サイログロブリン遺伝子の点突然変異による 先天性家族性甲状腺腫の1例

獨協医科大学内分泌内科¹⁾, 同 第1病理学²⁾, 同 第1生理学³⁾

家入 蒼生夫¹⁾, 黒田 久元¹⁾, 江本 達志¹⁾,
正和 信英²⁾, 長谷川 薫³⁾, 下田 新一¹⁾

Identification of a 3' Splice Site Mutation in the Thyroglobulin Gene in a Case of Congenital Familial Goiter

Tamio IEIRI¹⁾, Hisamoto KURODA¹⁾, Tatsushi EMOTO¹⁾,
Nobuhide MASAWA²⁾, Kaoru HASEGAWA³⁾ and Shin-Ichi SHIMODA¹⁾

1) Department of Endocrinology and Internal Medicine

2) Department of Pathology

3) Department of Physiology, Dokkyo University School of Medicine,
Mibu, Tochigi 321-02, Japan

A case of congenital familial goiter with impaired thyroglobulin (Tg) synthesis has been reported. The patient is the fifth in a family of six children, three of whom have a goiter. The parents are cousins. The patient's thyroid function tests showed low T₄ (1.0 μ g/dl) and free T₄ (0.2ng/dl), normal or slightly increased T₃ (1.8ng/ml) and free T₃ (7.4pg/ml), and high TSH (57 μ U/ml). Serum Tg was 5.1ng/ml (normal <30). The thyroidal ¹²³I-uptake was 59.8% before and 54.5% after perchlorate test. Gel filtration with Bio-Gel A 5m demonstrated the presence of albumin-like protein probably iodinated as a major protein in the thyroid and very low content of Tg which was smaller than the normal 19S Tg. Histologically microfollicular adenoma and negative Tg immunostaining were the dominant findings. Segregation of Tg alleles in the family was studied by Southern blotting with a probe revealing a diallelic RFLP. The results demonstrated that the affected siblings had received the same alleles from both parents and were homozygous for the RFLP. Northern blotting analysis of the goiter RNA with a Tg probe revealed that, whereas the amount of Tg mRNA was normal, its size seemed slightly reduced. PCR amplification of Tg mRNA as six overlapping cDNA fragments demonstrated that a 200bp fragment was missing from the 5' region of the goiter mRNA. Subcloning and sequencing of the cDNA fragments, and of the patient's genomic DNA amplified from this region, revealed that this aberrant splicing is due to a cytosine to guanine transversion at position minus 3 in the acceptor splice site of intron 3. The presence in exon 4 of a putative donor tyrosine residue (tyr 130) involved in thyroid hormone formation provides a coherent explanation of the hypothyroid

status of the patient. To our knowledge, this is the first identified mutation responsible for congenital familial goiter in humans.

Key words : thyroglobulin gene, splicing mutation, point mutation, congenital goiter, familial goiter

緒 言

甲状腺腫を伴うクレチン症の病因としてのサイログロブリン (Tg) の合成障害 (以下, 本症) は, 約20%の頻度であるといわれている¹⁾。本症に関して, これまでヒト及び動物モデルにおいて多くの報告があり, Tg をコードする遺伝子の何らかの変異が想定されていた^{2)~5)}。

ヒトの本症の詳細な研究は, 本症が比較的稀である事や L-thyroxine (T₄) の補充療法で甲状腺腫を縮小し得ることがある事などから外科的手術に至る例が少なく, 遺伝子レベルでの解析は不十分であった。こうした状況において, DNA 多型 (RFLP)⁶⁾の証明, 正常⁷⁾あるいは低下した⁸⁾Tg mRNA に関する報告がなされ, 本症の不均一性が想定されていた²⁾。

一方, afrikaner cattle の本症で, Tg 遺伝子の Exon 9内に生じた cytosine (C) から thymine (T) への変異による splicing の異常から Exon 9が脱落し, 正常の8.4-kilobase (kb) Tg-mRNA より1.1-kb 短い異常 Tg mRNA が報告された⁹⁾。

これまで我々の知る限り, ヒトの本症の Tg 遺伝子の変異を証明した報告はない。我々は, Tg 遺伝子 intron 3の3'端 (acceptor splice site) に生じた C から Guanine (G) への変異による splicing の異常で Exon 4が脱落した mRNA により発症した先天性家族性甲状腺腫の1例を経験したので, ここにその詳細について報告する。

症 例

本症例の病歴, 経過, 臨床内分泌学的検査結果及び切除された甲状腺組織についての生化学的解析結果は, 既に報告した¹⁰⁾ので, ここでは要点のみ記す。患者は, 2度の甲状腺摘除にもかかわらず気管の圧迫症状を来すほど肥大してきた甲状腺腫 (Fig. 1) を主訴に来院した33歳の女性である。両親は従兄弟同士であり, 6人兄弟のうち3人に同様の甲状腺腫が認められている (Fig. 4, 家系図)。

入院時の甲状腺機能検査成績は原発性甲状腺機能低下症の所見であった (T₄:1.0 μ g/dl, free T₄:0.2ng/dl, T₃:1.8ng/ml, free T₃:7.4pg/ml, TSH 57.0 μ U/ml)¹⁰⁾。PBI はむしろ高値を示し (8.7 μ g/dl), T₄との間に解離が見られた¹⁰⁾。パークロレイト試験 (400mg) 前後での甲状腺¹²⁵I 摂取率は, それぞれ59.8%, 54.5%であり, 有機化障害の存在は否定された¹⁰⁾。

切除された甲状腺組織抽出物の Bio-Gel A-5m によるゲル濾過の結果も既に報告した¹⁰⁾。すなわち, タンパクを示す280nmの吸収のピークは, 正常の19S Tg の示す位置より分子量の小さい位置に現れた。この位置は, PBI ならびに RIA によるアルブミンのピークと一致した。RIA による Tg のピークは, このピークとは異なっており, しかも正常の19S-Tg の示す位置とも異なるやや分子量の小さい位置に出現した。この Tg の RIA の結果から, 本例の甲状腺内 Tg 含量を推定したところ, 正常の数百分の一であった。

Fig. 1 The large asymmetrical and multinodular goiter observed in a case of congenital goiter with Tg synthesis defect.

手術時に得られた甲状腺組織の数箇所について組織学的に検索した。光顕パラフィン切片を作成し、HE 染色を行うと共に、抗 Tg モノクローナル抗体 (anti-human Tg mouse monoclonal antibody, DAKO 社) を用いて免疫組織学的検索を行った。

甲状腺組織は、不規則に拡張した濾胞や小管状の濾胞を形成して増殖し、線維性隔壁を有して大小の結節を形成していた (Fig. 2)。またごく一部には充実性・小胞巣状に増生する部もみられ、嚢胞形成も多数みられた。間質は浮腫性ないし硝子様蛋白沈着がみられ、新旧の出血像も観察された。濾胞上皮は、部分的に核の大小不同や核クロマチンの増量した異型の増生部もみられ、carcinoma との鑑別を要するが、明らかな malignancy を示唆する所見はなく、全体的には、腺腫様甲状腺腫の像を呈していた。

モノクローナル Tg 抗体による染色で濾胞上皮はまったく陰性であったが他の epitope を認識する抗体を用いた検討が必要であると考えられた。

甲状腺内 peroxidase 活性は、むしろ高く、coupling 活性も正常にあった¹⁰⁾。また Tg 中ヨードチロジンの含量は減少していた¹¹⁾。

Fig. 2 Histologically, the goitrous thyroid showed multiple nodules in various size separated with fibrous stroma, and each nodule consisted of hyperplastic, irregularly enlarged and microtubular follicles. Immunostaining with anti-Tg monoclonal antibody (anti-human Tg mouse antibody, DAKO Co.) revealed no positive grain in the goitrous thyroid (not shown).

材料と方法

Total RNA を本例からの摘除甲状腺，対照として甲状腺腫摘除術の際の近傍正常部位，及び橋本病甲状腺の切除組織から通常の方法¹²⁾で抽出した。Genomic DNA は，EDTA-2Na 入り採血管に採った全血から調製した¹³⁾。

Northern ならびに Southern blotting は Sambrook らのマニュアル¹²⁾¹³⁾に従って行った。プローブは，ヒト Tg cDNA 1663 bp の断片¹⁴⁾をランダム・プライミング法¹⁵⁾で³²P を標識したものをを用いた。

Polymerase chane reaction (PCR) による Tg cDNA の増幅は以下の様に行った。cDNA は，1 μ g の total RNA から reverse transcriptase (RT) 反応により合成した。この反応液の全量は，20 μ l で，reverse primer 50 pmoles, Moloney-Murine Leukemia Virus reverse transcriptase (BRL) 200 Units, RNase inhibitor (RNasin, Promega) 20 Units, Buffer (50 mM KCl, 2.5mM MgCl₂, 100 μ g/ml BSA, 20 mM Tris HCl pH8.4), 各 dNTP 1mM から成っている。室温10分間で primer を hybridize させた後，42℃にて1時間 incubate して cDNA を合成，95℃で逆転写酵素を失活させた。つづく PCR 反応は，全量100 μ l で，RT 反応生成物20 μ l, 10% DMSO, Thermus aquaticus DNA polymerase (Ampli Taq, Perkin Elmer Cetus), Buffer (RT 反応と同じ，ただし dNTP のみ200 μ M) と50p moles の foward primer から成っている。PCR は，35cycle で1cycle は，denaturation 92℃，30秒，annealing 55℃，45秒，Primer extension 72℃，90秒の条件で行った。cDNA 57～1539の増幅に用いた primer は，5' GAGATCTTCACCCCTGCTGGCCTCC 3' (forward, exon 1)，と5' CTCCAGGAGAGAAGCAAGGAATTT 3' (reverse, exon 9) である。Genomic DNA の増幅は，DNA 1 μ g，各 Primer 1 μ g を用いて行った。

増幅生成物は、寒天ゲル電気泳動後、ethidium bromide 染色、紫外線下観察し、Southern blotting により Tg であることを確かめた (Fig. 3)。Genomic DNA の増幅に用いた primer は、5' ATCTAACATTGCTCC 3' (forward, intron 3), と 5' CACATCACA CTGAAC 3' (reverse, exon 4) である。続く cloning を容易にするため、forward primer には Hind III, reverse primer には Xba I の restriction site をそれぞれの 5' 端に付加した。Subcloning は M13mp18 と mp19 に行い、DNA Sequencer (Applied Bio-systems 370A) を用いて両方向から配列を決定した。

Fig. 3 Verification with Southern blotting of the Tg nature of amplified materials from the Tg cDNA fragment (57-1760).

結 果

本例の家系図と Southern blotting の結果を Fig. 4 に示した。1, 2 は両親, 3, 4 は姉妹を示し, それぞれ甲状腺腫のない正常の表現型を示している。5, 6, 7 の 3 名が甲状腺腫を有し, 6 が発端者である。1→, 2→ で示すように, 正常者と異常者の間で restriction fragment length polymorphism (RFLP) は明らかであり, 甲状腺腫を有する 3 名は両親から同じ遺伝子を受継いだ homozygous (2, 2) と考えられ, 両親と正常の姉妹は, heterozygous (1, 2) と考えられる。

次に, Tg mRNA の性状を調べるために行った Northern blotting の結果は, 別に報告したので¹⁶⁾ここには示さない。正常甲状腺や橋本病甲状腺から得られた RNA と本例摘除甲状腺の RNA は, 量的にもまた正常 Tg mRNA で期待されるサイズ 8.5Kb¹⁷⁾¹⁸⁾を示している点でも差はほとんどないと思われた。しかし, この様な検討のみでは Tg mRNA の数 10 から数 100 といった小部分の欠損^{19)~21)}を検出するのは不可能であるので, PCR による cDNA の増幅により本例の Tg mRNA の詳細な構造を解析することにした。

Fig. 4 Family structure and Southern blotting. Ten μ g of genomic DNA from the parents (lane 1 and 2), two healthy children (lane 3 and 4), and three affected children (lane 5 to 7), have been hybridized with a Tg cDNA probe, after restriction with PvuII and Southern blotting. Arrows indicate the polymorphic fragments. The parents and the healthy children are heterozygous (1, 2), and the affected children are homozygous (2, 2).

Tg cDNA を5つの部分に分け、増幅し、寒天ゲル電気泳動でサイズを比較したところ、最も5'に近い部分で正常の断片は期待された長さ1490bpを示したのにたいし、本例では、明らかに短い断片であった (Fig 5a, そのシェーマ Fig. 5b)。これらを Sau3AI で切断し電気泳動し比較すると、Exon 4に相当する204bpの欠落が本例で起こっていると仮定すると泳動パターンを最も良く説明できた。Fig.5aに用いた cDNA 量は、十分量でなかったため明らかでないが、この異常の cDNA は更に短いもう一本の cDNA を含んでいた¹⁶⁾。

この異常の断片の cloning と sequencing から620bpの断片は、exon 4, 360bpの断片は、exon 3, 4, 5がそれぞれ欠落して生じたものであることが判明した¹⁶⁾ (Fig. 6)。

更に、本例と正常の姉の末梢血から得られた genomic DNA について、intron 3と exon 4との境界部分の配列を調べたところ、本例の acceptor splice site の-3位が、正常の cytosine (C) から guanine (G) へ変異していることが証明された¹⁶⁾ (Fig. 6)。

Fig. 5 a,b a. PCR results of the 5' end of Tg mRNA and restriction with Sau 3AI. b. Schematical representation of a. Ethidium bromide visualization of PCR fragments obtained after cDNA amplification with primers. N: normal, G: goiter, M: HaeIII fragment of Φ x 174. The restriction produced a larger band (394bp) in the goiter cDNA, instead of two (310 and 288bps) bands in the normal.

Fig. 6 Schematic representation of the genomic organization of the 5' region of the Tg gene, together with the normal and goitrous (major and minor) cDNA sequences. The C to G point mutation, tyrosine No. 5 (major homogenic acceptor residue), and tyrosine No. 130 (putative donor residue) are indicated with arrows. After skipping by splicing error in goiter mRNA, reading frames were maintained.

考 案

ここに報告した Tg 遺伝子の point mutation により splicing の異常を来し発症した先天性甲状腺腫の1例は、今までのところ我々の知る限り、ヒトにおける Tg 遺伝子発現の異常を証明し得た最初の例である。先天性甲状腺腫をきたす Tg 合成障害の遺伝子異常は、おそらく何種類かある heterogeneous なものと思われ、常染色体劣勢遺伝であると考えられている²⁾。Fig. 4に示す家系図と Southern blotting の結果から、一部の例で常染色体優勢遺伝も報告されているが⁶⁾、本例の発症の原因となった遺伝子の変異は homozygous で、遺伝形式は常染色体劣勢遺伝と考えられる。

本例でみられたような acceptor splice site-3位の変異により splicing の異常を来して発症した β -Thalassemia が最近報告された²²⁾。Intron の最も3' 端の配列は AG で、おそらくすべての intron で共通であろうが²³⁾、この1つ上流は、霊長類では C である確率が74%、T が22%、A が3%で、本症例のように G である確率は、約1%であると考えられている²⁴⁾。この様な事実は、本報告の Tg 遺伝子の変異が先天性甲状腺腫の引き起こすことを支持するものである。

大部分の正常な splicing にもとづく蛋白に小部分の異常な splicing にもとづく蛋白が共存する場合があることが報告されているが⁹⁾²⁵⁾²⁶⁾、本例では exon 4の欠落した Tg mRNA がほぼ正常量合成されており、exon 3, 4, 5の欠落した小部分の Tg mRNA と共存していた¹⁶⁾。このことは、本例の Tg 遺伝子 point mutation がこれら全体の splicing 機構に障害を与えたものである可能性がある。

Tg mRNA の exon 4の欠落は reading frame に影響を与えない²¹⁾ので、本例の甲状腺では、68個のアミノ算の欠落した異常 Tg が合成されていたはずである。この部分は、次の2つの点で注目される。第1は、Tg の N 末端は Cysteine を含む断片の10回の繰返し配列から成っており²¹⁾、これが Tg 一次構造の約半分を占めているが²⁷⁾²⁸⁾、この欠落部分は、その完全な繰返し配列の一つを成している点である。Cystine は Tg の3次構造に重要な役割を果している²⁹⁾と考えられるが、この部分

の欠落が Tg の 3 次構造にどう影響するのかは、不明である。第 2 に、この部分が 130 番目のアミノ酸である tyrosine を含んでおり、これは T₄ 合成の際 coupling 反応の donor となり、acceptor である tyrosine No. 5 と共役するといわれている³⁰⁾。しかし、tyrosine No. 130 が donor tyrosine であるとするには異論もある^{31)~34)}が、本症例の示す結果はむしろ tyrosine No. 130 の T₄ 合成に関する重要性を示唆していると考えられる。Afrikander cattle で報告されている本症は euthyroidism である³⁵⁾。この異常 Tg では、tyrosine No. 5 と No. 130 は、ともに存在している⁹⁾³⁶⁾ことも上記のことを示唆している。

血中 Tg は、本例では測定下限の値を示したが¹⁰⁾、内因性 TSH の増加による刺激で血中濃度が上昇しても良いはずである³⁷⁾。実際、このような症例の報告もある³⁸⁾が、低値をとる場合の方が多いようである³⁹⁾。この理由として、用いた RIA の抗体の認識部位により検出不能となること⁴⁰⁾⁴¹⁾と、或いは、exon 4 を欠いた mRNA からの異常 Tg の血中での半減期が短い可能性などが考えられる。

結 語

Tg 合成障害を呈した先天性家族性甲状腺腫の 1 例についての分子遺伝学的検索の結果、Tg 遺伝子の点突然変異による splicing の異常を証明した。

ここに報告した Tg 遺伝子の変異は、Tg の構造と機能の関係を考える上で貴重な情報を提供している。

ここで採られた解析の方法は、同様な疾患のみならず他の遺伝子異常の解析にも有効な手段であると考えられる。

謝辞

本研究の一部は、昭和 63 年度文部省科学研究費補助金 (海外学術研究) 課題番号 63044027 (代表, 群馬大学内分泌研究所生理学部門, 鈴木光雄教授) による。貴重な切除甲状腺組織を提供していただいた東京都渋谷区伊藤病院伊藤國彦先生その他スタッフの皆様へ感謝いたします。群馬大学内分泌研究所物理化学部門, 現東京理科大学, 樽谷 修教授には甲状腺蛋白のゲル濾過, また千葉大学薬学部, 細谷東一郎教授には, coupling assay 等でお世話になり感謝致します。獨協医科大学内分泌内科医局員諸兄には, 貴重な考察をいただき感謝致します。本研究は, ベルギー王国ブラッセル自由大学 IRIBHN との協同研究の結果であり, Gilbert Vassart 教授, Dr. Pascale Cochaux, Dr. Hector Targovnik, Dr. Janson Perret ならびに J. Dumont 教授に感謝の意を表します

なお、本論文の一部は J. Clin. Invest. 1991. 88:1901-1905. に発表した。

文 献

- 1) 中嶋博徳: クレチン症. 吉利 和, 中尾喜久, 山形敏一, 三辺 謙, 黒岩義五郎, 山村雄一 監修. 新日本内科学大系 41 内分泌疾患 II. 東京: 中山書店, 1973; 119-132
- 2) Dumont, J.E., G. Vassart and S. Refetoff: Thyroid disorders. Sriver, C.R., A.L. Beaudet, W.S. Sly and D. Valle eds. The metabolic bases of inherited disease. 6th edition. USA, McGraw-Hill Inc. 1989; 1843-1851
- 3) Sterk, A., J.E. van Dijk, G.J.M. Veenboer, A.F.M. Moorman and J.J.M. de Vijlder:

- Normal-sized thyroglobulin messenger ribonucleic acid in dutch goats with a thyroglobulin synthesis defect is translated into a 35,000 molecular weight N-terminal fragment. *Endocrinology* 1989; 124: 477-483
- 4) Lissitzky, S., J. Bismuth, P. Jaquet, M. Castray, M. Michel-Bechet, D.A. Koutras, A.D. Pharmakiotis, A. Moschos, A. Psarras and B. Malamos: Congenital goiter with impaired thyroglobulin synthesis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1973; 36: 17-29
 - 5) Taylor, B.A. and L. Rowe: The congenital goiter mutation is linked to the thyroglobulin gene in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1987; 84: 1986-1991
 - 6) Bass, F., H. Bikker, G.-J. B. van Ommen and J.J.M. de Vijlder: Unusual scarcity of restriction site polymorphism in the human thyroglobulin gene. A linkage study suggesting autosomal dominance of a defective thyroglobulin allele. *Hum. Genet.* 1984; 67: 301-305
 - 7) Cabrer, B., H. Brocas, A.P.-C. V. Pohl, J.J. Navas, H. Targovnik, J.A. Centenera and G. Vassart: Normal level of thyroglobulin messenger ribonucleic acid in a human congenital goiter with thyroglobulin deficiency. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1986; 63: 931-940
 - 8) Targovnik, H., F. Propato, V. Varela, B. Wajchenberk, M. Knobel, H.F. D'Abbronzio and G. Medeiros-Neto: Low levels of thyroglobulin messenger ribonucleic acid in congenital goitrous hypothyroidism with defective thyroglobulin synthesis. *Ibid.* 1989; 69: 1137-1147
 - 9) Rickts, M.H., M.J. Simons, J. Parma, L. Mercken, Q. Dong and G. Vassart: A nonsense mutation causes hereditary goitre in the africaner cattle and unmasks alternative splicing of thyroglobulin transcripts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1987; 84: 3181-3184
 - 10) Ieiri, T., T. Emoto, H. Kuroda, O. Tarutani and S.-I. Shimoda: A case of congenital goiter with impaired thyroglobulin synthesis. Vichayanrat, A., W. Niyyanant, C. Eastman and S. Nagataki, eds. *Recent Progress in Thyroidology*. Bangkok, Cristal House Press. 1987; 106-110
 - 11) Ohmori, T., T. Ieiri, Y. Asakura, Y. Ohki, T. Teshirogi, A. Terasaki and T. Hosoya: Application of improved coupling assay method for peroxidase of diseased thyroids: report of three cases. *Endocrinol. Japon.* 1991; 38: 113-117
 - 12) Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Maniatis: *Molecular cloning: A laboratory manual*, Vol. 1, 2nd ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989; 7.3-7.84
 - 13) Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Maniatis. *Ibid.* 9.16-9.59
 - 14) Brocas, H., D. Christophe, V. Pohl and G. Vassart: Cloning of human thyroglobulin complementary DNA. 1982; 137: 189-192
 - 15) Feinberg, A.P. and B. Vogelstein: A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragment to high specific activity. *Anal. Biochem.* 1983; 132: 6-13
 - 16) Ieiri, T., P. Cochaux, Héctor M. Targovnik, M. Suzuki, S.-I. Shimoda, J. Perret

- and G. Vassart: A 3' splice site mutation in the thyroglobulin gene responsible for congenital goiter with hypothyroidism. *J. Clin. Invest.* 1991; 88: 1901-1905
- 17) Vassart, G., L. Verstreken and C. Dinsart: Molecular weight of thyroglobulin 33 S messenger RNA as determined by polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of formamide. *FEBS Lett.* 1977; 79: 15-18
 - 18) Chebath, J., C. Chabaud, J.-L. Belgé-Lefranc, G. Cartouzou and S. Lissitzky: Molecular weight of the thyroglobulin messenger RNA of sheep thyroid gland. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1977; 79: 267-273
 - 19) Bass, F., G.-J. B. Van Ommen, H. Bikker, A.C. Arnberg and J.J.M. De Vijlder: The human thyroglobulin gene is over 300kb long and contains introns of up to 64kb: *Nucleic Acids Res.* 1986; 14: 5171-5186
 - 20) Musti, A.M., E.V. Avvedimento, C. Polistina, V.M. Ursini, S. Obici, L. Nitsch, S. Cocozza and R. Di Lauro: The complete structure of the rat thyroglobulin gene: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1986; 83: 323-327
 - 21) Parma, J., D. Christophe, V. Pohl and G. Vassart: Structural organization of the 5' region of the thyroglobulin gene: Evidence for intron loss and "Exonization" during evolution. *J. Mol. Biol.* 1987; 196: 769-779
 - 22) Wong, C., S.E. Antonarakis, S.C. Goff, S.H. Orkin, B.G. Forget, D.G. Nathan, P.J.V. Giardina and H.H. Kazazian, Jr.: β -Thalassemia due to two novel nucleotide substitution in consensus acceptor splice sequence of the β -globin gene. *Blood* 1989; 73: 914-918
 - 23) Breathnach, R., C. Benoist, K. O'Hare, F. Gannon and P. Chambon: Ovalbumin gene: Evidence for a leader sequence in mRNA and DNA sequences at the exon-intron boundaries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1978; 75: 4853-4857
 - 24) Shapiro, M.B. and P. Senapathy: RNA splice junctions of different classes of eukaryotes: sequence statistics and functional implications in gene expression. *Nucleic Acids Res.* 1987; 15: 7155-7174
 - 25) Merken, L., M. Simons, H.J. Brocas and G. Vassart: Alternative splicing may be responsible for heterogeneity of thyroglobulin structure. *Biochimie.* 1989; 71: 223-226
 - 26) Malthiery, Y., C. Marriq, J.L. Bergé-Lefranc, J.L. Franc, M. Henry, P.J. Lejeune, P. Ruf and S. Lissitzky: Thyroglobulin structure and function: Recent advances. *Biochimie.* 1989; 71: 195-210
 - 27) Mercken, L., M.-J. Simons, S. Swillens, M. Massaer and G. Vassart: Primary structure of bovine thyroglobulin deduced from the sequence of its 8,431-base complementary DNA. *Nature* 1985; 316: 647-651
 - 28) Malthiery, Y. and S. Lissitzky: Primary structure of human thyroglobulin deduced from the sequence of its 8448-base complementary DNA. *Eur. J. Biochem.* 1987; 165: 491-498
 - 29) De Combrugghe, B. and H. Edelhoch: The properties of thyroglobulin. X IV. The

- structure of reoxidized thyroglobulin. *Biochemistry* 1966; 5: 2238–2245
- 30) Marriq, C., P.-J. Lejeune, N. Venot and L. Vinet: Hormone synthesis in human thyroglobulin: possible cleavage of the polypeptide chain at the tyrosine donor site. *FBES Lett.* 1989; 242: 414–418
 - 31) Ohmiya, Y., H. Hayashi, T. Kondo and Y. Kondo: Location of dehydroalanine residues in the amino acid sequence of bovine thyroglobulin: Identification of donor tyrosine sites for hormogenesis in thyroglobulin. *J. Biol. Chem.* 1990; 265: 9066–9071
 - 32) Rawitch, A., G. Pollock and A. Taurog: Hormone forming sites in human thyroglobulin determined by pulse chase experiments using ^{125}I and thyroid peroxidase. *Proc. of the 10th International Thyroid Conference, The Hague Abstr.* 365: 220
 - 33) Lamas, L., P. Anderson, J. Fox and Dunn: Early iodinated sites in thyroglobulin. *J. Biol. Chem.* 1989; 264: 13541–13545
 - 34) Palumbo, G.: Thyroid hormogenesis: Identification of a sequence containing iodophenyl donor sites in calf thyroglobulin. *Ibid.* 1987; 262: 17182–17188
 - 35) Ricketts, M.H., K. Schultz, A. van Zyl, A.J. Bester, C.D. Boyd, H. Meinhold and P.P. van Jaarsveld: Autosomal recessive inheritance of congenital goiter in africaner cattle. *J. Hered.* 1985; 76: 12–16
 - 36) Tassi, V.P.N., R. Di Lauro, P. van Jaarsveld and C.G. Alvino: Two abnormal thyroglobulin-like polypeptide are produced from africaner cattle congenital goiter mRNA. *J. Biol. Chem.* 1984; 259: 10507–10510
 - 37) Van Herle, A., G. Vassart and J.E. Dumont: Control of thyroglobulin synthesis and secretion. *New Engl. J. Med.* 1979; 301: 239–249
 - 38) 鈴木 克, 鈴木俊輔, 加藤典博, 石田茂登男, 吉田 博, 奥野 豊, 佐々木純, 森 昌造, 有吉 忍, 矢川寛一: 家族性甲状腺腫クレチニズムの兄弟例. *診断と治療* 1982; 70: 1258–1260
 - 39) Refetoff, S. and E.G. Lever: The value of serum thyroglobulin measurement in clinical practice. *JAMA* 1983; 250: 2352–2357
 - 40) Dong, Q., M. Ludgate and G. Vassart: Towards an antigenic map of human thyroglobulin: identification of ten epitope-bearing sequences within the primary structure of thyroglobulin. *J. Endocrinol.* 1989; 122: 169–176
 - 41) Henry, M., Y. Malthiery, E. Zanelli and B. Charvet: Epitope mapping of human thyroglobulin heterogeneous recognition by thyroid pathologic sera. *J. Immunol.* 1990; 145: 3692–3698

共同研究者

鈴木 光雄 : 群馬大学内分泌研究所 生理学部門
樽谷 修 : 同上 物理化学部門
細谷東一郎 : 千葉大学 薬学部
伊藤 國彦 : 伊藤病院
Vassart, G. : IRIBHN, Université Libre de Bruxelles
Dumont, J.E. : *Ibid*
Cochaux, P. : *Ibid*
Perret, J. : *Ibid*
Targovnik, H.M. : Universidad de Buenos Aires

(受付日 : '91.10.28)

(採択日 : '92. 5. 6)