

## 한국에서 분리된 병원성 *Salmonella* 균주의 장독소 유전자(*stn*) 분포와 발현조절 기작

임상용 · 유상렬\*

서울대학교 농생명공학부 식품공학과

**Prevalence of *Salmonella* Enterotoxin Gene(*stn*) among Clinical Strains Isolated in Korea and Regulation of *stn* Expression. Lim, Sang-Yong and Sang-Ryeol Ryu\*. Department of Food Science and Technology, School of Agricultural Biotechnology, Seoul National University, Suwon 441-744, Korea** - Role of enterotoxin from *Salmonella* in pathogenesis is not known. Enterotoxin gene from *Salmonella typhimurium* (*stn*) encodes a 29 kDa toxin that has no homology to any other known enterotoxins. Expression of *stn* is enhanced upon contact with epithelial cell but not all strains having the *stn* gene express *Stn*. Based on PCR analysis, we found that all 36 clinical strains of *Salmonella* isolated in Korea tested carried the *stn* gene. To understand the regulation of the *stn* transcription, the expression of *stn* was studied *in vitro*. RNA polymerase was purified by polymin P fractionation, DNA-agarose affinity chromatography, and Mono-Q ion exchange chromatography from *Salmonella*. The expression of *stn* was inhibited by cAMP-CRP complex by about 50%.

**Key words:** *Salmonella* enterotoxin(*stn*), RNA polymerase purification, cAMP-CRP complex

*Salmonella*는 심한 위장염 증상과 발열, 구토를 동반하는 식품 유래의 식중독균이며, 일반적으로 *Salmonella*가 장관 세포 내에 침입을 한 후 증식하는 것이 발병(*Salmonellosis*)의 필수적인 과정으로 알려져 있다[8,11]. *Salmonellosis*의病因은 *Salmonella*의 장관세포 내로의 침입과 그 침입한 *Salmonella*가 lamina propria에서 염증을 일으키는 enterotoxin-like factor를 분비하기 때문인데[15], *Salmonella* 장독소(enterotoxin; *Stn*)는 다양한 병원성 인자(virulence factor)가 관여하는 *salmonellosis*에 중요한 요인으로 작용한다고 밝혀지고 있다[5]. *stn* 유전자는 single polypeptide chain으로 이루어진, 약 29kDa의 단백질을 전사하는 749bp의 크기를 가진 유전자로 *S. typhimurium* chromosome의 약 90 min 정도의 위치에 존재한다. *Stn*은 cholera toxin (CT)이나 *E. coli*가 분비하는 heat-labile toxin(LTs)과 비슷한 생물학적 활성을 가지고 있으며[7] anti-CT 항체에 의해 blocking이 되며 GM1 ganglioside와 CT에 비해 약 3,000배 정도 낮은 친화도로 중화되는 것으로 보아 CT-like 항원 결정기(epitope)를 가졌지만, subunit 구조와 leader sequence가 없는 등, 구조는 이들과 다르다는 것이 알려졌다[3]. *Stn*은 비록 CT와는 완전히 다른 아미노산 서열을 보이지만 *Stn*의 86-96 아미노산 잔기는 cholera toxin의 B subunit의 71-82 아미노산 잔기와 약간의 상동성을 보이고 127-142 아미

노산 잔기는 CT-A와 LT-A등, ADP-ribosylating bacterial toxin의 활성 부위와 conserved sequence를 보이기도 한다[4]. *Stn*은 Chinese Hamster Ovary(CHO) cell내에서 3',5'-adenosine monophosphate(cAMP)의 수준을 증가시키고, epithelial cell내에서 prostaglandin(e.g. PGE2)등의 eicosanoids의 유리를 유도한다[17,18]. 이들 유리된 prostaglandin 등이 *Salmonella*에 의해 유발되는 adenylate cyclase 활성화에 관여하여 cell내의 cAMP 농도를 증가시키고 이로 인해 *Salmonella* 장독소를 처리한 동물에서 Na<sup>+</sup>와 Cl<sup>-</sup>이 배출되어 설사를 유발할 것이라고 여겨진다[12].

감염 초기 *Salmonella*가 장관 표피세포에 침입되었을 때 동시에 단백질 독소가 발현되는 것이 관찰되었고 Wallis [25]등은 토끼의 회장(rabbit ileum) 모델에서 *Salmonella*의 장관로의 감염이 장염을 유발하는데 꼭 필요한 조건은 아니라고 하였다. 이는 장독소등의 다른 병원성 인자 등이 *Salmonellosis*에 일정 정도의 역할이 있음을 시사한다. *Salmonella* 장독소는 장관 운동에 급격한 변화를 초래하며 [19] *stn* 유전자가 변이된 균주의 경우 쥐에서 유액(fluid)의 축적과 장관 세포의 파괴 정도가 wild type에 비해서 그 정도가 급격히 감소함을 볼 수 있었다[5]. 이는 *Stn*으로 인한 장관에 미치는 영향이 유액의 분비를 발생시킬 수 있다는 가능성을 보여준다.

현재 *Salmonella* 균은 약 2,400여 종이 보고되어 있으며, 그 중 2,300여종 이상이 사람에게 식중독을 유발할 수 있다. 식중독의 주요 병원균으로는 *S. typhimurium*, *S. heidelberg*, *S. thompson*, *S. enteritidis*, *S. schwarzengrund* 등이 알려져

\*Corresponding author

Tel. 031-290-2584, Fax. 031-293-4789

E-mail: sangryu@snu.ac.kr

있고, 또한 *S. blockley*, *S. montevideo*, *S. newington* 등도 주요 원인균으로 지목되고 있다. 1996년도 미국에서 보고된 식중독 사례를 살펴보면 박테리아 중 *Salmonella*가 전체 세균성 식중독의 69%를 차지하고[1], 일본의 식중독 사례를 보면, 세균성이 증독건수의 70%, 환자별로는 74.3%이고 이중 *Salmonella*가 26.0%이고 *V. parahaemolyticus*가 20.0%이나 환자별로 보면 *Salmonella*가 27.1%이고 병원성 *E. coli*가 21.5%를 차지하고 있어서 *Salmonella*와 *E. coli*가 거의 절반에 달하고 있다. 우리 나라의 경우 1993년부터 1999년까지 7년간 발생한 식중독 중 *Salmonella*균이 원인이 된 식중독은 전체의 37.7%를 점하고 있다. 미국의 Center for Disease Control and Prevention(CDC)의 조사에 의하면 미국에서 매년 식중독과 관련하여 6백 50만~3천 3백만 명의 식중독환자가 발생하여 약 9,000명이 사망한다고 한다. 그리고 이러한 *Salmonella*의 오염원이 되는 식품들이 가금류나 달걀이었던 과거의 양상과는 달리 과일 샐러드, 아이스크림, 과일 등도 매개체가 되었다. 또한, 최근에는 학교 등에서 단체급식이 증가하는 추세로 식중독 세균에 관한 연구는 더욱 중요한 현안으로 대두되고 있으므로, 장독소와 실제로 식중독을 유발한 *Salmonella* virulence와의 상관 관계를 알기 위해 국내에서 식중독 원인균으로 분리된 *Salmonella*의 장독소 유전자의 분포를 알아보는 것이 필요하다. 그러므로, 본 연구에서는 국내에서 분리된 식중독 원인 *Salmonella* 균주를 대상으로 장독소 유전자의 분포를 조사하고 *in vitro* transcription assay를 이용하여 *stn* 유전자의 발현 특성을 살펴보았다.

## 재료 및 방법

PCR(Polymerase Chain Reaction)을 이용한 국내 분리 *Salmonella*의 *stn* 유전자 검출[16]

*stn* 유전자 검출에 사용한 *Salmonella typhimurium* 1662-1666 균주와 *S. enteritidis* 308, 316-319 균주는 국립보건원 장내 세균과에서, *S. typhimurium* ATCC14028·KCTC 1925, 닭에서 분리된 *S. enteritidis* 2개의 strain과 *S. javiana*, *S. heidelberg*는 충북대 식품과에서, 그리고 가축에서 분리한 *S. typhimurium* 1-10과, *S. enteritidis* 1-10 strain은 서울대 수의대에서 각각 분양을 받아 총 36개의 *Salmonella* sp. 에서 *stn* 유전자 검출을 시도하였다. 각 strain의 colony에서 GeneReleaser™(Bioventures Inc.)를 사용하여 genomic DNA를 추출하여 PCR 반응의 template로 사용하였다. 분양 받은 각 균주에서 *stn* 유전자를 검출하기 위한 PCR primer로 5'-GCAGACGGTTCGAATCCAGCGGTT-3'(stn-1)과 5'-ACTATCTGGTCTGCAGTGATAGCG-3'(stn-2)를 합성하였다(Bioneer Co.). PCR 반응은 denaturation (94°C, 30sec), annealing(63°C, 30sec), polymerization (72°C, 30sec) 단계를 30회 반복한 후 PCR products는 gel

electrophoresis로 확인하였다.

## *Salmonella* RNA polymerase 정제 [2,10,23]

*Salmonella* seed culture를 2×LB 배지 3l에 접종한 후 발효조에서 A<sub>600</sub>≒2.5 정도까지 배양했다. *Salmonella* 균체를 회수하여 약 10 g의 균체를 얻었고 여기에 260 μg/ml lysozyme과 0.2% sodium deoxycholate를 처리하여 균체를 용해시키고, Polymin P (최종농도 0.35%)를 이용하여 RNA polymerase 조효소액을 얻었다. DNA-agarose column (Pharmacia Biotech Inc; 1.5×10 cm)을 TGED [10 mM Tris (pH 7.9), 5%(v/v) glycerol, 0.1 mM EDTA and DTT]+0.2M NaCl 버퍼로 미리 평형화 한 후, 0.2-1 M NaCl gradient를 2 ml/min의 유속으로 crude RNA polymerase를 정제하였다. 얻어진 각 분획을 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel (SDS-PAGE)을 사용하여 RNA polymerase의 β β' subunit을 확인 한 후 조효소액을 ammonium sulfate로 농축하였다. 농축된 조효소액은 0.3-0.5 M의 gradient를 1 ml/min의 유속으로 Mono-Q column(Pharmacia)을 사용하여 정제하였다. 약 0.38 M NaCl 농도에서 정제된 RNA polymerase를 얻었다. TGED 버퍼는 모든 정제과정에서 기본 버퍼로 사용하였다.

## Template cloning [21]

*stn* promoter region을 *EcoRI*과 *PstI* site를 만들어 준 stn-1과 stn-2 primer를 사용하여 PCR을 하였다. 크기가 약 400 bp인 fragment를 gel elution kit(QIAGEN Co.)를 사용하여 elution 한 후 각각의 제한 효소로 PCR fragment와 *in vitro* transcription template용 vector인 pSA600을 처리하였다. Ligation한 후 *E. coli* DH5α에 transformation하고 이 cloned vector를 pStm이라 명명하였다. Wizard miniprep Kit을 이용하여 supercoiled plasmid를 준비하였다.

## *In vitro* transcription assay [9,20]

*in vitro* transcription 반응은 20 mM Tris acetate, pH 8.0, 3 mM magnesium acetate, 200 mM potassium glutamate, 1 mM dithiothreitol, 1 mM ATP, 0.2 mM GTP, 0.2 mM CTP, 0.02 mM UTP, 10 μCi의 [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]UTP (800 Ci/mmol), 2 nM DNA template, 20 nM RNA polymerase, 5% glycerol을 기본으로 사용하였다. 40 nM CRP와 100 μM cAMP를 필요에 따라 넣고 37°C에서 10분 반응시킨 후 동량의 formamide loading buffer (80% formamide, 89 mM Tris borate, 89 mM boric acid, 2 mM EDTA, 0.05% bromophenol blue, 0.05% xylene cyanol)를 가하여 반응을 중지시켰다. 생성된 RNA는 8 M urea, 8% polyacrylamide gel에 걸어서 분리한 후 X-ray film에 감광하여 transcript를 확인하였다.

결과 및 고찰

한국에서 분리된 병원성 *Salmonella* 균주에서 장독소 유전자(*stn*)의 분포

*stn* 유전자는 *Salmonella enterica* strain에는 대부분 존재하지만 *Salmonella bongori*등에는 존재하지 않는다고 알려져 있으므로[16] 한국에서 분리된 다양한 strain에서의 *stn* 유전자의 분포를 알기 위하여 PCR을 수행하였다. *S. typhimurium* 17종, *S. enteritidis* 17종, 그리고 *S. heidelberg*, *S. javiana*를 가지고 PCR을 한 결과, 실험 한 36종의 모든 식중독 원인 *Salmonella* strain에서 *stn* 유전자에서 유래된 약 400bp의 DNA 단편을 얻을 수가 있었다.(Fig. 1) 이로써 국내에서 *Salmonella*에 의해 발생하는 식중독의 한 요인으로 장독소가 일정정도의 역할을 할 것이라는 간접적인 유추가 가능하였다. *Salmonella*의 모든 strain들이 장독소 유전자를 가지고는 있지만 장독소를 생성하지 않는 이유로는 몇 가지의 추측이 가능하다. 장독소가 생성되지 않는 strain은 *stn* 유전자내의 단일 유전자 치환(single base substitution)으로 인해 stop codon이 생성되는 경우와 또는 promoter 부위에 이와 비슷한 변화가 발생하여 promoter의 기능을 잃어버린 경우가 가능할 것이다. 다른 가능성으로는 병원성능이 없는 *Salmonella* strain인 LT2[24]의 경우와 같이 병원성능에 지대한 영향을 미치는 *rpoS*와 같은 regulator가 다른 strain과 달리 아주 적은 양으로 또는 전혀 발현이 안될 경우 *stn* 발현에 영향을 주는 것이 아닐까 생각되어진다. 마지막으로 ADP-ribosyltransferase-like activity를 나타내는 부분의 아미노산이 변이된 경우이다. 앞에 서술한 바와 같이 *Stn*은 ADP-ribosylation을 일으키는

다른 toxin들과 생물학적인 유사성을 보인다[22]. 지금까지 밝혀진 adenylate-cyclase 활성화 독소들은 아주 낮은 아미노산 서열 상동성을 보이고 있으며 conserved sequence가 있다 해도 몇몇 독소에서만 발견된다[14]. 그러므로 단 1개의 염기서열의 치환으로 인해서도 장독소의 활성화 부위에 존재하는 중요한 아미노산이 바뀔 수도 있으므로 독소는 생성되지만 그 표현형이 검출되지 않는 strain들이 존재할 가능성도 있다.

*Salmonella* RNA polymerase의 정제

*stn* 유전자의 조절 작용을 연구하기 위하여 *Salmonella* RNA polymerase를 정제하였다. Polymin P로 일부 정제한 조효소액을 DNA-agarose column으로 정제한 결과 모두 4

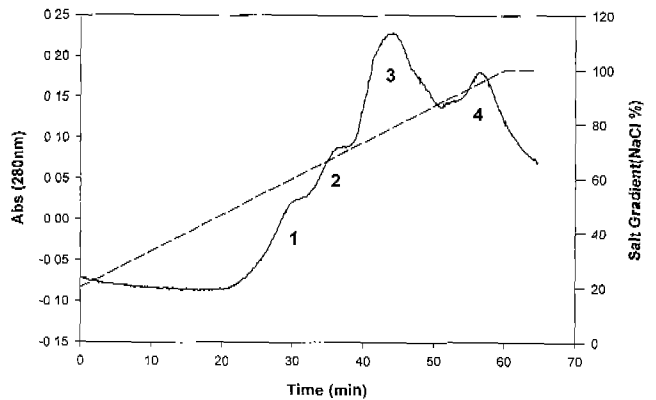


Fig. 2. DNA-Agarose chromatography. The salt gradient was from 0.2 M to 1.0 M of NaCl with flow rate of 2 ml/min. —: Abs(280 nm), ...: salt gradient

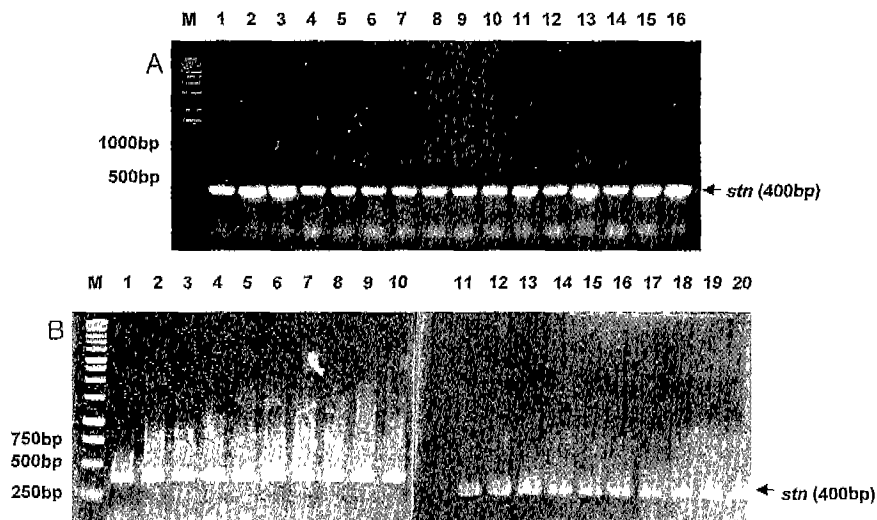


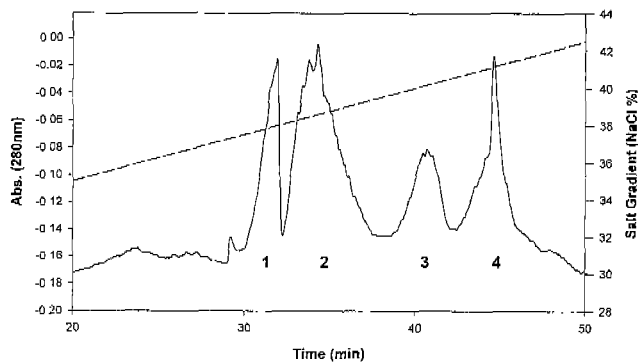
Fig. 1. Detection of *stn* gene in *Salmonella* sp. isolated in Korea using PCR. (A) 1-5: *S. enteritidis* 308, 316, 317, 318, 319 6-10: *S. typhimurium* 1662, 1663, 1664, 1665, 1666 11: *S. typhimurium* ATCC14028, 12: *S. typhimurium* KCTC1925 13: *S. enteritidis* from chicken, 14: *S. enteritidis* KY2 15: *S. heidelberg*, 16: *S. javiana* (B) 1-10: *S. typhimurium* SNU1-10, 11-20: *S. enteritidis* SNU1-10

개의 fraction을 얻을 수가 있었다(Fig. 2). 각각의 fraction을 SDS-PAGE로 확인한 결과 3번과 4번 fraction에서 RNA polymerase의  $\beta, \beta'$  subunit을 확인할 수 있었다. SDS-PAGE pattern으로 3번 fraction이 보다 더 정제된 형태임을 알 수 있었고 이 후 3번 fraction을 농축하여 Mono-Q chromatography를 수행하였다. Mono-Q 정제 후 역시 4개의 fraction을 얻을 수 있었고(Fig. 3) SDS-PAGE로 2번 fraction에서 분자량이 약 36kDa인  $\alpha$ , 약 150kDa인  $\beta, \beta'$  subunit과 분자량이 약 70 kDa인 sigma factor(RpoD)를 확인할 수 있었다(Fig. 4). Salt gradient가 약 0.38 M일 때 RNA polymerase가 elution되었으며 10g 정도의 *Salmonella* 균체에서 약 2mg 정도의 양을 얻을 수 있었다. 정제된 RNA polymerase는 *in vitro* transcription용 vector인 pSA600의 *repA* transcript(Fig. 6)의 발현으로 역기를 확인하였다.

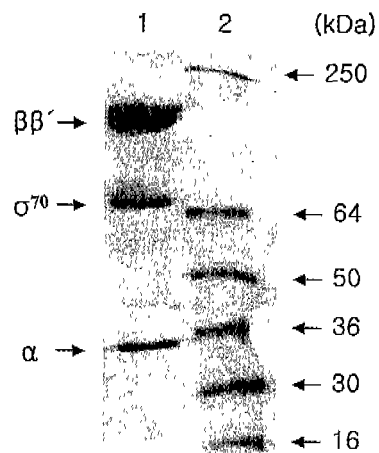
결과 +1 위치에 CRP 결합부위의 염기서열과 유사한 염기서열이 발견되어(Fig. 5) *in vitro* transcription에서 cAMP-CRP의 영향을 연구하였다. 정제된 RNA polymerase와 *stn* promoter를 가지고 있는 pStn plasmid, 그리고 cAMP, CRP등을 사용하여 *in vitro* transcription을 수행하였다. pSA 600은 *stn* promoter가 cloning되기 전인 plasmid로 negative control로 사용하였다. Fig. 6에서 볼 수 있듯이 pStn을 template로 사용한 경우에만 약 120bp의 *stn* transcript를 확인할 수 있었으며 cAMP와 CRP를 동시에 넣어 주었을 경우에 *stn* transcript의 현저한 감소를 볼 수 있었다(Fig. 6, lane 4). Phosphoimager (BAS 2500)를 사용하여 감소된 transcript의 intensity를 측정한 결과 cAMP-CRP complex가 있는 경우, 없는 경우에 비해 약 50%의 intensity를 나타내었지만 CRP만 단독으로 첨가하였을 경우에는 *stn*

**cAMP-CRP 단백질의 *stn* 발현 저해**

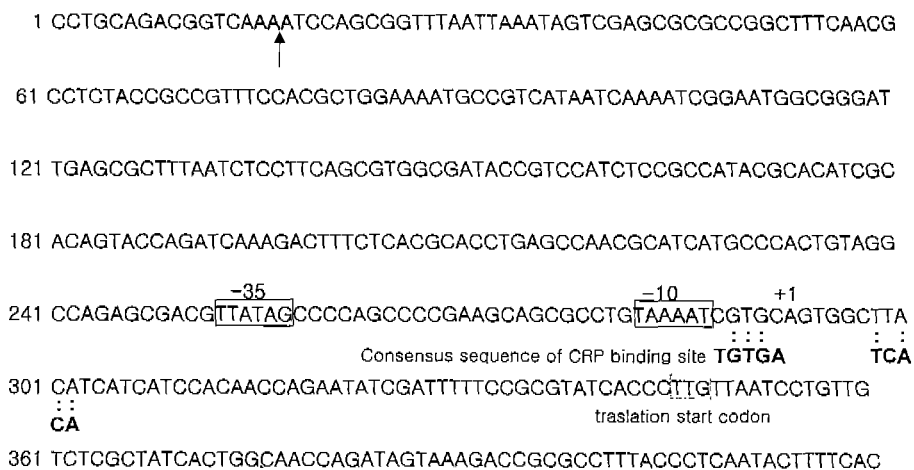
*stn* 유전자의 promoter 부분의 DNA 염기서열을 검토한



**Fig. 3 Mono-Q chromatography of DNA-Agarose fraction 3.** The salt gradient was from 0.3 M to 0.5 M of NaCl with flow rate of 1 ml/min. —: Abs (280 nm), ...: salt gradient



**Fig. 4. SDS-PAGE pattern of Mono-Q chromatography peak 2.** Samples were electrophoresed with 10% SDS-gel. Lane 1, purified RNA polymerase; lane 2, size marker



**Fig. 5. Organization of the *stn* promoter region.**

Arrows indicate the promoter region cloned into pSA600. -10 and -35 regions of *stn* promoter are indicated by box. Translation start codon was determined by Chopra *et al.*[4]

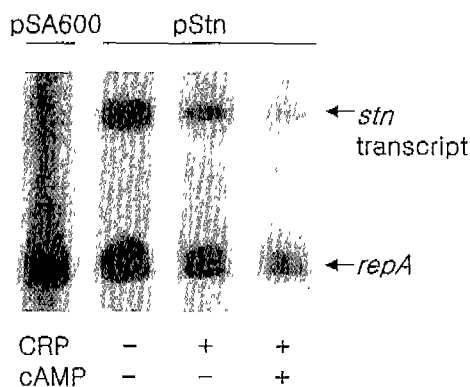


Fig. 6. *In vitro* transcription analysis of  $P_{stn}$  with or without cAMP · CRP complex.

pStn containing *stn* promoter was used as a template for *in vitro* transcription analysis. *repA* was used as an internal control.

transcript의 intensity가 변화를 보이지 않았으므로(Fig. 6, lane 3) *stn* transcript의 감소는(Fig. 6, lane 4)는 cAMP·CRP complex에 의한 효과임을 알 수 있었다. Fig. 5에 나타낸 바와 같이 대략 +1 site와 cAMP·CRP complex의 binding site가 서로 겹쳐져 있으므로 cAMP·CRP complex가 transcription을 방해하는 것으로 여겨진다.

cAMP·CRP complex에 의한 repression은 그 방식에 따라 두 가지 형태로 나뉘어진다. CRP 결합 부위가 RNA polymerase의 결합 부위와 겹쳐져 있어 cAMP·CRP complex가 RNA polymerase의 결합을 방해하는 경우를 direct repression이라 하고 activator의 결합을 방해하거나 DNA bending을 일으켜 repression-loop를 유도하여 transcription을 저해하는 경우를 indirect repression이라 한다[13]. *stn* promoter의 경우는 잠정적인 CRP binding site가 +1을 중심으로 위치해 있으므로 cAMP·CRP complex가 RNA polymerase의 결합을 방해하여 *stn*의 expression을 저해하거나, 또는 cAMP·CRP complex의 결합으로 DNA bending등이 발생하여 *stn*의 expression이 감소할 가능성이 있다. 이는 *Salmonella*가 장관 세포로 침입하였을 때나 다른 동물 세포 내에서 영양분의 변화에 민감하게 반응하여 *stn* 유전자의 발현이 조절될 것이라는 가능성을 시사하는 결과로서, *stn* 발현 조절을 연구하는데 중요한 단서가 될 것이라고 여겨진다. 또한, *stn* promoter의 -10 region은 conserved sequence (TATAAT)와 거의 일치하나, -35 region은 일반적인 conserved sequence (TTGACA)와 많은 차이가 있다. 이것은, *stn*의 발현이 cAMP·CRP complex와의 다른 regulator와의 상호작용에 의해서 조절될 것이라는 것을 암시한다고 볼 수 있다.

## 요 약

*Salmonella*로 인해 발생하는 salmonellosis에 장독소가

어떻게 관련이 되어 있는지는 아직 명확하게 밝혀져 있지 않다. *Salmonella typhimurium* (*stn*) 장독소 유전자는 다른 어떤 장독소와도 상동성을 보이지 않는 크기가 약 29 kDa인 독소를 만든다. *stn*의 발현은 장관세포와의 상호작용에 의해 증가하지만, *stn* 유전자를 가지고 있는 모든 strain들이 장독소를 생성하지는 않는다. 본 연구에서는 국내에서 분리된 36개의 *Salmonella* 병원성 균주에서 PCR을 이용하여 *stn* 유전자를 탐색한 결과 모든 균주에서 *Salmonella* 장독소 유전자를 발견할 수 있었다. *Salmonella* RNA polymerase를 polymin P fractionation과 DNA-agarose, Mono-Q chromatography를 통하여 정제하였고 정제된 RNA polymerase로 *in vitro* transcription assay를 수행한 결과 *stn* promoter의 발현이 cAMP·CRP complex에 의해 약 50%정도 감소함을 확인하였다. *Salmonella*가 장관 세포와 접촉했을 때 *Stn* 발현이 증가한다는 보고가 있지만 어떤 기작에 의해 일어나는 현상인지는 알려지지 않고 있다 [6]. 이 보고는, *stn* 유전자를 갖고 있는 균주 중에서 실제 *Stn*을 만드는 균주가 얼마 되지 않는다는 사실과[16] 함께 *stn* 유전자의 발현을 조절하는 미지의 환경인자가 있을 가능성을 시사하는 것이다.

## 감사의 글

본 연구는 1998년도 학술진흥재단 기초의학연구과제의 지원으로 수행되었으며, 임상용은 2000년도 두뇌한국21 사업에 의해 장학지원 되었기에 감사드립니다.

## REFERENCES

1. Bean, N. H., J. S. Golding, C. Lao, F. J. Angulo. 1996. Surveillance for Foodborne -Disease outbreaks-United States, 1988-1992. *Morbidity and Mortality Weekly Report* **45**: 1-55.
2. Burgess, R. R., and J. J. Jendrisak. 1975. A procedure for the rapid, large-scale purification of *Escherichia coli* DNA-dependent RNA polymerase involving polymin P precipitation and DNA-cellulose chromatography. *Biochemistry* **21**: 4634-4638.
3. Chary, P., R. Prasad, A. K. Chopra, and J. W. Peterson. 1993. Location of the enterotoxin gene from *Salmonella typhimurium* and characterization of the gene products. *FEMS Microbiol. Lett.* **111**: 87-92.
4. Chopra, A. K., A. R. Brasier, M. Dax, X. J. Xu, and J. W. Peterson. 1994. Improved synthesis of *Salmonella typhimurium* enterotoxin using gene fusion expression systems. *Gene* **144**: 81-85.
5. Chopra, A. K., J. H. Huang, K. Burden, M. W. Rosenbaum, and J. W. Peterson. 1999. Role of *Salmonella* enterotoxin in overall virulence of the organism. *Microb. Pathol.* **27**: 155-171.
6. Dinjus, U., I. Hanel, W. Muller, R. Bauerfeind, and R. Hel-

- muth. 1997. Detection and induction of *Salmonella* enterotoxin gene expression by contact with epithelial cells with RT-PCR. *FEMS Microbiol. Lett.* **146**: 175–179.
7. Duebber, I. E., and J. W. Peterson. 1985. Enterotoxin-induced fluid accumulation during experimental salmonellosis and cholera: Involvement of prostaglandins synthesis by intestinal cells. *Toxicon.* **23**: 157–172.
  8. Finlay, B. B., and S. Falkow. 1997. Common theme in microbial pathogenicity revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**: 136–169.
  9. Garges, S., H. Choy, and S. Ryu. 1995. Techniques to isolate specialized templates for *in vitro* transcription assays. *Methods in Molecular Genetics vol. 6, Microbial Gene Techniques.* pp389-399. Academic Press.
  10. Hager, D. A., D. J. Jin, and R. R. Burgess. 1990. Use of MonoQ-resolution Ion-exchange chromatography to obtain highly pure and active *Escherichia coli* RNA polymerase. *Biochemistry.* **29**: 7890–7894.
  11. Jones, B. D., and S. Falkow. 1996. Salmonellosis: host immune responses and bacterial virulence determinants. *Ann. Rev. Immunol.* **14**: 533–561.
  12. Khurana, S., N. K. Ganguly, M. Khullar, and D. Panigrahi. 1991. Studies on the mechanism of *Salmonella typhimurium* enterotoxin-induced diarrhoea. *Biochim. Biophys. Acta.* **1097**: 171–176.
  13. Kolb, A., S. Busby, H. Buc, S. Garges, and S. Adhya. 1993. Transcriptional regulation by cAMP and its receptor protein. *Annu. Rev. Biochem.* **62**:749–795
  14. Olson, J. C. 1993. Use of synthetic peptides and site-specific antibodies to localize a diptheria toxin sequence associated with ADP-ribosyltransferase activity. *J. Bacteriol.* **175**: 898–901.
  15. Peterson, J. W. 1986. *Salmonella* toxins. In *Int. Encyclop. Pharmacol. and Therapeutics.* (section 119) *Pharmacology of bacterial toxins* (F. Domer and J. Drews, eds), pp 227–234, Pergamon Press, Oxford.
  16. Prager, R., Fruth, A. and Tsch pe, H. (1995) *Salmonella* enterotoxin(*stn*) gene is prevalent among *Salmonella enterica* but not among *Salmonella bongori* and other *Enterobacteriaceae*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **12**: 47–50.
  17. Prasad, R., A. K. Chopra, J. W. Peterson, R. Pericas, and C. W. Houston. 1990. Biological and immunological characterization of cloned cholera toxin-like enterotoxin from *Salmonella typhimurium*. *Microb. Pathog.* **9**: 315–329.
  18. Prasad, R., A. K. Chopra, P. Chary, and J. W. Peterson. 1992. Expression and characterization of the cloned enterotoxin. *Microb. Pathog.* **13**: 109–121.
  19. Reeves-Darby, V. G., J. A. Turner, R. Prasad, A. K. Chopra, P. Chary, M. H. Clench, J. W. Peterson, and J. R. Mathias. 1995. Effect of cloned *Salmonella typhimurium* enterotoxin on rabbit intestinal motility. *FEMS Microbiol. Lett.* **134**: 239–244.
  20. Ryu, S., and S. Garges. 1994. Promoter switch in the *Escherichia coli pts* operon. *J. Biol. Chem.* **269**: 4767–4772.
  21. Ryu, S., S. Garges, and S. Adhya. 1994. An arcane role of DNA in transcription activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 8582–8586.
  22. Sixma, T. K., S. K. Pronk, K. H. Kalk, E. S. Wartna, B. A. M. van Zanten, B. Witholt, and W. G. J. Hol. 1991. Crystal structure of a cholera toxin-related heat-labile enterotoxin from *E. coli*. *Nature.* **351**: 371–377.
  23. Sukhodolets, M. V., and D. J. Jin. 1998. RapA, a novel RNA polymerase-associated protein, is a bacterial homolog of SWI2/SNF2. *J. Biol. Chem.* **273**: 7018–7023.
  24. Swords, W. E., B. M. Cannon, and W. H. Benjamin. 1997. Avirulence of LT2 strains of *Salmonella typhimurium* results from a defective *rpoS* gene. *Infect. Immun.* **65**: 2451–2453.
  25. Wallis, T. S., W. G. Starkey, J. Stephan, S. J. Haddon, M. P. Osborne, and D. C. A. Candy 1986. The nature and role of mucosal damage in relation to *Salmonella typhimurium*-induced fluid secretion in the rabbit ileum. *J. Med. Microbiol.* **22**: 39–49.

(Received November 20, 2000)