

## TA-058 の大腸菌に対する抗菌作用機作に関する研究

西野武志・後藤直正・石井信男・谷野輝雄  
京都薬科大学微生物学教室

(昭和 59 年 6 月 8 日受付)

TA-058 の *Escherichia coli* K-12 に対する抗菌作用機作について Piperacillin (PIPC) を比較薬として検討した。

増殖曲線に及ぼす影響では TA-058 は特に菌量が多い場合に優れた殺菌作用を示した。位相差顕微鏡による観察において MIC では TA-058 も PIPC も菌を伸長化させたが, 10 倍 MIC の TA-058 を作用させると菌はあまり伸長化せず spheroplast 様あるいは bulge 様構造を形成して溶菌した。同濃度の PIPC を作用させても菌は伸長化するだけであった。走査型電子顕微鏡による観察でも同様な形態変化が観察された。

Penicillin binding proteins (PBPs) に対する親和性について検討したところ TA-058 は 2, 1 A, 3, 1 B<sub>s</sub> に親和性を示し, 一方 PIPC は 3 に対して強い親和性を示した。

TA-058 は田辺製薬株式会社で開発された新しい半合成ペニシリン系抗生物質であり<sup>1)</sup>, 化学構造式は下図に示すとおりである (Fig. 1)。その抗菌スペクトラムは Piperacillin と同様で, グラム陽性菌群および陰性菌群に対し幅広い抗菌力を有する<sup>2)</sup>。

TA-058 の作用は殺菌的でありその殺菌力および溶菌作用は接種菌量が高い場合他の同系のペニシリン剤に比べて優れていると報告されている<sup>3)</sup>。

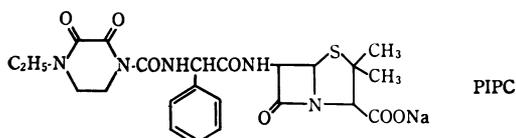
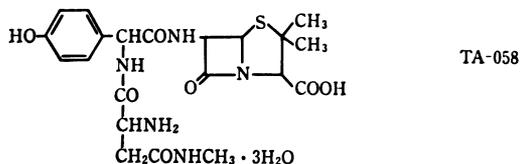
今回, 私どもは TA-058 の抗菌作用機作を明らかにすべく *E. coli* K-12 の形態学的変化および Penicillin binding proteins (PBPs) との親和性について検討を行った。

### I. 実験材料および実験方法

#### 1. 使用菌株および使用薬

菌株は *Escherichia coli* K-12 を用い, 薬としては TA-058 および Piperacillin (PIPC) のいずれも力価の

Fig. 1 Chemical structure of TA-058 and PIPC



明らかなるものを用いた。なお TA-058 および PIPC の *E. coli* K-12 に対する MIC はともに 1.56  $\mu\text{g/ml}$  であった。

#### 2. 位相差顕微鏡による観察

スライドガラス上に各薬剤を含む寒天を作り, 対数期途上の菌液 ( $5\sim 9 \times 10^7$  cells/ml) をカバーガラスに塗抹し, これをフィルム寒天にかぶせ周囲をパラフィンで封入し, 37°C 恒温装置付倒立型位相差顕微鏡 (日本光学) を用いて経時的に菌の形態を観察した。

#### 3. 走査型電子顕微鏡による観察

Trypto-Soya Broth (TSB: ニュスイ) を用いて前培養した菌を約 1% の割合で Heart Infusion Broth (HIB: ニュスイ) に接種し, 37°C で振とう培養を行った。培養約 3 時間後の対数期途上に薬剤を作用させ, 1, 2, 4 時間後に生菌数を測定すると同時に菌体を集め, 電子顕微鏡用の試料とした。集めた菌体は 1% glutar-aldehyde 溶液にて前固定し, KELLENBERGER 法<sup>4)</sup>の方法に従って 1% OsO<sub>4</sub> で本固定後, アルコール系列で脱水して酢酸イソアミールに置換し, 臨界点乾燥法<sup>5)</sup>により乾燥した。次いで, カーボンおよび金を蒸着し走査型電子顕微鏡 JSM-35 (日本電子) で菌体の表面構造を観察した。

#### 4. Penicillin binding proteins (PBPs) に対する親和性

SPRATT の方法<sup>6,7)</sup>に従って行なった。すなわち *E. coli* K-12 を HIB によって 37°C で振とう培養し, 対数増殖期の後半 (O. D. at 660 nm = 0.8) に達心して集菌した。これを 0.01 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) に懸濁

し、超音波処理後、超遠心にかけ約 20~30 mg protein/ml の膜画分を得た。この膜画分に TA-058 および PIPC を加え 30°C 10 分間反応させた後、<sup>14</sup>C-Penicillin G<sub>2</sub>(<sup>14</sup>C-PCG) を加え、さらに 10 分間 30°C 保温した。反応後直ちに PCG と Sarkosyl を加えて、反応を停止させるとともに細胞質膜を可溶化した。これに SDS 溶液とメルカプトエタノールを加え、沸騰水浴中で 2 分間加熱処理して、SDS ポリアクリルアミド・スラブゲル電気泳動<sup>2)</sup>にて分離した後、フルオログラフィーで親和性の検討を行なった。

## II. 実験結果

*E. coli* の増殖曲線に及ぼす影響について検討したところ、前報ですでに報告したように<sup>1)</sup>、TA-058 は 10<sup>8</sup> cells/ml の菌に作用させた時とくに優れた殺菌作用を示した。この特徴がいかなる理由によるものかを *E. coli* K-12 を用いさらに詳細に検討し、以下のような結果を得た。

### 1. 位相差顕微鏡による観察

*E. coli* K-12 に TA-058 および PIPC の 1.56 μg/ml (MIC) を作用させた時の形態変化を Fig. 2 に、15.6 μg/ml を作用させた時のそれを Fig. 3 に示した。

TA-058 を作用させた場合、1.56 μg/ml では伸長化が見られたが、15.6 μg/ml ではあまり伸長化せず、bulge

様構造を示し溶菌が認められた。一方、PIPC は 15.6 μg/ml を作用させても菌は伸長化するのみで、わずかに溶菌像が観察されるだけであった。

このような形態変化の差異をさらに詳細に観察するために、次に走査型電子顕微鏡により検討した。

### 2. 走査型電子顕微鏡による観察

走査型電子顕微鏡用試料作製時の生菌数の変化を Fig. 4 に示した。TA-058 および PIPC の 1.56 μg/ml を作用させた時には両者間に差が認められなかったが、15.6 μg/ml を作用させると、2 時間および 4 時間後に TA-058 は PIPC より明らかに優れた殺菌作用を示した。この菌数の変化に対応する形態変化を Fig. 5~17 に示した。

Fig. 5 は正常な *E. coli* K-12 の走査電顕像で、表面の平滑な棒状形態を示している。

Fig. 6, 7, 8 は TA-058 の 1.56 μg/ml をそれぞれ 1, 2, 4 時間作用させた時の走査電顕像で、菌体は伸長化し 4 時間後においても filament 状の形態を示すのみであった。

Fig. 9, 10, 11 は TA-058 の 15.6 μg/ml をそれぞれ 1, 2, 4 時間作用させた時の変化で、伸長化はあまりせず、やや膨化して spheroplast 様、あるいは bulge 様構造を形成した後溶菌した像が観察された。

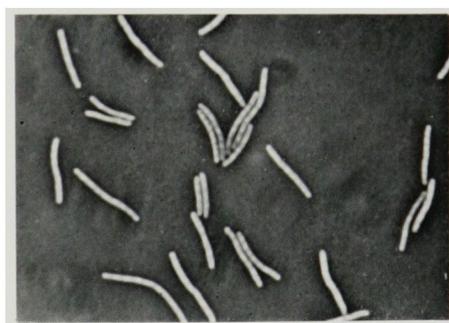
Fig. 2 Phase contrast micrograph of *E. coli* K-12 exposed

TA-058 (1.56 μg/ml)

PIPC (1.56 μg/ml)



1 hr.



2 hrs.

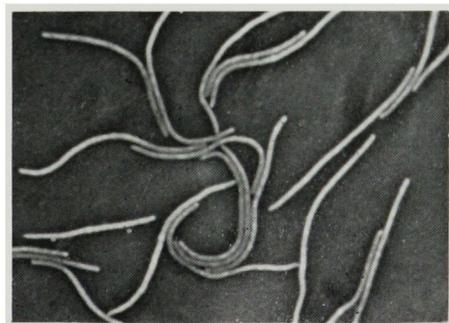


Fig. 3 Phase contrast micrograph of *E. coli* K-12 exposed  
TA-058 (15.6  $\mu\text{g/ml}$ ) PIPC (15.6  $\mu\text{g/ml}$ )

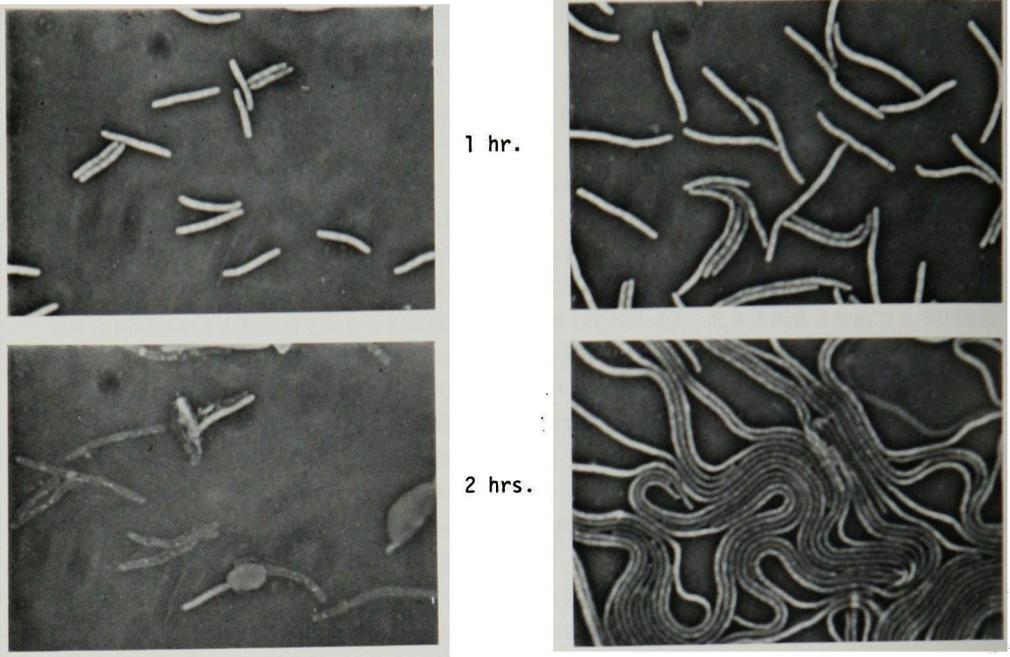
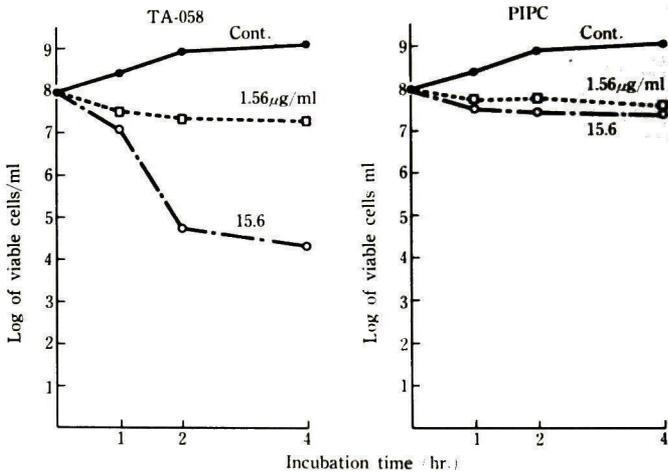


Fig. 4 Effect of TA-058 and PIPC on the viability of *E. coli* K-12



PIPC を作用させた時の形態変化は Fig. 12~17 に示すとおりである。すなわち Fig. 12, 13, 14 は PIPC の 1.56  $\mu\text{g/ml}$  をそれぞれ 1, 2, 4 時間作用させた時の走査電顕像で、TA-058 作用時と同様に 4 時間後においても伸長化して、filament 状の形態を示した。Fig. 15, 16, 17 は PIPC の 15.6  $\mu\text{g/ml}$  をそれぞれ 1, 2, 4 時

間作用させた時の形態変化であるが、作用時間の経過とともに一層長くなった filament 状の形態が真られ、同濃度の TA-058 を作用させた時に見られた bulge 様構造は観察できなかった。

TA-058 と PIPC との間に見られたような形態変化の差異をさらに詳細に検討するために、Penicillin bind-

Fig. 5 Untreated *E. coli* K-12 cells observed by scanning electron micrograph

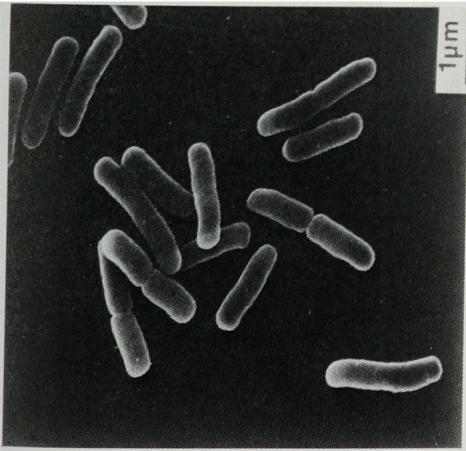


Fig. 6 Scanning electron micrograph of *E. coli* K-12 exposed to 1.56 μg/ml of TA-058 for 1 hour

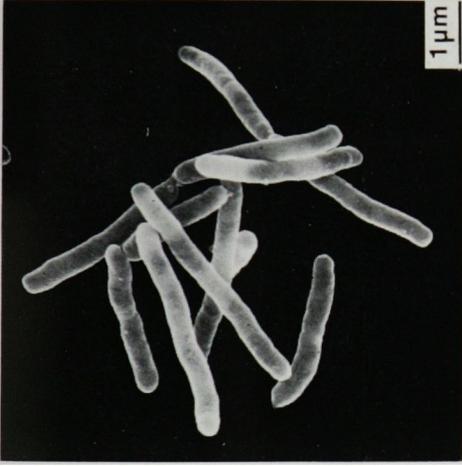


Fig. 7 Scanning electron micrograph of *E. coli* K-12 exposed to 1.56 μg/ml of TA-058 for 2 hours

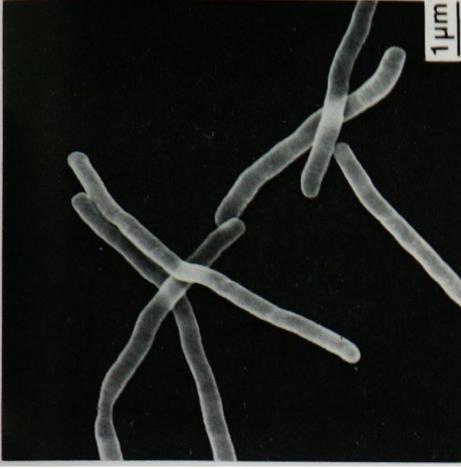


Fig. 8 Scanning electron micrograph of *E. coli* K-12 exposed to 1.56 μg/ml of TA-058 for 4 hours



Fig. 9 Scanning electron micrograph of *E. coli* K-12 exposed to 15.6 μg/ml of TA-058 for 1 hour



Fig. 10 Scanning electron micrograph of *E. coli* K-12 exposed to 15.6 μg/ml of TA-058 for 2 hours



Fig. 13 Scanning electron micrograph of *E. coli* K-12 exposed to 1.56  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of PIPC for 2 hours



Fig. 12 Scanning electron micrograph of *E. coli* K-12 exposed to 1.56  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of PIPC for 1 hour



Fig. 11 Scanning electron micrograph of *E. coli* K-12 exposed to 15.6  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of TA-058 for 4 hours



Fig. 16 Scanning electron micrograph of *E. coli* K-12 exposed to 15.6  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of PIPC for 2 hours



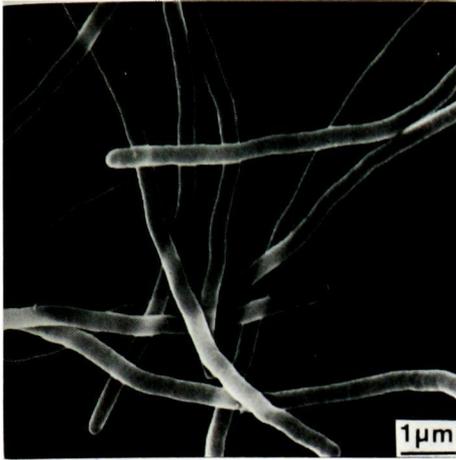
Fig. 15 Scanning electron micrograph of *E. coli* K-12 exposed to 15.6  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of PIPC for 1 hour



Fig. 14 Scanning electron micrograph of *E. coli* K-12 exposed to 1.56  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of PIPC for 4 hours



Fig. 17 Scanning electron micrograph of *E. coli* K-12 exposed to 15.6  $\mu\text{g/ml}$  of PIPC for 4 hours



ing proteins に対する親和性を検討した。

### 3. PBP<sub>s</sub> に対する親和性

SPRATT<sup>5,6)</sup> の方法により <sup>14</sup>C-PCG に対して TA-058 は、モル比で 0.2 倍、1 倍、5 倍、25 倍に加え検討を行なった結果、Fig. 18 に示すように TA-058 は PBP<sub>2</sub>, 1B<sub>s</sub> に対し強い親和性を有していた。一方、PIPC は 3 に対する親和性が強く認められた。

### III. 考 察

今回私どもは新しく合成されたペニシリン系抗生物質である TA-058 の *E. coli* K-12 に対する抗菌作用機作に興味を持ち、PIPC を比較薬として検討を行なった。TA-058 は接種菌量が高い場合にとくに優れた殺菌作用を示し、その時の形態変化を位相差顕微鏡および走査型電子顕微鏡で観察したところ、TA-058 の 15.6  $\mu\text{g/ml}$

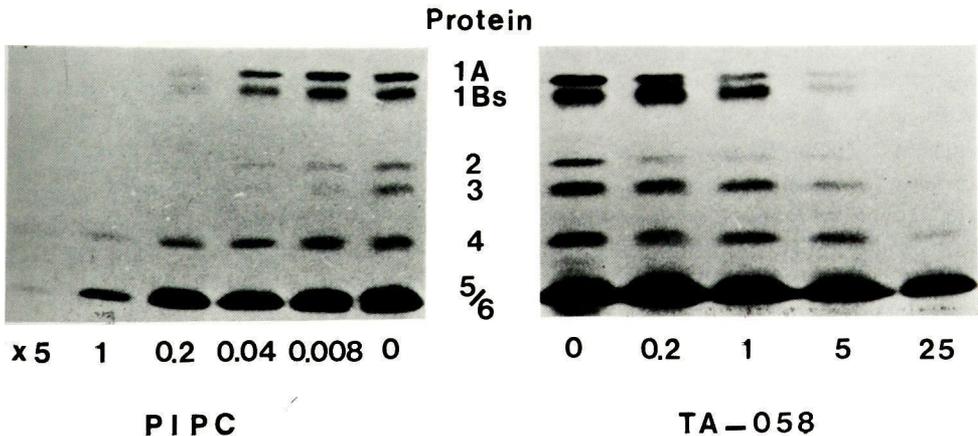
(10 倍 MIC) を作用させると菌体はあまり伸長化せず spheroplast 様構造あるいは bulge 様構造を形成して溶菌したが、PIPC の 15.6  $\mu\text{g/ml}$  を作用させても菌は filament 状を呈するのみで、spheroplast 様構造などは観察されなかった。

一般的に  $\beta$ -lactam 抗生物質のグラム陰性桿菌に対する抗菌作用は、1)  $\beta$ -lactamase に対する安定性、2) 菌体外膜の透過性、3) Penicillin binding proteins (PBP<sub>s</sub>) に対する親和性、これら 3 つの因子が相互に関連しているものと考えられるが、TA-058 の  $\beta$ -lactamase に対する安定性は PIPC と同様の傾向を示すと報告されており<sup>6)</sup>、今回私どもが行なった PBP<sub>s</sub> に対する親和性では、TA-058 は PBP<sub>s</sub> 2, 1A, 1B<sub>s</sub> に強い親和性を有していた。PBP<sub>2</sub> は細胞形態の維持、1A, 1B<sub>s</sub> は殺菌力に関係があると考えられており、この差が TA-058 の優れた殺菌作用に関与しているものと思われるが、これ以外の因子である外膜透過性などとの関連性も注目され、さらに検討を行なう必要があるものと思われる。

### 文 献

- 1) WAGATSUMA, M.; M. SETO, T. MIYAGISHIMA, T. YAMAGUCHI, S. OHSHIMA & M. KAWAZU: Synthesis of aminoacid derivatives of aminobenzyl penicillin. ACS/CSJ Chemical congress April 4, 1979. Honolulu, Hawaii, U. S. A. (Abstract No. 45, Medicinal chemistry section)
- 2) 西野武志, 石井信男, 谷野輝雄: 半合成ペニシリン系抗生物質 TA-058 に関する細菌学的評価 Chemotherapy 32(S-2): 47~66, 1984
- 3) KELLENBERGER, E.; A. RYTER & J. SECHAUD: Electron microscope study of DNA-containing plasmids. II. Vegetative and mature

Fig. 18 Fluorography showing competition of TA-058 and PIPC for <sup>14</sup>C-labeled PCG binding in *E. coli* K-12



- phage DNA as compared with normal bacterial nucleoids in different physiological states. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 4: 871~878, 1958
- 4) HORIDGE, G. A. & S. L. TAMM: Critical point drying for scanning electron microscopic study of ciliary motion. *Science* 163: 817~818, 1969
- 5) SPRATT, B. G.: Distinct penicillin binding proteins involved in the division, elongation, and shape of *Escherichia coli* K-12. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 72: 2999~3003, 1975
- 6) SPRATT, B. G.; V. JOBANPUTRA & U. SCHWAB: Mutants of *Escherichia coli* which lack a component of penicillin-binding protein 1 are viable. *FEBS Lett.* 79: 374~378, 1977
- 7) 林 健志, 大場義樹: SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法。蛋白質・核酸・酵素 17: 304~311, 1972
- 8) 五島聡智子, 宮崎修一, 辻 明良, 小川正俊, 金子麻子, 桑原章吾: 新広域ペニシリン剤 TA-058 の *in vitro*, *in vivo* 細菌学的評価 *Chemotherapy*. 32(S-2): 20~35, 1984

## A STUDY ON THE MECHANISM OF ANTIBACTERIAL ACTION OF TA-058 AGAINST *E. COLI*

TAKESHI NISHINO, NAOMASA GOTO, NOBUO ISHII  
and TERUO TANINO

Department of Microbiology, Kyoto College of Pharmacy

Mechanism of antibacterial action was studied with TA-058 against *Escherichia coli* K-12 using piperacillin (PIPC) as control drug. As to the effect on the growth curve of bacteria, bactericidal action of TA-058 was strong even when the inoculum size was increased. In morphological observation by a phase-contrast microscope, exposure to the MIC of TA-058 or PIPC resulted in the formation of filamentous cells. However, at the 10 MIC of TA-058, bacteria were slightly elongated, formed spheroplast-like or bulge-like structure and lysed. As compared with TA-058, the 10 MIC of PIPC caused only elongation of cells. The above described morphological changes caused by both drugs were further ascertained by scanning electron micrography. TA-058 showed the affinity for penicillin binding protein (PBP)-2, -1 A, -3 and -1 Bs, and PIPC showed strong affinity to PBP-3.