

ペプタイド系抗生物質 Enramycin の作用機序に関する研究

(II) 細胞質膜阻害に関する研究補遺

松本 建介・三和 秀明・中澤 昭三

京都薬科大学微生物学教室

(昭和 49 年 5 月 18 日受付)

要 約

Enramycin(ERM) は大腸菌スフェロプラスト, *Bacillus megaterium* プロトプラストを容易に溶解する。ERM の作用で ERM 感受性菌がプロトプラストに変形しない点は Penicillin, Cephalosporin 類とは異なる。ERM は UV 260 m μ 吸収物質の強い漏出作用を有する。

緒 論

ERM は *Streptomyces fugicidicus* から分離された¹⁾ 分子量約 2,600 をもつ新しい塩基性環状ペプタイドであり²⁾, またデブシペプタイドでもある。また, ERM はグラム陰性菌には作用せず, グラム陽性菌に対して著しい殺菌作用を有する³⁻⁵⁾。

ERM の作用機序研究に関しては土屋, 竹内^{6,7)}らは UDP-N-acetyl muramyl pentapeptide の菌体内蓄積および ¹⁴C-Glutamic acid の細胞壁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。

著者の前報⁹⁾は ERM の黄色ブドウ球菌, ジフテリア菌に対する電子顕微鏡像を報告した。それによると Gramicidin, Polymyxin B などの抗菌像に類似¹⁰⁻¹²⁾ し, Penicillin, Cephalosporin 類などのそれには類似しなかった¹³⁻¹⁶⁾。

今回の報告はこのものの作用機序を生化学的面から検討をしてとりあげたものである。

材料および方法

使用菌株: 大腸菌 NIH をスフェロプラスト溶解実験で, *Bacillus megaterium* KM をプロトプラスト溶解実験で, 黄色ブドウ球菌 FDA 209-P をプロトプラスト形成の実験で, それぞれ使用した。

使用培地: 全ての実験における増殖用培地および菌体内成分測定実験での振とう培養における培地として TSB(Trypto-soy Broth, Nissan) を用いた。プロトプラスト形成の研究における平板培地には普通寒天培地

(肉エキス 10 g: ペプトン 10 g: 食塩 3 g/1,000 ml, pH 7.0) を用いた。スフェロプラスト, プロトプラスト形成のために増殖させた菌の培養には Medium B (Na₂HPO₄ 4 g; KH₂PO₄ 2 g; (NH₄)₂SO₄ 1.2 g; MgSO₄·7H₂O 0.4 g; Bactopeptone 10 g; Yeast Extract 2 g/1,000 ml, pH 7.0) を使用した。

大腸菌スフェロプラストの調製: 大腸菌 NIH の overnight culture 1 容量を Medium B 100 容量に加え 37 °C, 4 時間振とう培養する。培養液を遠心して得た pellet を 0.6 M sucrose 加 Tris Buffer (0.01 M Tris-hydroxymethyl) amino methane Buffer, pH 8.0) に懸濁する。これに最終濃度 120 μ g/ml の lysozyme と 480 μ g/ml の EDTA を加える。30°C, 25 分放置後懸濁液を遠心し, 沈渣は 500 m μ の optical density で 0.5 から 0.6 になるように osmotic stabilizer (0.01 M MgCl₂ 加 0.9 M sucrose 溶液) 加 Tris Buffer 中にゆっくりと懸濁させる。

Bacillus megaterium プロトプラストの調製:

Bacillus megaterium の overnight culture 1 容量を Medium B 100 容量に加える。37°C, 4.5 時間の培養の後, 培養液を遠心する。Cell pellet は osmotic stabilizer (0.01 M MgCl₂ 加 0.2 M sucrose) 加 0.03 M Tris Buffer で 2 度洗浄後, 反応に適した濁度になるように, 同液で調整する。すなわち, optical density 500 m μ で 0.5 から 0.6 になるように調整する。

プロトプラスト形成の研究: 黄色ブドウ球菌 FDA 209-P の overnight culture を osmotic stabilizer (0.01 M MgCl₂ 加 1.2 M sucrose) 加 Medium B 中で 0.39 および 0.78 μ g/ml の ERM を作用させる。対照として 2.5 および 50 μ g/ml の Penicillin G を作用させた培養液を同様に測定した。薬剤添加して 2 時間培養後, 培養液を 1% peptone 水および osmotic stabilizer 加 1% peptone 水で希釈し, 生菌数は普通寒天培地および osmotic stabilizer 加普通寒天培地で調べた。

漏出した菌体内成分 (UV 260 m μ 吸収物質) の測定: 黄色ブドウ球菌 FDA 209-P の overnight culture を

Medium B に接種し, 18 時間培養後, 培養液を遠心する。沈渣として集めた cell pellet は 0.03 M PBS (Phosphate Buffer Solution, pH 7.0), または 1.2 M sucrose 加 PBS に 1 mg of dry cells/ml になるように懸濁させる。35 ml の細胞懸濁液に 5 ml の薬剤液を加えた反応液を 37°C の水浴中で培養し 30 分おきに 7 ml の細胞懸濁液を採取し, 3,000 rpm の遠心により得た上清について U. V. 260 m μ で吸収を測定した。

菌体内成分 DNA, RNA, Protein の定量: 黄色ブドウ球菌 FDA 209-P の overnight culture を 5% の割合で接種した TSB を 37°C, 3 時間振とう培養し, その培養液 3 ml と薬剤 1 ml を L-字管に入れ, 37°C で 2 時間振とう培養を行なった。細胞成分は PARK, HANCOCK の方法¹⁷⁾に従いがい分画した。すなわち, 3,000 rpm 15 分間の遠心で得た細胞分画を 5% cold TCA (Trichloroacetic acid) で抽出した。残渣は 75% ethanol で抽出後, さらに 5% hot TCA で抽出した。上清は DNA, RNA の定量に用い, DNA は deoxypentose の diphenyl amine 反応, RNA は pentose の orcinol 反応により定量した¹⁸⁾。残渣は 25 ml の 0.04 N NaOH で溶かした後, LOWRY-FOLIN 反応により蛋白の定量を行なった¹⁸⁾。

結果および考察

大腸菌スフェロプラストの溶解¹²⁾: Fig. 1 は正常な大腸菌 NIH の電子顕微鏡像, Fig. 2 はリゾチーム, EDTA の作用でできた大腸菌スフェロプラストの像である。Fig. 3 は大腸菌スフェロプラストに ERM 50 μ g/ml を 30 分間作用させた像である。大腸菌は ERM に感受性がないにもかかわらず, 大腸菌スフェロプラストはかなりの感受性を有し, 短時間で溶菌することが Fig.

3 からわかる。大腸菌スフェロプラストに対する ERM の作用は細胞壁においては多数の突起などという顕著な変化は見られなかったが, 原形質の急激な流出によって起る急速な溶菌は Polymyxin B¹³⁻¹⁵⁾, Gramicidin⁹⁾ の場合の溶菌過程と類似する。Fig. 4 は大腸菌スフェロプラスト懸濁液に ERM を作用させた溶菌曲線である。スフェロプラストの溶菌過程が O. D. 値の減少として示されており, この溶菌は 30 分から 60 分というきわめて短時間で起るものであり, しかも ERM の濃度に比例して起ることが示されている。

B. megaterium プロトプラスト溶解能の測定^{19,20)}: 細菌細胞質膜に対する種々の抗生物質のもつ膜溶解活性を比較するために, Gramicidin, Polymyxin B に対し

Fig. 2 Electron micrograph of cross section of *Escherichia coli*. Tripartite nature of cell wall and plasma membrane may be seen. Densely packed ribosomes can be seen. This cell is early stage in the formation of spheroplast induced by lysozyme and EDTA.

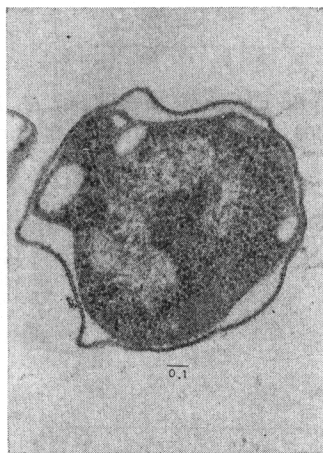


Fig. 3 Electron micrograph of lysed cells of spheroplasts of *Escherichia coli* exposed to enramycin 50 μ g per ml for 30 minutes.

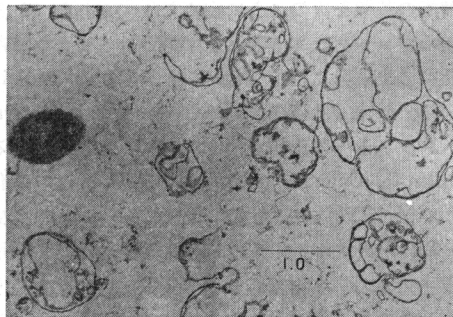


Fig. 1 Electron micrograph of *Escherichia coli* NIH. The magnification bar represents 0.1 μ . Three layers of cell wall were observed clearly. CW: cell wall, PM: plasma membrane, M: mesosome, N: nucleus.

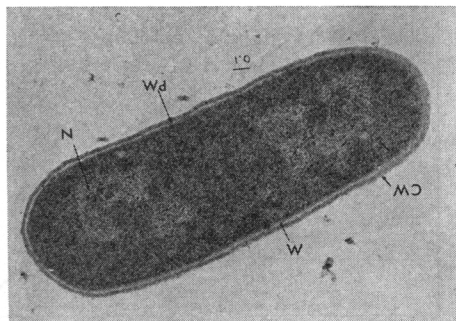
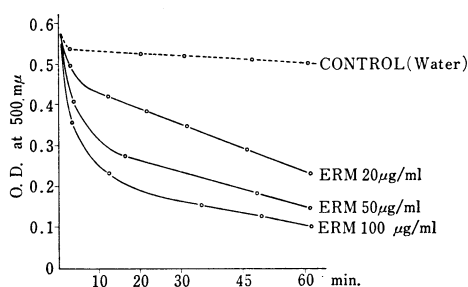
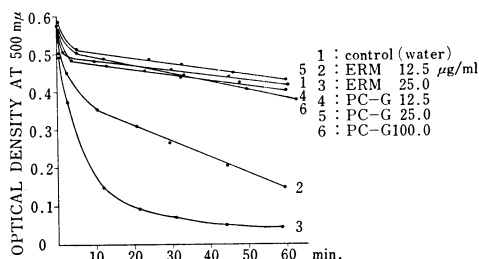
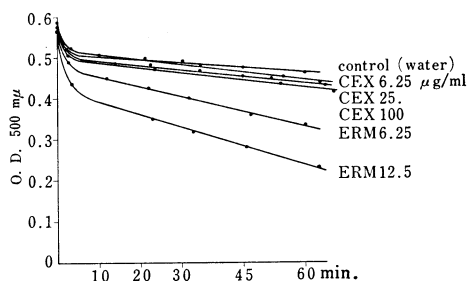


Fig. 4 Lytic curves of spheroplasts of *Escherichia coli* exposed to enramycin.Fig. 5 Lytic curves of protoplasts of *B. megaterium* against penicillin G and enramycin.Fig. 6 Lytic curves of protoplasts of *B. megaterium* against cephalaxin and enramycin.

て感受性をもつ *Bacillus megaterium* をリゾチーム処理によって得たプロトプラストをこの実験で用いた。細菌細胞質膜に対する抗生物質の溶解活性を定量化するため溶解能の基準を次のように定めた。すなわち 30 分間で最初のプロトプラスト菌量を半減させるような薬剤濃度を仮に LD_{50} とした。Fig. 5 は ERM と Penicillin G の Fig. 6 は ERM と Cephalaxin の *B. megaterium* プロトプラストへの影響を示した溶菌曲線である。Penicillin G, Cephalaxin の作用では O.D. 値に変化を与えないが、ERM の作用では急激な O.D. 値の減少を示し、ERM がプロトプラスト溶解能の強いことを示している。種々の抗生物質について同様な実験をくり返し、溶菌曲線を描き LD_{50} 値を求めた。Table 1 はその

Table 1. Lytic activities of protoplasts of *B. megaterium* against various antibiotics

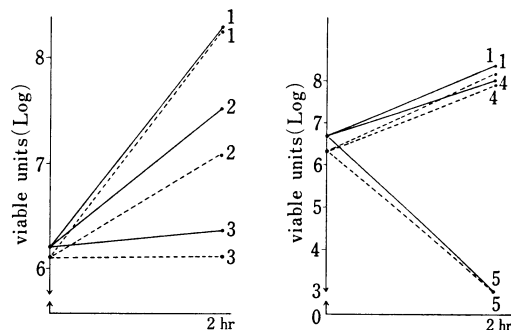
LD_{50} means the concentration which leads to decrease the cell density of protoplasts suspensions to half of initial density for 30 minutes.

Antibiotic	LD_{50} ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
Enramycin	20
Gramicidin	6
Polymyxin B	20
Vancomycin	100
Bacitracin	150—200
Penicillin-G	>500
Cephalexin	>500
Tetracycline	150
Minocycline	15

LD_{50} 値をまとめたものであり、この Table から各薬剤の膜溶解活性を比較することができる。これによると、Gramicidin, Polymyxin B, ERM の示す LD_{50} 値は小さく、これらの抗生物質の作用部位が細胞質膜にあることを示している。また、いっぽう Penicillin G, Cephalaxin の示す LD_{50} 値は大きい。これはそれらの薬剤が細胞質膜の溶解作用をもたないことを示すものである。また、蛋白合成阻害抗生物質である Tetracycline は LD_{50} が 150 であるのに比べ、その新しい誘導体である Minocycline の LD_{50} はきわめて小さく 15 であるが、このことは Minocycline の強力な殺菌作用と関係があり、このものの作用部位が細胞質膜にもあるのではない

Fig. 7 Comparison of the viable counts of stabilized and osmotically shocked cultures.

1: control, 2: penicillin G 2.5 μg per ml, 3: penicillin G 50 μg per ml, 4: enramycin 0.39 μg per ml, 5: enramycin 0.78 μg per ml. Dotted lines are viable counts of shocked cultures, and solid lines are those of stabilized cultures.



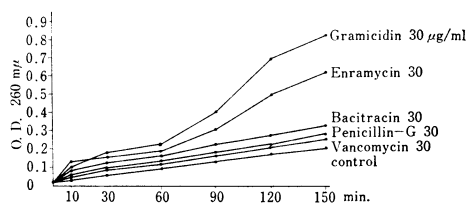
かということを示唆するものである。

ERM によるプロトプラスト形成実験 : Fig. 7-1 に示すように, Penicillin G 2.5 および 50 $\mu\text{g/ml}$ を作用させた場合, osmotic stabilizer を含まない培地では, それを含んでいる培地に比べて 1/2 および 1/5 の減少が見られた。この生菌数の減少は Penicillin G によってできたプロトプラストが溶解したために起るものであることを示している。いっぽう, ERM 0.78 $\mu\text{g/ml}$ を作用させた場合は Fig. 7-2 に示してあるが, osmotic stabilizer を含む培地でも含まない培地でも, 生菌数は同様に 10^{-8} cells/ml に減少し, 差は見られなかった。このように差がみられなかったことは, ERM によりプロトプラストが形成されていないことを推測し得る。

菌体内成分, UV 260 m μ 吸収物質の漏出 : Gramicidin, Bacitracin, Penicillin G, Vancomycin および ERM の 5 薬剤を黄色ブドウ球菌懸濁液に作用させ, その懸濁液の遠心上清について U. V. 吸収を測定したところ, いずれの薬剤についても 260 m μ に極大吸収を示した。Fig. 8 は上記 5 薬剤を作用させた懸濁液の遠心上清が示した 260 m μ 吸収値の経時変化である。Gramicidin, polymyxin B, ERM を作用させた細胞懸濁液は Bacitracin, Vancomycin, Penicillin G を作用させたものより強い吸収を示した。これは ERM が Gramicidin, Polymyxin B と同様に強力な細胞内容物流出作用を有することを示している。この現象はある種のペプチド系抗生物質で細胞質膜障害を作用機序とするものに共通にみられる。Fig. 9 に示す実験成績は ERM の作用により流出する菌体内成分量が懸濁液の温度に支配されるかどうかを調べた結果である。この成績からは ERM の作用による菌体内成分の漏出に関しては至適温度はみられず, 漏出量は温度に依存しないことが示されている。

また, Gramicidin の場合その漏出量は培地温度に依存しないことが報告されており²³⁾, Polymyxin B の場

Fig. 8 Release of cellular constituents, U. V. 260 m μ absorbing materials by exposing to antibiotics. Medium : 0.03 M phosphate buffer pH 7.0 containing 1.2 M sucrose.



合においても, 2°C という低温でもその作用を発揮することを, T₄ フェージ吸着阻害実験により報告されている²²⁾。

菌体内成分, DNA, RNA, Protein 量の変化 : Fig. 10 は ERM 0.09 から 3.12 $\mu\text{g/ml}$ の 6 段階の濃度を黄色ブドウ球菌に作用させた時の, 菌体内成分 DNA, RNA, Protein 量を定量しその結果を示したものである。予試験として同じ条件で ERM の作用による生菌数の変化を調べたところ, ERM 0.78 $\mu\text{g/ml}$ 以上では生菌数に

Fig. 9 Influence of release amounts against medium temperature.

Medium : 0.03 M phosphate buffer. Solid lines show release amounts treated with enramycin, dotted lines show release amounts no treated. Remainders found release amounts treated enramycin minus release amounts no treated show the same value at the various temperatures 3, 24 and 37°C.

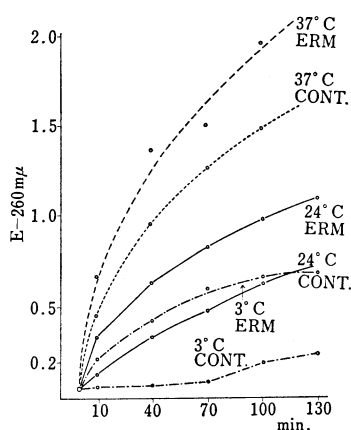
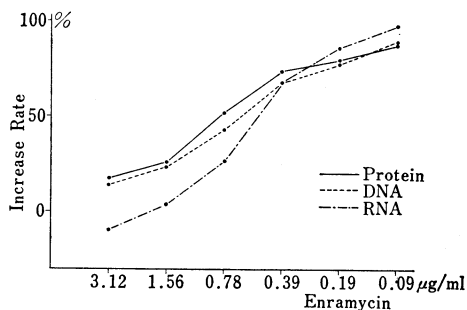


Fig. 10 Changes of cellular constituents DNA, RNA and protein. Increase rate : Increase amounts of enramycin treated cells for 2 hours incubation time was divided by increase amounts of control cells for the same period.



かなりの減少がみられることがわかった。菌体内成分を定量する場合、溶菌していない細胞について測定するべきであるから、ERM 0.78 $\mu\text{g/ml}$ 以上の濃度では、溶菌した細胞がかなりあると考えられるのでこの実験に適さない。そこで ERM 0.78 $\mu\text{g/ml}$ 以下の濃度を作用させ、DNA, RNA, Protein 量を測定したところ、それらの量にほとんど変化は認められなかった。しかし RNA 量は ERM が高濃度になるに従って減少した。この結果は細胞内容物の流出により RNA が流出したことによるものと推測される。それゆえ RNA 合成阻害とか RNase 活性の増大に起因する RNA 量の減少²³⁾ではないと推定される。

今回の実験結果をまとめると、ERM は次のような作用をもつことが判明した。i) 強力な細胞質膜溶解作用を有する。ii) プロトプラストを形成させない。iii) 菌体内成分 U. V. 260 m μ 吸収物質の強い漏出作用を有する。iv) 菌体内成分 DNA, RNA, Protein 量に変化を与えない。以上 i)~iv) までの性質は細胞質膜障害を作用機序とする抗生物質に共通にみられるものであり、上記の生化学的実験成績から、ERM は細胞質膜障害を作用機序とすることが推定できる。

いっぽう、前報で報告した電子顕微鏡による形態学的研究での抗菌作用像の解析結果は次のとおりであった。すなわち、黄色ブドウ球菌、ジフテリア菌に対する作用像では、i) プロトプラストの形成が認められない、ii) 隔壁の肥厚が認められないという点は、細胞壁合成阻害抗生物質 Penicillin, Cephalosporin 系での抗菌像とは著しく異なる。iii) 細胞質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 を大腸菌等に作用させ観察した CHAPMAN^{10,11)}、小池¹²⁾らの報告している抗菌像に類似するものであった。前報の形態学的研究の要旨は上記のとおりであるが、このような抗菌作用像の解析結果に追加した今度の実験成績はそれを生化学的に裏づけたものであり、両者はきわめてよく一致することが判明した。

以上は ERM の細菌細胞に対する作用を検討したものであるが、次に ERM のもつ i) 化学構造、ii) 物理化学的性質、iii) 毒性 などに関する報告を調べると以下のとおりである。i) 塩基性環状構造をもつ²⁾ポリペプチドである。その化学構造をもつため、ii) 陽イオン界面活性剤でもあり、強い界面活性作用を示すことが報告されている。iii) 毒性に関しては、I. V. での LD₅₀ が 31.2 mg/kg というきわめて高毒性を示す²⁵⁾。これは細胞壁合成阻害抗生物質は秀れた選択毒性をもつので、低毒性を示すとされていることに反する。このような i)~iii) の事実は全て、細胞質膜障害抗生物質として知ら

れている Gramicidin, Tyrocidin, Polymyxin B および Colistin 等に共通することである。

電子顕微鏡による形態学的な研究 (第 I 報) と、今回 (第 II 報) の両実験成績に付け加えて、ERM のもつ化学構造、界面活性作用、毒性等をも考慮に入れた上で、総括すると、ERM の抗菌作用機序は次のように推定しうる。すなわち、ERM は細胞壁を通過後、細胞質膜に接触した際、膜の溶解、透過性の変化という、膜に対する構造的、機能的な障害を与えることによって抗菌作用を発揮するものであり、しかもこの細胞質膜に対する作用が、抗菌作用において主な作用で、最初に起こる作用であると推測される。それゆえ ERM の抗菌作用機序において、その第 1 次作用点は細胞質膜の機能的構造的な障害にあると推定した。

文 献

- 1) HIGASHIDA, E.; K. HATANO, M. SHIBATA & K. NAKAZAWA: Enduracidin, a new antibiotic. I. *Streptomyces fungicidicus* No. B 5477, an enduracidin producing organisms. J. Antibiotics 21: 126~137, 1968
- 2) ASAI, M.; M. MUROI, N. SUGITA, 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, 土屋院司: 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) 松本建介, 三和秀明, 安達真知子, 中沢昭三: ペプチド系抗生物質 Enduracidin の作用機序に関する研究 (1) 電子顕微鏡的研究. Chemotherapy 21(3): 531~535, 1973
- 10) CHAPMAN, G. B.: Cytological aspects of antimicrobial antibiotics. I. Cytological changes

- associated with the exposure of *Escherichia coli* to colistin sulfate. J. Bact. 84 : 169~179, 1962
- 11) 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. Bact. 84 : 180~185, 1962
- 12) KOIKE, M., K. IIDA & T. MATSUO: Electron-microscopic studies on mode of action of polymyxin. J. Bact. 97 : 448~452, 1969
- 13) BURDASH, N. M.; M. A. EHRLICH, H. G. EHRLICH & J. T. PARISI: Electron microscopy of *Proteus vulgaris* exposed to cephalothin. J. Bact. 95 : 1956~1960, 1968
- 14) CHANGE, T. W. & L. WEINSTEIN: Morphological changes in gram-negative bacilli exposed to cephalothin. J. Bact. 88 : 1790~1797, 1964
- 15) CIAK, J. & F. E. HAHN: Concurrent morphological and chemical events in *Staphylococcus aureus* exposed to penicillin. Science 137 : 982~983, 1962
- 16) NISHINO, T. & S. NAKAZAWA: Morphological changes in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* exposed to cephalixin. Japan. J. Microbiol. 16(2) : 83~94, 1972
- 17) PARK, J. T. & R. HANCOCK: A fractionation procedure for studies of the synthesis of cell-wall mucopeptide and of other polymers in cells of *Staphylococcus aureus*. J. Gen. Microbiol. 22 : 249~258, 1960
- 18) 安藤鋭郎, 寺山 宏, 西沢一俊, 山川民夫: 生化学研究法Ⅱ, 朝倉書店 442 & 694, 1967
- 19) ALAN W. BERNHEIMER & L. LOIS SCHWARTZ: Lysis of bacterial protoplasts and spheroplasts by Staphylococcal α -Toxin and Streptolysin S. J. Bact. 89(5), 1965
- 20) 小田琢三, 佐藤 了, 中尾 真: 生体膜の生化学, 朝倉書店 416~437, 1969
- 21) WILLIAM A. GOSS; WILLIAM H. DEITZ & THOMAS M. COOK: Mechanism of action of nalidixic acid on *Escherichia coli*. J. Bact. 88 : 1112~1118, 1964
- 22) 中島久二瑛, 川俣順一, 菅沼 淳, 原一仁, 岸田綱太郎: コリスチンの作用機構, とくに大腸菌の膜構造におよぼす影響. Chemotherapy 17(6) : 999, 1969
- 23) 三木吉春: Gramicidin J の抗菌作用機序について—とくに菌体成分の漏出作用を中心として—. 大阪市大誌 4005~4017, 1960
- 24) FUJISAWA, H., J. ISE, Y. OKADA, A. MORI, K. AOKI & T. SHIMAMOTO: Behavior of enramycin in aqueous solution. J. Takeda Res. Lab. 30(2) : 339~343, 1971
- 25) 中沢昭三: 抗生物質の基礎知識 : 49~50, 1970

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

(II) Supplemental Study on the Disturbance of Cytoplasmic Membrane

KENSUKE MATSUMOTO, HIDEAKI MIWA and SHOZO NAKAZAWA

Department of Microbiology, Kyoto College of Pharmacy

Enramycin(ERM) even in low concentrations lyses *Escherichia coli* spheroplasts and *Bacillus megaterium* protoplasts easily. ERM does not transform sensitive bacteria to protoplasts, not as by penicillin or cephalosporin derivatives. ERM has the action of the release of cellular constituents, US 260 m μ absorbing materials. No distinct changes of DNA, RNA and protein amounts of *Staphylococcus aureus* are observed by exposition to ERM. So there are little possibility of ERM to cause inhibition of nucleic acids and protein synthesis. This report agrees with the result of previous paper about morphological study by electron microscopy. Both reports show the antibacterial mechanism of action of ERM is the impairment of cytoplasmic membrane.