C→T	Leu17Phe	35.0	8,545	G→A	Ala7Thr	2.5	8,764	G→A	Ala80Thr	1.3
8,447	A→G	Met28Val	1.3	8,563	A→G	Thr13Ala	6.3	8,794	C→T	His90Tyr	12.5
8,453	A→G	Asn30Asp	1.3	8,584	G→A	Ala20Thr	5.0	8,860	A→G	Thr112Ala	100.0
8,459	A→G	Asn32Asp	1.3	8,618	T→C	Ile31Thr	1.3	8,920	G→A	Gly132Ser	1.3
				8,677	A→C	Lys51Gln	1.3	8,962	A→G	Thr146Ala	1.3
				8,684	C→T	Thr53Ile	1.3	9,053	G→A	Ser176Asn	1.3
				8,701	A→G	Thr59Ala	63.8				

表3 Cytochrome b 遺伝子の非同義置換

Nucleotide	AA	(%)	Nucleotide	AA	(%)		
14,766	T→C	Ile7Thr	1.3	15,323	G→A	Ala193Thr	2.6
14,927	A→G	Thr61Ara	2.6	15,326	A→G	Thr194Ala	100.0
14,979	T→C	Ile78Thr	6.4	15,458	T→C	Ser238Pro	1.4
15,047	G→A	Gly101Ser	1.3	15,497	G→A	Gly251Ser	4.1
15,119	G→A	Ala125Thr	1.3	15,662	A→G	Ile306Val	2.7
15,218	A→G	Thr158Ala	2.6	15,851	A→G	Ile369Val	1.9
15,236	A→G	Ile164Val	1.3	15,860	A→G	Ile372Val	3.8
15,314	G→A	Ala190Thr	1.3	15,884	G→A	Ala380Thr	1.9

しかしながら、これまで報告されている複数の Haplogroup にランダムに分布することが明らかになったため、今回の分析からは除外した。

2. 2 ATP6 遺伝子領域の精査

ATP6 遺伝子領域について、競技者 182 名、コントロール 112 名について塩基配列を決定した結

表 4 競技成績と SNPs の出現頻度 (%)

	CON 群	ER 群	NER 群
n	20	10	50
ATP8			
Mt8414C → T	55.0 %	30.0 %	28.0 %
ATP6			
Mt8563A → G	5.0 %	30.0 %	2.0 %
Mt8584G → A	5.0 %	0.0 %	6.0 %
Mt8701A → G	80.0 %	40.0 % *	62.0 %
Mt8794C → T	5.0 %	50.0 % **	8.0 %
Cytochrome b			
Mt14979T → C	15.0 %	0.0 %	4.2 %

*は、CON 群に対して 5% 水準、**は 1% 水準で有意差が見られたもの。

表 5 D-loop の遺伝子多型。出現頻度が 10% 以上のもの

Nucleotide	(%)	Nucleotide	(%)	Nucleotide	(%)
16,129 G → A	19.8	16,304 T → C	12.5	263 A → G	100.0
16,182 A-del	10.4	16,311 T → C	16.7	303 C-CCC	21.1
16,183 A-del	22.9	16,319 G → A	10.4	303 C-CC	58.9
16,184 C-CCC	11.4	16,362 T → C	47.9	311 C-CC	98.9
16,189 T → C	31.3	16,519 T → C	43.8	489 T → C	66.7
16,209 T → C	11.5	73 A → G	100.0	514 C-del	37.5
16,223 C → T	74.0	152 T → C	18.8	515 A-del	37.5
16,278 C → T	10.4	248 A-del	12.5		

表 6 ATP6 遺伝子の SNPs。全被検者 (n=294) で 1.0% 以上の頻度で観察された SNPs

Nucleotide	AA	(%)	Nucleotide	AA	(%)
8,563 A → G	Thr13Ala	6.1	8,844 C → T	Ile106	1.0
8,584 G → A	Ala20Thr	4.4	8,856 G → A	Ala110	1.0
8,701 A → G	Thr59Ala	7.0	8,964 C → T	Thr146	5.4
8,705 T → C	Met60Thr	1.0	9,053 G → A	Ser176Asn	3.1
8,764 G → A	Ala80Thr	1.0	9,090 T → C	Ser188	1.7
8,793 T → C	Pro89	1.0	9,123 G → A	Leu199	2.4
8,794 C → T	His90Tyr	8.2	9,180 A → G	Val218	2.7
8,829 C → T	Asn101	2.0			

表 7 競技成績と SNPs の出現頻度

	n	Mt8563A → G (Thr13Ala)	Mt8701A → G (Thr59Ala)	Mt8794C → T (His90Tyr)
ER 群	31	4 _{/31} (12.9%)	17 _{/31} (58.4%)	6 _{/31} (19.4%) *
NER 群	108	6 _{/108} (5.6%)	68 _{/108} (63.0%)	10 _{/108} (9.3%)
OA 群	43	3 _{/43} (7.0%)	27 _{/43} (62.8%)	3 _{/43} (7.0%)
CON 群	112	5 _{/112} (4.5%)	71 _{/112} (63.4%)	5 _{/112} (4.5%)

*は、CON 群に対して 5% 水準で有意差が見られたもの。

果、59ヶ所に SNPs が確認された。その中で非同義置換は 31ヶ所であった (表 6)。

一人平均、1.2ヶ所に SNPs を有しており、全体としては、およそ 560 bp ごとに SNPs がある計算になる。

これら 59ヶ所の SNPs のなかで、出現頻度が 5%~95% の範囲で、機能的差異をもたらす可能性のある非同義置換は Mt8563A → G, Mt8701A → G, Mt8794C → T の 3ヶ所であった。

これら 3つの SNPs の出現頻度を、群ごとに比較したのが表 7 である。CON 群での出現頻度に対して、Mt8563A → G と Mt8701A → G の 2ヶ所の SNPs に関しては各群とも有意差は見られなかった。一方、Mt8794C → T では、ER 群における出現頻度が CON 群と比較して 5% 水準以上で有意に高いことが明らかになった。

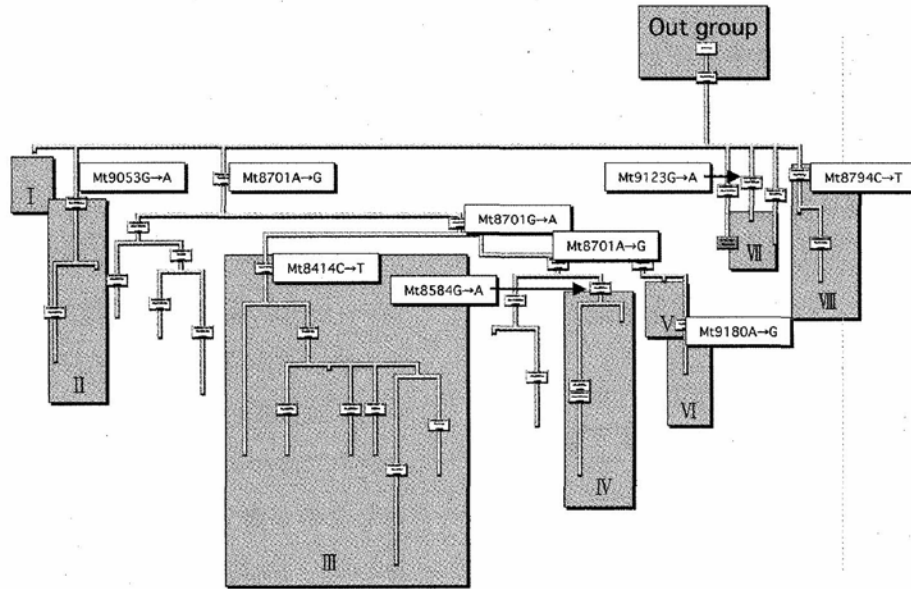


図2 ATP8/6 遺伝子領域の分子系統樹
分類される被検者が5%以上になる8つのHaplogroupに大別された

2. 3 分子系統樹による解析

ミトコンドリアゲノムの多型では、複数の多型が連鎖しているので系統的解析は重要である。そこで、このATP6 遺伝子領域の塩基配列に、情報量を増やすためにATP8 遺伝子領域の塩基配列を付加したものをを用い、クラスター解析を行った。

これにより上位の分岐を探してゆくと、5%以上の人数が分布する8つのクラスターが形成された(図2)。すなわち、この遺伝子領域でSNPsを持たないHaplogroup I, Mt9053G→A (Ser176Asn)を持つHaplogroup II, Mt8414C→T (Leu17Phe)を持つHaplogroup III, Mt8584G→A (Ala20Thr)を持つHaplogroup IV, Mt8701A→G (Thr59Ala)だけのHaplogroup V, Mt8701A→Gに加えてMt9180A→G (Val218Val)を持つHaplogroup VI, Mt9123G→A (Leu199Leu)を持つ

Haplogroup VII, Mt8794C→T (His90Tyr)を持つHaplogroup VIIIが確認された。Haplogroupごとに分布する競技者を見ると、Haplogroup VIIIに属する23名のうち、ER群は6名(26.1%)を占め、NER群10名を加えると、総ランナーは16名(69.6%)であった(表8)。これに対し、他のHaplogroupに属する271名のうち、ER群は25名(9.2%)であり、総ランナーは92名(33.9%)であった。Haplogroup VIIIに属するエリートランナーの割合は、他のHaplogroupに属するエリートランナーの割合に対して有意に高く(オッズ比=3.47, $p < 0.05$)、総ランナーの割合も有意差が見られた(オッズ比=4.45, $p < 0.001$)。

3. 考 察

これらの結果により、ATP合成酵素第6サブユ

表8 各Haplogroupeに分布するランナーの割合

	n	Haplogroup								Total
		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	
ER群 (%)	56	12.5	0.0	9.9	8.3	8.3	20.0	0.0	26.1*	10.5
NER群 (%)	9	30.4	22.2	36.6	41.7	41.7	50.0	57.1	43.5	36.7
ER群+NER群 (%)	101	42.9	22.2	46.5	46.5	50.0	70.0	57.1	69.6**	47.3

*は5%水準で、**は1%水準で有意差が見られたもの。

表9 ATP6 遺伝子の90番目付近のアミノ酸配列

ヒト	G	L	L	P	H	S	F	カエル	G	L	L	P	Y	T	F
ウシ	G	L	L	P	H	S	F	ニワトリ	G	L	L	P	Y	T	F
アザラシ	G	L	L	P	H	S	F	ハエ	G	L	F	P	Y	I	F
クジラ	G	M	L	P	H	S	F	ウニ	G	L	F	P	Y	A	F
マウス	G	L	L	P	H	T	F	カビ	G	M	V	P	Y	S	F
ラット	G	L	L	P	H	T	F	コウボ	S	M	I	P	Y	S	F
ハムスター	G	L	L	P	H	T	F	トウモロコシ	G	M	I	P	F	S	F
								コムギ	G	M	I	P	F	S	F

H=ヒスチジン, Y=チロシン, F=フェニルアラニン

ニットのMt8794C→T多型が持久性競技における競技成績と関連していることが明らかになった。

Mt8794C→T多型によってATP合成酵素第6サブユニットの90番目のアミノ酸がヒスチジン(His)からチロシン(Tyr)に置換される。各種生物でのATP合成酵素第6サブユニット遺伝子の90番目付近のアミノ酸配列をみると、哺乳類ではヒスチジンがよく保存されており、両生類・爬虫類・鳥類では、チロシンが使用されている(表9)。このことから、この位置におけるアミノ酸の相違が何らかの機能的ないし分子進化的意義を有するものと推定される。また、標準アミノ酸残基(His)と置換されたアミノ酸残基(Tyr)との間の物理化学的相違を表すGrantham値⁵⁾も83と、

今回確認されたSNPsの中では最も大きく、機能的にも影響は大きいと推定される。

ATP合成酵素第6サブユニットはATP合成酵素のF0部分にあり、内膜を5回貫通し、プロトン輸送に深く関わっている(図3)⁸⁾。ATP合成酵素第6サブユニット遺伝子の変異に基づく疾患として、母系遺伝性のLeigh脳症あるいはNARP症候群がある^{4,9,11)}。その主な変異はMt8993T→Gである。この変異によって、第6サブユニットの第4の膜貫通α-ヘリックスにある156番目のアミノ酸がロイシン(Leu)からアルギニン(Arg)への置換が生じ、これによってプロトン輸送に伴うATP合成能が失われる。一方、Mt8794C→Tによってアミノ酸置換が生じる第90番の残基は、内膜を貫通する第2α-ヘリックスのマトリクス側の端に位置する。従って、Mt8794C→T(His90Tyr)置換がATP合成酵素のATP合成能に何らかの影響を与えている可能性が考えられる。

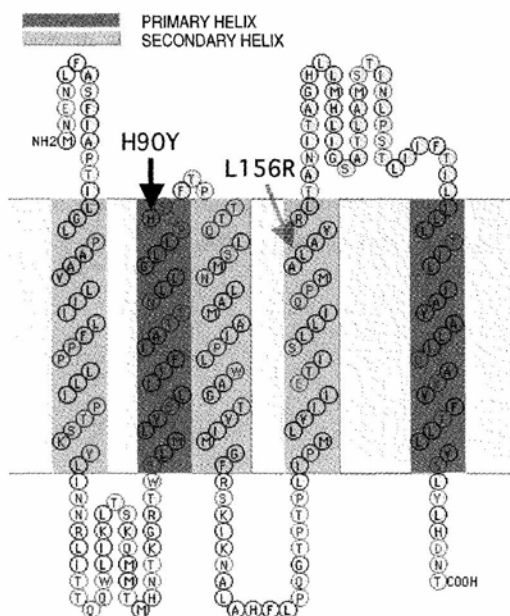


図3 ATP合成酵素第6サブユニットの構造およびアミノ酸置換の位置

4. 結語

これらの結果により、ミトコンドリアDNAのATP合成酵素第8サブユニットおよび第6サブユニット遺伝子領域、そしてcytochrome b遺伝子領域における遺伝子多型の中で、Mt8794C→T(His90Tyr)が持久性能力と関連していると推定された。

ミトコンドリアDNAはATP合成を担う酸化的リン酸化系を構成する13種のサブユニットをコードしており、今回、このなかの3つのサブユニ

ットの遺伝子領域の分析で持久性能力に関連する遺伝子多型を見いだすことができた。今後、他の遺伝子領域に分析を拡大するとともに、より多くの競技種目での研究を進めることによって、運動能力を規定する遺伝子多型をさらに同定することができるかと期待される。これにより個人の適性の応じたトレーニングメニューの処方などが可能になると思われる。

謝 辞

遺伝子解析について協力を頂いた岐阜県国際バイオ研究所の福典之博士、被検者からの試料および情報に関して協力を頂いた山口大学の宮田浩文助教授に感謝の意を表したい。

文 献

- 1) Anderson S., Bankier A. T., Barrell B. G., de Bruijn M. H., Coulson A. R., Drouin J., Eperon I. C., Nierlich D. P., Roe B. A., Sanger F., Schreier P. H., Smith A. J., Staden R., Young I. G. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, 290, 457-465 (1981)
- 2) Andrews R. M., Kubacka I., Chinnery P. F., Lightowlers R. N., Turnbull D. M., Howell N. Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nat. Genet.*, 23, 147 (1999)
- 3) Dionne F. T., Turcotte L., Thibault M. C., Boulay M. R., Skinner J. S., Bouchard C. Mitochondrial DNA sequence polymorphism, VO_2 max, and response to endurance training. *Med. Sci. Sports Exerc.*, 23, 177-185 (1991)
- 4) Fryer A., Appleton R., Sweeney M. G., Rosenbloom L., Harding A. E. Mitochondrial DNA 8993 (NARP) mutation presenting with a heterogeneous phenotype including 'cerebral palsy'. *Arch. Dis. Child*, 71, 419-422 (1994)
- 5) Grantham R., Amino acid difference formula to help explain protein evolution. *Science*, 185, 862-864 (1974)
- 6) Hagberg J. M., Moore G. E., Ferrell R. E. Specific genetic markers of endurance performance and VO_2 max. *Exerc. Sport Sci. Rev.*, 29, 15-19 (2001)
- 7) Holloszy J. O., Coyle E. F. Adaptations of skeletal muscle to endurance exercise and their metabolic consequences. *J. Appl. Physiol.*, 56, 831-838 (1984)
- 8) Kagawa Y., Ishizuka M., Saishu T., Nakao S. Stable structure of thermophilic proton ATPase beta subunit. *J. Biochem.*, 4, 923-934 (1986)
- 9) Playan A., Solano-Palacios A., Gonzalez de la Rosa J. B., Merino-Arribas J. M., Andreu A. L., Lopez-Perez M., Montoya, J. Leigh syndrome resulting from a de novo mitochondrial DNA mutation (T8993G). *Rev. Neurol.*, 34, 1124-1126 (2002)
- 10) Rankinen T., Perusse L., Rauramaa R., Rivera M. A., Wolfarth B., Bouchard C. The human gene map for performance and health-related fitness phenotypes: the 2001 update. *Med. Sci. Sports Exerc.*, 34, 1219-1233 (2002)
- 11) Santorelli F. M., Shanske S., Macaya A., DeVivo D. C., DiMauro S. The mutation at nt 8993 of mitochondrial DNA is a common cause of Leigh's syndrome. *Ann. Neurol.*, 34, 827-834 (1993)
- 12) Tanaka M., Hayakawa M., Ozawa T. Automated sequencing of mitochondrial DNA. *Methods Enzymol.*, 264, 407-421 (1996)