

ペプチド系抗生物質 Enramycin の作用機序に関する研究

(I) 電子顕微鏡的研究

松本建介・三和秀明・安達真知子・中沢昭三

京都薬科大学微生物学教室

(昭和 47 年 12 月 28 日受付)

要 約

黄色ブドウ球菌, ジフテリア菌に対する Enramycin (ERM) の試験管内抗菌作用像を電子顕微鏡により検討した。その結果, ERM を黄色ブドウ球菌に作用させるとすみやかに細胞質膜のシワの形成, 内側への嵌入, メソソームの多発という膜の形態変化が現われ, 次いで細胞質膜の透過性に支障をきたした結果起こるらしい細胞内容物の流出現象が観察され, これは溶菌へとすみやかに進む。そしてこの溶菌作用は試験管内発育阻止濃度 MIC 以下の ERM 低濃度で短時間に起こるのが特徴である。なお, この場合ブドウ球菌は隔壁の肥厚, プロトプラストの形成は認められなかった。いつぼう, ジフテリア菌に対する ERM の抗菌像についても膜のシワの形成, 内側への嵌入という細胞質膜の形態変化に続きすみやかに溶菌作用が見られたことはブドウ球菌の場合と同様であった。なおこの場合, ジフテリア菌の長大化は見られなかった。

緒 論

ERM は *Streptomyces fungicidicus* から単離された抗生物質¹⁾で, 分子量 2,600 の塩基性環状ペプチド²⁾であり, またデブシペプチドでもある。ERM の細菌学的研究によれば, グラム陽性菌群に対して有効であり, 殺菌的な抗菌作用を示すが, グラム陰性菌群に対しては全く無効である³⁻⁵⁾。

ERM の作用機序に関する生化学的研究については土屋, 竹内^{6,7)}らは UDP-N-acetyl muramyl pentapeptide の菌体内蓄積および ¹⁴C-Glutamic acid の cell wall 分画への取り込み阻害により, また松橋⁸⁾らはラベルした UDP-N-acetyl muramyl pentapeptide と N-acetyl glucosamine を基質とした cell free 系の生合成実験で cell wall peptide glycan の形成阻害によりそれぞれ ERM の細胞壁合成阻害を報告している。

今回, 私どもは ERM の黄色ブドウ球菌, ジフテリア菌に対する作用機序を電子顕微鏡観察により検討した結果, ERM の抗菌像は Penicillin, Cephalosporin 系抗生物質などの細胞壁合成阻害抗生物質で観察される抗菌像とは著しく異なり, むしろ Polymyxin B, Colistin な

どの細胞質膜障害の強い抗生物質による抗菌像と極めて類似していることを認めた。

材料および方法

Staphylococcus aureus FDA 209 P JC および *Corynebacterium diphtheriae* をこの実験で用いた。試料作製は Series I, Series II の2通りの方法で行なった。すなわち, Fig. 7 と Fig. 8 のみ Series II の寒天平板培地で行ない, それ以外は全て Series I による液体培地を用いて行なった。

Series I: Heart infusion broth (Nissan) の入った2個のフラスコに 18 時間 Tryptosoya broth (TSB Nissan) で前培養した菌液を1% 各々に加える。37°C で4時間培養後薬剤の最終濃度が 0.5 mcg/ml になるように Enramycin (Takeda, Osaka) を, いつぼうの培地にだけ加える。他方の培地には何も加えず Control とする。薬剤添加から 0.5, 1.5, 3.0 時間後に試料を採取する。0.1% OsO₄ で前固定した菌液を遠心 (1,800 G) により集菌し, 少量の 1.5% warm agar と混合した後固まらせ小さいブロックに切る。

Series II: 18 時間 TSB で前培養した菌液を2% の割合に 50°C に加温した Heart infusion agar (Nissan) と混合した後平板とする。平板上に立てた Cup に 0.5 mcg/ml の ERM を入れる。24 時間培養すると阻止円ができるので, その阻止円の境界付近を切りとりブロックを作る。

Series I および Series II で作ったブロック試料を1% OsO₄ 緩衝液で 18 時間固定する (KELLEUBERGER 法⁹⁾)。0.5% Uranyl acetate で2時間染色後 Ethanol series で脱水する。LUFT 法¹⁰⁾に従がい, Epoxy 樹脂で包埋後 LKB 社ウルトロームで超薄切片を作製する。切片染色は Uranyl acetate と Lead citrate で行ない, 観察は明石 S-500 大型電子顕微鏡を用いた。

結果および考察

Fig. 1 は正常な黄色ブドウ球菌 209 P JC の超薄切片標本による電子顕微鏡写真である。分裂を終えたばかりの細胞とこれから分裂を始めようとする細胞が見られる。各々の細胞について細胞壁, 細胞質膜, 核, メソソ

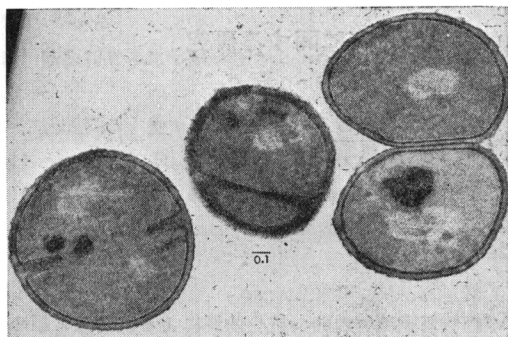


Fig. 1. Electronmicrograph of ultrathin section of normal cells of *Staphylococcus aureus* 209 P JC (control).

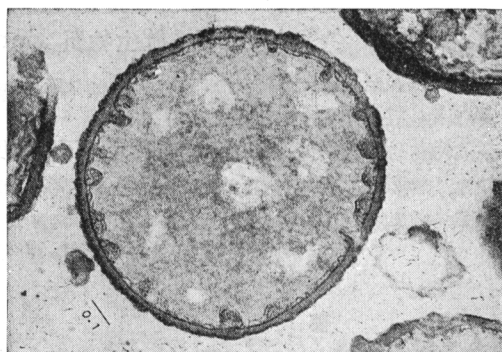


Fig. 2. Section of *Staphylococcus aureus* 209 P JC exposed to enramycin. The cell membrane is somewhat thicker than the control, the folds are formed, and the cell membrane is about to be indented into the cell.

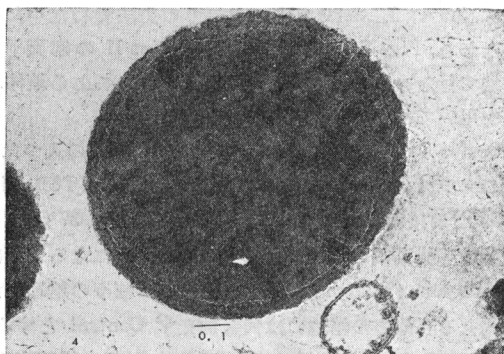


Fig. 3. Section of a cell exposed to enramycin. The membrane has been further indented to form a long, bag-shaped structure.

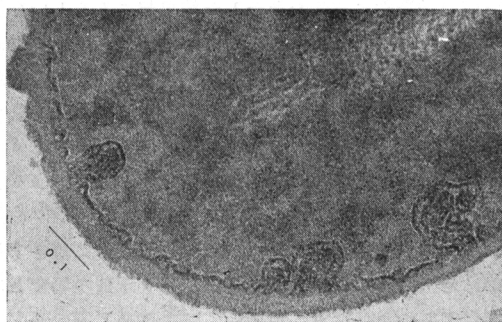


Fig. 4. This electronmicrograph is the enlargement of parts around the membrane which is in a state similar to that shown in Figs. 2 and 3.

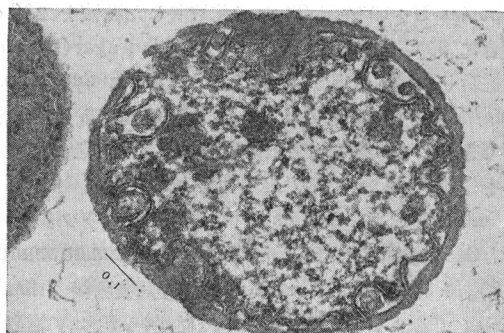


Fig. 5. Electronmicrograph of a cell which further reacted with ERM.

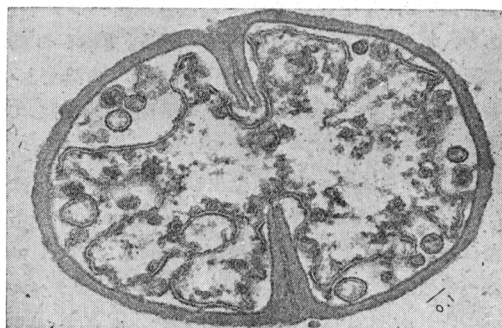


Fig. 6. Electronmicrograph of a cell which further reacted with ERM.

ームが明瞭に観察される。全ての電子顕微鏡写真のスケールは 0.1μ を示している。

Fig. 2～Fig. 6. は ERM 0.5 mcg/ml を作用させた黄色ブドウ球菌 209 P JC の抗菌像である。なお、ERM のこの菌に対する MIC は $0.78\sim 1.56\text{ mcg/ml}$ であり、それ故この実験で用いた 0.5 mcg/ml という濃度は第 1

次作用点を調べるのに適用で、かつ十分に低い濃度でもある。Fig. 2 では細胞質膜は control にくらべて、いくぶん厚く、シワが寄り内側へ入り込もうとしている。Fig. 3 では膜の入り込みは、さらに進んで袋状の細長い構造物になっている。Fig. 4 の写真は Fig. 2 および Fig. 3 と同程度の状態のものの膜付近の拡大である。

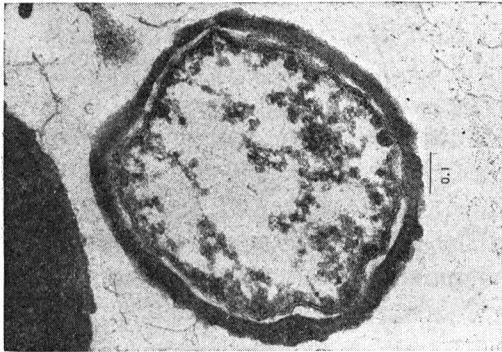


Fig. 7. Electronmicrograph of a cell of the test organism which reacted with ERM.

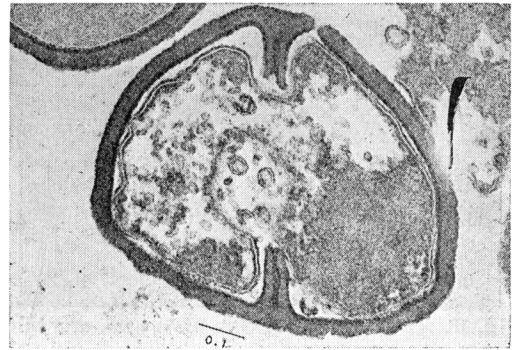


Fig. 8. Electronmicrograph of a cell which reacted with gramicidin (GR), an antibiotic of the peptide group which is active against Gram-positive bacteria like ERM.

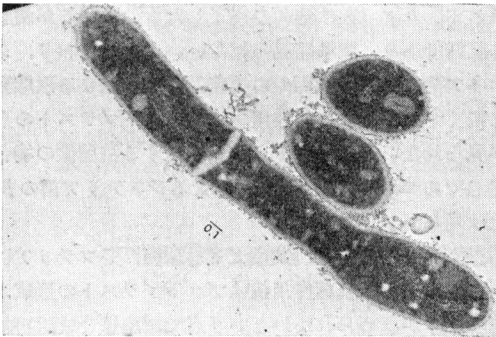


Fig. 9. Electronmicrograph of ultrathin section of normal cells of *Corynebacterium diphtheriae*.

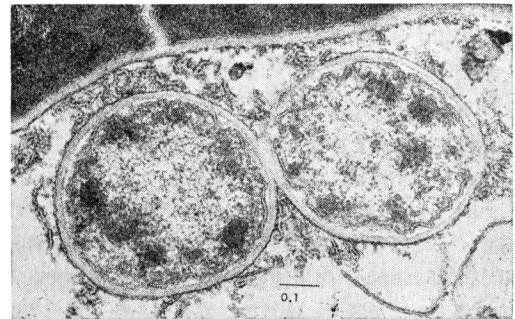


Fig. 10. Section of the cells cut vertically in the direction of the major axis in which occurs the separation of the cell wall and the cell membrane.

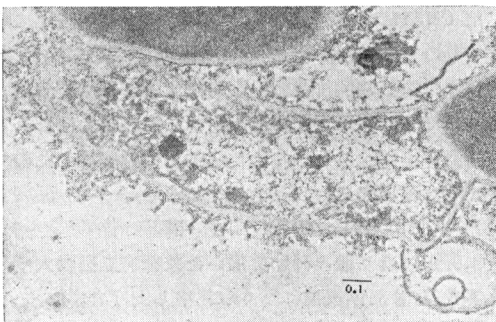


Fig. 11. Section of a cell cut in the direction of the major axis.

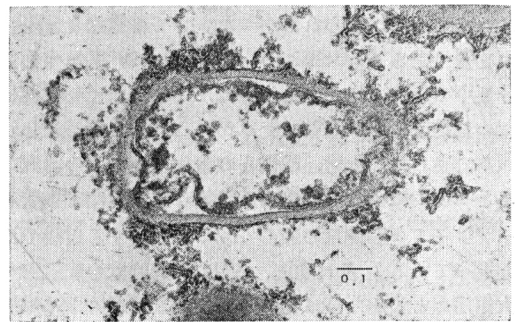


Fig. 12. Electronmicrograph of section of a cell in which bacteriolysis has been completed.

Fig. 4 から判断すると、このタイプの袋状になつた嵌入は膜の形態変化してできたものであり、メソソームであることが判る。このように ERM 作用によりこのタイプのメソソームが多数現われるという特徴がある。しかしながら、メソソームの発生、機能についての明確なことが判っていない現在、ERM などの薬物との接触でなぜメ

ソソームが多発するかという機構については判っていない。管沼ら¹¹⁾は次のように報告している。すなわち、正常なブドウ球菌においても培養初期にはこのタイプの膜の袋状の嵌入が数多く見られる。そしてこの嵌入を *carelae intracellure* と名づけている。土屋ら¹²⁾は抗生物質を次のように分類している。i) 殺菌作用のみを示すもの、

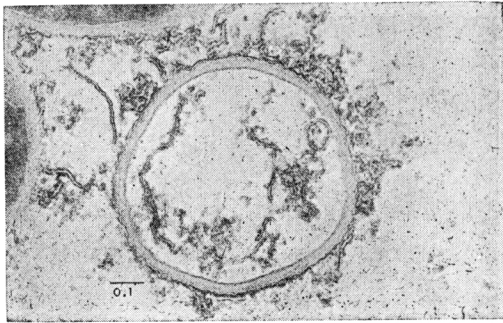


Fig. 13. Electronmicrograph of section of a cell in which bacteriolysis has been completed.

ii) 殺菌作用を示す濃度と同程度の濃度で溶菌作用を示すもの、iii) さらに高濃度でなければ溶菌作用を示さないもの。今回の電子顕微鏡観察の結果では、ERM はきわめて低濃度でしかも短時間ですみやかな溶菌を起こすことが判った。これは ERM が ii) の殺菌作用を示す濃度と同程度の濃度で溶菌作用を示す抗生物質に属するという土屋らの報告と一致している。Fig. 5, Fig. 6 は ERM の作用がさらに進んだ場合の抗菌像である。これらの Figure から細胞内容物漏出の結果起った細胞内の希薄化、すなわち溶菌現象が観察される。この溶菌作用は ERM 0.5 mcg/ml 作用後 30 分でも起っていた。そして希薄化した細胞内には単位膜構造からなる球形物がみられる。これは細胞内の内圧低下のため膨化した異常なメソソームらしい。また、これらの両 Figure は細胞分裂中の細胞に ERM が作用したものである。細胞内の希薄化からも判るように溶菌が起っているが細胞壁、隔壁は正常で肥厚は見られなかつた。さて細胞壁合成阻害抗生物質である Penicillin, Cephalosporin 系抗生物質を分裂中の細胞に作用した場合には細胞壁前駆物質蓄積のため細胞壁および隔壁に肥厚が見られることが知られており、さらに、土屋、松橋らの生化学面からの研究によると ERM による細胞壁合成阻害の作用点は細胞壁ムコペプチド生合成系の膜の lipid が関与する以後であると述べている。それゆえ、ERM は細胞壁合成阻害を 1 次作用点とするならば蓄積する細胞壁前駆物質は細胞壁または隔壁に可視性の肥厚像を作るはずである。しかしながら私どもの行なった電子顕微鏡による観察ではこのような肥厚は全く見られなかつた。

Fig. 7, Fig. 8 は Series II の方法に従い寒天平板で培養したもので、前者は ERM を後者は ERM と同様グラム陽性菌に有効なペプチド系抗生物質 Gramicidin (GR) を作用した場合の抗菌像である。両者とも細胞壁は正常であるが細胞内はすでに希薄化しており溶菌が起っている。また後者は分裂中の細胞に GR が作用した

抗菌像であるが、隔壁の肥厚は見られず溶菌が起っている。これは ERM の抗菌像とはほぼ同じである。

Fig. 9. ~ Fig. 13 はジフテリア菌に対して行なった実験である。Fig. 9 は正常なジフテリア菌の超薄切片標本による電子顕微鏡である。正常なジフテリア菌の電子顕微鏡像の特徴としてはメソソーム、ポリホスフェイト顆粒が多数見られたことである。Fig. 10 は長軸方向に垂直に切った切片像であり細胞壁と膜が分離し原形質分離を起こしている。これは膜の透過性に影響を与えた結果と思われる。この写真は細胞内が希薄化していることから判るように、すでに溶菌が進んでいるが細胞壁には変化が見られない。Fig. 11 は長軸方向に切った切片であり、Fig. 10 と同程度の状態のものである。細胞内の希薄化、原形質分離、管状メソソームなどが見られる。Fig. 12, Fig. 13 は溶菌の完了したものであるが細胞壁は正常であり、肥厚は見られない。以上のとおり、ジフテリア菌に対する ERM の抗菌像は膜に始まる形態変化に続くすみやかな溶菌作用およびプロトプラストの形成が見られないことはブドウ球菌に対する抗菌像の場合と同じであつた。また、ERM によるジフテリア菌の長大化は見られなかつた。

以上をまとめると、黄色ブドウ球菌、ジフテリア菌に対する ERM の抗菌作用像はプロトプラストの形成、隔壁の肥厚が認められないという点で細胞壁合成阻害抗生物質 Penicillin, Cephalosporin 系の抗菌像とは大きく異なる。それよりむしろ膜の形態変化に続くすみやかな溶菌過程は細胞質膜障害抗生物質といわれている Polymyxin B, Colistin を用いて大腸菌などについて観察した CHAPMAN^{13,14}、また KOIKE¹⁵ らの抗菌像に類似するものであつた。それゆえ、ERM の第 1 次作用点はその電子顕微鏡の抗菌像から判断すると細胞質膜障害にあるのではないかと推定した。さらに私どもはこれらの抗菌像を裏付けるための生化学的研究を実施したので、第 II 報で報告する。

謝 辞

本研究に当り種々御助言頂いた京都府立医科大学微生物学教室 菅沼停教授に厚くお礼申し上げます。

文 献

- 1) HIGASHIDA, E. ; K. HATANO, M. SHIBATA & A. MIYAKE : Enduracidin, a new antibiotic. I. *Streptomyces fungidicus* No. B 5477, an enduracidin producing organisms. J. Antibiotics 21 : 126~137, 1968
- 2) ASAI, M. ; M. MURAI, N. SHIBATA, H. KAWASHIMA, K. MIZUNO & A. MIYAKE : Enduracidin, a new antibiotic. II. Isolation and characterization. J. Antibiotics 21 : 138~146, 1968
- 3) TSUCHIYA, K. ; M. KONDO, T. OISHI & T.

- YAMAZAKI : Enduracidin, a new antibiotic. III. *In vitro* and *in vivo* antimicrobial activity. J. Antibiotics 21 : 147~153, 1968
- 4) 中沢昭三, 小野尚子, 横田芳武, 金森政人, 中崎睦子 : 新抗生物質 Enduracidin に関する細菌学的研究。Chemotherapy 16(4) : 451~456, 1968
- 5) 中沢昭三, 小野尚子, 瀬田律義, 藤堂保幸, 住広和子, 長瀬和子 : 新抗生物質 Enduracidin に関する細菌学的研究, 第2報。Chemotherapy 16(4) : 457~459, 1968
- 6) TSUCHIYA, K. & Y. TAKEUCHI : Enduracidin, an inhibitor of cell wall synthesis. J. Antibiotics 21 : 426~428, 1968
- 7) 竹内陽子, 土屋皖司 : Enduracidin の作用機序に関する研究, II. *Staph. aureus* の cell wall 合成阻害作用について。日本細菌学雑誌 23(7) : 449~455, 1968
- 8) MATSUHASHI, M. ; I. OHARA & Y. YOSHIYAMA : Inhibition of bacterial cell wall synthesis *in vitro* by enduracidin, a new polypeptide antibiotic. Progress in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy A 2 : 226~229, 1970
- 9) KELLENBERGER, E. ; A. RYTER & J. SECHAUD : Electronmicroscope study of DNA-containing plasmids. II. Vegetative and mature phage DNA as compared with normal bacterial nucleotide in different physiological states. J. Biophys. Biochem. Cytol. 4 : 671~678, 1958
- 10) LUFT, J. H. : Improvements in epoxyresin. Cytol. 9 : 409~414, 1961
- 11) SUGANUMA, A. : J. Infect. Dis. 113 : 179~185, 1963
- 12) 土屋皖司, 竹内陽子 : Enduracidin の作用機序に関する研究, I. 殺菌および溶菌作用について。日本細菌学雑誌 23(6) : 410~417, 1968
- 13) CHAPMAN, G. B. : Cytological aspects of antimicrobial antibiotics. I. Cytological changes associated with the exposure of *Escherichia coli* to colistin sulfate. J. Bacteriol. 84 : 169~179, 1962
- 14) CHAPMAN, G. B. : Cytological aspects of antimicrobial antibiotics. II. Cytological changes associated with the exposure of *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus megaterium* to colistin sulfate. J. Bacteriol. 84 : 180~185, 1962
- 15) KOIKE, M. ; K. IIDA & T. MATSUO : Electronmicroscopic studies on mode of action of polymyxin. J. Bacteriol. 97 : 448~452, 1969

STUDIES OF THE MECHANISM OF ACTION OF ENRAMYCIN, AN ANTIBIOTIC OF THE PEPTIDE GROUP

(I) Electron-microscopic Study

KENSUKE MATSUMOTO, HIDEAKI MIWA, MACHIKO ADACHI
and SHOZO NAKAZAWA

Department of Microbiology, Kyoto College of Pharmacy

Summary

Electronmicroscopic study was carried out to examine the *in vitro* antimicrobial activity of enramycin (ERM) against *Staphylococcus aureus* and *Corynebacterium diphtheriae*. Exposure of *Staphylococcus aureus* to ERM rapidly caused morphological changes in the cell membrane such as fold formation, inward incarceration and formation of many mesosomes followed by transudation of the cellular contents which appeared to result from the impaired permeability of the cell membrane, and this proceeded rapidly to bacteriolysis. The bacteriolytic action is characterized in that it takes place in a very short time at such low concentrations of ERM as are lower than the *in vitro* minimum inhibitory concentration (MIC) of the antibiotic. In this case, neither hypertrophy of the septum nor formation of protoplast has been observed with *Staphylococcus aureus*. On the other hand, the antibacterial pattern of ERM against *Corynebacterium diphtheriae* has been found to be similar to that against *Staphylococcus aureus*. Namely, morphological changes, such as formation of folds in the cell membrane and inward incarceration of the membrane, took place immediately followed by bacteriolysis. No elongation of the cells of *Corynebacterium diphtheriae* has been found.