

## $\beta$ -アドレナリン受容体 up-regulation に伴う cyclic AMP 生成系の機能変化

垂水 千早

初代培養マウス大脳皮質神経細胞への非選択的  $\beta$ -アドレナリン受容体 ( $\beta$ -AR) 拮抗薬である nadolol に長期間曝露した場合に生じる  $\beta$ -AR および cAMP 生成系の発現変化の機能的関連性について検討した。 [ $^3$ H]CGP12177 結合は nadolol への曝露時間および曝露した nadolol 濃度に依存して有意に増加した。Scatchard 解析の結果、nadolol 曝露群では Bmax 値の有意な増加が認められた。 $\beta_1$ -および  $\beta_2$ -AR への [ $^3$ H]CGP12177 結合と、それぞれの mRNA 発現が nadolol 曝露により有意に増加した。Isoproterenol および forskolin 刺激性 cAMP 生成は nadolol 曝露により有意に亢進した。また、nadolol 曝露は AC type I の蛋白および mRNA 発現を有意に増加させた。以上の結果から、nadolol の長期曝露により、初代培養マウス大脳皮質神経細胞では  $\beta$ -AR 蛋白の発現増加に起因する up-regulation が誘発されるとともに、AC type I のみの発現亢進による cAMP 生成が生じることが明らかとなった。

(平成13年3月7日受理)

### Functional Relationship between $\beta$ -adrenergic Receptor Up-regulation and Adenylate Cyclase Expression in Mouse Cerebral Cortical Neurons

Chihaya TARUMI

The functional relationship between  $\beta$ -adrenergic receptors ( $\beta$ -AR) and adenylate cyclase (AC) expression following long-term exposure to nadolol, a non-selective  $\beta$ -AR antagonist, was examined using primary cultures of mouse cerebral cortical neurons. Increase in [ $^3$ H]CGP12177 binding to particulate fractions from the neurons was dependent on the concentration of nadolol and the duration of exposure to it. Scatchard analysis revealed that the increase in [ $^3$ H]CGP12177 binding following the exposure to  $10^{-8}$  M nadolol for five days was due to a significant increase in the Bmax value. In addition, under the above conditions, both  $\beta_1$ - and  $\beta_2$ -AR were found to have been up-regulated when examined by the [ $^3$ H]CGP12177 binding assay and Northern blot analysis, indicating that the up-regulation of  $\beta$ -AR is a consequence of  $\beta$ -AR protein synthesis. Cyclic AMP (cAMP) formation stimulated by isoproterenol and forskolin was enhanced after exposure to  $10^{-8}$  M nadolol for more than 72 and 24 hr, respectively. After exposure to  $10^{-8}$  M nadolol, Northern and Western blot analyses for AC showed increased expression of AC type I whereas, other types of AC ; i.e.) types II, VIII, and IX, were unchanged in. These results indicate that continuous exposure to nadolol up-regulated  $\beta$ -AR with increase its mRNA expression and cAMP formation activity due to increase in AC type I expression. (Accepted on March 7, 2001)

*Kawasaki Igakkaishi 27(2) : 97-110, 2001*

**Key Words** ① Regulation ② Cyclic AMP formation  
③ Adenylate cyclase expression

## 緒 言

$\beta$ -アドレナリン受容体 ( $\beta$ -adrenergic receptors:  $\beta$ -AR) 拮抗薬は臨床治療に応用されて以来、その治療的効果は高血圧症、不整脈などの心疾患において顕著であり、また狭心症あるいは心筋梗塞後の再梗塞などの予防に応用されている。さらに、 $\beta$ -AR 拮抗薬は神経精神領域においても、急性ストレス反応や不安の治療、偏頭痛の予防などに応用されており、一般に不安に対してはその効果が良好であることが知られている<sup>1)</sup>。

$\beta$ -AR はその作動薬により desensitization を生じ、一方、拮抗薬の長期投与に伴う受容体の継続的な遮断により up-regulation, すなわち  $\beta$ -AR 数の増加が誘発されることはよく知られている。このような受容体の発現変化は薬物長期曝露に対する生体反応の一つとして考えられている<sup>2)</sup>。非選択的  $\beta$ -AR 拮抗薬である propranolol への長期間曝露は、心臓<sup>3)~5)</sup>、肺<sup>3)</sup>およびリンパ球<sup>3), 6)~8)</sup>において、 $\beta$ -AR の up-regulation が誘発されることが報告されている。さらに  $\beta$ -AR を含めた諸種の神経伝達物質受容体が up-regulation を生じた場合には、これら受容体と機能的に連関する細胞内情報伝達系の機能的変化が生じることが断片的に報告されている。すなわち、うつ病患者大脳皮質では  $\alpha$ 2A-アドレナリン受容体 up-regulation に付随して G $\alpha$ i 蛋白の増加が生じること<sup>9)</sup>が認められている。また抗うつ薬である imipramine の長期間処置により  $\beta$ -AR および D<sub>2</sub> ドパミン受容体の up-regulation が誘発された状態では cyclic AMP (cAMP) 生成能の修飾が認められると報告されているが、その詳細な機序については説明がなされていない<sup>10), 11)</sup>。さらに、muscarinic acetylcholine receptor (mAChR)-phospholipase C 共役系を有する培養

神経細胞を用いた研究では、神経細胞への mAChR の特異的拮抗薬である atropine の長期間の曝露を行った場合に、mAChR および mAChR と共役する phosphatidyl inositol 代謝回転の変化が生じることを明らかにされている<sup>12)</sup>。これらの実験成績を勘案すると、神経伝達物質受容体の up-regulation はその受容体に連関する細胞内情報伝達系の機能変化をもたらす可能性が高いと推測されるが、これらの変化の詳細な検討は十分なされていない。

本研究では、 $\beta$ -AR およびこれと機能的に共軛する cAMP 生成系を有する初代培養マウス大脳皮質神経細胞<sup>13)</sup>を用い、この細胞への非選択的  $\beta$ -AR 拮抗薬である nadolol の曝露を行うことにより、 $\beta$ -AR の発現、および adenylate cyclase の発現の変化の機能的相関性を明らかにすることを試みた。

## 実験方法および実験材料

### 1) 大脳皮質神経細胞の単離および初代培養

マウス大脳皮質神経細胞の単離および初代培養は、既報に準じて行った<sup>14)</sup>。すなわち、ddy 系マウス (Japan SLC: Hamamatsu, Japan) の胎齢15日目の胎児より新皮質を摘出し、髄膜を除去した後、Ca<sup>2+</sup>-free Puck's 液中で細切し、37°C、5分間の0.1% trypsin による処理を行った。次いでパスツールピペットにより残存した組織片を機械的に破碎した。得られた細胞懸濁液に遠心操作 (900 g, 4°C, 2分) を加え、得られた沈渣を15%ウシ胎児血清, 10 mM N-tris (hydroxymethyl) methyl-2-aminoethane-sulfonic acid (TES), および 10 mM N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2 ethanesulfonic acid (HEPES) を含有する Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) により細胞が  $3 \times 10^6$  個/ml となるように調整して浮遊させ、この細胞懸濁液の 3 ml を、使用

前24時間予め poly-L-lysine で処理した Falcon "Primaria" RT 培養皿 (直径: 60 mm) に播種した。この細胞を 37°C, 湿度 100%, air 95%/CO<sub>2</sub> 5% の条件下で 3 日間培養したのち, 10  $\mu$ M cytosine arabinoside および 10% ウマ血清を含有する DMEM 中で 24 時間培養することにより, 非神経細胞の増殖の抑制を行った。その後, 10% ウマ血清含有 DMEM 中で培養を継続した。培養液は 4 日毎に新鮮な 10% ウマ血清含有 DMEM に交換し, 培養後 14 日目の神経細胞を実験に使用した。なお, 免疫組織学的検討などから本実験に用いた細胞の 95% 以上が神経細胞であることが確認されている<sup>14)</sup>。

## 2) 薬物の曝露

$\beta$ -AR の非選択的拮抗薬である nadolol の神経細胞への曝露は, 最終濃度が 10<sup>-8</sup> M となるように Hank's solution で調整したものを直接培養液中に添加した。

## 3) $\beta$ -AR 結合実験

Nadolol を曝露した神経細胞を氷冷した phosphate buffer saline (PBS: pH 7.4, 137 mM NaCl, 2.6 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12 H<sub>2</sub>O, 1.8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) にて 3 回洗浄し, 次いで 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) を加え, rubber policeman を用いて培養皿より細胞を剥離した。剥離した細胞を Polytron homogenizer を用いて破碎し (setting 6, 30 sec), 48,000 xg, 4°C, 20 分間の遠心分離を行った。得られた沈渣に 50 mM Tris-HCl buffer を加えて再び懸濁させ, 上記と同一条件にて再度遠心分離を行った。これらの操作ののち, 得られた沈渣を -80°C で 24 時間以上保存した。 $\beta$ -AR 結合実験の直前にこの標品を解冻し, 前述と同様の遠心操作を 2 回行うことにより洗浄した標品 (顆粒画分) を結合実験の標品として使用した。

$\beta$ -AR 結合実験には,  $\beta$ -AR に対する特異的拮抗薬である [<sup>3</sup>H]CGP12177 を放射性リガンドとして用いた<sup>15)</sup>。上述の通りに神経細胞より調整した顆粒画分を 50 mM Tris-HCl buffer

に浮遊させ, 結合実験系の総容量を 1 ml とし, 0.4~0.5 mg 蛋白を含むように調製し, 0.2 nM [<sup>3</sup>H]CGP12177 の存在下に 25°C, 60 分間の incubation を行った。Incubation 終了後, 減圧下で Whatman GF/B filter により反応液を吸引濾過し, さらに氷冷した 50 mM Tris-HCl buffer で filter を 3 回洗浄することにより反応を停止させた。次いで filter を 10 ml の Triton-xylene scintillator [Trion X-100: xylene (1 L 中に 2 g PPO, 2 g POPOP を含む) = 1:2] を含有する scintillation vial に移し filter に残存する [<sup>3</sup>H]CGP12177 の放射活性を liquid scintillation spectrometer で測定した。なお [<sup>3</sup>H]CGP12177 の特異的結合は, 非放射性性 alprenolol の非存在下で得られた [<sup>3</sup>H]CGP12177 の総結合量から 10  $\mu$ M alprenolol 存在下で得られた非特異的結合量を差し引くことにより算出した。

$\beta_1$ -および  $\beta_2$ -AR への [<sup>3</sup>H]CGP12177 結合の測定は, それぞれ 10<sup>-5</sup> M の  $\beta_2$ -および  $\beta_1$ -AR の選択的拮抗薬である ICI-118551 および metoprolol の存在下で結合実験を行った。

## 4) Cyclic AMP (cAMP) 生成量の測定

cAMP の測定は既報<sup>13)</sup>を一部改変して行った。Nadolol に培養 8 日目から 5 日間連続曝露した神経細胞を 4°C の Krebs Ringer bicarbonate buffer (KRB: pH 7.4, 137 mM NaCl, 4.8 mM KCl, 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2.7 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 6H<sub>2</sub>O, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, 10 mM glucose) にて 3 回洗浄し, 1 mM isobutylmethylxanthine (IBMX) を含む 37°C の KRB 1 ml を添加し, 20 分間の preincubation を行った。その後, 反応液を新鮮な 1 mM IBMX を含む 37°C に加温した KRB に交換し, 直ちに isoproterenol を添加することにより反応を開始した。反応開始 10 分後に反応液を吸引除去し, 氷冷した 6% trichloroacetic acid (TCA) を 500  $\mu$ l 添加することにより反応を停止させた。次いで神経細胞を培養皿より剥離したのち, 超音波により破碎し, 得られた懸濁液を, 1500 xg, 4°C, 10 分間の条件下に遠心分離した。得られた上清を約 2 ml の水飽和 ether

にて5回洗浄して十分にTCAを除去したものをcAMP測定用試料として、測定まで $-20^{\circ}\text{C}$ にて保存した。cAMP量の測定はcAMP enzyme immunoassay (EIA) systemを用いて行った。

Forskolin刺激に伴うcAMP生成量の測定は以下の通りに行った。すなわち、神経細胞を氷冷したPBSにて3回洗浄し、KRBを適量培養皿に加えてrubber policemanを用いて細胞を培養皿から剥離した。次いで、細胞をPolytron homogenizerにて破碎(setting 6, 30 sec)し、48,000 xg, 20分,  $4^{\circ}\text{C}$ の条件下で遠心分離を行った。得られた沈渣(顆粒分画)を同様の操作で2回洗浄し、1 mM INBX含有KRBで再懸濁し、その一部を反応液(50 mM Tris-HCl, 1 mM EGTA, 5 mM  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.5 mM ATP, 6 mM creatine phosphate, 50 u/ml creatine phosphokinase含有:pH 7.4)と混和した。反応はforskolinの添加を行うことにより開始した。 $37^{\circ}\text{C}$ , 10分間のincubationの後、 $100^{\circ}\text{C}$ , 2分間の煮沸を行い反応を停止した。さらに8,000 xg  $4^{\circ}\text{C}$ , 10分の遠心操作を加え、得られた上清をcAMP enzyme immunoassay (EIA) systemを用いて生成されたcAMP量を測定した。

##### 5) $\beta$ -AR, adenylate cyclase (AC)

および $\beta$ -actin cDNAの作製

$\beta$ -AR, ACおよび $\beta$ -actin cDNAのprobeの作製は既報を一部変更して作製した<sup>16)</sup>。すなわち、マウス全脳よりFASTTrack™ mRNA isolation kitを用いてPoly(A)<sup>+</sup> RNAを精製し、first strand cDNA synthesizing kitを用い、oligo d(T)をプライマーとして一本鎖のcDNAを合成した。このcDNAをテンプレートとしてPCR法により各cDNAの増幅を行った。なお、本研究で用いた $\beta$ -AR, ACおよび $\beta$ -actinに特異的な一対のプライマーは、DNA合成装置を用いて合成し(Table 1), 5'末端

をT4 kinaseでリン酸化したものをを用いた。cDNA塩基配列に特異的な2種類のプライマーを作製した(Table 1)。これらのプライマーとマウス全脳由来のcDNAを用いて得たPCR産物を、pVC18ベクターにクローニングを行った後に、その塩基配列の確認を行ったところ、各cDNAの塩基配列と同一の塩基配列を有していることが確認された。なお、 $\beta_1$ -および $\beta_2$ -AR, AC type IおよびXIの塩基配列はそれぞれ既報のデータを応用した<sup>17)-20)</sup>。また、AC type IIおよびVIIIについてはそれぞれNIH gene bankに公表されているもの(No. AA238604, MMU85021)を用いた。

つぎに、得られたPCR産物をフェノール処理およびエタノール沈殿により精製し、EcoRIアダプターを連結させ、さらに末端をリン酸化してpUC18のEcoRIサイトに挿入した。こうして得られたDNAを大腸菌に導入して培養し、プラスミドDNAを超遠心により精製した後EcoRIで切断し、アガロース電気泳動により各cDNAを精製した。

##### 6) Northern blot法による $\beta$ -AR, ACおよび $\beta$ -actin mRNAの測定

Table 1. PCR Amplification of Mouse  $\beta$ -AR, AC and  $\beta$ -actin cDNA

cDNA probe	Forward/Reverse Primer or Antisense Oligomer	cDNA Sizes
$\beta$ -AR1	$\beta$ -AR1F (5'-GACGACGACGACGATGACG-3') $\beta$ -AR1R (5'-GCCCTCATCACCTGGACTC-3')	144 bp
$\beta$ -AR2	$\beta$ -AR2F (5'-TGCCCTCAATCCTCTTATCT-3') $\beta$ -AR2R (5'-GTCTGGTTAGTGCTCTGCA-3')	352 bp
AC I	AC1F (5'-GGTCACCAATGTCCGATCCCTGC-3') AC1R (5'-TCTTACTCTTCGCTCTGCCAAC-3')	478 bp
AC II	AC2F (5'-GACATGAGCCCTTCCCTTCG-3') AC2R (5'-CACAACTACGGTAAACAGAAAAC-3')	574 bp
AC VIII	AC8F (5'-GGTCTGGCAGGCCCAATGGACTC-3') AC8R (5'-GATACTGAACTGGACACCCCGG-3')	806 bp
AC IX	AC9F (5'-CATCTCCCCAGACATCCGAGTCC-3') AC9R (5'-AGTCCCAGACCGGAACGCAGACC-3')	592 bp
$\beta$ -actin	Antisense oligomer for $\beta$ -actin (5'-AGGTCTCAAACATGATCTGGGTCA-3')	—

RNA blot hybridization は既報の方<sup>16)</sup>に準じて行った。

mRNA は培養14日目の神経細胞より精製した。氷冷した PBS にて神経細胞を3回洗浄し、rubber policeman を用いて神経細胞を培養皿から剥離した後、FASTTrack<sup>TM</sup> mRNA isolation kit を用いて Poly(A)<sup>+</sup>RNA を精製した。変性 Poly(A)<sup>+</sup> RNA は、formaldehyde および formamide を含む 1.1% agarose gel を用いた電気泳動により分離した。電気泳動終了後、gel を ethidium bromide で染色し、UV 照射下で RNA の band を確認した。次いで RNA を nitrocellulose filter (NitroPlus 2000, MSI) に移行させ、baking を行い完全に吸着させた。神経細胞より調製した  $\beta$ -AR および AC の cDNA 断片の標識には、[ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP, random-primer および Klenow 断片を用いて行った。また、 $\beta$ -actin mRNA については、PE Biosystems 社製の DNA synthesizer により合成した  $\beta$ -actin の antisense oligomer<sup>21)</sup> を terminal deoxynucleotidyltransferase を用い [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP で標識した。次いで baking した nitrocellulose filter は 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0), 5  $\times$  SSC, 50 mg/ml salmon sperm DNA, 1  $\times$  Denhardt's solution, 30% formamide, 10% formamide, 10% dextran sulfate および [<sup>32</sup>P]labeled probe とともに 42  $^{\circ}$ C, 24 時間の hybridization を行った後、0.2  $\times$  SSC, 0.1% sodium lauryl sulfate により 50  $^{\circ}$ C で 2 時間洗浄した。得られた band の放射性強度は Fujix BAS 2000 System (Fuji Film, Tokyo, Japan) を用いて測定した。

#### 7) Western blot 法による AC 蛋白の定量

AC 蛋白の定量は既報の方法に準じて行った<sup>22)</sup>。すなわち、nadolol に曝露した神経細胞を氷冷した PBS で 3 回洗浄し、10% TCA を加えた後、8,000  $\times$ g, 10分, 4  $^{\circ}$ C で遠心操作を行った。得られた沈渣に 50 mM Tris-HCl (pH 6.8) 1 ml を加え、上述と同一の条件で再度遠心操作を加えた。得られた沈渣に 50 mM Tris-HCl 100  $\mu$ l と 2  $\times$  sample buffer (0.5 M Tris-HCl, 4

% (W/V) SDS, 12% (V/V)  $\beta$ -mercaptoethanol, 20% glycerol, 1% bromophenol blue 含有) 100  $\mu$ l を加えた後、超音波破碎し、100  $^{\circ}$ C, 3 分間の煮沸処理を行うことにより蛋白の可溶化を行った。その後、8,000  $\times$ g, 60分, 4  $^{\circ}$ C の遠心操作により、得られた上清を泳動用試料として測定まで -80  $^{\circ}$ C に保存した。

上述の方法により調整した試料を 25 mM Tris-HCl, 192 mM glycine, 0.1% SDS を含有する泳動液を用いて、5/20% gradient SDS polyacrylamide gel により 20 mA, 60分の条件下で分離した。泳動分離された蛋白の各バンドを既報の方法<sup>23)</sup>に従い、nitrocellulose filter に移行させた。目的とする蛋白質の同定はそれぞれの蛋白質的に特異的な一次抗体と Picobule immunoscreening kit を用いた免疫染色法により同定した。

#### 8) 蛋白質の定量

神経細胞に含まれる蛋白質は Lowry らの方法<sup>24)</sup>を用い、ウシ血清アルブミンを標準物質として測定した。

#### 9) 統計学的解析

得られた値はすべて mean  $\pm$  S.E.M. で示し、統計学的有意差の検定は、それぞれの図説明中に記載した方法により行った。

#### 10) 使用薬物

[<sup>3</sup>H]CGP12177 (比活性: 884.3 GBq/mmol) および [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP (比活性: 370 MBq/mmol) は New England Nuclear (Boston, MA, U.S.A.) より購入した。Nadolol は Sigma Chemicals (St. Louis, MO, U.S.A.) の製品を使用した。Terminal deoxynucleotidyl transferase は TOYOBO (Osaka, Japan) より入手した。また、FASTTrack<sup>TM</sup> mRNA isolation kit は Invitrogen (San Diego, CA, U.S.A.) より、random primed DNA labeling kit は Roche Diagnostics (Mannheim, Germany) より、first strand cDNA synthesing kit および cAMP EIA system は Amersham Pharmacia Biotech

(Buckinghamshire, England) より, picobule Immunoscreening kit は Strategene (CA, U.S.A.) より入手した. AC に対する抗体は Santa Cruz Biotechnology Inc. (CA, U.S.A.) 社製の製品を使用した. 実験に使用したその他の試薬は市販の特級試薬を用いた.

## 実験結果

### 1) Nadolol 長期曝露に伴う $[^3\text{H}]\text{CGP12177}$ 結合の変化

初代培養神経細胞に  $10^{-8}$  M nadolol を連続的に曝露し,  $\beta$ -AR に対する特異的放射性リガンドである  $[^3\text{H}]\text{CGP12177}$  を用いた結合実験により, その経時的变化を検討したところ, nadolol 曝露後 6 時間で  $[^3\text{H}]\text{CGP12177}$  結合の有意な増加がみられ, 12 時間から 24 時間でその結合量は最大値に達し, それ以降 96 時間に至るまで同程度の結合量を示した (Fig. 1A). また, 各種濃度の nadolol を 5 日間曝露した後,  $[^3\text{H}]\text{CGP12177}$  結合を検討したところ,  $10^{-10}$  M で有意な結合の増加が見られ, 濃度依存的に結合量は増大し,  $10^{-9}$  M で結合量は最大となった (Fig. 1B). これらの結果に基づき, 以後の実験における nadolol の曝露濃度および曝露時間を  $10^{-8}$  M および 5 日間とした. さらに, この nadolol 曝露に伴う  $[^3\text{H}]\text{CGP12177}$  結合の増加

が  $\beta$ -AR への結合増加によるか否かを確認するために, 結合実験を  $\beta$ -AR の非選択的拮抗薬である alprenolol 共存下で行ったところ, 対照群および nadolol 曝露群の神経細胞より採取した顆粒画分への  $[^3\text{H}]\text{CGP12177}$  結合は, いずれの場合も用量依存性に阻害され,  $\text{IC}_{50}$  値は対照群で  $1.2 \pm 0.1 \times 10^{-8}$  M (N = 4), nadolol 曝露群では  $1.4 \pm 0.2 \times 10^{-8}$  M (N = 4) であり, 両者間に有意差は認められなかった. これらの結果から, nadolol の長期曝露により  $\beta$ -AR の up-regulation が誘発されることが確認された.

中枢神経系には  $\beta$ -AR サブタイプのうち,  $\beta_1$ -および  $\beta_2$ -AR が主として存在していることから, nadolol 長期曝露後にみられる  $\beta$ -AR への  $[^3\text{H}]\text{CGP12177}$  結合の増大が, いずれの受容体への結合に起因しているのかについて検討を加えた.  $10^{-8}$  M の nadolol を 5 日間曝露させた神経細胞より調製した顆粒画分への  $[^3\text{H}]\text{CGP12177}$  結合を,  $\beta_2$ -AR 拮抗薬である ICI118551 および  $\beta_1$ -AR 拮抗薬である metoprolol の存在下で検討したところ, それぞれ対照群の神経細胞の場合に比して有意な結合量の増加が認められた (Fig. 2). したがって,  $\beta$ -AR 非選択的拮抗薬である nadolol は  $\beta_1$ -および  $\beta_2$ -AR の両者の up-regulation を誘発すると考えられる.

$\beta$ -AR への  $[^3\text{H}]\text{CGP12177}$  結合が受容体の親和性の変化によるものか, あるいは結合数の

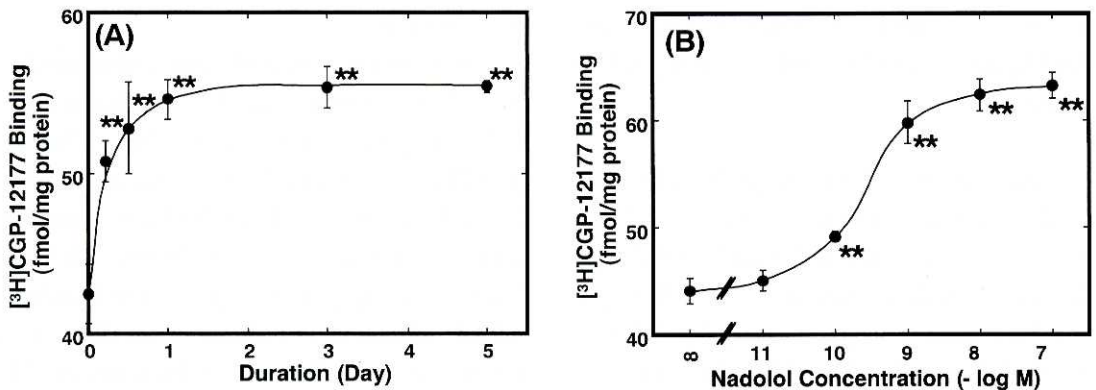


Fig. 1. Effect of nadolol exposure on  $[^3\text{H}]\text{CGP12177}$  binding to particulate fractions obtained from mouse cerebral cortical neurons. (A) Time course of changes in  $[^3\text{H}]\text{CGP12177}$  binding following exposure to  $10^{-8}$  M nadolol. \*\*  $p < 0.01$ , compared with the control (Dunnett's test, N = 4). (B) Effect of exposure to various concentrations of nadolol for five days on  $[^3\text{H}]\text{CGP12177}$  binding. \*\*  $p < 0.01$ , compared with the control (Dunnett's test, N = 4).

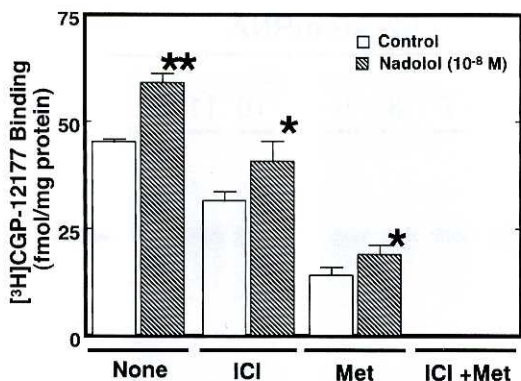


Fig. 2. Effect of exposure to  $10^{-8}$  M nadolol for five days on [ $^3$ H]CGP12177 binding to  $\beta_1$ - and  $\beta_2$ -AR in mouse cerebral cortical neurons. \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$ , compared with each control (Bonferroni's test,  $N = 4$ ).

変化によるものなのかを検討する目的で、各種濃度の [ $^3$ H]CGP12177 の存在下で [ $^3$ H]CGP12177 結合を検討したところ、 [ $^3$ H]CGP12177 結合には飽和性がみられ、さらに Scatchard 解析を行ったところ、nadolol 非曝露群および曝露群のいずれの場合も [ $^3$ H]CGP12177 の神経細胞膜における結合部位は、単一の高親和性部位からなることが判明した。また、両群の Kd 値と Bmax 値を比較したところ、Kd 値は両群間に有意差はなく、一方 nadolol 曝露群の Bmax 値は対照群のそれに比して有意に高値を示した (Fig. 3)。

2) Nadolol 長期曝露に伴う  $\beta$ -AR mRNA の発現変化

Nadolol への長期曝露により生じる [ $^3$ H]CGP12177 結合の増加は、結合部位数の増加に起因していることが Scatchard 解析から明らかになったことから、 $\beta$ -AR 蛋白の合成が亢進している可能性が考えられる。そこで、次に  $\beta_1$  および  $\beta_2$ -AR mRNA 発現の変化について検討した。Figure 4 に示すように、nadolol の 3 日間の曝露後においても有意に対照群に比して高いことが認められた。この実験成績から、上述の  $\beta$ -AR の up-regulation は受容体蛋白質の合成亢進により生じているものと考えられる。なお、上述と同一条件下における  $\beta$ -actin mRNA 発現

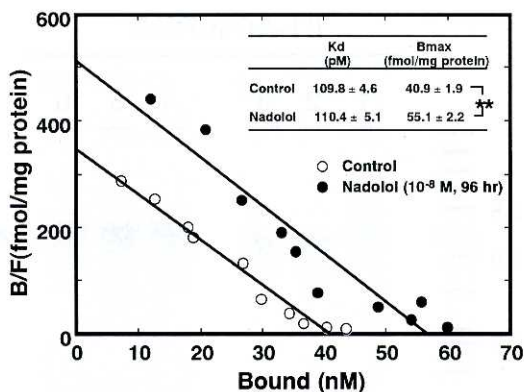


Fig. 3. Scatchard plot of specific binding of [ $^3$ H]CGP 12177 to particulate fractions obtained from mouse cerebral cortical neurons following exposure to  $10^{-8}$  M nadolol for five days. \*\* $p < 0.01$ , compared with each control (Bonferroni's test,  $N = 4$ ).

には変化を認めなかった。

3) Nadolol 長期曝露による cyclic AMP (cAMP) 生成能の変化

Nadolol 非曝露群と曝露群 ( $10^{-8}$  M nadolol : 5 日間) における isoproterenol 刺激による cAMP 生成量を検討したところ、両群において isoproterenol は用量依存性に cAMP 生成を亢進させた (Fig. 5)。しかも、nadolol 曝露群における isoproterenol 誘発性 cAMP 生成量は、有意に非曝露群のそれに比して高いことが観察された (Fig. 5)。また、 $10^{-8}$  M nadolol 後の isoproterenol 刺激性 cAMP 生成量の経時的变化の検討から、isoproterenol 刺激性 cAMP 生成量は曝露開始後 3 日目より有意な亢進がみられた (Fig. 6)

Isoproterenol 誘発性 cAMP 生成増加が、 $\beta$ -AR の up-regulation に起因する可能性の他に、 $\beta$ -AR に共役する効果器、すなわち AC の機能変化に起因する可能性も推測されることから、AC を直接活性化する作用を有する forskolin による cAMP 生成能についても併せて検討した。forskolin 誘発性 cAMP 生成量は、nadolol 曝露 1 日目でも有意に上昇し、3 日目でさらに上昇した (Fig. 7)。なお、本研究で用いた forskolin の添加濃度は、予備実験において cAMP 生成量が最大値を示した  $10^{-5}$  M とした。この実験

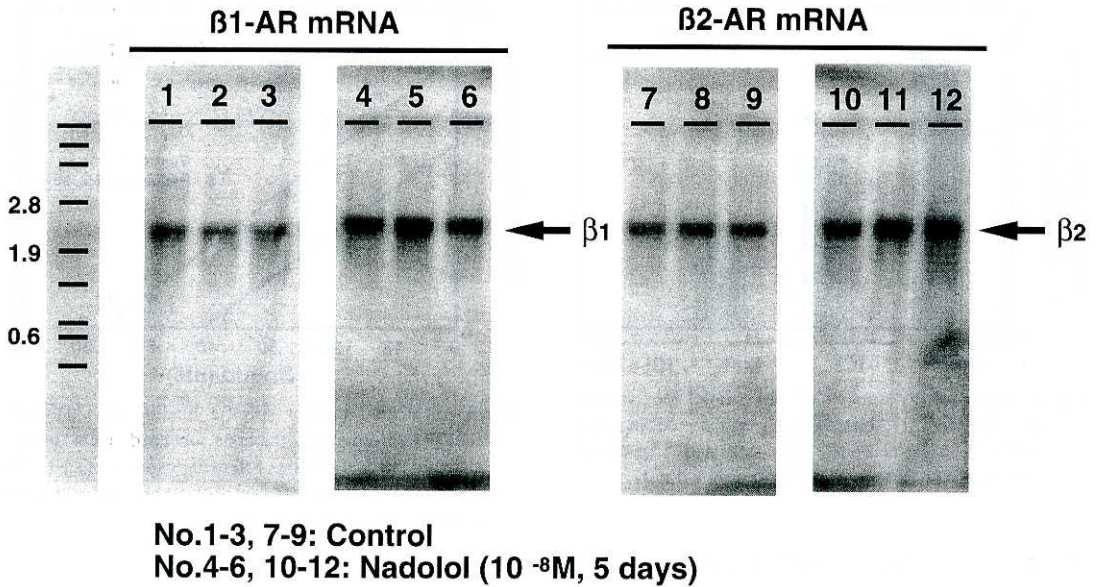


Fig. 4. Northern blot analysis for  $\beta_1$ - and  $\beta_2$ -AR mRNA expression in mouse cerebral cortical neurons following exposure to  $10^{-8}$  M nadolol for five days

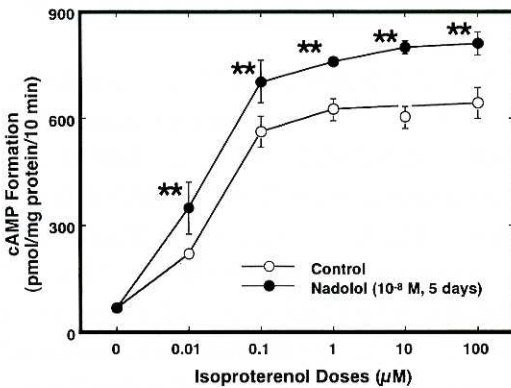


Fig. 5. Effect of exposure to  $10^{-8}$  M nadolol for five days on isoproterenol-stimulated cAMP formation. \*\* $p < 0.01$ , compared with each control value (Bonferroni's test,  $N = 4$ ).

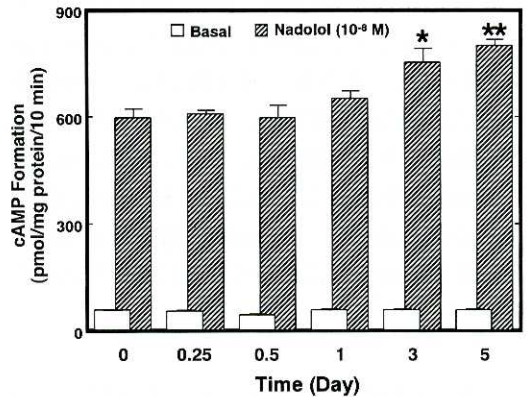


Fig. 6. Changes in isoproterenol-stimulated cAMP formation cerebral cortical neurons following exposure to  $10^{-8}$  M nadolol. \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$ , compared with the value before nadolol exposure (Bonferroni's test,  $N = 4$ ).

成績は、AC 活性が nadolol の長期曝露により亢進している可能性を示唆すると考えられる。

4) Nadolol 長期曝露に伴う AC 発現の変化

Nadolol の長期曝露中に AC 活性の亢進が生じていることから、まず AC mRNA 発現の経時的変化について検討を加えた。Figure 8 および 9 に示すように、本研究で使用した初代培養マウス大脳皮質神経細胞には AC I, II, VIII および IX mRNA の発現が認められた。さらに

nadolol の曝露開始後12時間の時点においてのみ、AC type I mRNA 発現の増加がみられ、その後は曝露前値と同程度に低下した。一方、他の AC サブタイプの mRNA 発現には nadolol 曝露の全期間を通じて変化がみられなかった (Fig. 8, 9)。

AC mRNA の nadolol 曝露期間中の発現の経時変化とともに、AC の各サブタイプ蛋白質の発現に関する経時的変化について、Western



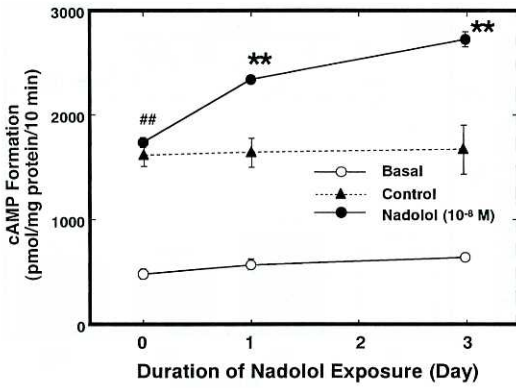


Fig. 7. Time course of forskolin-stimulated cAMP formation in particulate fractions from cerebral cortical neurons following exposure to  $10^{-8}$  M nadolol. ## $p < 0.01$ , compared with the basal value (Bonferroni's test,  $N = 4$ ). \*\* $p < 0.01$ , compared with the value obtained before nadolol exposure (Dunnett's test,  $N = 4$ ).

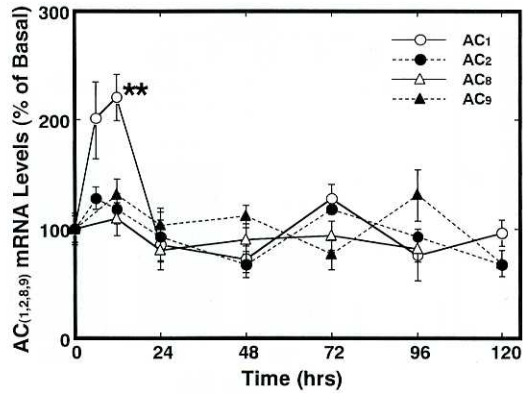


Fig. 9. Northern blots of AC mRNA expression following exposure to  $10^{-8}$  M nadolol

を示さなかった。

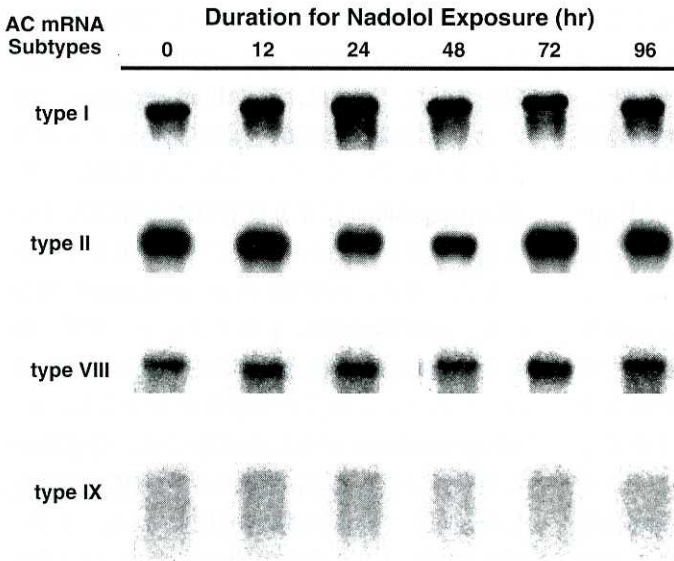


Fig. 8. Time course of changes in adenylate cyclase (AC) mRNA expression following exposure to  $10^{-8}$  M nadolol. \*\* $p < 0.01$ , compared with the value before nadolol exposure (Dunnett's test,  $N = 4$ ).

blot 法により検討した。AC type I は nadolol 曝露開始後 24 時間の時点で増加するのが観察され、曝露後 3 日目には明らかな発現増加が生じていた (Fig. 10A)。しかしながら、AC type II の発現は nadolol 曝露中に何ら変化を示さず (Fig. 10B)、また AC type VIII および IX の発現に関しても AC type II の場合と同様であった。なお、β-actin mRNA 発現は nadolol 曝露によっても変化

考 察

本研究では、β-AR およびこれと機能的に共役する cAMP 生成系を有する初代培養マウス大脳皮質神経細胞<sup>13)</sup>を用い、この神経細胞に対して非選択的 β-AR 拮抗薬である nadolol を曝露することにより、β-AR の up-regulation を誘発させ、β-AR up-regulation および AC 発現との機能的関連性について検討した。

β-AR は G 蛋白質共役型受容体の 1 つであり、従来よりそのサブタイプとして β<sub>1</sub>-および β<sub>2</sub>-AR が存在することは周知の通りである。最近これらのサブタイプ

の他に β<sub>3</sub>-と β<sub>4</sub>-AR が存在することがあきらかにされている<sup>25), 26)</sup>。β<sub>3</sub>-AR は主として褐色脂肪組織に分布しており、中枢神経系における分布量は β<sub>1</sub>-および β<sub>2</sub>-AR に比して極めて少ない。また、β<sub>4</sub>-AR の中枢神経系における分布の報告はなされていない。したがって、後述するように、本研究では β-AR のサブタイプとして β<sub>1</sub>-および β<sub>2</sub>-AR を取り扱った。

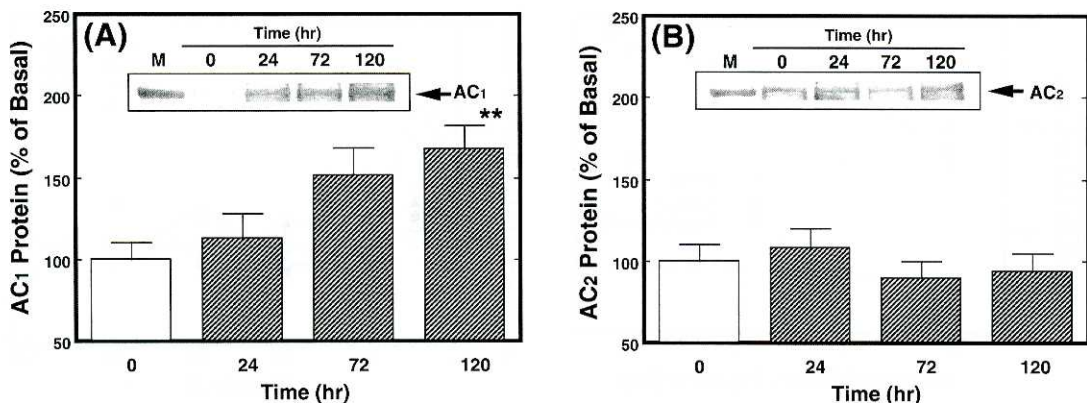


Fig. 10. (A) Protein-stained electrophoretic patterns and (B) immunoblot analysis of AC type I and type II following exposure to  $10^{-8}$  M nadolol

初代培養マウス大脳皮質神経細胞を非選択的  $\beta$ -AR 拮抗薬である nadolol に曝露することにより  $\beta$ -AR への [ $^3$ H]CGP12177 結合が増加することが明らかとなった。この結合増加は Scatchard 解析から結合部位数の増加であることが判明し、nadolol の曝露により  $\beta$ -AR 蛋白質自体が増加している可能性が高いと判断される。同様に、 $\beta$ -AR 拮抗薬投与により誘発される  $\beta$ -AR up-regulation は放射性リガンドの結合部位数の増加に起因することがすでに報告されている<sup>3), 27)</sup>。

[ $^3$ H]CGP12177 を用い、 $\beta_1$ -AR への結合を観察する場合には、選択的  $\beta_2$ -AR 拮抗薬である ICI-118551 の存在下で、 $\beta_2$ -AR への結合は選択的  $\beta_1$ -AR 拮抗薬である metoprolol 存在下で受容体結合実験を行い、本研究で示したように、 $\beta_1$ -および  $\beta_2$ -AR の両受容体への結合増加がみられた。 $\beta_1$ -および  $\beta_2$ -AR mRNA の発現についても、nadolol 曝露後には明らかに亢進していた。これらの結果は、非選択的  $\beta$ -AR 拮抗薬による両受容体の長期遮断により、 $\beta_1$ -および  $\beta_2$ -AR の両受容体 mRNA 発現の増加が生じ、次いで受容体蛋白の生合成が増加することに起因すると考えられる。このような神経伝達物質受容体 up-regulation の出現は、受容体の mRNA 発現の増加に付随して生じることが  $\alpha$ -アドレナリン受容体<sup>28)</sup>、ドパミン受容体<sup>29)~32)</sup>、GABA<sub>A</sub> 受容体<sup>33)</sup> などで報告されており、本研究で認められた  $\beta$ -AR up-regulation

とその mRNA 発現の増加との関連性は上述の報告と一致するものであると考えられる。

Nadolol を長期にわたり曝露した神経細胞では isoproterenol 刺激による cAMP 生成の増加が観察された。同様に、 $\beta$ -AR up-regulation に伴い  $\beta$ -AR 刺激性 cAMP 生成が亢進するとの報告がなされている<sup>6), 10)</sup>。これらの結果は、 $\beta$ -AR up-regulation により受容体数が増加しているためであることから十分に予想されるところである。また、mAChR の up-regulation の場合にも、mAChR 刺激によるイノシトールリン脂質代謝回転系の機能亢進が生じることが報告されている<sup>12)</sup>。これらの成績を勘案すると、 $\beta$ -AR up-regulation が生じた状態では、受容体から効果器に至る情報伝達系の共役機構の機能変化が付随している可能性が推測される。事実、 $\alpha_2$ A-アドレナリン受容体 up-regulation では  $G\alpha_i$  量の増加が生じていることが報告されている<sup>9)</sup>。さらに本研究で示したように、Nadolol 曝露後 6 時間ですでに  $\beta$ -AR 発現の増加が生じているにもかかわらず、isoproterenol 刺激性 cAMP 生成の増加が nadolol 曝露後 3 日目に出現しており、 $\beta$ -AR 発現の変化と isoproterenol 刺激性 cAMP 生成の変化の出現には時間的解離が認められている。この実験成績も  $\beta$ -AR up-regulation の発現とともに情報伝達系の共役機構の機能変化が関与している可能性を示唆していると同時に、 $\beta$ -AR up-regulation、および効

果器を含めた細胞内情報伝達機構の機能変化の発現には時間的差違があり、これらの発現に至る過程が異なっている可能性も推測される。したがって、 $\beta$ -AR up-regulation に付随する  $\beta$ -AR 刺激性 cAMP 生成の亢進の機序の検討には、これらの共役機構の検討も考慮するの必要があり、今後の研究課題として残されている。

一方、本研究とは異なり、 $\beta$ -AR up-regulation が生じているにもかかわらず、 $\beta$ -AR 刺激性 cAMP 生成の低下を報告した研究がある。すなわち、モルモットに  $\beta$ -AR 拮抗薬である propranolol を長期間投与した場合には、心臓において  $\beta$ -AR up-regulation が生じているにもかかわらず、 $\beta$ -AR 刺激性 cAMP 生成の低下を認める報告<sup>34)</sup>や、hypoxia により心筋細胞に  $\beta$ -AR up-regulation を誘発させた場合には isoproterenol 誘発性 cAMP 生成は変化しないとの報告である<sup>35)</sup>。本研究と異なる実験成績を報告しているこれらの研究では、前者においては  $\beta$ -AR up-regulation の発現に脂溶性の高い propranolol を用いているため、心筋細胞膜に propranolol が残存しており、これにより  $\beta$ -AR 作動薬による刺激が阻害されている可能性を否定できない。また後者の報告では、 $\beta$ -AR up-regulation の誘発方法が本研究などとは異なるために、 $\beta$ -AR up-regulation の誘発機序が異なっていることが本研究の実験成績との相違の原因となっている可能性が考えられる。さらに、これらの研究と本研究では実験に使用した動物種が異なっており、この相違も実験成績の相違の原因の1つとなっている可能性は否定できない。しかしながら、これらの相違の原因についての詳細は明らかではない。

Forskolin が直接 AC を活性化することはよく知られている。Nadolol の長期曝露を行った初代培養マウス大脳皮質神経細胞では、 $\beta$ -AR 刺激性 cAMP 生成のみならず、forskolin 刺激による cAMP 生成の増大が誘発されていることを本研究は明らかにした。この実験成績は AC 活性が nadolol 誘発性  $\beta$ -AR up-regulation に随伴して亢進することを示すものと考えられる。

そこで本研究ではさらにこの亢進に AC 蛋白の増加の関与について、AC 蛋白およびその mRNA 発現について検討した。得られた実験成績から、まず実験に供した初代培養マウス大脳皮質神経細胞には AC type I, II, VIII, および IX が発現していることが、Northern blot および Western blot 法により確認された。中枢神経系には AC type I・IX のすべての isozyme が存在しているが、大脳皮質にはこれらのうち type I, II, VIII, および IX が主に発現していると報告されており<sup>36)</sup>、本研究のデータはこれらと一致していると考えられる。さらに、nadolol 曝露後早期に AC type I mRNA 発現が有意に増加し、曝露開始後24時間目において AC 蛋白の発現増加が軽度で、また72時間後には著明にその発現の増加が生じていた。一方、他の isozyme の発現には有意な変化が認められていない。これらの研究結果から、 $\beta$ -AR の up-regulation でみられる AC 活性の亢進には AC type I の発現増加にも関与していることが明らかとなった。 $\beta_1$ -および  $\beta_2$ -AR の両受容体の up-regulation に付随して AC type I up-regulation が生じていることから、これら両受容体がいずれも AC type I と共役している可能性が考えられるが、その詳細については今後の研究課題といえる。 $\beta$ -AR 拮抗薬が  $\beta$ -AR のみならず、AC type I の up-regulation を誘発する機序についても現時点では明らかではない。

## 結 語

$\beta$ -アドレナリン受容体 ( $\beta$ -AR) およびこれに機能的に共役した cAMP 生成系を有する初代培養マウス大脳皮質神経細胞を用い、非選択的  $\beta$ -AR 拮抗薬である nadolol に長期曝露した場合に生じる  $\beta$ -AR および cAMP 生成系の発現変化の機能的関連性について検討、以下の結果を得た。

- 1) 神経細胞を nadolol に長期曝露したところ nadolol への曝露時間および曝露した nadolol の濃度に依存して、 $[^3\text{H}]\text{CGP12177}$  結合の

有意な増加が認められた。Scatchard 解析の結果、nadolol 曝露群では Bmax 値の有意な増加が認められ、Kd 値には変化がみられなかった。また、 $\beta_1$ -および  $\beta_2$ -AR への [ $^3$ H]CGP12177 結合と、それぞれの mRNA 発現が有意に nadolol 曝露により増加した。これらの結果から、nadolol の長期曝露により誘発される  $\beta$ -AR up-regulation は、 $\beta$ -AR mRNA 発現の亢進に引き続く  $\beta$ -AR 蛋白量の増加に起因する可能性が示唆された。

- 2) Nadolol 曝露後の神経細胞における isoproterenol 刺激性 cAMP 生成は nadolol の濃度に依存性を示し、かつ nadolol 曝露 3 日目より有意に増加することが判明した。また、forskolin 刺激 cAMP 生成も nadolol 曝露により亢進しているのが観察された。このことから isoproterenol 刺激誘発性 cAMP 生成の増加は、nadolol 曝露に伴う  $\beta$ -AR up-regulation に起因するのみならず、adenylate cyclase (AC) の機能変化も関与している可能性が示唆される。
- 3) Nadolol 曝露による神経細胞における AC 蛋白およびその mRNA の経時的発現変化について、それぞれ Western blot および Northern blot 法により検討した。神経細胞には AC type I, II, VIII, および IX のいずれもが発現していた。これらの isozyme

のうち AC type I mRNA は曝露後12時間で有意に増加し、その後対照群の場合と同様のレベルに低下した。AC type I 蛋白発現は曝露後24時間には増加傾向がみられ、72 時間後には著明に増加した。

- 4) 以上の結果から、nadolol の長期曝露により、初代培養マウス大脳皮質神経細胞では  $\beta$ -AR 蛋白の発現増加に起因する up-regulation が誘発されるとともに、AC type I のみの発現亢進による cAMP 生成能の増加が生じることが明らかとなった。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、終始御懇切なる御指導と御校閲を賜りました川崎医科大学薬理学教室 大熊誠太郎教授に深甚なる謝意を捧げます。また研究を遂行するに当たり、実験について直接御助言、御指導を頂いた川崎医科大学薬理学教室 桂 昌司先生に謝意を表するとともに、mRNA 測定に際しそのプローベの作製にご協力下さいました京都府立医科大学脳血管老化研究センターの辻村 敦先生に深謝致します。本研究の遂行にご協力頂いた薬理学教室員各位にも御礼申し上げます。また本研究の遂行に当たりご協力頂いた、RI センターおよび生化学センターの皆様にも厚く御礼申し上げます。なお、本研究の一部は川崎医科大学プロジェクト研究費 (10-114, 11-102, 12-118) の援助により行われた。

## 文 献

- 1) Emilin G, Maloteaux J-M : Current therapeutic uses and potential of  $\beta$ -adrenoceptor agonists and antagonists. *Eur J Clin Pharmacol* 53 : 389-404, 1998
- 2) Fleming W, Westfall DP : Adaptive supersensitivity. *In Handbook of Experimental Pharmacology* ed by Trendelenburg U, Weiner N, Vol. 90/Catecholamine, Heidelberg, Springer-Verlag. 1988, pp 509-559
- 3) Glaubiger G, Lefkowitz RJ : Elevated beta-adrenergic receptor number after chronic propranolol treatment. *Biochem Biophys Res Commun* 78 : 720-725, 1977
- 4) Aarons RD, Molinoff PB : Changes in the density of beta-adrenergic receptor in rat lymphocytes, heart and lung after chronic treatment with propranolol. *J Pharmacol Exp Ther* 221 : 439-443, 1982
- 5) Michel MC, Pingsmann A, Beckeringh JJ, Zerkowski HR, Doetsch N, Brodde OE : Selective regulation of  $\beta_1$ - and  $\beta_2$ -adrenoceptor antagonist treatment. *Br J Pharmacol* 94 : 685-692, 1988
- 6) Wolff BB, Harden TK, Sporn JR, Molinoff PB : Presynaptic modulation of beta-adrenergic receptor in rat cerebral

- cortex after treatment with antidepressants. *J Pharmacol Exp Ther* 207 : 446 - 457, 1978
- 7) Aarons RD, Nies AS, Gal J, Hegstrand LR, Molinoff PB : Elevation of  $\beta$ -adrenergic receptor density in human lymphocytes after propranolol administration. *J Clin Invest* 65 : 949 - 957, 1980
  - 8) Hedbergm A, Gerber JG, Nies AS, Wolf BB, Molinoff PB : Effect of pindolol and propranolol on beta-adrenergic receptors on human lymphocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 239 : 117 - 123, 1986
  - 9) Garcia-Sevilla JA, Escriba PV, Ozaita A, La Harpe R, Walzer C, Eytan A, Guimon J : Up-regulation of immunolabeled  $\alpha$ 2A-adrenoceptors, Gi coupling protein, and regulatory receptor kinases in prefrontal cortex of depressed suicides. *J Neurochem* 72 : 282 - 291, 1999
  - 10) Papp M, Nalepa I, Vetulani J : Reversal by imipramine of  $\beta$ -adrenoceptor up-regulation induced in a chronic mild stress model of depression. *Eur J Pharmacol* 261 : 141 - 147, 1994
  - 11) Dziejzicka-Wasylewska M, Rogoz R : The effect of prolonged treatment with imipramine on the biosynthesis and functional characteristics of D<sub>2</sub> dopamine receptors in the rat caudate putamen. *Brit J Pharmacol* 123 : 833 - 838, 1998
  - 12) Ohkuma S, Kishi M, Ma F-H, Kuriyama K : Alterations in receptor coupled second messenger system using primary cultured neurons. *Eur J Pharmacol* 189 : 277 - 285, 1990
  - 13) Ma F-H, Ohkuma S, Kishi M, Kuriyama K : Ontogeny of  $\beta$ -adrenergic receptor-mediated cyclic AMP generating system in primary cultured neurons. *Int J Dev Neurosci* 9 : 347 - 356, 1991
  - 14) Ohkuma S, Tomono S, Tanaka Y, Kuriyama K : Development of taurine biosynthesizing system in cerebral cortical neurons in primary culture. *Int J Dev Neurosci* 4 : 383 - 395, 1986
  - 15) Tsuchihashi H, Yokoyama H, Nagatomo T : Binding characteristics of <sup>3</sup>H -CGP12177 to  $\beta$ -adrenoceptors in rat myocardial membranes. *Jpn J Pharmacol* 49 : 11 - 19, 1989
  - 16) Katsura M, Ohkuma S, Tsujimura A, Kuriyama K : Increase of diazepam binding inhibitor mRNA levels in the brains of chronically treated-and-withdrawn mice. *J Pharmacol Exp Ther* 273 : 1529 - 1533, 1995
  - 17) Simomura H, Terada A : Primary structure of the rat beta-1 adrenergic receptor gene. *Nucleic Acids Res* 18 : 4591 - 4598, 1990
  - 18) Nakada MT, Haskell KM, Ecker DJ, Stadel JM, Crookes ST : Genetic regulation of beta-2-adrenergic receptors in 3T 3-L1 fibroblasts. *Biochem J* 260 : 53 - 59, 1989
  - 19) Abdel-Majid RM, Leong WL, Schalkwyk LC, Smallman DS, Wong ST, Strom DR, Fine A, Dobson MJ, Guernsey DL, Neumann PE : Loss of adenylyl cyclase I activity disrupts patterning of mouse somatosensory cortex. *Nature Genetics* 19 : 289 - 291, 1998
  - 20) Premont RT, Matsuoka I, Mattei M-G, Pouille Y, Defert N, Hanoune J : Identification and characterization of a widely expressed form of adenylyl cyclase. *J Biol Chem* 271 : 13900 - 13907, 1996
  - 21) Ponte P, Ng SY, Engel J, Gunning F, Kedes L : Evolutionary conservation in the untranslated regions on actin mRNAs : DNA sequence of a human beta-actin cDNA. *Nucl Acids Res* 12 : 1687 - 1691, 1984
  - 22) Katsura M, Ohkuma S, Tsujimura A, Xu J, Hibino Y, Ishikawa E, Kuriyama K : Functional involvement of benzodiazepine receptors in ethanol-induced increases of diazepam binding inhibitor (DBI) and its mRNA in the mouse brain. *Mol Brain Res* 54 : 124 - 132, 1998
  - 23) Laemmli UK : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 : 680 - 685, 1970
  - 24) Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ : Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193 : 265 - 275, 1951
  - 25) Strosberg AD : Structure and function of the  $\beta$  3-adrenergic receptor. *Ann Rev Pharmacol ; Toxicol* 37 : 421 - 450, 1997
  - 26) Kaumann AJ : Four  $\beta$ -adrenoceptor subtypes in the mammalian heart. *Trends Pharmacol Sci* 18 : 70 - 76, 1997
  - 27) Brodde OE, Daul A, Stuka S, O'Hara N, Burchard U : Effect of  $\beta$ -adrenoceptor antagonist administration on  $\beta$ 2-

- adrenoceptor density in human lymphocytes. The role of the "intrinsic sympathomimetic activity". Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 328 : 417 - 422, 1985
- 28) Beaulieu M, Brakier-Gingras L, Bouvier M : Upregulation of  $\alpha 1A$ -and  $\alpha 1B$ -adrenergic receptor mRNAs in the heart of cardiomyopathic hamsters. J Mol Cell Cardiol 29 : 111 - 119, 1997
- 29) Buckland P, O' Donovan MC, McGuffin P : Clonazepine and sulpiride up-regulate dopamine  $D_3$  receptor mRNA levels. Neuropharmacology 32 : 901 - 907, 1993
- 30) Filtz TM, Guan W, Artymyshyn RP, Pacheco M, Ford C, Molinoff PB : Mechanisms of up-regulation of  $D_{2L}$  dopamine receptors by agonists and antagonists in transfected HEK-293 cells. J Pharmacol Exp Ther 271 : 1574 - 1582, 1994
- 31) Wang W, Hahn K-H, Bishop JF, Gao D-Q, Jose PA, Mouradian M : Up-regulation of  $D_3$  dopamine receptor mRNA by neuroleptics. Synapse 23 : 232 - 235, 1996
- 32) D'Souza U, McGuffin P, Buckland PR : Antipsychotic regulation of dopamine  $D_1$ ,  $D_2$  and  $D_3$  receptor mRNA. Neuropharmacology 36 : 1689 - 1696, 1997
- 33) Neumann-Hafelin T, Bosse F, Redecker C, Muller H-W, Witte OW : Upregulation of  $GABA_A$ -receptor  $\alpha 1$ -and  $\alpha 2$ -subunit mRNA following ischemic cortical lesions in rats. Brain Res 816 : 234 - 237, 1999
- 34) Elfellah MS, Reid JL : Regulation of  $\beta_1$ -and  $\beta_2$ -adrenoceptors following chronic treatment with  $\beta$ -adrenoceptor antagonists. Eur J Pharmacol 173 : 85 - 92, 1989
- 35) Li H-T, Honbo NY, Karliner JS : Chronic hypoxia increases  $\beta_1$ -adrenergic receptor mRNA and density but not signaling in neonatal rat cardiac myocytes. Circulation 94 : 3303 - 3310, 1996
- 36) Mons N, Decorte L, Jaffard R, Cooper DMF :  $Ca^{2+}$ -sensitive adenylyl cyclases, key integrators of cellular signaling. Life Sci 62 : 1647 - 1652, 1998