

# 先天性甲状腺機能障害の成因に関する研究

## I. 先天性 TSH 欠損症の遺伝子解析

### —TSH $\beta$ サブユニット遺伝子のクローニング—

研究協力者 宮 井 潔  
(大阪大学臨床検査診断学)

共同研究者 林 崎 良 英  
(大阪大学臨床検査診断学)

松 原 謙 一  
(大阪大学細胞工学センター)

古 山 順 一  
(兵庫医科大学遺伝学)

橋 本 知 子  
(兵庫医科大学遺伝学)

## 目 的

先天性甲状腺機能障害の原因の一つとされている先天性 TSH 単独欠損症 (Congenital isolated TSH deficiency) は1971年われわれが姉妹例をはじめて報告<sup>1)</sup>して以来、2家系が報告されている。いずれも家族内発症をしており、おそらく常染色体劣性遺伝と考えられる。

一方 TSH は、 $\alpha$  と  $\beta$  のサブユニットから成っているが、 $\alpha$  サブユニットの遺伝子構造はすでに明らかにされ、性腺刺激ホルモンの  $\alpha$  サブユニットと共通構造を有している。先天性 TSH 単独欠損症では、TSH のみが欠損し、性腺刺激ホルモンが正常なことから、おそらく  $\alpha$  サブユニットは異常がなく、 $\beta$  サブユニットに異常があると推定される。

ところで、TSH- $\beta$  遺伝子の研究は、従来まで、ウシ、マウスなどの C-DNA が得られているのみで、ヒトではもちろん、他の動物でもその遺伝子構造は明らかにされていなかった。そこで本研究では、正常ヒト TSH- $\beta$  遺伝子について、クローニングと構造決定、染色体マッピングを行い<sup>2)3)</sup>、さらに本患者について解析を行った。

## 方 法

ヒト TSH- $\beta$  遺伝子のクローニング：後述するように、ウシ TSH- $\beta$ -cDNA (Dr. Maurer より提供) をプローブとし、ヒトゲノム DNA について Southern blot を行ったところ、Eco RI で2.2 Kb, 3.2 Kb の2つのバンドを得たのでこれをクローニングするため2つのゲノミックライブラリーを用いた。一つは白血球ゲノム DNA を Eco RI で完全消化し、アガロース電気泳動後、各バンドに相当する DNA を回収し、PBR325 にクローニングした。他の一

つは、Eco RI で消化した肝ゲノム DNA を、 $\lambda$ Charon 28 Eco RI arm に shot gun cloning したものである。なお塩基配列の決定は、M13 dideoxy 法を用いた。

染色体の解析：マッピングは福重らの方法により、正常核型をもつヒト線維芽細胞および、ヒトとマウスの雑種細胞を染色体ソーティングにかけ、各々の画分の DNA をとり、ヒト TSH- $\beta$  遺伝子をプローブとして Southern blot を行った。

High resolution banding は、ASG (Acetic Saline-Giemsa). Trypsin 法で染色して行った。

患者 DNA の解析：患者およびその家族から採取した白血球より、EB virus による blastoformation を行ない cell line 化し、これを DNA の供給源として Southern blot を行った。

### 結果および考察

#### 1. 正常ヒト TSH- $\beta$ 遺伝子の構造と染色体マッピング

Eco RI 2.2 Kbp と 3.2 Kbp の 2 つをクローニングし、その塩基配列を決定したのが図 1 である。既報の分泌型アミノ酸配列と比較したところ、このクローンにヒト TSH- $\beta$  遺伝子がのっていることが明らかとなった。

さてこのようにして明らかとなったヒト TSH- $\beta$  前駆体の構造は図 2 に示す通り 138 コのア

```

CAGCTGTACATAITTCACCTTAAAGGGATATCTAAGGGTTTGAAGTGGGATCAGGGGTTCTCTAGATTCTGAGTTAGCCCCCTAACACCAGTTGTA
ATTTACAGTTGACCTTTTTTGGACITTTATCTTTCTGGTGTCTTCCCTTGACCAAATGGTAGAATTATAAGCATGATCATATGCATTGGGATGGTACTGAAGT
TGGTTATACITTTTTCTGGTTTCTTTGCCCTTTCTGATTTTAAACAAATAGGTTCTTTAATTTTATCTTTGATTAGC  *a
                                                    ATG ACT GCT CTC TTT CTG
                                                    Met Thr Ala Leu Phe Leu
                                                    +1

ATG TCC ATG CTT TTT GGC CTT GCA TGT GGG CAA GCG ATG TCT TTT TGT ATT CCA ACT GAG TAT ACA ATG CAC ATC
Met Ser Met Leu Phe Gly Leu Ala Cys Gly Gln Ala Met Ser Phe Cys Ile Pro Thr Glu Tyr Thr Met His Ile
+10                                     +20                                     +30

GAA AGG AGA GAG TGT GCT TAT TGC CTA ACC ATC AAC ACC ACC ATC TGT GCT GGA TAT TGT ATG ACA CGG GTATGTA  *b
Glu Arg Arg Glu Cys Ala Tyr Cys Leu Thr Ile Asn Thr Thr Ile Cys Ala Gly Tyr Cys Met Thr Arg
+40                                     +50                                     +54

GTTTCATGTCACITCTTTTTGGCTG.....0.46 kbp intron.....ATTATGCTCTCTTTTCTGTTCTTTCCCGAG
*c
GAT ATC AAT GGC AAA CTC TTT CTT CCC AAA TAT GCT CTG TCC CAG GAT GIT TGC ACA TAT AGA GAC TTC ATC TAC
Asp Ile Asn Gly Lys Leu Phe Leu Pro Lys Tyr Ala Leu Ser Gln Asp Val Cys Thr Tyr Arg Asp Phe Ile Tyr
+55                                     +60                                     +70

AGG ACT GTA GAA ATA CCA GGA TGC CCA CTC CAT GTT GCT CCC TAT TTT TCC TAT CCT GIT GCT TTA AGC TGT AAG
Arg Thr Val Glu Ile Pro Gly Cys Pro Leu His Val Ala Pro Tyr Phe Ser Tyr Pro Val Ala Leu Ser Cys Lys
+80                                     +90                                     +100

TGT GCC AAG TGC AAT ACT GAC TAT AGT GAC TGC ATA CAT GAA GCC ATC AAG ACA AAC TAC TGT ACC AAA CCT CAG
Cys Gly Lys Cys Asn Thr Asp Tyr Ser Asp Cys Ile His Glu Ala Ile Lys Thr Asn Tyr Cys Thr Lys Pro Gln
+110                                     +120

AAG TCT TAT CTG GTA GGA TTT TCT GTC TAA TAGTGTATATAATTGCAATTTGGTTAAATGTCCTTGCCCTGAAATAAAGCTAATAAAAAAT  *d
Lys Ser Tyr Leu Val Gly Phe Ser Val Ter
+130 +132 +138

ATTATGTTTCACATTATCTCTGTTCATTTTGGAGTACTATTTAATCCATACCC

```

図 1 Nucleotide sequence of human TSH- $\beta$  gene<sup>2)</sup>

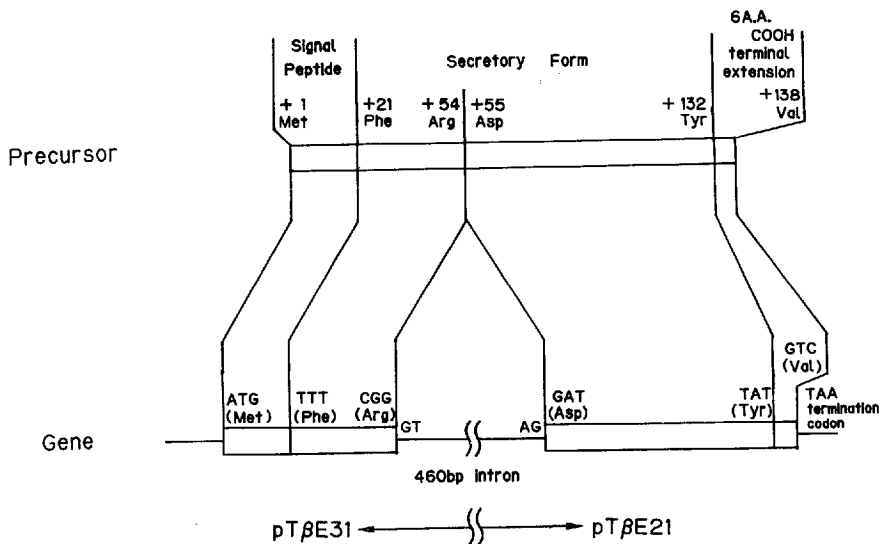


図2 Schematic representation of human TSH- $\beta$  precursor and its gene

ミノ酸から成っている。すなわち、20個のアミノ酸から成るシグナルペプチド、112アミノ酸の分泌型ペプチド、そして hydrophobic な6アミノ酸から成るC端付加の構造である。またコード領域は460bpの比較的小さなイントロンで分断されている。なお既報の分泌型ペプチドのアミノ酸配列のうち Met<sup>28</sup>, Thr<sup>29</sup> (分泌型としては第8, 9番目) は Thr<sup>28</sup>, Met<sup>29</sup> と訂正された。なお5'非翻訳領域、5'cap siteは未だ決定されていないが、その理由はヒト下垂体RNAが入手し難いこと、既知の動物cDNAの5'非翻訳領域とヒトのそれとは全く hybridize しないことによる。今後ヒト下垂体RNAを材料として決定する必要がある。

さて図3はヒトゲノムDNAのSouthern blotであり、EcoRIで2.2Kbpと3.2Kbp、HindIIIおよびPvuIIでそれぞれ17Kbp、2.0Kbpのシングルバンドを検出した。これから、ヒトTSH- $\beta$ 遺伝子はシングルコピーと推定される。

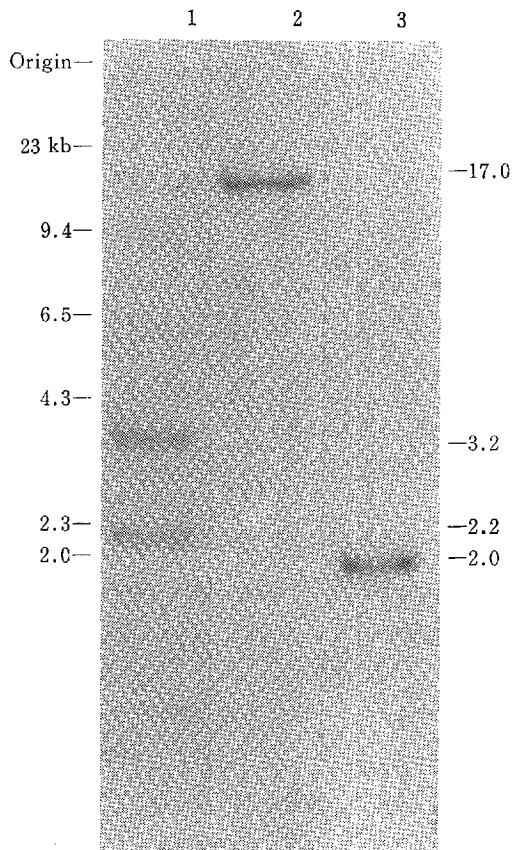
染色体マッピングの結果では、ヒトTSH- $\beta$ 遺伝子は1番染色体にあることが明らかとなった。

## 2. 先天性 TSH 欠損症の染色体と遺伝子と遺伝子解析

TSH- $\beta$  遺伝子が1番染色体にあることが明らかとなったので、本疾患々者姉妹例について1番染色体の high resolution banding を行ったが変化は認められず転座、欠失等の大きな異常はないと思われた(図4)。

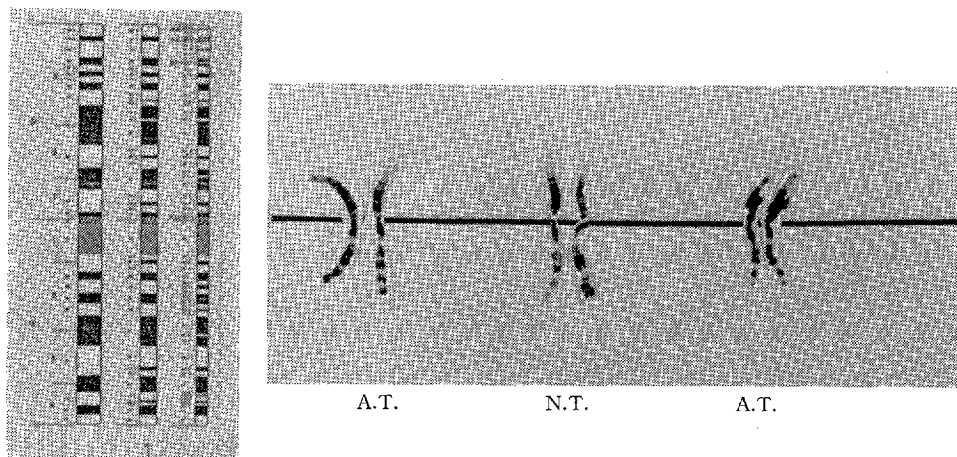
次に患者姉妹と両親のDNAにつき、ヒトTSH- $\beta$  遺伝子をプローブとしてSouthern blotを行ったところ図5に示す通り、EcoRI、PvuIIで対照正常人と差がなく、この結果からは大きな欠失はないと考えられた。

TSH欠損の機序として、TSH- $\beta$  遺伝子に異常がなくても glycosylation の異常、TSH産生細胞の形成障害などの可能性も否定は出来ない。しかし最近、本患者DNAの塩基配列を決



☒ 3 Genomic Southern hybridization analysis of human TSH- $\beta$  gene. Human leucocyte DNA was digested with EcoRI (lane 1), Hind III (lane 2) and Pvu II (lane 3)

High-Resolution Banding



☒ 4 High resolution banding of chromosome 1 of patients with isolated TSH deficiency (N.T. A.T. right) and their mother (A.T. left)

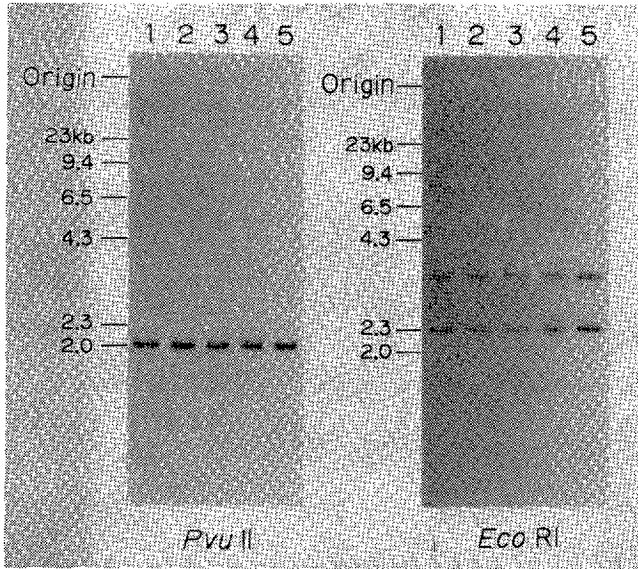


図5 Genomic Southern hybridization of human TSH- $\beta$  gene obtained from patients with isolated TSH deficiency (lanes 2, 3), their parents (lanes 4, 5) and a normal subject (lane 1)

定したところ、one point mutation が発見されたので、おそらくそれが原因であろうと考えられる。

## II. 先天性甲状腺形成障害におけるウイルス抗体

研究協力者 宮井 潔

(大阪大学臨床  
検査診断学)

共同研究者 藪内百治 野瀬 宰

(大阪大学医学部小児科)

栗村 敬

(鳥取大学医学部  
ウイルス学)

### 目 的

先天的な甲状腺の形成障害は、クレチン症の主原因となっているが、その成因については未だ明らかではない<sup>4)</sup>。先にわれわれは、本症の発症に季節変動がある<sup>5)6)</sup>ことから、何らかの環境因子が関与しているのではないかと指摘した。一方種々なウイルスの胎内感染が、先天奇型を発症させることもよく知られていることから、クレチン症の発症にもウイルス感染が関与していないかと考えた。抗風疹抗体についてはすでに報告<sup>7)</sup>したが、今回は、種々のウイルス抗

体を本症患者およびその母について検索した<sup>8)</sup>。

## 方 法

先天性甲状腺形成障害患者母子23例のほか、対照として、同時期の正常新生児50名、正常産褥婦人55名、非妊婦120名より採血し血清を得た。

血清の抗ウイルス抗体は受身赤血球凝集阻止反応 (HI), 補体結合反応 (CF) または中和反応 (NT) により次のように測定した herpes simplex virus (CF), varicella-zoster virus (CF), cytomegalovirus (CF), influenza virus (CF, HI), parainfluenza virus (HI), mumps virus (CF, HI), rubella virus (HI), coxsackie virus (CF, NT), echo virus (NT) and enterovirus (NT)。

## 結果および考察

### 1. Rubella virus.

既報のように、患児では生後1~2ヵ月で測定感度以下 ( $1 : < 8$ ) ~  $1 : 64$ であったが、これは母体より低く、また10ヵ月後には、測定感度以下になったことから、母体からの移行抗体と考えられる。

### 2. Herpes Simplex virus.

患児では生後1~2ヵ月で測定感度以下 ( $1 : < 5$ ) ~  $1 : 30$ であったが、5~10ヵ月で測定感度以下となった (図6)。

### 3. Influenza A virus.

患児では生後1~2ヵ月で、influenza A (Aichi) が測定感度以下 ( $1 : < 20$ ) から  $1 : 128$ を示したが、対照とした正常児との間に差はなかった (図6)。

### 4. Cytomegalo virus.

図7に示すように患児では生後2~4ヵ月で  $1 : 4$  ~  $1 : 16$ であったが、母体より低く、対照正常児と差がなかった。患児3例では生後7~10ヵ月で  $1 : 64$  ~  $1 : 128$ と上昇したが、これは恐らく腔内感染と思われる。

### 5. その他の virus.

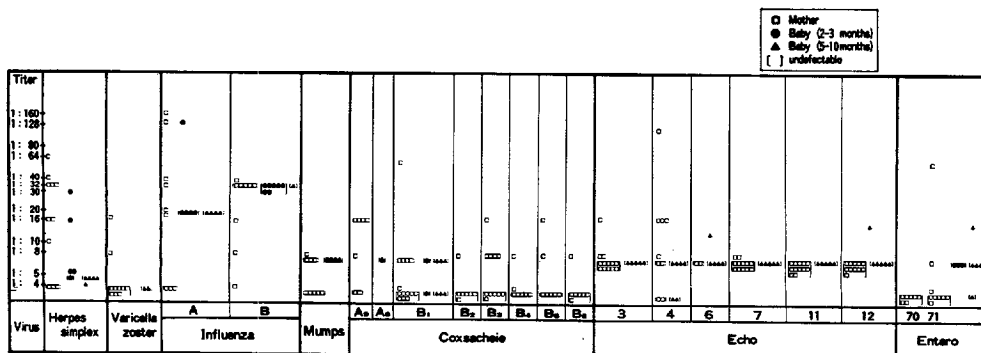


図6 Antiviral antibodies in patients with congenital thyroid dysgenesis and their mothers

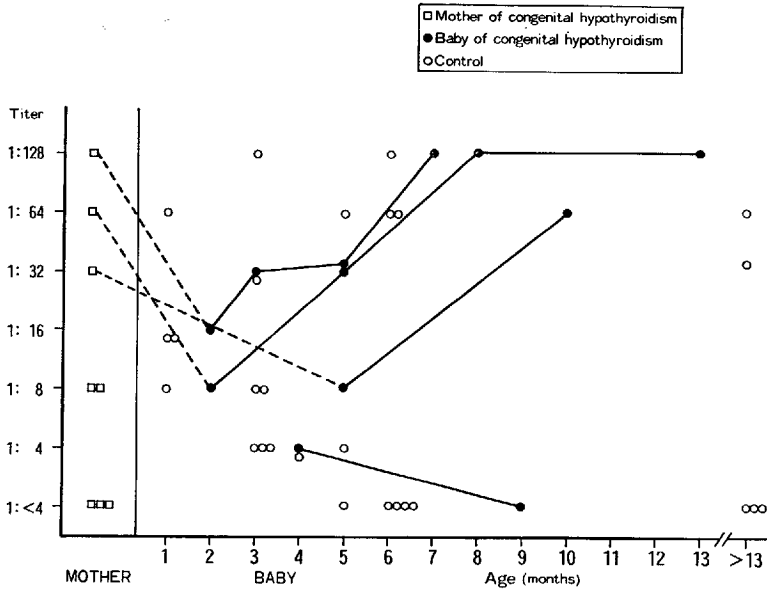


図7 Antibody to cytomegalovirus in patients with congenital thyroid dysgenesis and their mothers

患児の母において、parainfluenza, influenza B, varicella zoster, mumps, coxsackie B, echo, entero の一部で抗体が陽性であったが、対照婦人と大差は認められなかった (図6)。

結 論

I-1. ヒト TSH-β サブユニットの遺伝子をクローニングし、構造を解析した結果、前駆体の構造は、138個のアミノ酸 (20個のシグナルペプチド, 112個の分泌型, 6個のC端付加) から成り1個のイントロン (460 bp) が介在することが明らかとなった。この遺伝子は1番染色体にマップされた。

I-2. 先天性 TSH 単独欠損症姉妹例およびその両親について、1番染色体の high resolution banding や、DNA の Southern blot を行ったが対照と差がなく、大きな欠失などは認められなかった。最近、患児の DNA の塩基配列を決定し、one point mutation の存在が明らかとなった。

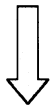
II.1. 先天性甲状腺形成障害の母子を対象とし、各種ウイルス抗体を測定した所、rubella, herpes simplex, influenza A, parainfluenza などの抗体が検出されたが、正常対照と差がなく、患児の場合は移行抗体と考えられ、Cytomegalo は腔内感染と考えられた。したがって本症と、催奇性のあるウイルス感染との間に関連性を見出すことはできなかった。

文 献

- 1) Miyai, K., Azukizawa, M. and Kumahara, Y. : Familial isolated thyrotropin deficiency. New Engl. J. Med., 285 : 1043, 1971.
- 2) Hayashizaki, Y., Miyai, K., Kato, K. and Matsubara, K. : Molecular cloning of the

- human thyrotropin- $\beta$  subunit gene., FEBS Lett., **188** : 394, 1985.
- 3) 林崎良英, 宮井 潔, 松原謙一 : 先天性 TSH 単独欠損症. 日本臨牀化学会年会記録 (印刷中) 25, 1985.
  - 4) 宮井 潔, 菟内百治, 野瀬 宰, 福西孝信, 栗村 敬, 鶴原常雄, 中島博徳, 大浦敏明 : 先天性甲状腺形成障害の成因に関する環境・遺伝要因の研究. 厚生省・先天異常のモニタリングに関する研究・昭和57年度研究報告書 146, 1982.
  - 5) Miyai, K., Ichihara, K., Amino, N., Nose, O., Yabuuchi, H., Tsuruhara, T., Oura, T. and Kurimura, T. : Seasonality of birth in sporadic cretinism., Early Human Develop., **3** : 85, 1979.
  - 6) Miyai, K., Connelly, J.F., Foley, T.P.Jr., Irie, M., Illig, R., Lie, S.O., Morissette, J., Nakajima, H., Rochiccioli, P. and Walfish, P.G. : An analysis for the variation of incidence of congenital dysgenetic hypothyroidism in various countries., Endocrinol. Japan., **31** : 77, 1984.
  - 7) Miyai, K., Mizuta, H., Kurimura, T., Nose, O. and Tsuruhara, T. : Rubella antibody in neonatal hypothyroidism due to thyroid dysgenesis., Early Human Develop., **5** : 215, 1981.
  - 8) Miyai, K., Hata, N., Kurimura, T., Nose, O., Harada, T., Tsuruhara, T., Kusuda, S., Satake, R., Mizuta, H., Amino, N. and Ichihara, K. : Anti-viral antibodies in congenital hypothyroidism., Proceedings of 9th International Thyroid Congress (in press), 1985.





## 検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用

論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



### 結論

-1. ヒト TSH- サブユニットの遺伝子をクローニングし,構造を解析した結果,前駆体の構造は,138個のアミノ酸(20個のシグナルペプチド,112個の分泌型,6個のC端付加)から成り1個のイントロン(460bp)が介在することが明らかとなった。この遺伝子は1番染色体にマップされた。

-2. 先天性 TSH 単独欠損症姉妹例およびその両親について,1番染色体の high resolution banding や,DNA の Southern blot を行ったが対照と差がなく,大きな欠失などは認められなかった。最近,患児の DNA の塩基配列を決定し,one point mutation の存在が明らかとなった。

1. 先天性甲状腺形成障害の母子を対象とし,各種ウイルス抗体を測定した所,rubella,herpes simplex, influenza A, parainfluenza などの抗体が検出されたが,正常対照と差がなく,患児の場合は移行抗体と考えられ,Cytomegalovirus は腔内感染と考えられた。したがって本症と,催奇性のあるウイルス感染との間に関連性を見出すことはできなかった。