

Cefpiramide (SM-1652) の大腸菌および緑膿菌 penicillin binding protein に対する結合親和性とその形態変化との関係

深沢万左友・加藤益弘・奥田隆夫・小松敏昭

住友化学工業株式会社医薬事業部研究部

矢野邦一郎

山之内製薬株式会社中央研究所

Cefpiramide (CPM, SM-1652) の penicillin binding protein (PBP) に対する結合親和性、および PBP と形態変化との関連を大腸菌および緑膿菌を用いて検討した。

Cefpiramide は大腸菌の PBP-1A, 1Bs, 2, 3, および緑膿菌の PBP-1A, 1B, 3, 4 に対し強い親和性を示した。特に、分裂に必須とされる PBP-3 に対しては、両菌種とも最も強い親和性を示し、このことは MIC 以下の濃度の Cefpiramide 存在下における伸長細胞の形成という形態変化からも裏付けられた。濃度が高くなるに従い、大腸菌では溶菌が観察されたが、緑膿菌では大腸菌の場合よりも広い濃度範囲で菌体の伸長化が認められた。

Cefpiramide (CPM, SM-1652), Sodium (6R, 7R)-7-[(R)-2-(4-hydroxy-6-methyl-3-pyridylcarboxamido)-2-(*p*-hydroxyphenyl)acetamido]-3-[(1-methyl-1H-tetrazol-5-yl)thio]methyl]-8-oxo-5-thia-1-azabicyclo[4.2.0]oct-2-ene-2-carboxylate は、グラム陽性および陰性菌に対して、幅広い抗菌スペクトルをもつ新しい注射用セファロsporin誘導体である。この物質の抗菌スペクトルにおける特徴は、既存のセファロsporinが、ほとんど無効である緑膿菌に対して強い抗菌力を示すことである^{1,2)}。

この抗菌力を解明するために、 β -lactam 抗生物質の標的酵素である penicillin binding protein (PBP) に対する結合親和性を大腸菌および緑膿菌を用いて検討し、あわせて、PBP に対する親和性と形態変化との関連についても検討を行なったので報告する。

I. 実験材料および方法

1. 使用菌株

PBP に対する結合親和性の解析には、*E. coli* JE 1011 および *P. aeruginosa* NCTC 10490 を、また、形態変化の観察には *E. coli* NIHJ JC-2 および *P. aeruginosa* PAO 2142 を使用した。

2. 使用薬剤

Cefpiramide (CPM: 力価 899 μ g/mg) および Cefoperazone (CPZ: 力価 900 μ g/mg) は当研究所で合成された。Cefazolin (CEZ: 力価 921 μ g/mg, 藤沢薬品) は市販品を用いた。

3. 感受性測定

前培養に Tryptosoya broth(ニッスイ), 感受性測定に

Heart infusion agar (HIA, ニッスイ) を用い、日本化学療法学会標準法³⁾ に従い 37°C 18 時間培養後の MIC (μ g/ml) を求めた。接種菌量は 10^6 cells/ml である。

4. 大腸菌および緑膿菌の細胞膜画分の調製

E. coli JE 1011 および *P. aeruginosa* NCTC 10490 の細胞膜画分の調製は SPRATT の方法^{4,5)} に準じて行なった。すなわち、被験菌を Penassay broth (Difco) で 37°C, 対数増殖後期まで振盪培養後、遠心集菌し、0.01 M Na-phosphate buffer (pH 7.0) で 1 回洗浄後、同じ buffer に懸濁し、氷冷下、超音波破碎を行なった。破碎液を 4,000 $\times$ g 10 分遠心し、未破碎菌体を除き、上清を 100,000 $\times$ g 30 分で超遠心を行なった。超遠心後の沈殿を 0.01 M Na-phosphate buffer (pH 7.0) に懸濁し、再度 100,000 $\times$ g 30 分の超遠心を行ない、その沈殿を 0.01 M MgCl₂ を含む 0.05 M Na-phosphate buffer (pH 7.0) に懸濁し、LOWRY 法⁶⁾ で、蛋白量が 20 mg/ml になるように調製したものを、細胞膜画分とした。

5. PBP に対する結合親和性の解析

薬剤を最終濃度が 0.03 から段階的に 300 μ g/ml になるように細胞膜画分に加え、30°C 10 分反応後、¹⁴C-PCG (Radiochemical Centre, Amersham, England, 59.5 mCi/mmol) 3 μ l (0.15 μ Ci) を加え、さらに 30°C 10 分反応した。その後、過剰の無標識 PCG および Sarkosyl を加えて、反応をとめ、内膜を可溶化した。遠心で外膜を除いた反応液を SDS-polyacrylamide gel slab electrophoresis にかけて、続いて、fluorography⁷⁾ を行なった。各 PBP に対する ¹⁴C-PCG の結合を 50

% 阻害する薬剤濃度 (ID₅₀) は X-ray film の黒化度を densitometer を用いて測定し、求めた。

6. 形態変化の観察

スライドガラス上に薬剤を含むフィルム寒天 (HIA, ニッスイ) を作成し、一方、37°C 1.5時間静置培養を行なった菌液の小白金耳をカバーガラスに塗抹し、これを寒天にかぶせてパラフィンで周囲を封入した。この標本を 37°C 2.5時間培養し、位相差顕微鏡 (日本光学) により観察および撮影を行なった。

II. 実験結果

1. CPM の PBP に対する結合親和性

CPM の *E. coli* JE 1011 および *P. aeruginosa* NCTC 10490 の PBP に対する結合親和性を、densitometer によって測定した阻害率 (Fig. 1) および ID₅₀ (Table 1) として示した。

a) 大腸菌

CPM の *E. coli* PBP に対する親和性は、PBP-3 に最も強く、0.04 $\mu\text{g/ml}$ の ID₅₀ を示し、続いて PBP-1A、2、1Bs の順に強い親和性を示すが 4、5、6 に対しては、ほとんど結合しなかった。CPZ も類似の結合親和性を示し、PBP-3 に対する親和性が最も強く、続いて 1A、1Bs、2 の順であった。CEZ はこれら 2 剤と異なり PBP-1A に対して最も強い親和性を示すが PBP-1Bs、2、3 に対しては 10~100 倍、弱い親和性しか示さなかった。また、CPM がほとんど結合しない PBP-4 に対して CEZ は比較的強い親和性を示した。

b) 緑膿菌

P. aeruginosa PBP に対する親和性では、CPM は PBP-3、1A、4、1B の順に強い親和性を示し、ID₅₀ は

Fig. 1 Densitometry of PBPs in *E. coli* and *P. aeruginosa* that preincubated with CPM

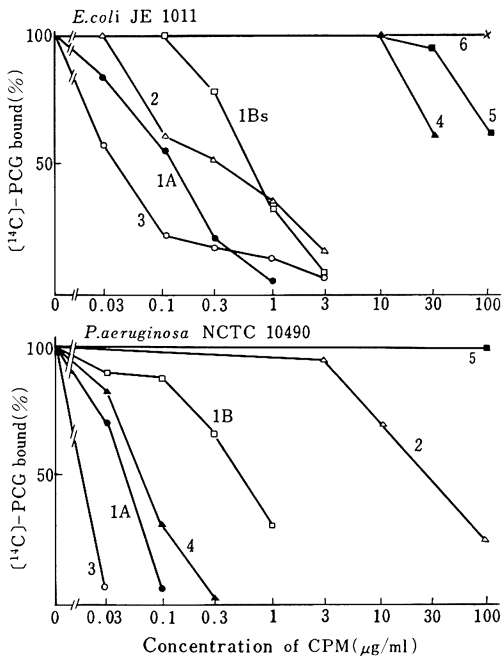


Table. 1 Affinity of CPM to PBPs (ID₅₀ values)

(1) *E. coli* K12 JE1011

ID ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)	1A	1Bs	2	3	4	5 / 6	MIC ($\mu\text{g/ml}$)
CPM	0.12	0.65	0.35	0.04	>100	>100	1.56
CPZ	0.18	0.44	0.64	0.02	52	>100	0.20
CEZ	0.05	4.3	3.1	2.3	3.7	>100	0.78

(2) *P. aeruginosa* NCTC 10490

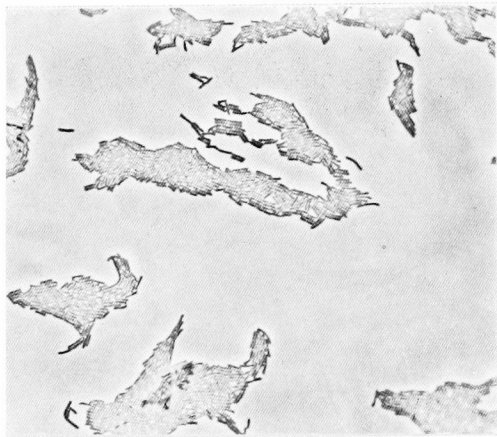
ID ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)	1A	1B	2	3	4	5	MIC ($\mu\text{g/ml}$)
CPM	0.04	0.60	50	0.01	0.06	>100	0.20
CPZ	0.05	1.0	>100	0.01	0.02	>100	0.39
CEZ	0.40	0.23	>100	2.2	0.04	>100	>800

N.B. 1) Method; preincubation method [¹⁴C - PCG was added after preincubation of membrane with β -lactams.]

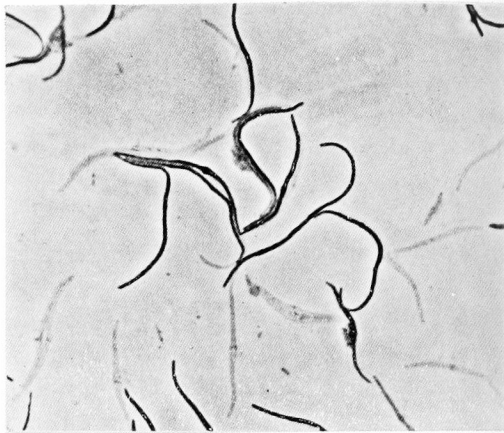
2) ID₅₀ indicates the concentration of β -lactams require to reduce ¹⁴C - PCG binding by 50%.

Fig. 2 Phase-contrast micrographs of *E. coli* NIHJ JC-2 expose to CPM for 2.5 hours at 37°C

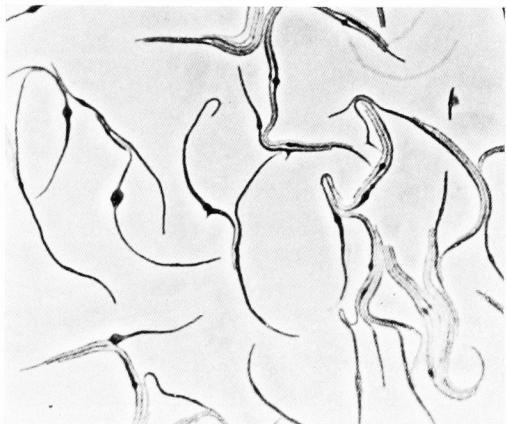
0 μ g/ml



6.25 μ g/ml



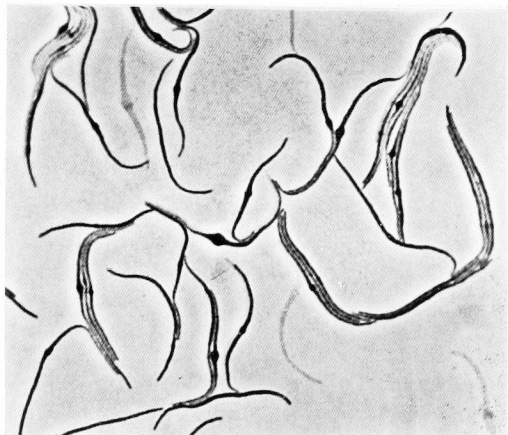
0.1 μ g/ml



25 μ g/ml



1.56 μ g/ml



それぞれ、0.01, 0.04, 0.06, 0.60 $\mu\text{g/ml}$ であったが、PBP-2 に対する親和性は弱く、PBP-5 にはほとんど結合しなかった。CPZ は、PBP-3 に最も強い親和性を示し、続いて PBP-4, 1A, 1B の順であり PBP-2, 5 には CPM と同様にほとんど結合しなかった。CEZ は PBP-4 に対して最も強い親和性を示し、続いて PBP-1B, 1A, 3 の順であり PBP-2, 5 にはほとんど結合しなかった。

2. 形態変化の観察

薬剤の4倍希釈系列濃度を含むフィルム寒天上に *E. coli* NIHJ JC-2 および *P. aeruginosa* PAO 2142 を塗抹し、その形態変化を位相差顕微鏡により観察した。Fig. 2, 3, 4, 5, 6 に示した形態変化の特徴より、filament 形成濃度、spheroplast 形成濃度、溶菌像を認める濃度の3種に分類し、薬剤濃度と形態変化との関係を Fig. 7

のグラフに示した。

a) 大腸菌

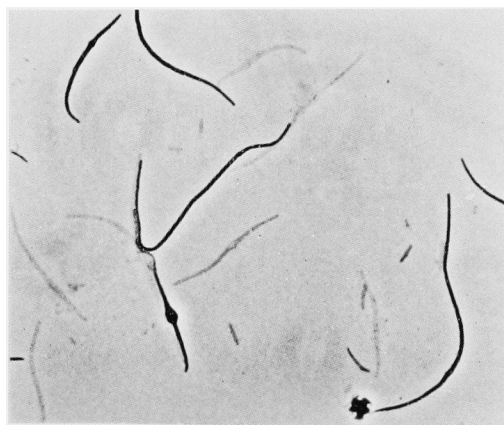
CPM による形態変化は Fig. 2 に示すように 0.1 $\mu\text{g/ml}$ の低濃度で始まり filament および中央が膨化した bulge form が観察される。濃度が、1.56 $\mu\text{g/ml}$ になると溶菌像が観察され始め、25 $\mu\text{g/ml}$ では完全に溶菌した残滓のみが観察される。CPZ は Fig. 3 に示すように CPM と同様の変化を示す。CEZ は、Fig. 4 に示すが、CPM で filament が観察される 0.1 $\mu\text{g/ml}$ の濃度では形態変化は認められず正常細胞のみが観察される。0.39 $\mu\text{g/ml}$ の濃度になると filament が観察され始め、MIC 濃度である 1.56 $\mu\text{g/ml}$ では filament および bulge form が観察されるが 6.25 $\mu\text{g/ml}$ になると filament は認められず溶菌像のみが観察された。

b) 緑膿菌

Fig. 3 Phase-contrast micrographs of *E. coli* NIHJ JC-2 exposed to CPZ for 2.5 hours at 37°C

0.1 $\mu\text{g/ml}$

6.25 $\mu\text{g/ml}$



1.56 $\mu\text{g/ml}$

25 $\mu\text{g/ml}$

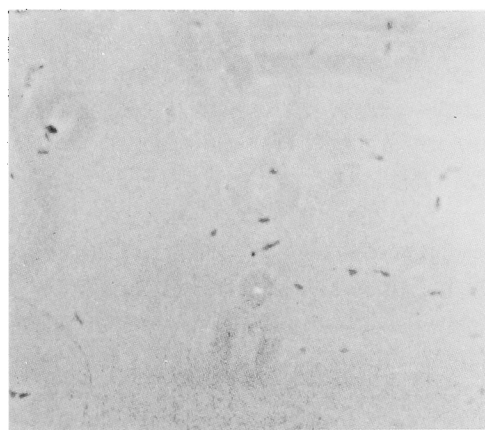
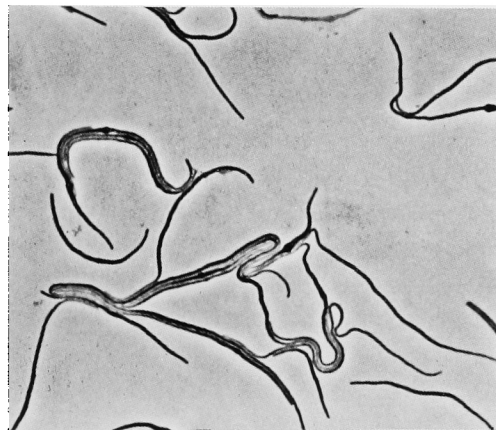
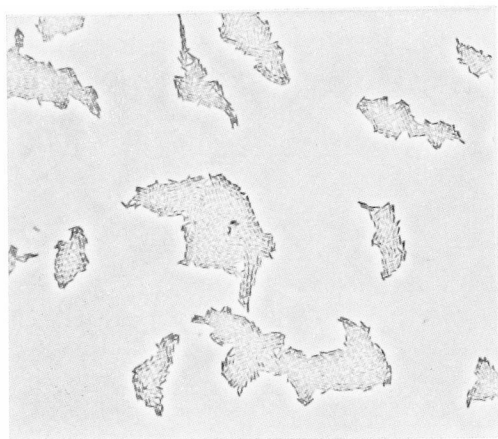
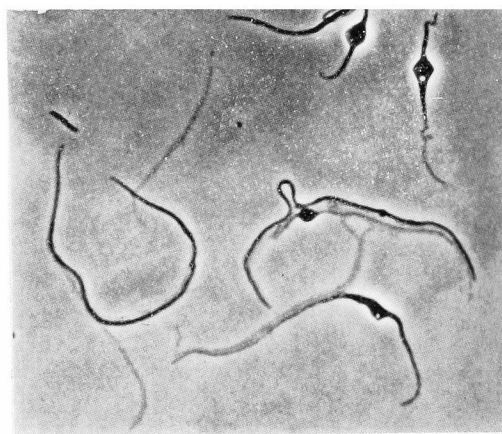


Fig. 4 Phase-contrast micrographs of *E. coli* NIHJ JC-2 exposed to CEZ for 2.5 hours at 37°C

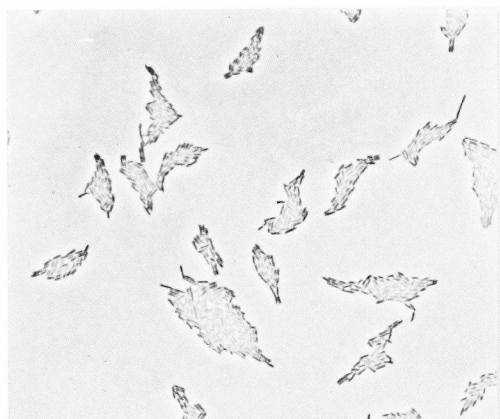
0.1 μ g/ml



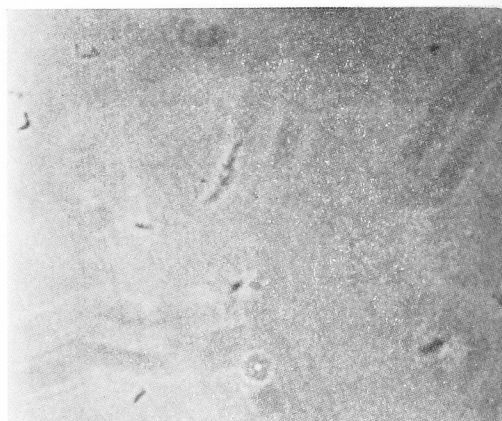
1.56 μ g/ml



0.39 μ g/ml



6.25 μ g/ml



CPM による形態変化は Fig. 5 に示されるように 0.39 μ g/ml の低濃度で filament が観察され始めるが spheroplast が観察されるのは、100 μ g/ml 以上の濃度であり、filament の形態を示す濃度幅が極めて大きい。1,600 μ g/ml の高濃度においても溶菌しない filament が残っており、また、球形化した細胞も観察された。CPZ による形態変化は Fig. 6 に示すが、CPM とほぼ同様の変化を示した。

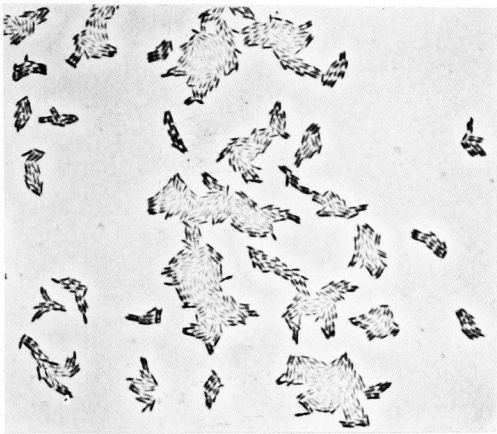
III. 考 察

Penicillin binding protein (PBP) は β -lactam 抗生物質の標的酵素であり、細菌の細胞膜に存在して、peptidoglycan の生合成に関与している。PBP に関する研究は主に、大腸菌を用いて行なわれ、各々の PBP の役割が明らかになってきた。大腸菌において CPM が最も強い親和性を示す PBP-3 (ID₅₀: 0.04 μ g/ml) は

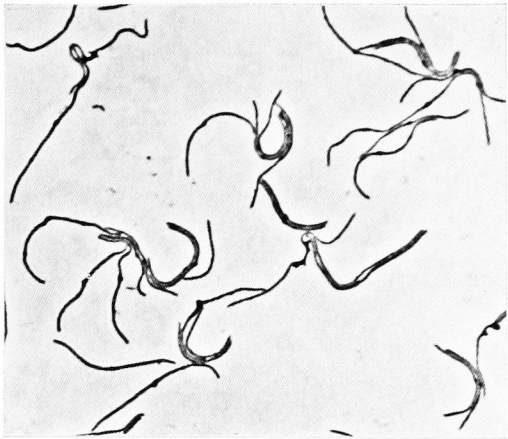
transglycosylase と transpeptidase の活性をもつ bi-functional enzyme⁹⁾ であり、隔壁合成に関与する。PBP-3 の transpeptidase 活性が阻害されると細胞は分裂できず filament cell を形成すると考えられるが⁹⁾、MIC 以下の低濃度の CPM の存在で、やはり filament cell の形成が観察された。CPM は PBP-1A, 1Bs にも強い親和性を示し、ID₅₀ はそれぞれ 0.12, 0.65 μ g/ml であった。PBP-1Bs は PBP-3 と同様の bi-functional enzyme⁹⁾ で、 β -lactam 抗生物質の溶菌作用の主要な標的であり、PBP-1A は 1Bs の detour enzyme¹⁰⁾ と考えられる。この両者を 1 μ g/ml 以下で同時に阻害することが CPM の強い溶菌作用の要因であろう。また、CPM は細胞の形態維持に関与すると考えられる PBP-2⁹⁾ にも強い親和性を示した。このように、CPM は大腸菌の生育に必須であると考えられる PBP-

Fig. 5 Phase-contrast micrographs of *P. aeruginosa* PAO 2142 exposed to CPM for 2.5 hours at 37°C

0µg/ml



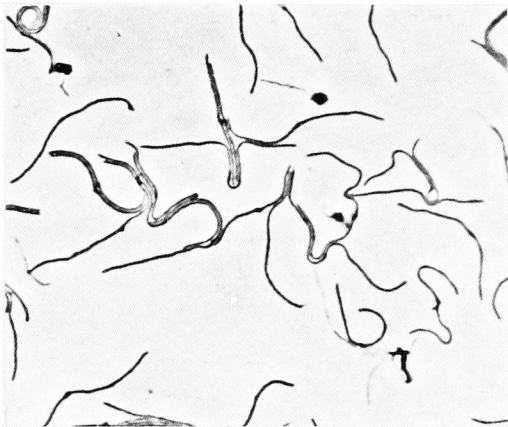
100µg/ml



0.39µg/ml



400µg/ml



1.56µg/ml

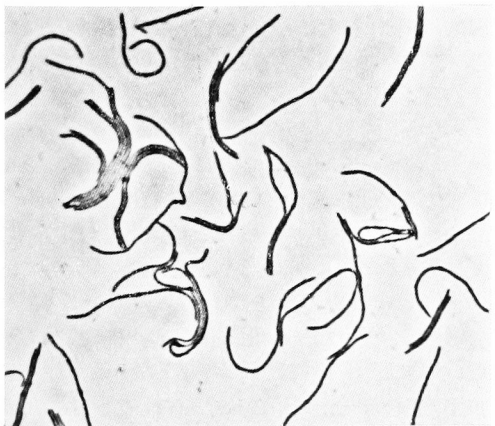
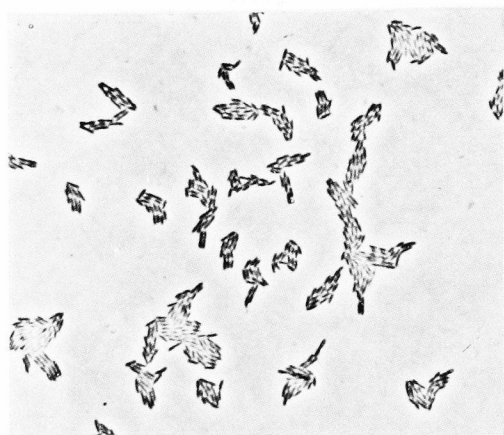


Fig. 6 Phase-contrast micrographs of *P. aeruginosa* PAO 2142 exposed to CPZ for 2.5 hours at 37°C

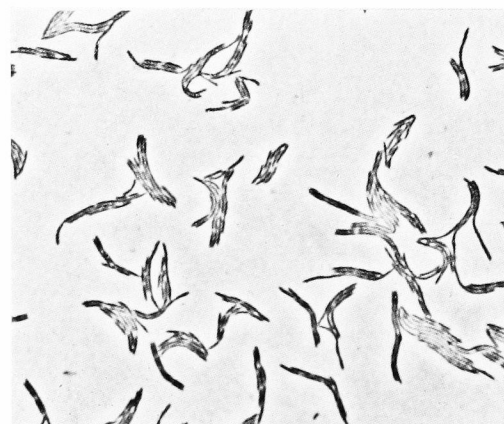
0.39 μ g/ml



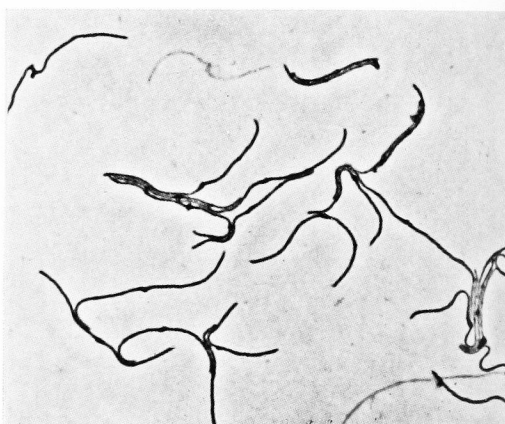
100 μ g/ml



1.56 μ g/ml



400 μ g/ml



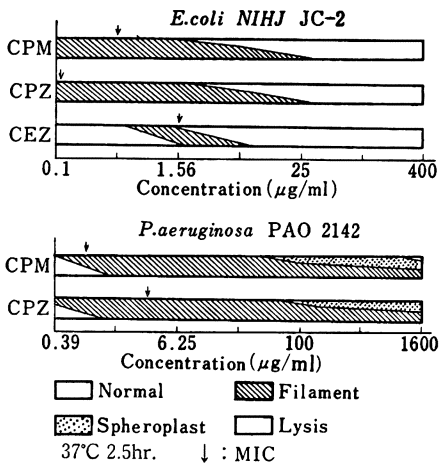
1A, 1Bs, 2, 3 に強い親和性を示すが、一方、PBP-4, 5/6 にはほとんど結合しなかった。PBP-4, 5/6 はそれぞれ D-alanine carboxypeptidase 1B, 1A¹¹⁾ であり生育には必須でないと考えられている^{12,13)}が、この変異株が β -lactam 抗生物質に対して高感受性を示すとの報告¹⁴⁾もあり、これらの PBP に親和性を示さないことが抗菌力にどのような影響を及ぼすかは明らかでない。CPZ の PBP に対する親和性は CPM に極めて類似しており、形態変化においても同様のことが観察された。これに対し CEZ は PBP-1A に ID₅₀ が 0.05 μ g/ml と強い親和性を示すが、PBP-1Bs, 2, 3 には ID₅₀ がそれぞれ 4.3, 3.1, 2.3 μ g/ml と中程度の親和性しか示さない。しかし、PBP-1Bs と 3 が同程度の濃度で阻害されることが、CEZ の形態変化において filament 形成の濃度幅が狭いことと関連していると考えられ、PBP に

対する親和性と形態変化の間の密接な関係が示唆される。

緑膿菌に関しても、CPM は大腸菌と同様 PBP-3 に最も強い親和性を示した。緑膿菌の PBP-1A, 1B, 2, 3, 4, 5 はそれぞれ大腸菌の PBP-1Bs, 1A, 2, 3, 4, 5/6 に対応すると考えられ¹⁵⁾、PBP-3 に対する強い親和性は、低濃度から filament cell が観察されることと一致している。緑膿菌において大腸菌と異なり filament 化の濃度幅が大きいのは、PBP-1A, 1B に対する ID₅₀ がそれぞれ 0.04, 0.60 μ g/ml と 15 倍も異なっていることや、PBP-2 に対する ID₅₀ が 50 μ g/ml と大きいことが影響しているとも考えられるが、詳細は明らかでない。

以上、述べたように β -lactam 抗生物質の lethal target である PBP に強い親和性を示すことが、CPM

Fig. 7 Morphological change of *E. coli* and *P. aeruginosa*



の大腸菌および緑膿菌に対する強い抗菌力の一つの要因であろう。特に PBP-3 に対する親和性の強さは、filament 形成という形態変化によっても裏付けられた。

文 献

- 1) KOMATSU, T.; T. OKUDA, H. NOGUCHI, M. FUKASAWA, K. YANO, M. KATO & S. MITSUHASHI: SM-1652, a new parenterally active cephalosporin: microbiological studies. Current Chemotherapy and Infectious Disease. Proceedings of the 11 th ICC and the 19 th ICAAC. 1: 275~278, 1980
- 2) KATO, M.; M. FUKASAWA, H. NOGUCHI, T. OKUDA, T. KOMATSU, K. YANO & S. MITSUHASHI: Comparative studies of SM-1652 with other recently developed cephalosporins. 12 th International Conference of Chemotherapy 300, 1981
- 3) 日本化学療法学会: 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法。Chemotherapy 23: 1~2, 1975
- 4) SPRATT, B. G.: Distinct penicillin binding proteins involved in the division, elongation, and shape of *Escherichia coli* K 12. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. 72: 2999~3003, 1975
- 5) 松橋通生, 野口 浩, 玉城成夫: ペニシリン結合蛋白質, 一理論と実際一。Chemotherapy 27: 827~840, 1979
- 6) LOWRY, O. H.; N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR & R. J. RANDALL: Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem.

- 193: 265~275, 1951
- 7) BONNER, W. M & R. A. LASKEY: A film detection method for tritiumlabelled proteins and nucleic acid in polyacrylamide gels. Eur. J. Biochem. 46: 83~88, 1974
- 8) ISHINO, F. & M. MATSUHASHI: Peptidoglycan synthetic enzyme activities of highly purified penicillin-binding protein 3 in *Escherichia coli*: A septum-forming reaction sequence. Biochem. Biophys. Res. Comm. 101: 905~911, 1981
- 9) NAKAGAWA, J.; S. TAMAKI & M. MATSUHASHI: Purified penicillin binding proteins 1 Bs from *Escherichia coli* membrane showing activities of both peptidoglycan polymerase and peptidoglycan crosslinking enzyme. Agric. Biol. Chem 43: 1379~1380, 1979
- 10) TAMAKI, S.; S. NAKAJIMA & M. MATSUHASHI: Thermosensitive mutation in *Escherichia coli* simultaneously causing defects in penicillin-binding protein-1 Bs and in enzyme activity for peptidoglycan synthesis *in vitro*. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. 74: 5472~5476, 1977
- 11) 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 1 A. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. 75: 2631~2635, 1978
- 12) MATSUHASHI, M.; Y. TAKAGAKI, I. N. MARUYAMA, S. TAMAKI, Y. NISHIMURA, H. SUZUKI, U. OGINO & Y. HIROTA: Mutants of *Escherichia coli* lacking in highly penicillin-sensitive D-alanine carboxypeptidase activity. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. 74: 2976~2979, 1977
- 13) TAMURA, T.; Y. IMAE & J. L. STROMINGER: Purification to homogeneity and properties of two D-alanine carboxypeptidase I from *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 251: 414~423, 1976
- 14) TAMAKI, S.; J. NAKAGAWA, J. N. MARUYAMA & M. MATSUHASHI: Supersensitivity to β -lactam antibiotics in *Escherichia coli* caused by D-alanine carboxypeptidase 1 A mutation. Agric. Biol. Chem. 42: 2147~2150, 1978
- 15) NOGUCHI, H.; M. MATSUHASHI & S. MISHUHASHI: Comparative studies of penicillin-binding proteins in *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*. Eur. J. Biochem. 100: 41~49, 1979

CEFPIRAMIDE (SM-1652), A NEW BROAD-SPECTRUM
CEPHALOSPORIN : AFFINITY TO PENICILLIN-
BINDING PROTEINS AND MORPHOLOGICAL
ALTERATION

MASATOMO FUKASAWA, MASUHIRO KATO,

TAKAO OKUDA and TOSHIAKI KOMATSU

Research Department, Pharmaceuticals Division, Sumitomo Chemical Co., Ltd.

KUNIICHIRO YANO

Central Research Laboratories, Yamanouchi Pharmaceuticals Co., Ltd.

Cefpiramide (CPM, SM-1652) is a new broad-spectrum cephalosporin with marked antipseudomonal activity. Effect of cefpiramide on penicillin binding proteins (PBPs) and morphological alteration in *E. coli* and *P. aeruginosa* was studied. Cefpiramide possessed the highest affinity for PBP-3 in both bacteria. It also had high affinities for PBP-1A, -1Bs, and -2 in *E. coli* and PBP-1A, -1B, and -4 in *P. aeruginosa*, and low affinities for PBP-4, -5, and -6 in *E. coli* and PBP-2 and -5 in *P. aeruginosa*. These results are compatible with morphological observations that at lower concentrations than its minimal inhibitory concentration, this antibiotic induced the formation of filamentous cells of *E. coli* and *P. aeruginosa*. At higher concentrations, it induced lysis of the cells. In *P. aeruginosa*, the range of concentration at which the formation of filamentous cells would be induced was wider than that in *E. coli*.