

図7. 経口ワクチンに対する腸管IgA応答における
 ビタミンB1の効果
 ビタミンB1欠乏餌、もしくはコントロール餌で3週間飼育した。その間、Day 14と21にコレラトキシンを経口免疫した。Day 31に糞便を回収し、コレラトキシン特異的IgAをELISA法にて測定した。両群ともDay 21から31までは通常餌で飼育した。

表1. 多様性の指標の比較(C-1)

	Sannon species diversity	同定菌種数
保存液群	2.635	252
対照群	2.554	237

表2. 多様性の指標の比較(C-2)

	Sannon species diversity	同定菌種数
1)ISOFEALキット	1.973	214
2)自動抽出	2.130	266
3)遠心分離	2.214	180
4)PBS洗浄	2.372	200

表3. 同定できた菌種の数(C-3)

サンプルID	菌種数
6245	429
6235	344
6233	406
6232	408
6231	320
6230	266
6229	298
6227	243
6228	267
6226	283
6225	432
6224	253
6223	318
6222	370
6221	296
6220	334
6219	406
6218	344
6217	225
6126	301

健康な日本人の腸管免疫と腸内細菌データベースの構築

研究分担者 水口 賢司
国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所
バイオインフォマティクスプロジェクト プロジェクトリーダー

<目的> 食事・栄養摂取状況や身体活動・運動など詳細な生活習慣情報の得られた被験者を対象に腸内細菌叢を解析し、腸内細菌叢、腸管免疫、生活習慣データおよび公共のデータベースからの情報を統合した基盤データベースを設計する。それらのデータについてバイオインフォマティクスを用いて横断的に分析することにより、生活習慣、腸内細菌叢、腸管免疫、疾患発症との相互関係を明らかにすることを目的とする。

<方法> 食事・栄養摂取状況、身体活動・運動などの生活習慣のデータおよび腸内細菌叢のデータをデータベース化し、別途構築した遺伝子、タンパク質、疾患、化合物、パスウェイ情報等を統合したデータベースとともに、多変量解析や機械学習等を用いることによって、分子メカニズムや各種測定量の関係を解析する。

<結果> 遺伝子、パスウェイ情報等を鍵とした独自のデータウェアハウス技術を拡張し、化合物や疾患などの、より多様なデータを統一的に解析できる枠組みを構築した。また、腸内細菌叢のデータを米国国立生物工学情報センター(NCBI)の提供する生物種IDとともにデータベース化する予定である。さらに、食事・栄養摂取状況、身体活動・運動などの生活習慣のデータを入手し、予備的な多変量解析と相関解析を行った。その結果、赤血球数と最大酸素摂取量や腹囲と動物性脂肪摂取量などに既知の相関がみられることを確認した。

<まとめ> 本研究では、詳細な生活習慣情報と腸内細菌叢や腸管免疫データについてバイオインフォマティクスを用いて横断的に分析することによって、分子機序の推定や各種測定量の間の相関予測モデルを構築することを目指している。今年度は、少数のデータを予備的に解析し、それぞれのデータの性質を理解した上で、データをどのように格納するかを設計を行った。この設計に基づいてデータベースを構築し、来年度以降データの格納を行い、異なる種類のデータの間の横断的な解析ができる環境を整える予定である。

A. 研究目的

最近の研究によって、腸内細菌叢が食事や肥満、代謝性疾患などと関連することが明らかになってきている。本研究では、食事・栄養摂取状況や身体活動・運動など詳細な生活習慣情報の得られた被験者を対象に腸内細菌叢を解析し、腸内細菌叢、腸管免疫、生活習慣データおよび公共のデータベースからの情報を統合した基盤データベースを設計する。それらのデータについてバイオインフォマティクスを用いて横断的に分析することにより、生活習慣、腸内細菌叢、腸管免疫、疾患発症との相互関係を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

食事・栄養摂取状況、身体活動・運動などの生活習慣のデータおよび腸内細菌叢のデータをデータベース化し、別途構築した遺伝子、タンパ

ク質、疾患、化合物、パスウェイ情報等を統合したデータベースとともに、多変量解析や機械学習法等を用いることによって、分子メカニズムや各種測定量の関係を解析する。

(倫理面への配慮)

すべてのデータは匿名化されており、個人を特定する情報は含まれていない。

C. 研究結果

(1) データ統合技術の開発

遺伝子、パスウェイ情報等を鍵とした独自のデータウェアハウス技術を拡張し、化合物や疾患などの、より多様なデータを統一的に解析できる枠組みを構築した(Chen *et al.*, 下記発表論文)。この技術を活用して、生活習慣や腸内細菌叢のデータ統合を実行していくことを計画している(図1)。

(2)腸内細菌叢のデータ解析

腸内細菌叢のデータは16SリボソームRNA遺伝子の配列を次世代シーケンサーで解析し、細菌分類における門、綱、目、科、属、種のレベルで分類したリード数のデータである。これらのデータをサンプル間で比較、分類する方法について検討した。今後得られるデータについては、米国立生物工学情報センター(NCBI)の提供する生物種IDとともにデータベース化する予定である。

(3)生活習慣・生理指標データの多変量解析

食事・栄養摂取状況、身体活動・運動などの生活習慣のデータの中から数値化可能なデータを抽出したところ321項目あった。これらのデータについて、予備的な多変量解析と相関解析を行った(図2)。その結果、赤血球数と最大酸素摂取量や腹囲と動物性脂肪摂取量などに既知の相関がみられることを確認した。

D. 考察

腸内細菌叢に関する研究は、ここ数年の間に非常に多く行われるようになった。これは次世代シーケンサーの普及により、細菌を培養することなく大規模に解析できるようになったことが大きい。これまでに腸内細菌叢に関する多くの研究がなされ、食事や疾患との関連が明らかにされてきている。しかしながら、腸内細菌叢を身体活動や運動との関わりで解析された例は少ない。本研究では、300項目以上にわたる詳細な身体データや生活習慣のデータと腸内細菌叢や腸管免疫データについてバイオインフォマティクスを用いて統合的に解析する。この解析から、これまでに知られていなかった生活習慣と腸内細菌との関わりが見いだせる可能性があると考えている。そこからどのような腸管免疫や腸内細菌叢を形成することが健康を維持するうえで重要かが明らかとなり、将来的には生活習慣の改善による従来の予防法に留まらず、プロ・プレバイオティクス、新しい治療薬、予防薬や疾患発症予測のバイオマーカーの開発につながる可能性がある。

E. 結論

本研究では、詳細な生活習慣情報と腸内細菌叢や腸管免疫データについてバイオインフォマティクスを用いて横断的に分析することによって、分子機序の推定や各種測定量との相関予測モデルを構築することを目指している。今年度は、少数のデータを予備的に解析し、それぞれのデ

ータの性質を理解した上で、データをどのように格納するか設計を行った。この設計に基づいてデータベースを構築し、来年度以降データの格納を行い、異なる種類のデータの間の横断的な解析ができる環境を整える予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

Yi-An Chen, Lokesh P. Tripathi, Kenji Mizuguchi: An integrative data analysis platform for gene set knowledge discovery in a data warehouse framework. *Database* (in press).

2. 学会発表

【国内学会:招待講演】

- ① 水口賢司, データウェアハウスによる創薬関連データ統合と解析の実際, 第361回CBI学会研究講演会, 大阪, 2015.4.24(招待講演)
- ② 水口賢司, 健康な日本人の生活習慣と腸管免疫・腸内細菌データベースの構築: バイオインフォマティクスの視点から, シリーズ「薬づくりの新しいR&Dモデルを探る」第11回「薬づくりと健康食品開発を結ぶ」, 東京, 2016.1.15(招待講演)

【国内学会:一般講演】

- ① 陳怡安, ロケシュ テリパチ, 水口賢司, 創薬の初期研究における統合データウェアハウスTargetMine, トーゴの日シンポジウム2015, 東京, 2015.10.5(ポスター)
- ② 長尾知生子, 五十嵐芳暢, 森田瑞樹, 陳怡安, 深川明子, 坂手龍一, 水口賢司, 創薬・疾患研究のためのデータベース検索システム Sagace & Toxygates, トーゴの日シンポジウム2015, 東京, 2015.10.6(ポスター)
- ③ Chen Y.A., Tripathi L.P., Mizuguchi K., The integration of biological data and its application to drug discovery, CBI学会2015年大会, 東京, 2015.10.27(ポスター)
- ④ 水口賢司, 坂手龍一, 深川明子, 五十嵐芳暢, 陳怡安, 長尾知生子, 医薬基盤・健康・栄養研究所の創薬支援データベースとツール, 第38回日本分子生物学会年会第88回日本分子生化学会大会 合同大会, 神戸, 2015.12.1(ポスター)

G. 知的財産権の出願・登録状況

無し

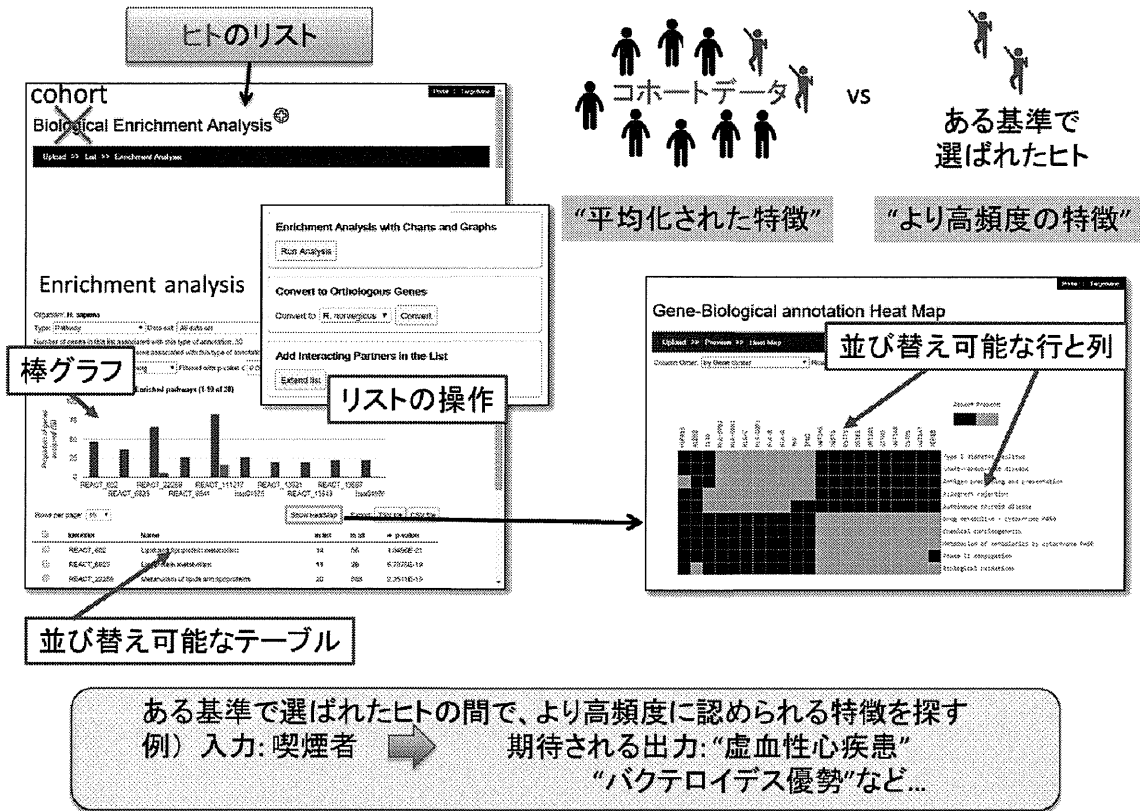


図1. 独自データウェアハウス技術を用いたデータ統合とエンリッチメント解析

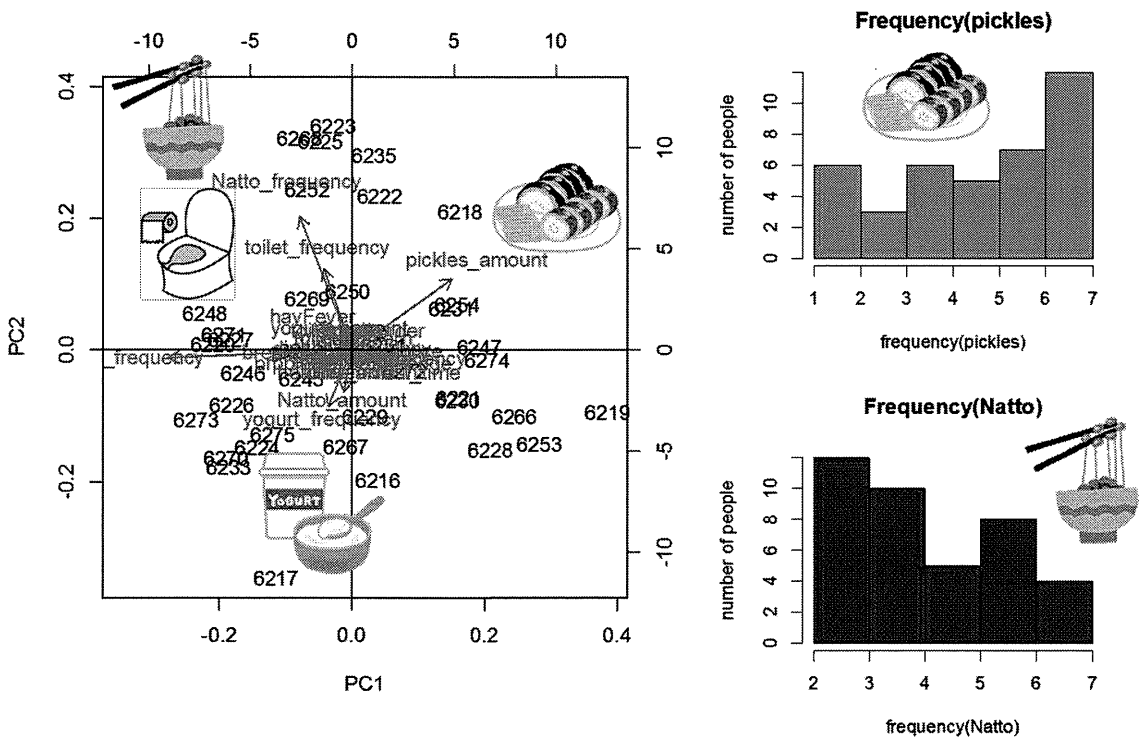


図2. 多項目のデータ間での多変量解析の例(主成分分析)

脂肪酸や胆汁酸のメタボローム解析

研究分担者 窪田 哲也
国立研究開発法人理化学研究所

研究要旨

<目的>環境因子の一つとして注目されている腸内細菌は、食事によりダイナミックにその組成が変化し、肥満・2型糖尿病をはじめとする生活習慣病やアレルギー性疾患との関連性が指摘されている。特に食事に含まれる脂質や食後分泌される胆汁酸は腸内細菌によって分解され吸収されるが、食事や腸内細菌の変化によって分解や吸収が異なることが知られている。そこで本研究ではメタボローム解析を用いて、代謝産物である脂肪酸や胆汁酸を測定する方法を確立する。

<方法>1. 脂肪酸の測定: Folch法で全脂質を抽出し、カラムを用いて脂質クラスを分離する。分離した脂質に内部標準を加えて、誘導化試薬を用いてメチル化を行う。中和、洗浄を行った後、窒素気流下で乾燥して、ヘキサンに再溶解してGC-MSで脂肪酸組成を測定する。2. 胆汁酸の測定: サンプルを凍結乾燥し、緩衝液に再溶解する。溶解液に酵素を加えて脱抱合後し、イオン交換カラムを用いて遊離の胆汁酸分画を調整する。さらに水酸基・カルボン酸基を非極性化するために、ジアゾメタンを用いてカルボン酸基をメチル化、続いてジメチルエチルシリルイミダゾールを用いてジメチルエチルシリルエーテル化を行う。シリカゲルカラムにかけて誘導体化された胆汁酸を調整、乾固後ヘキサン50 μ Lで再溶解しGC-MSで測定する。

<結果>健康者のサンプルであるため、適切な標準化物質を探索し、腸内細菌との関連性が深いと考えられるパルミチン酸、ステアリン酸といった飽和脂肪酸や不飽和脂肪酸、さらにコール酸、デオキシコール酸といった1次胆汁酸や2次胆汁酸などを定量的に測定することができた。

<まとめ>脂肪酸と胆汁酸を定量的に測定することができたが、サンプル数も多いことから、イオン化などの前処理の部分などもう少し簡略化できるかどうか検討する余地があった。

A. 研究目的

肥満・2型糖尿病といった生活習慣病やアトピー性皮膚炎といったアレルギー性疾患は、近年増加の一途を辿っている。これらの疾患の増加は、遺伝素因と高脂肪食といったエネルギー過剰や車社会といった身体活動・運動不足といった環境因子の相互作用に起因すると考えられている。特に環境因子の一つとして最近腸内細菌は注目されており、食事によりダイナミックにその組成が変化し、肥満・2型糖尿病をはじめとする生活習慣病やアレルギー性疾患との関連性が指摘されている。従って腸内細菌を含む環境因子と遺伝素因の相

互作用を明らかにしていくことが極めて重要である。しかしこれまでの腸内細菌に関連した多くの研究は、欧米によるデータであり、欧米とは遺伝的背景や食事・運動といった身体活動も異なっていることから、日本人のデータが必須である。そこで食事・栄養摂取状況や身体活動・運動と生活習慣病との関連について、コホート研究から得られたヒト試料を用いて、バイオインフォマティクス手法などを駆使し、腸内細菌を含めた食・栄養による免疫と代謝の相互メカニズムを踏まえつつ、生活習慣病やアレルギー疾患の新しい予防法確立に資する健康な日本人の腸管免疫と腸内細菌データベースを構築する。また、そのデータベースを横断的に分析することに

より、生活習慣、腸内細菌叢、腸管免疫、疾患発症との相互関係を明らかにすることも目的とする。具体的には、国立健康・栄養研究所が確立し運営している既存のコホート研究

(NEXIS) 600名に対し、1) 腸内細菌叢のメタゲノム解析、2) 腸管免疫指標、3) メタボローム解析、4) 詳細かつ標準的な生活習慣、5) 動脈硬化度、体格、身体組成、体力などの生理指標、6) GWASとインピュテーション法の併用による網羅的遺伝子多型解析する。遺伝子やパスウェイ情報を鍵とし、すでに構築しているデータベースに独自のデータウェアハウス技術等を用い新たな情報を追加した基盤データベースを設計する。特に食事に含まれる脂質や食後分泌される胆汁酸は腸内細菌によって分解され吸収されるが、食事や腸内細菌の変化によって分解や吸収が異なることが知られている。そこで本研究ではメタボローム解析を用いて、代謝産物である脂肪酸や胆汁酸を測定する方法を確立する。

B. 研究方法

国立健康・栄養研究所がすでに確立し運営している大規模介入研究の参加者を対象とし、20～80歳までの男女、合計600名の血漿を用いて、脂肪酸や胆汁酸を測定する。

1. 脂肪酸の測定

Folch法で全脂質を抽出し、カラムを用いて脂質クラスを分離する。分離した脂質に内部標準を加えて、誘導化試薬を用いてメチル化を行う。中和、洗浄を行った後、窒素気流下で乾燥して、ヘキサンに再溶解してGC-MSで脂肪酸組成を測定する(図1a)。

2. 胆汁酸の測定

サンプルを凍結乾燥し、緩衝液に再溶解する。溶解液に酵素を加えて脱抱合後し、イオン交換カラムを用いて遊離の胆汁酸分画を調整する。さらに水酸基・カルボン酸基を非極性化するために、ジアゾメタンを用いてカルボン酸基をメチル化、続いてジメチルエチルシリルイミダゾールを用いてジメチルエチルシリルエーテル化を行う。シリカゲルカラムにかけて誘導体化された胆汁酸を調整、乾固後ヘキサン50 μ Lで再溶解しGC-MSで測定する(図1b)。

(倫理面への配慮)

提供された血漿サンプルは、鍵付きの-20℃で保存する。当研究室ではヒトゲノムを扱わ

ないが、本研究ではヒトゲノムを扱うことから、当研究所ではヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針に則って申請し、倫理委員会で承認されている。

C. 研究結果

血漿中の代謝産物を精度と再現性良く測定するために、血漿からの各種代謝マーカーの抽出方法や測定方法を確立した。また健常者のサンプルであるため、適切な標準化物質を探索し、腸内細菌との関連性が深いと考えられるパルミチン酸、ステアリン酸といった飽和脂肪酸や不飽和脂肪酸、さらにコール酸、デオキシコール酸といった1次胆汁酸や2次胆汁酸などを定量的に測定できた(図2)。

D. 考察

脂肪酸と胆汁酸を定量的に測定することができたが、サンプル数も多いことから、イオン化などの前処理の部分などもう少し簡略化できるかどうか検討する余地があった。

E. 結論

当研究所の倫理審査が3ヵ月に1回しか行われないため、倫理審査の承認を得るために時間を要し、実際のサンプルを測定することができなかった。今後は実際のサンプルを測定しデータを解析していく。

F. 研究発表

1. 論文発表
特になし

2. 学会発表
特になし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
特になし

2. 実用新案登録
特になし

3. その他
特になし

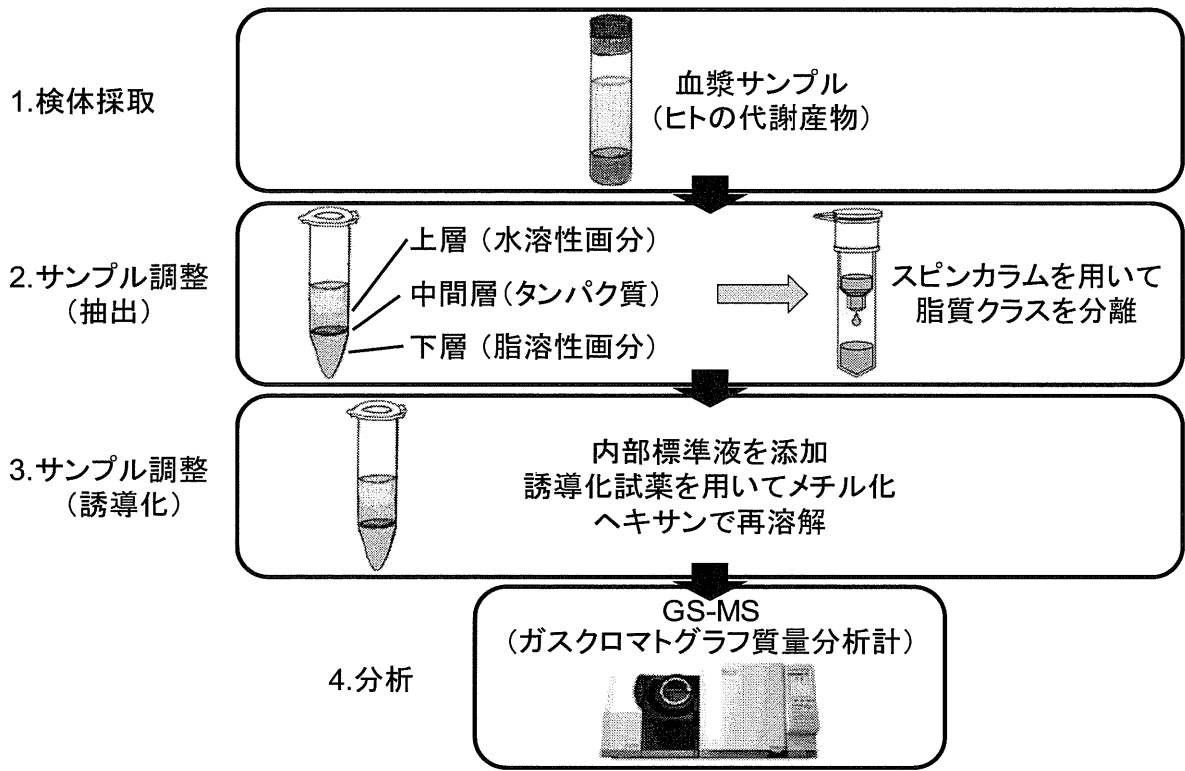


図1a 脂肪酸の測定方法

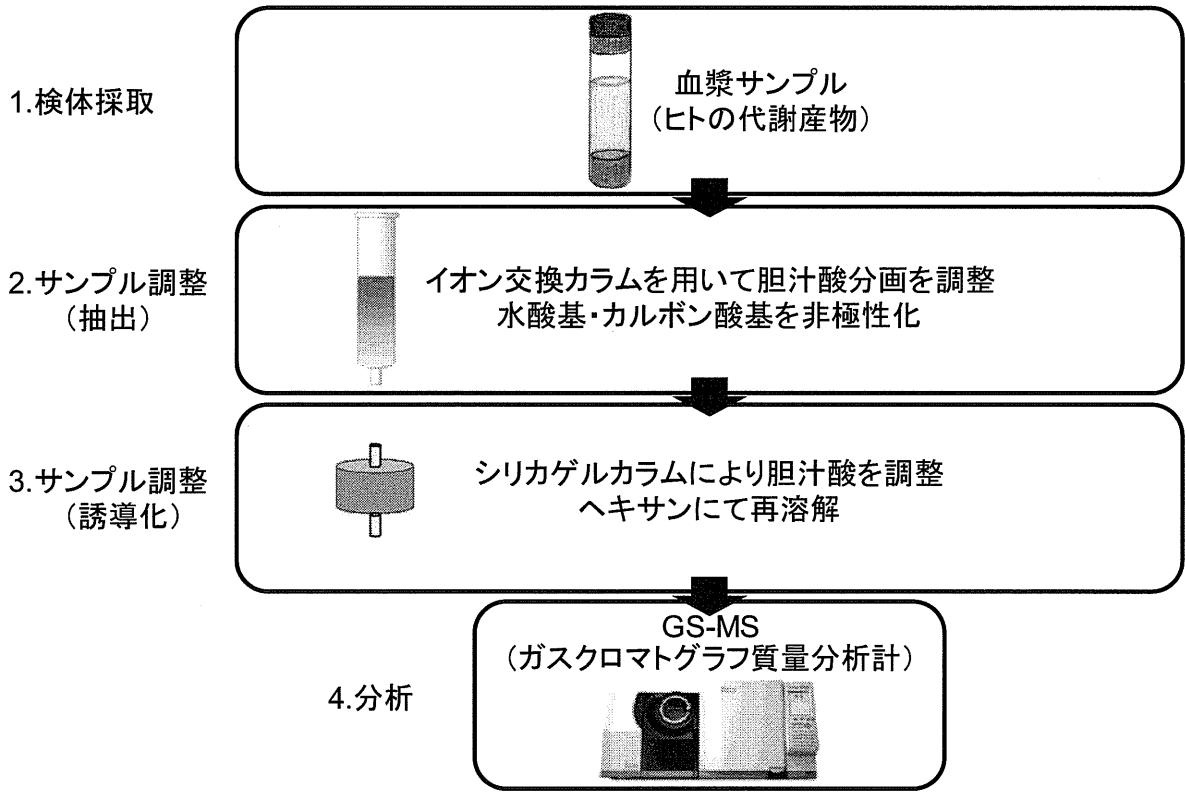


図1b 胆汁酸の測定方法

測定項目

脂肪酸	ラウリン酸	C12:0
	ミリスチン酸	C14:0
	ミリストレイン酸	C14:1 ω 5
	パルミチン酸	C16:0
	パルミトレイン酸	C16:1 ω 7
	ステアリン酸	C18:0
	オレイン酸	C18:1 ω 9
	リノール酸	C18:2 ω 6
	γ -リノレン酸	C18:3 ω 6
	リノレン酸	C18:3 ω 3
	アラキジン酸	C20:0
	エイコセン酸	C20:1 ω 9
	エイコサジエン酸	C20:2 ω 6
	5-8-11エイコサトリエン酸	C20-3 ω 9
	ジホモ γ -リノレン酸	C20:3 ω 6
	アラキドン酸	C20:4 ω 6
	エイコサペンタエン酸	C20:5 ω 3
	ベヘニン酸	C22:0
	エルシン酸	C22:1 ω 9
	ドコサテトラエン酸	C22:4 ω 6
	ドコサペンタエン酸	C22:5 ω 3
	リグノセリン酸	C24:0
	ドコサヘキサエン酸	C22:6 ω 3
	ネルボン酸	C24:1 ω 9

(μg/mL)

測定項目

胆汁酸	コール酸
	タウロコール酸
	グリココール酸
	ケノデオキシコール酸
	タウロケノデオキシコール酸
	グリコケノデオキシコール酸
	ウルソデオキシコール酸
	タウロウルソデオキシコール酸
	グリコウルソデオキシコール酸
	デオキシコール酸
	タウロデオキシコール酸
	グリコデオキシコール酸
	リトコール酸
	タウロリトコール酸
グリコリトコール酸	

(μmol/L)

図2 脂肪酸と胆汁酸を絶対値で測定

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kikuchi N, Miyamoto-Mikami E, Murakami H, Nakamura T, Min SK, Mizuno M, Naito H, Miyachi M, Nakazato K, Fuku N	ACTN3 R577X genotype and athletic performance in a large cohort of Japanese athletes.	Eur J Sport Sci		Epub ahead of print	2015
Gando Y, Murakami H, Kawakami R, Yamamoto K, Kawano H, Tanaka N, Sawada S, Miyatake N, Miyachi M	Cardiorespiratory fitness suppresses age-related arterial stiffening in healthy adults: A 2-year longitudinal observational study.	J Clin Hypertens		Epub ahead of print	2016
J. Kunisawa, Y. Sugiura, T. Wake, T. Nagatake, H. Suzuki, R. Nagasawa, S. Shikata, K. Honda, E. Hashimoto, Y. Suzuki, M. Setou, M. Suematsu, H. Kiyono	Mode of bioenergetic metabolism during B cell differentiation in the intestine determines the distinct requirement for vitamin B ₁ .	Cell Rep	13	122-131	2015
H. Suzuki, J. Kunisawa	Vitamin-mediated immune regulation in the development of inflammatory diseases.	Endocr Metab Immune Disord Drug Targets	15	212-5.	2015
Yi-An Chen, Lokesh P. Tripathi, Kenji Mizuguchi	An integrative data analysis platform for gene set knowledge discovery in a data warehouse framework	Database			in press

研究成果の刊行物・別刷

ACTN3 R577X genotype and athletic performance in a large cohort of Japanese athletes

NAOKI KIKUCHI^{1†}, ERI MIYAMOTO-MIKAMI^{2,3†}, HARUKA MURAKAMI⁴,
TOMOHIRO NAKAMURA⁵, SEOK-KI MIN⁶, MASUHIKO MIZUNO⁷, HISASHI NAITO⁵,
MOTOHIKO MIYACHI⁴, KOICHI NAKAZATO⁸, & NORIYUKI FUKU⁵

¹Sports Training Center, Nippon Sport Science University, Tokyo, Japan, ²Faculty of Sport and Health Science, Ritsumeikan University, Shiga, Japan, ³Japan Society for the Promotion of Science, Tokyo, Japan, ⁴Department of Health Promotion and Exercise, National Institute of Health and Nutrition, Tokyo, Japan, ⁵Graduate School of Health and Sports Science, Juntendo University, Chiba, Japan, ⁶Korea Institute of Sport Science, Seoul, South Korea, ⁷Department of Physical Education, Nippon Sport Science University, Tokyo, Japan, ⁸Department of Health and Medicine, Nippon Sport Science University, Tokyo, Japan

Abstract

Aim: Recent meta-analyses of the literature confirmed the association between the RR+RX genotype of the *ACTN3* R577X polymorphism and elite sprint/power athletic status in Europeans but not in Asians and Africans, while the association between the R577X genotype and elite endurance athlete status is less convincing. The aim of the present study was to investigate the association between the *ACTN3* R577X genotype and elite athlete status in a large Asian (Japanese) cohort of track and field athletes. **Methods:** One-thousand fifty-seven Japanese track and field athletes (627 sprint/power athletes and 430 endurance athletes) and 810 Japanese controls were genotyped for the *ACTN3* R577X polymorphism (rs1815739) by using the TaqMan® SNP Genotyping Assay. **Results:** Elite sprint/power athletes had a higher frequency of the RR+RX genotype than the controls (OR: 1.59, 95% CI: 1.16–2.18; $P = .003$). A significant linear correlation was found between the RR + RX genotype and athlete status (i.e. regional < national < international) in sprint/power athletes (regional: 71%, national: 81%, international: 84%; $P = .001$ for trend) and long-distance runners (regional: 65%, national: 72%, international: 82%; $P = .030$ for trend). **Conclusions:** The data obtained for this large Asian (Japanese) cohort of track and field athletes served to confirm the association between the RR + RX genotype of the *ACTN3* R577X polymorphism and elite sprint/power athlete status and also the association between the *ACTN3* RR + RX genotype and long-distance running athletic status.

Keywords: Sprint/power, endurance, physical performance, polymorphism, Asian

Introduction

Elite athletic performance involves a complex phenotype, determined by numerous environmental factors such as diet, physical training, and social factors. Genetic factors also affect sports performance (De Moor et al., 2007; Heffernan, Kilduff, Day, Pitsiladis, & Williams, 2015). The relationship between certain genetic polymorphisms and athletic performance has recently been reviewed (Ahmetov & Fedotovskaya, 2015; Bray et al., 2009; Fuku, Mikami, & Tanaka,

2013; Wang, Padmanabhan, et al., 2013). Of these polymorphisms, the most studied one is the α -actinin-3 gene (*ACTN3*) R577X genotype. The protein α -actinin-3 is a major component of the Z-disk in fast-twitch skeletal muscle, where it helps to anchor the actin filaments. Homozygosity (XX genotype) for the common nonsense polymorphism R577X in the *ACTN3* gene results in complete deficiency of α -actinin-3 protein in fast-twitch skeletal muscle fibres.

[†]These authors contributed equally to this work.

Correspondence: Noriyuki Fuku, Ph.D., Graduate School of Health and Sports Science, Juntendo University, 1-1 Hiraga-gakueidai, Inzai-city, Chiba 270-1695, Japan. E-mail: noriyuki.fuku@nifty.com

It was previously reported that the *ACTN3* R577X polymorphism is associated with muscle fibre composition (Vincent et al., 2007), muscle strength (MacArthur et al., 2008), and elite sprint performance (Gomez-Gallego et al., 2009; Yang et al., 2003). In addition to these findings, the R allele and RR + RX genotype were found to be associated with top-level, power-oriented athletic performance in a broad variety of ethnic groups, including Israelis (Eynon et al., 2009), Finns (Niemi & Majamaa, 2005), Greeks (Papadimitriou, Papadopoulos, Kouvatsi, & Triantaphyllidis, 2008), Spanish (Santiago et al., 2008), Russians (Druzhevskaya, Ahmetov, Astratenkova, & Rogozkin, 2008), and the Japanese (Kikuchi, Ueda, Min, Nakazato, & Igawa, 2013), but not in those of African ancestry (Scott et al., 2010). Furthermore, we confirmed a linear correlation between the frequency of the *ACTN3* RR + RX genotype and actual competition results (national < international level) in Japanese wrestlers (Kikuchi et al., 2013), as was previously reported for Russian athletes (Druzhevskaya et al., 2008). Taken together, there appears to be a relationship between the *ACTN3* R577X genotype and athletic status (e.g. regional-, national-, and international-level athletes).

On the other hand, several previous studies in Caucasians found that the *ACTN3* XX genotype, conferring a deficiency of α -actinin-3 protein, results in a better endurance performance in athletes (Ahmetov, Druzhevskaya, Astratenkova, Popov, Vinogradova, & Rogozkin, 2010; Clarkson et al., 2005; Shang, Huang, Chang, Zhang, & Huang, 2010). Furthermore, MacArthur et al. (2007) reported that *Actn3*-knockout mice, an animal model of α -actinin-3 deficiency, have fast-twitch skeletal muscles showing a shift towards oxidative metabolism. However, data obtained by Ahmetov et al. (2010) on Russian athletes reported a conflicting result; that is, the RR genotype was associated with endurance performance. In addition, we found a higher tendency for the RR + RX genotype in elite Japanese endurance athletes than the controls, though the sample size was small (Mikami et al., 2014). Thus, the role of the *ACTN3* R577X polymorphism in endurance performance remains largely unclear (Lucia et al., 2006).

By performing meta-analysis, Alfred et al. (2011) reported that the *ACTN3* RR genotype was more common among European sprint/power athletes than in controls. Another meta-analysis (Ma et al., 2013) also reported a positive association between the *ACTN3* RR + RX genotype and sprint/power athletic status in Europeans, but not in Asian and Africans. There are only a few studies published on the association between the *ACTN3* R577X genotype and athletic status in Asian athletes (Kikuchi et al., 2013;

Mikami et al., 2014). Therefore, it is necessary to validate the evidence for an association between the *ACTN3* R577X genotype and athletic status, sprint/power performance, and/or endurance performance in the Asian population by using a large cohort of athletes. Furthermore, subjects of some previous case-control studies consisted of athletes participating in various events (Cieszczyk et al., 2011; Druzhevskaya et al., 2008), which makes it very hard to come to a firm conclusion. The purpose of the present study was to investigate the association between the *ACTN3* R577X polymorphism and sprint/power and/or endurance performance and to determine how this relates to the athletic status (e.g. regional, national and international) in a large Asian cohort consisting of track and field athletes only.

Material and methods

Subjects

The subjects consisted of 1057 Japanese track and field athletes and 810 healthy Japanese controls. We divided these 1057 athletes into two groups, namely, 627 Sprint/power athletes (Regional: 290, National: 293, International: 44) and 430 endurance athletes (Regional: 132, National: 234, International: 64). Furthermore, these athletes comprised 299 short sprinters (100–200 m) (Regional: 138, National: 138, International: 23), 137 long sprinters (400 m) (Regional: 63, National: 65, International: 9), 100 jumpers (Regional: 43, National: 47, International: 10), 66 throwers (Regional: 30, National: 35, International: 1), 25 decathlon and heptathlon athletes (Regional: 16, National: 8, International: 1), 94 middle-distance runners (800–1500 m) (Regional: 51, National: 36, International: 7), and 336 long-distance runners (≥ 3000 m) (Regional: 81, National: 198, International: 57). We also divided these 1057 athletes into 3 groups, namely, regional, national, or international, based on their results in competition, as indicated above. The control subjects were recruited from healthy Japanese men and women living in Tokyo and the surrounding areas. Some of the athletes ($n = 299$) and controls ($n = 649$) in the present study were part of previous research (Mikami et al., 2014). The participants were informed of the purpose and methods of the study, and each of them provided written informed consent for participation. The study was approved by the ethics committees of the Nippon Sport Science University, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology, and National Institute of Health and Nutrition in Japan, and was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki for Human Research.

Genotyping

Total DNA was extracted and isolated from venous blood or saliva by using a QIAamp DNA Blood Maxi Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) or an Oragene-DNA Kit (DNA Genotek, Ontario, Canada) according to the manufacturer's instructions, and then quantified using a NanoDrop (Amersham Biosciences, Amersham, UK) spectrophotometer. The *ACTN3* R577X (rs1815739) polymorphism was genotyped by performing TaqMan® SNP Genotyping Assays (Assay ID: C____590093_1_) and using the StepOnePlus™ Real-Time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA). The genotyping mixture (total of 5 µl) contained 2.5 µl of GTXpress™ master mix, 0.125 µl of assay mix (40×), and 1.375 µl of distilled water mixed with 1 µl of genomic DNA (10ng µl⁻¹) for each reaction. One or two negative controls were included on each plate. TaqMan® assays for genotype calls were analysed by using StepOne™ Software v2.1 (Applied Biosystems).

Statistical analysis

The SPSS statistical package version 16.0 for Windows was used to perform all statistical evaluations. The Pearson's chi-square test was used to confirm that the observed genotype frequencies exhibited a Hardy–Weinberg equilibrium distribution. The linear-by-linear association test for trend was used to determine whether there would be a linear trend in the *ACTN3* RR + RX genotype frequency among the groups with different athletic status. Odds ratios (ORs) and 95% confidence intervals (CIs) were calculated to estimate the degree of contribution of the *ACTN3* R577X genotype (R-dominant model) to elite athlete status. The level of significance was set at $P < .05$.

Results

Genotype frequencies of the *ACTN3* R577X polymorphism in athletes and controls were in Hardy–Weinberg equilibrium (sprint/power athletes: $P = .805$, endurance athletes: $P = .765$, controls: $P = .231$). The frequencies of the genotypes for the control subjects were 21%, 52%, and 27% for RR, RX, and XX, respectively, similar to the frequencies previously reported for groups of the Japanese population (Kikuchi et al., 2013).

Genotype frequencies for each athletic status of sprint/power and endurance athletes, as well as for controls, are shown in Figure 1 and Table I. In order to examine the effect of the *ACTN3* genotype

on elite athlete status (national/international vs. control), the OR of elite athletes according to the *ACTN3* R577X genotype in the R-dominant model (RR + RX vs. XX) was calculated (Table II). There was a significant association between the *ACTN3* R577X genotype and elite sprint/power athletes (OR: 1.59, 95% CI: 1.16–2.18; $P = .003$). Especially, the short sprinter group showed a significantly higher frequency of the RR + RX genotype (OR: 1.53, 95% CI: 1.01–2.34, $P = .045$). Other sprint/power event athletes also had a higher frequency of this genotype. However, there was no significant association in the case of the elite endurance athletes.

Furthermore, when the trends of the frequency of the *ACTN3* genotype in the R-dominant model (RR + RX vs. XX) among athletic status (regional vs. national vs. international) were analysed, we could find significant linear correlations (Table III). International athletes in the sprint/power event showed the highest RR + RX genotype frequency (regional: 71%, national: 81%, international: 84%; $P = .001$ for trend). In addition, the same trend was observed for the throwers (regional: 57%, national: 86%, international: 100%; $P = .008$ for trend). Although there was no significant correlation in the case of all endurance athletes, the long-distance runners showed a significant correlation (regional: 65%, national: 72%, international: 82%; $P = .030$ for trend).

Discussion

The present study is the largest study to investigate the association between the *ACTN3* R577X polymorphism and athletic status in 1057 track and field athletes and 810 controls of Japanese individuals. We observed a higher frequency of the RR + RX genotype of the *ACTN3* R577X polymorphism in elite sprint/power athletes compared with the frequency for the controls. In addition, the frequency of the RR + RX genotype was higher according to the level of athletic status (i.e. regional < national < international) for sprint/power athletes and long-distance runners. These results indicate that the *ACTN3* RR + RX genotype would be associated with elite athlete status not only in sprint/power athletes but also in endurance athletes.

The *ACTN3* gene encodes the α -actinin-3 protein found in fast-twitch skeletal muscle fibres, a sarcomeric protein that is necessary to produce explosive powerful contractions (MacArthur & North, 2007). It was reported that sprint/power athletes have a higher frequency of the *ACTN3* RR + RX genotype, that is, the presence of α -actinin-3 protein in their fast-twitch skeletal muscle, than controls (Yang

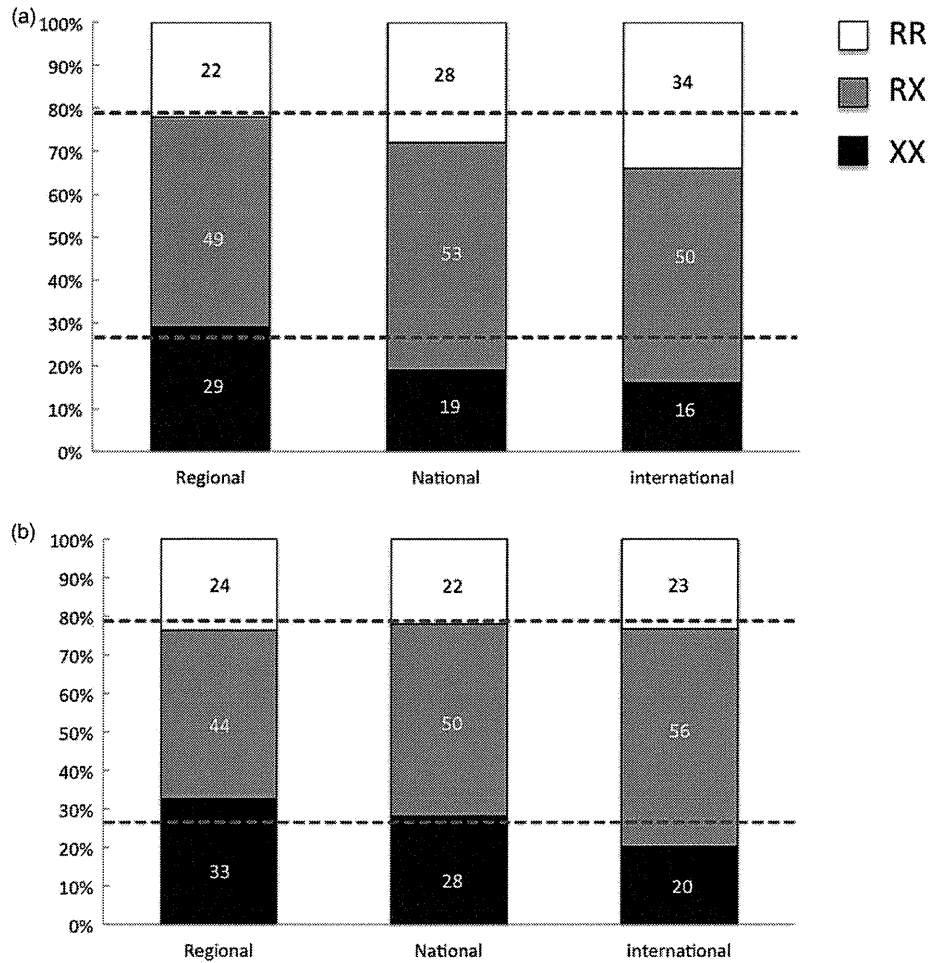


Figure 1. Frequencies of the *ACTN3* R577X genotype in all sprint/power athletes (a) and in all endurance athletes (b). The dashed lines in the graphs define the *ACTN3* genotype frequencies in the controls. There is a higher tendency for the RR + RX genotype frequency according to the level of athletic status (i.e. regional < national < international athletes) observed for both groups of athletes.

et al., 2003). The *ACTN3* RR + RX genotype was also found to be associated with muscle power and strength in both human (Vincent et al., 2007) and animal studies (MacArthur et al., 2007). Thus, it is believed that *ACTN3* might be a gene related to speed and/or power. Although recent meta-analysis reported no association between the *ACTN3* RR + RX genotype and sprint/power performance in Asian and/or African athletes (Ma et al., 2013), the present study based on a large cohort of Japanese athletes confirmed that sprint/power athletes had a higher frequency of this genotype than controls, in agreement with previous studies on Caucasian sprint/power-oriented athletes (Druzhevskaya et al., 2008; Eynon et al., 2009; Yang et al., 2003). In addition, we reported that the frequency of the RR + RX genotype in the *ACTN3* R577X polymorphism tended to be higher in sprint swimmers than in controls from the Asian population, although this

difference was not statistically significant (Wang, Mikami, et al., 2013). Furthermore, there was a linear relationship between the frequency of the *ACTN3* RR + RX genotype and the level of sprint/power athlete status in the present study. Previously, we reported that Japanese wrestlers with high athletic status showed a high frequency of the *ACTN3* RR + RX genotype (Kikuchi et al., 2013). These results suggest that the contribution of the *ACTN3* R577X genotype becomes more apparent in elite competitive athletes. The possible mechanisms underlying the association of the *ACTN3* R577X polymorphism with sprint/power performance have been discussed in detail elsewhere (MacArthur & North, 2007), and include recent findings that the percentage of surface area and number of type IIx fibres are greater in the RR and RX than in the XX genotype group (Vincent et al., 2007), and that muscle from α -actinin-3 knockout mice displays reduced force

Table I. Genotype frequency of *ACTN3* genotype in regional, national, international athletes and in controls

Event	<i>n</i>	Genotype frequency, <i>n</i> (%)											
		All			Regional			National			International		
		RR	RX	XX	RR	RX	XX	RR	RX	XX	RR	RX	XX
Power/sprint athlete	627	162 (26)	318 (51)	147 (23)	65 (22)	141 (49)	84 (29)	82 (28)	155 (53)	56 (19)	15 (34)	22 (50)	7 (16)
Short sprinter (100–200 m)	299	82 (27)	156 (52)	61 (20)	33 (24)	75 (54)	30 (22)	39 (28)	71 (51)	28 (20)	10 (43)	10 (43)	3 (13)
Long sprinter (400 m)	137	40 (29)	65 (47)	32 (23)	21 (33)	24 (38)	18 (29)	17 (26)	35 (54)	13 (20)	2 (22)	6 (67)	1 (11)
Jumper	100	14 (14)	60 (60)	26 (26)	3 (7)	25 (58)	15 (35)	9 (19)	30 (64)	8 (17)	2 (20)	5 (50)	3 (30)
Thrower	66	18 (27)	30 (46)	18 (27)	5 (17)	12 (40)	13 (43)	13 (37)	17 (49)	5 (14)	0 (0)	1 (100)	0 (0)
Decathlon and heptathlon athlete	25	8 (32)	7 (28)	10 (40)	3 (19)	5 (31)	8 (50)	4 (50)	2 (25)	2 (25)	1 (100)	0 (0)	0 (0)
Endurance athlete	430	98 (23)	210 (49)	122 (28)	31 (24)	58 (44)	43 (33)	52 (22)	116 (50)	66 (28)	15 (23)	36 (56)	13 (20)
Middle-distance runner (800–1500 m)	94	22 (23)	43 (46)	29 (31)	12 (23)	24 (47)	15 (29)	9 (25)	16 (44)	11 (31)	1 (14)	3 (43)	3 (43)
Long-distance runner (\geq 5000 m)	336	76 (23)	167 (50)	93 (28)	19 (23)	34 (42)	28 (35)	43 (22)	100 (51)	55 (28)	14 (25)	33 (58)	10 (18)
Control	810	170 (21)	421 (52)	219 (27)									

Table II. OR and chi-square test of elite athletes according to *ACTN3* R577X genotype in the R-allele dominant model

Event	n	OR (95% CIs)		P-value
		XX	RR + RX	
Elite sprint/power athlete	337	1.00	1.59 (1.16–2.18)	.003*
Short sprinter (100–200 m)	161	1.00	1.53 (1.01–2.34)	.045*
Long sprinter (400 m)	74	1.00	1.57 (0.86–2.86)	.141
Jumper	57	1.00	1.53 (0.78–3.00)	.215
Thrower	36	1.00	2.27 (0.87–5.90)	.085
Decathlon and heptathlon	9	1.00	1.28 (0.26–6.21)	.759
Elite endurance elite athlete	298	1.00	1.01 (0.75–1.37)	.932
Middle-distance runner (800–1500 m)	43	1.00	0.76 (0.39–2.09)	.404
Long-distance runner (≥ 3000 m)	255	1.00	1.07 (0.77–1.47)	.687

Note: Elite athlete: sum of the national and international athletes.

*Bold denotes $P < .05$ vs. controls.

generation (MacArthur et al., 2008). In addition, Vincent et al. (2010) described the protective role of the α -actinin-3 protein against muscle damage after excessive training. In addition, Brazilian professional soccer players with the XX genotype exhibited higher creatine kinase activity and higher levels of cortisol compared with individuals with the RR genotype after acute excessive training (Pimenta et al., 2012). These results may suggest that athletes with the RR or RX genotype have an advantageous response to higher intensity training.

Conflicting results were reported with respect to the association between the *ACTN3* R577X polymorphism and endurance performance in athletes (Ahmetov et al., 2010; Yang et al., 2003). Recently, we reported that the RR + RX genotype frequency of the *ACTN3* R577X polymorphism in Japanese middle- and long-distance runners with international athletic status tended to be higher than that of controls, although there was no significant difference when all athletes (national and international levels combined) were compared to controls (Mikami

et al., 2014). It should be noted that the present study using a large Japanese cohort revealed a linear correlation between the frequency of the *ACTN3* RR + RX genotype and level of athletic performance (regional < national < international athletes) in the case of long-distance runners. These results suggest that the *ACTN3* RR + RX genotype would be associated with athlete status in endurance athletes with higher athletic status. Successful athletic training involves the manipulation of training intensity, duration, and frequency, with the implicit goal of maximizing performance and related physiological characteristics. Endurance athletes normally use a high-volume, low-intensity training approach and incorporate moderate volumes of high-intensity training. Athletes with the RR + RX genotype of the *ACTN3* R577X polymorphism have a higher resistance against muscle damage due to high-intensity training than athletes with the XX genotype (Pimenta et al., 2012). Therefore, it is possible that the RR + RX genotype may be beneficial not only to sprint/power athletes but also to endurance

Table III. Genotype frequency and chi-square test for trend of the *ACTN3* R577X genotype in the R-allele dominant model for all athletes

Event	n	Genotype frequency, n (%)						Trend P-value
		Regional		National		International		
		RR + RX	XX	RR + RX	XX	RR + RX	XX	
Sprint/power athlete	627	206 (71)	84 (29)	237 (81)	56 (19)	37 (84)	7 (16)	.001*
Short sprinter (100–200 m)	299	108 (78)	30 (22)	110 (80)	28 (20)	20 (87)	3 (13)	.434
Long sprinter (400 m)	137	45 (71)	18 (29)	52 (80)	13 (20)	8 (89)	1 (11)	.147
Jumper	100	28 (65)	15 (35)	39 (83)	8 (17)	7 (70)	3 (30)	.232
Thrower	66	17 (57)	13 (43)	30 (86)	5 (14)	1 (100)	0 (0)	.008*
Decathlon and heptathlon athlete	25	8 (50)	8 (50)	6 (75)	2 (25)	1 (100)	0 (0)	.157
Endurance elite athlete	430	89 (68)	43 (32)	168 (72)	66 (28)	51 (80)	13 (20)	.080
Middle-distance runner (800–1500 m)	94	36 (71)	15 (29)	25 (69)	11 (31)	4 (57)	3 (43)	.579
Long-distance runner (≥ 3000 m)	336	53 (65)	28 (35)	143 (72)	55 (28)	47 (82)	10 (18)	.030*

*Bold denotes $P < .05$.

athletes. Another possibility is that the presence of the α -actinin-3 protein in fast-twitch skeletal muscle fibres would be beneficial for endurance performance as well as for sprint performance because of the demand for mobilization of fast muscle fibres at the end of a race, even though a high proportion of slow-twitch skeletal muscle fibres is obviously important for endurance performance.

Evidence for an association between the *ACTN3* R577X genotype and muscle phenotypes in untrained subjects and trained athletes is a point of contention (Clarkson et al., 2005; Garatachea et al., 2014; Kikuchi, Nakazato, Min, Ueda, & Igawa, 2014; Ruiz et al., 2011), and it is unclear which *ACTN3* R577X genotype is associated with the greatest response to physical training (Clarkson et al., 2005; Delmonico et al., 2007; Kikuchi et al., 2014). Longitudinal studies will be necessary to explain the effect of the *ACTN3* R577X polymorphism on the response to physical training. In addition to the effects of this polymorphism, multiple other genetic polymorphisms and environmental factors will also influence athletic performance. To uncover these multiple genetic effects, the application of high-throughput technologies, such as genome-wide association studies or next-generation whole genome and/or exome sequencing, will be necessary (Pitsiladis et al., 2013). Uncovering genetic contributions to physical performance and/or its related traits would help determine the possibility of using genetic approaches to individualize the manipulation of training variables to enhance competitive abilities or even to help select appropriate athletic events (i.e. talent identification). These possibilities provide the rationale and motivation for genetic studies of physical performance and/or its related traits.

In conclusion, we found the *ACTN3* R577X genotype to be associated with elite Japanese sprint/power performance in a large Asian cohort. In addition, our results suggested that the *ACTN3* RR + RX genotype is associated with athletic status (e.g. regional, national, and international) for both sprint/power athletes and long-distance runners.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

Funding

This work was supported by a Grant-in-Aid for Research Activity Start-up (26882041 to N. K.), Grants-in-Aid for Challenging Exploratory Research (24650414 to N. F.), Grants-in-Aid for Scientific Research (C) (23500788 to K. N.) from the Ministry

of Education, Culture, Sports, Science, and Technology, and by a Grant-in-Aid for Scientific Research from the Ministry of Health, Labor, and Welfare of Japan (to M. Miyachi).

References

- Ahmetov, I. I., Druzhevskaya, A. M., Astratenkova, I. V., Popov, D. V., Vinogradova, O. L., & Rogozkin, V. A. (2010). The *ACTN3* R577X polymorphism in Russian endurance athletes. *British Journal of Sports Medicine*, 44(9), 649–652. doi:10.1136/bjism.2008.051540
- Ahmetov, I. I., & Fedotovskaya, O. N. (2015). Current progress in sports genomics. *Advances in Clinical Chemistry*. doi:10.1016/bs.acc.2015.03.003
- Alfred, T., Ben-Shlomo, Y., Cooper, R., Hardy, R., Cooper, C., Deary, I. J., ... team, H. A. s. (2011). *ACTN3* genotype, athletic status, and life course physical capability: Meta-analysis of the published literature and findings from nine studies. *Human Mutation*, 32(9), 1008–1018. doi:10.1002/humu.21526
- Bray, M. S., Hagberg, J. M., Perusse, L., Rankinen, T., Roth, S. M., Wolfarth, B., & Boucard, C. (2009). The human gene map for performance and health-related fitness phenotypes: The 2006–2007 update. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 41(1), 35–73.
- Cieszczyk, P., Eider, J., Ostaneck, M., Arczewska, A., Leonska-Duniec, A., Sawczyn, S., ... Krupecki, K. (2011). Association of the *ACTN3* R577X polymorphism in Polish power-orientated athletes. *Journal of Human Kinetics*, 28, 55–61. doi:10.2478/v10078-011-0022-0
- Clarkson, P. M., Devaney, J. M., Gordish-Dressman, H., Thompson, P. D., Hubal, M. J., Urso, M., ... Hoffman, E. P. (2005). *ACTN3* genotype is associated with increases in muscle strength in response to resistance training in women. *Journal of Applied Physiology*, 99(1), 154–163. doi:10.1152/japplphysiol.01139.2004
- Delmonico, M. J., Kostek, M. C., Doldo, N. A., Hand, B. D., Walsh, S., Conway, J. M., ... Hurley, B. F. (2007). Alpha-actinin-3 (*ACTN3*) R577X polymorphism influences knee extensor peak power response to strength training in older men and women. *The Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences*, 62(2), 206–212.
- De Moor, M. H., Spector, T. D., Cherkas, L. F., Falchi, M., Hottenga, J. J., Boomsma, D. I., & De Geus, E. J. (2007). Genome-wide linkage scan for athlete status in 700 British female DZ twin pairs. *Twin Research and Human Genetics*, 10(6), 812–820. doi:10.1375/twin.10.6.812
- Druzhevskaya, A. M., Ahmetov, I. I., Astratenkova, I. V., & Rogozkin, V. A. (2008). Association of the *ACTN3* R577X polymorphism with power athlete status in Russians. *European Journal of Applied Physiology*, 103(6), 631–634. doi:10.1007/s00421-008-0763-1
- Eynon, N., Duarte, J. A., Oliveira, J., Sagiv, M., Yamin, C., Meckel, Y., & Goldhammer, E. (2009). *ACTN3* R577X polymorphism and Israeli top-level athletes. *International Journal of Sports Medicine*, 30(9), 695–698. doi:10.1055/s-0029-1220731
- Fuku, N., Mikami, E., & Tanaka, M. (2013). Association of mitochondrial DNA polymorphisms and/or haplogroups with elite Japanese athlete status. *The Journal of Sports Medicine and Physical Fitness*, 2(1), 17–27. doi:10.7600/jpfs.2.17
- Garatachea, N., Verde, Z., Santos-Lozano, A., Yvert, T., Rodriguez-Romo, G., Sarasa, F. J., ... Lucia, A. (2014). *ACTN3* R577X polymorphism and explosive leg-muscle power in elite basketball players. *International Journal of Sports*

- Physiology and Performance*, 9(2), 226–232. doi:10.1123/ijspp.2012-0331
- Gomez-Gallego, F., Santiago, C., Gonzalez-Freire, M., Muniesa, C. A., Fernandez Del Valle, M., Perez, M., ... Lucia, A. (2009). Endurance performance: Genes or gene combinations? *International Journal of Sports Medicine*, 30(1), 66–72. doi:10.1055/s-2008-1038677
- Heffernan, S. M., Kilduff, L. P., Day, S. H., Pitsiladis, Y. P., & Williams, A. G. (2015). Genomics in rugby union: A review and future prospects. *European Journal of Sport Science*, 1–9. doi:10.1080/17461391.2015.1023222
- Kikuchi, N., Nakazato, K., Min, S. K., Ueda, D., & Igawa, S. (2014). The *ACTN3* R577X polymorphism is associated with muscle power in male Japanese athletes. *Journal of Strength and Conditioning Research*, 28(7), 1783–1789. doi:10.1519/JSC.0000000000000338
- Kikuchi, N., Ueda, D., Min, S. K., Nakazato, K., & Igawa, S. (2013). The *ACTN3* XX genotype's underrepresentation in Japanese elite wrestlers. *International Journal of Sports Physiology and Performance*, 8(1), 57–61.
- Lucia, A., Gomez-Gallego, F., Santiago, C., Bandres, F., Earnest, C., Rabadan, M., ... Foster, C. (2006). *ACTN3* genotype in professional endurance cyclists. *International Journal of Sports Medicine*, 27(11), 880–884. doi:10.1055/s-2006-923862
- Ma, F., Yang, Y., Li, X., Zhou, F., Gao, C., Li, M., & Gao, L. (2013). The association of sport performance with ACE and *ACTN3* genetic polymorphisms: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One*, 8(1), e54685. doi:10.1371/journal.pone.0054685
- MacArthur, D. G., & North, K. N. (2007). *ACTN3*: A genetic influence on muscle function and athletic performance. *Exercise and Sport Sciences Reviews*, 35(1), 30–34. doi:10.1097/JES.0b013e31802d8874
- MacArthur, D. G., Seto, J. T., Chan, S., Quinlan, K. G., Raftery, J. M., Turner, N., ... North, K. N. (2008). An *Actn3* knockout mouse provides mechanistic insights into the association between alpha-actinin-3 deficiency and human athletic performance. *Human Molecular Genetics*, 17(8), 1076–1086. doi:10.1093/hmg/ddm380
- MacArthur, D. G., Seto, J. T., Raftery, J. M., Quinlan, K. G., Huttley, G. A., Hook, J. W., ... North, K. N. (2007). Loss of *ACTN3* gene function alters mouse muscle metabolism and shows evidence of positive selection in humans. *Nature Genetics*, 39(10), 1261–1265. doi:10.1038/ng2122
- Mikami, E., Fuku, N., Murakami, H., Tsuchie, H., Takahashi, H., Ohiwa, N., ... Tanaka, M. (2014). *ACTN3* R577X genotype is associated with sprinting in elite Japanese athletes. *International Journal of Sports Medicine*, 35(2), 172–177. doi:10.1055/s-0033-1347171
- Niemi, A. K., & Majamaa, K. (2005). Mitochondrial DNA and *ACTN3* genotypes in Finnish elite endurance and sprint athletes. *European Journal of Human Genetics*, 13(8), 965–969. doi:10.1038/sj.ejhg.5201438
- Papadimitriou, I. D., Papadopoulos, C., Kouvatzi, A., & Triantaphyllidis, C. (2008). The *ACTN3* gene in elite Greek track and field athletes. *International Journal of Sports Medicine*, 29(4), 352–355. doi:10.1055/s-2007-965339
- Pimenta, E. M., Coelho, D. B., Cruz, I. R., Morandi, R. F., Veneroso, C. E., de Azambuja Pussieldi, G., ... De Paz Fernandez, J. A. (2012). The *ACTN3* genotype in soccer players in response to acute eccentric training. *European Journal of Applied Physiology*, 112(4), 1495–1503. doi:10.1007/s00421-011-2109-7
- Pitsiladis, Y., Wang, G., Wolfarth, B., Scott, R., Fuku, N., Mikami, E., ... Lucia, A. (2013). Genomics of elite sporting performance: What little we know and necessary advances. *British Journal of Sports Medicine*, 47(9), 550–555. doi:10.1136/bjsports-2013-092400
- Ruiz, J. R., Fernandez del Valle, M., Verde, Z., Diez-Vega, I., Santiago, C., Yvert, T., ... Lucia, A. (2011). *ACTN3* R577X polymorphism does not influence explosive leg muscle power in elite volleyball players. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*, 21(6), e34–41. doi:10.1111/j.1600-0838.2010.01134.x
- Santiago, C., Gonzalez-Freire, M., Serratos, L., Morate, F. J., Meyer, T., Gomez-Gallego, F., & Lucia, A. (2008). *ACTN3* genotype in professional soccer players. *British Journal of Sports Medicine*, 42(1), 71–73. doi:10.1136/bjism.2007.039172
- Scott, R. A., Irving, R., Irwin, L., Morrison, E., Charlton, V., Austin, K., ... Pitsiladis, Y. P. (2010). *ACTN3* and ACE genotypes in elite Jamaican and US sprinters. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 42(1), 107–112. doi:10.1249/MSS.0b013e3181ae2bc0
- Shang, X., Huang, C., Chang, Q., Zhang, L., & Huang, T. (2010). Association between the *ACTN3* R577X polymorphism and female endurance athletes in China. *International Journal of Sports Medicine*, 31(12), 913–916. doi:10.1055/s-0030-1265176
- Vincent, B., De Bock, K., Ramaekers, M., Van den Eede, E., Van Leemputte, M., Hespel, P., & Thomis, M. A. (2007). *ACTN3* (R577X) genotype is associated with fiber type distribution. *Physiological Genomics*, 32(1), 58–63. doi:10.1152/physiolgenomics.00173.2007
- Vincent, B., Windelinckx, A., Nielens, H., Ramaekers, M., Van Leemputte, M., Hespel, P., & Thomis, M. A. (2010). Protective role of alpha-actinin-3 in the response to an acute eccentric exercise bout. *Journal of Applied Physiology*, 109(2), 564–573. doi:10.1152/jappphysiol.01007.2009
- Wang, G., Mikami, E., Chiu, L. L., DE Perini, A., Deason, M., Fuku, N., ... Pitsiladis, Y. P. (2013). Association analysis of ACE and *ACTN3* in elite Caucasian and East Asian swimmers. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 45(5), 892–900. doi:10.1249/MSS.0b013e31827c501f
- Wang, G., Padmanabhan, S., Wolfarth, B., Fuku, N., Lucia, A., Ahmetov, I. I., ... Pitsiladis, Y. (2013). Genomics of elite sporting performance: What little we know and necessary advances. *Adv Genet*, 84, 123–149. doi:10.1016/B978-0-12-407703-4.00004-9
- Yang, N., MacArthur, D. G., Gulbin, J. P., Hahn, A. G., Beggs, A. H., Easteal, S., & North, K. (2003). *ACTN3* genotype is associated with human elite athletic performance. *American Journal of Human Genetics*, 73(3), 627–631. doi:10.1086/377590