

## ポリアミンの生理機能解析とその濃度調節機序

五十嵐 一衛

## Physiological Functions of Polyamines and Regulation of Polyamine Content in Cells

Kazuei IGARASHI

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Chiba University, 1-8-1 Inohana, Chuo-ku, Chiba 260-8675, Japan

(Received April 17, 2006)

Polyamines (putrescine, spermidine, and spermine) are essential for normal cell growth. The polyamine level in cells is regulated by biosynthesis, degradation, and transport. The role of antizyme on polyamine biosynthesis and transport in mammalian cells and characteristics of polyamine transport in *Escherichia coli* and yeast are described briefly in this review. In addition, the effects of polyamines on protein synthesis and the NMDA receptor are outlined. Finally, the correlation between acrolein produced from polyamines by polyamine oxidase and chronic renal failure and brain stroke is summarized. Increased levels of polyamine oxidase and acrolein are good markers of chronic renal failure and brain stroke.

**Key words**—polyamine; transport protein; cell proliferation; protein synthesis; NMDA receptor; acrolein

## 1. はじめに

ポリアミン〔プトレスシン (PUT),  $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$ ; スペルミジン (SPD),  $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$ ; スペルミン (SPM),  $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$ ] はウイルスからヒトに至るまで生物界に広く存在する生理活性アミンであり、主として核酸、特に RNA と相互作用することにより蛋白質・核酸合成を促進し、細胞増殖因子として機能する。<sup>1-6)</sup> また、グルタミン酸受容体の 1 種である NMDA (*N*-methyl-D-aspartate) 受容体やヘパリン等のグリコサミノグリカンとの相互作用を通し、生体機能のモジュレーションにも関与している。<sup>7-10)</sup> 3 種のポリアミンは類似の機能を有するが、同じ効果を発揮するための有効濃度が異なるため、<sup>11)</sup> PUT  $\rightleftharpoons$  SPD  $\rightleftharpoons$  SPM と相互変換することにより、ポリアミンとしての至適濃度が厳密に保たれている。筆者らはこの細胞内のポリアミンの至適濃度がいかに保たれているかを明らかにする目的でポリアミンの生合成及び輸送機序を研究し、以下のような知見を

得た。また、ポリアミンが生体 (又は細胞) 内でどのような役割を果たしているかを分子レベルで解析した。実験は大腸菌から動物細胞まで、最も解析しやすい系を用いて行った。

## 2. ポリアミンの細胞内濃度調節

**2-1. ポリアミンの生合成と分解** Figure 1 に動物細胞におけるポリアミンの生合成と分解の模式図を示す。生合成の律速酵素はオルニチンからプトレスシンを合成するオルニチン脱炭酸酵素 (ODC) と、スペルミジン、スペルミンを合成するのに必要な脱炭酸化 *S*-アデノシルメチオニンを作る *S*-アデノシルメチオニン脱炭酸酵素 (SAMDC) である。この 2 種の酵素の細胞内ポリアミン量調節に果たす役割を検討するために、ODC 及び SAMDC 過剰産生株作製をマウス乳がん FM3A 細胞を用いて試みた。その結果、ODC が全蛋白質の約 3% を占める ODC 過剰産生株を得ることができたが、SAMDC は約 5 倍の活性上昇を認める株しか得ることができなかった。<sup>12,13)</sup> このことは、PUT 量はかなり大きく変動しても細胞増殖にはあまり強い影響を与えないが、SPD, SPM 量が大幅に上昇すると細胞増殖速度が低下することに起因していると考えられた。<sup>14)</sup>

ODC 過剰産生株を用いて、以下のことが明らかとなった。ODC の負の調節因子であるアンチザイ

千葉大学大学院薬学研究院 (〒260-8675 千葉市中央区亥鼻 1-8-1)

e-mail: iga16077@p.chiba-u.ac.jp

本総説は、平成 18 年度日本薬学会賞の受賞を記念して記述したものである。

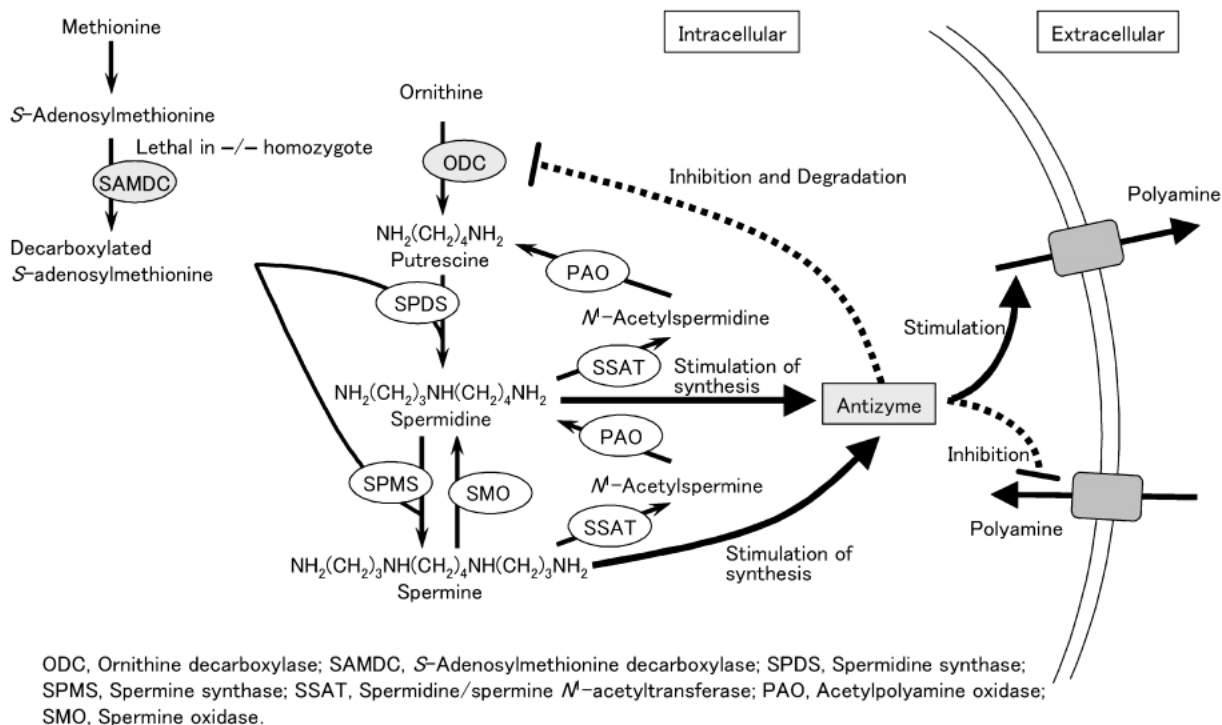


Fig. 1. Synthesis and Degradation of Polyamines and Regulation by Antizyme

ム (AZ) は,<sup>15)</sup> 通常の条件では Western blotting でその存在を確認するのが難しい程その量が少ない。しかし、ODC 過剰産生株は AZ 量が多く発現していたことから、この株を用いて、AZ がユビキチンの代わりに ODC と結合して標識となり、ODC がユビキチン非依存的に 26S プロテアソームにより分解されること、<sup>16)</sup> 及び AZ がポリアミン輸送系を負に調節し、<sup>17,18)</sup> 細胞内ポリアミン量を調節するのに重要な役割を担っていることが明らかとなった (Fig. 1)。また、SAMDC 過剰産生株は SAMDC 遺伝子が増幅していたので、その塩基配列を決定し、SAMDC 遺伝子ノックアウトマウスを作製することに成功した。SAMDC +/-ヘテロ接合体マウスは生存可能であったが、SAMDC -/-ホモ接合体マウスは、3.5 日胚までは卵由来の SPD で生存が可能であったが、3.5 日胚以降の生存は不可能であった。<sup>19)</sup> 3.5 日胚は SPD 添加により増殖が可能となったことから、細胞死は SPD と SPM の欠乏に依存しており、ポリアミンが細胞増殖必須因子であるという考えが確立された (Table 1)。

ポリアミンの至適濃度維持は AZ による調節だけでなく、SPM→SPD→PUT への変換も関わっている。動物細胞の場合はスペルミンオキシダーゼによ

る SPM→SPD の変換経路が存在するが、この場合、有害物質であるアクロレイン ( $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CHO}$ ) が産生されるので (後述)、一度スペルミジン/スペルミン N<sup>1</sup>-アセチルトランスフェラーゼによりアセチル化されたあとに、アセチルポリアミンオキシダーゼが働き、SPM→SPD、SPD→PUT の変換が行われるのが主たる変換経路である。<sup>20,21)</sup>

大腸菌では PUT と SPD のみが合成され、AZ は存在しない。ポリアミンが細胞内で過剰になった場合、動物細胞と同じようにアセチル化されることにより不活化され、細胞外に排出されるようである。<sup>22)</sup> また、ポリアミンが欠乏しないように、大腸菌ではもう 1 つの PUT 合成経路が存在する。<sup>23)</sup> すなわち、アルギニンが脱炭酸化を受けてアグマチンができ、ついで PUT が合成される経路である。

**2-2. ポリアミン輸送** ポリアミンもアミノ酸等と同様に必要な場合に外部から取り込む系が存在する。ポリアミン輸送がポリアミン細胞内濃度維持に重要であることは、動物実験でポリアミン生合成阻害剤の抗がん効果がポリアミン欠乏食を与えると上昇することより明らかとなっている。<sup>24)</sup> しかしながら、ポリアミン輸送蛋白質遺伝子は動物細胞ではいまだ同定されていないので、大腸菌及び酵母のポ

リアミン輸送系について紹介する。

大腸菌では、ポリアミンの生合成、分解、輸送に関わる遺伝子は全体の遺伝子の実に0.6%も占めている。<sup>25)</sup> そのうち、約半分がポリアミン輸送に関わ

る遺伝子である。大腸菌では PUT が合成できない場合、代替ポリアミンとしてカダベリン (CAD, NH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>NH<sub>2</sub>) とアミノプロピルカダベリン (NH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NH(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>NH<sub>2</sub>) が合成され、PUT, SPD と同じように細胞増殖促進作用を示す。<sup>26)</sup> 筆者らの研究室では、PUT 特異的取り込み系,<sup>27)</sup> SPD 優先取り込み系,<sup>28)</sup> PUT 及び CAD の取り込み及び排出を触媒する蛋白質 PotE<sup>29)</sup> 及び CadB<sup>30)</sup> の遺伝子クローニング並びにその機能解明に成功した (Fig. 2)。

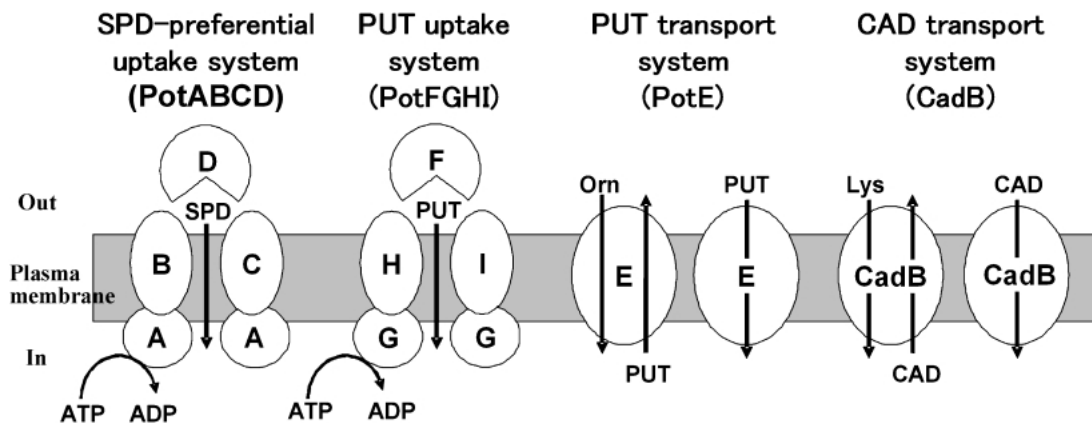
PUT 特異的取り込み系及び SPD 優先取り込み系は、それぞれ PotFGHI 及び PotABCD の4種の蛋白質よりなる ABC トランスポーターであった。すなわち、輸送系は基質結合蛋白質 (PotF, PotD), 2

Table 1. Genotyping of *Amd1*<sup>+/-</sup> Intercross Progeny

Developmental stage	Number	Number /litter	Genotype		
			+/+	+/-	-/-
Neonate	120	5.45	32	88	0
E16.5 dpc*	24	6.00	9	15	0
E8.5 dpc	19	4.75	6	13	0
E6.5 dpc	10	3.33	3	7	0
E3.5 dpc	65	7.56	17	33	15

\* dpc: days post-coitus.

### A. *Escherichia coli*



### B. Yeast

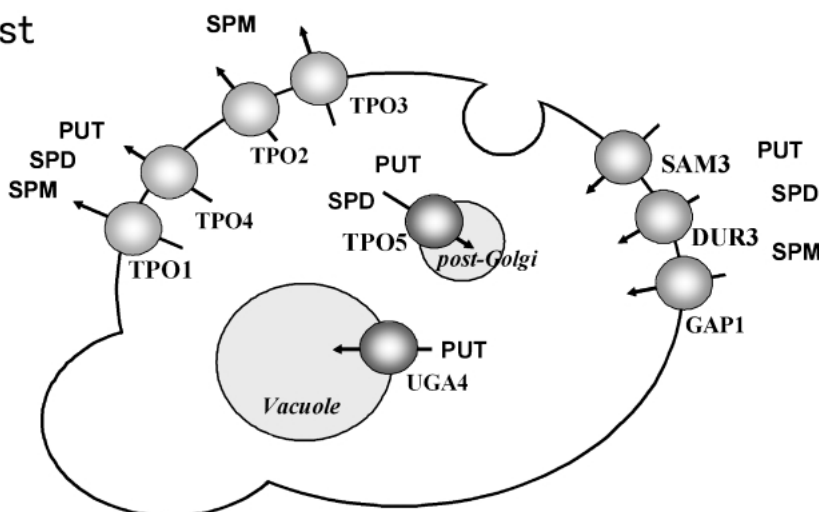


Fig. 2. Polyamine Transport in *Escherichia coli* (A) and Yeast (B)

種のチャンネル形成蛋白質 (PotHI, PotBC) 及び ATPase (PotG, PotA) より形成されていた。基質結合蛋白質である PotF と PotD は、その X 線結晶構造解析及び一アミノ酸変異体の活性測定より、全体構造並びに PUT 及び SPD の結合部位の同定に成功した (Fig. 3).<sup>31-34)</sup> PotF や PotD によるポリアミンの認識には酸性アミノ酸残基の他、Trp や Tyr の芳香族アミノ酸残基が関与していた。これはポリアミンがいかにかに蛋白質と相互作用するかを明らかにした最初の報告であった。PotABCD スペルミジン優先取り込み系のエネルギー供給に関与する ATPase の PotA は、378 アミノ酸残基よりなるが、N 末端側 (1-250 アミノ酸残基) が ATP 結合部位を含む触媒部位であり、C 末端側 (251-378 アミノ酸残基) が ATPase 活性調節部位であり、SPD がこの部位に結合して ATPase 活性を阻害した。<sup>35)</sup> PotA は、PotABC 複合体を形成すると ATPase が SPD により強い活性阻害を受けることから、

PotABCD 系による SPD の取り込みは PotA により調節されていることが示唆された。

PotE と CadB は中性条件下でプロトン駆動力による PUT と CAD の取り込み活性を有しており、PUT 及び SPD 優先取り込み系の補助的役割を果たしている。<sup>30,36)</sup> しかし酸性条件下では、両蛋白質は誘導性 ODC 及びリジン脱炭酸酵素 (LDC) と共に細胞増殖に非常に重要な役割を果たしている。すなわち、両蛋白質は酸性条件下 PUT (CAD)-オルニチン (リジン) アンチポーター活性を有しており、培地からオルニチン (リジン) を取り込み、誘導性 ODC 又は LDC により PUT (CAD) が合成され、PUT (CAD) が培地中に放出される (Fig. 4)。この過程で種々の栄養源を取り込むために必要なプロトン駆動力とヌクレオチド合成に必要な CO<sub>2</sub> が形成され、かつ培地が中性化され、細胞増殖が促進される。外部環境中にはリジンの方がオルニチンより多いため、酸性条件下では CadB の方が PotE より生

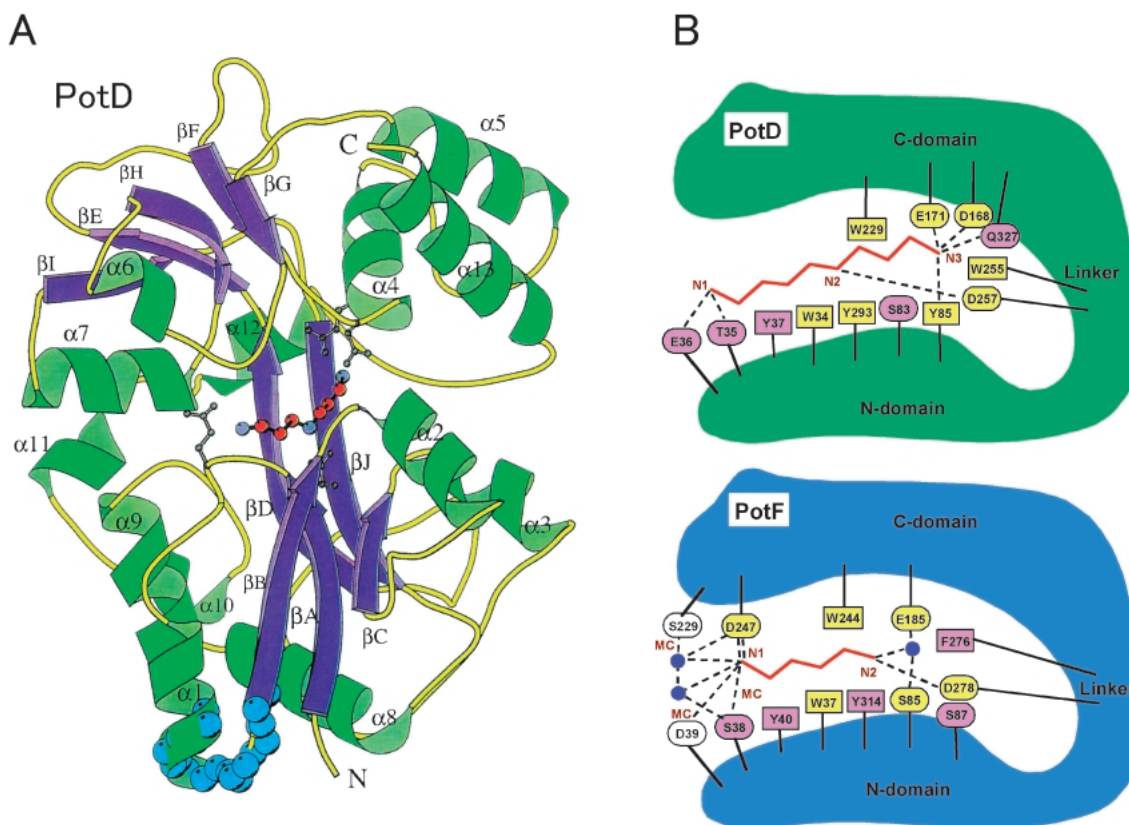


Fig. 3. Structure of PotD (A) and Polyamine Binding Sites on PotD and PotF (B)

A: Ribbon model of PotD is shown. Spermidine is bound to the central cleft between the N and C domains. B: Amino acid residues involved in the recognition of spermidine on PotD and of putrescine on PotF are shown. The most crucial residues are colored yellow, and the other residues, which affect substrate binding, are colored pink. The polar and hydrophobic residues are drawn as ellipses and rectangles, respectively. Water molecules involved in the recognition of putrescine on PotF are shown in blue circles.

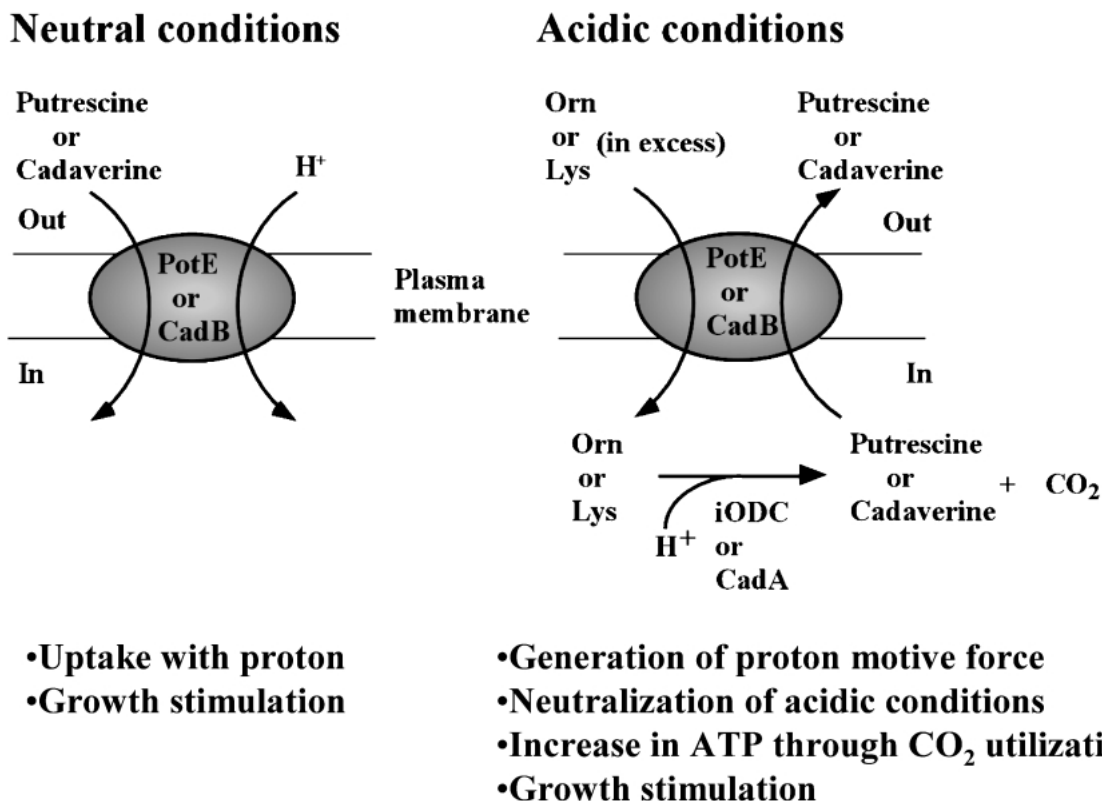


Fig. 4. Physiological Functions of PotE and CadB in *Escherichia coli*

理的に重要な機能を果たしている。同様の機能を有するヒスタミン-ヒスチジンアンチポーターとヒスチジン脱炭酸酵素の存在が乳酸菌で報告されている。<sup>37)</sup>

酵母においても、これまでに9種のポリアミン輸送蛋白質を同定している (Fig. 2)。TPO1-TPO4は異物を排出する蛋白質であり、ポリアミンもその基質として認識される。TPO5はポスト-ゴルジ小胞に局在するポリアミン特異的の排出蛋白質であり (Fig. 5)、この遺伝子が欠損すると酵母内にポリアミンが蓄積し、細胞増殖を促進するという非常に面白い性質を持つ蛋白質であった。<sup>38)</sup> 一方、ポリアミン取り込み蛋白質として、液胞に存在するUGA4がγ-アミノ酪酸 (GABA) と共にPUTを液胞に取り込むこと、<sup>39)</sup> 及び細胞膜に存在するGAP1がアミノ酸と共にポリアミンを細胞内に取り込む蛋白質であることを見出した。<sup>40)</sup> さらに、DUR3とSAM3がポリアミンを細胞内に優先的に取り込む蛋白質であることを明らかにした (投稿準備中)。最近、他のグループよりAGP2がポリアミン輸送蛋白質であると報告されたが、<sup>41)</sup> 筆者らの実験条件下では活性

は非常に低く、ポリアミン輸送蛋白質として機能していないと思われる。現在、9種のポリアミン輸送蛋白質が酵母のポリアミンの至適濃度維持にどのように寄与しているかを検討中である。

### 3. ポリアミンの生理機能

**3-1. ポリアミンによる蛋白質合成促進** ポリアミンの生理機能に関しては、依然として誤解が多い。すなわち、DNAとの相互作用を通してポリアミンは細胞増殖促進作用を持つと考えている人が多い。<sup>42)</sup> 筆者らはポリアミンの生理機能を研究するために、まずポリアミンと核酸等酸性物質との結合定数を求め、細胞内ポリアミン量とポリアミンと相互作用する酸性物質量を測定することにより、ポリアミンの細胞内分布を評価した。<sup>43,44)</sup> その結果、ポリアミンは動物細胞においても、大腸菌においても、主としてRNAと結合して存在することが明らかとなった (Table 2)。また、二本鎖RNAであるpoly (A) + poly (U) と牛胸腺DNAへのSPDとSPMの結合の強さを50 mM Tris-HCl, pH 7.5存在下で比較したところ、poly (A) + poly (U) の方にSPD及びSPMはそれぞれ25倍及び3倍強く結合し

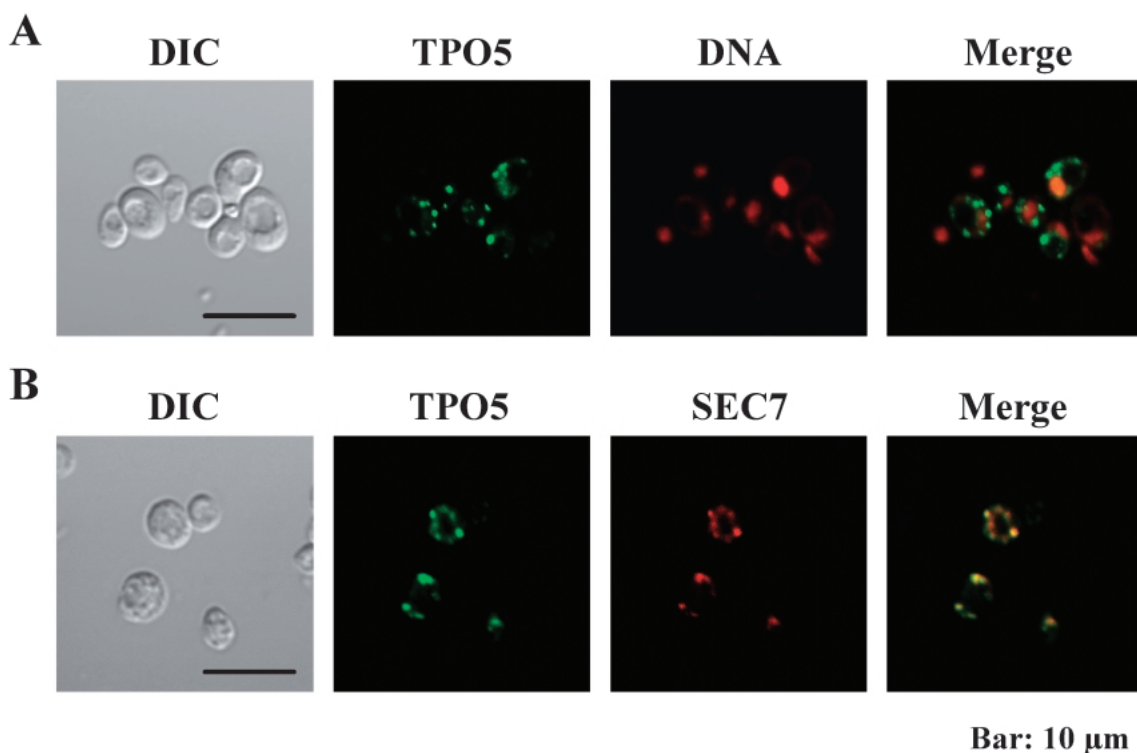


Fig. 5 Subcellular Localization of TPO5 Determined by Immunofluorescence Microscopy  
DIC: differential interference contrast, TPO5: HA-tagged TPO5, SEC7: a marker of Golgi complex.

Table 2. Polyamine Distribution in *Escherichia coli* and Rat Liver

Polyamine distribution	<i>Escherichia coli</i> (pH 7.5, 10 mM Mg <sup>2+</sup> , 150 mM K <sup>+</sup> )				Rat liver (pH 7.5, 2 mM Mg <sup>2+</sup> , 150 mM K <sup>+</sup> )			
	Putrescine		Spermidine		Spermidine		Spermine	
	(mM)	(%)	(mM)	(%)	(mM)	(%)	(mM)	(%)
(Total)	32.2	( 100)	6.88	( 100)	1.15	( 100)	0.88	( 100)
Free	12.5	(38.8)	0.26	( 3.8)	0.08	( 7.0)	0.02	( 2.3)
DNA	3.0	( 9.3)	0.35	( 5.1)	0.05	( 4.3)	0.05	( 5.7)
RNA	15.4	(47.9)	6.17	(89.7)	0.90	(78.3)	0.75	(85.2)
Phospholipid	0.46	( 1.4)	0.05	( 0.7)	0.07	( 6.1)	0.04	( 4.5)
ATP	0.84	( 2.6)	0.05	( 0.7)	0.05	( 4.3)	0.02	( 2.3)

た.<sup>45)</sup> この結果も、細胞内には RNAの方が DNAに比べて多いことを考え合わせると、ポリアミンが RNA レベルで作用することを強く支持した。

ポリアミンの蛋白質合成に対する効果について、最初に大腸菌の無細胞系 poly (U) 依存ポリフェニルアラニン合成で検討したところ、ポリアミンは Mg<sup>2+</sup> の至適濃度を下げるだけでなく、ポリフェニルアラニン合成能を促進した。<sup>46)</sup> ポリアミンによる蛋白質合成促進は、無細胞系でのグロビン合成及びファージ RNA 依存の蛋白質合成でも確認され

た。<sup>47)</sup> この結果は、Mg<sup>2+</sup> による RNA の構造変化とポリアミンによる構造変化が異なるために、いくつかの蛋白質合成がポリアミンにより促進を受けることを示唆した。

この結果を受け、*in vivo* におけるポリアミンの蛋白質合成に対する効果を、PUT を合成できない大腸菌を PUT の存在下あるいは非存在下で培養し検討した。Figure 6 に示すように、培地に PUT を添加するとポリアミン輸送系により細胞内に取り込まれて SPD に変換され、細胞増殖が 3—5 倍促進

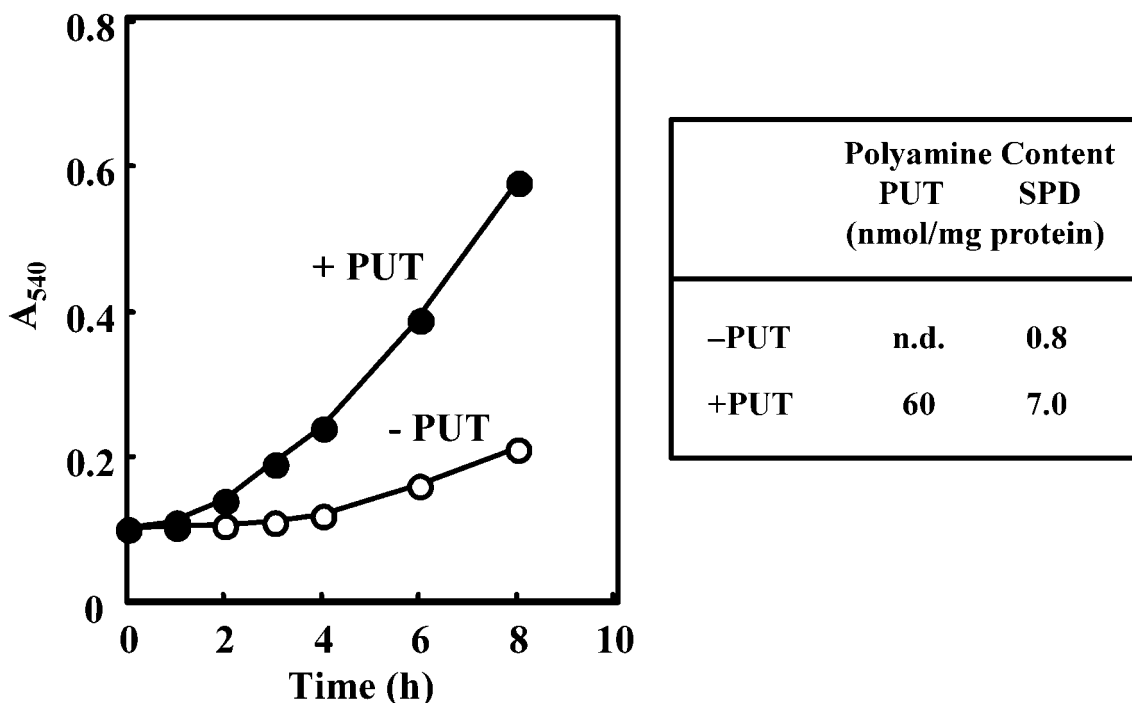


Fig. 6. Cell Growth of a Polyamine-requiring Mutant MA261 in the Presence or Absence of 100  $\mu\text{g/ml}$  Putrescine and Polyamine Content in Cells

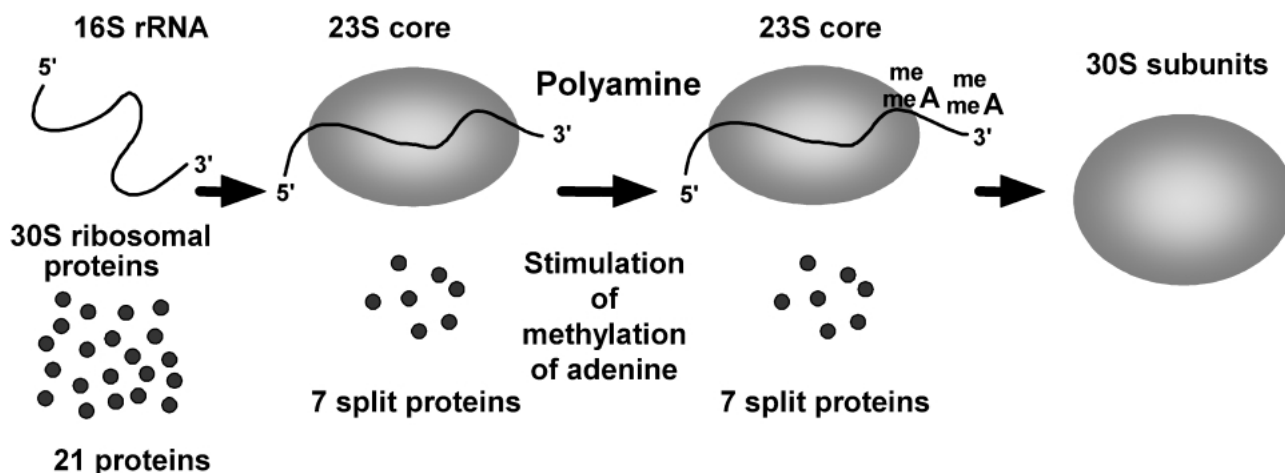


Fig. 7. Stimulation of the Assembly of 30S Ribosomal Subunits by Polyamines

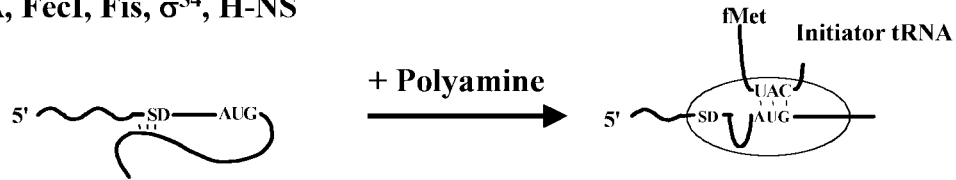
される。この条件下、リボソームの蛋白質合成能を比較したところ、PUTを含む培地で培養した細胞のリボソームは蛋白質合成能が高く、その原因は16S rRNAの3'-末端に存在するアデニンのメチル化がポリアミンにより促進を受け、30Sリボソーム亜粒子の会合がポリアミンにより約2倍促進されるためであった (Fig. 7).<sup>48,49)</sup>

ポリアミンによる細胞増殖促進効果は3—5倍と

大きかった。ついで、細胞増殖促進に働く特定蛋白質の合成がポリアミンによって促進されると考え、*in vivo*でポリアミンにより翻訳レベルで合成促進を受ける特定蛋白質の同定を試みた。Figure 8に示すように、栄養源として大切なオリゴペプチドを取り込むOppA蛋白質、アデニル酸シクラーゼ (Cya)、蛋白質合成終結因子RF2、及び転写に関わる因子 (鉄輸送遺伝子オペロンの転写因子 FecI、

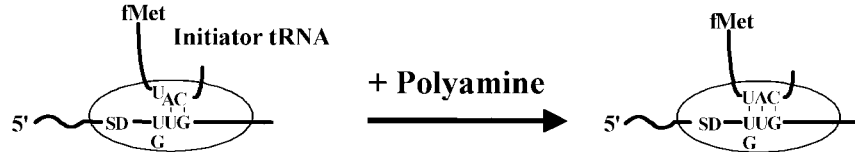
### 1. Long distance between SD sequence and inhibition codon AUG

OppA, Fecl, Fis,  $\sigma^{54}$ , H-NS



### 2. Initiation on unusual codon

Adenylate cyclase, Cra



### 3. Suppression and +1 frameshift on nonsense codon

RpoS ( $\sigma^{38}$ ), RF2

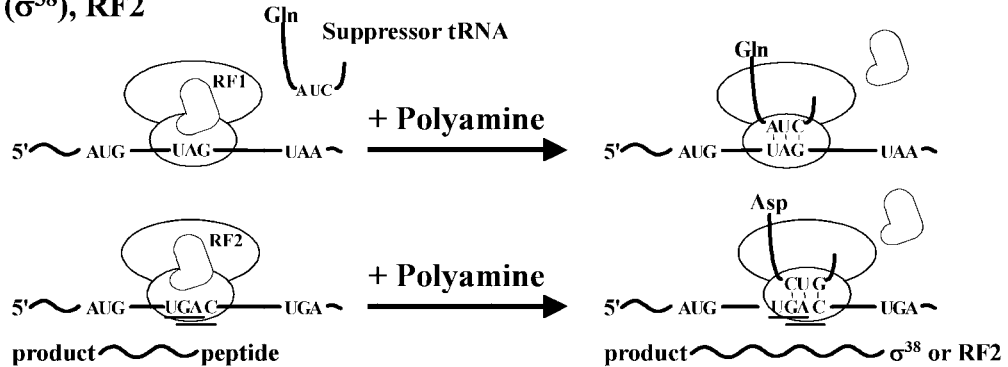


Fig. 8. Mechanism of Polyamine Stimulation of Protein Synthesis

rRNA 及びある種の tRNA の転写因子 Fis, 窒素代謝関連遺伝子の転写因子  $\sigma^{54}$ , グローバルな転写因子 H-NS, 糖代謝に関わる転写因子 Cra 及び静止期の生存率に関わる転写因子  $\sigma^{38}$  の合成が翻訳レベルでポリアミンにより促進を受けた.<sup>50-55</sup> 促進機序は 3 つに分類することができた. OppA, Fecl, Fis,  $\sigma^{54}$ , H-NS のポリアミンによる合成促進は, これらの mRNA 上の蛋白質合成開始に必要な Shine-Dalgarno (SD) 配列<sup>56</sup>が開始コドン AUG より 10 ヌクレオチド以上離れており (通常の mRNA では 6 又は 7 ヌクレオチド離れている), ポリアミンにより mRNA の構造が変化して SD 配列と開始コドン AUG の相対距離が近づくためであった. Cya と Cra の場合は, これらの mRNA の開始コドンが通常の AUG ではなく, 効率の良くない UUG 又は GUG であった. この UUG 又は GUG 依存 fMet-

tRNA のリボソームへの結合がポリアミンにより促進された.  $\sigma^{38}$ , RF2 の場合は, open reading frame (ORF) 中に終止コドンが存在し,  $\sigma^{38}$  の場合は終止コドンの Gln-tRNA<sup>Sup</sup> による認識 (suppression), RF2 の場合は終止コドンの +1 frameshift がポリアミンにより促進された. いずれの場合も, ポリアミンによる RNA の構造変化に基づくものであった.

ポリアミンが mRNA の構造をどのように変えるかを, RNase 感受性変化により検討した. すなわち, 一本鎖 RNA を認識する RNaseT<sub>1</sub> と二本鎖又は stacked RNA を認識する RNaseV<sub>1</sub> に対する OppA mRNA の感受性がポリアミンによりどのように変化するかを測定した (Fig. 9). ポリアミンは二本鎖 RNA により強く結合する.<sup>43,45</sup> OppA mRNA の場合, SD 配列と開始コドン AUG 領域の近くに bulge-out A を含む二本鎖 RNA 領域が存在



## OppA-130

( $\Delta G$  : -46.6 kcal/mol)

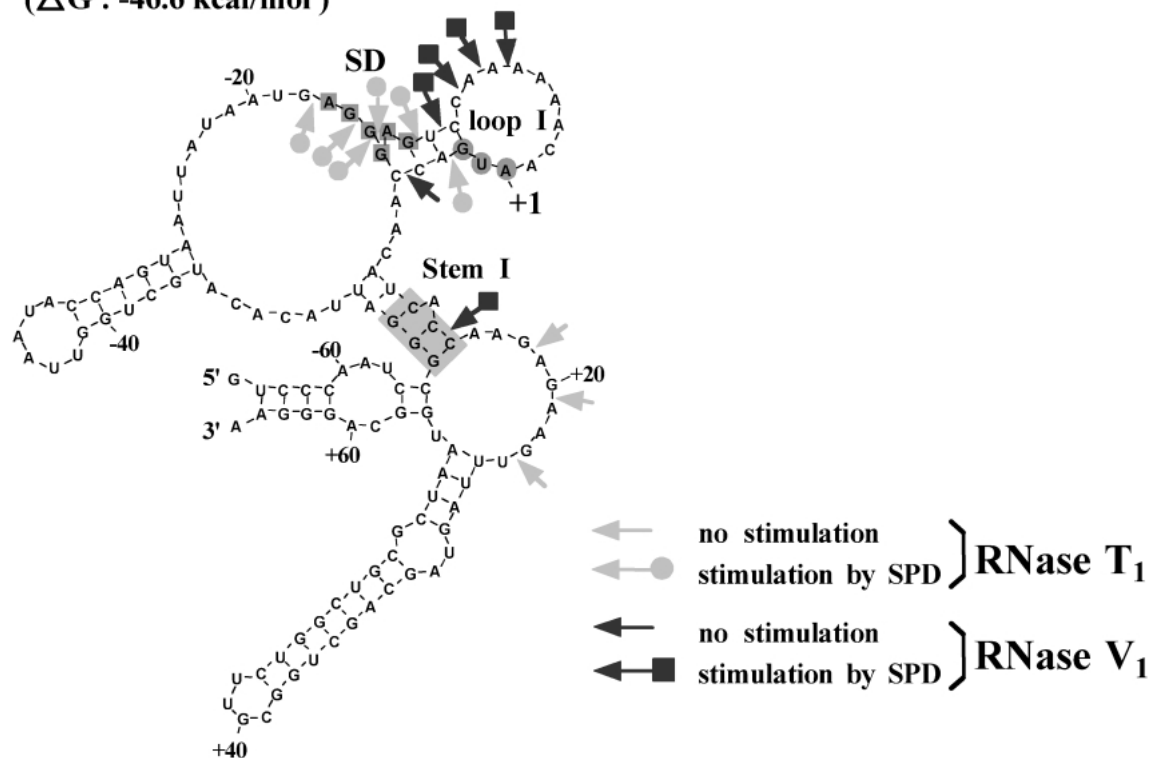


Fig. 9. Possible Secondary Structure of OppA mRNA and Changes of the Sensitivity to RNases by Spermidine

し、ポリアミンはこの部位に結合することにより bulge-out A の構造を安定化させ、SD 配列と開始コドン AUG 領域の構造を変化させた。これにより、SD 配列と AUG 領域の相対距離が近くなり、fMet-tRNA のリボソームへの結合が促進されるという考えを支持する結果が得られた。この考えの正当性を証明するための実験を、目下 NMR を用いて行っているところである。

ついで、ポリアミンにより翻訳レベルで合成促進を受ける蛋白質をコードしている遺伝子群をポリアミンモジュロンと命名し、ポリアミンモジュロンの細胞増殖促進に果たす役割を検討した。これまで同定したポリアミンにより翻訳レベルで合成促進を受ける 9 種の蛋白質のうち 7 種が転写因子であったので、DNA マイクロアレイを用いてポリアミンにより合成促進を受ける mRNA の同定を試みたところ、大腸菌の対数期には約 2700 種の mRNA が発現しており、そのうちの約 300 種の mRNA の発現がポリアミンにより促進を受け、かつ約 300 種の mRNA の発現が阻害を受けていた。このうちの約 170 種の mRNA の発現は、上記 7 種の転写因子の

コントロール下にあった (Table 3)。新しいポリアミンモジュロンを同定することにより、大腸菌におけるポリアミンの細胞増殖促進作用の全体像が明らかになる日も近いと思われる (Fig. 10)。

動物細胞においても、ポリアミンにより翻訳レベルで合成促進を受ける蛋白質を約 10 種同定した。しかし、蛋白質合成開始反応機序が動物細胞では異なるため、いまだそのメカニズム解明に至っていない。

**3-2. ポリアミンによる NMDA 受容体活性調節**  
 脳は細胞増殖が活発でないにも関わらずポリアミン含量が比較的多く、<sup>57)</sup> 脳におけるポリアミンの役割が注目されていた。1990 年代に入ると、長期増強に基づく記憶形成及び  $Ca^{2+}$  のニューロンへの流入による脳虚血時の症状悪化に強く関わっているグルタミン酸受容体のサブタイプの 1 つである NMDA 受容体 cDNA のクローニングが成功し、<sup>58)</sup> その活性測定がアフリカツメガエルの卵母細胞に NMDA 受容体 mRNA を注入することにより可能になり、ポリアミン、特にスperlミンが NMDA 受容体活性を脱分極 (興奮) 時に活性化し、過分極 (静止) 時

Table 3. Typical Regulated Genes in *E. coli* MA261 Cultured in the Presence of Putrescine Compared to Its Absence

		Gene
Genes regulated by RpoS ( $\sigma^{38}$ )	up	<i>acnA<sup>a)</sup>, aidB, aldB, appB, bolA, cbpA, cfa, dacC, deoD, dps, elaB, fic, frdD, gabP, gadA, gadB, hdeA, hdeB, hyaC, katE, katG, ldcC, msyB, narY, osmC, osmE, osmY, otsA, otsB, pfkB, poxB, psiF, slp, sodC, sufS, talA, treA, treF, uspB, wrbA, xasA, yahO, ybaS, ybaT, ybaY, ybgA, ybgS, ybhE, ybhP, ybjP, ycaC, yccJ, ycfH, ycgB, yddX, ydiZ, yeaG, yebF, yfcG, yfeT, ygaF, yhcO, yhiE, yhiN, yhiU, yhiV, yhjD, yiaG, yjbJ, yidI, yjdJ, yjgR, ynhG, yohF, yqjC, yqjD</i>
Genes regulated by Cya	up	<i>agaZ, cdd, flgA, flgM, flhB, fliA, fliD, fliG, fliH, fliI, fliM, fliN, fliQ, malP, manX, manY, manZ, ptsG<sup>b)</sup>, sdhA, sdhB, sdhD, tsr, ubp, ugpQ</i>
Genes regulated by FecI ( $\sigma^{18}$ )	up	<i>fecA, fecB, fecC, fecD, fecE</i>
Genes regulated by Fis	up	<i>adhE, nuoA, nuoB, nuoD, nuoG, nuoH, nuoI, nuoK, nuoL, hupA, ptsG<sup>b)</sup></i>
Genes regulated by RpoN ( $\sigma^{54}$ )	up	<i>astB, glnH, hycC, hypC, hypE, pspA, rtcA, rtcB, oat</i>
Genes regulated by Cra	up	<i>acnA<sup>a)</sup></i>
	down	<i>fruB, glk, epd</i>
Genes regulated by H-NS	up	<i>flgA, flgI, rplA, rplB, rplC, rplF, rplI, rplK, rplL, rplN, rplV, rpmG, rpsN, rpsQ, rpsS</i>
	down	<i>appY, aslB, csgA, cspC, cspG, cspI, cyoA, feoB, fin, gnd, hha, ompC, ompF, pflB, rfaI, rfaK, spy, wcaI, ycbW, ydbD, ydeP, yedV, ygaP, yhiX, ynaE</i>

a) Regulated by both RpoS ( $\sigma^{38}$ ) and Cra. b) Regulated by both Cya and Fis.

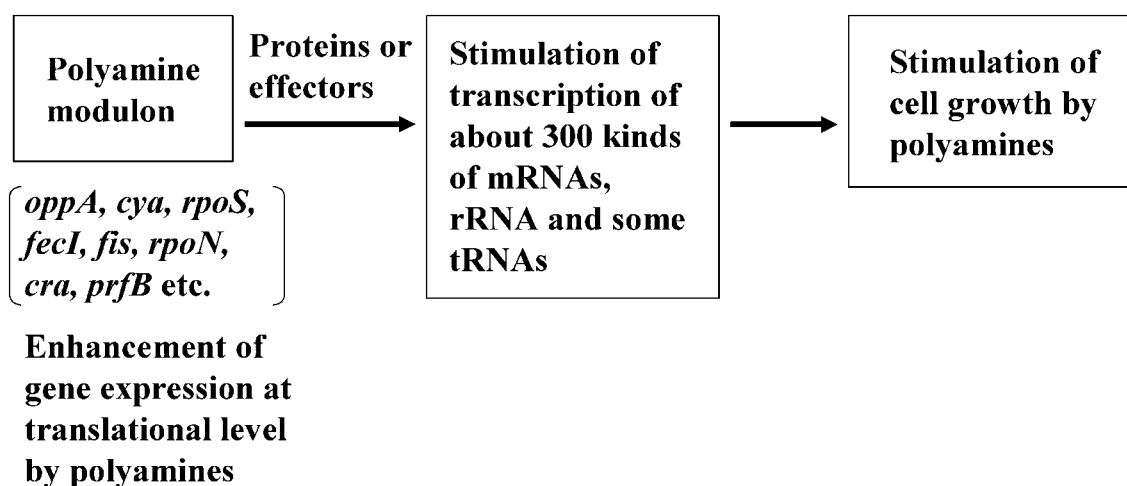


Fig. 10. Proposed Role of the Polyamine Modulon in Cell Proliferation

に阻害することが明らかとなった。<sup>7)</sup> 筆者らはポリアミン輸送系の基質結合蛋白質 PotD と NMDA 受容体のアミノ酸配列のホモロジーを検索し、NMDA 受容体上の活性化に関与するスペルミンの結合部位の同定を試みた。すなわち、ホモロジーの高い部分の酸性アミノ酸残基を中性アミノ酸に置換した NMDA 受容体をアフリカツメガエルの卵母細胞に発現させてその活性を測定し、スペルミンによる活性促進と脳機能改善薬であるイフェンプロジルの作用 (NMDA 受容体の活性阻害) に関わるアミノ酸残基の同定に成功した (Fig. 11 (A)).<sup>8,59,60)</sup> イフ

エンプロジルはスペルミンと結合部位が重複していると考えられていたが、実際には異なっており、かつ両物質の結合部位はアゴニスト結合領域のさらに N 末端側に位置していた。この部位を調節領域 (R-domain) と命名し、スペルミンとイフェンプロジルの結合モデルを PotD との相同性より構築した。このモデル構造は *Mol. Pharmacol.* の 1999 年度下半期の表紙に採用された (Fig. 11 (A)).<sup>8)</sup>

現在、アルツハイマー病治療薬としてアセチルコリンエステラーゼ阻害剤 (ドネパジル) が使われ、ニューロンへの  $\text{Ca}^{2+}$  流入を妨げる NMDA 受容体の

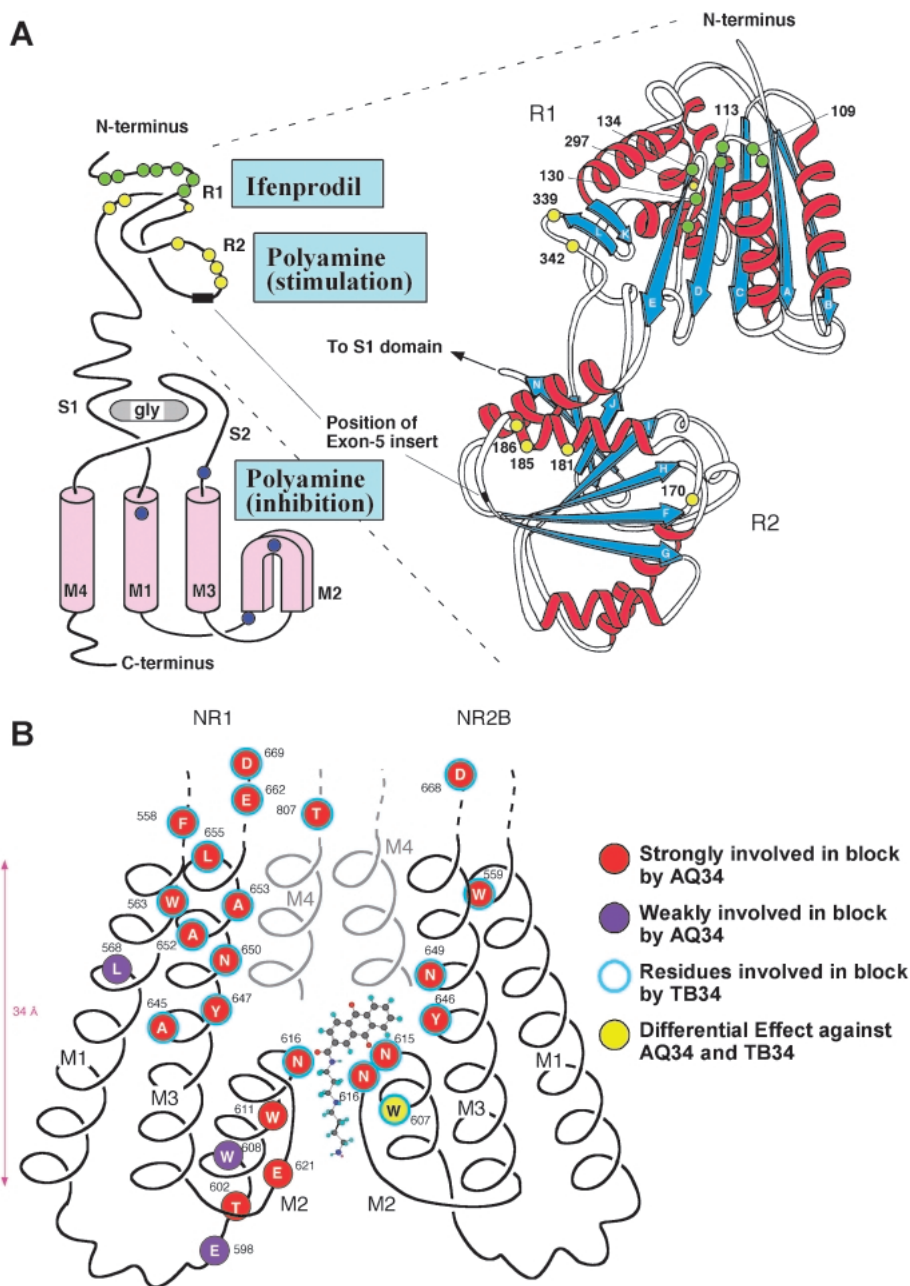


Fig. 11. Modeling of Regulatory Domains of NMDA Receptor (A) and Modeling Residues that Affect Block by AQ34 and TB34 (B)

チャンネルブロッカー（メマンチン）が日本では臨床試験段階にある。筆者らは、NMDA 受容体のチャンネル領域の構造解析及びメマンチンと類似の作用を持つ新しい NMDA 受容体チャンネルブロッカーの開発を試みた。<sup>61-63</sup> 新しいチャンネルブロッカーとして、トリベンジルスペルミジン (TB34) とアントラキノンスペルミジン (AQ34) を見出した。また、チャンネルはその最も狭い部分を形成する M2 ループと M3 膜貫通領域より形成されていることを、一アミノ酸変異 NMDA 受容体に対する TB34 及び AQ34

のチャンネルブロック活性を測定することにより明らかにした。さらに、TB34 はチャンネルの最も狭い部分に位置する M2 ループ上の N616 より上部に結合し、AQ34 は AQ 部分がチャンネルの最も狭い部分に、スペルミジン部分はその下部に、それぞれ結合することを明らかにした (Fig. 11 (B))。また、メマンチンはサイズの小さい化合物であり、N616 の近傍に結合することを同時に明らかにした。現在、結合部位の異なるこの 2 種の化合物 (TB34 及び AQ34) をリード化合物として、イフェンプロジ

ル、メマンチンを超える NMDA 受容体阻害剤を開発中である。

イオンチャネルとポリアミンの相互作用に関しては、NMDA 受容体の他に、内向き整流性 K<sup>+</sup>-チャネルの内向き整流活性がスペルミンに依存していることが報告されている。<sup>64,65)</sup>

**3-3. 腎不全及び脳梗塞時における血漿ポリアミンオキシダーゼとアクロレイン量の上昇** ポリアミンは細胞増殖促進因子であるため、細胞培養系の

培地によく添加される。しかし、牛血清が同時に存在すると、Fig. 12 に示すように牛血清アミンオキシダーゼにより H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> とアクロレインが産生され、細胞増殖が阻害される。この細胞増殖阻害が H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> によるのかアクロレインによるのかを決定するために、培地中にカタラーゼ (Cat) 又はアルデヒドデヒドロゲナーゼ (ALDH) を添加したところ、ALDH 添加時のみ細胞増殖は回復し、毒性物質はアクロレインであることが明らかとなった (Fig.

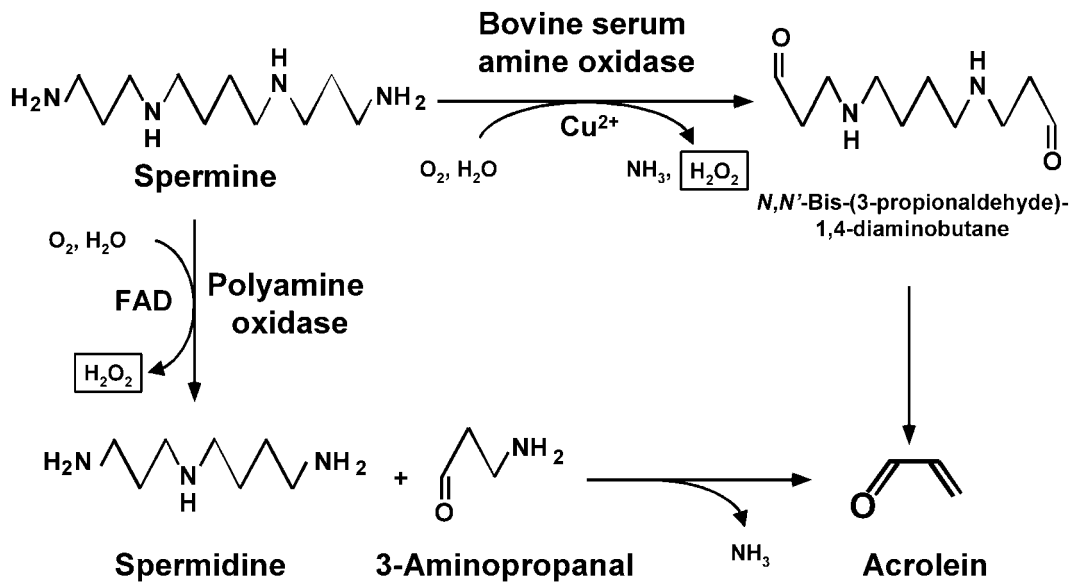


Fig. 12. Production of Acrolein from Spermine by SMO and Bovine Serum Amine Oxidase

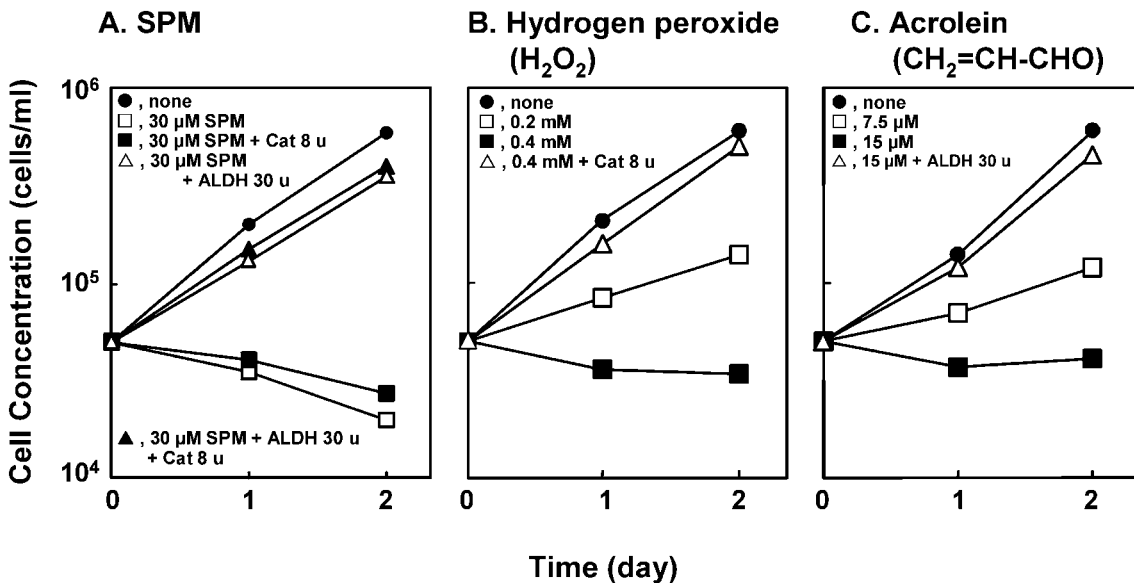


Fig. 13. Effect of Spermine (A), Hydrogen Peroxide (B) and Acrolein (C) on Cell Growth of FM3A Cells Cultured in the Presence of 2% Fetal Calf Serum

13(A)).<sup>66)</sup> 実際に細胞増殖を阻害する H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> とアクロレインの濃度を検討したところ、それぞれ 0.4 mM と 15 μM であった (Figs. 13(B), (C)).<sup>66)</sup>

同じ酸化ストレスでも、活性酸素に比べ影の薄かったアクロレインが非常に強い細胞毒性を示したことに興味を持ち、生活習慣病と血漿アクロレイン量に相関があるかどうか検討した。腎不全患者の場合は、血漿中のスペルミンが減少し、プトレスシンが増加していた。さらに、血漿中のスペルミンを分解するスペルミンオキシダーゼ (SMO) 活性、フリーのアクロレイン及び蛋白質結合型アクロレイン (FDP-Lys) の量が著しく上昇していた (Table 4).<sup>67)</sup> すなわち、腎不全と SMO 活性、アクロレイン量の間に関係が認められた。

次に、現在バイオマーカーが存在しない脳梗塞とポリアミンオキシダーゼ (PAO), アクロレイン量の間に関係が認められるかどうか検討した。<sup>69)</sup> アクロレインは、スペルミンから SMO により合成される 3-アミノプロパナール (Fig. 12) から生じる以外に、アセチルポリアミンオキシダーゼ (AcPAO) により合成される 3-アセタミドプロパナールからも少量生じる。この両酵素活性を加えた total PAO 活性は脳梗塞患者の血漿中で有意に増加していた (Fig. 14(A)). さらに、FDP-Lys 量も有意に増加していた。次に、発症後 40 日までの患者の各指標の経時変化を調べたところ、最初に AcPAO 活性が上昇し、続いて SMO 活性、最後に FDP-Lys 量が増加することが明らかとなった (Fig. 14(B)). AcPAO 活性は脳梗塞発症後直ちに上昇するので、発症直後の患者の AcPAO 活性と現在脳梗塞の診断に使われている MRI (Magnetic Resonance Imaging) を同時に測定したところ、AcPAO 活性の上昇の方

が MRI による梗塞像の検出より明らかに早かった (Fig. 15). すなわち、AcPAO 活性の上昇は発症後 1 日目に認められたが、MRI による梗塞像は発症後 2 日目になり初めて認められた。今後、AcPAO 活性が脳梗塞の早期診断マーカーとして利用できるかどうかを、多くの患者の AcPAO 活性を測定することにより明確にしたいと思っている。

もう一点大事なことは、無症候性脳梗塞患者の早期発見に total PAO 活性と FDP-Lys 量の測定が利用できるかどうかである。統計によると、小さい梗塞が検出された人が脳梗塞を発病する確率は健康人に比べ 13.1 倍高い。<sup>70)</sup> 手足のしびれ等自覚症状があり、MRI で梗塞が検出された 11 名の total PAO 活性及び FDP-Lys 量は、健康人に比べ有意に高かった。<sup>67)</sup> さらに、total PAO 活性と FDP-Lys 量が高い 8 名の健康人の MRI 測定を行ったところ、4 名に梗塞、2 名に萎縮が認められた (Fig. 16). 現在進行中のプロジェクトでは、200 名の健康人の total PAO 活性及び FDP-Lys 量を測定し、高値が認められた約 30 名について MRI 測定を行ったところ、非常に高い確率(約 80%)で梗塞像が認められた。この測定に近い将来人間ドックで利用され、社会に役立つことを願っている。

#### 4. おわりに

ポリアミンの細胞内濃度調節機序と生理機能について、筆者らの研究成果を中心に解説した。ポリアミンの細胞内濃度は 3 種のポリアミン量を生合成、分解、輸送により巧みに調節し、その至適濃度を保っている。

また、ポリアミンの生理機能の最たるものは細胞増殖促進作用であるが、それは主としてポリアミンによる RNA の構造変化によることを繰り返し強調

Table 4. Polyamine and Acrolein Contents and SMO Activity in Plasma of Normal Subjects and Patients with Chronic Renal Failure<sup>a)</sup>

Category of subjects <sup>b)</sup>	Level (pmol/ml of plasma) of polyamine			SMO activity (nmol/ml of plasma)	Acrolein (nmol/ml of plasma)	FDP-Lys (nmol/ml of plasma) <sup>c)</sup>
	Putrescine	Spermidine	Spermine			
Normal (n=19)	49.5±31.2	72.9±34.9	30.7±39.5	1.66±0.97	0.53±0.18	31.2±8.80
Moderate (n=13)	107±86.2*	68.9±53.4	9.22±7.58	3.56±2.10**	1.02±0.98	138±51.1***
Severe (n=9)	91.0±29.8***	46.1±15.4**	7.55±6.56*	3.96±3.19**	1.42±0.84**	170±85.8***

a) Results are means with standard deviations, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  and \*\*\*  $p < 0.001$  versus normal subjects. b) Moderate: <8 mg of serum creatinine per dl, severe: >8 mg of serum creatinine per dl. Creatinine in plasma was determined by a standard method for blood chemistry, the creatinase-peroxidase (CRTNas-POD) method. c) Protein-conjugated acrolein (FDP-Lys; N<sup>ε</sup>-(3-formyl-3,4-dehydropiperidino)-lysine) was determined by the method of Uchida et al.<sup>68)</sup> using ACR-Lysine adduct ELISA system and 0.05 ml of plasma.

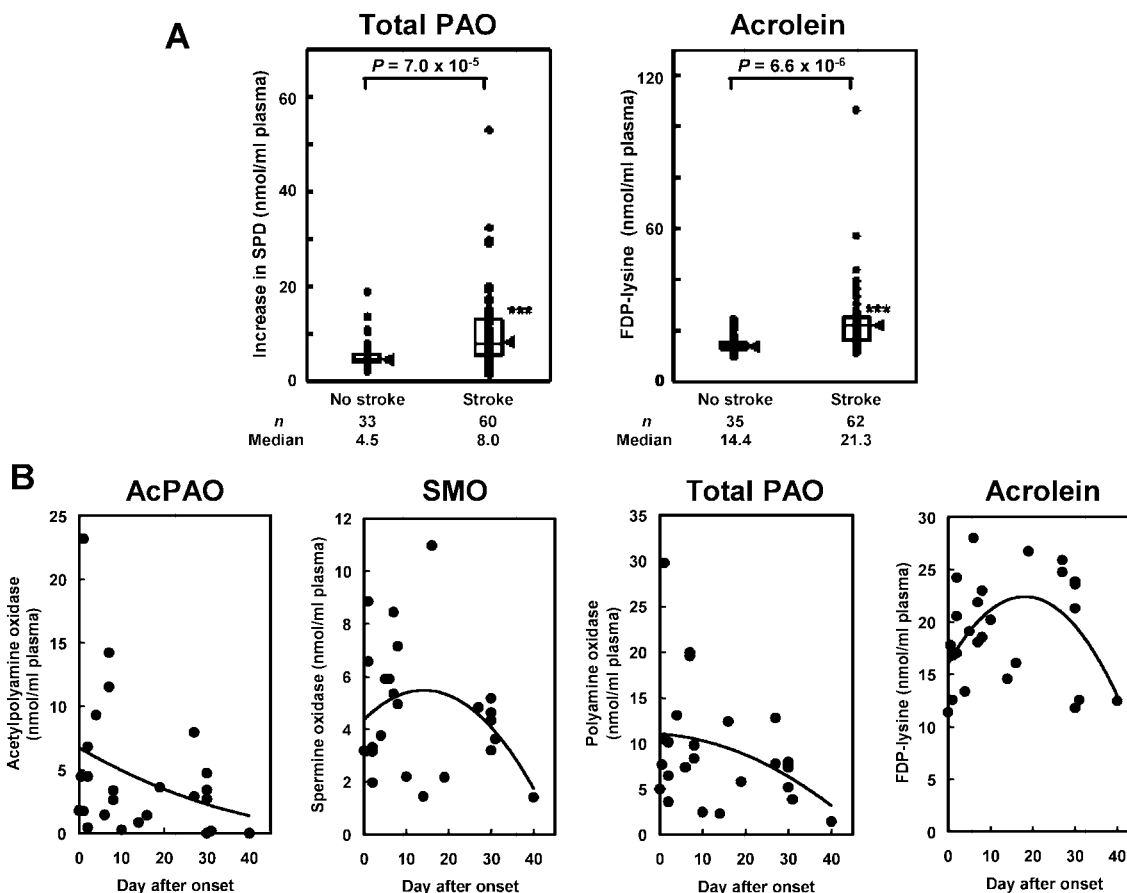


Fig. 14. Levels of Total PAO and Protein-conjugated Acrolein (FDP-lysine) in the Plasma of Patients with Stroke (A) and Relationship between AcPAO, SMO, Total PAO and FDP-lysine and the Day after Onset of Stroke (B)

Time after onset	Day 1 (infarction -)	Day 2 (infarction +)	Day 7 (infarction +)
<b>Patient 050</b> Age 81, Female			
	MRI	MRI	CT
<b>Acetylpolyamine oxidase</b> (nmol/ml plasma)	23.2 (x 25.8)	-	2.6 (x 2.92)
<b>Spermine oxidase</b> (nmol/ml plasma)	6.6 (x 2.05)	-	7.2 (x 2.23)
<b>FDP-lysine</b> (nmol/ml plasma)	16.8 (x 1.17)	-	23.0 (x 1.60)

Fig. 15. Relationship between Imaging and AcPAO, SMO and FDP-lysine

A	Patient	Total PAO x FDP-lys	Diagnosis
	A. 88y, female	411.2	Infarction
	B. 86y, male	288.3	Infarction
	C. 71y, male	112.5	T2 abnormal
	D. 51y, female	96.5	T2 abnormal
	E. 67y, male	93.3	Atrophy
	F. 62y, male	106.4	Atrophy
	G. 58y, male	238.9	Normal
	H. 56y, male	282.3	Normal

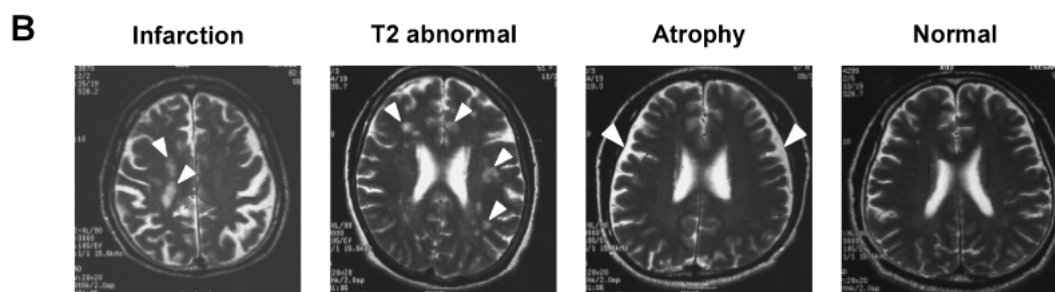


Fig. 16. Detection of Infarction from Apparently Normal Subject

MRI was made in 8 apparently normal subjects whose multiplied value of total PAO and FDP-lysine was beyond the cutoff value. Diagnosis of those 8 subjects and MRI of typical 4 examples are shown.

したい。その他に、NMDA 受容体のような特定の蛋白質と相互作用し、その機能調節に関与している。

最後に、酸化ストレスとして活性酸素の働きが主として論じられているが、アクロレインも細胞傷害に強く関わっていることを、腎不全及び脳梗塞を例に取り解説した。

ポリアミンは細胞増殖必須因子であるにも関わらず、その研究は遅れている。この総説を読み、一人でも多くの若い研究者がポリアミン研究に参入されることを切望し、筆を置く。

**謝辞** 本研究は千葉大学大学院薬学研究院病態生化学研究室で行われたものであり、一緒に研究を行ってくださった皆さんに心より感謝申し上げます。

## REFERENCES

- 1) Cohen S. S., "A Guide to the Polyamines," Oxford University Press, 1998.
- 2) Tabor C. W., Tabor H., *Annu. Rev. Biochem.*, **53**, 749-790 (1984).
- 3) Igarashi K., Kashiwagi K., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **271**, 559-564 (2000).
- 4) Igarashi K., Kashiwagi K., *J. Biochem.*, **139**, 11-16 (2006).
- 5) Igarashi K., "Polyamines: Mysterious Modulators of Cellular Functions" (in Japanese), Kyoritsu Syuppan, Tokyo, 1993.
- 6) Igarashi K., Kashiwagi K., *Kagaku to Seibutsu*, **35**, 442-450 (1997).
- 7) Williams K., Zappia A. M., Pritchett D. B., Shen Y. M., Molinoff P. B., *Mol. Pharmacol.*, **45**, 803-809 (1994).
- 8) Masuko T., Kashiwagi K., Kuno T., Nguyen N. D., Pakh A. J., Fukuchi J., Igarashi K., Williams K., *Mol. Pharmacol.*, **55**, 957-969 (1999).
- 9) Masuko T., Kusama-Eguchi K., Sakata K., Kusama T., Chaki S., Okuyama S., Williams K., Kashiwagi K., Igarashi K., *J. Neurochem.*, **84**, 610-617 (2003).
- 10) Homma R., Mase A., Toida T., Kashiwagi K., Igarashi K., *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **37**, 1911-1920 (2005).
- 11) Ogasawara T., Ito K., Igarashi K., *J. Biochem.*, **105**, 164-167 (1989).
- 12) Kameji T., Hayashi S., Hoshino K., Kakinuma Y., Igarashi K., *Biochem. J.*, **289**, 581-586

- (1993).
- 13) Suzuki T., Sadakata Y., Kashiwagi K., Hoshino K., Kakinuma Y., Shirahata A., Igarashi K., *Eur. J. Biochem.*, **215**, 247–253 (1993).
  - 14) He Y., Kashiwagi K., Fukuchi J., Terao K., Shirahata A., Igarashi K., *Eur. J. Biochem.*, **217**, 89–96 (1993).
  - 15) Murakami Y., Tanaka K., Matsufuji S., Miyazaki Y., Hayashi S., *Biochem. J.*, **283**, 661–664 (1992).
  - 16) Murakami Y., Matsufuji S., Kameji T., Hayashi S., Igarashi K., Tamura T., Tanaka K., Ichihara A., *Nature*, **360**, 597–599 (2002).
  - 17) Suzuki T., He Y., Kashiwagi K., Murakami Y., Hayashi S., Igarashi K., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **91**, 8930–8934 (2004).
  - 18) Mitchell J. L., Judd G. G., Bareyal-Leyser A., Ling S. Y., *Biochem. J.*, **299**, 19–22 (1994).
  - 19) Nishimura K., Nakatsu F., Kashiwagi K., Ohno H., Saito T., Igarashi K., *Genes Cells*, **7**, 41–47 (2002).
  - 20) Jänne J., Alhonen L., Keinänen T. A., Pietilä M., Uimari A., Pirinen E., Hyvönen M. T., Järvinen A., *J. Cell Mol. Med.*, **9**, 865–882 (2005).
  - 21) Wang Y., Casero Jr. R. A., *J. Biochem.*, **139**, 17–25 (2006).
  - 22) Fukuchi J., Kashiwagi K., Takio K., Igarashi K., *J. Biol. Chem.*, **269**, 22581–22585 (1994).
  - 23) Moore R. C., Boyle S. M., *J. Bacteriol.*, **172**, 4631–4640 (1990).
  - 24) Nakaike S., Kashiwagi K., Terao K., Iio K., Igarashi K., *Jpn. J. Cancer Res.*, **79**, 501–508 (1988).
  - 25) Igarashi K., Kashiwagi K., *Biochem. J.*, **344**, 633–642 (1999).
  - 26) Igarashi K., Kashiwagi K., Hamasaki H., Miura A., Kakegawa T., Hirose S., Matsuzaki S., *J. Bacteriol.*, **166**, 128–134 (1986).
  - 27) Pistocchi R., Kashiwagi K., Miyamoto S., Nukui E., Sadakata Y., Kobayashi H., Igarashi K., *J. Biol. Chem.*, **268**, 146–152 (1993).
  - 28) Furuchi T., Kashiwagi K., Kobayashi H., Igarashi K., *J. Biol. Chem.*, **266**, 20928–20933 (1991).
  - 29) Kashiwagi K., Suzuki T., Suzuki F., Furuchi T., Kobayashi H., Igarashi K., *J. Biol. Chem.*, **266**, 20922–20927 (1991).
  - 30) Soksawatmaekhin W., Kuraishi A., Sakata K., Kashiwagi K., Igarashi K., *Mol. Microbiol.*, **51**, 1401–1412 (2004).
  - 31) Igarashi K., Ito K., Kashiwagi K., *Res. Microbiol.*, **152**, 271–278 (2001).
  - 32) Sugiyama S., Vassilyev D. G., Matsushima M., Kashiwagi K., Igarashi K., Morikawa K., *J. Biol. Chem.*, **271**, 9519–9525 (1996).
  - 33) Kashiwagi K., Pistocchi R., Shibuya S., Sugiyama S., Morikawa K., Igarashi K., *J. Biol. Chem.*, **271**, 12205–12208 (1996).
  - 34) Vassilyev D. G., Tomitori H., Kashiwagi K., Morikawa K., Igarashi K., *J. Biol. Chem.*, **273**, 17604–17609 (1998).
  - 35) Kashiwagi K., Innami A., Zenda R., Tomitori H., Igarashi K., *J. Biol. Chem.*, **277**, 24212–24219 (2002).
  - 36) Kashiwagi K., Kuraishi A., Tomitori H., Igarashi A., Nishimura K., Shirahata A., Igarashi K., *J. Biol. Chem.*, **275**, 36007–36012 (2000).
  - 37) Molenaar D., Bosscher J. S., ten Brink B., Driessen A. J. M., Konings W. N., *J. Bacteriol.*, **175**, 2864–2870 (1993).
  - 38) Tachihara K., Uemura T., Kashiwagi K., Igarashi K., *J. Biol. Chem.*, **280**, 12637–12642 (2005).
  - 39) Uemura T., Tomonari Y., Kashiwagi K., Igarashi K., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **315**, 1082–1087 (2004).
  - 40) Uemura T., Kashiwagi K., Igarashi K., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **328**, 1028–1033 (2005).
  - 41) Aouida M., Leduc A., Poulin R., Ramotar D., *J. Biol. Chem.*, **280**, 24267–24276 (2005).
  - 42) Wallace H. M., Fraser A. V., Hughes A., *Biochem. J.*, **376**, 1–14 (2003).
  - 43) Watanabe S., Kusama-Eguchi K., Kobayashi H., Igarashi K., *J. Biol. Chem.*, **266**, 20803–20809 (1991).
  - 44) Miyamoto S., Kashiwagi K., Ito K., Watanabe S., Igarashi K., *Arch. Biochem. Biophys.*, **300**, 63–68 (1993).
  - 45) Igarashi K., Aoki Y., Hirose S., *J. Biochem.*, **81**, 1091–1096 (1977).
  - 46) Igarashi K., Sugawara K., Izumi I., Nagayama C., Hirose S., *Eur. J. Biochem.*, **48**, 495–502 (1974).
  - 47) Atkins J. F., Lewis J. B., Anderson C. W., Gesteland R. F., *J. Biol. Chem.*, **250**, 5688–



- 5695 (1975).
- 48) Igarashi K., Kishida K., Kashiwagi K., Tatokoro I., Kakegawa T., Hirose S., *Eur. J. Biochem.*, **113**, 587–593 (1981).
- 49) Igarashi K., Kashiwagi K., Kishida K., Kakegawa T., Hirose S., *Eur. J. Biochem.*, **114**, 127–131 (1981).
- 50) Igarashi K., Saisho T., Yuguchi M., Kashiwagi K., *J. Biol. Chem.*, **272**, 4058–4064 (1997).
- 51) Yoshida M., Meksuriyen D., Kashiwagi K., Kawai G., Igarashi K., *J. Biol. Chem.*, **274**, 22723–22728 (1999).
- 52) Yoshida M., Kashiwagi K., Kawai G., Ishihama A., Igarashi K., *J. Biol. Chem.*, **276**, 16289–16295 (2001).
- 53) Yoshida M., Kashiwagi K., Kawai G., Ishihama A., Igarashi K., *J. Biol. Chem.*, **277**, 37139–37146 (2002).
- 54) Yoshida M., Kashiwagi K., Shigemasa A., Taniguchi S., Yamamoto K., Makinoshima H., Ishihama A., Igarashi K., *J. Biol. Chem.*, **279**, 46008–46013 (2004).
- 55) Higashi K., Kashiwagi K., Taniguchi S., Terui Y., Yamamoto K., Ishihama A., Igarashi K., *J. Biol. Chem.*, **281**, 9527–9537 (2006).
- 56) Shine J., Dalgarno L., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **71**, 1342–1346 (1974).
- 57) Nishimura K., Shiina R., Kashiwagi K., Igarashi K., *J. Biochem.*, **139**, 81–90 (2006).
- 58) Moriyoshi K., Masu M., Ishii T., Shigemoto R., Mizuno N., Nakanishi S., *Nature*, **354**, 31–37 (1991).
- 59) Williams K., Kashiwagi K., Fukuchi J., Igarashi K., *Mol. Pharmacol.*, **48**, 1087–1098 (1995).
- 60) Kashiwagi K., Fukuchi J., Chao J., Igarashi K., Williams K., *Mol. Pharmacol.*, **49**, 1131–1141 (1996).
- 61) Igarashi K., Shirahata A., Pahk A. J., Kashiwagi K., Williams K., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **283**, 533–540 (1997).
- 62) Kashiwagi K., Masuko T., Nguyen C. D., Kuno T., Tanaka I., Igarashi K., Williams K., *Mol. Pharmacol.*, **61**, 533–545 (2002).
- 63) Kashiwagi K., Tanaka I., Tamura M., Sugiyama H., Okawara T., Otsuka M., Sabado T. N., Williams K., Igarashi K., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **309**, 884–893 (2004).
- 64) Lopatin A. N., Makhina E. N., Nichols C. G., *Nature*, **372**, 366–369 (1994).
- 65) Ficker E., Tagliatela M., Wible B. A., Henley C. M., Brown A. M., *Science*, **266**, 1068–1072 (1994).
- 66) Sharmin S., Sakata K., Kashiwagi K., Ueda S., Iwasaki S., Shirahata A., Igarashi K., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **282**, 228–235 (2001).
- 67) Sakata K., Kashiwagi K., Sharmin S., Ueda S., Irie Y., Murotani N., Igarashi K., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **305**, 143–149 (2003).
- 68) Uchida K., Kanematsu M., Morimitsu Y., Osa-wa T., Noguchi N., Niki E., *J. Biol. Chem.*, **273**, 16058–16066 (1998).
- 69) Tomitori H., Usui T., Saeki N., Ueda S., Kase H., Nishimuea K., Kashiwagi K., Igarashi K., *Stroke*, **36**, 2609–2613 (2005).
- 70) Kobayashi S., Okada K., Koide H., Bokura H., Yamaguchi S., *Stroke*, **28**, 1932–1939 (1994).