

細胞膜の $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ 共輸送

宮本博司・池原敏孝*・山口久雄*

(徳島文理大学家政学部生活環境情報学科・徳島大学医学部第一生理学教室*)

$\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ Cotransport in the Cell Membrane. Hiroshi MIYAMOTO, Toshitaka IKEHARA* and Hisao YAMAGUCHI* (Faculty of Domestic Science, Tokushima Bunri University, *Department of Physiology, School Medicine, University of Tokushima)

1. はじめに

$\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ 共輸送は軟体動物^{3,6)}、魚類⁶³⁾、両生類^{16,22)}、鳥類^{70,98)}、ヒトを含めた各種の哺乳類^{4,28,30,35,85)}等に広く分布する。哺乳類に限ってみても、上皮・内皮細胞^{35,49,53,73,114)}を初め、赤血球^{10,18,30,55,64)}、リンパ球²⁴⁾、線維芽細胞^{4,85)}、心筋細胞及び平滑筋細胞^{17,106)}や腫瘍細胞^{39,40,52,105,112)}等、各種の組織細胞に存在する。従って、動物界で最も広範且つ普遍的にみられる1価イオン輸送系の一つである。この共輸送は受動輸送であり、原動力は Na^+ 、 K^+ と Cl^- の化学ポテンシャルの総和の細胞膜を隔てた勾配である。言うまでもなく Na^+ 、 K^+ 両イオンのポテンシャル勾配は Naポンプが作り出したものであり、正常なイオン環境ではこの共輸送系を介する K^+ (Rb^+) 取り込み(内向きフラックス)と Na^+ 流出(外向きフラックス)はそれぞれのポテンシャル勾配に逆らう2次性能動輸送であるといえる。 $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ 共輸送には、1) 3種イオン間の相互依存性、2) 電気的中性の保持と3) ループ利尿剤感受性の3つの特性がある。この中で1)の詳細は後に述べる。

2) については最初、Geckら(1980)がエールリッヒ腹水腫瘍細胞を用いた研究から $1\text{Na}^+ / 1\text{K}^+ / 2\text{Cl}^-$ の輸送比率を提唱し³¹⁾、その後、同じ比率がヒト赤血球¹⁸⁾、ヒト網膜色素上皮細胞⁵¹⁾、ウサギ尿管細胞¹¹¹⁾、エールリッヒ腹水腫瘍細胞^{47,59)}、HeLa細胞⁶⁸⁾等で確認されている。陰陽イオンの電荷が等しいので、電気的中性が成立し、細胞内電位が変化してもイオ

ンの輸送は影響を受けない^{31,66)}。なお電気的中性とループ利尿剤感受性を保持しつつ違った比率で共輸送するものもあり、例えばイカ巨大軸索では $2\text{Na}^+ / 1\text{K}^+ / 3\text{Cl}^-$ であるといわれる³⁾。その他、 $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ 共輸送とは別に電気的中性のイオン共輸送として、N-エチルマレイミド(NEM)や細胞膨潤によって活性化される K^+/Cl^- 共輸送と細胞収縮によって活性化し、ヒドロクロロチアジド(HCTZ)で阻害される Na^+/Cl^- 共輸送があるが、今回は触れない。

3) に関し、腎のヘンレループ上行脚における Na^+ 再吸収を阻害し、利尿・降圧作用を有する一群の物質(ループ利尿剤)は共輸送を特異的に阻害する。これらの物質には、フロセミド、ピレタニド、ブメタニド等があるが、類似した化学構造をもつ。よく使用するフロセミドとブメタニドを比較すると、 IC_{50} がアフリカツメガエル尿管細胞ではそれぞれ $6.6\ \mu\text{M}$ と $1.7\ \mu\text{M}$ ²²⁾、 K_i がヒト赤血球では $9\ \mu\text{M}$ と $0.16\ \mu\text{M}$ である²⁰⁾。なお HeLa 細胞(ヒト子宮頸癌細胞)ではフロセミドの K_i が $1\ \mu\text{M}$ ⁶⁸⁾、ヒト網膜色素上皮細胞ではブメタニドのそれが $0.16\ \mu\text{M}$ ⁵¹⁾である。以上の結果はブメタニドに対する感受性の方が大きいことを示す。阻害の特異性からみれば、ヒト赤血球でブメタニドは $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ 共輸送のみを阻害するが、フロセミドは外液 Na^+ 非依存性の K^+/K^+ 交換も阻害する^{10,18)}。また仔牛動脈内皮細胞のブメタニド非感受性 K^+/Cl^- 共輸送はフロセミドで阻害される⁸⁸⁾等、ブメタニドの特異性が大きい。もっともフロセミドが K^+/Cl^- 共輸

送を阻害するといっても、有効濃度は $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ 共輸送の場合より1桁以上大きい⁸⁸⁾。

本論文では $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ 共輸送の機能、輸送体蛋白質の性質等に関し、我々自身の研究結果も含め、近年における研究の動向を解説する。

II. 上皮細胞膜における共輸送体の分布

$\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ 共輸送体(以下単に共輸送)は腎尿細管のような吸収組織では主に先端膜(管腔膜)に、分泌性の組織では基底外側膜に分布するといわれる⁶³⁾。例えば、マウス腎のヘンレループ上行脚細胞では特異的な ^3H -ブメタニド結合部位の約85%が先端膜に存在する⁴⁹⁾。他方、ウサギ耳下腺とイヌやヒト気道上皮の基底外側膜は高い ^3H -ブメタニド結合能をもち^{12,35)}、またサメ直腸腺細胞では共輸送体蛋白質が基底外側膜に沿って分布し、先端膜には分布しないことが免疫顕微蛍光法と免疫電顕法で確かめられる⁶³⁾。以上、上皮細胞は吸収・分泌をとわず、正味、イオンと水を細胞内へ取り込むのに役立つであろう。一方、アフリカツメガエルの培養遠位尿細管細胞では、フロセミド感受性 Rb^+ 取り込みの50%以上が先端膜、50%以下が基底外側膜でみられ、局在性は高くない²²⁾。しかし培養の結果、局在性が失われた可能性も否定できない。尿管細胞のループ利尿剤感受性は直腸腺細胞の約10倍も高いが⁶³⁾、両細胞間における共輸送体の性質の違いは、種よりは吸収上皮と分泌上皮の差異を反映するといわれる⁶¹⁾。他の細胞をみると、カエル網膜色素上皮細胞の先端側に加えたフロセミドは Cl^- 輸送を阻害するが、基底側に加えても影響しないので、共輸送体は先端膜に局在し、網膜から脈絡膜へ向う正味の Cl^- の移動が予想できる¹⁶⁾。HCTZを加えて K^+/Cl^- 共輸送を阻害した膀胱壁細胞(家兔)では内腔側に加えたブメタニドが有効であることから、 $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ 共輸送体が先端膜に¹⁴⁾、また脳室脈絡膜上皮(サンショウウオ)の高浸透圧で刺激されるフロセミド感受性共輸送体が脳室側膜に存在し¹¹³⁾、いずれも細胞が管(内)腔からイオンと水を吸収す

るのに役立つ。

III. 細胞内外のイオンの影響

共輸送では細胞外液の Na^+ 、 K^+ 、 Cl^- が互いに取り込みを刺激し合い、逆に1つでも欠くときは他のイオンの取り込みが抑止される。細胞からのイオンの流出についても同じことが言える。イオン欠如によって阻害される輸送成分はループ利尿剤に感受性の輸送成分に匹敵する³⁾。このような現象はヒトの赤血球^{9,11,55)}、培養細胞^{51,54,82,111)}、イカ巨大軸索^{3,94)}等の細胞で繰返し確かめられてきた。例えば、 Na^+ が枯渇した舌下線の粘液腺細胞を正常培養液に戻すと、 Na^+ 取り込みは外液の K^+ と Cl^- に依存し、ブメタニドで阻害される¹¹⁴⁾。種々の動物細胞の共輸送体に対する Na^+ 、 K^+ 、 Cl^- の親和性を表すみかけの K_m を一括表示した(表)。

次に Na^+ と K^+ の効果に関する速度論的解析の一例を示す。図1AはHeLa細胞のプロセミド感受性 Rb^+ 取り込みに対する外液 Rb^+ (K^+ の代替イオン)と Na^+ の刺激効果を示すもので、両イオン共濃度依存性に取り込みを促進することがわかる⁶⁸⁾。図1Bは同様に外液 Na^+ と Cl^- の刺激効果を示すものである。AとB図上の点は共に両逆数プロットが直線に最もよく適合するので、 K^+ の結合部位が1個であることを示唆する。同様に外液 K^+ 濃度を変えて家兔腎のヘンレループ上行脚細胞の $^{22}\text{Na}^+$ 、 $^{86}\text{Rb}^+$ 及び $^{36}\text{Cl}^-$ 取り込みを測定すると、Lineweaver-Burk プロットが全て直線関係を示す¹¹¹⁾。これに対し、ヒト赤血球のプロセミド感受性 Na^+ 流出に関する細胞内 Na^+ の活性化曲線はシグモイドで Hill 係数が1.6であるから、少なくとも2個の内液 Na^+ が関与すると提唱している³⁰⁾。

Cl^- の効果については、家兔腎のヘンレループ上行脚細胞のブメタニド感受性 $^{86}\text{Rb}^+$ 及び $^{36}\text{Cl}^-$ 取り込みが外液 Cl^- 濃度の関数として、シグモイドを示し、複数の Cl^- 結合部位の存在と、両部位間の相互作用を示唆する¹¹¹⁾。外

表 哺乳動物細胞の $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ 共輸送のイオン親和性

細胞	動物	細胞外液イオンのみかけの K_m (mM)			参考文献
		Na^+	K^+	Cl^-	
赤血球	ヒト	25.7	1.80		Lauf ⁵⁶⁾
HeLa	ヒト	15.3	1.49	44.1	Tivey ら ¹⁰⁵⁾
HeLa	ヒト	105*	0.83*	23.9* 103*	Miyamoto ら ⁶⁸⁾
線維芽細胞	ヒト	15	3	30	Owen ら ⁸²⁾
MDCK	イヌ	7	1		Aiton ら ¹⁾
MDCK	イヌ	30	25		Rindler ら ⁹⁰⁾
3T3	マウス	68.9	3.14		Atlan ら ⁴⁾
星状細胞	ラット	35	2.7	40	Tas ら ¹⁰³⁾
腎尿細管上行脚	マウス	7.3	1.3	68	Kaji ⁴⁹⁾
腎尿細管上行脚	家兎	2.99	3.64	46.7	Vuillemin ら ¹¹¹⁾
血管平滑筋細胞	ラット	46	4	78	Smith ら ¹⁰⁰⁾
骨芽細胞	ラット	24.4	2.9	6.7 62	Whisenant ら ¹¹²⁾
LLC-PK ₁	ブタ	0.42	11.9	5.14 55.2	Brown ら ⁸⁾

上記の数値は主にループ利尿剤感受性 Rb^+ 取り込みを指標にして得たものである。

*理想化したイオン条件への外挿値。

液 Cl^- 濃度の関数として、シグモイド状のイオン取り込みは HeLa 細胞⁵⁴⁾ やヒラメ小腸⁷⁵⁾ でも認められ、同様な相互協同作用を示す。グルコン酸塩で置換して外液の Cl^- 濃度を上げると、マウス腎のヘンレーループ上行脚細胞のブメタニド感受性 K^+ 取り込みはシグモイド状に増加し、2つの Cl^- 部位が同じ親和性を有するとしている⁴⁹⁾。一方、アヒル赤血球の ^3H -ブメタニド結合に及ぼす外液 Cl^- の効果は2相性で、そのみかけの K_m が 2.5 mM とみかけの K_i が 112.9 mM の親和性の異なる2個の Cl^- 結合部位の存在が想定される³⁸⁾。しかし実際に共輸送の測定データに基づいて、2つの異なる Cl^- 部位の K_m を決定したのは、培養腎上皮細胞⁸⁾ と HeLa 細胞⁶⁸⁾ の研究だけである(表)。

共輸送体のイオン選択性は重要な研究課題である。HeLa 細胞のプロセミド感受性取り込みは Rb^+ と K^+ を区別せず⁶⁹⁾、外液の K^+ と Rb^+ のみかけの K_m の比は 1.47 とよく似た親和性を示す⁶⁸⁾。エールリッヒ腹水腫瘍細胞³¹⁾ と MDCK 細胞(培養仔イヌ腎細胞)¹⁾ のプロセミド阻害も K^+ と Rb^+ を識別しないが、前者

の RVI(後述)はブメタニド感受性で、 Na^+ をコリンで置換すると阻害される⁴⁰⁾。アヒル赤血球の研究によれば、共輸送体の Na^+ と K^+ 結合部位の間に協調的相互作用があって、特異的 ^3H -ブメタニド結合を増強する。 Na^+ 部位の選択性は $\text{Na}^+ > \text{Li}^+ > \text{NH}_4^+$ の順、 K^+ 部位のそれは $\text{K}^+ = \text{Rb}^+ > \text{NH}_4^+ > \text{Cs}^+$ の順である。従って Na^+ と K^+ は厳密に識別され、 K^+ 部位は Rb^+ と K^+ をほとんど識別せず、 NH_4^+ も K^+ 部位に対して比較的高い親和性をもつ。 Li^+ は部分的に Na^+ の代わりをするが、他のイオンは代替できない³⁸⁾。

Cl^- を NO_3^- で置換すると共輸送を介する Na^+ 、 K^+ の取り込みは起こらない⁵⁵⁾。マウス腎のヘンレーループ上行脚細胞のブメタニド感受性 K^+ 取り込みに及ぼす Cl^- 代替イオンの効果には多様性があり、 NO_3^- 置換は濃度に比例する取り込み増加、メチルスルファートと硫酸塩置換では上に凹型の増加、グルコン酸塩ではシグモイド状の飽和曲線を呈する⁴⁹⁾。エールリッヒ腹水腫瘍細胞の RVI は NO_3^- の置換で阻害される⁴⁰⁾。アヒル赤血球の研究では、 ^3H -ブメタニド結合を指標にした高親和性 Cl^- 部

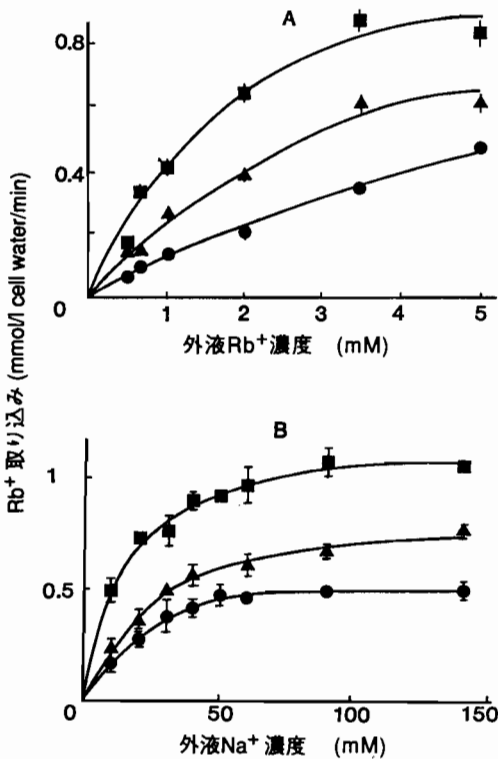


図1. ウワバイン非感受性・フロセミド感受性 Rb^+ 取り込みに及ぼす外液イオンの刺激効果. A. Na^+ の効果: ●10 mM Na^+ , ▲30 mM Na^+ , ■140 mM Na^+ . B. Na^+ と Cl^- の効果: ●45 mM Cl^- , ▲60 mM Cl^- , ■140 mM Cl^- . 各点は4回の実験値の平均, バーは標準偏差を示す. (Miyamoto, H. et al.⁶⁸) より引用)

位の選択性は $\text{Cl}^- > \text{SCN}^- > \text{Br}^-$ の順に強く, NO_3^- , メトスルファートとグルコン酸は無縁である³⁸. 一方, 低親和性 Cl^- 部位では $\text{SCN}^- > \text{NO}_3^- > \text{Cl}^-$ の順で, メトスルファートとグルコン酸はやはり無縁である. しかし高親和結合部位のイオン選択性の方がはるかに強いので, 陰イオン輸送の特異性を決定する. $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ 共輸送に関する Cl^- 滴定曲線の形は置換した陰イオンの種類によって違うので^{76, 82}, 置換イオンと Cl^- 部位が相互作用すると考えられる. HeLa 細胞では, NO_3^- , SCN^- , は Cl^- とほぼ同程度, 乳酸と酢酸はこれらより低い親和性を示し, スルファミン酸とグルコン酸は無縁である⁶⁸. そこでスルファミン酸

を代替イオンに用いて外液 Cl^- 濃度を調整すると, フロセミド感受性 Rb^+ 取り込みはシグモイド(図2A), NO_3^- と SCN^- を用いた場合は上に凹型を呈する(図2B). 速度論的解析から, この違いは親和性の異なる2つの Cl^- 部位に対してスルファミン酸は結合しないが, NO_3^- と SCN^- は Cl^- の結合を競争阻害するためであると説明できる.

同様に反体側のイオンの影響についてみる. まずヒト赤血球の内液 Na^+ 濃度の増加はフロセミド感受性 Na^+ 取り込みを刺激するが, アヒル赤血球では逆にフロセミド感受性 Rb^+ 取り込みを抑制する¹⁸). また外液 K^+ 濃度が増加すると, フロセミド感受性 Na^+ 流出が低下するのに反し, 外液 Na^+ 濃度の変化はフロセミド感受性 K^+ 流出には影響しない³⁰. 等張または高張海水中でイカ巨大軸索のブメタニド感受性 K^+ 取り込みは内液 Cl^- によって濃度依存性に阻害され^{6, 94}, 培養仔牛動脈内皮細胞

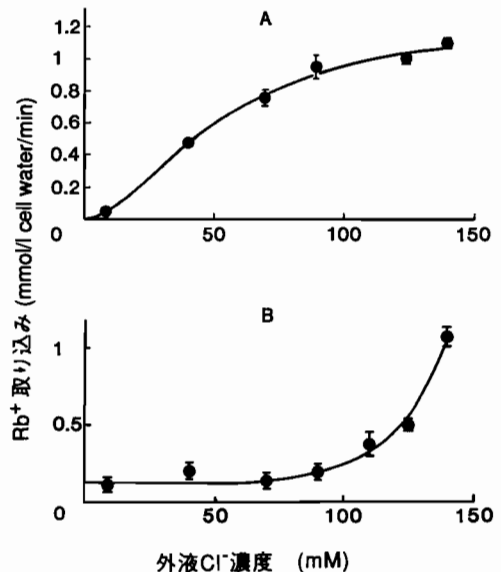


図2. 他の1価陰イオンによる外液 Cl^- の置換がウワバイン非感受性・フロセミド感受性 Rb^+ 取り込みに及ぼす影響. A. スルファミン酸による置換. B. NO_3^- による置換. 各点は4回の実験値の平均, バーは標準偏差を示す. (Miyamoto, H. et al.⁶⁸) より引用)

でも、化学ポテンシャル勾配からは可能であるのに等張・高張条件でイオン取り込みが生じないことから、細胞内 Cl^- の阻害効果が考えられる⁷⁸⁾。予めアルカリを負荷したラット耳下腺腺胞細胞を正常培養液に帰すと、ブメタニド感受性の NH_4^+ 流出が起こって細胞内 pH が回復するが、回復は外液 Cl^- を除去すると逆に阻害される⁸⁷⁾。この様に細胞、イオンの種類等によって結果はまちまちで、まだ統一した見解を引き出すことは困難である。HeLa 細胞のフロセミド感受性 Rb^+ 取り込みは細胞内液 K^+ の増加によって刺激、細胞内 Na^+ の増加によって阻害を受ける⁴⁵⁾。速度論的解析の結果、輸送部位とは別に想定される細胞内の調節性イオン結合部位に K^+ が結合するときは Rb^+ が共輸送され、 Na^+ が結合するかイオンを結合しないときは共輸送できないと推定している。

IV. 細胞容積と浸透圧の影響

細胞は低張溶液中で直ちに膨張するが、中にはやがて収縮を始めて元の容積に復帰するものがあり、調節性容積減少 regulatory volume decrease (RVD) という。逆に高張溶液では一度浸透圧的に収縮したのち増加に転じ、元の容積に戻るものがあり、調節性容積増加 regulatory volume increase (RVI) という。細胞膜には細胞容積変化を感知する受容体の存在が認められ、浸透圧変化その他の理由で $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ 共輸送以外に Na^+/H^+ 交換⁸⁰⁾、 K^+/Cl^- 共輸送^{50,77)}、 Ca^{2+} 依存性 K^+ チャネル^{44,70)}、 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 交換²¹⁾ 等のイオン輸送系が刺激されて調節性容積変化が起こる。

$\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ 共輸送活性は高浸透圧または細胞収縮で刺激され、細胞のイオンと水の取り込みが増加する。例えば、ラット赤血球は高張溶液で収縮し、ブメタニド感受性 $^{86}\text{Rb}^+$ の取り込みが約 2 倍に⁸⁰⁾、培養ヒト網膜色素細胞のそれは外液浸透圧が 30% 増すと 2.5 倍に上がる⁵¹⁾。イカ巨大軸索のブメタニド感受性 Cl^- 取り込みも高張海水で増加する⁶⁾。Hoffmann

ら(1983)はエールリッヒ腹水腫瘍細胞を低張培養液に入れて RVD を起こし、次に等張溶液に戻すと収縮した後、5 分以内に容積の回復をみている⁴⁰⁾。この RVI はフロセミドとブメタニドで強力に阻害され、陰イオン交換系の阻害剤 DIDS は無効である。RVI の一次過程として、細胞収縮によるブメタニド感受性の Na^+ と Cl^- 取り込みの刺激が認められる。骨肉腫芽細胞¹¹²⁾、仔牛動脈内皮細胞⁷⁸⁾ の共輸送も細胞収縮で刺激され、特に低張溶液で細胞を膨張後、等張溶液に移して収縮させるとき効果が大きい。培養腎上皮様細胞のように低張溶液で RVD、次に等張溶液で収縮、最後に低張溶液で容積が回復するという複雑な過程を経る場合にも、最終の RVI はフロセミド感受性である⁷¹⁾。ラット赤血球では高張溶液で収縮後に共輸送の活性化が生じ、しかも Na^+/H^+ 交換系の活性化よりも早く起こる⁷⁹⁾。

他方、高浸透圧による細胞収縮に伴って共輸送が刺激されても、必ずしも RVI が生じないものがある。HeLa 細胞のフロセミド感受性 $^{86}\text{Rb}^+$ 取り込みは高張溶液で刺激されるが、細胞自体は理想的な浸透圧計として働き、収縮状態を保つ¹⁰⁵⁾。蔗糖を加えた高張溶液でエールリッヒ腹水腫瘍細胞が収縮するときも共輸送は活性化するが、細胞容積は回復しない。しかしイオンを加えて高張にすると RVI が生じる⁴⁷⁾。蔗糖添加の場合、 Na^+ 、 K^+ と Cl^- の化学ポテンシャル総和の外向き勾配が大きいため正味のイオン流出が起こって収縮が持続するのに対し⁵⁸⁾、イオン添加の場合には流出が減少し、収縮後には正味のイオン流入に転じるからであろう。

ニワトリ小腸細胞の共輸送は高張溶液中で細胞収縮によって活性化し、逆に低張溶液では細胞の膨潤によって抑制される⁷⁰⁾。動脈内皮細胞でも同様な現象が観察され⁵³⁾、培養液の浸透圧を小刻みに増加して行くと共輸送活性の顕著な刺激、減少して行くと低下が起こる⁷³⁾。低張溶液だけでなく、高 K^+ 濃度の等張溶液で細胞が膨潤したときにも共輸送が阻害され

る⁷⁸⁾。この種の細胞の容積変化による輸送の調節は輸送体の磷酸化速度の変化と関係があるといわれ、容積感受性プロテインキナーゼが存在する可能性を示す⁵³⁾。

マニトールを加えて浸透圧を上げると、HeLa 細胞のプロセミド感受性 Rb^+ 取り込みは 390 mOsm まで増加し、それ以上浸透圧をあげても増加しない⁴⁵⁾ (図 3)。このとき浸透圧増加は、外液 Rb^+ のみかけの K_m には影響しないで、みかけの V_{max} が増加することが明らかになった。高張溶液で収縮した気道上皮細胞(イヌ)では特異的 ^3H -ブメタニド結合が増加する⁶⁵⁾。ヘンレループ上行脚細胞(マウス)の特異的 ^3H -ブメタニド結合も浸透圧の増加と

ともに増加し、低張溶液では低下するが、結合部位のイオン転回数は浸透圧の影響を受けない⁴⁹⁾。また動脈内皮細胞が収縮しても、ブメタニド結合部位 1 個当りの輸送速度は変化しないことが証明されている⁷⁸⁾。従って、細胞容積の変化による共輸送の調節は主に活性化した共輸送体数の変化によると推定される。

共輸送は RVI において特に Cl^- の輸送経路として重要であるが、イオン輸送が全てこの輸送系を經由して生じるのではなく、他の輸送系と協同する場合が少なくない。例えば等張溶液にブメタニドとクロロチアジドを同時添加すると、ウサギ心筋細胞の容積が減少することから、 $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ 共輸送と Na^+/Cl^- 共輸送の両者が細胞容積調節に関与することがわかる¹⁷⁾。骨肉腫細胞の RVI の 70% はプロセミド感受性であるが、25% はアミロリド感受性 (Na^+/H^+ 交換系) である⁵²⁾。低温の K^+ 欠乏培養液中で収縮したエールリッヒ腹水腫瘍細胞を正常培養液に戻したときに起こる RVI は、 Na^+ ポンプと共輸送の組み合わせで生じる Na^+ 流出と KCl 取り込みによって維持される⁵⁷⁾。さらに肝細胞³⁷⁾ の RVI やイヌ腎細胞 (MDCK)⁹²⁾ を低張から等張溶液に移したときの RVI には共輸送が関与しない。なおエールリッヒ腹水腫瘍細胞の RVI はブメタニド感受性の Na^+/Cl^- 共輸送で生じ、 K^+ は関与しないとされてきたが⁴⁰⁾、その後の研究で K^+ の必要性即ち $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ 共輸送であることが明らかにされている^{46, 59)}。特殊な例として、細胞が低張溶液で膨潤した後、RVD を生じて KCl の流出が起こるときにフロセミドが阻害すると報告されているものの、結果の再現性は低い¹⁰⁴⁾。また細胞収縮がイオン交換だけを活性化し、共輸送体を介する正味のフラックスを変化させない場合もある⁹¹⁾。

細胞容積変化が共輸送に及ぼす影響の機作を解明する研究が行われている。温度を 49°C に上げるとき、等張溶液ではラット赤血球の基本的な共輸送が影響されないのに、高張溶液では細胞収縮に伴う活性化が損なわれる。この高温に

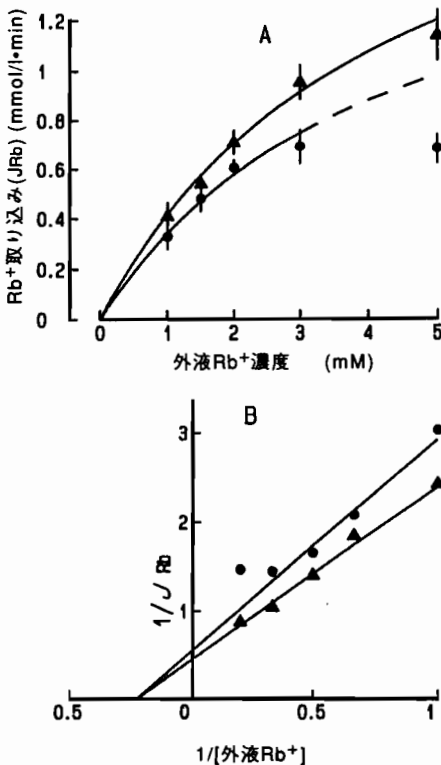


図 3. マニトール添加による高浸透圧がウワバイン非感受性・フロセミド感受性 Rb^+ 取り込みに及ぼす刺激効果。A. ● 対照, ▲ 200 mM マニトール。B. A のデータの両逆数プロット。各点は 4 回の実験値の平均、バーは標準偏差を示す。(Ikehara, T. et al.⁴⁵⁾ より引用)

おける輸送機構の性質の変化と蛋白質スペクトリンの熱変性に関するデータの比較検討から、細胞骨格が容積調節に関与する可能性があるという⁷⁹⁾。ミラノ系高血圧発症ラット(MHS)の赤血球では正常血圧ラットの赤血球よりも共輸送の速度が大きい²⁶⁾。一方、内外反転した膜小胞を作ると両赤血球の共輸送速度は同じになり、このとき細胞膜の骨格蛋白質が消失する。そこで骨格蛋白質を保有する赤血球ゴーストを作製して再び共輸送の速度を比較すると、やはりMHSの方が速いことから、細胞膜骨格蛋白質の異常が共輸送速度増加の原因であると説明される²⁶⁾。MHS赤血球が速い共輸送を示す理由には細胞内 Na^+ に対する親和性が高いことを挙げ²⁵⁾、また調節性の骨格蛋白質の候補としては分子量110-kDaのアッズシンを考えている^{67,96)}。エールリッヒ腹水腫瘍細胞は低張曝露してから高張処理すると、収縮後にRVIを起こす。この前処置の低張曝露中にマイクロフィラメントに著明な変化が起こり、RVDを伴う¹³⁾。そこで Ca^{2+} 存在下、低張曝露またはサイトカラシンBの処理でアクチン線維の集合を乱すと、細胞膨潤の段階で共輸送が活性化することが明らかになってきた⁴⁸⁾。しかし高張溶液ではこの様なアクチン集合体の乱れが生じないので、細胞収縮後の共輸送活性化には、正常なマイクロフィラメント系が関与する別個の調節機構が働くことと推定される⁴⁸⁾。以上、研究者によって候補に挙げる蛋白質の種類は違いますが、細胞膜の骨格蛋白質が共輸送の調節に何かの関係をもつという見解は一致する。なお低張溶液での共輸送活性化は、前述の低張溶液及び細胞膨潤の阻害効果と矛盾するので、今後さらに追究する必要がある。

V. 細胞内代謝とシグナル伝達系の役割

エールリッヒ腹水腫瘍細胞の共輸送活性は細胞内ATPレベルに応じて変化し、ATPはエネルギー源よりも共輸送の調節因子として重要であると提唱されてから³¹⁾、共輸送の細胞代謝依存性に関する研究が行われてきた^{15,28,31)}。

シロイタチ赤血球のATPレベルをブドー糖欠乏または2-デオキシグルコース(2-DG)添加によって100 μM 以下に低下すると、共輸送が阻害され、ATP量を正常に戻すと共輸送も部分的に回復する²⁸⁾。イカ巨大軸索のブメタニド感受性外向き Na^+ 、 Cl^- 輸送はATP欠乏によって減少する³⁾。

ATPレベルが正常なシロイタチ赤血球では、細胞内遊離 Mg^{2+} 濃度が増加すると共輸送活性は著明に増加するが、ATPが枯渇すると Mg^{2+} の効果はない²⁸⁾。また2価イオンのイオノフォアA23187存在下で細胞内 Mg^{2+} が減少すると共輸送が低下する²⁷⁾。ヒト赤血球の共輸送もATP依存性があり¹⁵⁾、 Mg^{2+} が欠乏すると共輸送は低下、増加すると刺激される⁶⁴⁾。

これらの結果は共輸送が、輸送体蛋白質の磷酸化によって活性化、脱磷酸化によって非活性化される可能性を示す。共輸送の調節に蛋白質磷酸化が関与する証拠として、動脈内皮細胞ではプロテインホスファターゼの阻害剤オカダ酸とカリクリンが共輸送を刺激するのに対し、プロテインキナーゼの阻害剤K252aがこれを阻害する事実がある^{53,87)}。ホスファターゼ1型阻害剤のカリクリンは作用がオカダ酸の50倍も強力であることから、脱磷酸化はホスファターゼ1型を経由して起こると推定される。この様に蛋白質の磷酸化は共輸送活性の前提条件であり、プロテインホスファターゼとキナーゼの間のバランスで左右されるため、キナーゼ活性を特に刺激しなくてもホスファターゼ阻害だけで輸送活性が変化する⁸³⁾。

我々は酸化的磷酸化の脱共役剤CCCPの存在下で、培養液のグルコース濃度を変えて細胞内ATPを正常値以下の各値に変化させ⁴³⁾、HeLa細胞のプロセミド感受性 Rb^+ 取り込みとATPレベルの関係について調べた⁴²⁾。その結果、ATPはやはりエネルギー源ではないこと、その濃度の増加によって Rb^+ 取り込みの V_{max} は影響を受けないが、 $\text{K}^+(\text{Rb}^+)$ に対する親和性が増加すること、即ち輸送体の活性化

は活性部位数の増加ではなく、質的变化によることを解明した。共輸送体が $1\text{Na}^+/1\text{K}^+/2\text{Cl}^-$ を輸送するに当って、 Rb^+ と Cl^- の結合時(別の実験結果から Rb^+ と Cl^- は同時に結合)に ATP を要求し(図 4), ADP や AMP の効果はない。 ^3H -ブメタニドの気道上皮細胞基底外側膜への結合は ATP や UTP で刺激され、ヌクレオチドによる Cl^- チャネルを介する先端側 Cl^- 流出促進の 2 次的効果であるといわれるが³⁵⁾, Cl^- 流出を生じない嚢胞線維症の鼻粘膜上皮細胞でもヌクレオチドによる ^3H -ブメタニド結合の増加がみられる³⁵⁾。共輸送と ATP の化学量論的關係については、研究者間で差異がみられ、ATP 作用部位数を 1 個⁹⁵⁾ または 2 個⁴²⁾ とするもの、一定の關係が成立しない

とするもの²⁸⁾に意見が分かれる。ATP の作用仮説には、1) 共輸送体に直接結合するアロステリックな調節因子、2) 輸送体蛋白質を燐酸化して輸送活性を上げるためのプロテインキナーゼの基質であるとする 2 つの考え方が⁸³⁾。プロテインホスファターゼとキナーゼの阻害剤を用いた研究結果は 2) の意見を支持するが、早急に結論を出すことはできない。なお、2-DG によってヒト赤血球の ATP を減少させても、ブメタニド感受性および Cl^- 依存性 K^+ 輸送を阻害しないという報告もあることを補足する⁷⁷⁾。

次に細胞内シグナル伝達系の役割を調べた研究を紹介する。先ずヒト赤血球のブメタニド感受性 K^+ 取り込みや⁷⁷⁾, HeLa 細胞のプロセミド感受性 Rb^+ 取り込みには細胞内 cAMP の効果がない⁴²⁾。しかしイソプロテレノルや cAMP アナログは気道上皮細胞基底外側膜の ^3H -ブメタニド結合を刺激し³⁵⁾, cAMP を増加させるホルスコリンは骨肉腫芽細胞のブメタニドまたはプロセミド感受性 $^{86}\text{Rb}^+$ 取り込みを刺激する¹¹²⁾。上皮小体ホルモンとプロスタグランジン E_2 はこの細胞の cAMP と遊離 Ca^{2+} 濃度を増加、PKC を刺激、同時に共輸送の活性化を起こすのに反し、エンドセリンは遊離 Ca^{2+} 濃度を上げ、PKC を刺激するが、cAMP を増加せず、共輸送には無効果である¹¹²⁾。RVI を指標とした場合も、ホルスコリンと IBMX の同時作用で刺激される⁵²⁾。 β 受容体アゴニストのイソプロテレノル、ノルアドレナリンはラット耳下腺腺細胞の共輸送を経由する NH_4^+ 流出を刺激、アンタゴニストのアテノロールが阻害する⁸⁷⁾。8-プロモ cAMP や IBMX も刺激するが、プロテインキナーゼ阻害剤 H9, スタウロスポリンや K 252 a は阻害する⁸⁷⁾。

以上の結果に対し、培養ヒトリンパ腫瘍細胞のブメタニド感受性 $^{86}\text{Rb}^+$ 取り込みはイソプロテレノルで顕著に抑制され、同時に cAMP 依存性プロテインキナーゼ A (PKA) とアデニレートシクラーゼの活性化が生じる。イソプロテレノルの阻害は β -アドレナリン受容体アン

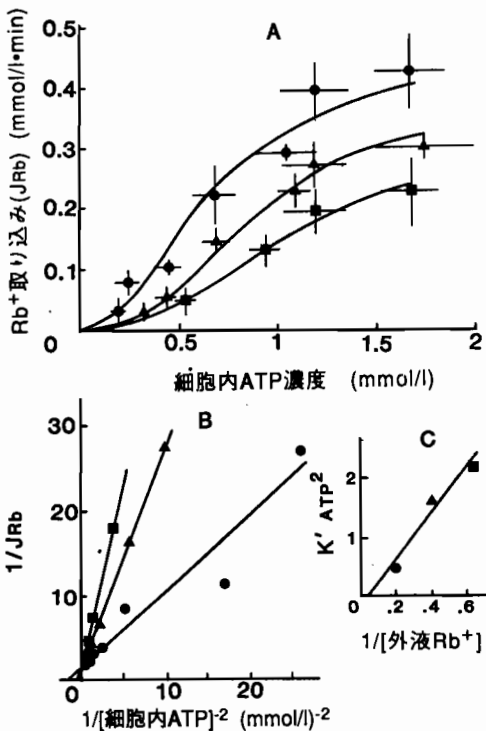


図 4. ウワバイン非感受性・プロセミド感受性 Rb^+ 取り込みに及ぼす細胞内 ATP の刺激効果. A. 外液 Rb^+ の影響: ● 5 mM, ▲ 2.5 mM, ■ 1.6 mM. 各点は 4 回の実験値の平均、バーは標準偏差を示す. B. A のデータの両逆数プロット. C. B で求めた Rb^+ の見かけの K_m と細胞内 ATP レベルの關係. (Ikehara, T. et al. ⁴²⁾より引用)

タゴニストのナドロールが除去し、ジブチリル cAMP も抑制効果を示すことから、PKA の活性化はこの細胞の共輸送を阻害する²⁴⁾。同様な cAMP の阻害効果は内皮細胞⁷⁾、血管平滑筋細胞⁷⁴⁾で報告されている。

アフリカツメガエルの培養尿管細胞の特異的 ^3H -ブメタニド結合はイオノマイシン、アデノシンやホルスコリンで刺激、PKC を活性化するホルボルエステルで阻害される²²⁾。ホルボルエステルは骨肉腫芽細胞^{52,112)}、血管平滑筋細胞⁸¹⁾及びヒト大腸腺癌細胞²⁹⁾の共輸送も阻害する。逆に、この阻害剤による線維芽細胞の PKC 活性化が逆に共輸送を刺激するという報告もある^{47,84,86)}。

他方、ホルボルエステルでプロテインキナーゼ C (PKC) を刺激しても BALB/c 3T3 線維芽細胞の共輸送は影響されないが、 Ca^{2+} 濃度を一過性に上げる血清や各種の成長因子で活性化される。このときカルモジュリン阻害剤のトリフルオペラジンかクロプロマジンと細胞内 Ca^{2+} 動員を阻害する TMB-8 を投与すると、血清や成長因子で刺激した共輸送をブロックする¹⁰¹⁾。舌下線の腺胞細胞では、イオノマイシンやカルバコル(ムスカリン受容体アゴニスト)による Ca^{2+} 濃度の上昇はブメタニド感受性の細胞内 Na^+ 濃度増加を引き起こし、この増加は Ca^{2+} のキレート剤で阻害される¹¹⁴⁾。エールリッヒ腹水腫瘍細胞でも、ホスフォリパーゼ C を刺激するブラジキニンが細胞内 Ca^{2+} を動員し、ブメタニド感受性 K^+ 取り込みを促進するが、カルモジュリン阻害剤ピモジドはこの取り込みを阻害する⁴⁷⁾。

以上の結果はやや錯綜しているが、 $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ 共輸送が各種細胞内シグナル伝達系の調節作用を受け、その効果は細胞や阻害剤の種類によって一様でないことがわかる。cAMP の増加は PKA を活性化し、共輸送を刺激する場合が多いが、逆の例もある。PKC の刺激に関しても、共輸送を抑制するとする報告が多い反面、無関係または刺激作用を示すものがある。細胞内遊離 Ca^{2+} の増加は共輸送を促進し、 Ca^{2+} -

カルモジュリン系等の関与が考えられる。

シグナル伝達系が共輸送に及ぼす効果はどのような機作で生じるのだろうか。家兎腎のヘンレ上行脚細胞(SV40変換細胞)の cAMP 生成とブメタニド感受性 $^{86}\text{Rb}^+$ 取り込みはカルシトニンその他の物質で刺激されるが、このとき Rb^+ に関するみかけの K_m は変わらないで、みかけの V_{max} が増加する¹¹¹⁾。ヒト大腸癌細胞に cAMP を数時間作用するとき共輸送の活性化が起こり⁹⁹⁾、アクチノマイシン D やシクロヘキシミドで阻害されないことから²⁹⁾、既存の輸送体の活性化または動員によって起こると考えるべきである。また血管作動性腸管ペプチド(VIP)がこの細胞のブメタニド感受性 K^+ 取り込みを刺激するが、多分 cAMP の増加の結果であろう¹⁰⁸⁾。このときも K^+ に関するみかけの K_m は変化しないでみかけの V_{max} が増加する。ラット腎系球体のメサングウム細胞では、ホルボルエステルまたは細胞内遊離 Ca^{2+} の増加によって共輸送が一過性に増加した後減少に転じ、8-プロモ cAMP 或はホルスコリンと IBMX の組み合わせの場合は一過性に抑制した後増加に転じる。いずれも2相性の調節であり、特に後半の調節は主に共輸送活性部位数の変化による⁴¹⁾。このようにシグナル伝達系を介する共輸送の調節は、輸送体の質的变化よりも活性型の数の変化に基づくことを支持する結果が多い。

VI. ブメタニド結合と輸送体蛋白質分子

ブメタニドは細胞膜の特定部位へ特異的に結合する性質をもっている。この結合部位についてはまだ十分に解明されていないが、アヒル赤血球ではブメタニドの共輸送阻害に対して外液 Cl^- が競争的に作用することから³⁶⁾、輸送体の Cl^- 結合部位がブメタニド結合部位であると考えられてきた。しかし近年、同種の赤血球或は膜標品を用いた研究から、 ^3H -ブメタニド結合に対して Cl^- が2相性の影響を与えることがわかってきた^{32,38,109)}。低濃度における高親和性部位への Cl^- 結合はブメタニド結合を

刺激するが、高濃度における低親和性部位への Cl^- 結合はこれを阻害するので、少なくとも低親和性部位とブメタニド結合部位は同一でないといえる^{38,109)}。

アヒル赤血球ではブメタニド結合部位数の増加と共輸送活性の促進との間に相関性が認められ^{32,33)}、家兎耳下腺細胞の基底外側膜小胞の³H-ブメタニド結合は Na^+ , K^+ , Cl^- に強い依存性がある。他の細胞でも外液の Na^+ , K^+ または Cl^- を欠くと特異的³H-ブメタニド結合が極端に低下する⁴⁹⁾。このような理由からブメタニド結合は共輸送活性の重要な指標として使用することができる。Sarkadi と Parker (1991)は相関性の原因として、輸送体の活性化に伴ってブメタニドが膜内へ組み込み込まれるか、或は機能している輸送体だけがブメタニドを結合するためではないかと考えている⁹⁷⁾。

ブメタニド結合の至適 pH は 7.8~8.1 であり、6.0 まで減少すると結合能が急激に低下するので、共輸送体はプロトン附加によって阻害されるらしい³⁸⁾。特異的ブメタニド結合能をアフリカツメガエルの培養遠位尿管細胞でみた場合、8.6 pmol/mg 蛋白質で、結合親和性 K_d は $1.6 \mu\text{M}$ である²²⁾。一方、ヒト大腸癌細胞²⁹⁾と血管内皮細胞⁷²⁾の飽和結合の K_d はそれぞれ $0.1\sim 0.2 \mu\text{M}$ と $0.13 \mu\text{M}$ である。Kaji (1993)はマウス腎のヘンレループ上行脚細胞の³H-ブメタニド結合のスキヤチャードプロットが直線に最もよくフィットするので、結合部位は1個であると推定し、一方、 K_d が $0.20 \mu\text{M}$ 、最大結合能が 0.63 pmol/mg 蛋白質であり、同時に測定したブメタニド感受性 K^+ 取り込みのデータを考慮して、ブメタニド結合部位数は1細胞当たり53,000個、転回数は毎分255と結論している⁴⁹⁾。

阻害剤等の影響をみると、ヒト大腸癌細胞の³H-ブメタニド結合部位数はホルボルエステルによって減少する²⁹⁾。メサングイウム細胞では前述のように共輸送活性に2相性の変化が起こり、ホルボルエステルは後半の輸送を阻害、ホルスコリン及び IBMX は刺激して、それぞれ

最大結合能(対照値 0.33 pmol/mg 蛋白質)の有意な減少と増加を生じるが、 K_d (対照値 $0.16 \mu\text{M}$)は変化しない⁴¹⁾。以上の結果は同じ阻害剤が引き起こす共輸送の V_{max} とイオン K_m の変化に一致する。ブメタニド結合の K_d 値はアフリカツメガエルの細胞を除いていずれもよく近似し、しかもブメタニドによる共輸送阻害の K_i 値(前述)とほぼ一致する。

七面鳥赤血球の共輸送を cAMP かアドレナリンで刺激すると 230-kDa の膜蛋白質が磷酸化し²⁾、またカエル赤血球の共輸送刺激と 240-kDa の蛋白質の磷酸化がよく似た時間経過を示すことが早くから報告されている⁹³⁾。近年、特異的な³H-ブメタニド結合を利用してウサギ耳下腺の基底外側膜の特定部位を標識し、表面活性剤を用いて約 200-kDa の分子量をもつ高親和性ブメタニド結合蛋白質を分離、部分純化することに成功している。表面活性剤処理は一旦ブメタニド結合能を失活させるが、大豆脂質の添加によって回復する¹¹⁰⁾。回復は各種の純粋な脂質の添加によっても可能で、特に細胞膜ではマイナーな負荷電性リン脂質のホスファチジルセリンが効果的であるのに対し、哺乳類形質膜の主要成分であるホスファチジルコリン等は効果がないから、この特殊な脂質の必要性はブメタニド結合親和性が異種細胞間で異なる理由を説明する¹²⁾。上記の分子量 200-kDa はイヌ腎尿管上皮³⁴⁾から分離した蛋白質の約 150-160-kDa と大差がない。後二者の蛋白質は光反応性ループ利尿剤³H-BSTBA を用いて $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ 共輸送体であると同定されている。サメ直腸腺からも 200-kDa のブメタニド結合性膜蛋白質を分離し、ホルスコリン投与か細胞収縮による共輸送の活性化に対応する磷酸化を認めている⁶⁰⁾。この蛋白質分子構造の特定領域を認識する複数の単クローン抗体を作り、その1つを利用して作製した免疫親和基質を用いて、蛋白質を 195-kDa のシングルバンドの段階(電気泳動法)まで純化している⁶³⁾。一方、エールリッヒ腹水腫瘍細胞では分子量の少ない 82-kDa と 39-kDa の蛋白質が

共輸送に関与するので^{19,23)}, 大きい蛋白質のサブユニットか分解産物かであろうとみなされる¹⁹⁾. しかしサメ直腸腺の膜蛋白質の単クローン抗体はいずれも 80-kDa の物質を認識せず, またトリプシン等のプロテアーゼの分解産物にもこの大きさの物質が含まれないので疑問が残る⁶³⁾.

以上の事実から共輸送体の実体は分子量 150-200-kDa のリンと脂質を含む糖蛋白質であると推定されるが, 今後の研究結果を待たなければならない.

VII. 共輸送体モデルと対称性

$\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ 共輸送体のイオン結合解離が細胞膜を挟んで対称的に生じるかどうかは問題である. Lytle と McManus (1986) はアヒル赤血球で単純な glide symmetry のモデルを提唱してきた⁶²⁾. このモデルはイオンを充分結合した輸送体が内向きと外向き構造の間を素早く振動する. 外向きの空の輸送体は Na^+ , Cl^- , Rb^+ (K^+), Cl^- , の順にイオンを結合すると内向きに変わって, 同じ順序でイオンを内液へ完全放出し空になるか, 条件によっては, 例えば Na^+ と Cl^- だけを放出し, 内液から Na^+ と Cl^- を結合して内向きに戻る. 前者では $1\text{Na}^+ / 1\text{K}^+ / 2\text{Cl}^-$ を完全輸送, 後者では $\text{Na}^+ / \text{Na}^+$ が交換される. 内向き輸送体の場合は逆の順序で内液イオンを結合する. 我々は実験結果に基づき, HeLa 細胞のフロセミド感受性輸送が殆ど完全輸送だけであることを確かめてから, 先ず Na^+ と低親和性部位へ Cl^- が, 次いで Rb^+ (K^+) と高親和部位へ Cl^- が同時に結合してから, 内向きに一斉に輸送されるというモデルを提唱してきた⁶⁸⁾. 我々の結果を基にして, Stein (1990) は Na^+ の次ぎに Cl^- が結合し, 次いで Rb^+ と Cl^- が任意に結合する可能性を指摘している¹⁰²⁾.

MaManus のモデルは細胞膜の両側で共輸送が対称であることを前提に置いているが, それには賛否両論がある. 賛成論の根拠として, ヒト赤血球の共輸送にはこのモデルで説明できる

Na^+/K^+ 共輸送と K^+ / K^+ 交換¹⁸⁾, フロセミド感受性 $\text{Na}^+ / \text{Na}^+$ 交換⁵⁾ が認められ, エールリッヒ腹水腫瘍細胞でもループ利尿剤感受性の 1 対 1 の $\text{Na}^+ / \text{Na}^+$, K^+ / K^+ 交換がある¹⁰⁷⁾. しかし同じ赤血球でも, 外液 Cl^- を NO_3^- で置換すると内向き共輸送が消失するのに反し, 外向き輸送ではイオンの相互依存がみられず, また外液 Na^+ は共輸送による K^+ 取り込みを刺激するが, 内液 K^+ で刺激される Na^+ 流出がない⁵⁵⁾. マウス腎ヘンレループの上行脚細胞の外向き $^{86}\text{Rb}^+$ 輸送はブメタニドで阻害されないのが共輸送体を經由する K^+ / Rb^+ 交換はない⁴⁹⁾. HeLa 細胞のフロセミド感受性 Rb^+ 取り込みは内液 Na^+ で阻害されるが, フロセミド感受性 K^+ 流出は外液 Na^+ の阻害を受けない(池原ら未発表). これ等一連の結果は非対称説を支持する.

VIII. おわりに

$\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ 共輸送による Rb^+ (K^+) 取り込みが細胞の全 K^+ 取り込みに占める割合は, HeLa 細胞で約 25%⁶⁹⁾, マウス 3T3 細胞で 20~40%⁴⁾, ヒト網膜色素上皮細胞⁵¹⁾ では約 25% である. ヒトリンパ腫細胞²⁴⁾ と遠位尿管細胞 (アフリカツメガエル)²²⁾ では実にそれぞれ 74% と 63% に達して最も主要な 1 価イオン輸送系となっている. 全受動輸送に占める割合でいえば, HeLa 細胞で 71~77%⁶⁸⁾, マウス 3T3 細胞で 57%⁴⁾, エールリッヒ腹水腫瘍細胞では 76%¹⁰⁷⁾ であり, 重要な経路であることがわかる. 特に Cl^- にとって不可欠の輸送経路である.

この様に細胞間で多少の差異はあるが, 共輸送がイオン輸送系の中で大きい比率を示すことは, 細胞機能の遂行に重要な役割を果たすことを意味する. 細胞によっては共輸送が常に活動するものもあれば, 休止状態からホルモン, 成長因子の刺激で活性化するものもあり, 上皮細胞では分泌と吸収等, 培養細胞や赤血球等では細胞内イオン環境の恒常性維持, 容積調節等に役立つことは既に詳述した.

終りに細胞の基本的機能である増殖への影響

について触れておく。細胞周期の G_0/G_1 期で休止する BALB/c 3T3 細胞の共輸送は各種のミトゲンによって活性化される¹⁰¹⁾。胎児血清と各種の成長因子は休止中のヒト皮膚線維芽細胞の共輸送を劇的に刺激し、同時に細胞は G_0/G_1 期から脱出して S 期へ進行する。フロセミドやブメタニドは細胞周期の進行と DNA 合成を阻害し、しかも阻害は可逆的、特異的であるから共輸送が分裂発現のシグナル伝達において重要な役割をもつに相違ない⁸⁵⁾。他方、ハムスター線維芽細胞の場合には血清や各種の成長因子が共輸送と DNA 合成を刺激するが、ブメタニドは DNA 合成を阻害しないので、共輸送は細胞増殖に必須ではない⁸⁶⁾。従って細胞増殖に於ける共輸送の重要性は細胞によって異なる。

文 献

- 1) Aiton, J. F., Brown, C. D. A., Ogden, P. & Simmons, N. L. (1982) K^+ transport in 'tight' epithelial monolayers of MDCK cells. *J. Membr. Biol.*, **65**, 99-109
- 2) Alper, S. L., Beam, K. G. & Greengard, P. (1980) Hormonal control of $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ co-transport in turkey erythrocytes. Multiple site phosphorylation of goblin, a high molecular weight protein of the plasma membrane. *J. Biol. Chem.*, **255**, 4864-4871
- 3) Altamirano, A. A. & Russell, J. M. (1987) Coupled $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ efflux. "Reverse" unidirectional fluxes in squid giant axons. *J. Gen. Physiol.*, **89**, 669-686
- 4) Atlan, H., Snyder, D. & Panet, R. (1984) Ouabain-resistant Na^+ , K^+ transport system in mouse NIH 3T3 cells. *J. Membr. Biol.*, **81**, 181-188
- 5) Brand, S. C. & Whittam, R. (1985) The change from symmetry to asymmetry of a sodium transport system in red cell membranes. *Proc. R. Soc. Lond. B*, **223**, 449-457
- 6) Breitwieser, G. E., Altamirano, A. A. & Russell, J. M. (1990) Osmotic stimulation of $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{Cl}^-$ cotransport in squid giant axon is $[\text{Cl}^-]_i$ dependent. *Am. J. Physiol.*, **258**, C 749-C 753
- 7) Brock, T. A., Brugnara, C., Canessa, M. & Gimbrone, M. A., Jr. (1986) Bradykinin and vasopressin stimulate $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{Cl}^-$ cotransport in cultured endothelial cells. *Am. J. Physiol.*, **250**, C 888-C 895
- 8) Brown, C. D. A. & Murer, H. (1985) Characterization of a $\text{Na} : \text{K} : 2\text{Cl}$ cotransport system in the apical membrane of a renal epithelial cell line (LLC-PK₁). *J. Membr. Biol.*, **87**, 131-139
- 9) Brugnara, C., Canessa, M., Cusi, D. & Tosteson, D. C. (1986) Furosemide-sensitive Na and K fluxes in human red cells. Net uphill Na extrusion and equilibrium properties. *J. Gen. Physiol.*, **87**, 91-112
- 10) Canessa, M., Brugnara, C., Cusi, D. & Tosteson, D. C. (1986) Modes of operation and variable stoichiometry of the furosemide-sensitive Na and K fluxes in human red cells. *J. Gen. Physiol.*, **87**, 113-142
- 11) Chipperfield, A. R. (1981) Chloride dependence of furosemide- and phloretin-sensitive passive sodium and potassium fluxes in human red cells. *J. Physiol., (Lond.)*, **312**, 435-444
- 12) Corcelli, A. & Turner, R. J. (1991) Role of phospholipids in the binding of bumetanide to the rabbit parotid $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ cotransporter. *J. Membr. Biol.*, **120**, 125-130
- 13) Cornet, M., Lambert, I. H. & Hoffmann, E. K. (1993) Relation between cytoskeleton, hypoosmotic treatment and volume regulation in Ehrlich ascites tumor cells. *J. Membr. Biol.*, **131**, 55-66
- 14) Cremaschi, D., Porta, C., Botta, G. & Meyer, G. (1992) Nature of the neutral $\text{Na}^+ - \text{Cl}^-$ coupled entry at the apical membrane of rabbit gallbladder epithelium: IV. Na^+/H^+ , $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ double exchange, hydrochlorothiazide-sensitive $\text{Na}^+ - \text{Cl}^-$ symport and $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$ cotransport are all involved. *J. Membr. Biol.*, **129**, 221-235
- 15) Dagher, G., Brugnara, C. & Canessa, M. (1985) Effects of metabolic depletion on the furosemide-sensitive Na and K fluxes in human red cells. *J. Membr. Biol.*, **86**, 145-155
- 16) DiMattio, J., Degnan, K. J. & Zadunaisky, J. A. (1983) A model for transepithelial ion transport across the isolated retinal pigment epithelium of the frog. *Exp. Eye Res.*, **37**, 409-420
- 17) Drewnowska, K., & Baumgarten, C. M. (1991) Regulation of cellular volume in rabbit ventricular myocytes: bumetanide, chlorothiazide, and ouabain. *Am. J. Physiol.*, **260**, C 122-C 131
- 18) Duhm, J. (1987) Furosemide-sensitive K^+ (Rb^+) transport in human erythrocytes: modes of operation, dependence on extracellular and intracellular Na^+ , kinetics, pH dependency and the effect of cell volume and N-ethylmaleimide. *J. Membr. Biol.*, **98**, 15-32
- 19) Dunham, P. B., Jessen, F. & Hoffmann, E. K. (1990) Inhibition of $\text{Na}-\text{K}-\text{Cl}$ cotransport in Ehrlich ascites cells by antiserum against purified proteins of the cotransporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 6828-6832
- 20) Ellory, J. C. & Stewart, G. W. (1982) The human erythrocyte Cl^- -dependent $\text{Na}-\text{K}$ cotransport sys-

- tem as a possible model for studying the action of loop diuretics. *Br. J. Pharmac.*, **75**, 183-188
- 21) Eveloff, J. L. & Warnock, D. G. (1987) Activation of ion transport systems during cell volume regulation. *Am. J. Physiol.*, **252**, F1-F10
 - 22) Fan, P.Y., Haas, M. & Middleton, J. P. (1992) Identification of a regulated $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ cotransport system in a distal nephron cell line. *Biochim. Biophys. Acta*, **1111**, 75-80
 - 23) Feit, P. W., Hoffmann, E. K., Schiødt, M., Kristensen, P., Jessen, F. & Dunham, P. B. (1988) Purification of proteins of the Na^+/Cl^- cotransporter from membranes of Ehrlich ascites cells using a bumetanide-sepharose affinity column. *J. Membr. Biol.*, **103**, 135-147
 - 24) Feldman, R. D. (1992) β -adrenergic inhibition of $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ cotransport in lymphocytes. *Am. J. Physiol.*, **263**, C1015-C1020
 - 25) Ferrari, P., Torielli, L., Cirillo, M., Salardi, S. & Bianchi, G. (1991) Sodium transport kinetics in erythrocytes and inside-out vesicles from Milan rats. *J. Hypertens.*, **9**, 703-711
 - 26) Ferrari, P., Torielli, L., Salardi, S., Rizzo, A. & Bianchi, G. (1992) $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ cotransport in resealed ghosts from erythrocytes of the Milan hypertensive rats. *Biochim. Biophys. Acta*, **1111**, 111-119
 - 27) Flatman, P. W. (1988) The effects of magnesium on potassium transport in ferret red cells. *J. Physiol. (Lond.)*, **397**, 471-487
 - 28) Flatman, P. W. (1991) The effects of metabolism on $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ co-transport in ferret red cells. *J. Physiol. (Lond.)*, **437**, 495-510
 - 29) Franklin, C. C., Turner, J. T. & Kim, H. D. (1989) Regulation of $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ cotransport and [^3H] bumetanide binding site density by phorbol esters in HT 29 cells. *J. Biol. Chem.*, **264**, 6667-6673
 - 30) Garay, R., Adragna, N., Canessa, M. & Tosteson, D. (1981) Outward sodium and potassium cotransport in human red cells. *J. Membr. Biol.*, **62**, 169-174
 - 31) Geck, P., Pietrzyk, C., Burckhardt, B.-C., Pfeiffer, B. & Heinz, E. (1980) Electrically silent cotransport of Na^+ , K^+ and Cl^- in Ehrlich cells. *Biochim. Biophys. Acta*, **600**, 432-447
 - 32) Haas, M., and Forbush, B., III. (1986) [^3H] bumetanide binding to duck red cells. Correlation with inhibition of $(\text{Na} + \text{K} + 2\text{Cl})$ co-transport. *J. Biol. Chem.*, **261**, 8434-8441
 - 33) Haas, M. & Forbush, B., III. (1987) Na , K , Cl -cotransport system: characterization by bumetanide binding and photolabelling. *Kidney Int.* **32**, S134-S140
 - 34) Haas, M. & Forbush, B., III. (1987) Photolabeling of a 150-kDa $(\text{Na} + \text{K} + \text{Cl})$ cotransport protein from dog kidney with a bumetanide analogue. *Am. J. Physiol.*, **253**, C243-C252
 - 35) Haas, M., McBrayer, D. G. & Yankaskas, J. R. (1993) Dual mechanisms for $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ cotransport regulation in airway epithelial cells. *Am. J. Physiol.*, **264**, C189-C200
 - 36) Haas, M. & McManus, T. J. (1983) Bumetanide inhibits $(\text{Na} + \text{K} + 2\text{Cl})$ co-transport at a chloride site. *Am. J. Physiol.*, **245**, C235-240
 - 37) Hässinger, D. & Lang, F. (1991) Cell volume in the regulation of hepatic function: a mechanism for metabolic control. *Biochim. Biophys. Acta*, **1071**, 331-350
 - 38) Hegde, R. S. & Palfrey, H. C. (1992) Ionic effects on bumetanide binding to the activated $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ cotransporter: selectivity and kinetic properties of ion binding sites. *J. Membr. Biol.*, **126**, 27-37
 - 39) Hoffmann, E. K., Simonsen, L. O. & Lambert, I. H. (1984) Volume-induced increase of K^+ and Cl^- permeabilities in Ehrlich ascites tumor cells. Role of internal Ca^{2+} . *J. Membr. Biol.*, **78**, 211-222
 - 40) Hoffmann, E. K., Sjøholm, C. & Simonsen, L. O. (1983) Na^+ , Cl^- cotransport in Ehrlich ascites tumor cells activated during volume regulation (regulatory volume increase). *J. Membr. Biol.*, **76**, 269-280
 - 41) Homma, T. & Harris, R. C. (1991) Time-dependent biphasic regulation of $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ cotransport in rat glomerular mesangial cells. *J. Biol. Chem.*, **266**, 13553-13559
 - 42) Ikehara, T., Yamaguchi, H., Hosokawa, K. & Miyamoto, H. (1990) Kinetic mechanism of ATP action in $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ cotransport of HeLa cells determined by Rb^+ influx studies. *Am. J. Physiol.*, **258**, C599-C609
 - 43) Ikehara, T., Yamaguchi, H., Hosokawa, K., Sakai, T. & Miyamoto, H. (1984) Rb^+ influx in response to changes in energy generation: effects of the regulation of the ATP content of HeLa cells. *J. Cell. Physiol.*, **119**, 273-282
 - 44) Ikehara, T., Yamaguchi, H., Hosokawa, K., Takahashi, A., Masuya, T. & Miyamoto, H. (1992) Different patterns of cell volume regulation in hyposmotic media between attached and suspended HeLa cells. *Biochim. Biophys. Acta*, **1111**, 151-158
 - 45) Ikehara, T., Yamaguchi, H., Hosokawa, K., Takahashi, A. & Miyamoto, H. (1993) Kinetic study on the effects of intracellular K^+ and Na^+ on Na^+ , K^+ , Cl^- cotransport of HeLa cells by Rb^+ influx determination. *J. Membr. Biol.*, **132**, 115-124
 - 46) Jensen, B. S. & Hoffmann, E. K. (1990) On the K^+ -dependence of the cation-anion cotransport system in Ehrlich ascites tumor cells. *Acta Physiol. Scand.*, **140**, 34A
 - 47) Jensen, B. S., Jessen, F. & Hoffmann, E. K. (1993) Na^+ , K^+ , Cl^- cotransport and its regulation in

- Ehrlich ascites tumor cells. Ca^{2+} /calmodulin and protein kinase C dependent pathways. *J. Membr. Biol.*, **131**, 161-178
- 48) Jessen, F. & Hoffmann, E. K. (1992) Activation of the $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ cotransport system by reorganization of the actin filaments in Ehrlich ascites tumor cells. *Biochim. Biophys. Acta*, **1110**, 199-201
- 49) Kaji, D. M. (1993) $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ cotransport in medullary thick ascending limb cells: kinetics and bumetanide binding. *Biochim. Biophys. Acta*, **1152**, 289-299
- 50) Kaji, D. M. & Tsukitani, Y. (1991) Role of protein phosphatase in activation of KCl cotransport in human erythrocytes. *Am. J. Physiol.*, **260**, C178-C182
- 51) Kennedy, B. G. (1990) $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ cotransport in cultured cells derived from human retinal pigment epithelium. *Am. J. Physiol.*, **259**, C29-C34
- 52) Khademazad, M., Zhang, B.-X., Loessberg, P. & Muallem S. (1991) Regulation of cell volume by the osteosarcoma cell line UMR-106-01. *Am. J. Physiol.*, **261**, C441-C447
- 53) Klein, J. D., Perry, P. B. & O'Neill, W. C. (1993) Regulation by cell volume of $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ cotransport in vascular endothelial cells: role of protein phosphorylation. *J. Membr. Biol.*, **132**, 243-252
- 54) Kort, J. J. & Koch, G. (1989) The $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ cotransport system in HeLa cells and HeLa cell mutants exhibiting an altered efflux pathway. *J. Cell. Physiol.*, **141**, 181-190
- 55) Kracke, G. R., Anatra, M. A. & Dunham, P. B. (1988) Asymmetry of Na-K-Cl cotransport in human erythrocytes. *Am. J. Physiol.*, **254**, C243-C250
- 56) Lauf, P. K. (1983) Thiol-dependent passive K/Cl transport in sheep red cells: II. Loss of Cl^- and N-ethylmaleimide sensitivity in maturing high K^+ cells. *J. Membr. Biol.*, **73**, 247-256
- 57) Levinson, C. (1990) Regulatory volume increase in Ehrlich ascites tumor cells. *Biochim. Biophys. Acta*, **1021**, 1-8
- 58) Levinson, C. (1991) Inability of Ehrlich ascites tumor cells to volume regulate following a hyperosmotic challenge. *J. Membr. Biol.*, **121**, 279-288
- 59) Levinson, C. (1992) Regulatory volume increase in Ehrlich ascites tumor cells is mediated by the 1Na:1K:2Cl cotransport system. *J. Membr. Biol.*, **126**, 277-284
- 60) Lytle, C. & Forbush, B., III. (1990) The [Na-K-Cl] cotransport protein is activated and phosphorylated by cell shrinkage or cyclic AMP in a secretory epithelium. *J. Cell Biol.*, **111**, 312 a
- 61) Lytle, C. & Forbush, B., III. (1992) Na-K-Cl cotransport in the shark rectal gland. II. Regulation in isolated tubules. *Am. J. Physiol.*, **262**, C1009-C1017
- 62) Lytle, C. & McManus, T. J. (1986) A minimal kinetic model of [Na+K+2Cl] cotransport with ordered binding and glide symmetry. *J. Gen. Physiol.*, **88**, 36 a
- 63) Lytle, C., Xu, J.-C., Biemesderfer, D., Haas, M. & Forbush, B., III. (1992) The Na-K-Cl cotransport protein of shark rectal gland. I. Development of monoclonal antibodies, immunoaffinity purification, and partial biochemical characterization. *J. Biol. Chem.*, **267**, 25428-25437
- 64) Mairbäurl, H. & Hoffman, J. F. (1992) Internal magnesium, 2,3-diphosphoglycerate, and the regulation of the steady-state volume of human red blood cells by the Na/K/2Cl cotransport system. *J. Gen. Physiol.*, **99**, 721-746
- 65) Mason, S. J., Paradiso, A. M. & Boucher, R. C. (1991) Regulation of transepithelial ion transport and intracellular calcium by extracellular ATP in human normal and cystic fibrosis airway epithelium. *Br. J. Pharmacol.*, **103**, 1649-1656
- 66) McRoberts, J. A., Erlinger, S., Rindler, M. J. & Saier, M. H., Jr. (1982) Furosemide-sensitive salt transport in the Madin-Darby canine kidney cell line. Evidence for the cotransport of Na^+ , K^+ , Cl^- . *J. Biol. Chem.*, **257**, 2260-2266
- 67) Mische, S. M., Mooseker, M. S. & Morrow, J. S. (1987) Erythrocyte adducin: A calmodulin-regulated actin-binding protein that stimulates spectrin-actin binding. *J. Cell Biol.*, **105**, 2837-2845
- 68) Miyamoto, H., Ikehara, T., Yamaguchi, H., Hosokawa, K., Yonezu, T. & Masuya, T. (1986) Kinetic mechanism of $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ cotransport as studied by Rb^+ influx into HeLa cells: Effects of extracellular monovalent ions. *J. Membr. Biol.*, **92**, 135-150
- 69) Miyamoto, H., Sakai, T., Ikehara, T. & Kaniike, K. (1978) Effects of Rb^+ substituted for K^+ on HeLa cells: Cellular content and membrane transport of monovalent cations, and cell growth. *Cell Str. Funct.*, **3**, 313-324
- 70) Montero, M. C. & Ilundáin, A. (1989) Effects of anisomotic buffers on K^+ transport in isolated chicken enterocytes. *Biochim. Biophys. Acta*, **979**, 269-271
- 71) Monterose, M. H., Knoblauch, C. & Murer, H. (1988) Separate control of regulatory volume increase and Na^+/H^+ exchange by cultured renal cells. *Am. J. Physiol.*, **255**, C76-C85
- 72) O'Donnell, M. E. (1989) [^3H] bumetanide binding in vascular endothelial cells. Quantitation of Na-K-Cl cotransporters. *J. Biol. Chem.*, **264**, 20326-20330
- 73) O'Donnell, M. E. (1993) Role of Na-K-Cl cotransport in vascular endothelial cell volume regulation. *Am. J. Physiol.*, **264**, C1316-C1326

- 74) O'Donnell, M. E. & Owen, N. E. (1986) Atrial natriuretic factor stimulates $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ cotransport in vascular smooth muscle cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 6132-6136
- 75) O'Grady, S. M., Musch, M. W. & Field, M. (1986) Stoichiometry and ion affinities of the $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ cotransport system in the intestine of the winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*). *J. Membr. Biol.*, **91**, 33-41
- 76) O'Grady, S. M., Palfrey, H. C. & Field, M. (1987) Characteristics and functions of $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ cotransport in epithelial tissues. *Am. J. Physiol.*, **253**, C177-192
- 77) O'Neill, W. C. (1991) Swelling-activated K^+/Cl^- cotransport: metabolic dependence and inhibition by vanadate and fluoride. *Am. J. Physiol.*, **260**, C308-C315
- 78) O'Neill, W. C. & Klein, J. D. (1992) Regulation of vascular endothelial cell volume by $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ cotransport. *Am. J. Physiol.*, **262**, C436-C444
- 79) Orlov, S. N., Kolosova, I. A., Cragoe, E. J., Gurlo, T. G., Mongin, A. A., Aksentsev, S. L. & Konev, S. V. (1993) Kinetics and peculiarities of thermal inactivation of volume-induced Na^+/H^+ exchange, $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ cotransport and K^+/Cl^- cotransport in rat erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta*, **1151**, 186-192
- 80) Orlov, S. N., Pokudin, N. I., Kotelevtsev, Y. V. & Gulak, P. V. (1989) Volume-dependent regulation of ion transport and membrane phosphorylation in human and rat erythrocytes. *J. Membr. Biol.*, **107**, 105-117
- 81) Owen, N. E. (1985) Effect of TPA on ion fluxes and DNA synthesis in vascular smooth muscle cells. *J. Cell Biol.*, **101**, 454-459, 1985.
- 82) Owen, N. E. & Prastein, M. L. (1985) $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ cotransport in cultured human fibroblasts. *J. Biol. Chem.*, **260**, 1445-1451
- 83) Palfrey, H. C. & Pewitt, E. B. (1993) The ATP and Mg^{2+} dependence of $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ cotransport reflects a requirement for protein phosphorylation: studies using calyculin A. *Pflügers Arch.*, **425**, 321-328
- 84) Panet, R. & Atlan, H. (1990) Bumetanide-sensitive $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ transporter is stimulated by phorbol ester and different mitogens in quiescent human skin fibroblasts. *J. Cell. Physiol.*, **145**, 30-38
- 85) Panet, R. & Atlan, H. (1991) Stimulation of bumetanide-sensitive $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ cotransport by different mitogens in synchronized human fibroblasts is essential for cell proliferation. *J. Cell Biol.*, **114**, 337-342
- 86) Paris, S. & Pouysseur, J. (1986) Growth factors activate the bumetanide-sensitive $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ cotransport in hamster fibroblasts. *J. Biol. Chem.*, **261**, 6177-6183
- 87) Paulais, M. & Turner, R. J. (1992) β -adrenergic upregulation of the $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ cotransporter in rat parotid acinar cells. *J. Clin. Invest.*, **89**, 1142-1147
- 88) Perry, P. B. & O'Neill, W. C. (1993) Swelling activated K^+ fluxes in vascular endothelial cells: volume regulation via K^+/Cl^- cotransport and K^+ channels. *Am. J. Physiol.*, **265**, C763-C769
- 89) Pewitt, E. B., Hegde, R. S., Haas, M. & Palfrey, H. C. (1990) The regulation of $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ cotransport and bumetanide binding in avian erythrocytes by protein phosphorylation and dephosphorylation. Effects of kinase inhibitors and okadaic acid. *J. Biol. Chem.*, **265**, 20747-20756
- 90) Rindler, M. J., McRoberts, J. A. & Saier, M. H., Jr. (1982) (Na^+/K^+) -cotransport in the Madin-Darby canine kidney cell line. Kinetic characterization of the interaction between Na^+ and K^+ . *J. Biol. Chem.*, **257**, 2254-2259
- 91) Rotin, D. & Grinstein, S. (1989) Impaired cell volume regulation in Na^+/H^+ exchange-deficient mutants. *Am. J. Physiol.*, **257**, C1158-C1165
- 92) Roy, G. & Sauvé R. (1987) Effect of anisotonic media on volume, ion and amino-acid content and membrane potential of kidney cells (MDCK) in culture. *J. Membr. Biol.*, **100**, 83-96
- 93) Rudolph, S. A. & Greengard, P. (1980) Effects of catecholamines and prostaglandin E_1 on cyclic AMP, cation fluxes, and protein phosphorylation in the frog erythrocytes. *J. Biol. Chem.*, **255**, 8534-8540
- 94) Russell, J. M. (1983) Cation-coupled chloride influx in squid axon. Role of potassium and stoichiometry of the transport process. *J. Gen. Physiol.*, **81**, 909-925
- 95) Russell, J. M. (1990) Role of K^+ and ATP in $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ cotransport by the squid giant axon. In: Reuss, L., Russell, J. M. & Szabo, G., Regulation of K^+ transport across biological membranes. Univ. of Texas Press, Austin, 265-282
- 96) Salardi, S., Saccardo, B., Borsani, G., Modica, R., Ferrandi, M., Tripodi, M. G., Soria, M., Ferrari, P., Baralle, F. E., Sidoli, A. & Bianchi, G. (1989) Erythrocyte adducin differential properties in the normotensive and hypertensive rats of the Milan strain. Characterization of spleen adducin m-RNA. *Am. J. Hypertens.*, **2**, 229-237
- 97) Sarkadi, B. & Parker, J. C. (1991) Activation of ion transport pathways by changes in cell volume. *Biochim. Biophys. Acta*, **1071**, 407-427
- 98) Schmidt, W. F., III, & McManus, T. J. (1977) Ouabain-insensitive salt and water movements in duck red cells. I. Kinetics of cation transport under hypertonic conditions. *J. Gen. Physiol.*, **70**, 59-79
- 99) Slotki, I. N., Breuer, W. V., Greger, R. & Cabantchik, Z. I. (1993) Long-term cAMP activa-

- tion of $\text{Na}^+-\text{K}^+-2\text{Cl}^-$ cotransporter activity in HT-29 human adenocarcinoma cells. *Am. J. Physiol.*, **264**, C 857-C 865
- 100) Smith, J. B. & Smith, L. (1987) $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ cotransport in cultured vascular smooth muscle cells: stimulation by angiotensin II and calcium ionophores, inhibition by cyclic AMP and calmodulin antagonists. *J. Membr. Biol.*, **99**, 51-63
- 101) Snyder, D., Atlan, H., Markus, M. & Panet, R. (1991) $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ cotransport is stimulated by a Ca^{++} -calmodulin-mediated pathway in BALB/c 3T3 fibroblasts. *J. Cell. Physiol.*, **149**, 497-502
- 102) Stein, W. D. (1990) Channels, carriers, and pumps. An introduction to membrane transport, Academic Press, San Diego, 188-219
- 103) Tas, P. W. L., Massa, P. T., Kress, H. G. & Koschel, K. (1987) Characterization of an $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ co-transport in primary cultures of rat astrocytes. *Biochim. Biophys. Acta*, **903**, 411-416
- 104) Thornhill, W. B. & Laris, P. C. (1984) KCl loss and cell shrinkage in the Ehrlich ascites tumor cell induced by hypotonic media, 2-deoxyglucose and propranolol. *Biochim. Biophys. Acta*, **773**, 207-218
- 105) Tivey, D. R., Simmons, N. L. & Aiton, J. F. (1985) Role of passive fluxes in cell volume regulation in cultured HeLa cells. *J. Membr. Biol.*, **87**, 93-105
- 106) Tseng, H. & Berk, B. C. (1992) The $\text{Na}/\text{K}/2\text{Cl}$ cotransporter is increased in hypertrophied vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.*, **267**, 8161-8167
- 107) Tupper, J. T. (1975) Cation flux in the Ehrlich ascites tumor cell. Evidence for Na^+ -for- Na^+ and K^+ -for- K^+ exchange diffusion. *Biochim. Biophys. Acta*, **394**, 586-596
- 108) Turner, J. T., Franklin, C. C., Bollinger, D. W. & Kim, H. D. (1990) Vasoactive intestinal peptide stimulates active K^+ transport and $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ cotransport in HT-29 cells. *Am. J. Physiol.*, **258**, C 266-C 273
- 109) Turner, R. J. & George, J. N. (1988) Ionic dependence of bumetanide binding to the rabbit parotid $\text{Na}/\text{K}/\text{Cl}$ cotransporter. *J. Membr. Biol.*, **102**, 71-77
- 110) Turner, R. J. & George, J. N. (1990) Solubilization and partial purification of the rabbit parotid $\text{Na}/\text{K}/\text{Cl}$ -dependent bumetanide binding site. *J. Membr. Biol.*, **113**, 203-210
- 111) Vuillemin, T., Teulon, J., Geniteau-Legendre, M., Baudouin, B., Estrade, S., Cassingena, R., Ronco, P. & Vandewalle, A. (1992) Regulation by calcitonin of $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ cotransport in a rabbit thick ascending limb cell line. *Am. J. Physiol.*, **263**, C 563-C 572
- 112) Whisenant, N., Zhang, B.-X., Khademazad, M., Loessberg, P. & Muallem, S. (1991) Regulation of $\text{Na}-\text{K}-2\text{Cl}$ cotransport on osteoblasts. *Am. J. Physiol.*, **261**, C 433-C 440
- 113) Zeuthen, T. (1991) Water permeability of ventricular cell membrane in choroid plexus epithelium from *Necturus Muculosus*. *J. Physiol. (Lond.)*, **444**, 133-151
- 114) Zhang, G. H., Cragoe, E. J., Jr. & Melvin, J. E. (1993) Na^+ influx is mediated by $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ cotransport and Na^+/H^+ exchange in sublingual mucous acini. *Am. J. Physiol.*, **264**, C 54-C 62