

## MLS계 항생물질 유도내성 유전자의 크로닝과 유전자의 발현조절 기전

*Staphylococcus aureus* TR-1균주의 프라스미드 pMB4에 존재하는  
MLS 내성 유전자 *ermC-4*

김수환 · 최응칠 · 김병각 · 심미자\*

서울대학교 약학대학, \*서울시립대학교

(Received January 23, 1991)

## Cloning of Inducible MLS Antibiotics Resistance Genes and their Expression Control Mechanism

*ermC-4*, a macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance  
determinant on pMB4 from *Staphylococcus aureus* TR-1

Soo-Hwan Kim, Eung-Chil Choi, Byong Kak Kim and Mi-Ja Shim\*

College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742

\*Seoul City University, Seoul 130-743, Korea

**Abstract**—pMB4 is a 2.4-kilobase plasmid of *Staphylococcus aureus* TR-1 that confers inducible resistance to the macrolide-lincosamide-streptogramin B (MLS) antibiotics. By subcloning studies, it was found that the MLS resistance determinant was located at 1.0 Kb fragment between *Sau3AI* and *TaqI* sites. DNA sequence of the MLS resistant determinant, named *ermC-4* was determined, and found to be highly homologous with that of *ermC*. Because the leader peptide sequence of *ermC-4* was identical with that of *ermC*, the expression of the resistance gene is thought to be controlled by posttranscriptional attenuation in *S. aureus* TR-1.

**Keywords** □ *Staphylococcus aureus*, MLS antibiotics, resistance, *ermC-4*, cloning.

마크로라이드-린코사마이드-스트렙토그라민 B (MLS)계 항생물질에 대한 내성은 23S rRNA의 특정 adenine 잔기를 N-monomethylation 또는 N,N-dimethylation 시킴으로써 ribosome의 생화학적 변화에 의하여 획득된다.<sup>1-4)</sup> MLS계 항생물질에 대한 내성은 자연에서 분리되는 균주에서 두 가지 형태가 모두 발견되는데 즉, 항상 내성이 발현되는 지속성 내성과 소량의 erythromycin(EM)이나 oleandomycin(OM)의 접촉에 의해 내성이 유도되는 유도내성이다. 지금까지 여러 MLS 내성 유전자에 대한 연구가 활발히 진행되고 있고 그들 내성 유전자의 DNA 염기배열이

결정되었다. 이 유전자들의 산물은 특정 adenine을 methyl화 시키기 위한 rRNA methyltransferase인 것으로 알려져 있으며, 내성균들은 이러한 methylase를 만드는 유전자를 갖고 있다.

항생물질이 어떠한 기전에 의하여 내성을 유도하는가 즉, 내성 관련 유전자를 어떻게 조절하는가에 대한 기전 연구가 중요시 되었으며, 이러한 기전은 *Staphylococcus aureus* 균주로부터 분리된 pE194 plasmid의 MLS계 항생물질에 대한 유도 내성 유전자인 *ermC*의 연구에서 밝혀지고 있다.<sup>5-11)</sup> 이 연구에서 밝혀진 유도내성 기전은 posttranscriptional attenua-

tion(또는 translational attenuation) 기전으로 설명되고 있다.<sup>12-16)</sup>

MLS계 항생물질의 유도내성 기전 즉, 유전자 발현 조절기전을 보다 명백히 밝히기 위해서 최근에는 *ermC*를 모델로 하여 제시된 translational attenuation 기전을 보다 깊게 연구하고, 여러 속의 균주로부터 내성 관련 유전자를 크로닝하고 DNA 염기배열을 결정하여 유추되는 mRNA의 2차 구조를 해석하여 지금까지 밝혀진 MLS 내성 유전자의 발현기전과 비교 검토하여 MLS 내성 유전자의 발현 조절기전을 보다 상세히 설명할 수 있다.

저자 등은 우리나라 토양시료에서 다수의 세균을 분리하고, 그 중에서 EM 등의 MLS계 항생물질에 의해서 다른 MLS계 항생물질에 대한 유도내성을 갖는 균주들을 분리하였으며, 이 분리된 균주 중에서 세균의 형태, 디스크법에 의한 내성 패턴을 검토하여 선발된 균주를 대상으로 각각 균주를 동정하고 유도내성의 특성을 조사하였다. 선발된 균주 중의 하나로 EM과의 접촉에 의해 다른 MLS계 항생물질에 대해 유도내성을 갖는 *Staphylococcus aureus* TR-1균주로부터 플라스미드를 분리하여 이 플라스미드상에 MLS 내성 유전자가 존재함을 확인하였고, pMB4라 명명하였으며, 플라스미드의 크기 및 제한 효소지도를 작성하였다.<sup>17)</sup>

본 연구에서는 *Staphylococcus aureus* TR-1균주에서 내성을 나타내는 methylase 유전자를 vector pBS42를 이용하여 subcloning하였으며, 이 유전자를 *ermC-4*라 명명하였다. 이어 *ermC-4*의 구조 유전자와 leader 부분에 해당하는 부분의 DNA 염기배열을 결정하였다. leader 부분의 DNA 염기배열을 *ermC*, *ermC'*과 비교 분석하였고, 컴퓨터 분석에 의해 mRNA leader 부분의 2차 구조를 분석하여 *S. aureus* TR-1균주에서의 내성 조절기구를 추정하였다.

### 실험방법

**균주 및 플라스미드**—*Staphylococcus aureus* TR-1,<sup>17)</sup> *E. coli* CSH26(*lac-*, CAM<sup>r</sup>),<sup>18)</sup> *Bacillus subtilis* BD170(EM<sup>r</sup>, CAM<sup>r</sup>),<sup>19)</sup> *E. coli* K12 JM109,<sup>20)</sup> pBS42(CAM<sup>r</sup>, EM<sup>r</sup>),<sup>21)</sup> R408 helper phage<sup>22)</sup>(Promega), pGEM3Zf(+), (-) phagemid<sup>23)</sup>(DNA 염기배열 결정용 vector, Promega).

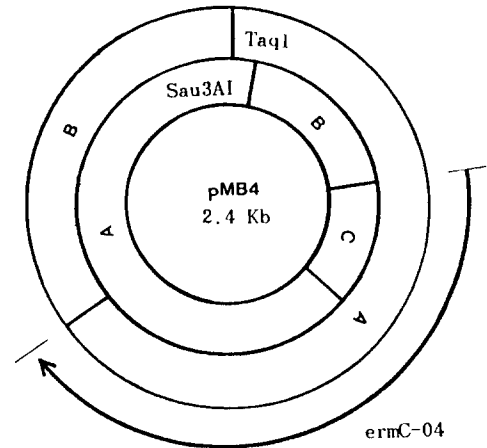


Fig. 1—Restriction endonuclease map of pMB4 plasmid.

The resistance determinant is located on the 1.0 Kb fragment between *Sau3AI* and *TaqI* fragment sites.

**항생물질 및 효소**—erythromycin(EM), chloramphenicol(CAM), tylosin, ampicillin 등의 항생물질은 Sigma사의 제품을 구입하였다.

제한효소인 *AccI*, *TaqI*, *MboI*, *BclI*, *MspI*은 New England Biolabs.의 것을 사용하였고, *BamHI*, *Sau3AI*은 Promega사의 것을, *EcoRI*, *HincII*, *PvuII*, *HindIII* 등은 Boehringer Mannheim사의 제품을 사용하였다. T4 DNA ligase는 KOSCO사의 것을 사용하였고, calf intestine phosphatase(CIP), Klenow fragment는 Promega사로부터, lysozyme, RNase는 Sigma사의 제품을 사용하였다.

**pMB4로부터의 MLS 내성 유전자의 Subcloning**—pMB4의 어느 부분에 목적하는 내성 유전자가 존재하는지 확인하기 위해 subcloning을 실시하였다.

#### 1) DNA 절편의 제조

Fig. 1에 표시된 *TaqI* 절편(1.6 Kb)을 electroelution에 의하여 분리하였다. 또한 *Sau3AI*으로 partial digestion한 후, chloroform으로 추출하여 DNA 절편 혼합물을 얻었다.

#### 2) Ligation 및 형질전환

1  $\mu$ g의 *TaqI* 절편(1.6 Kb)을 1  $\mu$ g의 pBS42 vector에 삽입시켜 얻은 ligated pBS42를 Gryczan 등<sup>24)</sup>의 방법으로 *B. subtilis* BD170에 직접 형질전환시켰다.

또한 1  $\mu$ g의 *Sau3AI* 절편 혼합물을 1  $\mu$ g의 pBS42

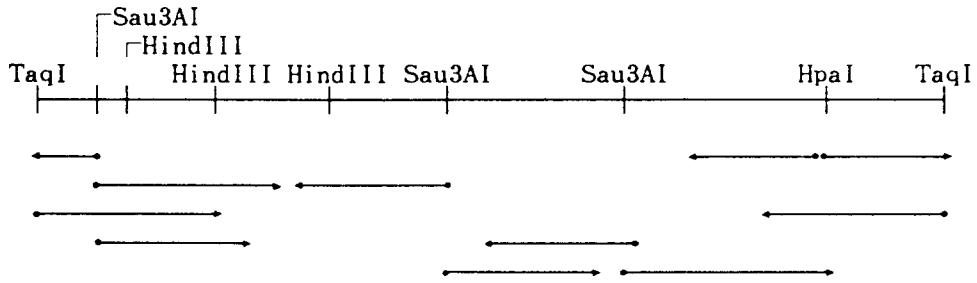


Fig. 2—DNA sequencing strategy of the 1.6 Kb fragment between *TaqI* and *TaqI* sites of pMB4 plasmid.



Fig. 3—Electrophoresis pattern of recombinant plasmids from *B. subtilis* BD170 transformants digested with *Sau3AI*.

lane A : lambda DNA (*HindIII*-cutted), lane B : Digestion of pBS42 vector with *Sau3AI*, lane C, D, E, G, H : pBS42+pMB4 2.4 Kb insert, lane F : pBS42+pMB4 1.8 Kb insert, lane I : Digestion of pMB4 plasmid with *Sau3AI*

vector에 삽입시켜 얻은 ligated pBS42를 ice-cold  $CaCl_2$ 를 이용한 Mandel 등<sup>25)</sup>의 방법을 적용하여 *E. coli* CSH26에 형질전환시킨 후, *E. coli* library에서 분리한 플라스미드를 *B. subtilis* BD170에 앞의 방법으로 재형질전환시켰다.

### 3) 재조합 DNA의 제한효소절단

*B. subtilis* BD170에 재형질전환시켜 얻은 6개의 transformants로부터 각각 분리한 플라스미드 1  $\mu$ g을 *Sau3AI*으로 절단하여 pMB4 플라스미드의 어느 부분이 삽입되어 EM 내성이 나타나는가를 확인하였다

(Fig. 3).

**MLS계 항생물질 내성 유전자의 DNA 염기배열 결정**—Fig. 2에 표시된 전략대로 Sanger의 dideoxy nucleotide chain termination 방법을 적용하여 DNA 염기배열을 결정하였으며,<sup>26)</sup> Promega사의 pGEM-Zf phagemid를 이용한 Klenow sequencing system을 사용하였다.<sup>23)</sup>

### 실험결과

**MLS 내성 유전자의 Subcloning**—pMB4를 *Sau3AI*으로 partial digestion시킨 후 pBS42에 ligation하여 *E. coli* CSH26에 1차, *B. subtilis* BD170에 2차 형질전환시켰다. *B. subtilis* transformants 중 6개의 colony를 선발하여 nine disk pattern을 관찰해본 결과, 6개의 transformants 모두 *S. aureus* TR-1과 동일한 유도내성 패턴을 나타내었다. 이들 균주로부터 SDS-NaCl법으로 플라스미드를 분리하여 *Sau3AI*으로 절단하였을 때, Fig. 3에서 보는 바와 같이 pBS42 vector에서 유래되는 밴드 외에 pMB4에서 유래되는 1.4 Kb, 0.4 Kb의 두 밴드(lane F) 또는 1.4 Kb, 0.6 Kb, 0.4 Kb의 세 band(lane C, D, E, G, H)가 관찰되었다. 따라서 내성 관련 유전자는 1.4 Kb와 0.4 Kb가 연결된 1.8 Kb 절편에 존재하는 것으로 해석되었다. 또한 pMB4의 큰 *TaqI*절편(1.6 Kb)를 pBS42 vector와 ligation하여 직접 *B. subtilis* BD170에 형질전환시켜 transformants를 얻었다. 이것의 nine disk pattern을 관찰했을 때, *S. aureus* TR-1과 동일한 pattern을 나타내었다. 이로써 *S. aureus* TR-1의 MLS 유도 내성 유전자는 pMB4의 *Sau3AI* 1.8 Kb 절편과 *TaqI* 1.6 Kb 절편이 중복되는 *Sau3AI*=*TaqI* 1.0 Kb에 존재하고 있음을 알 수 있었다. 이 분리된 유전자를 *ermC-4*라

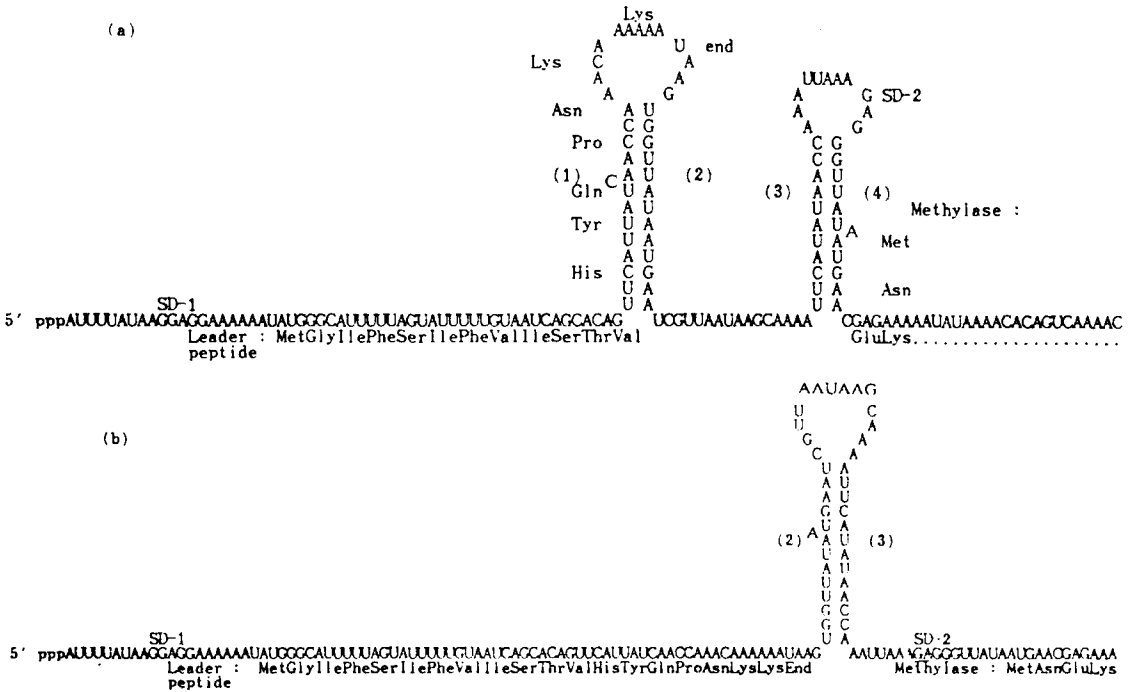


Fig. 4—The *ermC-4* DNA sequence and deduced amino acid sequence. The *ermC-4* promoter(-35 and -10), restriction endonuclease recognition site, SD-1 and SD-2 are all underlined. ▼ : Sites of point mutation

명명하였다(Fig. 1).

*ermC-4*의 염기배열 결정—*ermC-4*의 DNA 염기배열을 Fig. 2에 표시된 전략에 따라 Sanger의 dideoxy-

nucleotide chain termination 방법에 의해 결정하였다. 이와 같이 방법에 의해 밝혀진 염기배열 순서를 IBM PC DNA SEQUENCE ANALYSIS PACKAGE



**Fig. 5**—a) Inactive conformation in which the methylase. Shine-Dalgarno sequence(SD-2) and AUG initiation codon are sequestered in (3)-(4) stem and loop structure.  
 b) Active conformation in which SD-2 and the methylase AUG codon are free of secondary structure interaction.

로 분석하여 총 985 bp에 달하는 *ermC-4* 전체 염기 배열을 결정하였다(Fig. 4). 이 유전자는 141 bp에 해당하는 leader sequence와 729 bp에 해당하는 구조 유전자로 되어 있음을 알 수 있었다.

***ermC-4* leader 부분의 mRNA 2차 구조의 분석**—*ermC*의 유전자 발현 조절기전은 주로 translational attenuation기전에 의해 조절되고 있으며, *ermC* mRNA의 leader 부분이 이 기전에 직접 관련이 있는 것으로 밝혀졌다. *ermC-4*에서도 *ermC*에서와 같이 이러한 translational attenuation기전이 존재하는지를 확인하기 위해, *ermC-4* mRNA leader 부분의 2차 구조를 PCFOLD program(version 3.0)으로 분석하였다. *ermC-4*의 leader 부분의 크기는 141 bp로서 *ermC*의 leader 부분의 크기와 동일하였고, 염기서열에서도 차이가 없었다. 따라서 *ermC-4*는 *ermC*와 유사한 translational attenuation기전에 의해 유전자 발현이 조절되리라는 것을 추측할 수 있었다(Fig. 5).

**고 찰**

MLS계 항생물질에 대한 유도내성 기전을 규명하기 위하여 EM에 유도내성인 *Staphylococcus aureus* 균주로부터 분리한 pE194에 존재하는 methylase 유전자 *ermC*에 대한 유전자 발현 조절기구가 제안되어, 많은 연구가 활발히 진행되고 있다. *ermC* 유전자의 조절 기구는 posttranscriptional attenuation기전으로 설명되고 있다.

유도내성 기전을 보다 자세히 규명하기 위하여, 본 연구에서는 토양으로부터 MLS계 항생물질에 대해 유도내성을 갖는 *Staphylococcus aureus* TR-1균주로부터 MLS 내성 유전자를 가진 약 2.4 Kb의 플라스미드 pMB4를 분리하였으며, 제한 효소지도에 근거하여 제조된 여러 DNA 절편을 얻어 vector pBS42를 이용하여 subcloning을 실시하였다. 그 결과 내성 유전자는 약 1.0 Kb의 *Sau3AI*=*TaqI* 절편에 존재함을

**Table 1**—Differences of DNA base sequences and amino acid codons between *ermC-4*, *ermC* and *ermC'*.

Position			Base(amino acid) Substitution		
<i>ermC-4</i>	<i>ermC</i>	<i>ermC'</i>	<i>ermC-4</i>	<i>ermC</i>	<i>ermC'</i>
943	2613	1804	C(Gly)	C(Gly)	G(Gly)
965	2591	1826	C(Gln)	A(Lys)	C(Gln)
1113	2443	1974	T(Phe)	A(Tyr)	T(Phe)
1141	2415	2002	A(Tyr)	G(Thr)	G(Thr)
1178	2378	2039	G(Asp)	A(Asn)	G(Asp)
1250	2306	2111	T(Phe)	C(Leu)	T(Phe)
1320	2236	2181	A(Lys)	A(Lys)	G(Arg)
1347	2209	2208	A(Asn)	G(Ser)	A(Asn)
1384	2172	2245	G(Gln)	A(Gln)	G(Gln)

알 수 있었고, 이 유전자를 *ermC-4*라 명명하였다.

*ermC-4*가 포함되어 있는 약 1.6 Kb의 *TaqI*=*TaqI* 절편을 Fig. 2에 표시된 전략에 의하여 DNA 염기배열을 결정하였다. 그 결과 *ermC-4*는 leader 부분에 해당하는 141 bp와 구조 유전자에 해당하는 729 bp로 구성되어 있었다. *ermC-4*를 이미 *S. aureus*의 프라스미드로부터 DNA 염기배열이 밝혀진 MLS 내성 유전자인 *ermC*,<sup>9)</sup> *ermC'*<sup>27)</sup>의 염기배열과 비교시, *ermC*와는 2개의 DNA 염기와 5개의 아미노산에서 차이를 보였다.

또한 *ermC'*과는 2개의 DNA 염기와 1개의 아미노산이 차이를 보였다(Table 1). 이로써 내성 유전자들이 계통 발생학적으로 서로 밀접한 관련이 있으며, 또 이들 내성 유전자들은 transposon 등에 의하여 서로 다른 속의 세균으로 쉽게 전달되어 진화가 일어난 것으로 추측할 수 있다. *ermC-4*의 유전자 발현 조절기전을 규명하기 위해 이들 유전자의 조절부위인 leader 부분의 mRNA 2차 구조를 분석하였다.

컴퓨터 분석에 의해 *ermC-4* mRNA에서도 *ermC*에서 보여졌던 것과 같은 stem-loop의 2차 구조를 확인하였다. 이상의 실험결과를 통해서 본 실험실에서 분리한 *S. aureus* TR-1 균주의 MLS 내성 유전자인 *ermC-4*는 지금까지 보고된 *ermC* 등의 유전자와 비슷한 기전에 의하여 그 발현이 조절됨을 추정할 수 있었다.

즉, EM이 존재시 EM과 결합한 ribosome이 leader peptide를 translation할 때 stalling하게 되고 따라서

leader의 stem-loop 2차 구조를 변화시켜 궁극적으로 *ermC-4* 구조 유전자의 SD-2와 translation 시작 부위가 노출되게 하여 methylase가 생성되는 posttranscriptional attenuation기전에 의해 조절됨을 추정할 수 있었다.

## 결 론

우리나라 토양재료에서 MLS계 항생물질에 유도내성을 나타내는 균주를 분리하였으며, 이 균주는 *Staphylococcus aureus*로 정정 동정되었다. 이 *Staphylococcus aureus* TR-1은 내성 유전자를 가진 프라스미드(pMB4)를 가지고 있었으며, subcloning 결과, 내성 유전자가 *Sau3AI*=*TaqI*(1.0 Kb) 절편에 존재함이 밝혀졌으며, 이 내성 유전자 *ermC-4*의 염기서열이 결정되었다. *ermC-4*에는 141 bp의 leader region과 729 bp의 구조 유전자로 구성되어 있다. 또한 이 유전자의 2차 구조분석을 통하여, 그 발현이 posttranscription attenuation에 의해 조절됨을 알 수 있었다.

## 감사의 말씀

이 연구는 1989년도 교육부 학술 연구조성비(유전공학) 및 서울대학교 약학대학의 약학연구재단의 연구비에 의하여 이루어진 것이며, 이에 해당기관에 깊이 감사드립니다.

## 문 헌

- 1) Lai, C.J. and Weisblum, B.: Altered methylation of ribosomal RNA in an erythromycin-resistance strain of *Staphylococcus aureus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **68**, 856(1971).
- 2) Lai, C.J., Weisblum, B., Fahnestock, S.R. and Nomura, M.: Alteration of 23S ribosomal RNA and erythromycin-induced resistance to lincomycin and spiramycin in *Staphylococcus aureus*. *J. Mol. Biol.* **74**, 67(1973).
- 3) Horinouchi, S. and Weisblum, B.: Posttranscriptional modification of mRNA conformation. Mechanism that regulates erythromycin-induced resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **77**, 7079(19

- 80).
- 4) Gryczan, T.J., Grandi, G., Hahn, J., Grandi, R. and Dubnau, D. : Conformational alteration of mRNA structure and the posttranscriptional regulation of erythromycin-induced resistance. *Nucleic Acid Res.* **8**, 6081(1981).
  - 5) Weisblum B., Siddhikol, C., Lai, C.J. and Demohn, V. : Erythromycin-inducible resistance in *Staphylococcus aureus*. Requirement for induction. *J. Bacteriol.* **106**, 835(1971).
  - 6) Shivakumar, A.G., Hahn, J., Grandi, G., Kozlov, Y. and Dubnau, D. : Posttranscriptional regulation of an erythromycin resistance protein specified by plasmid pE194. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **77**, 3903(1980).
  - 7) Horinouchi, S. and Weisblum, B. : Nucleotide sequence and functional map of pE194, a plasmid that specifies inducible resistance to macrolide, lincosamide and streptogramin type B antibiotics. *J. Bacteriol.* **150**, 804(1982).
  - 8) Narayanan, C.S. and Dubnau, D. : Demonstration of erythromycin-dependent stalling of ribosomes on the *ermC* leader transcript. *J. Bacteriol.* **262**, 1766(1987).
  - 9) Denoya, C.D. and Dubnau, D. : Site and substrate specificity of the *ermC* 23S rRNA methyltransferase. *J. Bacteriol.* **169**, 3857(1987).
  - 10) Mayford, M. and Weisblum, B. : *ermC* leader peptide : Amino acid sequence critical for induction by translational attenuation. *J. Mol. Biol.* **206**, 69 (1989).
  - 11) Mayford, M. and Weisblum, B. : The *ermC* leader peptide : Amino acid alterations leading to differential efficiency of induction by macrolide-lincosamide-streptogramin B antibiotics. *J. Bacteriol.* **172**, 3772(1990).
  - 12) Gryczan, T.J., Grandi, G., Hahn, J., Grandi, R. and Dubnau, D. : Conformational alteration of mRNA structure and the postranscriptional regulation of erythromycin-induced drug resistance. *Nucleic Acids Res.* **8**, 6082(1980).
  - 13) Hahn, J., Grandi, G., Gryczan, T.J. and Dubnau, D. : Translational attenuation of *ermC* : a deletion analysis. *Mol. Gen. Genet.* **186**, 204(1982).
  - 14) Dubnau, D. : Translational attenuation. the regulation of bacterial resistance to the macrolide-lincosamide-streptogramin B antibiotics. *Crit. Rev. Biochem.* **16**, 103(1984).
  - 15) Narayanan, C.S. and Dubnau, D. : Evidence for the translational attenuation model : ribosome-binding studies and structural analysis with an in vitro run-off transcript of *ermC*. *Nucleic Acids Res.* **13**, 7307(1985).
  - 16) Narayanan, C.S. and Dubnau, D. : An in vitro study of the translational attenuation model of *ermC* regulation. *Nucleic Acids Res.* **262**, 1756(1987).
  - 17) Jung, S.H., Kwak, J.H., Kim, S.H., Choi, E.C. and Kim, B.K. : Cloning of the MLS antibiotics inducible resistance gene and its control mechanism : Inducible resistance to MLS antibiotics of pMB4 plasmid isolated from *Staphylococcus aureus* TR-1. *Yakhak Hoeji* **34**, 139(1990).
  - 18) Miller, J.H. : *Experiments in molecular genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor U.S.A. (1972).
  - 19) Dubnau, D. and Cirigliano, C. : Genetic characterization of recombination-deficient mutants of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **117**, 488(1974).
  - 20) Yanish-Perron, C., Vieira, J. and Messing, J. : Improved M13 phage cloning vectors and host strains. Nucleotide sequences of the M13 mp18 and 19 vectors. *Gene.* **33**, 103(1985).
  - 21) Band, L. and Henner, D.J. : *Bacillus subtilis* requires a stringent Shine-Dalgarno region for gene expression. *DNA* **3**, 7(1984).
  - 22) Selzer, G., Som, T., Itoh, T. and Tomizawa, J. : The origin of replication of plasmid p15A and comparative studies on the nucleotide sequences around the origin of related plasmids. *Cell* **32**, 119(1983).
  - 23) Mead, D.A. and Kemper, B. : *Vectors, A survey of molecular cloning vectors and their uses*(R.L. Rodriguez and D.T. Denhardt, eds.), Butterworth Publishing Co., Stonham, MA. (1987).
  - 24) Gryczan, T.J., Contente, S. and Dubnau, D. : Characterization of *Staphylococcus aureus* plasmids introduced by transformation into *Bacillus subtilis*.

- J. Bacteriol.* **134**, 318(1978).
- 25) Mandel, M. and Higa, A. : Calcium dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.* **53**, 154 (1970).
- 26) Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. : DNA sequencing with chain termination inhibitors. *Pro. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **74**, 5463(1977).
- 27) Steven, J., Monod, P.M., Narayanan, C.S. and Dubnau, D. Replication properties of pIm13, a naturally occurring plasmid found in *Bacillus subtilis*, and of its close relative pE5, a plasmid native to *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **169**, 5131(1987).