

[研究報告]

GGCX 遺伝子多型がオステオカルシンの Gla 化と骨密度に及ぼす影響 — 第一報 PCR-SSP 法による GGCX 遺伝子多型判定試験の検討 —

長谷川秀隆¹⁾、神口 浩²⁾、村上 大介¹⁾、松木 秀明³⁾

要 旨

本研究の目的は、 γ -グルタミルカルボキシラーゼ (GGCX) 遺伝子多型が、オステオカルシンの Gla 化と骨密度に及ぼす影響を検討し、将来、骨代謝異常をきたす慢性疾患を持つ人々に骨量低下や骨粗鬆症の予防のための効果的な栄養指導を行うことである。その第 1 段階として、GGCX 多型判定試験の判別法を確立する必要がある。今回、GGCX 遺伝子多型判定試験は、PCR-SSP 法 (Polymerase Chain Reaction-Sequence Specific Primer Method) で行い、2 種類のリバースプライマー (8RA と 8RG) を使用した。PCR 反応条件を検討した結果、Sample 1 は 8RA と 8RG、Sample 2 は 8RA、Sample 3 は 8RG のプライマーによるバンドが検出された。またシーケンス解析の結果、標的とする GG 型、AA 型、GA 型の塩基配列が確認できた。以上のことから、本方法は GGCX 遺伝子多型判定試験の判別法として有効であることが証明された。

キーワード：GGCX 遺伝子多型、低カルボキシル化オステオカルシン、ビタミン K、骨密度

I. 緒 言

慢性腎不全や糖尿病は骨代謝異常をきたし、また長期臥床患者は骨量が低下する傾向にあるため、患者の栄養管理は重要である。これまで骨形成に必要な栄養素として、カルシウムやビタミン D などの微量栄養素が重要とされてきたが、近年、骨形成や骨リモデリングにおけるビタミン K の働きが明らかになってきた¹⁾。図 1 に示すように、ビタミン K を補酵素とする γ -グルタミルカルボキシラーゼ (GGCX) は、オステオカルシン (OC) がカルシウムと結合して骨形成が行われる過程の Gla 化に関与する²⁾。National Center for Biotechnology Information (NCBI) の遺伝子マップによると、GGCX 遺伝子は 2p12 に存在し、G (グアニン) が A (アデニン) に変異する一塩基多型が (SNP: Single Nucleotide Polymorphism) が存在する²⁾。オステオカルシンの Gla 化に及ぼす SNP の影響に関する先行研究は少ないが、曾我部らは、(GGCX) の遺伝子型の違いがビタミン K の作用と低カルボキシル化オステオカルシン (ucOC) の Gla 化に影響を及ぼすことを示唆している³⁾。

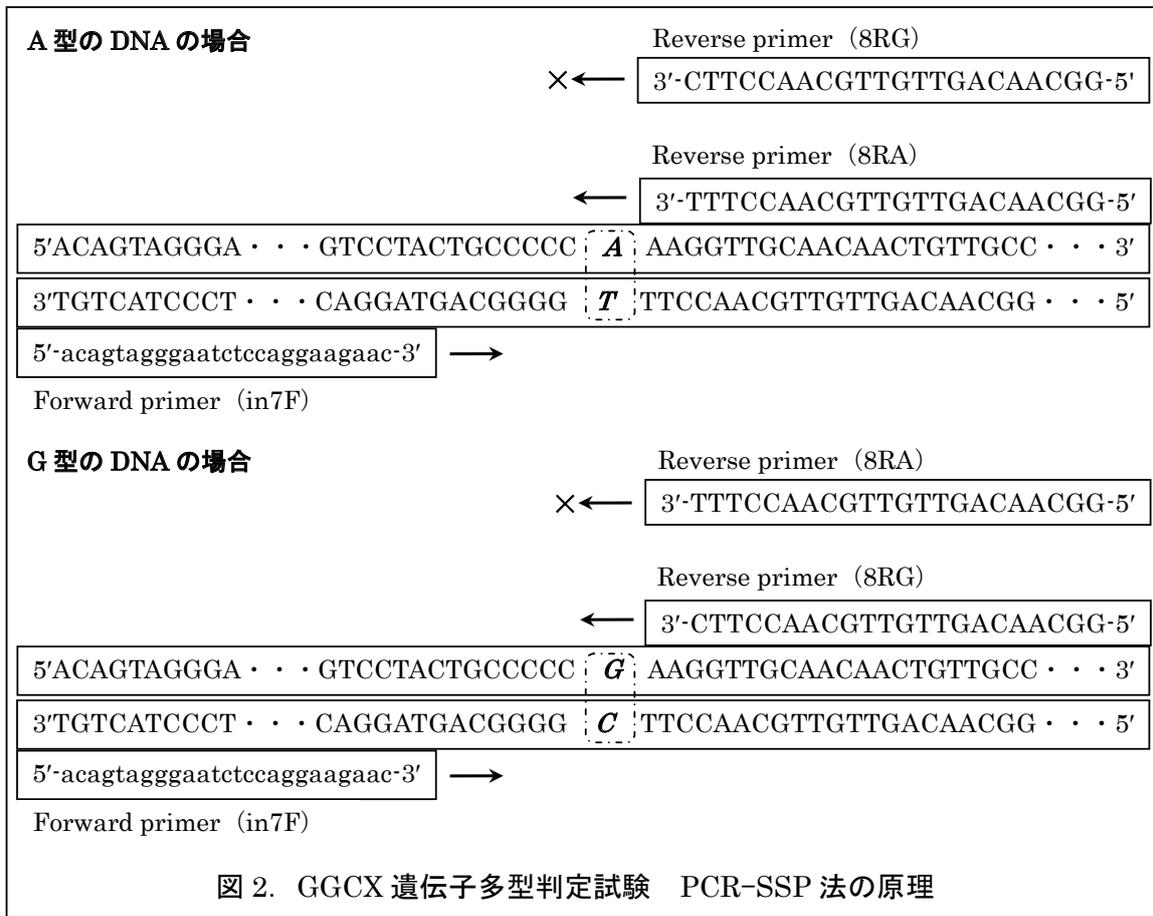
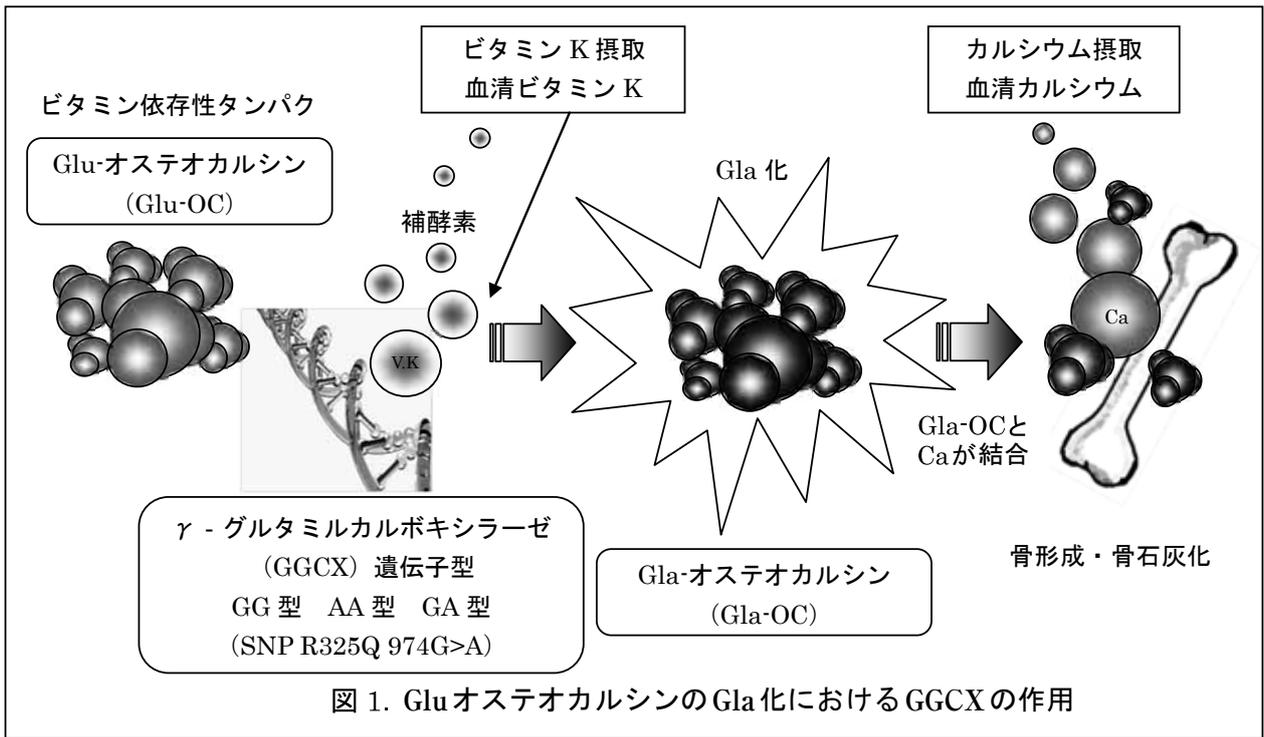
本研究の目的は Glu-OC の Gla 化と骨密度に及ぼす GGCX 遺伝子多型の影響を検討し、将来骨量低下や骨粗鬆症の予防に効果的なビタミン K 摂取の栄養指導を行うことである。

今回、Intron7 Exon8 GGCX 遺伝子の SNP (R325Q, 974G>A rs699664) に対し、PCR-SSP 法 (図 2) により遺伝子多型判定試験を行った結果、GGCX 遺伝子多型 GG 型、AA 型、GA 型のバンドを検出した。また各遺伝子型と推測された GGCX 遺伝子領域のシーケンス解析を行った結果、標的となる遺伝子型の塩基配列が確認できたので報告する。

1) 弘前医療福祉大学保健学部看護学科 (〒236-8102 弘前市小比内 3-18-1)

2) 東海大学教育・研究支援センター分子科学部門 (〒259-1193 神奈川県伊勢原市下糟屋 143)

3) 東海大学健康学部看護学科 (〒259-1193 神奈川県伊勢原市下糟屋 143)



II. 研究方法

1. 調査対象者：共同研究者と A 大学教職員の男女 8 名 (平均年齢 47 歳)
調査期間：2009 年 11 月 14 日～2010 年 3 月 31 日
倫理的配慮：2009 年 9 月に東海大学健康科学部倫理委員会の承認を受け、対象者に研究の趣旨を説明し、同意後に末梢血を採取した。
2. 研究の役割分担
 - 1) 検体採取、遺伝子解析、栄養調査、統計学的解析：長谷川秀隆
 - 2) 検体採取、遺伝子解析・指導：神口浩
 - 3) 血液検査データの集計：村上大介
 - 4) 栄養調査、統計学的解析、測定に関する総括：松木秀明
3. GGCX 遺伝子多型判定試験の方法
 - 1) DNA の抽出方法：TritonX-100, Guanidine-HCl 抽出法
 - 2) GGCX 遺伝子多型判定試験の方法
PCR-SSP 法 (Polymerase Chain Reaction-Sequence Specific Primer Method) による GGCX 遺伝子多型判定試験を行った。
 - 3) PCR 装置：Veriti® Thermal Cycler Applied Biosystems 社製
 - 4) 使用したプライマー (SIGMA-ALDRICH 社製 Oligonucleotide primer)
 - (1) Forward primer (GGCX-in7F) 5'-ACAGTAGGGAATCTCCAGGAAGAAC-3'
 - (2) 2 種類のリバースプライマー
 - ① Reverse primer (GGCX 8RA) 5'-GGCAACAGTTGTTGCAACCTTT-3'
 - ② Reverse primer (GGCX 8RG) 5'-GGCAACAGTTGTTGCAACCTTC-3'
 - (3) PCR 用酵素
Roche 社製 Fast Start High Fidelity PCR System
 - (4) PCR の反応条件
PCR 前に 96℃ 2 分間加熱 — 変性 96℃ 10 秒間 — アニーリング 62℃、63℃、64℃ 各 15 秒間 — 伸長 72℃ 30 秒間を 40 サイクル行い、72℃ 5 分間維持した (図 3)。
 - (5) 電気泳動
PCR 産物を 1.5% アガロース TBE バッファーで電気泳動を行い (50V 1 時間)、エチジウムブロマイド (EtBr) 染色を行った。
 4. シークエンス解析
使用したデータベース⁴⁾
LOCUS EU135733 16504 bp DNA linear HUM 12-SEP-2007
DEFINITION Homo sapiens gamma-glutamyl carboxylase (GGCX) gene, complete cds.
ACCESSION EU135733
PCR-SSP 法で GG 型、AA 型、GA 型と判定されたゲノム DNA に対し、シークエンス用に合成した GGCX-8Rseq と GGCX-in7F を用いて PCR を行なった。PCR 産物 (813bp) を切り出し精製してシークエンス用試料とした。
使用したプライマー：① GGCX-8Rseq 5'-ctgcaaaccagccccattc-3'
② GGCX-in7-F 5'-acagtagggaatctccaggaagaac-3'
 - 1) リバース側からのシークエンス解析
GGCX 8 Rseq でリバース側からのシークエンス解析を行った。
 - 2) フォワード側からのシークエンス解析
GGCX-in 7 Fseq でフォワード側からシークエンス解析を行った。
使用したプライマー：GGCX-in7Fseq 5'-ggaacacctgggagaagtc-3'

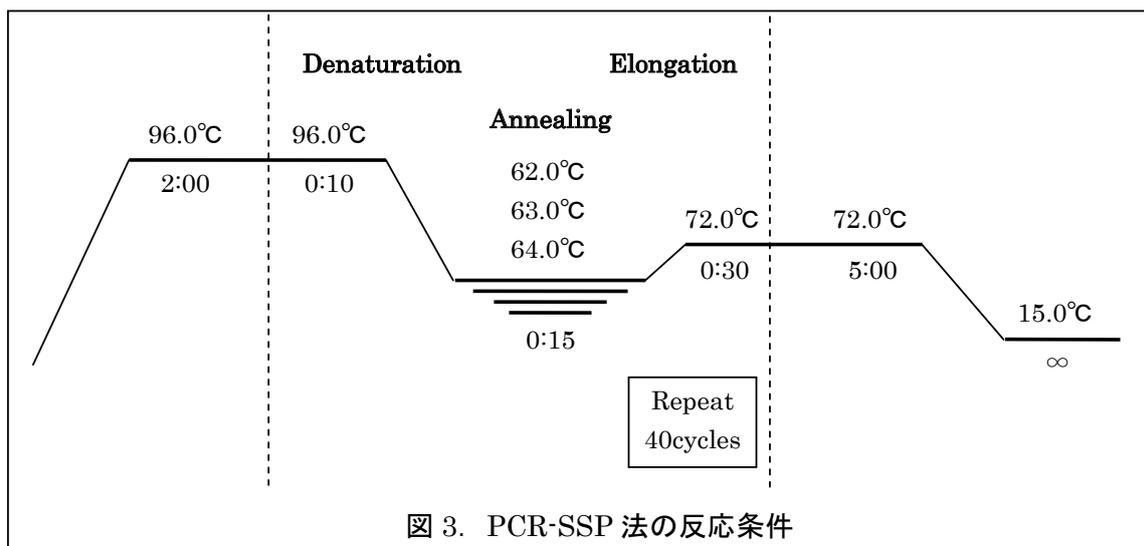


図 3. PCR-SSP 法の反応条件

Ⅲ. 結果

62℃、63℃、64℃の条件でアニーリングを行った結果を図4に示した。今回の実験で増幅されるPCR産物の長さは563bpであり、電気泳動の結果500bpと600bpのマーカーの間にDNAパターンが確認できた。Sample 1は8RAと8RG、Sample 2は8RA、Sample 3は8RGのプライマーによる3種類のバンドが出現した。62℃、63℃ではSample 3にマイナーバンドが認められたが、64℃ではほとんど見られなかった。

プライマー GGCX-in7Fとプライマー GGCX-8RseqでPCRを行い、シーケンス解析の結果を図5に示した。リバーズ側のシーケンス解析であるため、データベースの表記の塩基配列は相補鎖で示されている。Sample 1はヘテロ接合型、Sample 2とSample 3はホモ接合型であることが確認された。さらにリバーズ側からのシーケンス解析で使用したPCR産物を切り出し精製し、フォワード側からシーケンス解析を行った結果、Sample 1はヘテロ接合型、Sample 2とSample 3はホモ接合型であることが確認された(図6)。

シーケンス解析の結果、リバーズ側とフォワード側からの塩基配列が一致した。このことから、Sample 1はGGCX遺伝子GA型、Sample 2はAA型、Sample 3はGG型であることが確認できた。これにより今回のPCR-SSP法によるGGCX遺伝子多型判定試験の条件は確立されたと考えられる。

Ⅳ. 考察

骨代謝において、Glu-OCがGGCXによってGla化される際、GGCX遺伝子型によりucOC/intactOCに差があり、血清Caとの結合に影響を及ぼすことが考えられる。曾我部らの研究では、血清ビタミンK₂のメナキノン(MK-7)とucOC/intactOCとの相関について、GG型は $r=-0.572$, $p=0.003$ 、AA型は $r=-0.143$, $p=0.787$ 、Ga型は $r=-0.260$, $p=0.166$ という結果を示し、ビタミンK摂取量とucOC/OC比の関連については負の相関関係($r=-0.331$, $p=0.010$)を示したと報告している⁵⁾。西村らが行ったucOC測定キットを用いた臨床検討では、骨代謝が盛んな10代よりも閉経後の50代の女性の方がucOCは高値であった⁶⁾。またBinkleyらは、ビタミンK₁(フィロキノン)投与量と血清ucOCの低下についての介入試験を行ったが、投与量が500 μ g/日を超えるとucOCが有意に低下したと報告している⁷⁾。GGCXの酵素としての働きやオステオカルシンのGla化への影響を検討するためには、骨におけるビタミンKの不足状態を反映するとされるucOCと骨代謝マーカーである血清OCを測定し、ucOC/OC比を算出することが必要とされている。このucOC/OC比が低いほどGGCXの酵素としての働きが高まり、オステオカルシンのGla化が促進している状態であることが推測される。ビタミンK₂は納豆、チーズなどの食品に多く含まれるが、2007年に我々が女子大学生を対象に調査した結果、骨密度が高い群は乳製品の摂取頻度が多かった。二項ロジスティック回帰分析の結果、乳製品を摂取しない場合、骨密度が低下するオッズ比は2.142であった($p<0.05$)⁸⁾。また若年男性を対象とした、ビタミンK

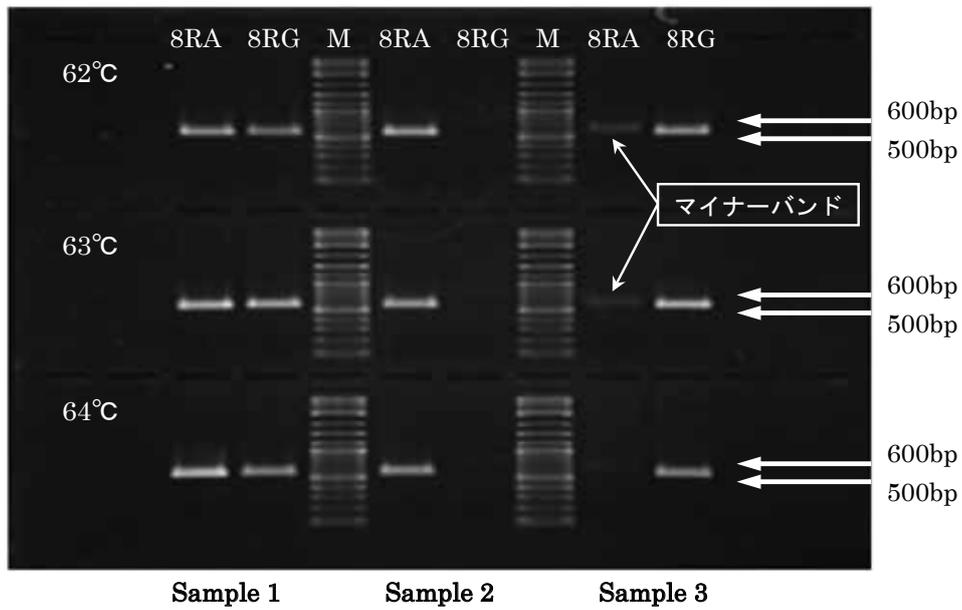


図 4. PCR-SSP 法で検出された GGCX 遺伝子パターン

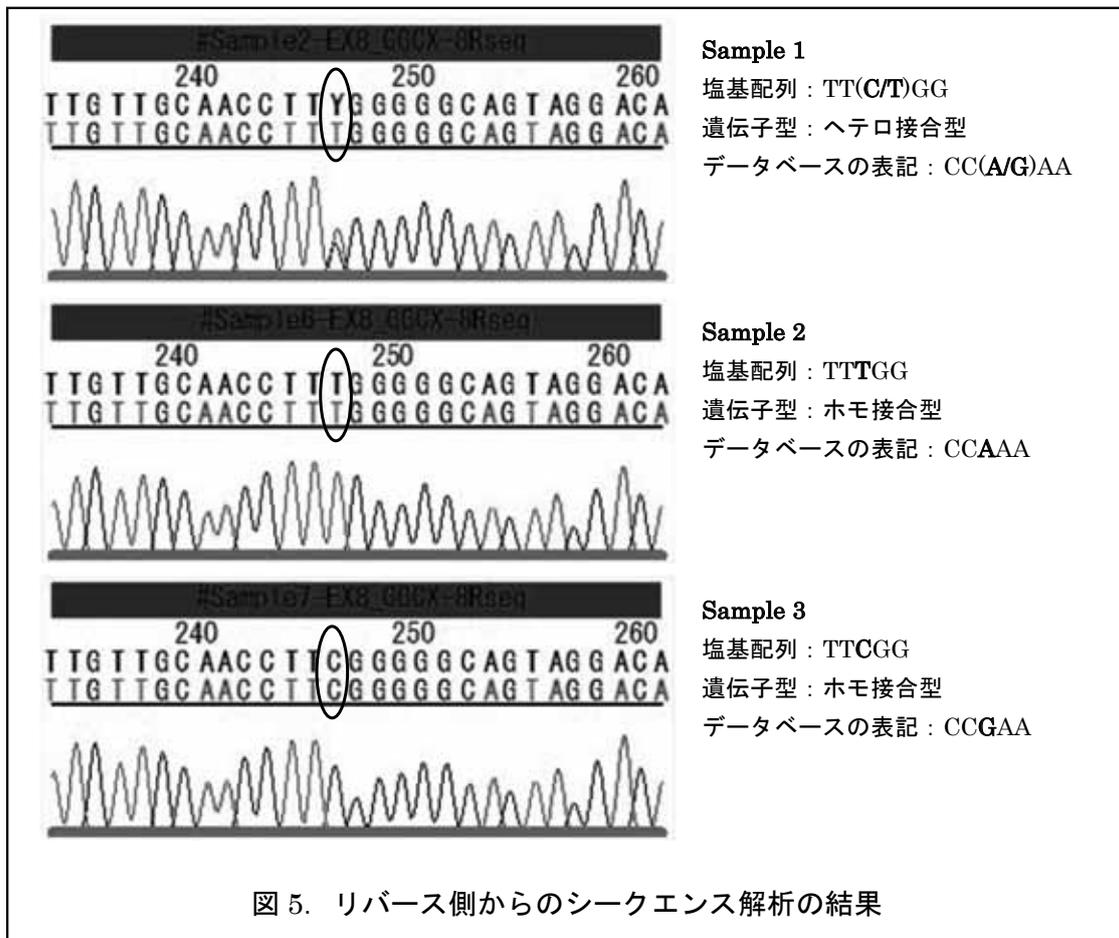
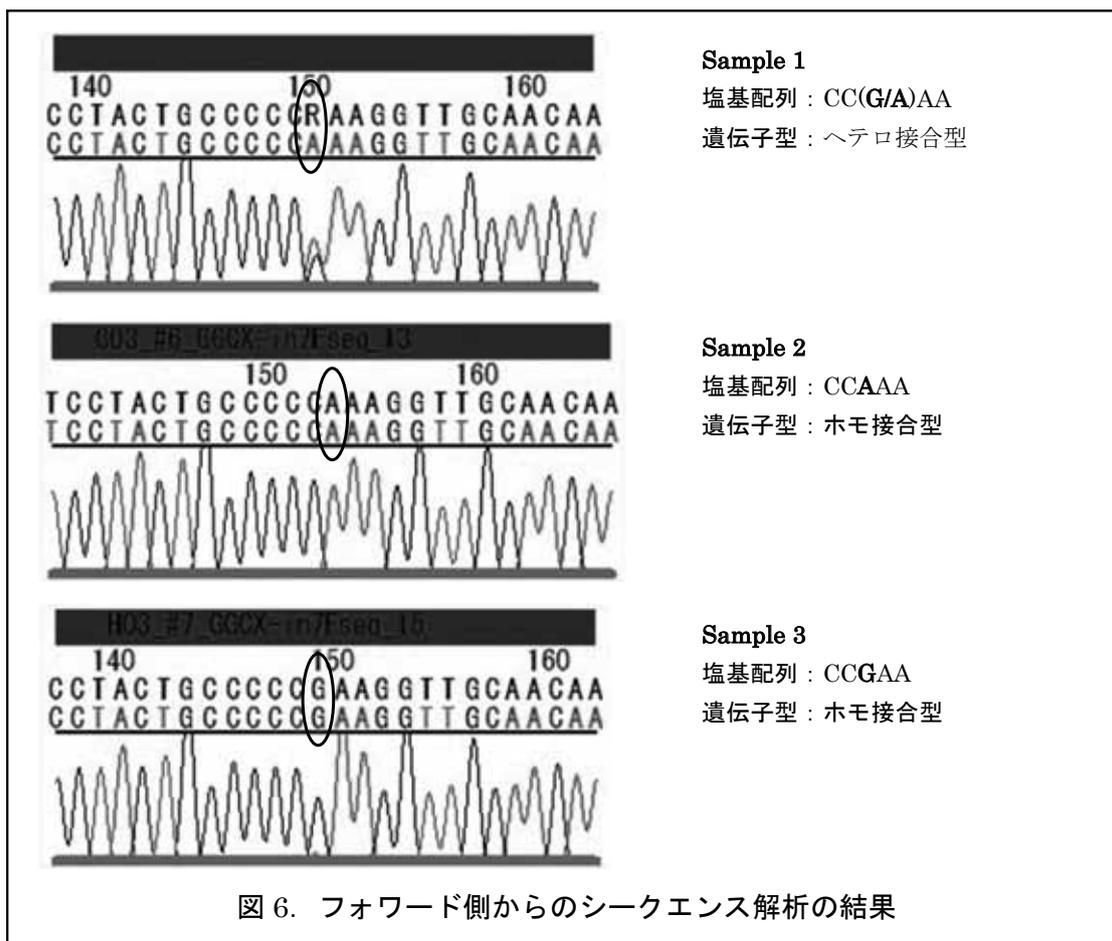


図 5. リバース側からのシーケンス解析の結果



摂取量と血清ビタミン K 濃度との関連を調査した研究では、野菜由来のビタミン K 摂取量は、血清フィロキノン濃度と正の相関を示し ($r=0.337$, $p=0.009$)、納豆由来のビタミン K 摂取量は、血清メナキノン (MK-7) との正の相関関係 ($r=0.663$, $p<0.001$) を示している⁹⁾。以上のことから、摂取した食事に含まれるビタミン K の種類と摂取量、血清ビタミン K₁ およびビタミン K₂ 濃度、ucOC/OC 比、骨密度との関連について、GGCX 遺伝子型の違いによる差を検討する必要がある。

V. 結論と今後の研究課題

- 1) PCR-SSP 法による GGCX 遺伝子多型判定試験の判別法が確立された。
- 2) 今後の研究課題として、ビタミン K 摂取量、血清ビタミン K 濃度、ucOC/OC 比、血清 Ca 濃度、骨密度、骨代謝マーカー (骨型アルカリホスファターゼ、I 型コラーゲン架橋 N 末端テロペプチド) について GGCX 遺伝子型間で比較を行い、GGCX 遺伝子型が OC の Gla 化と骨密度に及ぼす影響を検討する。

(受理日 平成 25 年 2 月 27 日)

参考文献

- 1) 岡野登志夫, 津川尚子, 須原義智, 中川公恵, 鎌尾まや: 骨折予防からみたビタミンKの栄養状態. *Osteoporosis Japan* 16(2): 159-164, 2008
- 2) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp?term=ggcx%20rs699664>
- 3) Tsugawa N, Shiraki M, Suhara Y, et al: Vitamin K status of healthy Japanese women; age-related vitamin K requirement for γ -carboxylation of osteocalcin. *Am J Clin Nutr* 83: 380-386, 2006
- 4) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/EU135733>
- 5) Sogabe N, Tsugawa N, Maruyama R et al: Nutritional effect of gamma-glutamyl carboxylase gene polymorphism on the correlation between the vitamin k status and gamma-carboxylation of osteocalcin in young males. *J Nutr Sci Vitaminol* 53: 419-425, 2007
- 6) 西村 順, 荒井紀光, 藤松順一: 電気化学発光免疫測定法 (electrochemiluminescence immunoassay: ECLIA) による血清中ucOC測定用キット「ピコルミ ucOC」の性能検討. *医学と薬学* 57: 523-535, 2007
- 7) Binkley NC, Krueger DC, Kawahara TN, Engelke JA, Chappell RJ, Suttie JW: A high phyloquinone intake is required to achieve maximal osteocalcin gamma-carboxylation. *Am J Clin Nutr* 76: 1055-60, 2002
- 8) 松木秀明, 三ツ井陳雄, 門馬歩美, 長谷川秀隆, 横山公通, 宮崎康文: 女子大生の生活習慣と骨密度に関する研究. *日本公衆衛生雑誌* 第67回日本公衆衛生学会総会抄録集: 439, 2008
- 9) 五関-曾根正江: γ -glutamy carboxylase 遺伝子多型と栄養因子. *骨粗鬆症治療* 8(3): 199-204, 2009

Effect of polymorphisms in the gamma-glutamyl carboxylase gene *GGCX* on gamma-carboxylation of osteocalcin and bone mineral density: PCR-SSP-based genotyping

Hidetaka Hasegawa¹⁾ Hiroshi Kamiguchi²⁾ Daisuke Murakami¹⁾ Hideaki Matsuki³⁾

1) Hirosaki University of Health and Welfare (3-18-1 Sanpinai, Hirosaki, 036-8102, Japan)

2) Tokai University Education and Research Support Center (143 Shimokasuya, Isehara, Kanagawa, 259-1193, Japan)

3) Tokai University School of Health Sciences (143 Shimokasuya, Isehara, Kanagawa, 259-1193, Japan)

Abstract

The purpose of our study was to examine the relationship between gamma-carboxyglutamic acid, osteocalcin regulated bone density, and polymorphisms in the γ -glutamyl carboxylase (*GGCX*) gene. We also aimed to provide effective nutrition education about the risks of low bone-mineral density and mitigating the risks of osteoporosis to people who are predisposed to potential bone metabolism disorders. For further research, there is a need for PCR-SSP-based genotyping studies for detecting polymorphisms in *GGCX*. In this experiment, *GGCX* genotyping was carried out using PCR-SSP, using 2 types of reverse primers. In the PCR-SSP results, Sample 1 showed 2 bands amplified by primers 8RA and 8RG, Sample 2 showed a band that was amplified by primer 8RA, and Sample 3 showed a band amplified by 8RG. Sequence analysis showed that the nucleotide sequences of the type GG, AA, and GA were the targets that could be confirmed. In conclusion, we found that PCR-SSP has a potential to be a valuable method for analyzing genetic polymorphisms in *GGCX*.

Key Words: *GGCX* genotype testing, undercarboxylated osteocalcin, Vitamin K, bone mineral density