

사람에서 유래한 장독성 대장균의 이열성장독소와 관련된 Plasmid 특성*

가톨릭대학 의학부 미생물학교실 · 서울대학교 의과대학 미생물학교실¹

유문간 · 김금용 · 장우현¹

= Abstract =

Characterization of Plasmid Encoding a Heat-labile Enterotoxin Originated from an Human *Escherichia coli* Strain 015:H11.

Mun Gan Rhyu, Gum Ryong Kim and Woo Hyun Chang¹

Department of Microbiology, Catholic Medical College and Department of Microbiology, College of Medicine, Seoul National University,¹ Seoul, Korea.

A heat-labile enterotoxin and no heat-stable enterotoxin producing (LT⁺ST⁻) plasmid (110 kilobases in size) was isolated from an enterotoxigenic *Escherichia coli* of human strain 015:H11 and used for analysis of the LT⁺ deoxyribose nucleic acid region using recombinant DNA technology. A DNA segment containing the LT⁺ DNA region which was one restriction endonuclease *Bam*HI fragment (6.2 kb in size) was joined to a small multicopy plasmid, pUC9. *E. coli* K-12 strain, JM103 harboring the chimeric plasmid produced greater amounts of LT than did the enterotoxigenic *E. coli* 015:H11 strain. The *Bam*HI fragment was further digested with various restriction endonucleases and contained no *Hind*III restriction site which is an essential in LT⁺ST⁺ plasmid. The detailed DNA sequencing of this LT⁺ST⁻ plasmid is required.

서 론

장독성 대장균은 이열성 장독소(heat labile toxin, LT)와 내열성 장독소(heat stable toxin, ST)를 동시에 또는 한 종류만 생산하여 (LT⁺ST⁻; LT⁺ST⁺; LT⁻ST⁺) 사람과 가축에서 급성설사를 일으킨다^{1, 10}.

이열성 장독소는 *Vibrio cholerae*의 장독소와 작용기전과 분자구조가 유사하나 아미노산 서열이다르고²⁰ DNA hybridization 실험으로 이열성 장독소를 생산하는 대장균주 사이에서 차이가 없었으나, 돼지와 사람에서는 장독성 대장균주에 따라 이열성 장독소의 면역학적, 구조적 차이가 있으므로 이들 항원성의 차이는 장독성 대장균주에 따른 이열성 장독소 구조 유전자의 차이로 볼 수 있다^{4, 5}.

이열성 장독소에 관한 연구는 주로 사람과 돼지의 LT⁺ST⁺ 대장균에서 진행되어 각각에 대한 열기서열이 밝혀졌으나^{18, 20, 21} 사람에서 유래한 LT⁺ST⁻

대장균의 plasmid는 Wachsmuth 등¹⁹이 분리 보고한 이후 자세한 분석이 없었다. 이에 저자들은 종래에는 보고된 바 없는 사람에서 유래한 LT⁺ST⁻ 대장균 015:H11의 이열성 장독소 유전자를 cloning하고 각종 제한 효소에 의한 절단양상을 관찰하였다.

재료 및 방법

1. 균주 및 plasmid

장독성 대장균으로는 세계보건기구에서 분양 받은 *E. coli* 015:H11 (LT⁺ST⁻)를, *E. coli* K-12 strain JM 103을 숙주세포로, vector plasmid는 pUC 9를 각각 사용하였다. JM 103은 *thi*, *strA*, *supE*, *endA*, *sbcB*, *hsdR*⁻, *F' traD36*, *proAB*, *lacIq*, *ZAM15*의 유전자형을, pU9은 *Amp*^r, *lacZ*의 표현형을 갖고 있다.

2. Plasmid의 분리

Plasmid DNA는 Birnboim²²이 기술한 방법에 따라 분리하였고 제한효소로 처리한 분획은 Robert 등²³

*본 연구는 1984년도 및 1985년도 가톨릭 중앙 의료원 학술연구 조성비로 이루어졌음.

들의 방법에 의해 전기영동후 agarose gel로 부터 DNA를 용출하여 선택적으로 분리하였다.

3. 제한 효소반응

E. coli, *Bam*HI, *Pst*I, *Hind*III, *Hpa*I, *Hinc*II, *Hae*II를 Bethesda Research Laboratories, Inc. (BRL)로부터 구입하였다. 각 효소는 37°C에서 1시간동안 아래의 완충액에서 반응시킨다음 63°C에서 5분 가열하여 반응을 정지시켰다.

*Bam*HI-20mM tris-HCl(pH 8.0), 7mM MgCl₂, 100mM NaCl, 2mM 2-mercaptoethanol; *Hae*II, *Hind*III, *Pst*I-50mM tris-HCl(pH 8.0), 10mM MgCl₂, 50mM NaCl; *Eco*RI-100mM tris HCl(pH7.5), 10mM MgCl₂, 50mM; *Hinc*II-10mM tris-HCl (pH 7.9), 1mM MgCl₂, 60mM NaCl, 1mM Dithiothreitol(DTT); *Hpa*I-20mM tris-HCl(pH 7.4), 10mM MgCl₂, 20mM KCl, 1mM DTT.

4. Ligation조건

Ligation 반응은 60mM tris-HCl (pH 7.5), 10mM

MgCl₂, 10mM DTT, 0.05mM disodium ATP 하에서 시행하였다. 적당량의 T, DNA ligase (BRL 제품)를 넣은 후 0°C에서 18시간 반응시켰다.

5. Transformation

Maniatis 등¹⁰⁾의 방법에 따라, ligation된 DNA로 JM103을 transformation시켰으며 ampicillin 50 µg/ml, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside(x-gal) 0.03%, isopropylthio-β-galactoside(IPTG) 0.3 mM의 평판배지에서 흰 집락을 회수하였다.

6. 이열성 장독소 측정방법

Guerrant 등¹¹⁾과 Honda 등¹²⁾의 방법에 따라 Chinese Hamster Ovary (CHO) 세포주를 사용하여 이열성 장독소를 측정하였다. 즉 균배양 여과액을 CHO 세포주 배양액에 넣어 24시간 배양한 후 난원형태에서 장경이 연장되어 장경이 단경보다 4배 이상인 방추형태로 변형된 세포가 전체세포의 40% 이상일때 양성으로 판정하였다.

7. 전기영동

전기영동은 0.7% agarose slab gel(60×80×3mm)을 사용하여 tris-borate buffer(89mM tris base, 89mM boric acid, 2mM EDTA, pH 8.0)에서 시행하였다. DNA band는 ethidium bromide로 염색하여 중파 자외선하에서 관찰하였으며 λ phage DNA를 *Hind*III로 잘라 형성된 분획을 기준으로 분자량을 계산하였다.

성 적

1. CHO세포주로 측정된 이열성 장독소

Fig. 1. Cultures of chinese hamster ovary cells incubated for 24 h in 0.1 dilution of culture filtrates of control *E. coli* JM 103 (A), and toxigenic *E. coli* 015:H11 LT*ST⁻ (B). Magnification X 100.

Fig. 2. Various restriction cleavage patterns of plasmid from heat-labile toxin positive and heat-stable toxin negative 015:H11 enterotoxigenic *E. coli*. Lane A, *Bam*HI. Lane B, *Eco*RI. Lane C, *Hind*III. Lane D, *Hinc*II. Lane E, *Hae*II. Lane F, *Pst*I. Lane G, *Hpa*I. Numbers indicate sizes in kilobases.

Table 1. Electrophoretic patterns of only heat-labile toxin producing enterotoxigenic *E. coli* (015:H11) plasmid digested with various restriction endonucleases

| Restriction endonucleases | No. of fragment (above 1 kb) | Sizes of each fragment (kb) |
|---------------------------|---------------------------------|--|
| <i>Bam</i> HI | 7 | 48.7, 32.6, 9.3, 6.2, 4.4, 2.4, 1.2 |
| <i>Eco</i> R1 | 11 | 31, 25, 12.1, 8.5, 4.9, 4.3, 3.8, 3.6, 1.6, 1.3, 1 |
| <i>Hind</i> III | 13 | 32.6, 21, 14.1, 8.3, 6.2, 4.9, 4.4, 2.5, 2.3, 1.9, 1.7, 1.5, 1.2 |
| <i>Hinc</i> II | 21 | 6.7, 6.2, 5.9, 4, 3.7, 3.3, 2.9, 2.8, 2.5, 2.4, 2.1, 1.8, 1.7, 1.6, 1.5, 1.4, 1.3, 1.2, 1.1, 1 |
| <i>Hae</i> II | 19 | 7.4, 7.0, 5.2, 4.3, 4.1, 3.4, 3.2, 3, 2.6, 2.7, 2.2, 1.8, 1.6, 1.5, 1.4, 1.3, 1.2, 1.1, 1 |
| <i>Pst</i> I | 20 | 21, 12, 9.6, 7, 6.4, 5.9, 5, 3.5, 3.4, 3.2, 3.1, 2.8, 2.6, 2.3, 2.2, 1.9, 1.7, 1.4, 1.2, 1.1 |
| <i>Hpa</i> I | 16 | 16, 12, 8.4, 7.3, 7.2, 6.1, 5.2, 5.1, 4.6, 3.8, 3.3, 3.1, 2.9, 2.4, 2.1, 1.9 |

대장균의 이열성 장독소 생산여부를 CHO 세포 주로 검정한 결과 그림 1 과 같이 나타났다.

CHO세포주는 대장균 배양 여과액에 대해 이열성 장독소가 없더라도 자연적인 변형을 일으키므로 원래의 배지인 Ham F-12 대신에 minimum essential medium을 사용하나 이 배양액에도 적응된 상태에서는 자연변형이 일어났다. 따라서 Ham-F-12 배지에서 배양하다가 사용전 1 주부터 minimum essential medium으로 배지를 바꾼 상태에서 이열성 장독소 검정에 사용하였다. 즉 대장균 배양 여과액을 1:10의 농도로 CHO세포주의 배양액에 넣어 24시간 배양한 후 CHO세포중 장경이 단경보다 4 배이상 길어 방추형태로 변형을 일으켰다고 판정된 것은 전체 세포의 40%였으며 그 이상의 농도에서

Fig. 3. Agarose gel analysis of BamHI digests of p151(D) and LT⁺ recombinant plasmid, pEL 241(A), pEL 183(B) and pEL 162(C).

Table 2. Effect of dilution of culture filtrates of LT⁺ ST⁻ enterotoxigenic *E. coli* 015:H11 and JM 103 transformed with LT⁺ recombinant DNA to the CHO cells^a

| Dilution of culture filtrate | Morphological changes more than 50% of total cell population ^b . | | | |
|---------------------------------|--|---------|---------|---------|
| | p151 | pEL 241 | pEL 183 | pEL 162 |
| 1/10 | ± | + | + | + |
| 1/50 | - | + | + | + |
| 1/100 | - | + | ± | + |
| 1/500 | - | + | - | - |
| 1/1000 | - | - | - | - |

a. Each value represents data from three experiments.

b. Each dilutions of bacterial culture filtrate were added to CHO cells. After 24h incubation, morphological changes of CHO cells in which ratios of length to width were more than 4 were considered to due to LT.

는 감소하였다.

2. 이열성 장독소 plasmid의 분리 및 제한 효소 반응

이열성 장독소만 생산하는 장독성 대장균에서 분리한 plasmid를 agarose gel 전기영동하여 *Hind* III 제한효소로 자른 λ phage DNA를 기준으로 크기를 측정된 결과 약 110의 단일 분획만 보였으며 이 plasmid를 각종 제한 효소로 처리하여 agarose gel 전기 영동한 후 1kb 이상의 분획만 본 결과, *Bam* HI은 7분획, *Eco* RI은 11분획, *Hind* III는 13분획, *Hinc* II는 21분획, *Hae* II는 19분획, *Pst* I은 20분획, *Hpa* I은 16분획으로 장독성 대장균의 plasmid를 잘랐다.

각 분획의 이동 양상은 그림 2와 같고 분획들의 숫자와 각 분획의 크기는 표 1과 같았고 이 plasmid를 p151로 명명하였다.

3. 이열성 장독소 plasmid의 *Bam* HI 제한 효소 분획 및 cloning

p151은 *Bam* HI제한 효소에 의한 1kb 이상의 분획이 48.7, 32.6, 9.3, 6.2, 4.4, 2.4, 1.2kb 등이었다. 이 분획들을 *Bam* HI로 자른 pUC9 plasmid에 ligation시켜 *E. coli* K-12 JM103 균주에 transformation시킨후 IPTG, x-gal, ampicillin 배지에서 배양하여 나타나는 흰집락을 선택하였다. 각 집락의 이열성 장독소 유전자 발현 여부는 균배양 여과액을 CHO세포주 배양액에 넣어 24시간 배양한 후 난원형태에서 장경이 연장되어 단경보다 4배 이상인 방추형태로 변형된 세포가 전체세포의 40% 이상일 때 양성으로 판정하여 4개의 양성반응을 보인 집락을 얻었다.

양성반응을 일으킨 균주에서 plasmid를 분리하여

Bam HI제한 효소로 반응시킨 다음 agarose 전기영동을 시행한 결과 3종류의 plasmid임을 확인하고 각각을 pEL183, pEL162, pEL241로 명명 하였다 (그림 3).

즉 pEL162는 9.3, 6.2, 4.4, pEL183은 6.2, 2.4, pEL241은 6.2kb의 *Bam* HI제한효소 분획이 pUC9 plasmid에 각각 삽입된 이열성 장독소 양성인 재조합형 plasmid로서 이열성 장독소 유전자가 *Bam* HI제한효소 분획중 6.2kb 분획에 있음을 확인하였다.

각 plasmid에 의한 이열성 장독소 생산량은 CHO세포주에 대하여 50% 이상의 변형을 일으키는 배양 여과액의 회석농도로 측정하였다(표 2).

pEL241, pEL162, pEL183의 순서로 이열성 장독소의 양이 많았으며 p151이 제일 낮았으나 숙주세포가 다르기 때문에 직접적인 비교는 할 수 없었다.

4. pEL241의 제한 효소 반응

pEL241의 plasmid를 분리하여 각종 제한 효소로 처리한 다음 agarose 전기영동을 시행한 결과는 그림 2와 같다. 즉 6.2kb의 *Bam* HI 분획에는 *Hind* III의 인식 부위가 없었고 *Pst* I으로 처리하면 4.6, 1, 0.6, *Eco* RI은 3.9, 1.4, 0.9, *Hinc* II는 3, 1.9, 0.8, 0.5 *Hpa* I은 3.4, 2, 0.8, *Hae* II는 5.2, 1kb의 제한 효소 분획이 각각 나타났다.

고 찰

본 실험에서 사용한 장독성 대장균의 배양 여과액은 CHO세포주에 대한 변형능이 Guerrant등¹⁾이 사용한 대장균 균주보다 약 15% 낮았으며, 그 이유는 이열성 장독소 한가지만 생산하는 장독성 대장균의 경우는 이열성 및 내열성 장독소 모두 생산하는 경우보다 독소 생산이 적고¹⁰⁾ 이열성 장독소 유전자의 발현은 다양한 숙주세포의 영향을받아 균주마다 그 생산능이 다르기 때문이다^{11,12)}.

장독성 대장균은 생산하는 독소의 종류에 관계없이 각 균주마다 다른 plasmid를 갖는다. 그 이유는 첫째, 이열성 장독소에 관련된 유전자 부위는 transponson에 있으며 둘째, plasmid에는 장독소 외에도 다른 유전정보가 병존하기 때문이다^{4, 13, 16, 22)}.

본 실험에서 사용한 장독성 대장균(O15: H11)은 이열성 장독소만 생산하는 균주로서 110kb 크기의 단일 plasmid만 갖고 있어서 Wachsmuth등¹⁹⁾이 보고한 균주(LT*ST*)가 5개의 plasmid를 갖고 있었고 이중 가장 큰 plasmid의 크기는 약 100kb 이었

Fig. 4. Agarose gel analysis of single and double digested LT* recombinant plasmid, pEL 241 with various endonuclease. *Bam* HI + *Hae* II (A), *Hpa* I (B), *Hind* III (C), *Hinc* II (D), *Eco* RI (E) and *Pst* I (F), and *Bam* HI alone (G).

던 것에 비해 숫자는 적었으나 크기가 다소 컸다.

이열성 장독소의 plasmid에 관한 연구는 돼지균주에서 p307(LT⁺ST⁺) 사람균주에서는 H10407(LT⁺ST⁺)를 대상으로 이루어져 이열성 장독소에 해당하는 유전자 부위는 9.3 kb의 BamHI 제한 효소 분획과 5.1 kb의 PstI 제한 효소 분획에 각각 위치한다고 한다^{17,18}.

Wachsmuth 등¹⁹은 사람균주 (Serotype O25: K98: NM, LT⁺ST⁺)를 BamHI로 처리하여 11개의 분획을 관찰하였으나 균주가 5개의 plasmid를 갖고 있었기 때문에 이열성 장독소 plasmid에 관한 분획만이라 볼 수 없다. 본 실험에서 사용한 사람균주(O15: H11; LT⁺ST⁺)는 단일 plasmid를 갖고 있었으며 각종 제한 효소에 의한 분획양상은 그림 2와 같다. 즉 실험에서 사용한 장독성 대장균은 p307이나, H10407과 다른 사람의 균주(LT⁺ST⁺)로서, BamHI제한 효소에 의한 분획을 검색하였다. 왜냐하면 첫째, 이열성 장독소 유전자에는 돼지나 사람의 균주에 관계없이 BamHI제한 효소의 인식 부위가 없으며 둘째, BamHI제한 효소에 의한 분획수가 적어서 cloning의 가능성이 높기 때문이었다. 결과적으로 5.0 kb의 PstI 제한 효소 분획에서 이열성 장독소의 유전자를 확인하여 사람균주의 plasmid와 유사하다고 본다.

Yamamoto 등^{16,20}은 이열성 장독소 구조 유전자는 subunit A1과 subunit B 및 이들을 연결하는 subunit A2가 있고 subunit A1과 A2사이에 HindIII 제한 효소에 있다고 보고하였으나 본 실험에서는 HindIII 제한 효소의 인식부위를 발견하지 못했다. 이런 차이가 사람균주로서 이열성 장독소만 합성하는 장독성 대장균 plasmid의 특징인지 확실하지 않다. Plasmid 외에 숙주세포의 요인에 따라서도 이열성 장독소의 합성정도가 다르기 때문이다²¹.

따라서 자세한 제한 효소 map가 염기서열이 밝혀져야 LT⁺ST⁺ plasmid와의 관계가 규명될 것이다.

결 론

사람에서 유래한 장독성 대장균으로 serotype O15: H11이고 이열성 장독소만 생산하는 균주의 plasmid(p151)에서 BamHI 제한 효소에 의한 분획을 pUC9 vector plasmid를 이용하여 cloning하고 각종 제한 효소로 처리한 바 이열성 장독소 유전자에 대한 다음 결과를 얻었다.

1. 110 kb 크기의 단일 plasmid를 갖고있으며 대장균 배양 여과액의 1: 10 희석농도에서 24시간 배

양한 CHO 세포중 40%가 변형되었다.

2. 각종 제한 효소에 의한 장독성 대장균의 plasmid 반응은 BamHI이 7분획, EcoRI이 11분획, HindIII이 13분획, HincII이 21분획, HaeII는 19분획, PstI이 20분획, HpaI이 16분획으로 나타났다.

3. 이열성 장독소를 합성하는 3가지 재조합형 plasmid pEL162, pEL183, pEL241에 공통된 BamHI제한 효소 분획의 크기는 6.2이었고 CHO 세포 주로 측정된 이열성 장독소의 합성은 pEL241이 가장 많고 이어서 pEL162, pEL183의 순이었다.

4. pUC9과 BamHI제한 효소의 6.2kb 분획으로 구성된 pEL241의 각종 제한 효소에 의한 분획수는 BamHI이 2, HindIII이 2, PatI이 4, EcoRI이 4, HincII이 4, HpaI이 5, HaeII가 4개로 나타났다.

따라서 동 균주의 plasmid에서 이열성 장독소의 유전자는 6.2 kb의 BamHI 제한 효소분획에 위치하며 HindIII 제한 효소 인식 부위가 없으므로 자세한 제한 효소 map과 염기서열에 의한 LT⁺ST⁺ plasmid와의 비교가 필요하다고 본다.

참 고 문 헌

- 1) Bäck E, Svennerholm AM, Holmgren J and Möllby R: Evaluation of a ganglioside immunosorbent assay (GMI-ELISA) for detection of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *J. clin. Microbiol.* 10: 791, 1979.
- 2) Birnboim HC: A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA, p. 243. In Wu R, Grossman L and Moldave K ed., *Methods in Enzymology*, vol. 100. Academic Press, New York, 1983.
- 3) Dallas WS and Falkow S: Amino acid sequence homology between *Cholera* toxin and *Escherichia coli* heat-labile toxin. *Nature (London)*. 288: 299, 1980.
- 4) Evans DG, Silver R.P, Evans DJ, Chase DG and Gorbach SL: Plasmid-controlled colonization factor associated with virulence in *Escherichia coli* enterotoxigenic for humans. *Infect. Immun.* 12: 656, 1975.
- 5) Evans DJ, Evans DG and Gorbach SL: Production of vascular permeability factor by enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from man. *Infect. Immun.* 8: 725, 1973.
- 6) Geary SJ, Marchlewicz BA and Finkelstein RA: Comparison of heat-labile enterotoxins from porcine and human strains of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 36: 215, 1982.

- 7) Guerrant RL, Brunton LL, Schnatitman TC, Rebhun LI and Gilman AG: Cyclic adenosine monophosphate and alteration of chinese hamster ovary cell morphology: a rapid, sensitive in vitro assay for the enterotoxins of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **10**: 320, 1974.
- 8) Honda T, Shimizu M, Takeda Y and Miwatani T: Isolation of a factor causing morphological changes of chinese hamster ovary cells from the culture filtrate of *Vibrio parahemolyticus*. *Infect. Immun.* **14**: 1028, 1976.
- 9) Honda T, Tsuji T, Takeda T and Miwatani T: Immunological non identity of heat-labile enterotoxins from human and porcine enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **34**: 337, 1981.
- 10) Maniatis T, Fritsch EF and Sambrook J: Transformation of *Escherichia coli* by plasmid DNA, p. 249. In *Molecular cloning, a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, 1982.
- 11) Morris GK, Merson MH, Sack DA, Wells JG, Martin WT, Dewitt WE, Feeley JC, Sack RB and Bessudo DM: Laboratory investigation of diarrhea in travelers to Mexico: evaluation of methods for detecting enteropathogenic *Escherichia coli*. *J. clin. Microbiol.* **3**: 486, 1976.
- 12) Moseley SL, Echeverria, P, Seriwatana J, Tirapa C, Chaicumpa W, Sakuldaipeara T and Falkow S: Identification of enterotoxigenic *Escherichia coli* by colony hybridization using three enterotoxin gene probes. *J. Infect. Dis.* **145**: 863, 1982.
- 13) Neil JR, Twiddy EM and Holmes RK: Synthesis of plasmid coded heat-labile enterotoxin in wild type and hypertoxigenic strains of *Escherichia coli* and in other genera of *Enterobacteriaceae*. *Infect. Immun.* **41**: 1056, 1983.
- 14) Ørskov F, Ørskov A, Evans DJ, Sack RB, Sack DA and Wadstrom T: Special *Escherichia coli* serotypes among enterotoxigenic strains from diarrhea in adults and children. *Med. Microbiol. Immunol.* **162**: 73, 1976.
- 15) Robert C-AY, Lis J and Wu R: Elution of DNA from agarose gels after electrophoresis, p. 176. In Wu R ed., *Methods in Enzymology*, vol. **68**. Academic press, New York, 1979.
- 16) So M, Crandal JF, Crosa JH and Falkow S: Extrachromosomal determinants which contribute to bacterial pathogenicity, p. 16. In Schlessinger D ed., *Microbiology-1974*. American Society for Microbiology, Washington DC, 1974.
- 17) So M, Dallas WC and Falkow S: Characterization of an *Escherichia coli* plasmid encoding for synthesis of heat-labile toxin: molecular cloning of the toxin determinant. *Infect. Immun.* **21**: 405, 1978.
- 18) Spicer EK and Noble JA: *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. nucleotide sequence of the A subunit gene. *J. Biol. Chem.* **257**: 5716, 1982.
- 19) Wachsmuth K, Wells J, Shipley P and Ryder R: Heat-labile enterotoxin production in isolates from a ship-board outbreak of human diarrheal illness. *Infect. Immun.* **24**: 793, 1979.
- 20) Yamamoto T, Tamura T and Yokota T: Primary structure of heat-labile enterotoxin produced by *Escherichia coli* pathogenic for human. *J. Biol. Chem.* **259**: 5037, 1984.
- 21) Yamamoto T and Yokota T: Cloning of deoxyribonucleic acid regions encoding a heat-labile and heat-stable enterotoxin originating from an enterotoxigenic *Escherichia coli* strain of human origin. *J. Bacteriol.* **143**: 652, 1980.
- 22) Yamamoto T and Yokota T: *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin genes are flanked by repeated deoxyribonucleic acid sequences. *J. Bacteriol.* **145**: 850, 1981.
- 23) Yamamoto T and Yokota T: Sequence of heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli* pathogenic for humans. *J. Bacteriol.* **155**: 728, 1983.