

パク量を定量した。

Bolton-Hunter 試薬により r30kDa を<sup>125</sup>I 標識した (<sup>125</sup>I-r30kDa)。pH11 処理により膜骨格タンパク (spectrin, actin, protein 4.1, ankyrin) を解離させた反転膜小胞およびこの小胞を更に trypsin 処理して Band 3 の細胞質 domain を欠失させた反転膜小胞を得、<sup>125</sup>I-r30kDa との結合を Ca<sup>2+</sup>-CaM あるいは EGTA CaM の存在下で解析した。リン酸化アミノ酸は、anti-phosphoserine monoclonal antibody および anti-phosphotyrosine monoclonal antibody を用いた Western-blot 法により検出した。

〔結果〕 r30kDa の分子量は SDS-PAGE の結果から 35.5kDa と算定された。r30kDa は Ca<sup>2+</sup>非依存的に CaM-Agarose に結合し、0.6M KCl により解離した。r30kDa にはリン酸化アミノ酸は検出されなかった。2 種類の反転膜小胞を用いた実験により、r30kDa は glycophorin C と Band 3 に結合した。r30kDa の glycophorin C および Band 3 への binding capacity は 9.1μg/mg と 14μg/mg であった。Band 3 との結合の K<sub>d</sub> (1.13×10<sup>-7</sup>M) は CaM 結合により変化しなかったが、glycophorin C との結合の K<sub>d</sub> (0.50×10<sup>-7</sup>M) は、CaM により低下した (0.39×10<sup>-7</sup>M)。この効果は Ca<sup>2+</sup>に依存しなかった。現在、r30kDa を ghost 内に封入し、その膜機能をレーザー回折法により測定している。

〔結論〕 r30kDa は Ca<sup>2+</sup>非依存的に CaM と結合する。r30kDa の glycophorin C との結合は Ca<sup>2+</sup>非依存的に CaM によって調節されるが、Band 3 との結合には CaM は関係が無いことが示唆された。

## 2. 2型バゾプレッシンレセプターのラット脳内局在について

(<sup>1</sup>)東京女子医大第一病理、<sup>2</sup>)国立小児医療センター小児薬理部)

加藤陽一郎<sup>1)</sup>・五十嵐紀子<sup>2)</sup>・

平澤 明<sup>2)</sup>・辻本豪三<sup>2)</sup>・小林慎雄<sup>1)</sup>

我々は、reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法 *in situ* hybridization (ISH) 法を用いて、2型バゾプレッシンレセプター (V2R) mRNA のラット脳内での局在について検討した。RT-PCR 法では、V2R mRNA は新生仔ラットの大脳、小脳および成熟ラットの脳に発現を認めたが、大脳では検出することができなかった。ISH 法では、V2R mRNA は、大脳の海馬領域および小脳顆粒層に局在していた。大脳におけるこの発現は、脳の発達と共に

減少してゆき生後14日目では全く認められなかった。また小脳における発現は、脳の発達に関係なく持続的であった。

## 3. IL-4-TK transgenic mouse を用いた CD4T 細胞の lineage の解析

(<sup>1</sup>)東京女子医大消化器内科、

<sup>2</sup>)Yale University・Immunobiology)

鴨川由美子<sup>1)2)</sup>・山内克巳<sup>1)</sup>・竹内 正<sup>1)</sup>・

林 直諒<sup>1)</sup>・Kim Bottomly<sup>2)</sup>・

Richard A. Flavell<sup>2)</sup>

近年、CD4T 細胞はクローン等の解析から、その機能と産生するサイトカインにより IL-2, IFN $\gamma$  を主に産生する Th1 と、IL-4, 5, 10などを産生する Th2 との二つのタイプが存在することが報告されている。これらは特にマウスの Leishmania 症などの寄生虫感染症で明らかにされており、どちらの T 細胞が活性化されるかにより一方は生存しもう一方は死亡するという、全く異なる病態を示すことが知られている。しかしこれらの細胞がどこから発生分化するかについての報告は未だ確たるものはない。今回我々は、これら CD4T 細胞の lineage を探るため、IL-4 の promotor に、Herpes simplex virus-thymidine kinase (HSV-TK) gene を繋ぎ transgenic mouse を作製した。この系では、HSV に特異的な抗ウイルス薬で正常細胞には影響を与えない Ganciclovir (GANC) の添加によって、HSV-TK 産生細胞つまり、IL-4 産生細胞のみを特異的に抹殺することができる。つまり、このマウスを使うことにより、分化過程における gene targeting が可能になる。我々はこのマウス牌の CD4T 細胞を mitogen (ConA) を用い刺激し外因性のサイトカイン IL-12, IL-4 を加えることにより、Th1 (IFN $\gamma$  産生細胞) もしくは Th2 (IL-4 産生細胞) に分化を誘導できることを確認した。この反応の初期に GANC を添加し、IL-4 産生細胞を除去し、反応の最終段階に残る細胞のサイトカインを測定し残存細胞のタイプをコントロールと比較検討した。この結果、Th1 または Th2 への skewing を起こさせるとどちらの系においても、IL-4 産生細胞の除去により、IL-4 のみならず IFN $\gamma$  の産生も抑制された。さらに、*in situ* hybridization の結果よりこの HSV-TK gene は、IL-4 の発現と相関し、IL-4 の promoter に特異的に制御されていることが確認された。以上の事実より、CD4T 細胞はその分化過程において、早期に、IL-4 を産生するような、(最近報告されつつある多数のサイトカインを産生する) Th0 といわれる