

特集：リボソームの機能調節と疾患

III. リボソーム機能の調節

III-3 リボソームをハブとする mRNA 品質管理機構と 遺伝子発現制御の新展開

稲田 利文

スプライシングやポリ(A)鎖付加反応といった mRNA プロセッシング過程は、遺伝子発現の多様性獲得に必須な機能を果たす。一方で、プロセッシング反応の過程で合成されるさまざまな異常 mRNA は、細胞の持つ mRNA 品質管理機構によって認識され迅速に分解される。我々は終止コドンを持たないノンストップ mRNA に対する品質管理機構 (NSD) を解析し、ポリ(A)鎖にコードされるポリリシン配列が翻訳伸長反応を阻害する結果、異常 mRNA と異常タンパク質が迅速に分解されることを見いだした。この品質管理機構におけるポリ(A)鎖の新しい機能の発見が契機となり、リボソームをハブとする遺伝子発現制御の分子機構の解明が進んでいる。特に、合成途中の新生ポリペプチド鎖に依存した翻訳制御と、それに共役した異常タンパク質と異常 mRNA の分解機構の新展開について紹介する。

1. はじめに

スプライシングやポリ(A)鎖付加反応といった mRNA プロセッシング過程は、遺伝子発現の多様性獲得に必須な機能を果たす。一方で、プロセッシング反応の過程でさまざまな異常 mRNA が合成され、mRNA 品質管理機構によって認識・排除される結果、正常な細胞機能に必要な遺伝子発現の正確性が保証されている。ほとんどのヒトの遺伝子から複数のスプライシングバリエーションが合成されるが、その多くは分解され、翻訳産物はほとんど検出されない。また、イントロンなど異常な位置でのポリ(A)鎖付加反応によって合成された異常 mRNA も、細胞の持つ mRNA 品質管理機構によって認識され迅速に分解される。mRNA 品

質管理因子のノックアウトマウスの多くが胎生致死となることは、mRNA 品質管理機構の重要性を明確に示している。現在、解析が進められている品質管理機構は、①ナンセンス変異に代表される異常な位置に存在する終止コドンに依存したナンセンス変異依存 mRNA 分解機構 (NMD)¹⁾、②終止コドンを持たないノンストップ mRNA 分解機構 (NSD)²⁾、③翻訳伸長阻害による mRNA 分子内切断機構 (NGD)³⁾、の三つである。NMD の分子機構については優れた総説があるので、本稿では NSD と NGD の分子機構について解説する。また、NSD における解析から、ポリ(A)鎖にコードされる連続したアミノ酸配列が翻訳伸長反応を阻害することが明らかになった。この品質管理機構におけるポリ(A)鎖の新しい機能の発見が契機となり、リボソームをハブとする遺伝子発現制御の分子機構の解明が進んでいる⁴⁾。特に、合成途中の新生ポリペプチド鎖に依存した翻訳制御と、それに伴って異常タンパク質と異常 mRNA が迅速に分解される分子機構の新展開について紹介する。

東北大学大学院薬学研究科 (〒980-8578 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉6番3号)

Ribosome as a hub for protein and mRNA quality control and gene regulation

Toshifumi Inada (Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University, Aoba-Ku, Sendai 980-8578, Miyagi prefecture, Japan)

2. NSDの分子機構

細胞内に存在するノンストップ mRNA の種類としては、①オープンリーディングフレーム (ORF) 中でのポリ (A) 鎖付加反応、②正常な mRNA が 3' 末端から分解される際の分解中間体、③ORF 中での低分子干渉 RNA (siRNA) 等による mRNA 分子内切断の結果生じる 5' 末端側の断片、等がある。最近の次世代シーケンサーを用いた細胞内の RNA の塩基配列を決定する RNA-seq 等の解析から、ORF 中でのポリ (A) 鎖付加反応によって合成されるノンストップ mRNA が、全体の 5% 程度まで発現する主要な異常 mRNA であることが明らかになった⁵⁾。原核生物ではトランスファー・メッセンジャー RNA (tmRNA) が mRNA の 3' 末端で停滞したりボソームの A サイトに結合し、ノンストップ mRNA 由来の異常短鎖型タンパク質にタグ配列を付加することで、異常タンパク質の迅速な分解を引き起こす⁶⁾。しかしながら真核生物には tmRNA のオースログが存在しないため、mRNA の 3' 末端で停滞したりボソームを解離させる因子は不明であった。

最近我々は、新規翻訳複合体が mRNA の 3' 末端で停滞したりボソームの A サイトに結合し、終止コドン非依存にリボソームを解離させることを報告した^{7,8)}。通常の翻訳反応においては、アミノアシル tRNA もしくはペプチド鎖解離因子 eRF1 が、GTP 結合因子との複合体として A サイトに結合してデコーディング (コドン解読) を行う (図 1)。しかしながら、ノンストップ mRNA の 3' 末端で停滞したりボソームの A サイトには、これらの因子が結合できないため、新規翻訳因子の存在が示唆された。出芽酵母 Dom34 (ヒトのオースログは Pelota) と GTP 結合因子 Hbs1 はリボソームの A サイトに結合する新規因子として最近解析が進んでいる。我々は細胞内でノンストップ mRNA を効率よく発現するレポーター系を構築し、ノンストップ

mRNA を鋳型としたタンパク質の合成に Dom34 : Hbs1 複合体が必須であることを明らかにした⁹⁾。さらに、ショ糖密度勾配遠心法と中性条件下での SDS/PAGE を組み合わせ、Dom34 : Hbs1 複合体非存在下では、ノンストップ mRNA 由来のペプチジル tRNA がリボソーム中に存在することを明らかにした⁷⁾。この結果から、Dom34 : Hbs1 複合体がノンストップ mRNA の 3' 末端で停滞したりボソームの A サイトに結合し、サブユニットの解離を担う因子であることが初めて証明された (図 1)。さらに、Dom34 : Hbs1 複合体によってリボソームがノンストップ mRNA から解離することによって、エキソソームによる mRNA の分解が促進されることも明らかにした⁷⁾。これらの結果は、ノンストップ mRNA の分解促進に Dom34 : Hbs1 複合体が必須であることを明確に示している。さらに、翻訳伸長阻害による mRNA 分子内切断機構 (NGD) によって生じた mRNA 断片も、終止コドンを持たないノンストップ mRNA であり、Dom34 : Hbs1 複合体に依存して迅速に分解されることを明らかにした。したがって、Dom34 : Hbs1 複合体は NSD と NGD の両方の品質管理機構に重要な因子である。

我々の細胞内での Dom34 : Hbs1 複合体の機能解析と前後して、試験管内再構成翻訳反応系を用いて Dom34 : Hbs1 複合体の持つ活性について解析が行われた。まず Shoemaker と Green らは、出芽酵母の再構成系を用いて Dom34 : Hbs1 複合体が伸長反応中のリボソームの A サイトに結合し、サブユニットの解離とペプチジル tRNA の解離を引き起こすことを証明した⁹⁾。続いて Pestova らは、哺乳細胞由来の因子を用いた再構成系を用いて、同様の活性を証明した。さらに ABCE1 が A サイトに結合した Pelota と相互作用し、ATP の加水分解と共役して高効率でサブユニット解離を起こすことを明らかにした¹⁰⁾。これらの試験管内での解析に用いられたペプチジル tRNA のペプチ

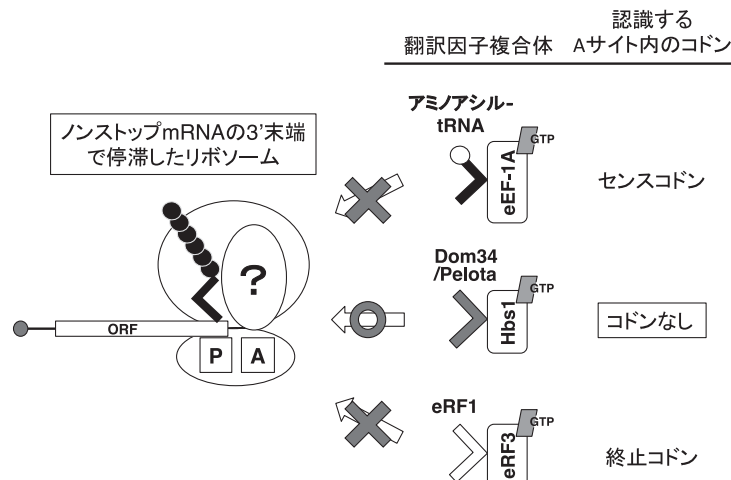


図 1 新規翻訳複合体 Dom34 : Hbs1 による終止コドン非依存のリボソームの解離

下部分は数アミノ酸程度の長さであり、リボソームトンネルを通過するには不十分な長さであるため、ペプチジル tRNA はサブユニットの解離に伴ってリボソームから解離する。一方で生体内では、ノンストップ mRNA の翻訳においても終止コドン非依存にペプチド鎖の解離が起こる。終止コドン依存の翻訳終結反応を担う翻訳終結因子は、進化上完全に保存された GGQ モチーフを持つ。翻訳終結因子はリボソームの A サイトに結合し、終止コドンの正しい認識に依存して GGQ モチーフがペプチド転移反応中心と相互作用し、tRNA からのペプチド鎖の解離を引き起こす。一方で、Dom34/Pelota は、tRNA ならびに翻訳終結因子と構造上は高い類似性を示すが GGQ モチーフを持たない⁸⁾。さらに GGQ モチーフを含むドメインの長さがペプチド転移反応中心に到達するには不十分な長さであり、終止コドン依存の翻訳終結反応を直接行う因子である可能性は低い。原核生物では、終止コドン非依存のペプチド鎖解離反応を担う因子が同定されており^{11~14)}、いずれも GGQ モチーフを持つ因子によってペプチド鎖が tRNA から解離する。終止コドン非依存のペプチド鎖解離反応を担う因子の同定は、mRNA 品質管理機構の分子機構のみでなく、生命現象の最も基本的な遺伝子発現の基盤を理解する上でも重要である。

3. ポリ(A)鎖における翻訳アレストの生理的意義とその分子機構

ノンストップ mRNA の分解機構の解明には、ノンストップ mRNA の翻訳反応の理解が前提である。ノンストップ mRNA の翻訳自体の解析を行った結果、ノンストップ mRNA の翻訳産物量はきわめて低いレベル（正常の 1% 程度）であり、NSD による mRNA 量の低下（正常の 20% 程度）より強い抑制が観察された。この結果は、mRNA 分解のみでなく、タンパク質合成もしくは分解の段階でも発現抑制が起こることを明確に示唆した¹⁵⁾。ポリソーム解析による翻訳効率の検討を行った結果、ノンストップ mRNA の翻訳開始は阻害されておらず、むしろノンストップ mRNA は正常な mRNA よりも多くのリボソームと結合する結果が得られた。この結果は、ノンストップ mRNA を鋳型とした翻訳伸長もしくは終結反応が正常な mRNA に比較して非効率であることを示唆していた¹⁵⁾。

では、ノンストップ mRNA のどのような配列が発現抑制を引き起こすのであろうか？ 正常な mRNA では決して翻訳されないポリ(A)鎖がノンストップ mRNA では翻訳されるため、ポリ(A)配列が翻訳伸長・終結反応を抑制する原因である可能性が考えられた。ポリ(A)配列の発現抑制効果を検証する目的で、ORF 中に挿入したレポーター系を構築し解析を行った。その結果、ポリ(A)配列を含むポリリシン配列をコードする塩基配列を挿入した系

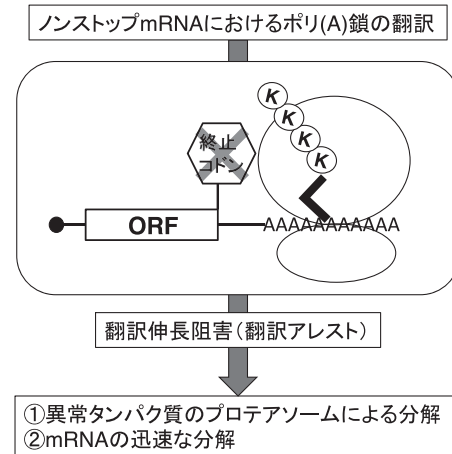


図2 mRNA 品質管理機構におけるポリ(A)鎖の新規機能

は、非常に強い発現抑制効果を示した。さらに、抑制効果を示す連続したアミノ酸配列を検索した結果、ポリアルギニン配列がポリリシン配列同様に抑制効果を示した¹⁶⁾。新生ポリペプチド鎖が通過するリボソームトンネルは rRNA に由来する負の電荷を持っており、正電荷を持つポリリシン配列との相互作用によって翻訳伸長反応阻害が起こることが示唆された (図 2)。

4. 翻訳アレストに共役した新生ポリペプチド鎖の分解機構

我々はポリ(A)配列による発現抑制機構の解析中に、連続した塩基性アミノ酸配列を持つタンパク質がプロテアソームによって迅速に分解されることを見いだした¹⁷⁾ (図 2)。翻訳アレスト配列合成中に停滞したりボソームに含まれる翻訳アレスト産物が、プロテアソーム阻害剤存在下で顕著に安定化することを見いだした。この研究結果が契機となり、停滞したりボソーム上の新生ポリペプチド鎖の分解機構の解析が急速に進んでいる。

この分解に関与する E3 ユビキチンリガーゼとして Not4 と Ltn1 が報告されている。Not4 は新生ポリペプチド鎖結合因子 (NAC) の E3 ユビキチンリガーゼとして報告されていた。我々は、連続した塩基性アミノ酸配列による翻訳アレストに共役した新生ポリペプチド鎖の分解に、Not4 が関与することを明らかにした¹⁷⁾。驚くべきことに、この Not4 による分解効率は、翻訳アレストが起こる mRNA 上の位置によって異なっている。not4 欠損変異株において翻訳アレスト産物の発現量を検証した結果、mRNA の中央付近に翻訳アレスト配列を挿入した場合は顕著な安定化が観察されたが、終止コドン直前やポリ(A)鎖における翻訳アレストに共役した新生ポリペプチド鎖の分解にはほとんど関与していなかった。これは、mRNA 上の位置情報が感知され、Not4 によるユビキチン化と翻訳アレスト産

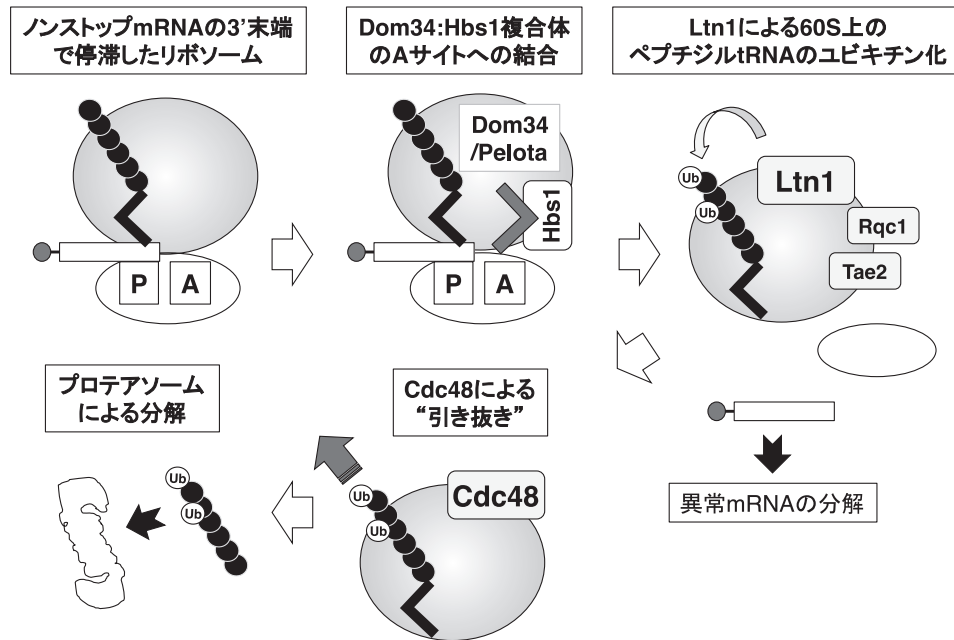


図3 新規リボソーム結合因子によるノンストップタンパク質の分解機構

物の分解が起こることを示唆しているが、その分子機構はいまだほとんど不明である。

Ltn1はvan Hoofらによって、ノンストップ mRNA 由来の遺伝子産物が増加する変異として同定された¹⁸⁾。その後、Joazeiroらによってポリ(A)配列依存の翻訳アレストに共役した新生ポリペプチド鎖の分解に重要な役割を果たすことが明らかになった¹⁹⁾。Ltn1は60Sサブユニットに特異的に結合することから、翻訳アレスト配列合成中に停滞したリボソームが各サブユニットに解離し、ペプチジル tRNAを含む60SサブユニットがLtn1によって認識されユビキチン化された後に、プロテアソームによって分解されるモデルが提唱されている^{20,21)}(図3)。さらに翻訳アレストに共役した新生ポリペプチド鎖分解に関与する因子のスクリーニングがWeissmanらによって行われ、Rqc1とTae2の二つの新規因子が同定された^{20,22)}。これらの因子はLtn1と同様に60Sサブユニットに特異的に結合し、翻訳アレスト産物のユビキチン化に関与している(図3)。

Cdc48は多種多様な機能を持つAAAファミリー分子であり、ATP加水分解と共役してタンパク質複合体から特定の分子を解離させるdisassembly活性を持つ分子である。小胞体関連分解(ERAD)においては、小胞体内の異常タンパク質をサイトゾル側に引き出すことで、プロテアソームによる分解に必須な役割を果たすことが示唆されている。翻訳アレストにおいてもLtn1によるユビキチン化に依存してCdc48が60Sサブユニットに結合し、ATP加水分解と共役してペプチジル tRNAをリボソームトンネルから引き出した後で、翻訳アレスト産物がプロテアソームによる分解を受けるモデルが提唱されている^{20,21)}。

*in vitro*においても翻訳アレストに共役した新生ポリペプチド鎖の分解機構が解析されている。網状赤血球の粗抽出液を用いて、ノンストップ mRNAの末端で停滞したリボソームを基質としてLtn1等の因子の機能解析が行われた²³⁾。その結果、Dom34:Hbs1依存に停滞したリボソームが40Sと60Sサブユニットに解離した後、60Sサブユニットに結合したペプチジル tRNAを、Ltn1が特異的にユビキチン化することが、試験管内反応系で示された。Cdc48の機能については解析されていないが、停滞したリボソームの解離とLtn1による60S上のペプチジル tRNAユビキチン化には必須でないことが示されており、ユビキチン化後の引き出しに関与するモデルと一致した結果となっている(図3)。

5. 新生ポリペプチド鎖の配列に依存した翻訳アレストの分子機構

連続した塩基性アミノ酸配列が強い翻訳伸長反応阻害を引き起こすことから、翻訳阻害に必要な因子を遺伝学的に同定した。その結果、40Sサブユニットに結合するRACK1が翻訳アレストに必要であることが明らかとなった²⁴⁾。RACK1はシグナル伝達系における多様な機能を保持する一方で、翻訳における機能はほとんど不明であった。RACK1の40Sサブユニットとの結合面に変異を導入し解析を行った結果、40SサブユニットへのRACK1の結合が、連続した塩基性アミノ酸配列に依存した翻訳アレストに重要であることが明らかとなった²⁴⁾。新生ポリペプチド鎖と相互作用するのは60Sサブユニットに存在するリボソームトンネルであり、40Sサブユニット結合因子であ

る RACK1 が、どのような機構で 60S サブユニット依存の制御機構に関与しうるかは大変興味深い、その分子基盤はほとんど不明である。我々は、RACK1 と同様のスクリーニングによって翻訳アレストに関与する因子として Hel2 を同定した (池内ら, 未発表)。Hel2 は、過剰なヒストンの分解に関与する E3 ユビキチンリガーゼである。また、我々との共同研究で Weissman らによって行われた同様のスクリーニングによっても、Hel2 が同定された²⁰⁾。Hel2 の RING ドメインが翻訳アレストに必須であることから、Hel2 によってユビキチン化を受ける因子が翻訳伸長反応阻害を引き起こすことが考えられる。最近、Frydman らは、新生ポリペプチド鎖のユビキチン化に関与する可能性のある E3 ユビキチンリガーゼを網羅的に解析し、Hel2 と Ltn1 は互いに独立な経路で翻訳アレスト産物のユビキチン化に関与することを報告している²⁵⁾。Ltn1 は直接 60S 上のペプチジル tRNA をユビキチン化することが証明されているが、Hel2 によるユビキチン化の基質は依然として不明である。Hel2 による合成途中の新生ポリペプチド鎖のユビキチン化自体が翻訳伸長反応を制御する可能性も含めて検証が必要である。

6. 翻訳アレストによる mRNA 分子内切断機構

翻訳伸長制御の生理的役割がいくつかの例で明らかになっている。京都産業大学の伊藤維昭博士らの研究グループによって、分泌活性のセンサーとしての SecM における翻訳アレストの生理的機能と、翻訳アレストの分子機構についての詳細な解析が報告されている²⁶⁻³⁰⁾。また、植物のメチオニン合成系における代謝中間体 SAM の濃度センサーとしての機能が、北海道大学の内藤哲博士らの研究グループによって報告されている^{31,32)}。Parker らは mRNA 上の二次構造や特異的なアミノ酸配列によって翻訳伸長反応が阻害される結果 mRNA が分子内で切断されることを報告し、NGD と命名した³⁾。NGD の細胞内基質や生理的意義についてはいまだ不明であるが、S-アデノシルメチオニン (AdoMet) による翻訳アレストは mRNA 切断を伴うため、その分子機構の解明が待たれる。我々は、連続した塩基性アミノ酸配列に依存した翻訳アレストによって NGD (mRNA 分子内切断) が起こるため、翻訳アレストに重要な RACK1 の欠損変異株における NGD を確認した。その結果、*rack1* 欠損変異株ではプロテアソームによる分解は観察されなかったが、NGD は依然として観察された²⁴⁾。一方、Hel2 変異株ではプロテアソームによる翻訳アレスト産物の分解と NGD のいずれもまったく観察されなかった。したがって、Hel2 によるユビキチン化は、①mRNA 分子内切断、②プロテアソームによる翻訳アレスト産物の分解、のいずれにも必須な反応である。Hel2 によるユビキチン化の基質の同定は NGD、NGPD の分子機構の理解

に必須であり、Hel2 によるユビキチン化を受ける未知の基質の同定が最重要課題である。

7. おわりに

ポリ (A) 鎖の発現抑制効果の発見を契機に、翻訳伸長反応や合成途中の新生ポリペプチド鎖や翻訳の鋳型である mRNA が、さまざまな制御を受けることが急速に明らかになってきた。細胞内でリボソームが合成するさまざまなタンパク質が、その合成途中でユビキチン化等の制御を受けうることが広く認識され、mRNA とタンパク質の発現制御に機構におけるリボソームの役割はこれからますます注目されると予想される。リボソームをハブとした発現制御系の分子機構の解明は、品質管理を含めた遺伝子発現全体の根本的な理解のみでなく、さまざまな疾患の原因の理解に貢献することは間違いない。新たなリボソーム研究は始まったばかりである。

文 献

- 1) Kervestin, S. & Jacobson, A. (2012) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 13, 700-712.
- 2) Shoemaker, C.J. & Green, R. (2012) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 19, 594-601.
- 3) Doma, M.K. & Parker, R. (2006) *Nature*, 440, 561-564.
- 4) Inada, T. (2013) *Biochim. Biophys. Acta*, 1829, 634-642.
- 5) Ozsolak, F., Kapranov, P., Foissac, S., Kim, S.W., Fishilevich, E., Monaghan, A.P., John, B., & Milos, P.M. (2010) *Cell*, 143, 1018-1029.
- 6) Barends, S., Kraal, B., & van Wezel, R.G.P. (2011) *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*, 2, 233-246.
- 7) Tsuboi, T., Kuroha, K., Kudo, K., Makino, S., Inoue, E., Kashima, I., & Inada, T. (2012) *Mol. Cell*, 46, 518-529.
- 8) Kobayashi, K., Kikuno, I., Kuroha, K., Saito, K., Ito, K., Ishitani, R., Inada, T., & Nureki, O. (2010) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107, 17575-17579.
- 9) Shoemaker, C.J., Eyler, D.E., & Green, R. (2010) *Science*, 330, 369-372.
- 10) Pisareva, V.P., Skabkin, M.A., Hellen, C.U., Pestova, T.V., & Pisarev, A.V. (2011) *EMBO J.*, 30, 1804-1817.
- 11) Chadani, Y., Ito, K., Kutsukake, K., & Abo, T. (2012) *Mol. Microbiol.*, 86, 37-50.
- 12) Chadani, Y., Matsumoto, E., Aso, H., Wada, T., Kutsukake, K., Sutou, S., & Abo, T. (2011) *Genes Genet. Syst.*, 86, 151-163.
- 13) Chadani, Y., Ono, K., Kutsukake, K., & Abo, T. (2011) *Mol. Microbiol.*, 80, 772-785.
- 14) Chadani, Y., Ono, K., Ozawa, S., Takahashi, Y., Takai, K., Nanamiya, H., Tozawa, Y., Kutsukake, K., & Abo, T. (2010) *Mol. Microbiol.*, 78, 796-808.
- 15) Inada, T. & Aiba, H. (2005) *EMBO J.*, 24, 1584-1595.
- 16) Ito-Harashima, S., Kuroha, K., Tatematsu, T., & Inada, T. (2007) *Genes Dev.*, 21, 519-524.
- 17) Dimitrova, L.N., Kuroha, K., Tatematsu, T., & Inada, T. (2009) *J. Biol. Chem.*, 284, 10343-10352.
- 18) Wilson, M.A., Meaux, S., & van Hoof, A. (2007) *Genetics*, 177, 773-784.
- 19) Bengtson, M.H. & Joazeiro, C.A. (2010) *Nature*, 467, 470-

- 473.
- 20) Brandman, O., Stewart-Ornstein, J., Wong, D., Larson, A., Williams, C.C., Li, G.W., Zhou, S., King, D., Shen, P.S., Weibezahn, J., Dunn, J.G., Rouskin, S., Inada, T., Frost, A., & Weissman, J.S. (2012) *Cell*, **151**, 1042–1054.
- 21) Verma, R., Oania, R.S., Kolawa, N.J., & Deshaies, R.J. (2013) *elife*, **2**, e00308.
- 22) Defenouillere, Q., Yao, Y., Mouaikel, J., Namane, A., Galopier, A., Decourty, L., Doyen, A., Malabat, C., Saveanu, C., Jacquier, A., & Fromont-Racine, M. (2013) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 5046–5051.
- 23) Shao, S., von der Malsburg, K., & Hegde, R.S. (2013) *Mol. Cell*, **50**, 637–648.
- 24) Kuroha, K., Akamatsu, M., Dimitrova, L., Ito, T., Kato, Y., Shirahige, K., & Inada, T. (2010) *EMBO Rep.*, **11**, 956–961.
- 25) Duttler, S., Pechmann, S., & Frydman, J. (2013) *Mol. Cell*, **50**, 379–393.
- 26) Murakami, A., Nakatogawa, H., & Ito, K. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 12330–12335.
- 27) Muto, H., Nakatogawa, H., & Ito, K. (2006) *Mol. Cell*, **22**, 545–552.
- 28) Nakatogawa, H. & Ito, K. (2001) *Mol. Cell*, **7**, 185–192.
- 29) Nakatogawa, H., Murakami, A., & Ito, K. (2004) *Curr. Opin. Microbiol.*, **7**, 145–150.
- 30) Nakatogawa, H., Murakami, A., Mori, H., & Ito, K. (2005) *Genes Dev.*, **19**, 436–444.
- 31) Chiba, Y., Ishikawa, M., Kijima, F., Tyson, R.H., Kim, J., Yamamoto, A., Nambara, E., Leustek, T., Wallsgrove, R.M., & Naito, S. (1999) *Science*, **286**, 1371–1374.
- 32) Onouchi, H., Nagami, Y., Haraguchi, Y., Nakamoto, M., Nishimura, Y., Sakurai, R., Nagao, N., Kawasaki, D., Kadokura, Y., & Naito, S. (2005) *Genes Dev.*, **19**, 1799–1810.
-