

세균의 Peptide Deformylase(PDF)를 억제하는 새로운 항균물질의 스크리닝

곽진환[#] · 김현주 · 설민정 · 서병선 · 이종국* · 최수영*

한동대학교 생명식품과학부, *(주)이매진

(Received March 19, 2003; Revised May 26, 2003)

Screening of New Antibiotics Inhibiting Bacterial Peptide Deformylase (PDF)

Jin-Hwan Kwak[#], Hyun-Joo Kim, Min-Jeong Seol, Byung-Sun Suh, Jongkook Lee* and Sooyoung Choi*

School of Life and Food Sciences, Handong Global University, Pohang, Kyung-Buk 791-940, Korea

*ImaGene Co. Ltd., Seoul 151-742, Korea

Abstract — Peptide deformylase (PDF) is essential and unique to bacteria, thus making it an attractive target for the discovery of novel antibacterial drugs. PDF deformylates the N-formylmethionine of newly synthesized polypeptides in prokaryotes. In this study, a *pdf* gene from *Staphylococcus aureus* 6538p was cloned in pET-14b vector and PDF protein was over-produced in *Escherichia coli* BL21 (DE3). NH₂-terminal His-tagged PDF protein was purified by nickel-nitrilotriacetic acid (Ni-NTA) metal-affinity chromatography. Enzymatic activity of purified 6xHis-tagged PDF was tested on the substrate (formyl-Methionine-Alanine-Serine) by formate dehydrogenase-coupled spectrometric assay of peptide deformylase. For the discovery of new PDF inhibitors from chemical libraries and culture broths of soil bacteria, a target-oriented screening system using a 96-well plate was developed. About 3,000 commercial chemical libraries were tested in this screening system, and 2 chemicals (0.07%) among them showed an inhibitory activity against PDF enzyme. This result showed that a new screening system can be used for the discovery of new PDF inhibitors.

Keywords □ Peptide deformylase (PDF), Formate dehydrogenase (FDH), Formyl-Methionine-Alanine-Serine, Antibiotics, Screening

생명공학의 눈부신 발전과 수많은 의약품에도 불구하고 인류는 아직도 세균에 의한 감염질환의 공포에서부터 아직 해방되지 못하고 있다. 뿐만 아니라 고령화와 장기이식의 보편화, 화학요법의 남용 등의 원인으로 인해 새로운 고도내성세균(superbug)들이 계속 등장하고 있는 실정이다. 현재 약 200여 종의 항균제들이 임상적으로 사용되고 있고, 매년 새로운 항생제들이 지속적으로 개발됨에도 불구하고, 내성세균에 의한 감염증은 계속 증가하고 있는 실정이고 더구나 최근에는 여러 항균제에 대해 동시에 내성을 갖는 다제약제 내성균주(multi-drug resistant superbug)들이 출현하고 있어 인류에게 큰 위협이 되고 있다.¹⁾ 따라서 지속적인 새로운 항생제의 개발이 절실히 요구되는 상황이다. 최근의 항생제 연구 동향은 예전의 me-too approach(이미 약효가 증명된 기존의 항생제의 화학구조를 화학적으로 변형시켜 새로운 항생물질을 개발하는 것)에 의한 항생제 개발 대신,

genome이 완전 해독된 주요 세균으로부터 필수적인 유전자 타겟(essential gene)을 comparative genomics 정보를 이용해서 선별하고, 이로부터 개발된 새로운 target-oriented 스크리닝 시스템을 이용해서 새로운 화학구조와 새로운 작용기전을 가진 항생제를 개발하는 것이 주류를 이루고 있다.²⁻⁴⁾

Peptide deformylase(PDF; EC 3.5.1.27)는 세균(eubacteria)에만 존재하며 또한 세균의 성장에 필수적이기 때문에, 새로운 항생물질의 개발을 위한 좋은 target이 될 수 있음이 알려지면서, 이에 대한 연구가 세계 각국에서 이제 막 시작되고 있다.⁵⁻⁸⁾ PDF는 1968년도에 처음 확인되었지만, 자연 상태의 이 효소는 ferrous (Fe⁺)를 catalytic ion으로 갖고 있는 매우 불안정한 효소이기 때문에, 분리 정제가 어려워 최근까지 이에 대한 연구가 거의 진행되지 못하였다. 그러나, 1998년에 매우 안정하면서 효소의 활성을 그대로 갖고 있는 nickel surrogate form이 발견되면서, 이 효소를 이용한 새로운 항생제의 개발이 가능하게 되었다.⁹⁾ 원핵세포(eubacteria)에서의 모든 polypeptide는 N-말단에 N-formyl-methionine을 갖는데, 이는 세균에서 단백질 생합성이 시작될 때 formyl-methionyl-tRNA를 사용하기 때문이다.¹⁰⁻¹¹⁾ Peptide가

[#]본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 054-260-1353 (팩스) 054-260-1925
(E-mail) jhkwak@handong.edu

합성되는 동안 formyl group은 peptide deformylase(PDF)에 의해 제거되어야 하는데, 만약, 세균에서 peptide 합성 중, de-formylation이 일어나지 않으면 단백질이 maturation될 수 없기 때문에 세균은 정상적으로 성장할 수 없게 된다. 그리고, peptide의 두 번째의 아미노산이 작고 극성을 갖고 있지 않은 alanine, cysteine, glycine, proline, serine, threonine, valine일 경우 N-말단의 methionine은 methionine aminopeptidase (MAP; EC3.4.11.18)에 의해 제거된다. N-말단이 formyl기로 block되어 있는 methionine을 갖고 있는 peptide는 MAP에 의해 methionine이 제거되지 않으므로, 세균에서의 de-formylation은 단백질이 maturation되는 전제 조건임을 알 수 있다. 이것은 pdf 유전자가 knock-out된 균주는 정상적으로 성장할 수 없는 실험 결과로서도 확인할 수 있다.¹²⁾ 반면에 포유동물에는 이러한 PDF 효소가 존재하지 않으므로 세균의 PDF는 새로운 항생제의 개발에 이상적인 target이 될 수 있으며, 최근에는 천연물로부터 분리된 actinonin의 항균효과가 PDF를 저해하는 것으로 밝혀지면서 이와 유사한 PDF 저해제의 개발이 시도되고 있다.¹³⁾ 세균의 새로운 타겟으로서의 PDF의 장점은 다음과 같다. 첫째, 기존의 항생제 타겟과는 전혀 다른 새로운 것이며, 그리고 PDF 효소 저해제로서 실제로 임상에서 사용되고 있는 항생제는 지금까지 전혀 알려지지 않았기 때문에, 새로운 저해물질이 발굴되면 신규성이 있는 신약 후보로서의 가능성이 매우 높다. 둘째, 진핵세포에는 이 효소가 전혀 존재하지 않기 때문에 세균에 대한 선택성이 매우 높아서 높은 독성이 예상된다. 셋째, 이 효소를 이용한 assay system은 비교적 간단하여서 High Throughput Screening(HTS) 시스템의 개발이 용이하고 따라서 짧은 기간에 많은 양의 시료를 검색할 수 있다는 장점이 있다.

다시, 본 연구에서는 세균의 PDF를 저해하는 물질을 검색할 수 있는 스크리닝 시스템을 개발하여, 이를 이용하여 내성균주에 우수한 항균력을 갖는 신약후보를 발굴하고자 하였다. 우선 최근에 큰 문제가 되고 있는 다제약제 내성균주인 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*)으로부터 peptide deformylase (pdf) 유전자를 클로닝하고, 이로부터 PDF 효소를 다량 순수 분리 정제하였다. 그리고 화합물은행 및 토양미생물 배양액으로부터 효과적으로 PDF 저해제를 검색할 수 있는 스크리닝 시스템을 개발하였다.

실험방법

시약

Actinonin, lysostaphin, lysozyme, Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside(IPTG)는 Sigma사 제품을 사용하였고, KH₂PO₄는 USB사 제품을, NAD, formate dehydrogenase(FDH)는 Roche사 제품을 사용하였다. 또한 formyl-Methionine-Alanine-Serine

(fMAS)는 Bachem사 제품을, Taq polymerase 및 제한 효소는 Takara사의 제품을, 항균력 측정용 cellulose disk는 Toyo Roshi Kaisha사 제품을, LB 배지는 Difco사 제품을 사용하였다. 스크리닝에 사용한 화합물들은 외국에서 구입하여 사용하였으며, 토양미생물 배양액은 생명과학연구원으로부터 분양을 받았다.

*Staphylococcus aureus*로부터 Genomic DNA의 분리

Staphylococcus aureus ATCC 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, phenol-chloroform-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 침전물을 얻었다. 이것을 상온에서 잘 건조시킨 후 100 μl의 TE buffer에 녹였다.

*Staphylococcus aureus*로부터 pdf 유전자의 크로닝

Gene bank 및 Blast를 이용해 *S. aureus*를 비롯한 여러 종류의 세균으로부터 유래된 pdf 유전자의 염기 서열을 검색하고 분석하여 PCR 용 primer-I(5'-CATATGTTAACAATGAAAGACATCATTAGAGAT-3')과 primer-II(5'-GGATCCTTAAACTTCTACAGCATCTGTATGTGG-3')를 고안하였다. 이 primer는 *Nde*I 및 *Bam*HI 제한효소 부위를 갖도록 디자인되어, 나중에 pET-14b vector에 쉽게 클로닝될 수 있도록 하였다. pdf 유전자를 클로닝하기 위해, *S. aureus*의 genomic DNA로부터 primer-I과 primer-II를 이용하여 pdf 유전자를 증폭하였다. PCR 조건은 94°C에서 먼저 5분간 반응시킨 후, 다시 94°C에서 1분간, 55°C에서 2분간, 72°C 2분간 반응시키는 사이클을 30회 되풀이하였고, 마지막으로 72°C에서 5분간 반응시켰다. 이렇게 해서 얻어진 PCR product는 T-vector인 pGEM-T easy vector(Promega, USA)와 직접 ligation시킨 후, *Escherichia coli* JM109에 형질전환 시켰고, pdf 유전자가 성공적으로 삽입된 균주로부터 다시 plasmid를 분리 정제하였다. 이렇게 얻어진 재조합 pGEM-T plasmid를 *Nde*I 과 *Bam*HI로 처리하여 pdf 유전자 부분만을 다시 얻은 후, 이

것을 미리 *NdeI*, *BamHI*로 처리한 pET-14b vector(Novagen, USA)와 다시 ligation 시켰다. 이 재조합 plasmid를 다시 *E. coli* BL21(DE3)에 형질전환 시켜, PDF 효소를 대량 발현시킬 수 있는 형질전환체를 얻었다.

PDF 효소의 발현 및 대량 정제

pET-14b에 클로닝된 *pdf* 유전자는 Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside(IPTG)의 유도에 의해 다량의 PDF 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 PDF 단백질을 얻을 수 있게 된다.¹⁴⁻¹⁵⁾ 먼저 *pdf* 유전자가 삽입된 pET-14b plasmid에 의해 형질전환된 *E. coli* BL21(DE3) 균주를 100 μg/ml의 ampicillin이 함유된 10 ml의 LB 배지에서 하루 동안 배양한 후, 이 배양액의 8 ml를 취하여 다시 400 ml의 LB 배지에 (100 μg/ml의 ampicillin이 함유) 다시 접종하여 37°C에서 배양하였다. 배양액의 OD₆₀₀가 0.6 정도가 되면, 최종 농도가 0.2 mM이 되게 IPTG를 가하여 단백질의 발현을 유도한 후, 28°C에서 6시간 정도 더 배양하였다. 4,000×g에서 20분간 원심분리하여 균체를 얻은 다음, 15 ml의 lysis buffer(50 mM HEPES [pH 7.5], 5 mM NiCl₂)에 현탁시키고, 여기에 1 mg/ml의 농도로 lysozyme을 가하여 30분 간 반응시켰다. ice 상에서 약 10회 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 10분간 20,000×g 조건에서 원심분리하여 상등액을 취하였다. 4 ml의 50% Ni-NTA slurry를 (Qiagen, USA) 15 ml의 상등액에 가하여 4°C rotary shaker에서 1시간 동안 200 rpm의 속도로 shaking하면서 잘 섞은 다음, 반응혼합물을 column에 충전하였다. 10 ml의 wash buffer(50 mM NaH₂PO₄ [pH 8.0], 300 mM NaCl, 60 mM imidazole)로 column을 잘 씻은 다음, 1 ml의 elution buffer(50 mM NaH₂PO₄ [pH 8.0], 300 mM NaCl, 250 mM imidazole)로 6회 정도 용출하였다. 이것을 잘 모은 다음 Amicon사의 Amicon Ultra-15로 농축한 후, 12% SDS-PAGE를 이용하여 단백질의 순도를 측정하였다.

PDF의 효소 활성 측정 및 PDF 저해제 스크리닝을 위한 Enzyme Assay 방법 확립

순수 분리 정제된 PDF 효소의 활성을 확인하기 위해, PDF/FDH coupled assay 방법을 응용하였다.¹⁶⁻¹⁸⁾ PDF의 기질로 사용되는 formyl-Methionine-Alanine-Serine(fMAS)로부터 peptide deformylase(PDF)에 의해 생성된 formate가 다시 formate dehydrogenase(FDH)에 의해 formaldehyde로 산화되어지는데,

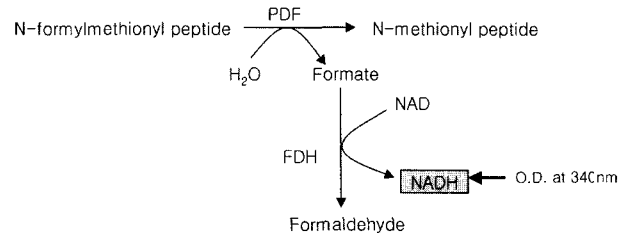


Fig. 1 – Formate dehydrogenase-coupled spectrometric assay of peptide deformylase.

이때 부산물로 생성되는 NADH의 양을 340 nm에서의 흡광도를 측정하여 NADH 양을 정량함으로써 간접적으로 PDF의 활성 정도를 측정하였다(Fig. 1). 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 PDF 저해제로 알려진 actinonin의 농도를 변화키면서 효소 활성을 측정하여, actinonin의 농도에 비례하여 PDF 효소의 활성이 저해되는 지를 확인하였다. 이를 토대로 High-Throughput Screening(HTS)의 전단계로서 96-well plate를 이용하여 PDF 효소 저해제를 스크리닝할 수 있도록 검색계를 확립하였다.

화합물은행으로부터 PDF 저해제의 스크리닝

위에서 확립된 검색계를 이용하여 96-well plate에서 actinonin을 대조약물로 하여, 약 3,000여개의 화합물은행 및 토양미생물 배양액을 스크리닝하여 PDF 저해제 검색계의 유용성을 평가하였다.

결과 및 고찰

*Staphylococcus aureus*로부터 Genomic DNA의 분리 및 *pdf* 유전자의 크로닝

*S. aureus*의 genomic DNA를 분리한 뒤, primer-I과 primer-II를 이용하여 *pdf* 유전자에 해당하는 DNA 부분을 증폭하였다. 이를 Fig. 2의 도식도와 같이 pGEM-T easy vector(Promega, USA)에 클로닝하고, 다시 최종적으로 pET-14b vector(Novagen, USA)에 클로닝하여, IPTG에 의해 PDF 효소를 대량 생산할 수 있는 형질전환체를 선발하였다.

PDF 효소의 발현 및 대량 정제

pdf 유전자가 성공적으로 클로닝된 pET-14b 벡터로 형질전환된 *E. coli* BL21(DE3) 균주를 400 ml 정도 배양한 뒤, IPTG를 첨가하여 PDF 단백질의 N-말단에 6개의 histidine이 연속적으로 붙어있는 fusion protein의 생산을 유도하였다. 28°C에서 0.2 mM의 IPTG로 단백질의 생산을 유도한 후, 5~7시간 사이에서 단백질의 생산량이 가장 높은 것을 알 수 있었다. 일반적인 단백질 발현 유도 조건인 0.4 mM의 IPTG와 37°C에서는 대부분의

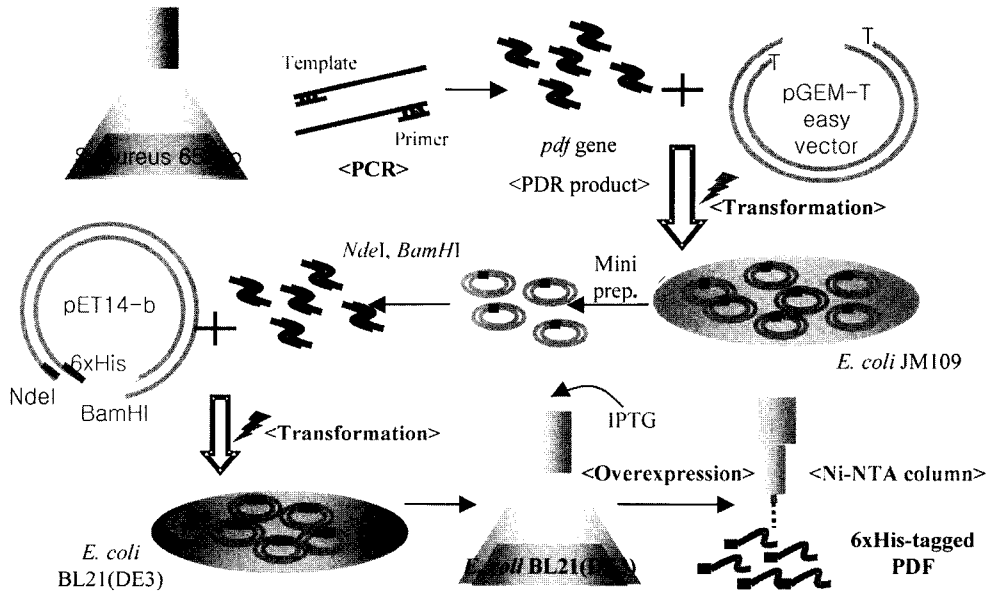


Fig. 2 - Cloning of pdf gene from *S. aureus* 6538p and overexpression of 6xHis-tagged PDF in *E. coli* BL21 (DE3).

PDF가 불용성의 inclusion body로 발현되었지만, 0.2 mM의 IPTG 농도로 28°C에서 단백질 합성을 유도하였을 때는 PDF가 수용액의 상등액 중에 많이 생성되었다. 상등액 중에 존재하는 6xHis-tagged PDF 단백질을 Ni-NTA affinity column에 흡착시킨 후 wash buffer로 세척하고, elution buffer로 단백질을 elution 한 다음, Amicon Ultra-15(Amicon, USA)으로 농축하고, 각각을 12% SDS-PAGE에서 전기영동을 하였다. Fig. 3에서 보는 바와 같이, 대부분의 6xHis-tagged PDF 단백질은 Ni-NTA affinity column에 잘 흡착하였고, elution시 PDF 단백질의 순도는 SDS-PAGE 상에서 순도 95% 이상이었다.

PDF의 효소저해제 활성 측정 및 PDF 효소저해제 검색계의 확립

PI)의 기질로서 formyl-Methionine-Alanine-Serine(fMAS)를

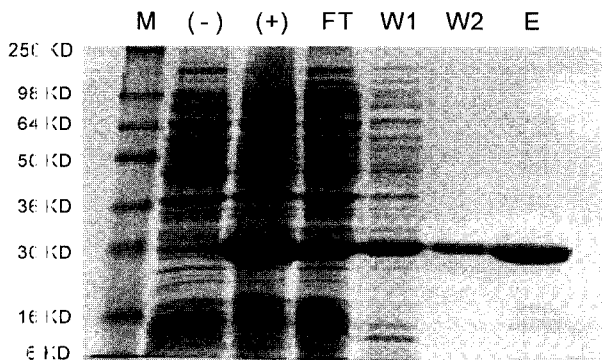


Fig. 3 - Purification of 6xHis-tagged PDF protein using Ni-NTA chromatography under native condition. FT : flow-through; W1 : first wash; W2 : second wash; E : eluates; M : Molecular size marker.

사용하고, peptide deformylase(PDF)에 의해 생성되는 formate 가 다시 formate dehydrogenase(FDH)의 작용에 의해 부산물로 생성되는 NADH의 양을 상온에서 반응 시간을 변화시켜 가면서 340 nm에서의 O.D. 값을 측정 한 결과, Fig. 4에서처럼 반응 시간에 비례하여 NADH의 양이 증가하였다. 이는 대장균에서 발현 정제한 PDF가 효소 활성을 갖고 있음을 보여 주고 있다. 이런 효소반응 조건에서 이미 PDF 저해제로서 알려진 actinonin의 농도를 변화키면서 효소활성 저해효과를 측정 한 결과, Fig. 5에서와 같이 actinonin의 농도에 비례하여 PDF 효소의 활성이 비례적으로 저해되었다. 따라서 이 조건을 이용하여 HTS의 전 단계로서 96-well plate를 이용하여 PDF 효소 저해제를 스크리닝할 수 있는 검색계를 다음과 같이 확립하였다.

상온에서 96-well plate에 먼저 0.2 µg의 PDF, 135 µl의 멸균 증류수, 10 µl의 100 mM KH₂PO₄(pH 7.5), 15 µl의 fMAS (10 mM), 10 µl의 20 mM NAD를 순서대로 첨가한 후, 340 nm에서의 O.D. 값을 재었다. 그리고 10 µl의 7.2 U/ml FDH를 첨가하고

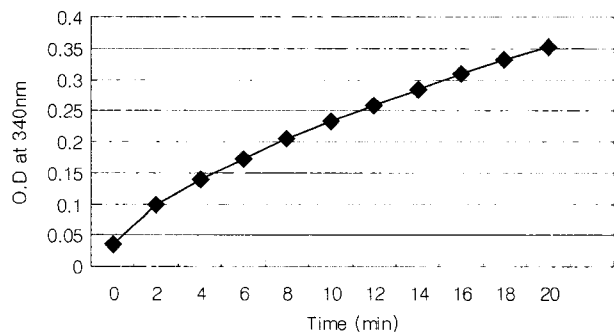


Fig. 4 - Enzymatic activity of purified 6xHis-tagged PDF.

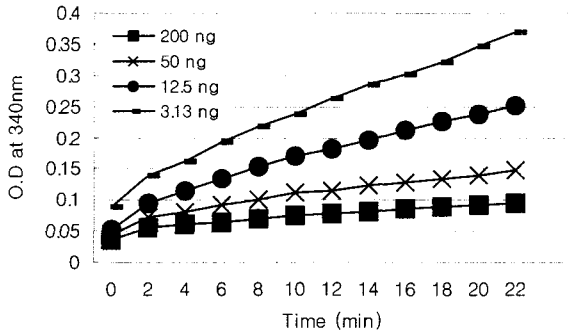


Fig. 5 - Inhibition of PDF activity by actinonin.

20분 후의 O.D 값을 측정하여 그 값을 비교하였다. PDF의 저해제 검색을 위해서는, PDF와 검색할 물질(control로서는 이미 PDF 저해제로 알려진 actinonin을 사용)을 함께 10분간 먼저 preincubation 시킨 후, 125 μ l의 멸균증류수, 10 μ l의 100 mM KH_2PO_4 (pH 7.5), 15 μ l의 fMAS(10 mM), 10 μ l의 20 mM NAD를 순서대로 첨가해주었다. 역시 10 μ l의 7.2 U/ml FDH를 첨가하기 전에 340 nm에서의 O.D 값을 재고, FDH를 첨가한 후 20분 후의 O.D. 값을 측정하여, 그 변화 값을 효소저해제가 들어 있지 않은 대조군과 비교하여 화합물에 의한 효소저해율(Inhibition Ratio)을 계산하였다.

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

A : PDF와 FDH만 있을 때의 NADH 변화값
(OD₃₄₀ 값의 변화)

B : PDF와 FDH 및 효소저해제가 있을 때의 NADH 변화값
(OD₃₄₀ 값의 변화)

화합물은행으로부터 PDF 저해제의 스크리닝

위의 방법으로 확립된 검색계를 이용하여 화합물은행 및 토양 미생물 배양액에 대해 PDF 저해제를 스크리닝 하였다. 대조 약물인 actinonin은 1.3 μ M 농도에서 약 85%의 저해효과를 보여 주었으며, 3,000개의 화합물 중 2개의 화합물이 PDF에 대해 60% 이상의 저해 효과를 보여 주었다. 따라서 이 스크리닝 시스템은 매우 적절한 sensitivity와 정확성을 갖고 있어서, PDF 저해제를 검색할 수 있는 매우 유용한 검색계임을 알 수 있었다.

결 론

최근에 매우 안정하면서 효소의 활성을 그대로 갖고 있는 nickel surrogate form의 PDF가 발견되면서, PDF 효소는 새로운 항균제의 개발을 위한 좋은 표적물질로서 외국의 벤처회사 및 몇몇 제약회사에서 연구되고 있다. 본 연구에서는 화합물은행 및 토

양미생물의 배양액으로부터 간편하면서 경제적인 PDF 저해제 검색계를 개발하였다. 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 보건복지부 보건의료기술진흥사업의 지원에 의하여 이루어진 것임(과제고유번호 : 02-PJ2-PG10-21503-0002)”.

문 헌

- 1) Service, R. E. : Antibiotics that resist resistance. *Science* **270**, 724 (1995).
- 2) Rosamond, J. and Allsop, A. : Harnessing the power of the genome in the search for new antibiotics. *Science* **287**, 1973 (2000).
- 3) Trias, J. and Gordon, E. M. : Innovative approaches to novel antibacterial drug discovery. *Current Opinion in Biotechnology* **8**, 757 (1997).
- 4) Moir, D. T., Shaw, K. J., Hare, R. S. and Vovis, G. F. : Genomics and antimicrobial drug discovery. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**, 439 (1999).
- 5) Yuan, Z., Trias, J. and White, R. J. : Deformylase as a novel antibacterial target. *Drug Discovery Today*, **6**(18), 954 (2001).
- 6) Giglione, C., Pierre, M. and Meinel, T. : Peptide deformylase as a target for new generation, broad spectrum antimicrobial agents. *Mol. Microbiol.* **36**, 1197 (2000).
- 7) Apfel, C. M., Locher, H., Evers, S., Takas, B., Hubschwerlen, C., Pirson, W. Page, M. P. and Keck, W. : Peptide deformylase as an antibacterial drug target : target validation and resistance development. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 1058 (2001).
- 8) Waller, A. S. and Clements, J. M. : Novel approaches to antimicrobial therapy : peptide deformylase. *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* **5**, 785 (2003).
- 9) Dardel, F., Ragusa, S., Lazennec, C., Blanquet, S. and Meinel, T. : Solution structure of nickel-peptide deformylase. *J. Mol. Biol.* **280**, 501 (1998).
- 10) Adams, J. M. and Capecchi, M. R. : N-formylmethionyl-sRNA as the initiator of protein synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **55**, 147 (1966).
- 11) Mazel, D., Pochet, S. and Marliere, P. : Genetic characterization of polypeptide deformylase, a distinctive enzyme of eubacterial translation. *EMBO J.* **13**, 914 (1994).
- 12) Margolis, P. S., Hackbarth, C. J., Young, D. C., Wang, W., Chen, D., Yuan, Z., White, R. and Trias, J. : Peptide deformylase in *Staphylococcus aureus*: resistance to inhibition is mediated by mutations in the formyltransferase gene. *Antimicrob. Agents*

- Chemother.* **44**, 1825 (2000).
- 13) Chen, D. Z., Patel, D. V., Hackbarth, C. J., Wang, W., Dreyer, G., Young, D. C., Margolis, P. S., Wu, C., Ni, Z. J., Trias, J., White, F. J. and Yuan, Z. Y. : Actinonin, a naturally occurring anti-bacterial agent, is a potent deformylase inhibitor. *Biochemistry* **39**, 1256 (2000).
 - 14) 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).
 - 15) Farath, J., Carlsson, J., Olsson, I. and Belfrage, G. : Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature* **258**, 598 (1975).
 - 16) Lazennec, C. and Meinnel, T. : Formate dehydrogenase-coupled spectrophotometric assay of peptide deformylase. *Analytical Biochemistry* **244**, 180 (1997).
 - 17) Guo, X. C., Rajagopalan, P. T. R. and Pei, D. : A Direct Spectrophotometric Assay for Peptide Deformylase. *Analytical Biochemistry* **273**, 298 (1999).
 - 18) Wei, Y. and Pei, D. : Continuous Spectrophotometric Assay of Peptide Deformylase. *Analytical Biochemistry* **250**, 29 (1997).