

## 6059-S の標的蛋白に関する研究

小松良英・西川 徹

塩野義製薬株式会社研究所

Oxacephem 系抗生物質 6059-S は大腸菌の分裂や伸長に必須とされるペニシリン結合蛋白 3 や 1A, 1Bs に高い親和性をもって強固に結合した。特にペニシリン結合蛋白 3 に対する親和性が非常に高く、Cefoxitin や Cefmetazole を凌ぐものであった。

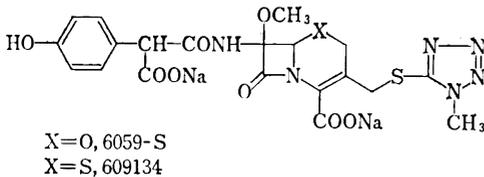
本薬剤はペニシリン結合蛋白 5% や 7% にも高い親和性を示し、この点は Cefotaxime にはみられない特徴であった。

ペニシリン結合蛋白以外の細胞質膜蛋白で 6059-S を結合するものがみつかった。

## 結 論

6059-S の化学名は、7β-(2-carboxy-2-(4-hydroxyphenyl)acetamido)-7α-methoxy-3-[(1-methyl-1H-tetrazol-5-ylthio)-methyl]-1-oxa-1-dethia-3-cephem-4-carboxylic acid disodium salt (Fig. 1) であり、当社研究所において新しく開発された Oxacephem 系抗生物質である<sup>1,2)</sup>。

Fig. 1 Chemical structure of 6059-S



本剤は広範囲の抗菌スペクトラムを有し、特にグラム陰性細菌に対して *in vitro*, *in vivo* の抗菌力が強い<sup>3,4)</sup>。

そのすぐれた抗菌力から考えて、「作用標的が何で、それに対してどのように作用するのか?」は興味深いところである。

細菌の細胞質膜にはペニシリン結合蛋白 (penicillin-binding proteins, 以下 PBP と略す) と呼ばれる一群の蛋白質が存在し、これらの中には細胞の増殖の際に伸長、分裂、形態形成等に重要な役割を果たすものが含まれており、多くの β-ラクタム抗生物質の作用標的ともなっている。

著者らは、標的レベルでこの薬剤の抗菌力の質的評価を行なう目的で、まず [<sup>14</sup>C] Penicillin G ([<sup>14</sup>C] PCG と略す) との競合試験法によって大腸菌 PBP に対する本薬剤の親和性を他の β-ラクタム剤、Cefoxitin (CFX と略す)、Cefotaxime (CTX と略す) および Cefmetazole (CMZ と略す) などと比較し、次いで、[<sup>14</sup>C] 標識 6059-S を用いて本薬剤の大腸菌内膜蛋白への結合の様子を直接調べた。

## 実験材料および方法

## 1. 使用菌株

*Escherichia coli* K-12 (野生株) を用いた。

## 2. 標識化合物

[<sup>14</sup>C] PCG (比放射能 51.0~59.5 mCi/mmol) は Radiochemical center (Amersham, 英国) より購入した。2-[<sup>14</sup>C] 6059-S (比放射能 9.2 mCi/mmol) は当社研究所において合成されたものを用いた。本標品は、シリカゲル薄層クロマトグラフィーにより単一スポットを与え、放射化学的にほとんど純粋であった。

## 3. 使用薬剤

使用した薬剤は次のとおりである。

6059-S : 当社研究所製試験研究用 6059-S 原末 [922 μg (力価)/mg]

CFX : Merck Sharp & Dohme Research Laboratories 製

CMZ : 三共 (株) 製

CTX : Hoechst-Roussel 製 [925 μg (力価)/mg]

Potassium benzylpenicillin : PCG と略、明治製薬 (株) 製

## 4. ペニシリン結合蛋白の検出法

PBP の検出には、従来 SPRATT が開発した方法<sup>5)</sup> が多く用いられているが、この方法は、大腸菌の細胞破砕液から調製した細胞膜標品に [<sup>14</sup>C] PCG を作用させ、sarkosyl NL-97 という特殊な表面活性剤で細胞質膜蛋白を選択的に可溶化し、これを SDS-ポリアクリルアミド平板電気泳動で分離し、乾燥したゲル平板を蛍光ラジオオートグラフィー<sup>6,7)</sup> で検出するものであるが、SPRATT 自身が述べている<sup>5)</sup> とおり、この方法の蛍光ラジオオートグラフィーの過程が非常に長時間を要する欠点があった。著者らは、この過程を「ゲル平板から放射性蛋白を抽出して液体シンチレーションカウンターで測定する方法」に改変し、検出に要する時間を大巾に短縮した。この方法によると、PBP の検出が 2~3 日で行なえる。方法の概略を次に述べる。

## 1) 細胞膜標品の調製

*E. coli* K-12 株を Difco Antibiotic Medium No. 3 で 37°C において 4 時間振盪培養後、遠心によって集菌し、これを超音波破碎して、遠心によって細胞膜標品を分画した。詳細は SPRATT の方法<sup>9)</sup>に従った。得られた標品は細胞外膜、ペプチドグリカン層、細胞質膜を含み、蛋白含量は 6~10 mg/ml であった。

#### 2) [<sup>14</sup>C] PCG の結合

細胞膜標品 800  $\mu$ l に対し 100  $\mu$ l の [<sup>14</sup>C] PCG 溶液 (最終濃度 33~34  $\mu$ g/ml, 5  $\mu$ Ci) を加え、30°C において 12 分間保温した。大量の非放射性 PCG (最終濃度 4.7 mg/ml, 30  $\mu$ l) と sarkosyl NL-97 溶液 [Chiba geigy 製, 最終濃度 1% (W/V), 50  $\mu$ l] とを加えて反応を停止させた。

#### 3) [<sup>14</sup>C] PCG-PBP 複合体の可溶化

反応液を 30°C において 15 分間さらに保温することによって [<sup>14</sup>C] PCG の結合した PBP を可溶化し、遠心 (40,000 $\times$ g, 40 分間) によって分画後、上澄液を回収した。

4) SDS-[<sup>14</sup>C] PCG-PBP 複合体の形成と濃縮 [<sup>14</sup>C] PCG-PBP を含む上澄液 (約 1,020  $\mu$ l) に 500  $\mu$ l の SDS-緩衝溶液<sup>5)</sup> [3% SDS, 30% グリセロール, 0.002% プロモフェノールブルーを含む 0.2 M Tris-HCl 緩衝溶液 (pH 6.8)] を混合し、室温で 20 分間放置後、collodion bag (SM 13,200, Sartorius-Membrane filter GmbH) を用いて減圧下に濃縮して、約 200  $\mu$ l とした。

#### 5) 加熱処理

濃縮液に 8% (V/V) の 2-メルカプトエタノールを混合してから、100°C で 3 分間加熱した。この処理は使用直前に行なった。

#### 6) SDS-ポリアクリルアミドスラブディスク電気泳動

加熱処理を施した濃縮液 (40~60  $\mu$ l) を SDS-ポリアクリルアミドゲル平板 (アクリルアミドモノマー濃度 10%, N, N'-メチレンビスアクリルアミド濃度 0.27% ; この組成のゲルを便宜上 "total gel" とよぶ) の試料孔に充填し、2 倍希釈のトリス-グリシン緩衝溶液<sup>6)</sup> (pH 8.6) 中で室温において 12 mA で 17~19 時間電気泳動を行なった。Total gel では、PBP-1 を sub-components (1 A, 1 B<sub>s</sub>)<sup>9,10)</sup> に分離できないので、アクリルアミド濃度と架橋度を低下させた SDS-ポリアクリルアミドゲル平板 (アクリルアミドモノマー濃度 7.5%, N, N'-メチレンビスアクリルアミド濃度 0.10% ; この組成のゲルを便宜上 "AB gel" とよぶ) によって電気泳動を行ない、PBP-1 を PBP-1A と PBP-1B<sub>s</sub> とに分離した。泳動の条件は total gel の場合と同じで

ある。

#### 7) ゲル平板の洗滌と乾燥

泳動後のゲル平板はジメチルスルホキシド溶液 (300 ml) に 1 時間浸漬した。この操作をさらに 2 回繰り返した。次に、ゲル平板を水 (500 ml) に 1 時間浸漬した。この操作もさらに 1 回繰り返した。ゲル平板は、湿った濾紙 (Whatman 3 MM) 上においてスラブ・ディスク泳動ゲル乾燥器 [アトー (株) 製 SJ-1060-SH] を用いて減圧下で加熱して乾燥 (65°C で 2 時間) した。

8) ゲル平板を試料孔に沿って縦 2 mm $\times$ 横 20 mm の切片に切断した。

#### 9) [<sup>14</sup>C] PCG-PBP の溶出と放射能の測定

各切片をそれぞれ放射能測定用バイアル瓶中で 1 ml の 1 N アンモニア水溶液に浸し、32°C で 2 日間保温することによって [<sup>14</sup>C] PCG を結合した PBP を溶出し、これに 10 ml の BRAY のシンチレーター<sup>11)</sup>を加えて 1 時間放置後、よく攪拌してから液体シンチレーションカウンター (LKB wallac 1215 Rackbeta) によって放射能を測定した。各切片について単位膜蛋白当りの放射能 (cpm/mg membrane protein) を算出し、Fig. 2~4 のようにプロットした。この方法によると、total gel では 6 本の major peak が検出され、各種  $\beta$ -ラクタム抗生物質に対する親和性や泳動速度から判定して泳動度の小さい順にそれぞれ SPRATT が命名し

Fig. 2-A Effects of 6059-S, CFX, CTX and CMZ on the binding of [<sup>14</sup>C] PCG to the PBP<sub>s</sub> of *E. coli* K-12

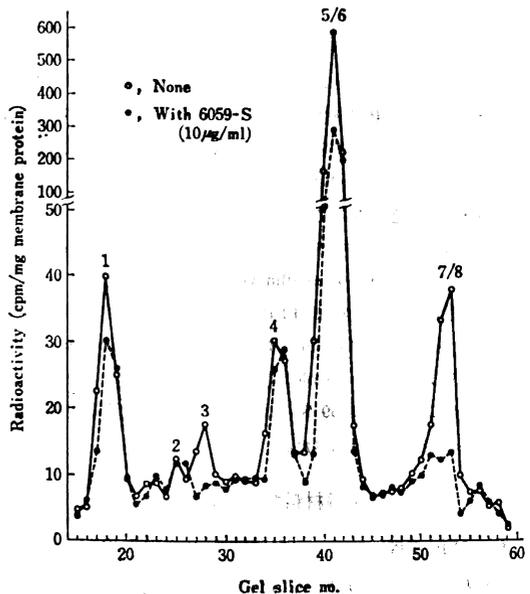


Fig. 2-B Effects of 6059-S, CFX, CTX and CMZ on the binding of [ $^{14}$ C] PCG to the PBPs of *E. coli* K-12

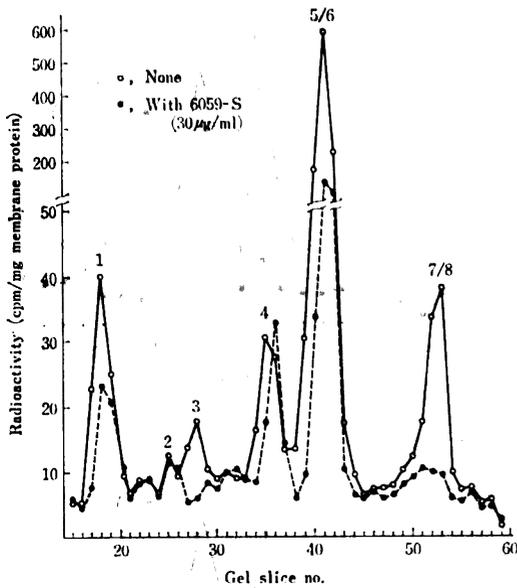


Fig. 2-C Effects of 6059-S, CFX, CTX and CMZ on the binding of [ $^{14}$ C] PCG to the PBPs of *E. coli* K-12

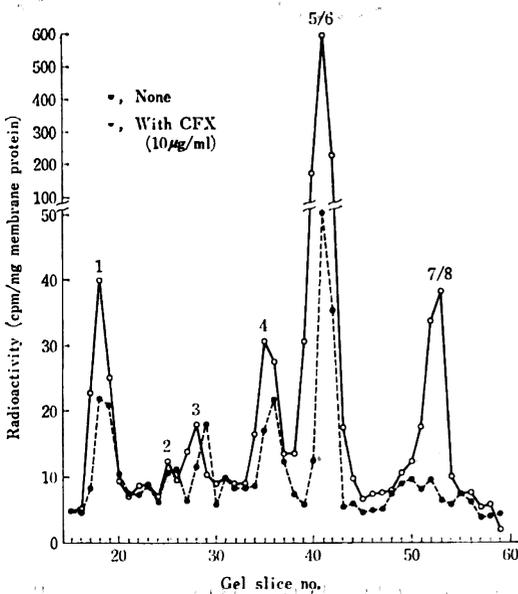


Fig. 2-D Effects of 6059-S, CFX, GTX and CMZ on the binding of [ $^{14}$ C] PCG to the PBPs of *E. coli* K-12

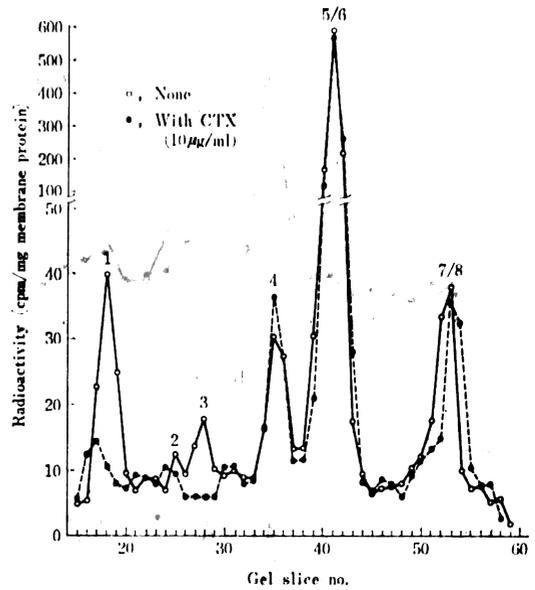
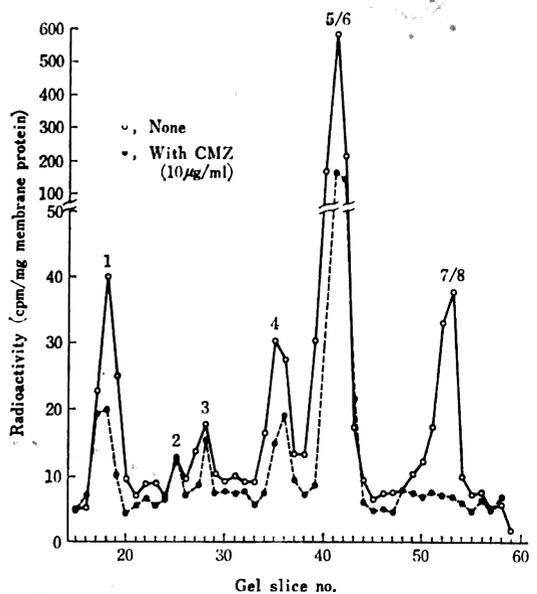


Fig. 2-E Effects of 6059-S, CFX, CTX and CMZ on the binding of [ $^{14}$ C] PCG to the PBPs of *E. coli* K-12

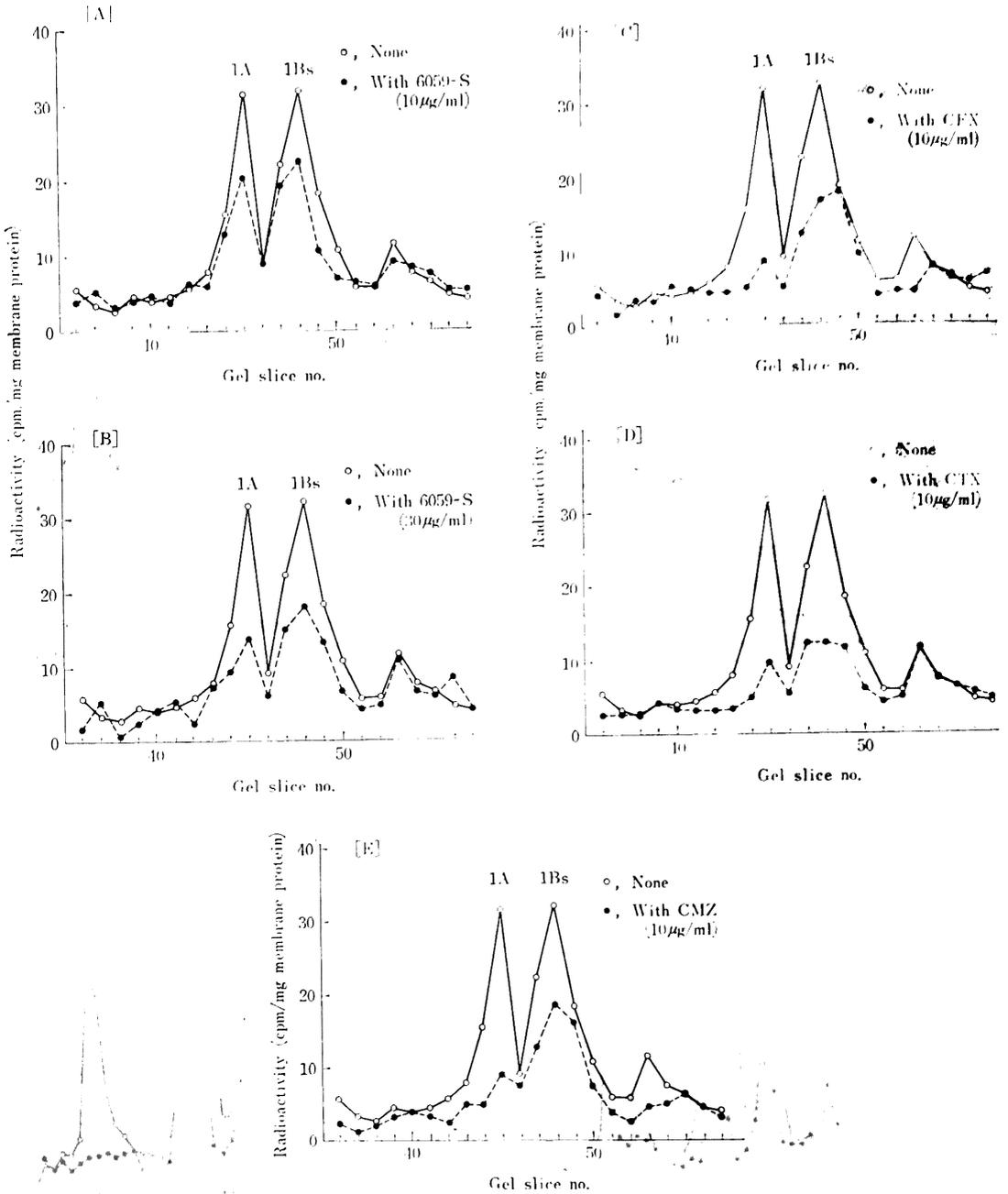


た<sup>5)</sup> PBP-1, -2, -3, -4, -5/6 および -7/8 であることが明らかとなった (Fig. 2)。また, AB gel 上の 2本の peak は, 泳動度の小さい方が PBP-1A で, 大きい方が -1Bs と判明した (Fig. 3)。

#### 5. 薬剤の PBP に対する親和性の測定法

調べようとする薬剤の溶液 (最終濃度 10 および 30  $\mu$ g/ml, 40  $\mu$ l) を [ $^{14}$ C] PCG 溶液 (最終濃度 33  $\mu$ g/ml, 100  $\mu$ l) と共に 4-2) の方法で細胞膜標品 (800

Fig. 3 Effects of 6059-s, CFX, CTX and CMZ on the binding of [<sup>14</sup>C] PCG to the PBP-1A and -1Bs of *E. coli* K-12



μl) に作用させ、4-3~9) の方法で [<sup>14</sup>C] PCG-PBP を検出し、薬剤溶液の代わりに純水 (40 μl) を加えた場合とくらべて [<sup>14</sup>C] PCG の PBP への結合が薬剤によってどれだけ競合されたかを測定し、薬剤の PBP への親和性の強さを知った。実測値は非特異性の [<sup>14</sup>C] PCG 結合を含んでいるので、これを除去するために大量の

[<sup>12</sup>C] PCG ([<sup>14</sup>C] PCG の 130 倍量) と共に [<sup>14</sup>C] PCG を同じ膜標品に作用させ、この場合の各切片に含まれる放射能を非特異性結合として実測値から差し引く補正を行なった。

6. [<sup>14</sup>C] 6059-S の細胞質膜蛋白への結合法

[<sup>14</sup>C] PCG の代わりに 2-[<sup>14</sup>C] 6059-S (107.1 μg/ml,

1.78  $\mu$ Ci) を用いた。結合反応の停止に際して、sarkosyl NL-97 と共に [ $^{14}$ C] 6059-S (最終濃度 4.7 mg/ml) を添加した。その他は方法 4 と同様に行なった。

### 実験結果

#### 1. [ $^{14}$ C] PCG の PBP への結合におよぼす 6059-S の影響

[ $^{14}$ C] PCG の PBP への結合が 6059-S によってどのように競合されるかを指標にして、本薬剤の PBP への親和性を測定した。

まず、10  $\mu$ g/ml の 6059-S と共に [ $^{14}$ C] PCG (33  $\mu$ g/ml) を細胞膜標品に作用させたところ、Fig. 2-A に明らかなように、PBP-3 と -7/8 への [ $^{14}$ C] PCG の結合が著しく阻害された。30  $\mu$ g/ml の 6059-S を共存させた場合には、PBP-3、-7/8 の他に -5/6、-1 などへの [ $^{14}$ C] PCG 結合も著しく阻害された (Fig. 2-B)。PBP-1 は -1A と -1Bs という複数の subcomponent を含むので、AB gel を用いて 1A、1Bs に分けて調べた結果、6059-S は 1A、1Bs への [ $^{14}$ C] PCG の結合を同時に阻害することが判明した (Fig. 3-A、3-B)。

6059-S と同じ実験を CFX、CTX および CMZ について行なって比較した。各薬剤 10  $\mu$ g/ml を共存させた場合の [ $^{14}$ C] PCG の結合状況を Fig. 2-C~E および Fig. 3-C~E に図示した。さらに詳細な結果を数値化し、表示した (Table 1)。これらによると、各 PBP への [ $^{14}$ C] PCG の結合に対する各薬剤の阻害度には次の関係が見い出される。すなわち、

PBP-1A : CFX=CTX=CMZ>6059-S

PBP-1Bs : CTX>CMZ=CFX $\geq$ 6059-S

PBP-3 : CTX $\geq$ 6059-S>CMZ>CFX

PBP-4 : CMZ=CFX>6059-S>CTX

PBP-5/6 : CFX>CMZ>6059-S>CTX

PBP-7/8 : CFX=CMZ $\geq$ 6059-S>CTX

PBP-2 に対して、すべての薬剤が阻害力が小さかった。また、CTX は PBP-4、-5/6、-7/8 に対してほとんど阻害を示さなかった。

#### 2. [ $^{14}$ C] 6059-S の細胞質膜蛋白への結合性

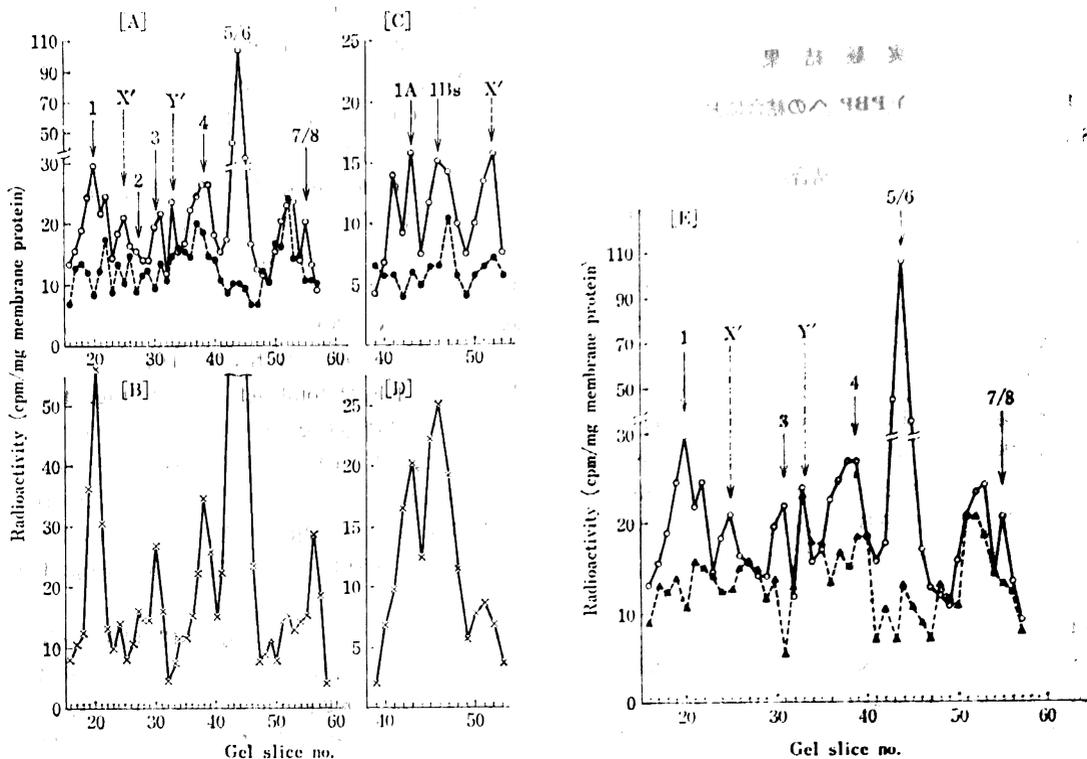
[ $^{14}$ C] 標識 6059-S を大腸菌細胞膜標品に作用させ、その結合性を調べたところ、Fig. 4-A、4-C、および 4-E のようになった。各 PBP の位置を知るために、同一条件で [ $^{14}$ C] PCG を結合させ、同じゲル平板上で分析した結果を Fig. 4-B および 4-D に示した。Fig. 4-A、4-B、4-E は total gel で、また Fig. 4-C および 4-D は AB gel で分析したものである。図に明らかなように、[ $^{14}$ C] 6059-S は [ $^{14}$ C]-PCG との競合試験で親和性が高いとされた PBP のすべて (1A、1Bs、3、4、5/6、7/8) に強固に結合し、これらの結合はいずれも非放射性 6059-S によって競合された (Fig. 4-A、4-C)。

その上興味深いことには、major PBP 以外の蛋白で、[ $^{14}$ C] 6059-S を結合し、その結合が非放射性 6059-S で競合されるものが 2 種 (X' および Y') みつかった。これらは細胞質膜蛋白画分に存在し、X' への [ $^{14}$ C] 6059-S の結合は非放射性 PCG で競合されたが、Y' への [ $^{14}$ C] 6059-S の結合は PCG でまったく競合されないことが判明した (Fig. 4-E)。同一ゲル平板上で [ $^{14}$ C] PCG の結合と比較してみると、X' の位置には [ $^{14}$ C] PCG の結合した peak がみられるが、Y' の位置には [ $^{14}$ C] PCG の結合を示す peak はみられな

Table 1 Effects of 6059-S, CFX, CTX, and CMZ on the binding of [ $^{14}$ C] PCG to the penicillin-binding proteins of *E. coli* K-12

$\beta$ -Lactam added ( $\mu$ g/ml)		Binding of [ $^{14}$ C] PCG to PBP (% of control)						
		1 A	1 Bs	2	3	4	5/6	7/8
6059-S	10	71.3	72.0	112.0	41.3	82.5	56.1	36.9
	30	51.3	59.5	97.3	25.2	74.3	26.4	26.8
CFX	10	25.9	61.7	93.3	73.5	56.6	9.0	20.5
	30	22.1	58.8	73.3	56.8	42.8	3.1	14.0
CTX	10	27.2	46.1	97.3	26.5	105.5	97.6	112.1
	30	22.2	19.9	64.0	18.6	94.4	90.1	102.3
CMZ	10	31.0	63.0	90.0	69.4	49.3	36.0	23.4
	30	15.2	36.0	79.3	44.5	45.9	10.9	23.7

Fig. 4 Binding of [ $^{14}$ C] 6059-S, and [ $^{14}$ C] PCG to the inner membrane proteins of *E. coli* K-12



った (Fig. 4-A, 4-B)。これらの結果は、6059-S が PBP-1A, -1Bs, -3, -4, -5/6, -7/8 の他に、X' と Y' という 2 種の細胞質膜蛋白にも結合しており、しかも、Y' は PBP ではないことを示唆するものであった。

#### 考 察

著者らは、ゲル平板上で分離した [ $^{14}$ C] PCG-PBP を蛍光ラジオオートグラフィーを用いることなく検出する方法を確立し本実験に用いた。これにより PBP の研究が大幅にスピードアップされた。この方法は標識蛋白の分析一般に応用でき、定量性が優れているので、二重標識蛋白の分離定量には効果的と思われる。

6059-S は Oxacephem 系であり、ペニシリン類、セファロsporin 類、セファマイシン類のいずれとも異なる群に属し、これらを凌ぎ  $\beta$ -ラクタム 抗生物質として評価に値すると考えられるが、そのすぐれた抗菌力から考えて作用点においてもすぐれた作用のあることが期待された。実験の結果は予想されたとおり、本薬剤はペニシリンの標的蛋白と考えられている各種の PBP に高い親和性をもって結合しており、特に PBP-3 に対する

親和性は CFX や CMZ を凌ぎ CTX にせまるものであった。PBP-3 は細胞分裂における隔壁形成に関与する蛋白と考えられており、この機能が阻害されると細胞分裂ができず、伸長化した細胞が現れること<sup>12)</sup>が報告されているが、低濃度の 6059-S の存在によってやはり伸長化した細胞が観察されている<sup>4)</sup>。PBP の中で  $\beta$ -ラクタム抗生物質の lethal target は PBP-1, -2, -3 であると考えられているが、6059-S の PBP-3 を阻害する強さは CFX や CMZ などの PBP-1 や -3 に対する阻害作用より優っており (Table 1), lethal target に対する作用が CTX に次いで強いということができよう。

6059-S は PBP-1 に対しても高い親和性を有しており、この蛋白の機能が欠損したときに起こる溶菌現象<sup>13)</sup>が本薬剤の場合も MIC 近辺の濃度で観察されている<sup>4)</sup>。PBP-1 の subcomponent である 1A と 1Bs とは細胞の伸長時に合成される murein の架橋反応に関与し、その機能を互に代替できることが知られている<sup>10)</sup>が、本薬剤はこの両者を同時に阻害する特徴を有していた (Table 1)。

放射性の 6059-S を用いた実験によって、本薬剤がこ

れら lethal target に強固に(恐らく共有結合で)結合していることが判明した。

従って、6059-S のすぐれた抗菌力は、細胞分裂や伸長に必須とされる PBP-3 や -1A, -1Bs に対して本薬剤が高い親和性をもって強固に結合してその機能を阻害することであるとしてその一部を説明できるように思われる。

放射性 6059-S を用いると、major PBP 以外の細胞質膜蛋白で 6059-S の結合するものがみつかった。このうち、X' と名づけた蛋白は minor PBP の 1 種である PBP-1C にゲル電気泳動の挙動が一致した。一方、Y' と名づけた蛋白は、 $^{14}\text{C}$ -6059-S を結合する能力が PCG の影響をまったく受けないことから、多分 PBP でない細胞質膜蛋白であろうと思われる。これらの蛋白の機能はわかっていないが、lethal target である可能性も残されており、目下検討中である。

6059-S のもう一つの特徴は、本薬剤が PBP-5/6 と -7/8 とに高い親和性を有していることである。この性質は CTX にはまったくみられない。PBP-5 は D-alanine carboxypeptidase 1A<sup>13)</sup>であり、PBP-6 はその関連蛋白であろうと考えられている<sup>14)</sup>。PBP-5/6 が欠損した変異株でも正常な生育を示すことから、他の PBP が正常に機能している状況下ではこれらの蛋白は "non-essential" なものであろうと考えられている<sup>15,16)</sup>。しかし、この変異株が  $\beta$ -ラクタム抗生物質に高感受性となっていること<sup>17)</sup> や 6059-S の 1 位の酸素原子が硫黄である化合物 609134 (Fig. 1) が PBP-5/6 に対する親和性を失って同時に抗菌力も減衰している事実<sup>18)</sup>などを考えると、PBP-1, -3 などの機能が阻害された状況下では、PBP-5/6 が正常に作動するか否かは菌の生育に大きな影響を与えている可能性が考えられ、PBP-5/6 に高い親和性をもつことはすぐれた抗菌力を発揮するうえで好ましい性質であろうと考えられる。

PBP-7 や -8 の機能はまだわかっていない。従って、本薬剤がこれらに高い親和性をもつことが抗菌力にどのように反映しているのか現在のところわからない。

## 謝 辞

稿を終るにのぞみ、ご助言、ご助力をいただいた当社研究所の田中兼太郎、吉田 正の両氏に深謝します。

## 文 献

- 1) NARISADA, M ; T. YOSHIDA, H. ONOUE, M. OHTANI, T. OKADA, T. TSUJI, I. KIKKAWA, N. HAGA, H. SATOH, H. ITANI & W. NAGATA : Synthetic studies on  $\beta$ -lactam antibiotics. Part 10. Synthesis of 7 $\beta$ -[2-carboxy-2-(4-hydroxyphenyl)-acetamido]-7 $\alpha$ -methoxy-3-[[1-(1-methyl-1H-tetrazol-5-yl)thio]-methyl]-1-oxa-1,4-dithia-3-cephem-4-carboxylic acid disodium salt (6059-S) and its related 1-oxacephems. J. Med. Chem. 22 : 787~799, 1979
- 2) NAGATA, W : Straightforward synthesis of 7 $\alpha$ -methoxy-1-oxacephems from penicillins. Phil. Trans. Roy. Soc. London. B 289 : 225~230, 1980.
- 3) YOSHIDA, T : Structural requirements for antibacterial activity and  $\beta$ -lactamase stability of 7 $\beta$ -acrylamonyl-amino-7 $\alpha$ -methoxy-1-oxacephems. Phil. Trans. Roy. Soc. London. B 289 : 231~237, 1980
- 4) 吉田 正, 亀山康雄, 元川清司 : Oxacephem 系抗生物質 6059 S の *in vitro* 抗菌作用. Chemotherapy 28 (S-7) : 86~131, 1980
- 5) SPRATT, B. G. : Properties of the penicillin-binding proteins of *Escherichia coli* K-12. Eur. J. Biochem. 72 : 341~352, 1977
- 6) BONNER, W. M. & R. A. LASKEY : A film detection method for tritium-labelled proteins and nucleic acids in polyacrylamide gels. Eur. J. Biochem. 46 : 83~88, 1974
- 7) LASKEY, R. A. & A. D. MILLS : Quantitative film detection of  $^3\text{H}$  and  $^{14}\text{C}$  in polyacrylamide gels by fluorography. Eur. J. Biochem. 56 : 335~341, 1975
- 8) LAEMMLI, U. K. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>. Nature 227 : 680~685, 1970
- 9) SPRATT, B. G. & V. JOBANPUTRA : Mutants of *Escherichia coli* which lack a component of penicillin-binding protein 1 are viable. FEBS Lett. 79 : 374~378, 1977
- 10) TAMAKI, S., S. NAKAJIMA & M. MATSUHASHI : Thermosensitive mutation in *Escherichia coli* simultaneously causing defects in penicillin-binding protein-1Bs and in enzyme activity for peptidoglycan synthesis *in vitro*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 74 : 5472~5476, 1977
- 11) BRAY, G. A. : A simple efficient liquid scintillator for counting aqueous solutions in a liquid scintillation counter. Analyt. Biochem. 1 : 279~285, 1960
- 12) SPRATT, B. G. : Distinct penicillin binding proteins involved in the division, elongation and shape of *Escherichia coli* K 12. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 72 : 2999~3003, 1975
- 13) MATSUHASHI, M. ; I. N. MARUYAMA, Y. TAKAGAKI, S. TAMAKI, Y. NISHIMURA & Y. HIROTA : Isolation of a mutant of *Escherichia coli* lacking penicillin-sensitive D-alanine carboxypeptidase 1A. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 75 : 2631~2635, 1978
- 14) MATSUHASHI, M. & S. TAMAKI : Enzymatic studies on the mechanism of action of cefoxitin. Correlation between the affinities of cefoxitin to penicillin-binding proteins and its rates of inhibition of the respective peni-

- cillin-sensitive reactions in *E. coli*. *J. Antibiot.* 31 : 1292~1295, 1978
- 15) MATSUHASHI, M. ; Y. TAKAGAKI, I. N. MARUYAMA, S. TAMAKI, Y. NISHIMURA, H. SUEUKI, U. OGINO & Y. HIROTA. : Mutants of *Escherichia coli* lacking in highly penicillin-sensitive D-alanine carboxypeptidase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74 : 2976~2979, 1977
- 16) TAMURA, T. ; Y. IMAE & J. L. STROMINGER : Purification to homogeneity and properties of two D-alanine carboxypeptidases I from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 251 : 414~423, 1976
- 17) TAMAKI, S. ; J. NAKAGAWA, J. N. MARUYAMA & M. MATSUHASHI : Supersensitivity to  $\beta$ -lactam antibiotics in *Escherichia coli* caused by D-alanine carboxypeptidase IA mutation. *Agric. Biol. Chem.* 42 : 2147~2150, 1978
- 18) KOMATSU, Y. & T. NISHIKAWA : Mozalactam (6059-S), a new 1 oxa- $\beta$ -lactam : Binding affinity for penicillin binding proteins of *Escherichia coli* K-12. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* 17 : 316~321, 1980

## NEW OXACEPHEM ANTIBIOTIC, 6059-S : STUDIES ON THE TARGET PROTEINS

YOSHIHIDE KOMATSU and TOHRU NISHIKAWA  
Shionogi Research Laboratory, Shionogi & Co., Ltd.

6059-S is a new broad-spectrum oxacephem antibiotic with a structure markedly different from those of penicillins or cephalosporins. The binding activity of 6059-S to the inner membrane proteins of *Escherichia coli* K-12 was tested. 6059-S had the highest affinity for penicillin-binding protein (PBP)-3, and -7/8, and a higher affinity than benzylpenicillin for PBP-1A, -1Bs, -4, and -5/6, and a lower affinity for PBP-2. Another proteins that binds [ $^{14}$ C] 6059-S but does not bind [ $^{14}$ C] benzylpenicillin was found.