

세균의 지방산 생합성 효소 (Enoyl-Acyl Carrier Protein Reductase, FabI) 를 저해하는 새로운 항균물질의 스크리닝

곽진환[#]

한동대학교 생물식품공학부

(Received December 20, 2001; Revised January 30, 2002)

Screening of New Antibiotics Inhibiting Bacterial Enoyl-Acyl Carrier Protein Reductase (FabI)

Jin-Hwan Kwak[#]

School of Bioscience and Food Technology, Handong University, Pohang, Kyung-Buk 791-940, Korea

Abstract — Enoyl-Acyl Carrier Protein Reductase (FabI) of bacteria is known as an important target for new antibacterial drugs and plays a determinant role in completing cycles of elongation in type-II fatty acid synthase system. In this study, a *fabI* gene from *Staphylococcus aureus* 6538p was cloned in pET-14b vector and FabI protein was over-produced in *Escherichia coli* BL21 (DE3). NH₂-terminal His-tagged FabI protein was purified by nickel-nitrilotriacetic acid (Ni-NTA) metal-affinity chromatography. Purified 6xHis-tagged FabI showed a catalytic activity on *trans*-2-octenoyl-*N*-acetylcysteamine by utilizing NADPH as a cofactor. For the discovery of new FabI inhibitors from chemical libraries, a target-oriented screening system using a 96-well plate was developed. About 10,000 chemical libraries from Korea Chemical Bank were tested in this screening system, and 26 chemicals (0.25%) among them showed an inhibitory activity against FabI enzyme. This result showed that a new screening system can be used for the discovery of new FabI inhibitors.

Keywords □ Bacterial Enoyl-Acyl Carrier Protein Reductase (FabI), Antibiotics, Screening, Essential Gene Target

새로운 항균제를 개발하기 위한 최근의 연구 동향은, 기존 항균제의 단순한 화학적 변형과 같은 me-too approach 방법보다는 genome이 완전 해독된 주요 세균으로부터 필수적인 유전자 타겟(essential gene target) comparative genomics 정보를 이용해서 선별하고, 이로부터 개발된 새로운 target-oriented screening system을 이용해서 새로운 화학구조와 새로운 작용기전을 가진 항균제를 개발하는 것이 주류를 이루고 있다.¹⁻³⁾

지방산은 생명체에서 에너지원으로서 뿐만 아니라 세포막의 주성분으로 생명 현상의 유지에 필수적인 역할을 한다. 따라서 세포 내의 이들 지방산 생합성 과정은 모든 살아있는 세포에서 필수적으로 존재하는 생화학적 과정이며, 이에 관여하는 유전자는 세균에서부터 사람에게까지 필수적으로 존재하는 일종의 essential gene이다. 세균과 같은 원핵세포와 고등동물세포인 진핵세포간에는 지방산 생합성의 각 과정은 매우 유사하지만, 이

과정에 관여하는 각종 효소는 서로 차이가 있다. 즉, 세균의 경우에는 7종의 효소들이 각각 별도로 존재하지만(type II-independent mono-functional enzymes), 고등 동물에서는 한 개의 큰 polypeptide가 7개의 서로 다른 반응에 관여하고 있기 때문에(type I-multifunctional enzymes), 효소차원에서는 큰 선택성(selectivity)이 존재한다. 더구나 최근에 항결핵제인 Isoniazid (INAH)의 작용 기전이 결핵균의 지방산 생합성을 저해하는 것으로 밝혀지면서,⁴⁾ 세균의 지방산 생합성에 관여하는 유전자는 새로운 항균제 개발을 위한 매우 유망한 타겟으로 관심의 초점이 되고 있다. 그리고 최근의 연구 결과들은 세균의 지방산 생합성의 과정 중에서 특히 enoyl-acyl carrier protein reductase (FabI)가 지방산 생합성의 rate-limiting step으로서 가장 유망한 항균제 타겟인 것을 보여주고 있다.⁵⁻⁷⁾

새로운 항균제의 개발을 위한 세균의 새로운 타겟으로서의 *fabI* 유전자는 다음과 같은 장점을 갖는다. 첫째, 기존의 항균제 타겟과는 전혀 다른 새로운 것이며, FabI 효소 저해제로서 실제로 임상에서 사용되고 있는 것은 항결핵제인 Isoniazid(INAH)가 유일한 것이기 때문에, 새로운 저해물질이 발굴되면 신규성이 있는

[#]본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 054-260-1353 (팩스) 054-261-6705
(E-mail) jhkwak@handong.edu

신약후보로서의 가능성이 매우 높다. 둘째, 진핵세포와의 효소 구조상의 차이로 인해 매우 선택성이 높아서 낮은 독성이 예상되며, 또한 그람양성, 그람음성 세균간의 염기서열에 대한 유사성을 조사함으로써 항균 스펙트럼을 예측할 수 있다. 셋째, 최근에 FabI 효소를 저해하는 물질로 밝혀진 INAH,⁸⁾ triclosan⁹⁻¹⁰⁾ 등의 화합물들이 실제로 세균에 대해 항균 효과도 가지고 있다는 사실로부터, 새로운 타겟의 선정에 있어서 가장 중요한 요소인 target validation이 이미 증명되어 있다. 넷째, 이 효소를 이용한 항균제 검색계는 매우 간단하여서 HTS(High Through-put Screening) 시스템의 개발이 용이하고 따라서 짧은 기간에 많은 양의 시료를 검색할 수 있다는 장점이 있다.

따라서 본 연구에서는 최근에 큰 문제가 되고 있는 다제약제 내성균주인 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*)에 유효한 새로운 항균물질을 개발하기 위해, *Staphylococcus aureus*의 지방산 생합성에 관여하고 있는 *fabI* 유전자를 클로닝하고, 이로부터 FabI 효소를 다량 순수 분리 정제하였다. 또한 FabI 저해제를 스크리닝 할 수 있는 검색계를 개발하여, 한국화학연구원의 화합물은행(Korea Chemical Bank)으로부터 분양 받은 화합물 중에서 약 10,000 여 개의 화합물에 대해 FabI 저해제를 스크리닝한 결과, 이 중 약 0.25%에 해당하는 26개의 화합물이 세균의 FabI에 대해 효소 저해 효과를 보였다.

실험방법

시약

Lysostaphin, lysozyme, NADPH, Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside(IPTG)는 Sigma사 제품을 사용하였고, *trans*-2-octenoyl-N-acetylcysteamine(C₁₂H₂₁NO₂S)는 서강대 화학과에서 직접 합성하였다. Triclosan은 Aldrich사 제품을, Taq polymerase 및 제한 효소는 Takara사의 제품을, 항균력 측정용 cellulose disk는 Toyo Roshi Kaisha사 제품을, LB 배지는 Difco사 제품을 사용하였다. 스크리닝에 사용한 화합물들은 한국화학물은행(Korea Chemical Bank)에서 분양을 받았다.

*Staphylococcus aureus*로부터 genomic DNA의 분리

Staphylococcus aureus 6538p 균주로부터 genomic DNA를 추출하기 위해, 균을 10 ml의 LB 배지에서 키운 다음 원심분리에 의해 균체를 얻고, 여기에 500 μl의 digestion buffer(50 mM glucose, 100 mM Tris-HCl(pH 7.7), 100 mM EDTA, 100 μg/ml RNase A)를 첨가하여 잘 현탁 시켰다. 현탁액에 lysostaphin (10 units/ml)과 lysozyme(2.5 mg/ml)을 가하여 37°C에서 1시간 반응시킨 후, 최종 농도가 0.5%가 되도록 SDS를 첨가한 후 부드럽게 반응액을 섞었다. 여기에 동량의 phenol-chloroform-isoamyl alcohol(25 : 24 : 1) 용액을 첨가하여 vortex하여 잘 섞은

후, 12,000 g에서 5분간 원심분리 하였다. 상등액을 취하여 다시 깨끗한 Eppendorf tube로 옮긴 후, phenolchloroform-isoamyl alcohol(25 : 24 : 1) 용액을 이용한 추출 조작을 3회 되풀이하였다. 마지막으로 chloroform-isoamyl alcohol(24 : 1) 용액으로 추출하여 맑은 상등액을 얻은 후, 여기에 NaCl를 가하여 최종농도가 0.5 M이 되도록 하였다. 마지막으로 전체 반응액 용량의 2배 가량의 EtOH를 가하여 잘 섞은 후, 12,000 g에서 5분간 원심분리하여 DNA 침점물을 얻었다. 이것을 상온에서 잘 건조시킨 후 100 μl의 TE buffer에 녹였다.

Staphylococcus aureus fabI 유전자의 크로닝

Gene bank 및 Blast를 이용해 *S. aureus*를 비롯한 여러 종류의 세균으로부터 유래된 *fabI* 유전자의 염기 서열을 검색하고 분석하여 PCR 용 primer-I(5'-CATATGTTAAATCTTGAAAAA-CGTATGTCAT-3')과 primer-II(5'-GGATCCTTATTT-AATTGCGTGAATCCGCTATC-3')를 고안하였다. 이 primer는 NdeI 및 BamHI 제한효소 부위를 갖도록 디자인되어, 나중에 pET-14b vector에 쉽게 클로닝될 수 있도록 하였다. *fabI* 유전자를 클로닝하기 위해, *S. aureus*의 genomic DNA로부터 primer-I과 primer-II를 이용하여 *fabI* 유전자를 증폭하였다. PCR 조건은 94°C에서 먼저 5분간 반응시킨 후, 다시 94°C에서 1분간, 45°C에서 2분간, 72°C 2분간 반응시키는 사이클을 30회 되풀이 하였고, 마지막으로 72°C에서 5분간 반응시켰다. 이렇게 해서 얻어진 PCR product는 T-vector인 pGEM-T easy vector (Novagen, USA)와 직접 ligation시킨 후, *Escherichia coli* JM109에 형질전환 시켰고, *fabI* 유전자가 성공적으로 삽입된 균주로부터 다시 plasmid를 분리 정제하였다. 이렇게 얻어진 재조합 pGEM-T plasmid를 NdeI과 BamHI으로 처리하여 *fabI* 유전자 부분만을 다시 얻은 후, 이것을 미리 NdeI, BamHI으로 처리한 pET-14b vector(Novagen, USA)와 다시 ligation 시켰다. 이 재조합 plasmid를 다시 *E. coli* BL21(DE3)에 형질전환 시켜, FabI 효소를 대량 발현시킬 수 있는 형질전환체를 얻었다.

FabI 효소의 발현 및 대량 정제

pET-14b에 클로닝된 *fabI*는 Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside(IPTG)의 유도에 의해 다량의 FabI 단백질을 생산하게 되는데, 이 때 단백질의 N-말단에 histidine이 연속적으로 6개가 붙어 있는 fusion protein 형태로 발현된다. 6xHis-tagged proteins은 Ni-NTA resin과 선택적으로 binding하게 되는데, 이 특성을 이용하여 Ni-NTA affinity chromatography를 사용하면, 단 한번의 조작으로 순수한 FabI 단백질을 얻을 수 있게 된다.¹¹⁻¹²⁾ 먼저 *fabI* 유전자가 삽입된 pET-14b plasmid에 의해 형질전환된 *E. coli* BL21(DE3) 균주를 50 μg/ml의 ampicillin이 함유된 10 ml의 LB배지에서 하루동안 배양한 후, 이 배양액의 8 ml를 취

하여 다시 400 ml의 LB 배지에(50 µg/ml의 ampicillin이 함유) 다시 접종하여 37°C에서 배양하였다. 배양액의 OD₆₀₀가 0.6 정도가 되면, 최종 농도가 0.4 mM이 되게 IPTG를 가하여 단백질의 발현을 유도한 후, 4시간 정도 더 배양하였다. 4,000×g에서 20분간 원심분리하여 균체를 얻은 다음, -70°C에서 하루정도 보관하였다. 균체를 얼음 상에서 서서히 녹인 다음 20 ml의 lysis buffer(20 mM Tris-HCl(pH 7.4), 1 mM β-mercaptoethanol, 500 mM NaCl, 20 mM imidazole)에 현탁시키고, 여기에 1 mg/ml의 농도로 lysozyme을 가하여 30분 간 반응시켰다. 얼음상에서 약 10 회 정도 sonication(200-300 W에서 10 초간 반응 후, 10초 동안 냉각)한 후, RNase A(10 µg/ml)를 가하여 10분 동안 더 반응시킨 후, 4°C에서 20분간 10,000 g 조건에서 원심분리하여 상등액을 취하였다. 4 ml의 50% Ni-NTA slurry를(Qiagen, USA) 20 ml의 상등액에 가하여 4°C rotary shake에서 1시간동안 200 rpm의 속도로 shaking하면서 잘 섞은 다음, 반응혼합물을 column에 충전하였다. 4 ml의 wash buffer(20 mM Tris-HCl(pH 7.4), 1 mM β-mercaptoethanol, 500 mM NaCl, 60 mM imidazole)로 column을 잘 씻은 다음, 0.5 ml의 elution buffer(20 mM Tris-HCl(pH 7.4), 1 mM β-mercaptoethanol, 500 mM NaCl, 200 mM imidazole)로 4회 정도 용출하였다. 이것을 잘 모은 다음 Amicon사의 Centricon-30으로 농축한 후, 10% SDS-PAGE를 이용하여 단백질의 순도를 측정하였다.

FabI의 효소 활성 측정 및 FabI 저해제 스크리닝을 위한 enzyme assay 방법 확립

순수 분리 정제된 FabI 효소의 활성을 확인하기 위해, FabI에 대한 기질로서 *trans*-2-octenoyl-*N*-acetylcysteamine (C₁₂H₂₁NO₂S)를 사용하고, 여기에 수소공여체인 NADPH와 FabI 효소를 혼합

하여 상온에서 1-10 분 동안 반응시킨 후, 340 nm에서 NADPH의 흡광도를 측정하여 감소된 NADPH 양을 정량 함으로써, 분리 정제된 FabI 효소 활성의 정도를 측정하였다. 그리고 효소 반응의 최적 조건을 찾기 위해, 효소와 기질의 양과 반응 시간 등을 변화시켜 최적의 효소 반응 조건을 결정하였다. 이렇게 해서 결정된 효소 반응 조건에서 이미 FabI 기해제로서 알려진 triclosan의 농도를 변화키면서 효소 활성을 측정하여, triclosan의 농도에 비례하여 FabI 효소의 활성이 저해되는 지를 확인하였다. 이를 토대로 High-Throughput Screening(HTS)의 전단계로서 96-well plate를 이용하여 FabI 효소저해제를 스크리닝할 수 있도록 검색계를 확립하였다.

화합물은행으로부터 FabI 저해제의 스크리닝

위에서 확립된 검색계를 이용하여 96-well plate에서 triclosan을 대조약물로 하여, 한국화학연구원 화합물은행으로 분양 받은 화합물 중 10,000 여개를 스크리닝하여 FabI 저해제 검색계의 유용성을 평가하였다.

결과 및 고찰

*Staphylococcus aureus*로부터 genomic DNA의 분리 및 *fabI* 유전자의 크로닝

*S. aureus*의 genomic DNA를 분리한 뒤, primer-I과 primer-II를 이용하여 *fabI* 유전자에 해당하는 DNA 부분을 증폭하였다. 이를 Fig. 1의 도식도와 같이 pGEM-T easy vector(Novagen, USA)에 클로닝하고, 다시 최종적으로 pET-14b vector(Novagen, USA)에 클로닝하여, IPTG에 의해 FabI 효소를 대량 생산할 수 있는 형질전환체를 선발하였다.

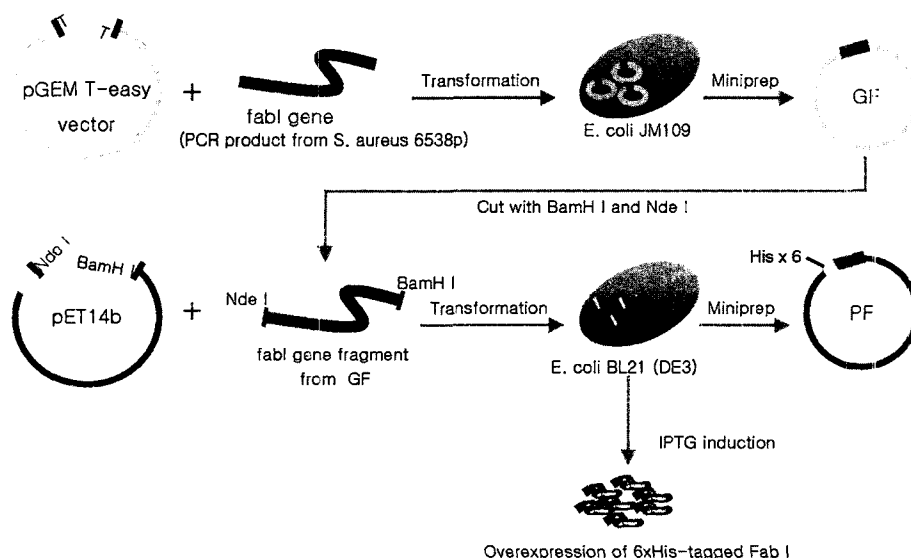


Fig. 1 - Cloning of *fabI* gene from *S. aureus* 6538p and overexpression of 6xHis-tagged FabI in *E. coli* BL21 (DE3).

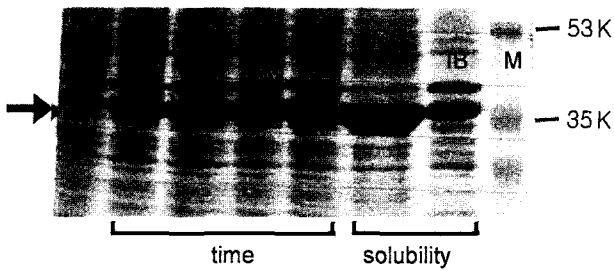


Fig. 2 - Time course of expression. Expression of 6xHis-tagged FabI was induced with 0.4 mM IPTG. Aliquots were removed at the times indicated. CL: clear lysate (soluble); IB: inclusion body (insoluble); M: markers.

FabI 효소의 발현 및 대량 정제

fabI 유전자가 성공적으로 클로닝된 pET-15b 벡터로 형질전환된 *E. coli* BL21(DE3) 균주를 400 ml 정도 배양한 뒤, IPTG를 첨가하여 FabI 단백질의 N-말단에 6개의 histidine이 연속적으로 붙어있는 fusion protein의 생산을 유도하였다. Fig. 2의 결과에서 보는 바와 같이 IPTG로 단백질의 생산을 유도한 후, 3-5 시간 사이에서 단백질의 생산량이 가장 높은 것을 알 수 있었고, 대부분의 FabI는 불용성의 inclusion body가 아니라 수용성의 상등액 중에 존재하는 것을 알 수 있었다.

상등액 중에 존재하는 6xHis-tagged FabI 단백질을 Ni-NTA affinity column에 흡착시킨 후, wash buffer로 세척하고, elution buffer로 단백질을 elution한 다음, Centricon-30(Amicon, USA)으로 농축하고, 각각을 10% SDS-PAGE에서 전기연동을 하였다. Fig. 3에서 보는 바와 같이, 대부분의 6xHis-tagged FabI 단백질은 Ni-NTA affinity column에 잘 흡착하였고, elution시 FabI 단백질의 순도는 SDS-PAGE 상에서 순도 85% 이상이었다.

FabI의 효소저해제 활성 측정 및 FabI 효소저해제 검색계의 확립

기질로서 *trans*-2-octenoyl-*N*-acetylcysteamine($C_{12}H_{21}NO_2S$)를 사용하고, 여기에 수소공여체인 NADPH와 FabI 효소를 혼합하여 상온에서 반응 시간을 변화시켜 가면서 감소된 NADPH 양

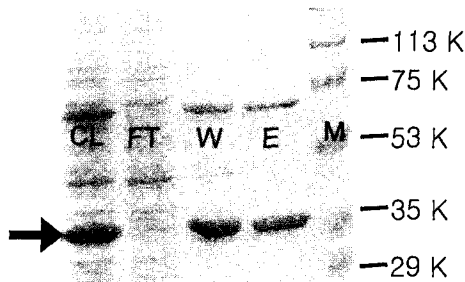


Fig. 3 - Purification of 6xHis-tagged FabI protein using Ni-NTA chromatography under native condition. CL: clear lysate; FT: flow-through; W: wash; E: eluates; M: markers.

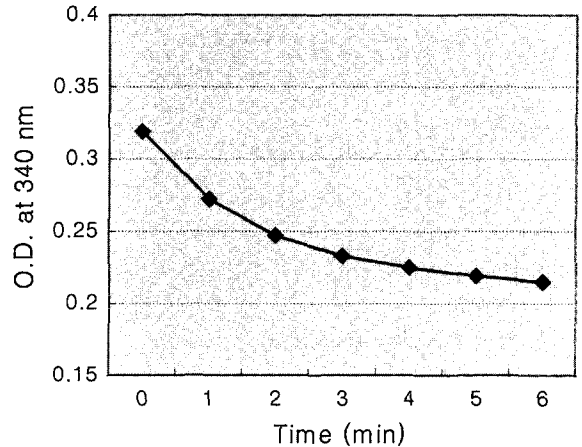


Fig. 4 - Time course of NADPH (cofactor) utilization by FabI protein.

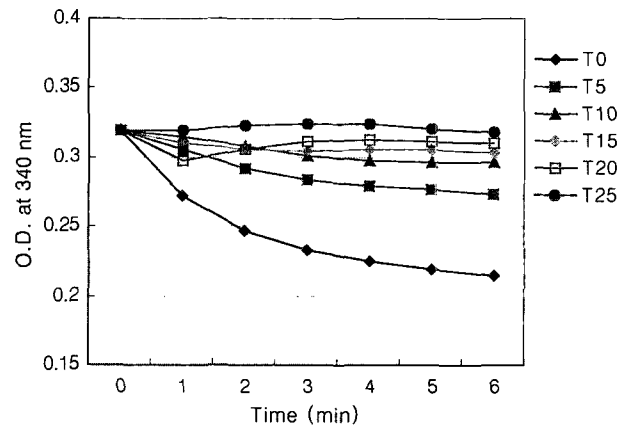


Fig. 5 - Inhibition of FabI activity by triclosan.

을 측정할 결과, Fig. 4에서처럼 반응 시간에 비례하여 cofactor인 NADPH의 양이 감소하였다. 이는 정제된 6xHis-tagged FabI가 5분 안에 NADPH를 이용하여 기질을 충분히 환원시킬 수 있는 효소 작용이 있음을 보여 주고 있다. 이런 효소반응 조건에서 이미 FabI 저해제로서 알려진 triclosan의 농도를 변화키면서 효소활성 저해효과를 측정할 결과, Fig. 5에서와 같이 triclosan의 농도에 비례하여 FabI 효소의 활성이 비례적으로 저해되었다. 따라서 이 조건을 이용하여 HTS의 전단계로서 96-well plate를 이용하여 FabI 효소 저해제를 스크리닝할 수 검색계를 다음과 같이 확립하였다.

먼저 96-well plate에 다음의 최종 반응액 용량이 200 μ l가 되게끔 미리 멸균중류수를 첨가하고, 여기에 40 μ l의 0.5 M sodium phosphate(pH 7.5), 20 μ l의 $C_{12}H_{21}NO_2S$ (1 mM), 10 μ l의 스크리닝할 화합물(약 500 μ M 농도) 및 35 μ l의 NADPH(1 mM)를 첨가한 후 초기 OD₃₄₀ 값을 측정하였다. 여기에 20 μ l의 FabI protein(5 μ g)을 가한 후, 이 plate를 상온에서 5분간 반응시키

Table I - Inhibition ratio of chemical libraries against FabI

Compound	Inhibition Ratio (%)
Triclosan	85%
KRICT CB 208-10A	100%
KRICT CB 209-8B	62%
KRICT NCB 14-8B	88%
KRICT NCB 14-12E	74%
KRICT NCB 14-12G	67%
KRICT NCB 9-3C	63%
KRICT NCB 9-7F	82%
KRICT NCB 9-7G	70%
KRICT NCB 9-12B	72%
KRICT NCB 9-12C	64%
KRICT CB 263-8F	100%
KRICT CB 259-5A	69%
KRICT CB 260-5A	62%
KRICT CB 260-7D	68%
KRICT CB 260-10E	61%
KRICT CB 170-4G	67%
KRICT CB 170-8B	71%
KRICT CB 90-3F	85%
KRICT CB 91-11F	72%
KRICT CB 92-6G	75%
KRICT CB 75-3G	66%
KRICT CB 75-5G	64%
KRICT CB 76-3H	96%
KRICT NCB 6-3F	65%
KRICT CB 79-5A	74%
KRICT CB 68-12H	77%

면서 1분 간격으로 microplate reader를 사용하여 O.D.를 측정하여, 효소저해제가 들어 있지 않은 대조군과 비교하여 화합물에 의한 효소저해율(Inhibition Ratio)을 계산하였다.

$$\text{효소 저해율 (\%)} = \frac{A-B}{A} \times 100$$

A: FabI만 있을 때의 NADPH 감소량(OD₃₄₀ 값의 변화)

B: FabI 및 효소저해제가 있을 때의 NADPH 감소량(OD₃₄₀ 값의 변화)

화합물은행으로부터 FabI 저해제의 스크리닝

위의 방법으로 확립된 검색계를 이용하여 한국화학연구원 화합물은행으로 분양받은 화합물 중에서 약 10,000 개에 해당하는 화합물에 대해 FabI 저해제를 스크리닝 하였다. Table I의 결과에서, 대조 약물인 triclosan은 약 85%의 저해효과를 보여 주었으며, 10,000 개의 화합물 중 0.25%에 해당하는 26 개의 화합물이 FabI에 대해 60% 이상의 저해 효과를 보여 주었다. 따라서 이 스크리닝 시스템은 매우 적절한 sensitivity와 정확성을 갖고 있어서, FabI 저해제를 검색할 수 있는 매우 유용한 검색계임을 알 수 있었다.

결론

최근에 세균의 지방산 생합성과 관련 있는 Enoyl-Acyl Carrier Protein Reductase(FabI)에 대한 연구가 활발해지면서, FabI 효소는 새로운 항균제의 개발을 위한 좋은 표적물질로서 알려지게 되었다. 따라서 외국의 벤처회사 및 몇몇 제약회사에서 약물설계에 의한 화학합성법과 화합물은행 및 천연물질의 스크리닝에 의해 새로운 FabI 저해제를 개발하려는 연구가 지금 진행 중이다. 그러나 FabI 저해제에 대한 연구는 지금까지 국내에서는 거의 진행되지 않고 있기 때문에, 본 연구에서는 화합물은행 및 토양미생물의 배양액으로부터 간편하면서 경제적인 FabI 저해제 검색계를 개발하였다. 현재 96-well plate를 이용한 이 검색계를 사용하면 하루에 평균 1,000 개 정도의 화합물을 스크리닝 할 수 있지만, 차후 HTS가 확립되면 최소한 하루 50,000 개 이상의 화합물을 스크리닝할 수 있을 것으로 기대된다. 따라서 이 검색계는 빠른 시간에 많은 시료를 스크리닝할 수 있는 장점이 있고, 재현성이 높기 때문에 새로운 항균물질의 개발을 위한 유용한 검색계로 사료된다.

감사의 말씀

본 연구는 한국과학재단 목적기초연구(2001-1-20900-009-2)지원으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

문헌

- Rosamond, J. and Allsop, A. : Harnessing the power of the genome in the search for new antibiotics. *Science* **287**, 1973 (2000).
- Trias, J and Gordon, E. M. : Innovative approaches to novel antibacterial drug discovery. *Current Opinion in Biotechnology* **8**, 757 (1997).
- Moir, D. T., Shaw, K. J., Hare, R. S., and Vovis, G. F. : Genomics and antimicrobial drug discovery. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**, 439 (1999).
- Mdluli, K., Slayden, R. A., Zhu, Y., Ramaswamy, S., Pan, X., Mead, D., Crane, D. D., Musser, J. M. and Barry III, C. E. : Inhibition of a *Mycobacterium tuberculosis* β -ketoacyl ACP synthetase by Isoniazid. *Science* **280**, 1607 (1998).
- Heath, R. J. and Rock, C. O. : Enoyl-acyl carrier protein reductase (*fabI*) plays a determinant role in completing cycles of fatty acid elongation in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **270**, 26538 (1995).
- Hoang, T. T. and Schweizer, H. P. : Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* enoyl-acyl carrier protein reductase (FabI): a target for the antimicrobial triclosan and its role in

- acylated homoserine lactone synthesis. *J. Bacteriol.* **181**, 5489 (1999).
- 7) Heath, R. J., Yu, Y. T., Shapiro, M. A., Olson, E. and Rock, C. O. : Broad spectrum antimicrobial biocides target the FabI component of fatty acid synthesis. *J. Biol. Chem.* **273**, 30316 (1998).
- 8) McMurry, L. M., McDermott, P. F. and Levy, S. B. : Genetic evidence that InhA of *Mycobacterium smegmatis* is a target for triclosan. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**, 711 (1999).
- 9) Heath, R. J., Rubin, J. R., Holland, D. R., Zhang, E., Snow, M. E. and Rock, C. O. : Mechanism of triclosan inhibition of bacterial fatty acid synthesis. *J. Biol. Chem.* **274**, 11110 (1999).
- 10) Heath, R. J., Li, J., Roland, G. E. and Rock, C. O. : Inhibition of the *Staphylococcus aureus* NADPH-dependent enoyl-acyl carrier protein reductase by triclosan and hexachlorophene. *J. Biol. Chem.* **275**, 4654 (2000).
- 11) Gu, J., Stephenson, C. G., and Ladarola, M. J. : Recombinant proteins attached to a Ni-NTA column: Use in affinity purification of antibodies. *BioTechniques* **17**, 257 (1994).
- 12) Parath, J., Carlsson, J., Olsson, I., and Belfrage, G. : Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature* **258**, 598 (1975).