HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ウマヘルペスウイルス1型感染症の遺伝子診断とウイルスDNAの解析に関する研究
Author(s)	桐澤, 力雄
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(獣医学)
Dissertation Number	乙第4992号
Issue Date	1996-03-25
DOI	https://doi.org/10.11501/3112181
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/51349
Type	doctoral thesis
File Information	000000297373.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

ウマヘルペスウイルス1型感染症の遺伝子診断と
ウイルスDNAの解析に関する研究

桐澤力雄

①

ウマヘルペスウイルス１型感染症の遺伝子診断と

ウイルスDNAの解析に関する研究

桐　澤　力　雄

目　次

緒　　言……1

第１章　ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によるウマヘルペスウイルス１型（EHV-1）ならびにウマヘルペスウイルス４型（EHV-4）感染症の迅速確定診断……4

要　旨……4

序　文……5

材料と方法……5

成　績……10

1）PCR産物の特異性……10

2）ネステッドPCR……11

3）野外例へのPCRの応用……11

考　察……18

第２章　日本のウマ流産胎子から分離されたEHV-1株のウイルスDNA解析……20

要　旨……20

序　文……21

材料と方法……22

成　績……27

1）日本で初めてウマから分離されたEHV-1 HH1株のウイルスDNA制限酵素切断プロファイル……27

2）HH1株ウイルスDNAの *Bam* HI 断片のクローン化……28

3）HH1株のウイルスDNA制限酵素切断地図の作成……28

4）EHV-1野外分離株のウイルスDNAの解析……28

考　察……41

第３章　ウシ腎臓（BK）細胞継代EHV-1ウイルス株のＤＮＡ解析……44

要　旨……44

序　文……45

材料と方法……46

成　績……49

1）HH1株とそのBK細胞継代株（BK77、BK161、BK271、BK343）のウイルス

DNA プロファイル 49
2）BK343 株の 5 種類のウイルスクローン（1E、1F、3F、3G、3H）の DNA プロファイル 50
3）BK343 株のウイルスクローン 3F の DNA 解析 51
4）1 番遺伝子の塩基配列 61
5）24 番遺伝子の変異領域の塩基配列 61
6）71 番遺伝子の塩基配列 62
考　察 86
第 4 章　71 番遺伝子組み換え EHV-1 のマウス肺における増殖性 90
要　旨 90
序　文 91
材料と方法 92
成　績 98
1）組み換えウイルスの作出 98
2）ウイルスタンパク 99
3）組み換えウイルスの培養細胞における増殖性 99
4）組み換えウイルスの細胞接触を介した感染性 100
5）組み換えウイルスのマウス肺における増殖性 100
考　察 111
総　括 114
謝　辞 116
参　考　文　献 117
英　文　抄　録 129

主 な 略 語

BHV-1	: ウシヘルペスウイルス１型
BK	: ウシ腎臓
β-gal	: β-ガラクトシダーゼ
CIP	: 子ウシ腸由来アルカリフォスファターゼ
CPE	: 細胞変性効果
DME	: ダルベッコの変法イーグル培地
EHV-1	: ウマヘルペスウイルス１型
EHV-2	: ウマヘルペスウイルス２型
EHV-4	: ウマヘルペスウイルス４型
FCS	: ウシ胎子血清
HK	: ウマ腎臓
HSV-1	: 単純ヘルペスウイルス１型
IPTG	: イソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド
MEM	: イーグルの最小必須培地
PAGE	: ポリアクリルアミドゲル電気泳動
PBS	: リン酸緩衝食塩水
PCR	: ポリメラーゼ連鎖反応
PrV	: オーエスキー病ウイルス
SDS	: ドデシル硫酸ナトリウム
TK	: チミジンキナーゼ
VZV	: 水痘-帯状疱疹ウイルス
X-gal	: 5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-β-D-ガラクトシド

緒　言

ウマヘルペスウイルス１型（equine herpesvirus-1: EHV-1）は、アルファヘルペスウイルス亜科に属し、妊娠馬の死流産や子ウマの鼻肺炎、また、ときには神経疾患を引き起こす。同じ亜科に属するウマヘルペスウイルス４型（equine herpesvirus-4: EHV-4）は主として子ウマに呼吸器疾患、また、まれに妊娠馬に死流産を起こす。これら２つのウイルス感染による疾病はウマ鼻肺炎と総称されている（AllenとBryans, 1986; BryansとAllen, 1989）。EHV-1によるウマの流産は1936年にアメリカ合衆国で初めて確認され（DimockとEdwards, 1936）、その後、Dollら（1953）によって原因ウイルスが流産馬材料をハムスターに接種して分離された。さらに、当時、ウマインフルエンザと呼ばれていた呼吸器疾患の原因ウイルスがEHV-1と同一であることが明らかにされた（Dollら, 1957）。Shimizuら（1959）は、日本で分離されたEHV-1株（H-45株）の抗原性が中和試験でアメリカ合衆国で分離されたKyD株のものと明らかに異なることを報告し、EHV-1には血清型の異なる2種類のウイルスの存在が示された。その後、アメリカ合衆国の株を亜型1（あるいはアメリカ型）、日本の株を亜型2（あるいは日本型）と呼称されていたが、近年、ウイルスDNAの制限酵素切断プロファイルが両亜型で著しく異なることから（Sabineら, 1981; Studdertら, 1981）、亜型1はEHV-1、そして亜型2 はEHV-4として再分類された。

わが国ではEHV-4がウマに広く伝播していることが報告されていたが（Kawakamiら, 1959; Shimizuら, 1963）、当時、EHV-1の存在は確認されていなかった。EHV-1のわが国への伝播は、1966年から1967年にかけてアメリカ合衆国およびイギリスから北海道日高地方に輸入された妊娠馬の流産を発生源とし、周囲に「流産の嵐」となって波及した（Kawakamiら, 1970）。以来、わが国ではEHV-1による流産は毎年発生し、軽種馬生産業界に多大の経済損失を与えていることから、ウマのウイルス性疾病の中で最も重要視されている。

EHV-1あるいはEHV-4の感染を受けたウマでは、ヘルペスウイルス感染の特性として回復後もウイルスは体内に潜み（潜伏感染）、種々の要因でウイルスが再活性化され、馬群内での感染源となる。EHV-1による流産の初発は、鼻肺炎に罹患した子ウマや外部から導入したウマからの感染、あるいは潜伏感染していたウイルスの再活性化で起こる。流産胎子には多量のウイルスが含まれているのでこれが次の汚染源になって流産が続発する。従って、EHV-1による流産の蔓延を防ぐには迅速な確定診断とワクチンによる防御が必要である。

本疾病の実験室内診断は、主にウイルスの分離・同定をもとにして行われるが、両ウイルス

は抗原性状が似ているため、その型別は型特異的なモノクローナル抗体を用いた血清反応（Yearganら, 1985）、あるいはウイルスＤＮＡの制限酵素切断プロファイルの解析（Sabineら, 1981; Studdertら, 1981）などで行われている。しかし、これらの方法は確定診断までに長期間を要する。

EHV-1による流産を防止する目的で、わが国では1979年より不活化ワクチンが実用化されている（Hashiguchiら, 1980）。諸外国では生ワクチンを実用化しているところもあるが、効果はいずれも不充分で（Bürkiら, 1991）、さらに有効なワクチンの開発が切望されている。

EHV-1のウイルスDNAは、直鎖状２本鎖で約150kbの塩基からなり、Ｌ領域とＳ領域に分けられる（Henryら, 1981; Whalleyら, 1981）。Telfordら（1992）はイギリスで分離されたEHV-1強毒株Ab4の全塩基配列を決定し、76種類の遺伝子がウイルスゲノム上に存在することを示唆した。さらに、この遺伝子の配列順序は既に全塩基配列が決定された水痘-帯状疱疹ウイルス（varicella zoster virus: VZV）（DavisonとScott, 1986）および単純ヘルペスウイルス1型（herpes simplex virus type 1: HSV-1）（McGeochら, 1988）のそれと非常に良く似ていると報告されている。EHV-1 DNAの制限酵素切断プロファイルの解析では、分離株間で多様性のあることが報告されている（AllenとBryans, 1986; Chowdhuryら, 1986）。アメリカ合衆国では、不活化ワクチンの実用化前と実用化後にウマ流産胎子から分離された株のDNAプロファイルが大きく異なっていたと報告されている（Allenら, 1985; AllenとBryans, 1986）。このように野外で流行しているウイルスのDNAプロファイルを把握しておくことはワクチン開発や防疫対策上重要である。

Kawakamiら（1978）は生ワクチンを開発する目的で、強毒株をウシ腎臓（BK）細胞で長期間連続継代して子ウマに病原性を示さない株を得たが、ワクチン効果は認められなかった。このように、弱毒生ワクチンは強毒株を本来の宿主以外の動物や培養細胞で連続して継代することによって作出されるが、病原性がなく且つ免疫原性の高い株を得ることは困難である。免疫原性の高い弱毒株の選択を効率良く行う方法として、近年、遺伝子操作によるワクチン開発が種々のウイルスで進められ、例えば、オーエスキー病ウイルス（pseudorabies virus: PrV）では既にわが国を含め多くの国々で遺伝子組み換え弱毒生ワクチンが実用化されている（KitとKit, 1991）。しかし、EHV-1に関しては、これまでに病原性に関与する遺伝子の解明がほとんどなされておらず、遺伝子操作によるワクチン開発が著しく困難であった。

そこで、著者はEHV-1による流産の防疫対策の一環として、EHV-1感染症の迅速な確定診断法の確立と遺伝子組み換えによるワクチン開発に必要な基礎研究を行った。すなわち、第1

章では、本ウイルスによる流産の蔓延防止を目的に、ポリメラーゼ連鎖反応（polymerase chain reaction: PCR）を応用した早期確定診断法の確立について述べた。第2章では、わが国でウマ流産胎子から分離されたウイルス株のDNAプロファイルを不活化ワクチンの実用化前の分離株と実用化後の分離株に分けて調べ、さらに、分離株間で分子量に変化のみられたウイルスゲノム領域の同定について述べた。第3章では、EHV-1の病原性に関与する遺伝子の検索を目的に、強毒株とそれをBK細胞で長期間連続継代して作出された弱毒株のウイルスDNA構造を詳細に比較検討した成績について述べた。第4章では、第3章の成績で明らかとなった弱毒株の71番遺伝子の変異と病原性との関係を、組み換えウイルスを作出して調べた成績について述べた。

第１章　ポリメラーゼ連鎖反応によるEHV-1ならびにEHV-4感染症の迅速確定診断

要　　旨

EHV-1とEHV-4感染症を迅速に診断する目的でポリメラーゼ連鎖反応（polymerase chain reaction: PCR）の応用を試みた。プライマーは両ウイルスのエンベロープ糖タンパクgB遺伝子の塩基配列をもとに、両ウイルスに共通のもの3種類ならびにEHV-1とEHV-4 のそれぞれに特異的なもの1種類ずつの合計5種類を設定した。各種プライマーペアを用いてPCRを行ったところ、共通のプライマーペアではEHV-1 とEHV-4 を、EHV-1 特異的プライマーペアでは１型のみを、また、EHV-4 特異的プライマーペアでは４型のみを増幅した。両型にそれぞれ特異的なプライマーを混合してPCRを行うと、プライマー間相互の影響なしにDNAが増幅され、容易に型別することができた。野外のウマ流産例に本法を応用したところ、PCRによる成績はウイルス分離成績と完全に一致した。

以上の成績より、本PCR法は両ウイルス感染症の優れた迅速確定診断法であることが示唆された。

序　文

EHV-1およびEHV-4感染症のウイルス学的診断は、鼻汁拭い液、バフィーコートあるいは流産胎子臓器からのウイルス分離や血清学的方法によるウイルス抗原検出で行われるが、両ウイルスは抗原的に近縁なため、ポリクローナル抗体を用いた血清反応での同定は困難であった（Thomsonら, 1976; MumfordとRossdale, 1980; BryansとAllen, 1989）。そこで、型別は両ウイルスにそれぞれ特異的なモノクローナル抗体を用いた血清反応（Yearganら, 1985）あるいはウイルスDNAの制限酵素切断プロファイルの解析（Sabineら, 1981; Studdertら, 1981）などにより行われている。しかし、これらの方法では検出感度が低かったり確定診断まで長期間を要することなどから、EHV-1による流産の蔓延防止のため迅速で鋭敏な診断法の開発が望まれてきた。

近年、耐熱性DNAポリメラーゼを用いて特定のDNAを増幅するPCRが開発され（Saikiら, 1985; MullisとFaloona, 1987）、種々のウイルス性疾患の迅速で鋭敏な診断法として応用されている。EHV-1感染の診断にもPCRを用いた報告が数例なされているが、それらの方法ではEHV-1とEHV-4のいずれのDNAをも増幅できるためPCRだけでは確定診断が難しく、制限酵素切断や型特異的プローブを用いたサザンハイブリダイゼーションによる診断法が併用されていた（Ballagi-Pordányら, 1990; O'Keefeら, 1991; Sharmaら, 1992; Welchら, 1992）。そこで、著者はEHV-1およびEHV-4のエンベロープ糖タンパクgB遺伝子の塩基配列（Whalleyら, 1989; Riggioら, 1989）をもとにプライマーを設定し、両ウイルスをPCRだけで迅速に型別する方法を検討した。

材　料　と　方　法

1）ウイルス

EHV-1として、日本で初めてウマ流産胎子材料から初代ウマ腎臓（HK）細胞に分離されたHH1株（Kawakamiら, 1970）とアメリカ合衆国でウマ流産胎子材料をハムスターに接種して分離されたKyD株（Dollら, 1954）を用いた。EHV-4には急性気道感染例の子ウマの鼻汁からHK細胞に分離されたTH20株（Kawakamiら, 1962）と酪農学園大学酪農学部獣医学科獣医微生物学教室で子ウマの気道感染例からHK細胞に分離されたR1株を用いた。ウマヘルペスウ

イルス２型（equine herpesvirus-2: EHV-2）はウマに広く潜伏感染していることから、EHV-2として同教室でHK細胞を長期間培養して分離されたC1株と健康なウマの末梢血リンパ球から株化ウマ皮膚（E. Derm）細胞に分離されたY5株を用いた。HH1株の高継代株としてBK細胞で343回連続継代して得られたBK343株を用いた（Kawakamiら, 1978）。

さらに、ウシヘルペスウイルス１型（bovine herpesvirus-1: BHV-1）のLos Angeles株とPrVのYamagata-S81株（Fukushoら, 1981）を用いた。

EHV-1、-2と-4の増殖はE. Derm細胞、BK343株とBHV-1は株化ウシ腎臓（MDBK）細胞ならびにPrVは株化ブタ腎臓（ESK）細胞で行った。

2）培養液

E. Derm細胞の増殖用培養液には、ダルベッコの変法イーグル培地（Dulbecco's modified Eagle medium: DME、Gibco BRL社、アメリカ合衆国）に非働化ウシ胎子血清（fetal calf serum: FCS、Gibco BRL社、アメリカ合衆国）を10%、$NaHCO_3$を0.75 mg/ml、ペニシリン200単位/ml、ストレプトマイシン200 μg/ml、カナマイシン20 μg/ml、ファンギーソン1.5 μg/mlを加えたものを用いた。MDBK細胞とESK細胞は、イーグルの最少必須培地（Eagle's minimum essential medium: MEM、Gibco BRL社、アメリカ合衆国）にFCSを５%、$NaHCO_3$をMDBK細胞には0.75 mg/ml、ESK細胞では1.5 mg/ml添加し、抗生物質・抗真菌剤は前述と同量加えて培養した。維持培養液は増殖用培養液のFCS濃度をE. Derm細胞では５%、また、MDBK細胞とESK細胞では１%に低めたものを用いた。

3）ウイルス粒子からのDNA抽出

単層培養細胞にウイルスを接種し、細胞変性効果（cytopathic effect: CPE）が約80%出現したときに培養上清を回収した。これを４℃で8,000rpm 10分間遠心し、その上清を20%ショ糖（w/v）を加えたリン酸緩衝食塩水（phosphate buffered saline: PBS、pH 7.2）上に重層して４℃で30,000 rpm 90分間遠心した（SCP85H、RP42ローター、日立工機、茨城）。この沈査を最初の培養上清の1/100 量のPBSに浮遊し、部分精製ウイルスとした。

部分精製ウイルス液200 μlにDNA抽出液［プロナーゼ-E 1.5 mg/ml、100 mM Tris-HCl pH 9.0、100 mM NaCl、1% ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）、5 mM EDTA］400 μlを加えて静かに転倒混和し、37℃に一晩静置した。等量のフェノールを加え、15分間穏やかに転倒混和した後、3,000 rpm 10分間遠心し、水層を回収した。再度同様の処理を行った後、等量のク

ロロホルム・イソアミルアルコール（24：1）を加えて穏やかに15分間転倒混和した後、3,000rpm 10分間遠心し、水層を回収した。同様の操作を水層の白濁が消えるまで繰り返した。回収した水層に1/10 量の3M 酢酸ナトリウム（pH 5.2）と2.5 倍量の100％ エタノールを混合して−20℃に一晩静置した。これを12,000 rpm 20分間遠心し、沈査を70％ エタノールで２回洗浄して乾燥後、TE溶液（10 mM Tris-HCl pH 8.0、1 mM EDTA）50 μlに溶解して4 ℃で保存した（Sambrookら, 1989）。

4）ウイルス感染細胞からのDNA抽出

ウイルスを接種した単層培養細胞の約80％にCPEが認められたとき、培養上清を除去し、ウイルス感染細胞にDNA抽出液を加えて37 ℃で一晩消化した。感染細胞溶解液をラバーポリスマンを用いて回収し、上記と同様に行ってDNAを抽出した。

5）野外材料

14例の野外ウマ流産胎子から肺、脾臓、胸腺、肝臓と腎臓を採取し、５倍量の抗生物質と抗真菌剤を加えたMEMで10％乳剤を作製した。DNA抽出は10％乳剤を出発材料として上記の方法で行った。ウイルス分離には10％乳剤を3,000 rpm 10分間遠心し、その上清をHK細胞あるいはE. Derm 細胞に接種して行った（Shimizuら, 1959）。 分離ウイルスの同定はウイルスDNAの制限酵素切断プロファイルを解析して行った。

6）ウイルスDNAの制限酵素切断と電気泳動

ウイルスDNAは制限酵素*Bam* HI（Boehringer Mannheim 社、ドイツ）を用いて、至適条件下で切断した。酵素消化したDNA断片は、0.7％ アガロースゲルで15V 14～16時間、TAE緩衝液（40 mM Tris-acetate、1 mM EDTA）中で泳動した。ゲルはエチジウムブロマイド（0.5 μg/ml）で染色し、紫外線トランスイルミネーター上で写真撮影を行った。

7）プライマー

EHV-1 とEHV-4 の糖タンパクgB遺伝子の塩基配列（Whalleyら, 1989; Riggioら, 1989）をDNA 解析用ソフトDNASIS（日立ソフトウェアエンジニアリング、神奈川）で比較したところ相同性が83％を示していた。この成績をもとに5種類のプライマーを設定した（表1）。正方向のプライマーとして両ウイルスに共通の配列のFC2とFC3の2種類を設定した。逆方向の

表1. プライマーの塩基配列

プライマー	特異性	塩基配列 (5'–3')	位置	
FC2	EHV–1 & –4	CTTGTGAGATCTAACCGCAC	EHV–1	2,427–2,446
			EHV–4	1,737–1,756
FC3	EHV–1 & –4	ATACGATCACATCCAATCCC	EHV–1	2,699–2,718
			EHV–4	2,003–2,022
RC (逆方向)	EHV–1 & –4	GGGTATAGAGCTTTCATGGG	EHV–1	3,607–3,588
			EHV–4	2,911–2,892
R1 (逆方向)	EHV–1	GCGTTATAGCTATCACGTCC	EHV–1	2,886–2,867
R4 (逆方向)	EHV–4	CCTGCATAATGACAGCAGTG	EHV–4	2,679–2,660

表2. PCR産物の推定塩基数

	塩基数 (bp)	
プライマーペア	EHV–1	EHV–4
FC2–RC	1,181	1,175
FC2–R1	460	–
FC2–R4	–	943
FC3–R1	188	–
FC3–R4	–	677

プライマーとしては両ウイルスに共通のRC、EHV-1に特異的なR1およびEHV-4に特異的なR4の３種類を設定した。プライマーはDNAシンセサイザー（Model 380B、Applied Biosystem社、アメリカ合衆国）を用いて合成した。各プライマーペアで増幅するDNA断片の予想される塩基数を表2 に示した。

8）PCR

PCR用チューブにDNA溶液５μl、10倍濃度の反応液（100 mM Tris-HCl pH 8.3、500 mM KCl、15 mM $MgCl_2$、0.01% ゼラチン）10μl、200μMのdATP、dCTP、dGTPとdTTPをそれぞれ2 μlおよび1 μMの正方向と逆方向のプライマーをそれぞれ2 μlずつ加えて再蒸留水で総量99.5 μlとした。蒸発を防ぐためにミネラルオイルを60 μl 重層した後、94℃６分間加熱後72 ℃に保ち、Taqポリメラーゼ0.5 μl（2.5 単位、Perkin-Elmer社、アメリカ合衆国）を加えた。反応条件は、熱変性ステップ94℃１分、アニーリングステップ60℃１分と伸長ステップ72℃３分を１サイクルとして、Thermal Cyclic Reactor（Model TC-100、朋栄科学、東京）を用いて35サイクル反応を行った。PCRを行なうときは常に陽性と陰性の対照をおいた。増幅したDNA断片は2％ アガロースゲルを用いて100 V 30分間、 TAE緩衝液中で電気泳動を行って解析した。

9）ジゴキシゲニン標識オリゴヌクレオチドプローブ

EHV-1とEHV-4に特異的な25 merのオリゴヌクレオチド配列を、すべてのプライマーペアで共通に増幅されるgB遺伝子領域内の塩基配列から選択した。すなわち、EHV-1に特異的なオリゴヌクレオチド（gB1）の塩基配列は5'-CGAGCGCCATAGTCTCCGCAACCCT-3'（位置：2,812～2,836）、また、EHV-4に特異的なオリゴヌクレオチド（gB4）の塩基配列は5'-CAAGCGCTATTGTTTCCGCCACTCT-3'（位置：2,116～2,140）であり、これらのオリゴヌクレオチドの3' 端にジゴキシゲニン-11-dUTPをターミナルデオキシヌクレオチドトランスフェラーゼを用いて標識し、プローブとした（Schmitzら, 1991）。

10）サザンハイブリダイゼーション

電気泳動後のアガロースゲル中のDNA断片はSouthernの方法（1975）に従ってニトロセルロースメンブラン（0.45 μm、Schleicher & Schuell 社、ドイツ）に転写し、80℃２時間加熱して固定した。メンブランはプレハイブリ液［5倍濃度のSSC（1倍濃度: 150 mM NaCl、15

mM クエン酸ナトリウム pH 7.0）、1％ ブロッキング剤（Boehringer Mannheim 社、ドイツ）、0.1% N-ラウロイルサルコシン、0.02% SDS］に68℃ 1時間浸した。ハイブリダイゼーションはジゴキシゲニン標識オリゴヌクレオチドプローブをプレハイブリ液に10 pmol/ml の濃度で加え、55℃で 6 時間行った。その後、このメンブランを0.1％ SDS を含む2倍濃度のSSCで室温 5分の振盪洗浄を2回、次いで、0.2倍濃度のSSC-0.1％ SDS で55℃ 5分の洗浄を2回反復した。ハイブリダイズしたバンドはアルカリフォスファターゼ標識抗ジゴキシゲニン抗体を用いた免疫学的方法（DNA検出システム、Boehringer Mannheim 社、ドイツ）でメンブラン上に発色させた。

成　績

1）PCR産物の特異性

EHV-1とEHV-4のgB遺伝子を標的に設定した5種類のプライマーを組み合わせてPCRを行った。鋳型DNAにはEHV-1（2株）、EHV-4（2株）、EHV-2（2株）、BHV-1とPrVならびにウマ由来の HK 細胞 と E. Derm 細胞の各DNAを用いた。EHV-1とEHV-4に共通のプライマーペア、FC2-RCを用いてPCRを行ったところ、EHV-1とEHV-4 のウイルスDNA がともに増幅し、その塩基数は約1,180 bp で予想した値と一致した（図1-A、表2）。他の鋳型DNAでは増幅はみられなかった。これらの増幅DNAがgB遺伝子内の産物であるかどうかをみるために、増幅領域内の塩基配列をもとにして作製されたオリゴヌクレオチドプローブを用い、サザンハイブリダイゼーションにより検討した（図1-B、C）。EHV-1に特異的なgB1プローブはEHV-1の2株、また、EHV-4に特異的なgB4プローブはEHV-4の2株とのみ反応したことから、本PCRによる増幅断片の特異性が確認された。

EHV-1に特異的な2種類のプライマーペア、FC2-R1とFC3-R1を用いてPCRを行ったところ、EHV-1のみが増幅され、しかも、その塩基数はそれぞれ約460 bp と約190 bp であって予想した値と一致した（図2）。次に、EHV-4に特異的な2種類のプライマーペア、FC2-R4とFC3-R4でPCRを行ったところ、EHV-4のみが増幅され、その塩基数もそれぞれ約940 bp と約680 bp で予想値と一致した（図3）。

EHV-1のHH1株をBK細胞で高継代して作出されたBK343株にこれらのプライマーを応用したところ、EHV-1とEHV-4に共通のプライマーペアとEHV-1に特異的な2種類のプライマー

ペアで増幅がみられ、しかも、それらの塩基数も予想した値と一致していた（図4）。しかし、EHV-4に特異的な2種類のプライマーペアではBK343株のDNA増幅はみられなかった。

1回のPCRだけでEHV-1とEHV-4を鑑別する目的で、3種類のプライマー、すなわち、両ウイルスに共通のFC3、EHV-1 に特異的なR 1 とEHV-4 に特異的なR4 を混合して（混合プライマー）PCRを行った（図5）。その結果、これらのプライマーは互いに影響することなく作用し、EHV-1では約190 bp、また、EHV-4では約680 bpの特異的な断片が増幅された。また、EHV-1とEHV-4の両方が存在する材料では、2種類の断片が増幅され、塩基数の差で両ウイルスを型別することができた。

2）ネステッドPCR

PCRによるウイルスDNAの検出感度を高めるためにネステッドPCRを試みた（図6）。EHV-1 HH1株のウイルス粒子から抽出したDNAをTE溶液で10倍階段希釈して10 pg/μl～1 ag/μlに調整し、その1 μlを鋳型DNAとして用いた。共通プライマーペア、FC2-RCで1回目のPCRを行ったところ、1 pgの鋳型DNAまで約1,180 bpの断片が検出された（図6-A）。続いて、1回目のPCRの増幅遺伝子の内側に設定した混合プライマー・FC3-R1-R4を用いて1回目のPCR産物1 μlを鋳型として2回目のPCRを行った。その結果、約190 bpのEHV-1に特異的なDNA断片を1 fgまで検出でき（図6-B）、感度が1,000倍上昇した。

3）野外例へのPCRの応用

混合プライマー（FC3、R1、R4）を用いたPCRをウマの流産例に応用し、ウイルス分離の成績と比較した（表3）。14例のウマ流産胎子の肺、脾臓、胸腺、肝臓と腎臓の計58検体の臓器乳剤からウイルス分離を行ったところ、8例の流産馬の各種臓器からウイルスが分離された。分離ウイルスのDNAプロファイルを解析したところ、これらはすべてEHV-1と同定された（データ示さず）。同じ臓器乳剤から抽出したDNAのPCRによる増幅成績は、ウイルス分離の成績と完全に一致した。

A. プライマーペア、FC2-RCの電気泳動プロファイル



B. gB1 プローブ

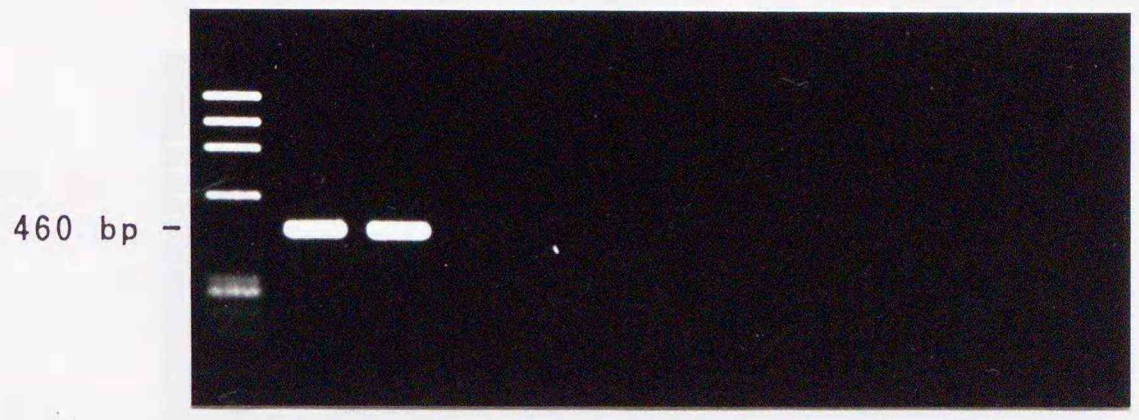
1,180 bp -

C. gB4 プローブ

1,180 bp -

図1.（A）EHV-1とEHV-4に共通なプライマーペア、FC2-RCによるPCR産物の電気泳動プロファイル。DNA 分子量マーカーにはφX174ファージDNAの*Hae* III切断断片を用いた。（B）Aのゲルの PCR 産物の gB1 プローブによるサザンハイブリダイゼーション。（C）Aのゲルの PCR 産物の gB4 プローブによるサザンハイブリダイゼーション。

A. FC2-R1 の電気泳動プロファイル

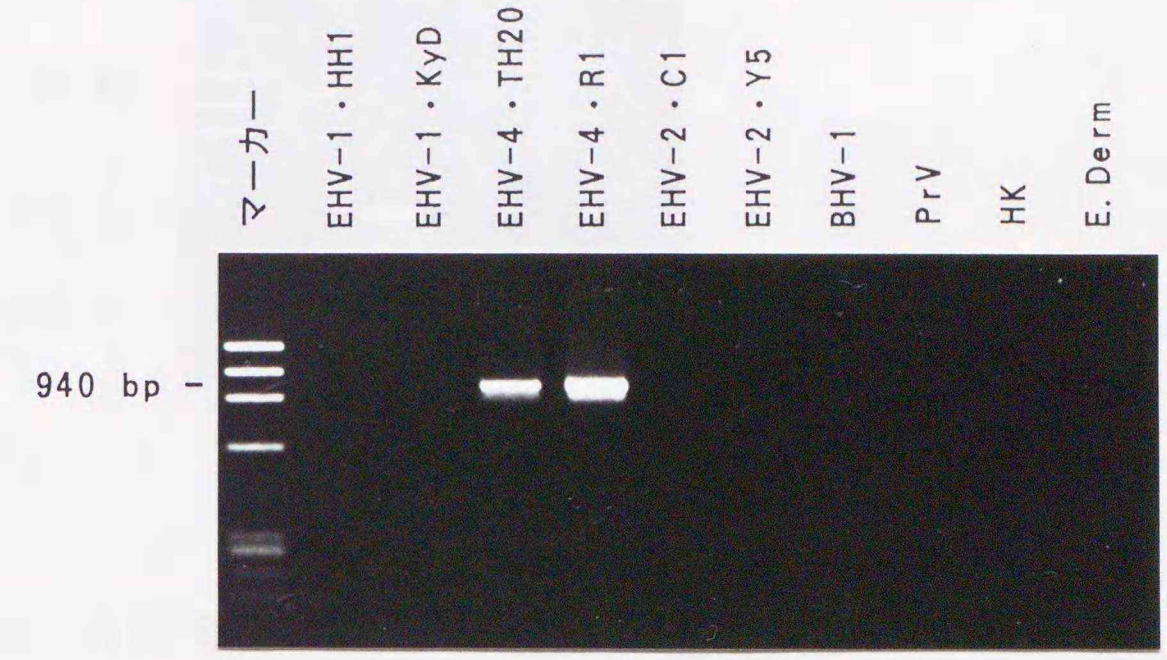


B. FC3-R1 の電気泳動プロファイル



図 2. EHV-1 に特異的な２種類のプライマーペア、FC2-R1（A）と FC3-R1（B）による PCR 産物の電気泳動プロファイル

A. FC2-R4の電気泳動プロファイル



B. FC3-R4の電気泳動プロファイル



図3. EHV-4に特異的な2種類のプライマーペア、FC2-R4（A）とFC3-R4（B）によるPCR産物の電気泳動プロファイル

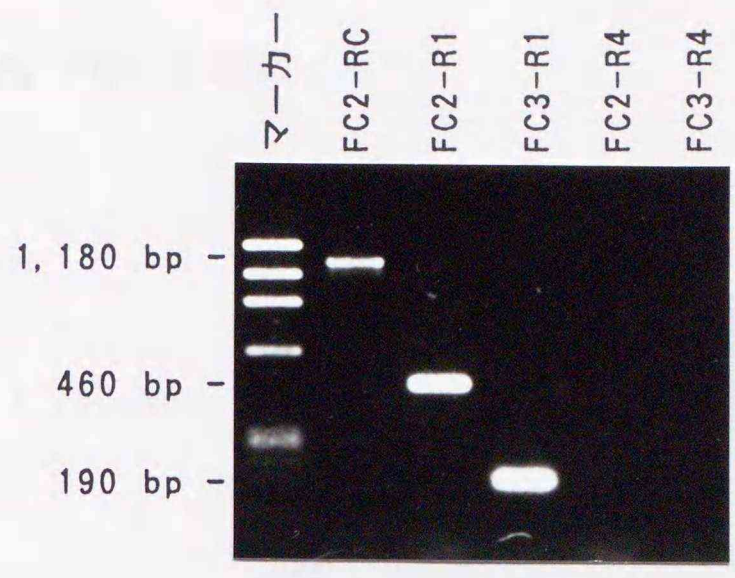


図 4. EHV-1 の BK 細胞高継代 BK343 株における各種プライマーペアの反応性

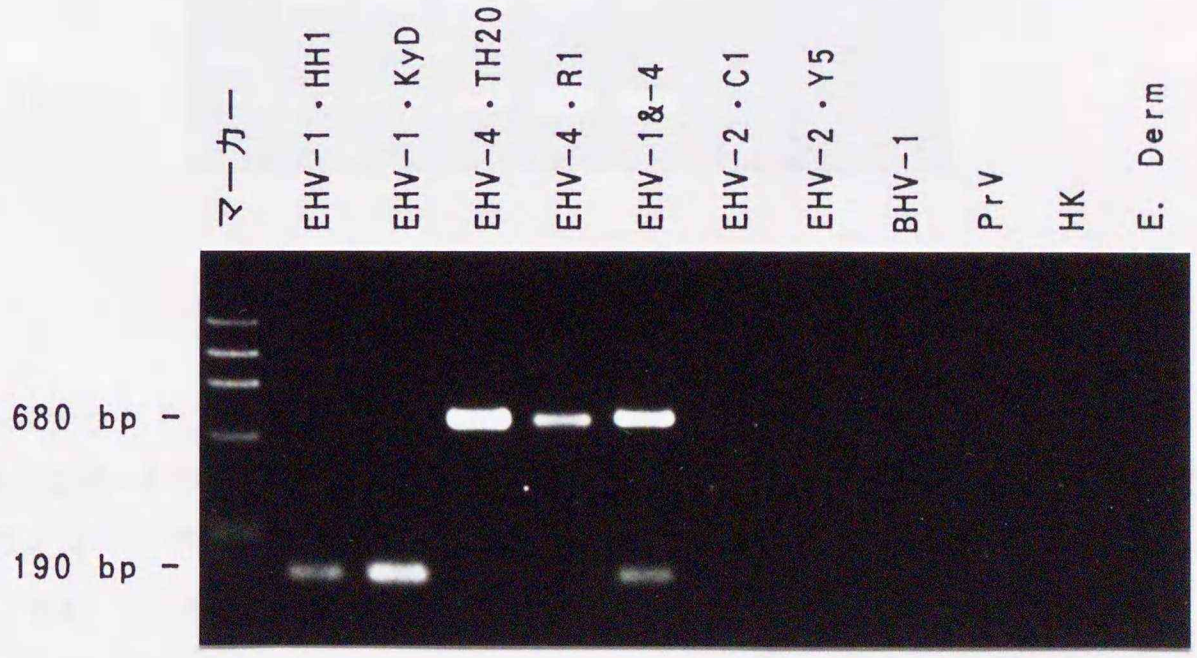
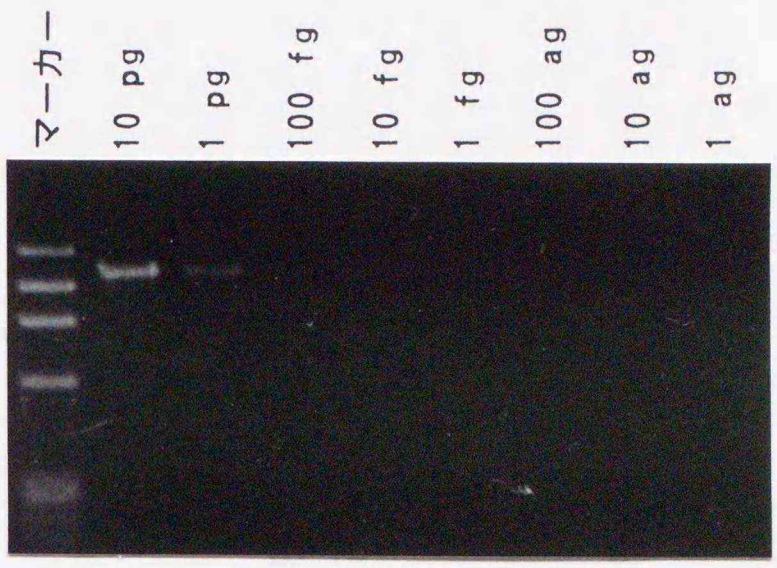


図 5. 混合プライマー（FC3, R1, R4）を用いた PCR による EHV-1 および EHV-4 の型別

A. PCR（1回目）



B. ネステッドPCR

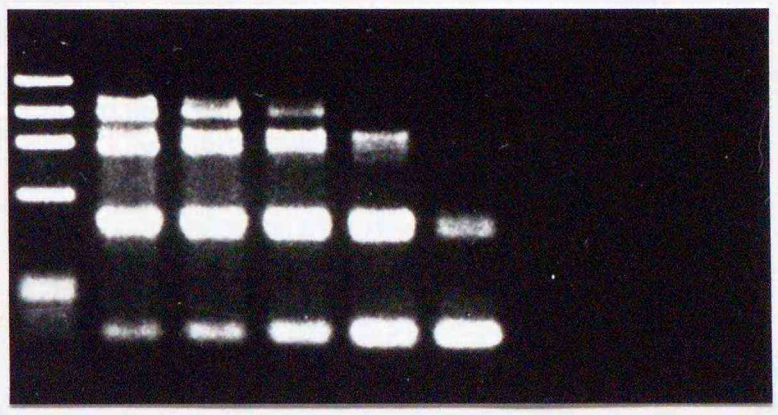


図6. ネステッドPCRのEHV-1 DNA検出感度

（A）EHV-1のHH1株ウイルス粒子から抽出したDNAを10倍階段希釈し、それを鋳型にプライマーペアFC2-RCで増幅。（B）Aの増幅産物1 μlをネステッド混合プライマー（FC3、R1、R4）で再増幅。各レーンはAに対応。

表3. PCRによるウマ流産胎子からのEHV-1 DNAの検出と
EHV-1分離

被検材料	PCR	ウイルス分離
肺	8／14 [1)]	8／14
脾臓	8／14	8／14
胸腺	6／12	6／12
肝臓	6／12	6／12
腎臓	4／6	4／6
合計	32/58	32/58

1）陽性数／検体数

考　察

今回の研究で、EHV-1 とEHV-4 に特異的なプライマーを混合してPCRを行うことにより、1回のPCRだけで両ウイルスを型別できることが判明した。両ウイルスのDNA相同性はDNA-DNAハイブリッド形成法により約17％と報告されていたが（AllenとTurtinen, 1982）、今回のPCRの標的としたgB遺伝子の相同性は83％という著しく高い値を示したように、これまでに報告されていたエンベロープ糖タンパクgC遺伝子やgH遺伝子などの塩基配列の相同性も両ウイルス間で非常に高い（AllenとCoogle, 1988; NicolsonとOnions, 1990; Nicolsonら, 1990a, b; RobertsonとWhalley, 1988; Robertsonら, 1991）。そのため、両ウイルスの型特異的なプライマーを用いたPCRは報告されていなかった。Ballagi-Pordányら（1990）はEHV-1のgC遺伝子をDNA増幅の標的とし、増幅後にEHV-1に特異的なDNAプローブを用いてサザンハイブリダイゼーションによりEHV-1 感染症の診断を行った。Sharmaら（1992）は両ウイルスのgC遺伝子とgH遺伝子をDNA増幅の標的とし、増幅後に型特異的DNAプローブによるサザンハイブリダイゼーションを併用して型別を行った。また、O'Keefeら（1991）とWelchら（1992）は両ウイルスのgB遺伝子をDNA増幅の標的とし、増幅DNA断片を制限酵素切断することで型別を試みた。すなわち、これらの方法ではDNA増幅後、型別するためにハイブリダイゼーションあるいは制限酵素切断を行うために時間と経費が嵩むのに対して、今回確立した方法は、1回のPCRだけで十分に型別できることから、迅速で経済的に優れた方法といえよう。

今回設定した5種類のプライマーはEHV-2、BHV-1とPrV のウイルスDNAならびにウマ由来の培養細胞のDNAを増幅しなかったことから、これらのプライマーの特異性は高いものと思われる。一方、EHV-1あるいはEHV-4の株で今回設定したプライマー領域の塩基に変異が生じている場合、DNAを増幅しない可能性がある。しかし、今回のプライマーは日本で分離された株ではなく海外の分離株の塩基配列をもとに設定され、しかも、EHV-1のHH1株をBK細胞で長期継代して作出されたBK343株でもHH1株と同様のDNA増幅がみられたことから、今回のプライマーの塩基配列はウイルスゲノム中で良く保存されていることが示唆された。これらのことから、今回設定したプライマーを用いることによって世界中で両ウイルス感染症の確定診断を迅速に行なうことができるものと考えられる。

今回確立したPCRを野外のウマ流産例に応用したところ、これまでに報告された成績（Ballagi-Pordányら, 1990; Sharmaら, 1992）と同様にウイルス分離とPCRの成績は良く相

関していた。さらに、PCRを2回行うネステッドPCRの検出感度が1回のPCRに比べ1,000倍上昇したことから、両ウイルスが惹起する潜伏感染の研究にも応用可能と考えられた。Kanekoら（1989）はB型肝炎ウイルス、また、Liuら（1991）は豚コレラウイルスのゲノム検出にネステッドPCRを応用し、今回得た成績と同様にPCRの検出感度が1,000倍上昇すると報告している。

混合プライマーを用いてPCRを行った場合、EHV-1 とEHV-4 の2つが同時に含まれている材料であっても、両ウイルスDNAを増幅型別できたことから、ウマが両ウイルスに混合感染した場合でも正確な診断が可能と考えられる。以上の成績より、今回設定したPCRはEHV-1とEHV-4 感染症の迅速な確定診断法として優れていることが示唆された（Kirisawaら，1993a）。

第２章　日本のウマ流産胎子から分離されたEHV-1株のウイルスDNA解析

要　　旨

日本のウマ流産胎子から1967年から1987年の間に分離された９株のEHV-1のウイルスDNAについて制限酵素*Bam* HI 切断法とサザンハイブリダイゼーション法によりDNAプロファイルを解析した。1979年のEHV-1不活化ワクチンの実用化前に分離された3株と実用化後に分離された6株とのウイルスDNAの制限酵素切断プロファイルを比較したところ、大きな変化は認められなかったが、9株の間ではいくつかの断片で分子量の違いが認められた。これらの断片のゲノム上の位置を特定するために、日本で初めて分離されたEHV-1 HH1株の*Bam* HI断片をプラスミドベクターpUC18にクローニングし、サザンハイブリダイゼーションと制限酵素2重切断法によりHH1株の制限酵素切断地図を作成した。次に、クローン化されたDNA断片をプローブとしてサザンハイブリダイゼーションを行ったところ、9株の間にはウイルスDNAの*Bam* HI 消化で生じるA～Tの20断片のうち、A、D、E、N、P、QR、SとTの8断片で分子量の変化が認められた。A断片の分子量の変化はこれまでに報告がなく、今回の研究で初めて明らかになった。これらの変化の認められた断片はウイルスゲノム上のULの両端部と中央部の領域、IRs、UsとTRsに位置していることが判明した。

序　文

EHV-1のウイルスゲノムは、約150 kbの塩基からなる直鎖状2本鎖DNAで構造上LとSの2領域に大別される（Henryら, 1981; Whalleyら, 1981）。L領域の両端には小さな倒置繰り返し配列（TRLとIRL）が存在し、それらの間にユニークな塩基配列（UL）がある（Chowdhuryら, 1990; YalamanchiliとO'Callaghan, 1990 ; Telfordら, 1992）。S領域の両端には大きな倒置繰り返し配列（TRsとIRs）があり、それらの間にユニークな配列（Us）が存在する。このようなS領域の構造はL領域に対して2種類の方向性をとるため、EHV-1ゲノムには2種類のアイソマーがほぼ同量存在することになる。同様のゲノム構造は、EHV-4、PrV、VZVやBHV-1などでも報告されている（Ben-Poratら, 1979; Dumasら, 1981; Mayfieldら, 1983; Cullinaneら, 1988）。EHV-1のウイルスDNAを制限酵素で切断し、電気泳動プロファイルを解析すると、株間で切断断片に分子量の変化あるいは制限酵素切断点の消失や増加などの生じていることが諸外国で報告されている（Sabineら, 1981; Studdertら, 1981, 1984; Turtinenら, 1981; Allenら, 1983b, 1985; Studdert, 1983; Chowdhuryら, 1986）。しかし、これまでこれらの変化を示した断片をウイルスゲノム上に正確に特定した報告はなく、さらに日本のEHV-1分離株のDNAについての詳細な検討はまったくなされていない。

わが国では、1967年にEHV-1による流産の初発例が報告されて以来（Kawakamiら, 1970）、各地のウマで本ウイルスによる流産が多発した。このため、1979年にウマの流産防止を目的とし、日本で初めて分離されたEHV-1のHH1株をBK細胞に馴化して製造された不活化ワクチンが実用化された（Kawakamiら, 1970; Hashiguchiら, 1980）。しかし、妊娠馬に本ワクチンを投与したにもかかわらずEHV-1による流産の散発的あるいは流行的な発生がみられた。アメリカ合衆国においても流産防止の目的で不活化ワクチンが広く用いられているが、その効果はわが国と同様で流産の防圧には至っていない（AllenとBryans, 1986）。アメリカ合衆国ではウマ流産胎子から分離されたEHV-1を不活化ワクチンの実用化前の分離株と実用化後の分離株とに分けて、それらのウイルスDNAの制限酵素切断プロファイルを比較したところ、実用化前の分離株の多くはプロトタイプを示していたのに対し、実用化後の分離株は変異型に変化していたことが報告されている（Allenら, 1985; AllenとBryans, 1986）。

本研究では、わが国で1967年から1987年の間にウマ流産胎子から分離された9株のEHV-1を1979年の不活化ワクチンの実用化前の分離株と実用化後の分離株とに分け、それらのウイルスDNAの制限酵素切断プロファイルを比較した。次いで、9株間のウイルスDNAプロファイル

の比較を行い、分子量に変化の認められたDNA断片をクローン化したEHV-1ウイルスDNAの*Bam* HI 切断断片をプローブとするサザンハイブリダイゼーションによりウイルスゲノム上に特定した。

材　料　と　方　法

1）ウイルス

EHV-1のHH1株と酪農学園大学酪農学部獣医学科獣医微生物学教室でウマ流産胎子からHK細胞を用いて分離されたＦ１～Ｆ８までの8株、合計9株を用いた（表4）。これらの株はHK細胞を用いて増殖させた。

2）ウイルス粒子からのDNA抽出

第1章の材料と方法の項で述べた方法で行った。

3）DNAの制限酵素切断と電気泳動

DNAは制限酵素*Bam* HI、*Eco*RIと*Bgl* II（Boehringer Mannheim社、ドイツ）を用い、それぞれの酵素の至適条件下で処理して切断した。酵素切断されたDNAの電気泳動は、第1章の材料と方法の項で述べた方法で行った。

4）エキソヌクレアーゼIIIとマングビーンヌクレアーゼ消化

HH1株ウイルスDNA 10 μl（4 μg）に10倍濃度のエキソヌクレアーゼIII 用反応液（500 mM Tris-HCl pH 8.0、50 mM $MgCl_2$、100 mM 2-メルカプトエタノール）2 μl、再蒸留水7 μlおよびエキソヌクレアーゼIII 1 μl（100単位、宝酒造、滋賀）を加え、23℃で20分間反応させて5' 端よりDNAを消化・除去した。次いで、10倍濃度のマングビーンヌクレアーゼ用反応液（300 mM 酢酸ナトリウム pH 5.0、1 M NaCl、10 mM 酢酸亜鉛、50% グリセリン）8 μl、再蒸留水51 μl、マングビーンヌクレアーゼ1 μl（20単位、宝酒造、滋賀）を加えて23℃で15分反応させ、残りの1本鎖部分を消化した。等量のフェノール・クロロホルム（1：1）を加えて混和後、12,000 rpm 5分間遠心し、上層を回収した（フェノール・クロロホルム処理）。1/10量の3 M 酢酸ナトリウム（pH 5.2）と2倍量の100％エタノールを加えて-80℃

表4. 供試ウイルス株

ウイルス株	分離年	HK細胞での継代数
HH1 (−)[1)]	1967	10
F1 (−)	1978	5
F2 (−)	1978	5
F3 (+)[2)]	1983	3
F4 (+)	1983	3
F5 (+)	1983	3
F6 (+)	1983	3
F7 (+)	1987	3
F8 (+)	1987	3

1)−: EHV-1不活化ワクチンの実用化前に分離されたウイルス株
2)+: EHV-1不活化ワクチンの実用化後に分離されたウイルス株

に30分間静置後、12,000 rpm 15分間遠心した（エタノール沈殿）。沈殿したDNAを70％エタノールで洗浄して乾燥させた後、TE溶液に溶解した。

5）ウイルスDNAライブラリーの作製

HH1株ウイルスDNAの*Bam* HI切断断片を以下のようにプラスミドベクターpUC18の*Bam* HIサイトにクローン化し、ウイルスDNAライブラリーを作製した。

（1）pUC18 の5' 突出DNA末端の脱リン酸化

pUC18 DNAを*Bam* HIで完全消化してDNAの両端に生じた5' 突出末端が、連結反応時に自己再結合しないよう子ウシ腸由来アルカリフォスファターゼ（CIP、宝酒造、滋賀）を用いてDNAの5' 末端の脱リン酸化を行った。すなわち、pUC18 DNA（0.5 μg/μl）10 μlに、再蒸留水33 μl、10倍濃度のCIP反応液（500 mM Tris-HCl pH 9.0、10 mM $MgCl_2$）5 μlとCIP（1単位/μl）2 μlを混合し、37℃ 1時間反応させた。次いで、これに反応停止液（10 mM Tris-HCl pH 8.0、100 mM NaCl、0.5 % SDS）を50 μl 加え、68℃ 15分間加温した後、フェノール・クロロホルム処理してエタノール沈殿させた。沈殿したDNAは70％エタノールで洗浄して乾燥させ、TE溶液 80 μlに溶解した。

（2）HH1株ウイルスDNA断片のクローン化

脱リン酸化したpUC18 DNA 2 μl（0.1 μg）に10倍濃度のリガーゼ反応液（660 mM Tris-HCl pH 7.6、66 mM $MgCl_2$、100 mM ジチオスレイトール、10 mM ATP）2 μl、HH1株ウイルスDNAの*Bam* HI切断断片 2 μl（0.4 μg）、再蒸留水13 μlと T4DNAリガーゼ（350単位/μl、宝酒造、滋賀）1 μlを加え、14℃で一晩連結反応を行った。大腸菌 JM109株のコンピテントセル（後述）100 μlに反応液を10 μl 加え、氷中で30分間と42℃で90秒間処理した後、SOC培地（2％ バクトトリプトン、 0.5% バクトイーストエキストラクト、0.05％ NaCl、2.5 mM KCl、10 mM $MgCl_2$、20 mM グルコース）を1 ml 加え、37℃、90分間培養した。その後、0.1 mg/mlの5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-β-D-ガラクトシド（X-gal）、0.5 mM イソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド（IPTG）と50 μg/mlのアンピシリンを含むLB寒天平板培地（1％ バクトトリプトン、0.5％ バクトイーストエキストラクト、1% NaCl、1.5％ バクトアガー）に塗布して37℃で一晩培養し、形質転換によって発育した大腸菌のコロニーのうち白色のものを選択した。

ウイルスDNAの両端に存在する*Bam* HI 切断箇所を含むDNA断片のプラスミドベクターへの組み込みは次のようにして行った。HH1株ウイルスDNA 10 μl（2 μg）に0.5 mMのdATP、

dCTP、dGTPとdTTPをそれぞれ1 μl、10倍濃度の反応液（330 mM Tris-酢酸 pH 7.9、660 mM 酢酸カリウム、100 mM 酢酸マグネシウム、5 mM ジチオスレイトール、1 mg/ml ウシ血清アルブミン）5 μl、再蒸留水30 μl とKlenow フラグメント1 μl（5単位、宝酒造、滋賀）を加え、37℃で30分間反応させた。これを70℃10分間加温してKlenow フラグメントを不活化した後、T4 DNAポリメラーゼ1 μl（5単位、宝酒造、滋賀）を加えて37℃10分間の処理を行い、ウイルスDNAの両端を平滑化した。このウイルスDNA液をフェノール・クロロホルム処理した後、エタノール沈殿を行い、乾燥DNAを10 μlのTE溶液に溶解した。次に、DNA溶液10 μlに5' 末端がリン酸化されている*Bam* HI リンカー（pCGGATCCG）2 μl（2 μg）、10倍濃度のリガーゼ反応液2 μl、再蒸留水5 μlおよびT4 DNAリガーゼ1 μl（350単位）を加えて14℃で一晩連結反応を行った。この反応液を再びフェノール・クロロホルム処理とエタノール沈殿の後、DNAをTE溶液に溶解して*Bam* HIで消化した。アガロース電気泳動でこのDNA断片を分画し、目的とする断片をアガロースゲルからガラス微粒子に吸着させて回収した（Geneclean キット、BIO 101 社、アメリカ合衆国）。以後の操作は上述の方法に従って、このDNA断片をpUC18の*Bam* HIサイトに連結させて大腸菌に導入し、形質転換を行った。

6）コンピテントセル

Scottの方法（Department of Neurology, University of California; personal communication）に従ってコンピテントセルを調整した。すなわち、大腸菌JM109株をLB寒天平板培地で37℃一晩培養後、コロニーを10 ml のTYM培地（2% バクトトリプトン、0.5 % バクトイーストエキストラクト、100 mM NaCl、10 mM $MgSO_4$）に植菌し、OD_{600} の吸光値が0.2～0.8になるまで37℃ 180 rpm で振盪培養した。これに37℃に加温した40 mlのTYM培地を加え、OD_{600} が0.5～0.9になるまで同様に振盪培養した後、さらに、200 ml の加温済みTYM培地を加え、OD_{600} の値が0.6になるまで振盪培養を続けた。最後にこの培養液を急速に氷冷した後、4℃で5,000 rpm 10分間遠心した。この上清を捨て、沈渣を50 mlの冷TFB I 液（30 mM 酢酸カリウム、50 mM $MnCl_2$、100 mM KCl、10 mM $CaCl_2$、15% グリセリン）に静かに浮遊させた後、4℃で5,000 rpm 5 分間遠心した。この上清を捨てた後、沈渣を10 mlの冷TFB II 液（10 mM Na-MOPS pH 7.0、75 mM $CaCl_2$、10 mM KCl、15% グリセリン）に静かに浮遊させ、予め氷冷してあったマイクロチューブに100 μl ずつ分注し、液体窒素中で急速凍結した後-80 ℃で保存した。実験時には、マイクロチューブのコンピテントセルを室

温で溶解し、直ちに氷上に移して使用した。

7）プラスミドDNAの抽出と精製

プラスミドDNAの抽出は、少量の場合にボイル法、また、大量の場合にはアルカリ・SDS法を用いて行った（Sambrookら, 1989）。アルカリ・SDS法で抽出したDNAは、さらに塩化セシウム・エチジウムブロマイド法を用いて精製した。

(1) ボイル法

組み換えプラスミドで形質転換した大腸菌のコロニーを50μg/mlのアンピシリンを加えたLB液体培地2mlに移植し、37℃ 180 rpmで16時間 振盪培養した後、菌液1mlを6,000 rpm 2分間遠心した。この沈渣をSTET溶液（8％ ショ糖、5％ Triton X-100、50 mM EDTA、50 mM Tris-HCl pH 8.0）50μlに浮遊し、リゾチーム（10 mg/ml、25 mM Tris-HCl pH 8.0）4μlを混和してから、100℃で40秒間加熱処理した。次いで、室温で12,000 rpm 10分間遠心し、沈渣を除去した後、冷イソプロピルアルコール50μlを加えて氷中に5分間静置した。その後、これを室温で12,000 rpm 5分間遠心し、沈渣を70％エタノールで洗浄して乾燥させた後、TE溶液50μlに溶解し、4℃に保存した。

(2) アルカリ・SDS法

組み換えプラスミドで形質転換した大腸菌のコロニーを100mlのアンピシリン（50μg/ml）加LB液体培地に移植し、上述と同様にして培養した。この菌液を室温で6,000 rpm 10分間の遠心後、沈渣を4 mlのTGE溶液（50 mM グルコース、25 mM Tris-HCl pH 8.0、10 mM EDTA）に浮遊させた。これにアルカリ・SDS溶液（0.2 N NaOH、1％ SDS）を8 ml加えて転倒混和しながら溶菌させ、氷中に10分間静置した。次いで、冷5 M 酢酸カリウム溶液（pH 4.8）を6 ml加えて転倒混和して中和後、10分間氷中に静置した。これを4℃で12,000 rpm 10分間遠心し、上清を回収してイソプロピルアルコール12 mlを加えてから混和し、室温に15分間静置した。その後、これを室温で12,000 rpm 10分間遠心し、沈渣を70％エタノールで洗浄して乾燥させた後、TE溶液1 mlに溶解した。続いて、これに冷5 M 塩化リチウム溶液を1 ml 混和し、氷上に10分間静置した後、4℃で12,000 rpm 10分間遠心した。上清を回収し、2倍量の100%エタノールを加えて氷上に20分間静置した後、4℃で12,000 rpm 15分間遠心した。沈渣を70% エタノールで洗浄して乾燥させた後、TE 溶液200 μlに溶解した。

(3) 塩化セシウム・エチジウムブロマイド法

アルカリ・SDS法で得られたプラスミドDNAをTE溶液で 2.4 mlにした後、4.2 gの塩化セシ

ウムを加えて37℃で加温溶解した後、400 μlのエチジウムブロマイド（10 mg/ ml）を混和し、室温で8,000 rpm 10分間遠心した。次いで、この上清を予め3.78 M 塩化セシウム-TE溶液を入れた超遠心チューブ（13CN、日立工機、茨城）の下層に入れ、20℃で35,000 rpm 17時間の遠心を行った（SCP85H、RPS40T ローター、日立工機、茨城）。プラスミドDNAのバンドを紫外線照射下で回収し、5M NaClで飽和したイソアミルアルコールを等量加えてエチジウムブロマイドを抽出して除去した後、DNA溶液の2倍量の再蒸留水と6倍量の100% エタノールを加え、-20℃で一晩静置した。その後、これを4℃で12,000 rpm 30分間遠心し、沈殿したDNAを70%エタノールで洗浄して乾燥させた後、TE溶液100 μlに溶解して精製プラスミドDNAとして4℃に保存した。

8）サザンハイブリダイゼーション

第1章の材料と方法の項に準じてDNA断片を転写したメンブランをプレハイブリ液［50%脱イオンホルムアミド、5 倍濃度のSSPE（1 倍濃度：150 mM NaCl、10 mM NaH_2PO_4、1 mM EDTA、pH 7.4）、10倍濃度のデンハート溶液（0.2% ポリビニルピロリドン、0.2% ウシ血清アルブミン、0.2% フィコール400）と熱変性サケDNA（150 μg/ml）］に42℃ 2時間浸漬した。ハイブリダイゼーションはランダムプライム法（FeinbergとVogelstein, 1983）によりビオチン11-dUTPを標識したプローブと硫酸デキストランをそれぞれ10 ng/mlと50mg/mlの濃度でプレハイブリ液に加え、42℃で14～16時間行った。ハイブリダイゼーション終了後、メンブランは0.2 倍濃度のSSC-0.1% SDSで室温5分の振盪洗浄を3回、次いで55℃ 15分の洗浄を2回行った。ハイブリダイズしたDNA断片はアルカリフォスファターゼ標識ストレプトアビジンを用いた免疫学的方法（BlueGene DNA検出システム、Gibco BRL社、アメリカ合衆国）によりメンブラン上に発色させた。

成　　績

1）日本で初めてウマから分離されたEHV-1 HH1株のウイルスDNA制限酵素切断プロファイル

HH1株のウイルスDNAを制限酵素*Bam* HI、*Eco* RIならびに*Bgl* IIで切断し、0.7%アガロースゲル電気泳動で解析した（図7）。*Bam* HIで切断すると20種類の断片に分かれ、これらを

分子量順にA～T断片として配列した。*Eco* RI切断では16種類の断片が検出され、これらを分子量順にA～P断片とした。また、*Bgl* II切断では15種類の断片が得られ、これらをA～O断片とした。ウイルスゲノムの両端に位置する断片を調べる目的で、HH1株のウイルスDNAの両端をエキソヌクレアーゼIIIとマングビーンヌクレアーゼで消化し、*Bam* HIで切断して解析したところ（図8）、この処理によって得られたSとT断片の分子量がヌクレアーゼ未処理に比べて明らかに低下していたことから、これらの断片がウイルスゲノムの両端に位置していると推定された。

2）HH1株ウイルスDNAの*Bam* HI断片のクローン化

Bam HI消化で生じた20種類の断片のうち、19種類をプラスミドベクターpUC18にクローン化し、その特異性をサザンハイブリダイゼーション法により確認した（データ示さず）。ここで得られた組み換えプラスミドクローンを*Bam* HIで消化し、各DNA断片を分子量順に電気泳動した成績を図９に示した。*Bam* HI消化で生じたDNA断片QとRはまったく同一であることから（Whalleyら, 1981）、今回得られた19種類の組み換えプラスミドを活用することによりHH1株のウイルスDNA全体をカバーするDNAライブラリーが完成した。

3）HH1株のウイルスDNA制限酵素切断地図の作成

HH1株のウイルスDNAの*Bam* HI、*Eco* RIならびに*Bgl* IIの切断地図を作成するために、まず、*Bam* HI、*Eco* RIあるいは*Bgl* IIでHH1株のウイルスDNAを消化し、これらの断片についてビオチン-11-dUTPで標識した19種類のクローン化DNA断片をプローブとしてサザンハイブリダイゼーションを行い、反応性を調べた。各プローブと制限酵素消化断片との反応成績を表5に示した。次いで、正確な制限酵素切断地図を作成するために、組み換えプラスミドを*Bam* HIと*Eco* RIあるいは*Bgl* IIの2重切断で生じたDNA断片の大きさを調べ、その成績を表６に示した。表５と表６の成績をもとに3種類の酵素を用いて得られたHH1株のウイルスDNAの制限酵素切断地図を図10に示した。この切断地図は、EHV-1では最初の報告であったHVS-25株のものと基本的に同じであったが（Whalleyら, 1981, 1989）、*Eco* RIによる切断では、Q、RとSの3断片、また、*Bgl* II切断ではP、QとRの3断片の存在が新たに確認された。

4）EHV-1野外分離株のウイルスDNAの解析

EHV-1の8分離株とHH1株のウイルスDNAを*Bam* HIで切断し、これらの電気泳動プロファ

イルを比較した（図11）。HH1株、F1株とF2株は不活化ワクチンの実用化前に、残りの6株は実用化後に分離されたもので、これらの*Bam* HI切断プロファイルはすべてプロトタイプと基本的に類似していた。しかし、9株間でE、TおよびL～Sの各断片の中のいくつかで分子量が異なっていた。そこで、これらの分子量の異なる断片を検出・同定するために、19種類のクローン化したHH1株の*Bam* HI DNA断片をプローブとしてサザンハイブリダイゼーションを行った。*Bam* HI N、QRとSの各断片をプローブとしたときに様々な大きさの断片が検出された（図12）。N断片プローブを用いた場合、N断片のほかにP断片でも分子量の多様性が同時に検出された。これはN断片とP断片が、EHV-1ゲノムのIRsとTRsの両方に共通するDNA領域を含むことによる。S断片プローブも同様の理由でE断片と反応し、その分子量の多様性も検出された。*Bam* HI E断片プローブの成績はS断片プローブの場合と同一であった（データ示さず）。*Bam* HI T断片プローブの成績は、図11の電気泳動プロファイルでみられた各分離株のT断片の泳動像と完全に一致していた（データ示さず）。しかし、他のプローブ、すなわち、*Bam* HI A、B、C、D、F、G、H、I、J、K、L、MとO断片のプローブではDNA断片の分子量の多様性を検出しえなかった。

Bam HI A、B、CとD断片は分子量（10 kb 以上）が大きすぎて分子量の多様性を検出できなかった可能性がある。そこで、ウイルスDNAを*Bam* HIと*Eco* RIで2重切断してサザンハイブリダイゼーションを行ったところ、A断片とD断片で分子量の多様性が新たに検出されたが（図13）、BとCの断片では認められなかった（データ示さず）。A断片は*Eco* RI切断により分子量順にA1、A2とA3の3種類の断片が生じたが、これらのうちA2断片でのみ分子量の多様性が認められた（図13-A、C）。このA2断片の多様性は電気泳動プロファイルでも確認された（データ示さず）。D断片は*Eco* RI切断で分子量順にD1とD2の2断片が生じ、D1断片に多様性が認められた（図13-B、D）。さらに、2重切断したウイルスDNAを用いた解析によって、*Bam* HI E断片上の多様性を示す領域が特定された（図14）。E断片は*Eco* RI切断でE1とE2の2断片が生じ、分子量の大きいE1断片に多様性がみられた（図14-A）。*Bgl* IIで切断した場合はB1とB2の2断片が生じ、両断片で多様性が認められた（図14-B）。B1断片の分子量の変化はE断片上のIRs部分と同一のDNAを共有するTRs領域のS断片の変化と連動していた。これらのことから、E断片上のUL領域の右末端部の一部とIRs領域の2箇所で分子量に多様性を示す領域のあることが示唆された（図14-C）。

今回の研究で分子量に変化の認められた領域を図15にまとめた。



図 7.　HH1 株のウイルス DNA の制限酵素 *Bam* HI、*Eco* RI と *Bgl* II 切断による電気泳動プロファイル

酵素切断で生じた断片を右側に分子量順にアルファベットで示した。ラムダファージ DNA の *Hind* III 切断断片をマーカーとして使用し、その大きさ（kb）を左側に示した。

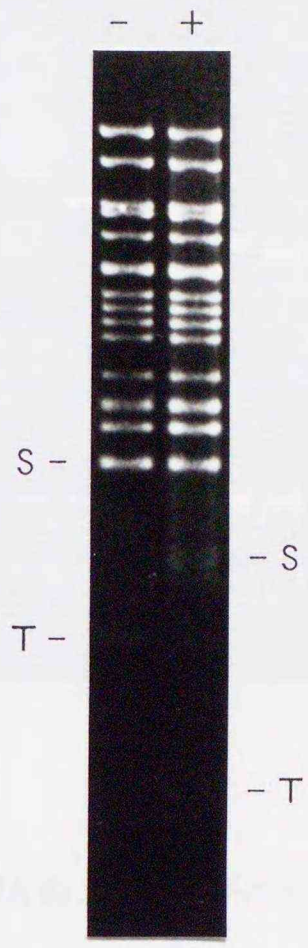


図8．エキソヌクレアーゼ III とマングビーンヌクレアーゼで処理した
HH1 株ウイルス DNA の *Bam* HI 切断プロファイル

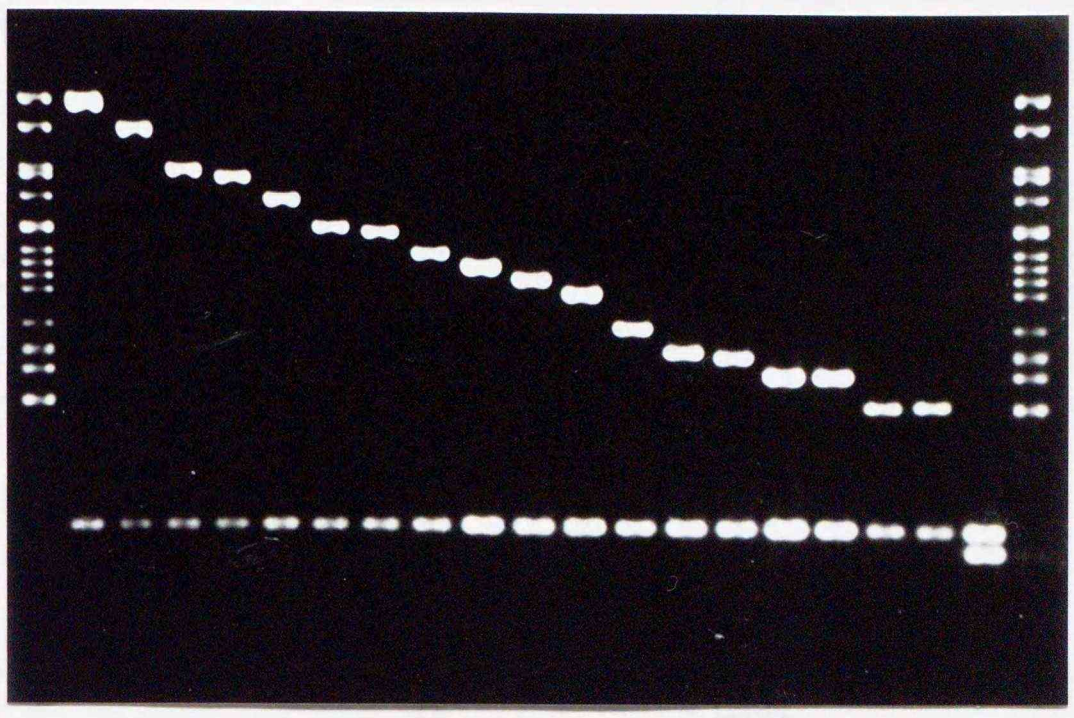


図９．HH1 株ウイルス DNA の *Bam*HI 断片をクローン化した組み換えプラスミドの *Bam*HI 切断プロファイル

レーン上部の A～T は、それぞれ HH1 株ウイルス DNA の *Bam*HI 断片 A～T と対応する。組み換えプラスミド名は表６に示した。

表5. クローン化したHH1株ウイルスDNAの*Bam* HI 断片プローブと*Bam* HI, *Eco* RI あるいは *Bgl* IIで切断されたHH1株のウイルスDNAとの反応性[1)]

	制限酵素切断断片		
Bam HIプローブ	*Bam* HI	*Eco* RI	*Bgl* II
A	A	A, I, P	C, G, O, P[2)]
B	B	A	B, H
C	C	E, L	E, I, N
D	D	B, C, K	A
E	E, S	B, C, D, F, L	A, M
F	F	J, O, S[2)]	F, K
G	G	A, E	H, I
H	H	G, N	D
I	I	A	B, G, Q[2)]
J	J	G, O, Q[2)]	D, F
K	K	H, P, R[2)]	C, L, R[2)]
L	L	H, M	J, L
M	M	M, N	D, J
N	N, P	B, C, D, F, K	A
O	O	L	E, M
P	N, P	B, C, D, F	A
Q(R)	Q(R)	B, C, D, F	A
S	E, S	B, C, D, F	A
T	T	J	K

1) サザンハイブリダイゼーションによる検索
2) これらの断片は図7では認められなかったが、表6の成績からもその存在が確認された。

表6. HH1株ウイルスDNAの*Bam* HI 断片をクローン化した組み換えプラスミドDNAの*Bam* HI、*Eco* RIと*Bgl* II切断で生じたDNA断片の大きさ (kb)[1)]

Bam HI 断片 （プラスミド番号）	*Bam* HI	*Bam* HI+*Eco* RI	*Bam* HI+*Bgl* II
A (pEh-A)	20.7	9.8, 9.6, 1.3	9.4, 7.7, 1.8, 1.8
B (pEh-B)	15.0	15.0	9.3, 5.7
C (pEh-C)	11.3	10.8, 0.5	7.1, 3.0, 1.2
D (pEh-D)	10.9	6.1, 4.8	10.9
E (pEh-E)	9.6	8.5, 1.1	7.3, 2.3
F (pEh-F)	8.4	6.7, 1.5, 0.2	7.0, 1.4
G (pEh-G)	8.2	6.2, 2.0	5.7, 2.5
H (pEh-H)	7.5	5.7, 1.8	7.5
I (pEh-I)	7.1	7.1	6.0, 1.1
J (pEh-J)	6.7	4.0, 2.0, 0.7	3.6, 3.1
K (pEh-K)	6.3	5.4, 0.6, 0.3	4.4, 1.5, 0.4
L (pEh-L)	5.5	4.1, 1.4	3.1, 2.4
M (pEh-M)	4.9	3.0, 1.9	2.8, 2.1
N (pEh-N)	4.9	4.1, 0.8	4.9
O (pEh-O)	4.6	4.6	3.2, 1.4
P (pEh-P)	4.6	4.6	4.6
Q(R) (pEh-QR)	4.2	4.2	4.2
S (pEh-S)	4.2	4.2	4.2
T (pEh-T)	2.5	2.5	2.5

1)pUC18のDNA断片の成績は未掲載。

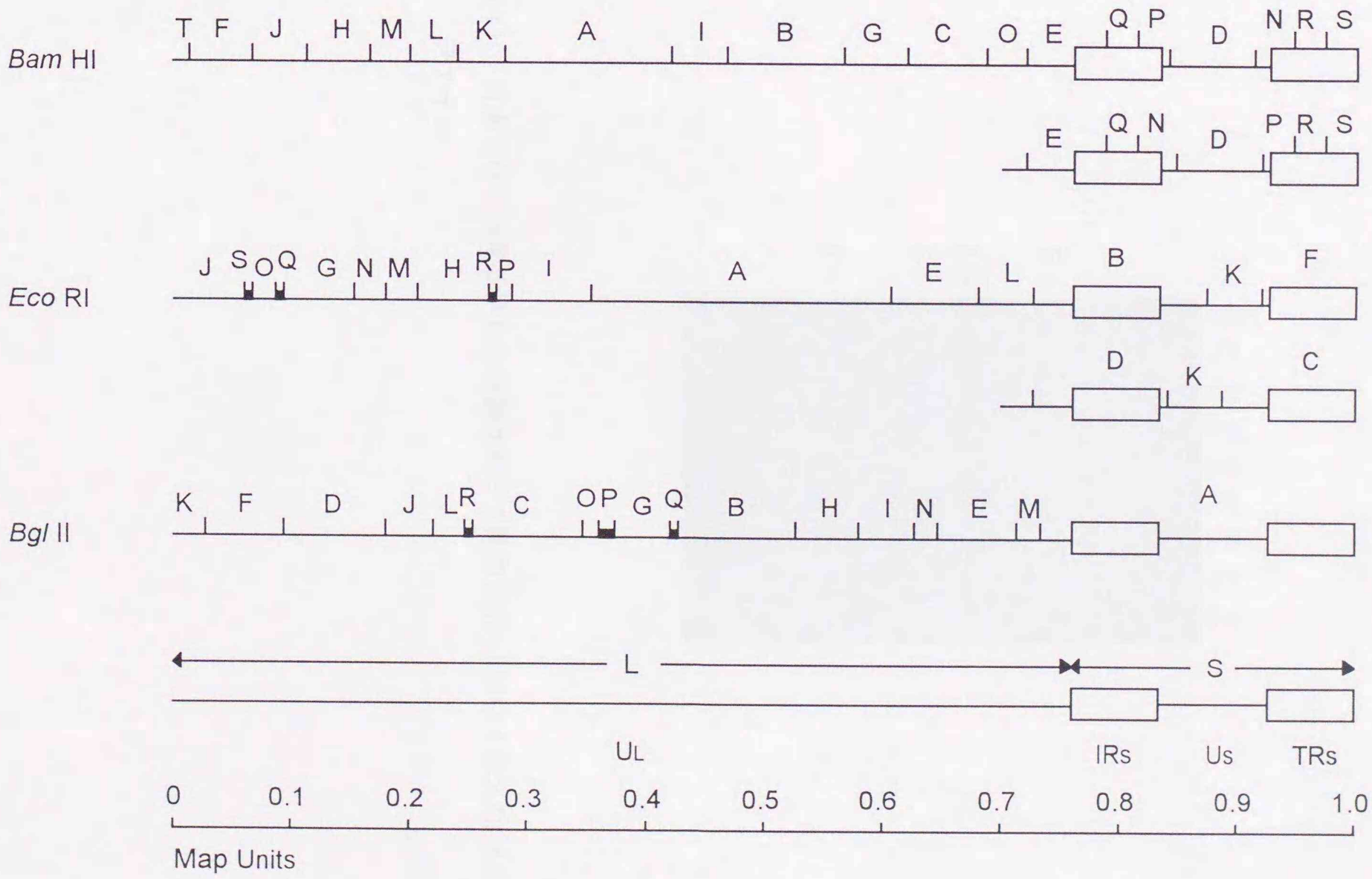


図 10.　EHV-1 HH1 株のウイルス DNA の *Bam* HI、*Eco* RI ならびに *Bgl* II の制限酵素切断地図
Eco RI と *Bgl* II の切断地図で新しく認められた断片を太線で示した。

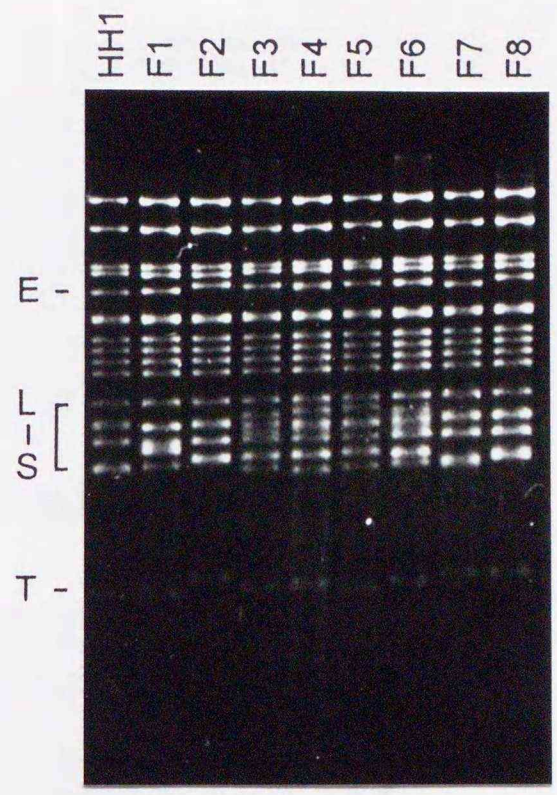


図11.　日本でウマ流産胎子から分離された9株のEHV-1のウイルスDNAの*Bam*HI切断プロファイル

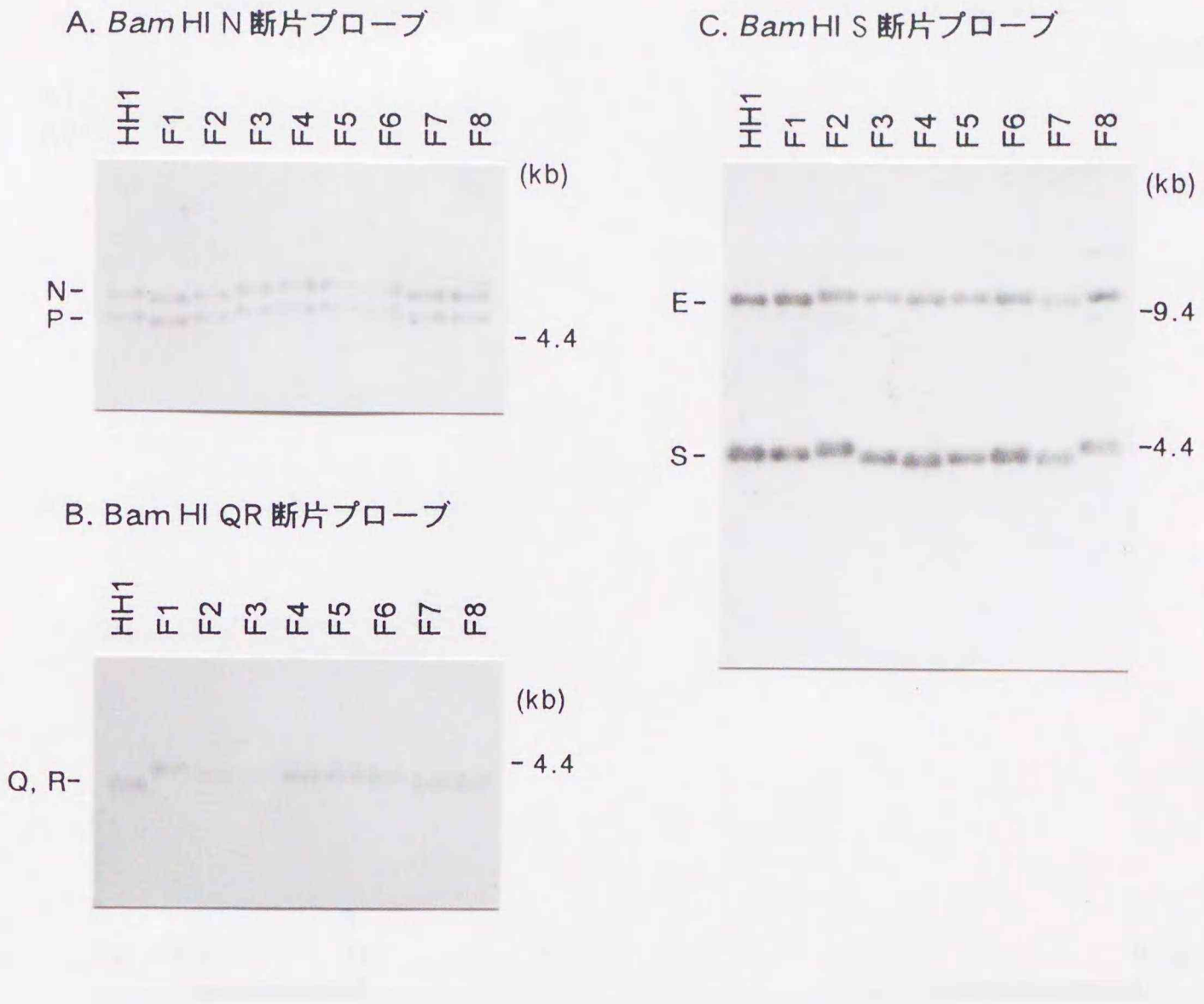


図 12.　EHV-1 野外分離株のウイルス DNA の *Bam*HI 切断で分子量に多様性を示す断片のサザンハイブリダイゼーションによる同定

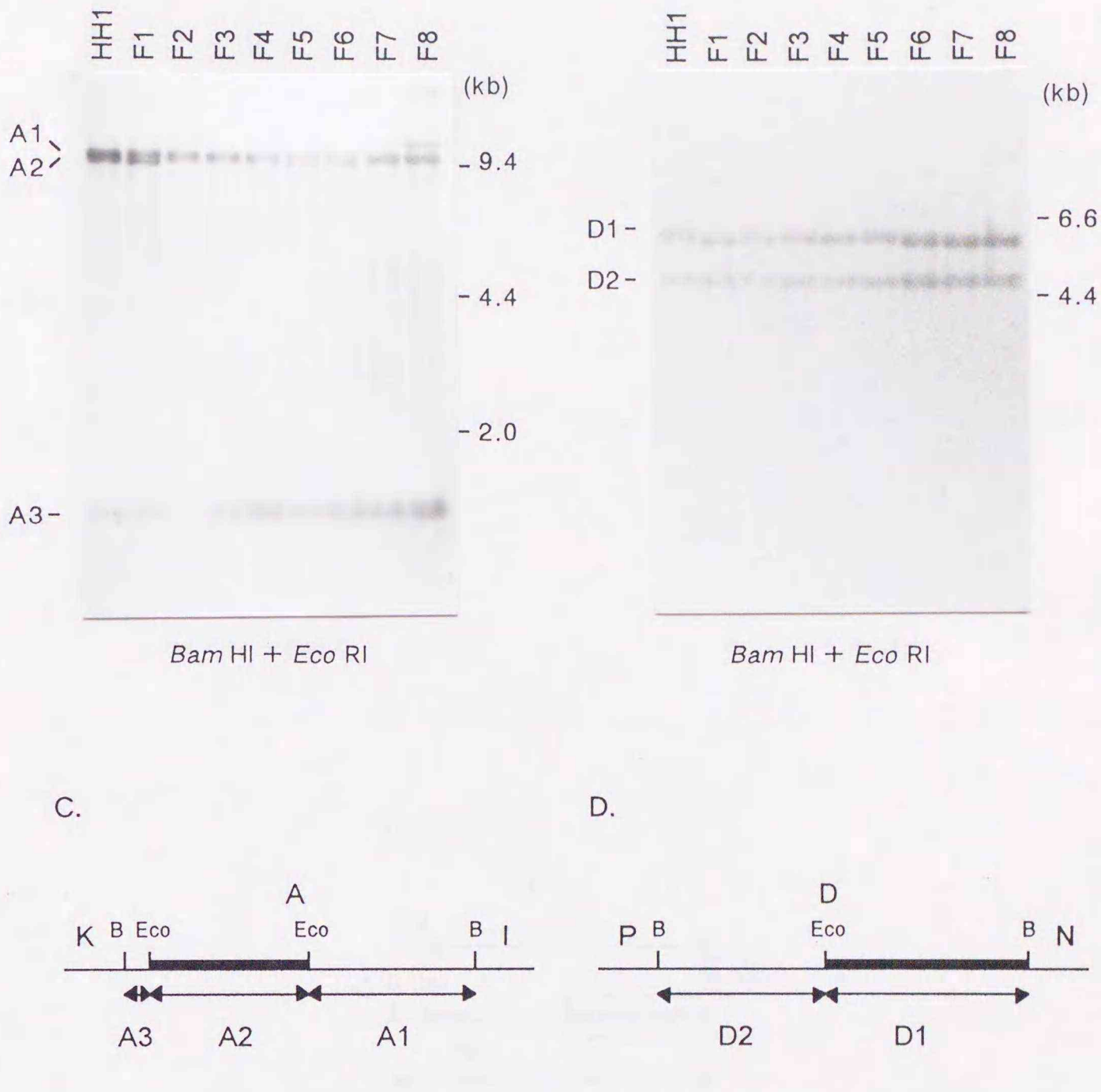
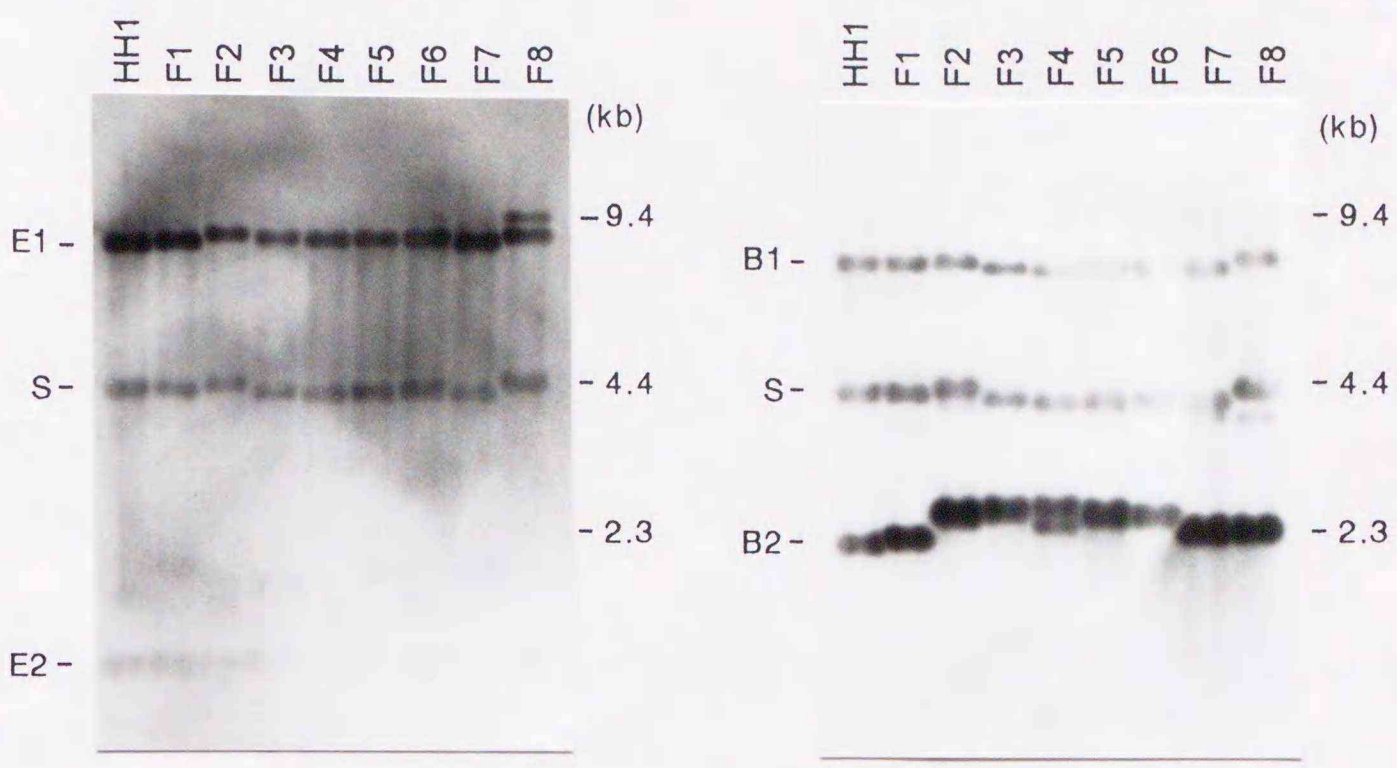


図 13. EHV-1 野外分離株のウイルス DNA の *Bam* HI A と D 断片の多様性のサザンハイブリダイゼーションによる解析

*Bam*HI と *Eco* RI の 2 酵素で消化したウイルス DNA を *Bam*HI A 断片プローブ（A）および *Bam* HI D 断片プローブ（B）と反応させた。（C）A 断片プローブを用いたサザンハイブリダイゼーションで分子量に変化の認められた領域を太線で示した。（D）D 断片プローブを用いたサザンハイブリダイゼーションで分子量に変化の認められた領域を太線で示した。B, *Bam* HI; Eco, *Eco* RI



C.

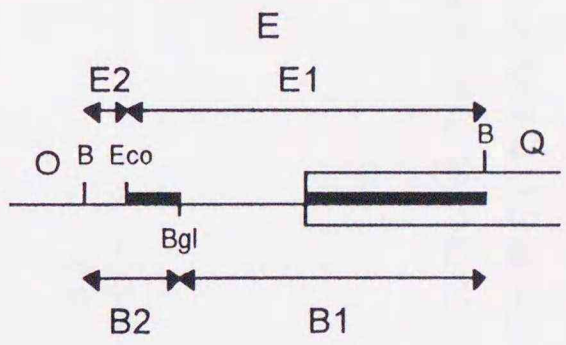


図 14.　EHV-1 野外分離株のウイルス DNA の *Bam* HI E 断片の多様性のサザンハイブリダイゼーションによる解析

*Bam*HI と *Eco* RI (A) あるいは *Bam*HI と *Bgl* II (B) で消化したウイルス DNA を *Bam* HI E 断片プローブと反応させた。(C) A と B のサザンハイブリダイゼーションで分子量に変化の認められた断片をもとに、E 断片上の分子量に多様性を示す領域を決定して太線で示した。B, *Bam* HI; Eco, *Eco* RI; Bgl, *Bgl* II

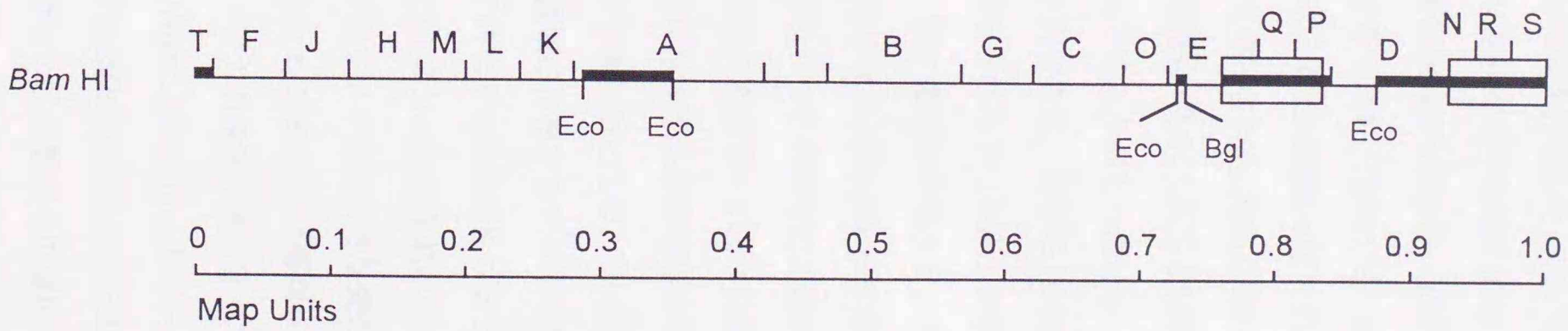


図 15.　EHV-1 HH1 株のウイルス DNA の *Bam* HI 制限酵素切断地図

日本でウマ流産胎子から分離された EHV-1 の株間で分子量に変化のみられた断片を太線で示した。Eco, *Eco* RI; Bgl, *Bgl* II

考　察

今回の研究では、日本で初めてウマから分離されたEHV-1 HH1株のウイルスDNAについて、*Bam* HIで切断されたDNA断片をすべてプラスミドベクターにクローン化してHH1株の正確な制限酵素切断地図を作成した。次いで、これをもとに日本で分離されたEHV-1株の株間でDNAの分子量に変化を示す領域の検出・同定を行った。HH1株の制限酵素切断プロファイルと制限酵素切断地図はWhalleyら（1981, 1989）によって報告されたEHV-1のHVS-25株のものとほぼ同様であったが、Henryら（1981）によって報告されたマウス細胞に馴化したEHV-1のKyA株のものとは異なっていた。さらに、今回の切断地図作成により、Whalleyら（1989）によって修正されたHVS-25株の*Bam* HI制限酵素切断地図が正確であったことも確認された。*Bgl* II切断の場合、HVS-25株ではK、LとM断片がほぼ同一の分子量を持ち、電気泳動のみでは区別できなかったのに対し、HH1株のM断片は分子量が小さく電気泳動でKとL断片とは明確に区別できた。さらに、HH1株のウイルスDNAの*Eco* RIと*Bgl* IIの切断地図では、HVS-25株にみられなかった新しい断片が確認されたことから、このような株間の相違を認識することは、特に遺伝子のマッピングなどを行う際に重要と判断された。

EHV-1野外株のウイルスDNAの制限酵素切断プロファイルはすべてプロトタイプと同じであったが、株間でいくつかの断片に相違が認められた。これらは切断断片の分子量の増減によるもので、外国で報告されているような制限酵素の切断点の欠除あるいは出現によるものではなかった。今回用いたウイルス株で認められたDNA断片上の多様性を示す領域をサザンハイブリダイゼーションで調べたところ、ULの両端（*Bam* HI TとE 断片）、ULの中央部（*Bam* HI A断片）およびS領域に存在するすべての断片で分子量の変化がみられた。*Bam* HI A断片の分子量の多様性はこれまで、この断片の分子量が大きすぎたために報告されていなかった。日本のEHV-1不活化ワクチンの実用化前にウマから分離されたウイルス株と実用化後の分離株との制限酵素切断プロファイルに大きな変化はみられず、アメリカ合衆国の報告（Allenら, 1985; AllenとBryans, 1986）とは異なっていた。しかし、野外で流行しているわが国のEHV-1の中にアメリカ合衆国で報告されているようなDNAプロファイルを異にするウイルス（Allenら, 1985; AllenとBryans, 1986）が存在しているか否かを継続調査することは、今後のワクチン開発および防疫対策上重要と思われる。

近年、EHV-1ゲノム上に数多くの遺伝子が同定されてきた（AllenとYeargan, 1987; AllenとCoogle, 1988; Whalleyら, 1989; Audonnetら, 1990; Robertsonら, 1991; Whittakerら,

1991, 1992; Eltonら, 1992）。Telfordら（1992）は、イギリスで分離された強毒EHV-1 Ab4株の全塩基配列を決定し、さらに、それまでに全塩基配列が明らかとなっていたHSV-1とVZVのものと比較することにより76個の遺伝子の存在を示した。これらの報告をもとに、今回の実験で明らかとなった分子量に多様性を示す断片を詳細に解析したところ、*Bam* HI A断片のA2サブフラグメントの中には、7種類の遺伝子（24番遺伝子の後半部分、25番、26番、27番、28番、29番、30番遺伝子の前半部分）が存在していた。これらの遺伝子のうち、24番遺伝子はHSV-1のUL36遺伝子に対応することからテグメントタンパクをコードすると考えられ、コード領域内には塩基の繰り返し配列が存在している（Telfordら, 1992）。28番遺伝子はHSV-1のUL32の相同遺伝子でEHV-1の主要な糖タンパクの一つであるgp2をコードすると考えられている（Telfordら, 1992; Whittakerら, 1992）。Whittakerら（1990）はEHV-1株間でgp2の分子量に差を認め、特に弱毒生ワクチンのRinomune株で分子量の低化が顕著であることを報告している。従って、このA2サブフラグメントでみられる分子量の多様性が24番遺伝子あるいは28番遺伝子に起因しているならば、これがウイルスの抗原性に影響を及ぼしている可能性が考えられる。

Bam HI D断片のD1サブフラグメントの中には、4種類の遺伝子（69番遺伝子の一部、70番、71番、72番遺伝子の一部）が存在していた（Telfordら, 1992）。これらの遺伝子のうち、71番遺伝子はHSV-1のUs5遺伝子と相同でエンベロープ糖タンパクをコードし、この遺伝子内には2種類の繰り返し配列が存在する（Telfordら, 1992; Sunら, 1994）。D1サブフラグメントの多様性はこれらの繰り返し配列のコピー数の変化に依存すると思われ、このことが抗原性に影響を及ぼしている可能性がある。

ウイルスゲノムのUL両端、IRsおよびTRsにみられる多様性はそれらのゲノム中に存在する繰り返し配列のコピー数の変化によるものと考えられている（Hammerschmidtら, 1986; Chowdhuryら, 1990; YalamanchiliとO'Callaghan, 1990; Telfordら, 1992）。今回調べた野外分離株のウイルスDNAにおいてもそれらの領域で分子量に差が認められたが、この分子量の多様性はEHV-1をウマ以外の動物に由来する培養細胞で継代した場合、容易に観察される（Allenら, 1983a; Studdertら, 1986）。これらの領域の分子量の変化と抗原性あるいは病原性との関連性は不明であるが、Chowdhuryら（1988）は反芻獣から分離したいくつかのEHV-1株のDNA制限酵素切断プロファイルがプロトタイプとは異なっていて、病原性および交差中和試験による抗原性にも差が認められたことから、今後の詳細な検討が待たれている。

一般に、EHV-1ゲノムはウマ由来の培養細胞でウイルス継代すると非常に安定であるが

（AllenとBryans, 1986）、EHV-1を実験感染させたウマの体内ではウイルスDNAに多様性が認められたとの報告もある（Matsumuraら, 1994）。このような多様性がどのようにして起こるのかは現在のところ不明であるが、ウマ体内でのEHV-1の潜伏感染機構あるいはウイルス複製とウマに広く潜伏感染しているEHV-2（ウマサイトメガロウイルス）などとの関連性を検討することが解明の糸口になるのかもしれない（BryansとAllen, 1989; Edington, 1992）。

第３章　ウシ腎臓細胞継代 EHV-1 ウイルス株のＤＮＡ解析

要　旨

EHV-1 の強毒 HH1 株とそれをウシ腎臓（BK）細胞で 77 代（BK77 株）、161 代（BK161 株）、271 代（BK271 株）および 343 代（BK343 株）連続継代された株のウイルス DNA を制限酵素 *Bam* HI で切断して解析した。BK77 株と BK161 株は親株の HH1 株と同一の DNA プロファイルを示したが、BK271 株と BK343 株は明らかに親株と異なっていた。DNA プロファイルに変化のみられた株の継代数は子ウマに対する病原性の低下した株の継代数とほぼ一致していた。そこで、分子量に変化のみられた断片を特定するためにプラスミドベクターにクローン化した HH1 株の *Bam* HI DNA 断片をプローブとしてサザンハイブリダイゼーションを行ったところ、*Bam* HI B、E、N、P、QR、S と T の 7 種類の断片で変化が認められた。さらに、ウイルスゲノム中の分子量の変化した領域を詳細に調べるために、BK343 株ウイルス DNA の *Bam* HI 切断断片をプラスミドベクターpUC18 にクローン化し、各断片の制限酵素切断地図を原株 HH1 のそれと比較した。その結果、７種類の断片の他に、新たに A と D の 2 種類の断片で相違が認められた。BK343 株で変化のみられた DNA 領域を Telford ら（1992）の報告にもとづき特定した結果、T 断片上の 1 番遺伝子、A 断片上の 24 番遺伝子と D 断片上の 71 番遺伝子の 3 遺伝子に変化が認められた。他の 6 断片の変化は非コード領域あるいは繰り返し配列部位に認められた。変化の認められた 3 遺伝子について塩基配列を決定したところ、1）1 番遺伝子内には 299 塩基を単位とする繰り返し配列の挿入、2）24 番遺伝子には繰り返し配列のコピー数の変化、3）71 番遺伝子では繰り返し配列のコピー数の変化とアミノ酸置換を伴う 2 箇所の塩基置換が認められた。以上の成績より、BK 細胞で長期間連続継代されて変化したウイルスゲノム領域のうち、3 種類の遺伝子に変化が認められたことから、これらが病原性に関与している可能性が推察された。

序　文

EHV-1による妊娠馬の流産を防ぐ目的で、世界各地で不活化ワクチンあるいは生ワクチンが広く応用されている（AllenとBryans, 1986）が、その有効性は低く（Bürkiら, 1991）、安全で効果的なワクチンの開発が切望されている。わが国においても、1967年のEHV-1による流産の初発以来、本ウイルスによる流産が多発したことから（Kawakamiら, 1970）、1979年に妊娠馬への不活化ワクチンの接種が実施されたが（Hashiguchiら, 1980）、防圧するまでには至っていない。Kawakamiら（1978）は不活化ワクチンと弱毒生ワクチンとの併用を考え、EHV-1のHH1株をBK細胞で連続継代して弱毒化を図ったところ、268代以上継代された株では子ウマに経鼻接種してもほとんど呼吸器症状を示さず、病原性が著しく低下していることを報告した。しかし、320代継代された株を子ウマに経鼻接種した場合、強毒のHH1株に対する中和抗体を産生したものの、強毒株の攻撃接種に対してほとんど防御を示さず、ワクチンとしての有効性は認められなかった（Kawakamiら, 未発表）。

一般に、生ワクチンの開発は強毒のウイルス株を本来の宿主以外の動物や培養細胞で継代・馴化して行なわれているが、この方法は弱毒株を選択するまで長期間を要し、しかも弱毒化を調整することができないために有用なワクチン株を任意に得ることは困難である。しかし、近年の遺伝子工学の発展により、ウイルスDNAを人工的に操作して弱毒化することが可能となった。例えば、同じヘルペスウイルス属のPrVでは遺伝子組み換え生ワクチンが既にわが国を含め多くの国々で使用されている（KitとKit, 1991）。PrVの病原性に関与するタンパクとして、チミジンキナーゼ（TK）、gC、gE、gIとプロテインキナーゼなどが報告されており（Tenserら, 1983; Kitら, 1985; Mettenleiterら, 1988; Zuckermannら, 1988; Kimmanら, 1992）、これらをコードする遺伝子を単独あるいは複数不活化することで安全で効果的なワクチンを作出することが可能となっている（KitとKit, 1991）。現在では、さらにウイルス複製に必須の遺伝子をも不活化してより安全で免疫原性の高いワクチン株の開発が進められている（Mettenleiterら, 1994）。

しかし、EHV-1ではTK遺伝子以外に病原性に関与する遺伝子はほとんど知られていないため、遺伝子操作による生ワクチン開発が困難であった。薬剤を用いて選択されたEHV-1のTK遺伝子変異株の病原性は親株に比べて明らかに低下していたものの、強毒株に対する防御能はほとんどなく生ワクチンとしての有効性は認められていない（Cornickら, 1990; Slaterら, 1993）。

EHV-1には76種類の遺伝子が存在し、それらの配列順序はVZV（DavisonとScott, 1986）やHSV-１（McGeochら, 1988）の場合と良く似ている（Telfordら, 1992）。EHV-1の野外分離株とウマ以外の培養細胞で継代されたEHV-1株のウイルスDNAには、制限酵素切断点の増減の他に、切断断片の分子量に変化のあることが明らかとなっている（AllenとBryans, 1986; Chowdhuryら, 1986; Kirisawaら, 1993b）。しかし、このようなウイルスDNAの分子量の多様性と抗原性あるいは病原性との関係についてはほとんど検討されていない。

そこで、EHV-1の病原性に関与する遺伝子の解明の一環として、強毒HH1株とこの株をBK細胞で連続継代して得られた弱毒株を用いて、これらのウイルスのDNA構造の比較検討を行った。

材　料　と　方　法

1）ウイルス

HH1株ならびにこれをBK細胞で77代（BK77株）、161代（BK161株）、271代（BK271株）と343代（BK343株）連続継代した株（Kawakamiら, 1978）を用いた。さらに、BK343株をBK細胞を用いた通常のプラック形成法でウイルスクローニングし、得られた５種類のウイルスクローン、1E、1F、3F、3Gと3Hを実験に供試した。

2）ウイルス粒子からのDNAの抽出

第1章の材料と方法で述べた方法に従った。

3）DNAの制限酵素切断と電気泳動

DNAの切断は種々の制限酵素（宝酒造、滋賀；Boehringer Mannheim 社、ドイツ）を用い、それぞれの酵素の至適条件下で行った。酵素で切断されたDNAの電気泳動は、第1章の材料と方法の項で述べた方法で行った。

4）サザンハイブリダイゼーション

ジゴキシゲニン-11-dUTPで標識したDNAプローブを用いて、第2章の材料と方法の項で述べた方法でサザンハイブリダイゼーションを行った。DNAプローブはDNA標識システム

（Boehringer Mannheim 社、ドイツ）を用いて調整した。ハイブリダイズしたDNA断片は第1章の材料と方法の項で述べた方法で検出した。

5）クローン化したHH1株ウイルスDNAの*Bam* HI 断片

第2章でプラスミドベクターpUC18にクローン化したHH1株の*Bam* HI DNA断片を実験に用いた。

6）BK343株ウイルスDNAのクローン化

BK343株のウイルスクローン3Fと3HのウイルスDNAを*Bam* HI で切断し、それらのDNA断片をプラスミドベクターpUC18の*Bam* HIサイトに挿入し、第2章の材料と方法の項で述べた方法でクローン化した。

7）DNA の 3' 突出末端および平滑末端の脱リン酸化

3' 突出末端あるいは平滑末端を生じる制限酵素で切断されたプラスミド DNA（0.5 μg/μl）10 μl に、再蒸留水 34 μl、10 倍濃度の CIP 反応液（500 mM Tris-HCl pH 9.0、10 mM $MgCl_2$）5 μl と CIP（25 単位/μl）1 μl を混和し、50℃ 20 分間反応させた。再度 CIP を 1 μl 加え、さらに 50℃で 20 分間反応させた。以後の操作は、第 2 章の材料と方法の項（pUC18 の 5' 突出 DNA 末端の脱リン酸化）で述べた方法に従った。

8）クローン化したウイルス DNA 断片のサブクローニングとデリーションクローンの作製

プラスミド pUC18 にクローン化した HH1 株あるいは BK343 株 3F クローンの DNA の *Bam* HI T、A と D の 3 種類の断片を種々の制限酵素で消化した後、アガロースゲル電気泳動で分画し、目的とする DNA 断片を抽出した。プラスミドベクターには pBluescript II KS(+)（Stratagene 社、アメリカ合衆国）を用い、組み込む断片に適合する制限酵素で消化して脱リン酸化した後にそれらの断片を T4 DNA リガーゼで連結した。これを大腸菌 XL-1 blue 株のコンピテントセルに導入して組み換えプラスミドを得た（第 2 章の材料と方法の項を参照）。

サブクローニングされた組み換えプラスミドのデリーションクローンはエキソヌクレアーゼ III とマングビーンヌクレアーゼで消化して作製した。すなわち、組み換えプラスミドのマルチクローニングサイト領域に 3' と 5' 突出末端が生じるように 2 種類の酵素で消化された DNA について、DNA 1 μg あたり 20 単位のエキソヌクレアーゼ III を加えて総量 100 μl（反応

液：50 mM Tris-HCl pH 8.0、5 mM $MgCl_2$、10 mM 2-メルカプトエタノール）とした。これを23℃で5、10、15および20分間反応させ、5’端よりDNAを消化した。各反応時間毎に25 μlを回収し、予め10倍濃度のマングビーンヌクレアーゼ用反応液（300 mM酢酸ナトリウムpH 5.0、1 M NaCl、10 mM酢酸亜鉛、50%グリセリン）20 μlと再蒸留水155 μlを分注しておいたマイクロチューブに移し、68℃で15分間処理した。これを直ちに氷冷し、マングビーンヌクレアーゼをDNA 1 μgに対して0.6単位加えて30℃で30分間反応させ、DNAの1本鎖部分を消化した。この溶液をフェノール・クロロホルム処理してエタノールでDNAを沈殿させた後、TE溶液に溶解し、Klenowフラグメントにより DNAの両端を平滑化し、T4DNAリガーゼで環状化させた（第2章の材料と方法の項参照）。この後、このDNAを大腸菌XL-1 blue株に導入して増殖させ種々の分子量サイズの挿入断片を持つデリーションプラスミドを得た。

9）プラスミドDNAの抽出と精製

プラスミドDNAの抽出は、少量の場合にボイル法、また、大量の場合にはアルカリ・SDS法を用いて第2章の材料と方法の項で述べた方法で行った。プラスミドDNAの精製は塩化セシウム・エチジウムブロマイド法（第2章の材料と方法の項参照）あるいはセファロースCL-4Bクロマトグラフィーにより以下のようにして行った。すなわち、セファロースCL-4B（Pharmacia社、スウェーデン）をミニカラム（容量250 μl、Promega社、アメリカ合衆国）にベッドボリュームが約90%になるように充填し、TE溶液を重層して2,000 rpm 3分間遠心した。同様の操作を3回反復してTE溶液でカラムを平衡化した後、アルカリ・SDS法で抽出したプラスミドDNAを20 μl重層し、2,000 rpm 3分間遠心して溶出液をマイクロチューブに回収した。カラムを替えて同様の操作を行い、回収された溶液を精製プラスミドとした。

10）塩基配列の決定

ジデオキシ法の原理にもとづいて、AutoRead Sequencing キット（Pharmacia社、スウェーデン）を用いて反応を行った。塩基配列はA.L.F. DNA Sequencer II（Pharmacia社、スウェーデン）を用いて決定した。得られた塩基配列の編集・解析はDNA解析ソフトDNASISを用いて行った。

成　績

1）HH1株とそのBK細胞継代株（BK77、BK161、BK271、BK343）のウイルスDNAプロファイル

HH1株と４種類のBK細胞継代株のウイルスDNAを*Bam* HIで切断し、0.7％アガロースゲル電気泳動で解析した（図16-A）。HH1株のウイルスDNAを*Bam* HIで切断すると分子量順にA～Tの20種類の断片が生じた（第2章・図7; 図16-A）。BK77株とBK161株の*Bam* HI 切断プロファイルはHH1株のものと同一であったが、継代数の著しく高いBK271株とBK343株のプロファイルは親株のHH1株と明らかに異なっていた。高継代株では、①A断片とB断片の間に２本のサブフラグメントが出現し、② E断片の不明瞭化、③ T断片の消失と ④ L～S断片の間に存在するいくつかの断片で分子量の変化が認められた。

これらの変化を示した断片を同定するために、HH1株のウイルスDNAの全長をカバーする19種類のクローン化した*Bam* HI DNAの断片をプローブとしてサザンハイブリダイゼーションを行った。その結果、4種類の断片で分子量の変化が認められた。A断片とB断片の間に出現した2本のサブフラグメントは、*Bam* HI B 断片プローブと反応したことから、これらの断片はB断片に由来することが明らかとなり、分子量の少ない方からB' 断片（16.6 kb）とB" 断片（18.2 kb）とした（図16-B）。

不明瞭であったE断片は、*Bam* HI E 断片プローブとの反応性によりHH1株と同じ分子量の9.6 kbと分子量の低下した8.4 kbの2種類の断片からなっていることが明らかになった（図16-C）。さらに、E断片はIRs領域の一部を含むため、この領域と相同性を持つS断片も反応した（図16-C）。また、S 断片プローブを用いても同様の成績が得られた（データ示さず）。

BK271株とBK343株のQR断片の分子量は親株のHH1株より大きく、しかも、不均一で分子量に幅のあることが明らかとなった（図16-D）。

T断片は電気泳動プロファイルで認められなかったが（図16-A）、サザンハイブリダイゼーションの結果、約0.3 kbの間隔で階段状に多数の断片が検出された（図16-E）。

他の14種類の*Bam* HI DNA断片をプローブとした場合、分子量の変化した断片は認められなかった。

以上の成績より、BK271株とBK343株では*Bam* HI B、E、QRとTの4種類のDNA断片で分子量の変化とともに複数の断片が検出されたことから、これらの株にはいくつかのウイルス集団の存在することが明らかとなった。そこで、BK271株とBK343株の成績がほぼ同一であっ

たことから、最も継代の進んだBK343株からプラック形成法でクローニングされた5種類のクローン（1E, 1F, 3F, 3G, 3H）を用いてさらにウイルスDNAプロファイルの解析を進めた。

2）BK343株の5種類のウイルスクローン（1E、1F、3F、3G、3H）のDNAプロファイル

5種類のウイルスクローンのDNAを*Bam* HI で切断し、0.7％アガロースゲル電気泳動を行ったところ、各クローン間でいくつかの断片に分子量の相違が認められた（図17-A）。このような分子量に多様性を示す断片を同定するために19種類のHH1株の*Bam* HI DNA断片をプローブとしてサザンハイブリダイゼーションを行った。B断片プローブを用いると、B、B'とB"断片が検出されたが、B' 断片あるいはB" 断片のみを単独に持つウイルスクローンは得られなかった（図17-B）。

E断片プローブを用いた解析では1Eと1FのウイルスクローンのE断片が親株のHH1株のE断片と同じ分子量を示したが、他の3クローンではDNAの一部の欠損が認められた。さらに、このプローブの使用によりすべてのウイルスクローンのS断片の分子量に多様性のあることが認められた（図17-C）。この成績はS断片プローブを用いた場合と同一であった（データ示さず）。

N断片プローブにより3H、3Fと3GクローンのNとP断片の間に不明瞭なバンドが検出された。このN断片はEHV-1ゲノムのIRs領域に存在するため、TRs領域に存在するP断片と同一のDNAを一部に含むため、P断片とも反応し、その分子量の多様性も同時に観察された（図17-D）。また、P 断片プローブを用いてもN断片プローブの場合と同じ成績が得られた（データ示さず）。

5種類のウイルスクローンのQR断片はすべて親株のHH1株のものより分子量が大きく、それらの反応パターンは均一なバンドを示すものから不均一で分子量に幅のあるものまで多様であった（図17-E）。

T断片においては、5種類のクローンすべてでクローニング前の株と同様の階段状の断片が観察された（図17-F）。

他の12種類のDNA断片をそれぞれプローブとした場合、いずれの断片でも分子量の多様性を検出できなかった。

以上の成績より、5種類のBK343株のウイルスクローンでは7断片（B, E, N, P, QR, S, T）で分子量の大きさに多様性のあることが明らかとなり、また、5種類のウイルスクローンの中では3FクローンのDNAが最も分子量に多様性を示した。

3）BK343株のウイルスクローン3FのDNA解析

BK343株のウイルスDNAの分子量の変化を示す領域をさらに詳細に調べる目的で、3FクローンのBam HI DNA断片をすべてプラスミドベクターpUC18のBam HIサイトにクローン化した。3FクローンとHH1株の間でクローン化されたDNA断片の制限酵素切断地図を作成して比較したところ、新たにAとDの2断片に差が認められた（図18～24）。A断片上の差異は、5' 端から2番目のKpn Iサブフラグメントに認められ、また、このサブフラグメント全体は24番遺伝子の一部を構成し2種類の繰り返し配列を含んでいた（図18）。さらに、24番遺伝子はHSV-1のテグメントタンパクをコードするUL36遺伝子の相同遺伝子であった。

B断片をクローン化したところ3種類の断片、すなわち、3F-B（15.1 kb）、3F-B'（16.6 kb）と3F-B" 断片（18.2 kb）が得られた（図19）。3F-B断片内の変異は39番遺伝子（gH遺伝子）と40番遺伝子（HSV-1のUL21遺伝子と相同）の間の繰り返し配列を含む非コード領域内にみられ、HH1株のB断片より0.1 kb 大きかった。3F-B'と3F-B" 断片では同じ非コード領域内に、DNA複製開始点を含む1.6kbの繰り返し配列が、それぞれ2個ないし3個みられた。

3FクローンのD断片はHH1株のものと同じ分子量（10.9 kb）であったが、エンベロープ糖タンパクをコードすると考えられているHSV-1のUs5遺伝子に対応する71番遺伝子の塩基配列中に新たにKpn Iの切断点が生じていた（図20）。

Bam HI のE, N, P, QRとSの各断片の分子量の大きさに関与する部位はすべて非コード領域に存在することが判明した（図21～23）。E断片には2箇所でDNAの欠失が認められ、その一つはEco RI切断点と5'端から4番目のDra I切断点の間の1.1 kb、また、次はIRsのDra I切断点の左側の繰り返し配列が存在する領域内での0.1 kbの脱落であった（図21）。後者の脱落部位は3FクローンとHH1株のS断片の制限酵素切断点地図の比較で明らかとなった（データ示さず）。

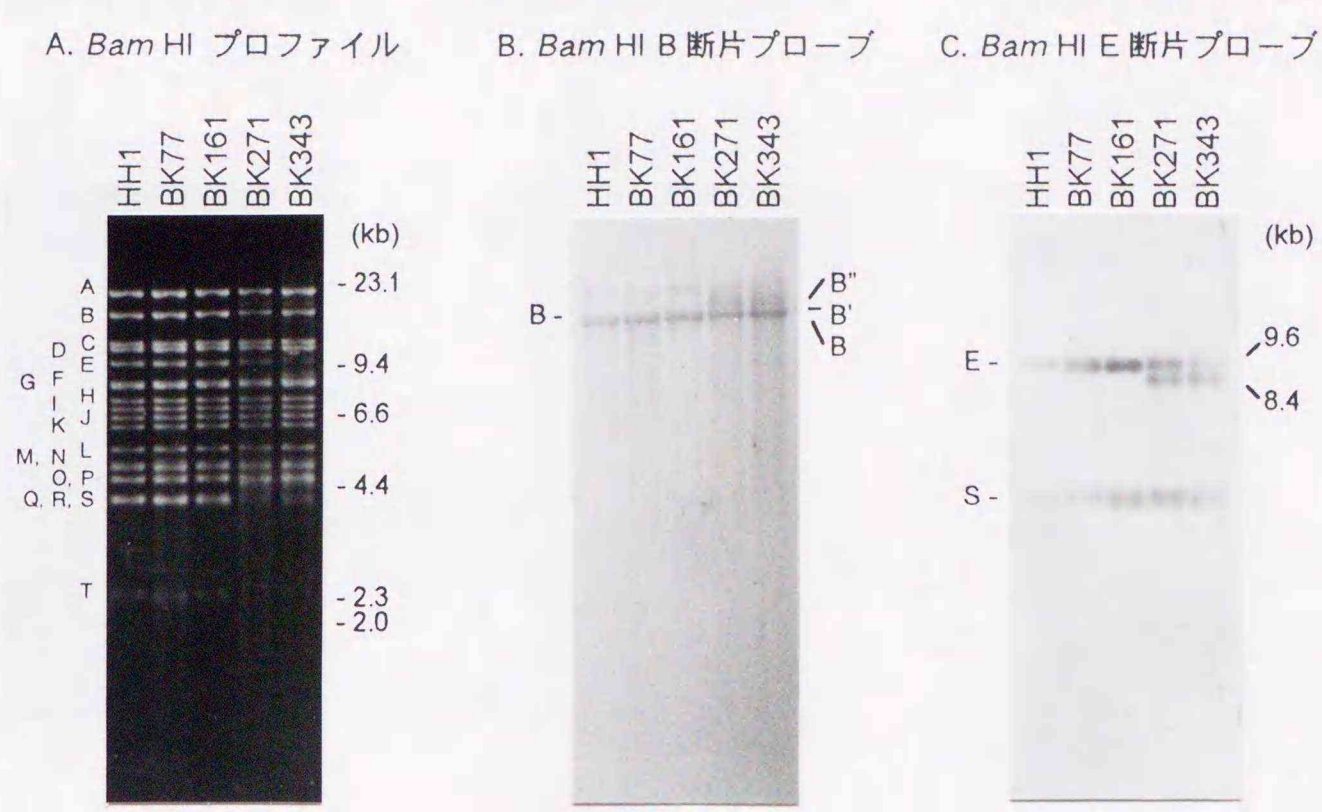
3FクローンのN断片からは分子量の異なる2種類の断片、3F-N8と3F-N36が得られた（図22）。両断片で分子量の変化のみられた領域はいずれもN断片の5' 端から2番目のSma I切断点と1番目のMse I切断点の間に位置し、この領域には1種類の繰り返し配列の存在が認められた。3FクローンのP断片についても2種類の分子量の異なる断片がクローン化され、それらの変化の認められた領域を調べたところ、いずれも3F-N8と3F-N36断片で変化のみられた領域と一致していた（データ示さず）。

QR断片については3Fクローンから2種類の断片、3F-QR10（4.6 kb）と3F-QR46（4.7

kb）が得られた（図23）。さらに詳細にこの断片の分子量の変化を調べるために、サザンハイブリダイゼーションで分子量に幅のあるバンドとして観察された3HクローンのQR断片（図17-E）をクローン化し、分子量の異なる6種類の断片、3H-QR55（4.5 kb）、3H-QR34（4.7 kb）、3H-QR43（4.8 kb）、3H-QR26（4.9 kb）、3H-QR54（5.0 kb）と3H-QR31（5.5 kb）を得た（図23）。これらの8断片の分子量はすべて親株のHH1株のQR断片のものより大きく、しかも、これらの断片で分子量の変化した領域はすべて同じでQ断片の2番目の*Apa* I切断点からQ断片の3' 端までの間に位置し、この領域には1種類の繰り返し配列が存在していた。また、この分子量の変化した領域の約0.4 kb上流にDNA複製開始点の存在が認められた。

3FクローンのT断片からは6種類の断片、3F-T5（3.0 kb）、3F-T8（3.3 kb）、3F-T3（3.6 kb）、3F-T7（4.2 kb）、3F-T2（5.1 kb）と3F-T9（7.2 kb）が得られた（図24）。これらの制限酵素切断地図を比較したところ、各断片は*Hind* III切断で生じた0.3 kbの繰り返し配列を2～16個含んでいることが明らかとなった。次に、これらの繰り返し配列部にオープンリーディングフレームのコード領域が含まれているか否かをみるために予備的にノーザンハイブリダイゼーションによりmRNAの検出を行った。HH1株のT断片上には2種類の遺伝子（1番と2番遺伝子）が存在し、これらの遺伝子が存在しない5' 端側の*Hind* IIIサブフラグメント（1.2 kb）をプローブとするとBK271株とBK343株では階段状にmRNAが検出された。しかし、HH1, BK77とBK161の各株では反応がみられなかった（データ示さず）。さらに、0.3 kbの繰り返し配列をプローブとしてクローン化されたHH1株のT断片の*Hind* III切断断片との反応性をサザンハイブリダイゼーションで調べたところ、2種類の遺伝子配列を含む3' 端側の*Hind* IIIサブフラグメントとプローブは強く反応した（データ示さず）。これらのことから、0.3 kbの繰り返し配列には*Hind* III切断点の下流に存在する1番遺伝子の塩基配列の一部を含むことが示唆された。

以上の成績より、強毒HH1株をBK細胞で長期間連続継代した結果、9種類の*Bam* HI DNA断片に分子量の変化あるいは制限酵素切断点数の増加が生じ、それらの変異断片の中で、特に3種類の遺伝子（1番遺伝子、24番遺伝子、71番遺伝子）の塩基配列に変化のあることが明らかとなった（図25）。次に、これらの3種類の遺伝子の変異をさらに詳細に知る目的でそれらの塩基配列の決定を行った。



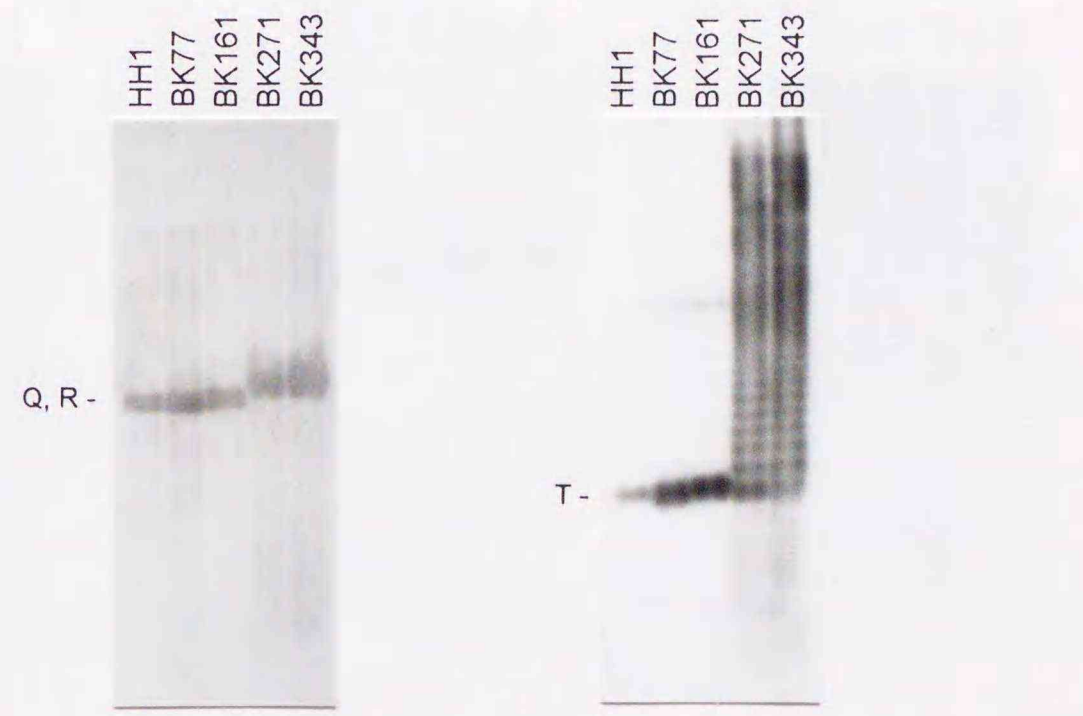
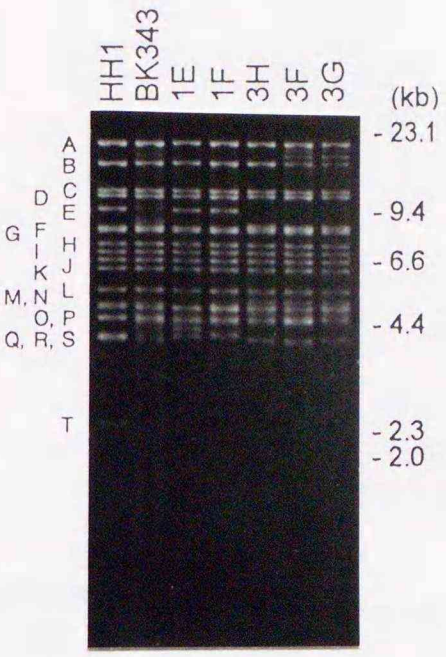


図 16.　EHV-1 HH1 株の BK 細胞継代株（BK77、BK161、BK271、BK343）のウイルス DNA プロファイル

（A）ウイルス DNA の *Bam* HI 切断電気泳動プロファイル。（B～E）分子量に変化のみられた断片のサザンハイブリダイゼーションによる同定。プローブには HH1 株のウイルス DNA の *Bam* HI 断片を用いた。

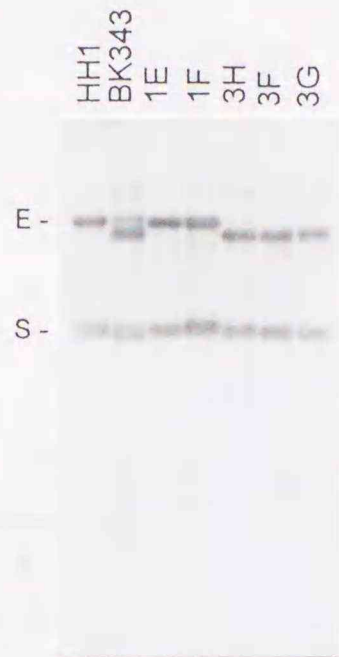
A. *Bam* HI プロファイル



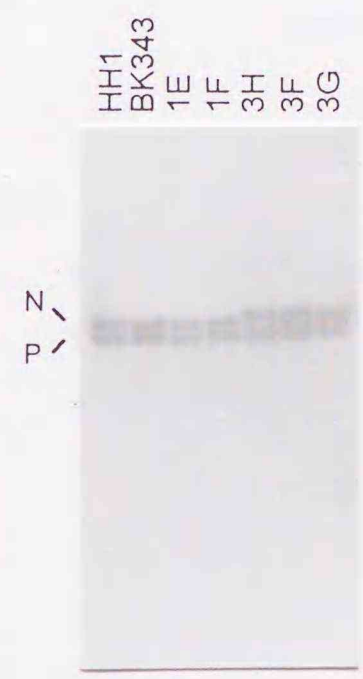
B. *Bam* HI B 断片プローブ



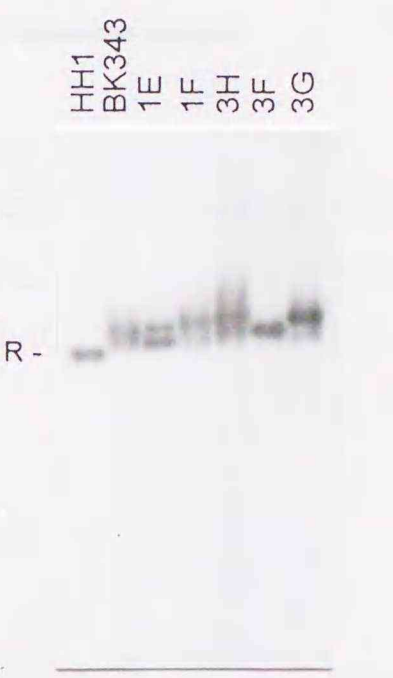
C. *Bam* HI E 断片プローブ



D. *Bam* HI N 断片プローブ



E. *Bam* HI QR 断片プローブ



F. *Bam* HI T 断片プローブ

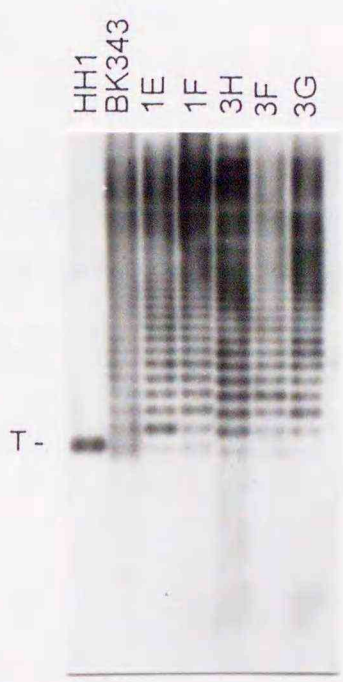


図 17. BK343 株の 5 種類のウイルスクローン（1E、1F、3H、3F、3G）のウイルス DNA プロファイル

（A）ウイルス DNA の *Bam* HI 切断電気泳動プロファイル。（B〜F）分子量に変化のみられた断片のサザンハイブリダイゼーションによる同定。プローブには HH1 株のウイルス DNA の *Bam* HI 断片を用いた。

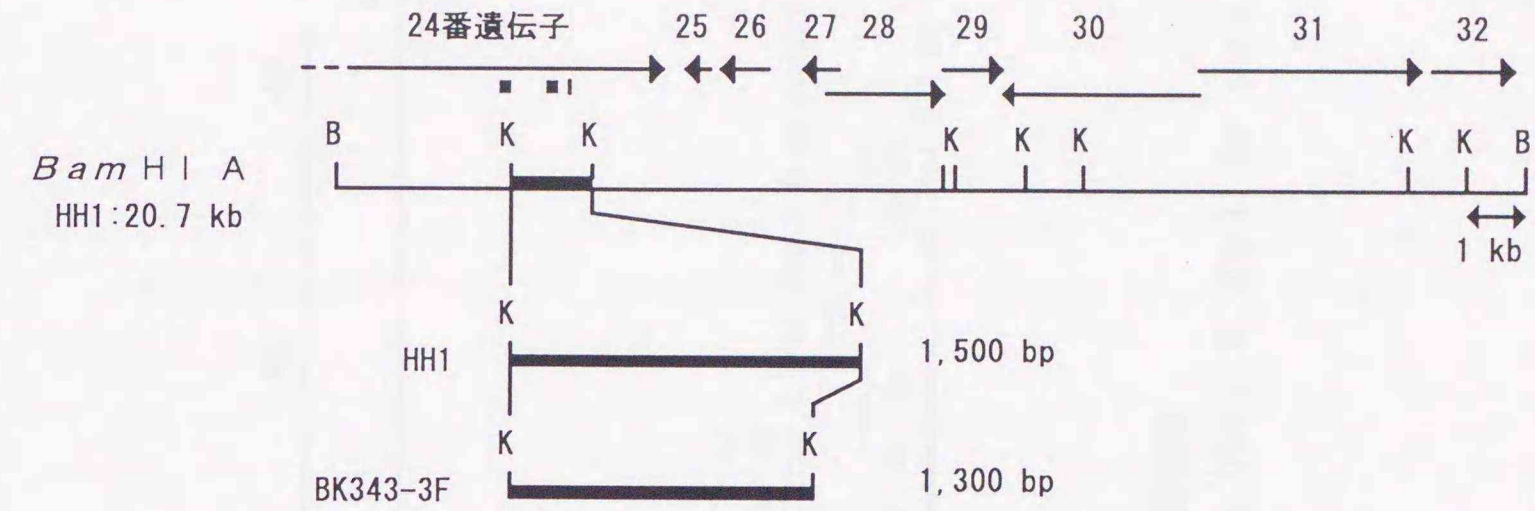


図18. BK343株3Fクローンのウイルス DNAの*Bam* HI A断片にみられた変異領域

変化のみられた領域を太線で示した。*Bam* HI A断片内に存在する遺伝子および繰り返し配列（■）の位置はTelfordら（1992）の報告にもとづいてウイルスゲノムの上部に記した。

B, *Bam* HI; K, *Kpn* I

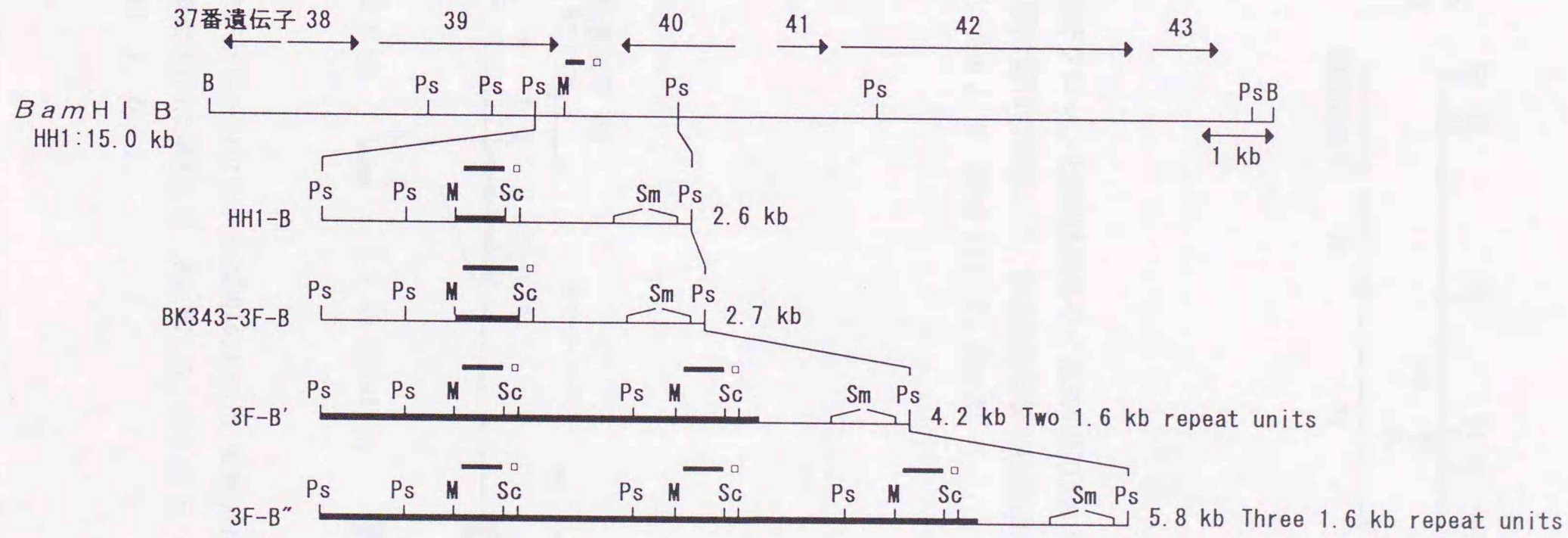


図19. BK343株3Fクローンのウイルス DNAの*Bam* HI B断片にみられた変異領域

□, DNA複製開始点。他の付図説明は図18に準拠。B, *Bam* HI; Ps, *Pst* I; M, *Mlu* I; Sc, *Sac* I; Sm, *Sma* I

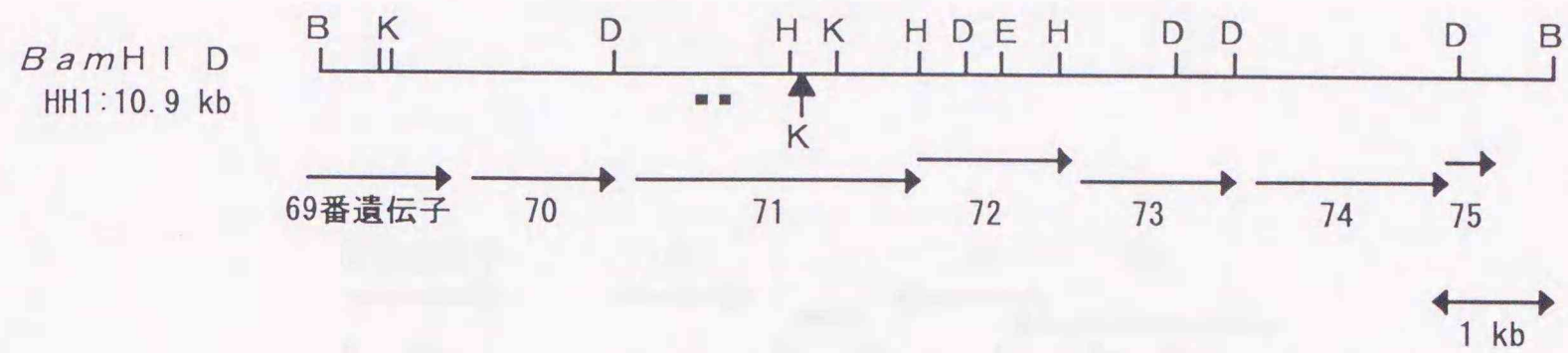


図20. BK343株3FクローンとHH1株の各ウイルスDNAの*Bam* HI D断片の制限酵素切断地図

付図説明は図18に準拠。↑: BK343株で新たに認められた*Kpn* I切断点。B, *Bam* HI; K, *Kpn* I; D, *Dra* I; H, *Hind* III; E, *Eco* RI

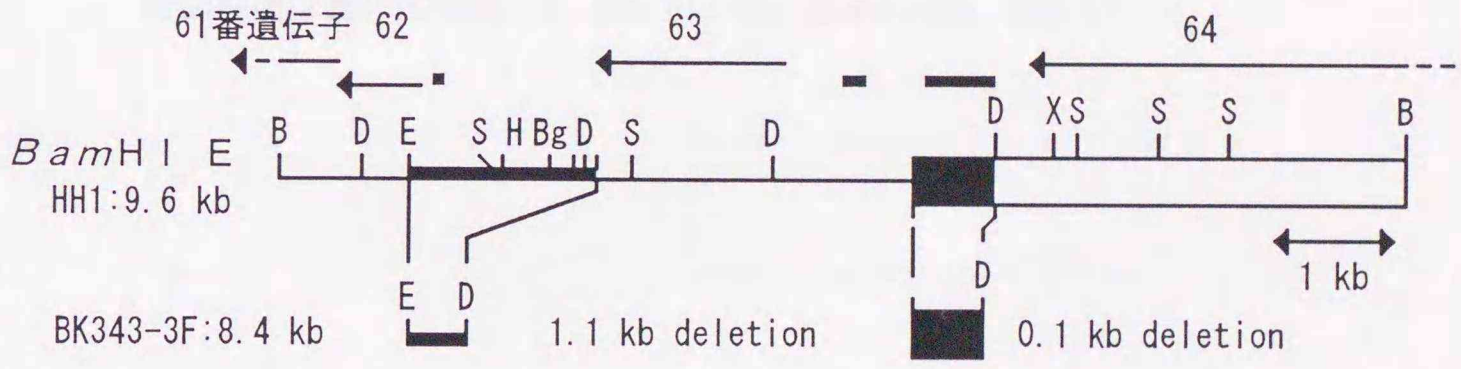


図21. BK343株3Fクローンのウイルス DNAの*Bam* HI E断片にみられた変異領域

付図説明は図18に準拠。B, *Bam* HI; D, *Dra* I; E, *Eco* RI; S, *Sal* I; H, *Hind* III; Bg, *Bgl* II; X, *Xho* I

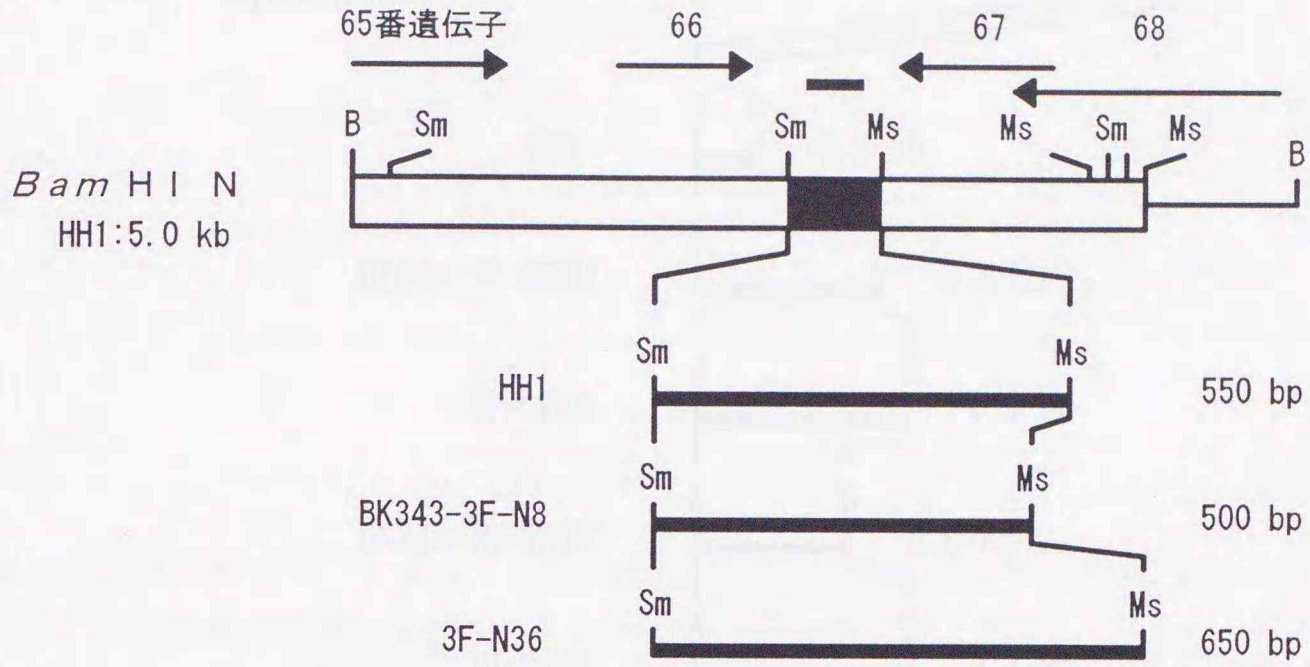


図22. BK343株3Fクローンのウイルス DNAの*Bam* HI N断片にみられた変異領域
付図説明は図18に準拠。B, *Bam* HI; Ms, *Mse* I; Sm, *Sma* I

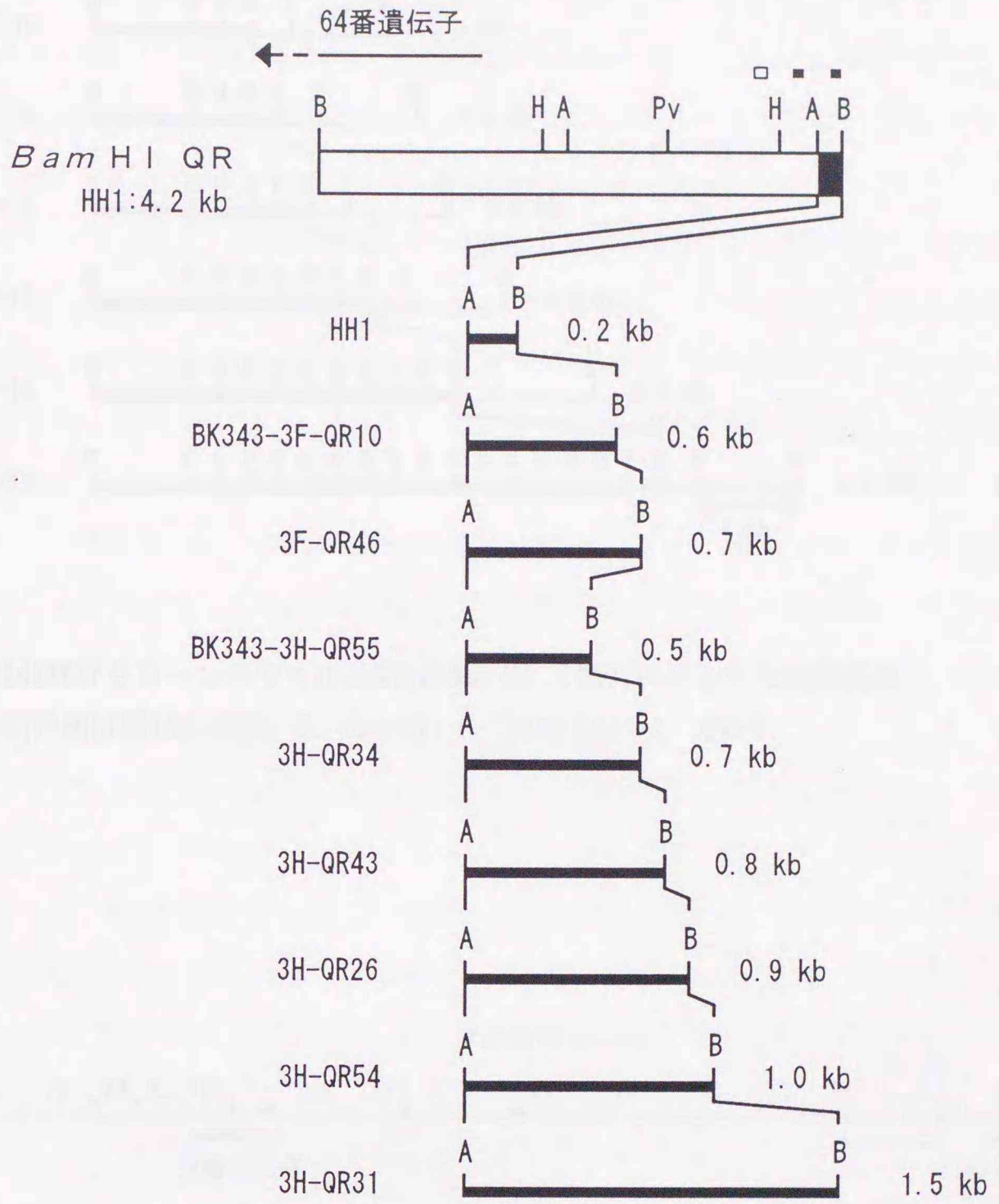


図23. BK343株の3Fと3Hクローンの各ウイルスDNAの*Bam* HI QR断片にみられた変異領域
付図説明は図18と19に準拠。B, *Bam* HI; H, *Hind* III; A, *Apa* I; Pv, *Pvu* II

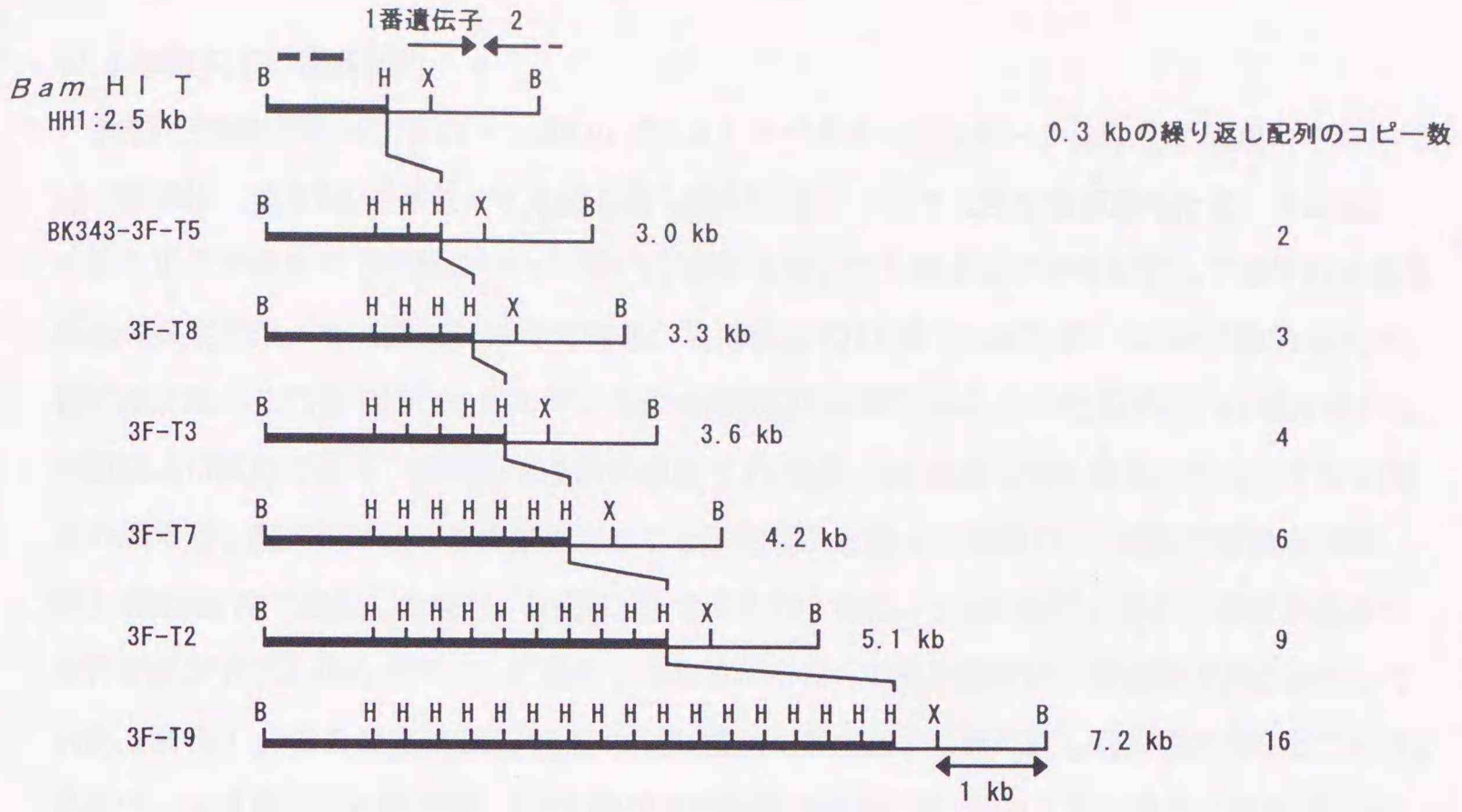


図24. BK343株3FクローンのウイルスDNAの*Bam* HI T断片にみられた変異領域

付図説明は図18に準拠。B, *Bam* HI; H, *Hind* III; X, *Xho* I

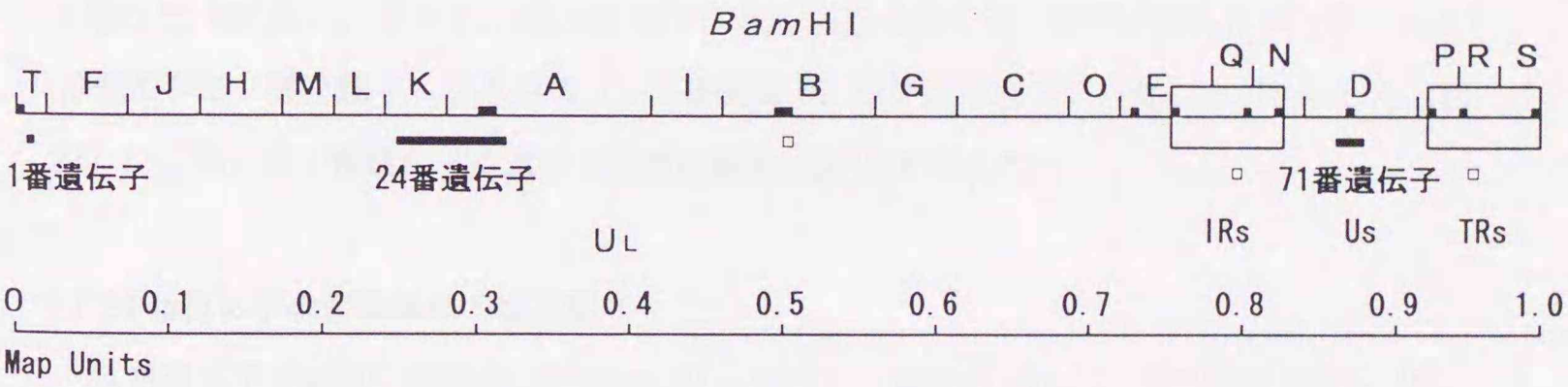


図25. HH1株ウイルスDNAの*Bam* HI制限酵素切断地図

図18～24で特定したBK343株3FクローンのDNA変異領域をウイルスゲノム上に太線で示した。変異の認められた３種類の遺伝子をウイルスゲノムの下部に示した。□：ＤＮＡ複製開始点

4）1 番遺伝子の塩基配列

BK343 株のウイルスクローン 3F のプラスミドベクターにクローン化した 6 種類の T 断片には（図 24）、0.3 kb を単位とする繰り返し配列のコピー数に大きな差があるため、今回は、これらのうち最もコピー数の少ない 3F-T5 断片を用いて 1 番遺伝子が存在する T 断片の全塩基配列の決定を行った（図 26）。その結果、塩基数は HH1 株で 2,471 個、BK343 株では 2,961 個であった。これまでにウイルスゲノムの全塩基配列が明らかにされた EHV-1 の Ab4 株の塩基数は 2,559 個であり、株間の塩基数の相違は 17 塩基、18 塩基と 299 塩基を単位とする 3 種類の繰り返し配列のコピー数の差によることが明らかとなった（表 7）。塩基の置換を HH1 株と BK343 株で比較した場合、BK343 株では 1,102 番目、1,401 番目と 1,700 番目の塩基がそれぞれアデニンからグアニンに変化しており、これらの変異部位は 1 番遺伝子内に存在していた（図 26）。この変化は BK343 株の 299 塩基を単位とする繰り返し配列中に存在していた。さらに、Ab4 株との比較では、HH1 株の 2,299 番目と BK343 株の 2,789 番目の塩基がシトシンからチミンに変化していた。この変異は T 断片に一部存在する 2 番遺伝子（転写は逆方向）上にあり、この点変異によりアミノ酸はグリシン（GGC）からアスパラギン酸（GAC）に変化していた（図 26）。

次に、1 番遺伝子の塩基配列をもとにアミノ酸に翻訳し配列を比較したところ、BK343 株では HH1 株と Ab4 株の開始コドンの ATG が GTG に変化していたため、BK343 株においては読み枠の一致する 51 塩基下流の ATG を開始コドンとして翻訳された場合（1-1 番遺伝子）、最初の 17 残基が脱落し全体のアミノ酸数は HH1 株と Ab4 株で 202 個、BK343 株では 185 個となった（図 27）。さらに、BK343 株では 299 塩基の繰り返し配列が挿入されたことにより、59 個のアミノ酸を転写しうる領域（1-2 番遺伝子）が 2 個存在していたことが判明した（図 27）。これらの 1 番遺伝子の遺伝子構造の概要を図 28 に示した。

5）24 番遺伝子の変異領域の塩基配列

24 番遺伝子で変異が確認された *Bam* HI A 断片の 2 番目の *Kpn* I サブフラグメント（図 18）の塩基配列を決定したところ、HH1 株で 1,512 塩基、BK343 株では 1,293 塩基であった（図 29）。対照の Ab4 株では 1,278 塩基であった。これらの塩基数の相違は 33 塩基と 12 塩基を単位とする 2 種類の繰り返し配列のコピー数の差によるものであった（表 8）。これらのコピー数の変化はアミノ酸配列の読み枠に影響を与えず、*Kpn* I サブフラグメントから翻訳されるアミノ酸数は HH1 株で 503 個、BK343 株では 430 個、また、Ab4 株では 425 個であっ

た（図30）。この領域では塩基の置換が認められなかった。図31に24番遺伝子の変異領域の遺伝子構造の概要を示した。

6）71番遺伝子の塩基配列

71番遺伝子の全長を含む*Bam* HI D 断片の2番目の*Dra* I サブフラグメント（図20）の塩基配列を決定したところ、各ウイルス株の塩基数はHH1 株では3,170個、BK343株では3,173個、また、対照のAb4株では2,963個であった（図32）。塩基配列に変化が認められたのは71番遺伝子のコード領域であった。71番遺伝子の塩基数は、HH1 株で2,601個、BK343株では2604個、Ab4株では2,394個であり、これらの塩基数の差異はこの領域に存在する3種類の繰り返し配列（それぞれの単位の塩基数：12、15、15）のコピー数の差によるものであった（表9）。これらのコピー数の変化は71番遺伝子の読み枠に影響を与えず、翻訳されるアミノ酸数はHH1 株で866個、BK343株では867個、また、Ab4株では797個であった（図33）。さらに、BK343株では2箇所で塩基置換が認められ、1,819番目のシトシンがチミンに、また、1,853番目のグアニンがチミンに変化していた。これに伴い、71番遺伝子のアミノ酸配列は568番目のヒスチジンがチロシンに、また、579番目のセリンがイソロイシンに変化していた。図34に71番遺伝子の遺伝子構造の概要を示した。

```
HH1          1 GGCCAGGCTC TCTCTCGGGC GCGGGCCCGT GAAAAAAATT TTTCGGCCTC GCGACGGCCT   60
BK343-3F     1 .......... .......... .......... .......... .......... ..........   60
Ab4          1 .......... .......... .......... .......... .......... ..........   60

HH1         61 CGAAGAAAAC CGTAGAGGGG AGTGGGGGAT GGGATTTTTT TATTAGGCCA CGCCCACTGG  120
BK343-3F    61 .......... .......... .......... .......... ....AGGCCA CGCCCACTGG  120
Ab4         61 .......... .......... .......... .......... ....AGGCCA CGCCCACTGG  120

HH1        121 GAGGCCACGC CCACTGGGAG GCCACGCCCA CTGGGAGGCC ACGCCCACTG GGAGGCCACG  180
BK343-3F   121 .......... .......... .......... .......... .......... ..........  180
Ab4        121 .......... .......... .......... .......... .......... ..........  180

HH1        181 CCCACTGGGA GGCCACGCCC ACTGGGAGGC CACGCCCACT GGGAGGCCAC GCCCACTGGG  240
BK343-3F   181 .......... .......... .......... .......... .......... ..........  240
Ab4        181 .......... .......... .......... .......... .......... ..........  240

HH1        241 AGGCCACGCC CACTGGGAGG CCACGCCCAC TGGGAGGCCA CGCCCACTGG G---------  291
BK343-3F   241 .......... .......... .......... .......... .......... .---------  291
Ab4        241 .......... .......... .......... .......... .......... .AGGCCACGC  300

HH1        292 ---------- ---------- -----AGGCC ACGCCCACTC CGGTGATGCA GCGGTTATGC  326
BK343-3F   292 ---------- ---------- -----..... .......... .......... ..........  326
Ab4        301 CCACTGGGAG GCCACGCCCA CTGGG..... .......... .......... ..........  360

HH1        327 GATTGTCCTC TCAGCGCTAC AGTGGGGCTC ACTGCTATGC TGGGGCTCAC TGCTATGCTG  386
BK343-3F   327 .......... .......... ..........  .......... .......... ..........  386
Ab4        361 .......... .......... ..........  .......... .......... ..........  420

HH1        387 GGGCTCACTG CTATGCTGGG GCTCACTGCT ATGCTGGGGC TCACTGCTAT GCTGGGGCTC  446
BK343-3F   387 .......... .......... .......... .......... .......... ..........  446
Ab4        421 .......... .......... .......... .......... .......... ..........  480

HH1        447 ACTGCTATGC TGGGGCTCAC TGCTATGCTG GGGCTCACTG CTATGCTGGG GCTCACTGCT  506
BK343-3F   447 .......... .......... .......... .......... .......... ..........  506
Ab4        481 .......... .......... .......... .......... .......... ..........  540

HH1        507 ATGCTGGGGC TCACTGCTAT GCTGGGGCTC ACTGCTATGC TGGGGCTCAC TGCTATGCTG  566
BK343-3F   507 .......... .......... ..-------- ---------- ---------- ----------  528
Ab4        541 .......... .......... .......... .......... .......... ..........  600

HH1        567 GGGCTCACTG CTATGCTGGG GCTCACTGCT ATGCTGGGGC TCACTGCTAT GCTGGGGCTC  626
BK343-3F       ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
Ab4        601 .......... .......... .......... .......... .......... ..........  660

HH1        627 ACTGCTATGC ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  636
BK343-3F       ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
Ab4        661 ..........  TGGGGCTCAC TGCTATGCTG GGGCTCACTG CTATGCTGGG GCTCACTGCT  720
```

図 26. HH1 株、BK343 株 3F クローンと Ab4 株の各ウイルス DNA の *Bam* HI T 断片の塩基配列（1）

-：配列をシフト、.：同一の塩基、二重下線部：繰り返し配列の基本単位、

下線部：繰り返し配列領域

```
HH1          637 ----TGGGCC CCTTGTTTGT TCAGCGCCCA ATACCTACCA ACCCCCGGCA AGAAGTTTTT  692
BK343-3F     529 ----..... ..........  ..........  ..........  ..........  .........  584
Ab4          721 ATGC..... ..........  ..........  ..........  ..........  .........  780

HH1          693 GTGCCCCTTC GCGCGTTCAA CCCGCTCCGC GACATTAGTT GCCACGCTTC TGTCCATCGT  752
BK343-3F     585 ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  .........  644
Ab4          791 ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  .........  840

HH1          753 TCTGAAACAC CCATTGCCTT GGGCGTTCGC ACTTGCATTC CCCGGTTTTG CTCCGCCCCT  812
BK343-3F     645 ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  .........  704
Ab4          841 ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  .........  900

HH1          813 CTAGGGAAGT AATCTAACTT TACTCAACCA ACAACCCTGG GCTCTTTACA CACAGTCTTT  872
BK343-3F     705 ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  .........  764
Ab4          901 ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  .........  960

HH1          873 TAACACCATG GCAGGCCTGT TGTCCGCCAT TCCTCTGGGG GTAATTAATG GCTGCCACTC  932
BK343-3F     765 ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  .........  824
Ab4          961 ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ......... 1020

HH1          933 AAATCGGGTA TCCCCACTCC CCTCTACGGT TTTCTTCGAG GCCGTCGCGA GGCCGAAAAA  992
BK343-3F     825 ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  .........  884
Ab4         1021 ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ......... 1080

HH1          993 TTTTTTTCAC GGGCCCGCGC CCGAGAGAGA GCCTGGCCCC CATCTCCCCC CGCAGCCAGC 1052
BK343-3F     885 ..........  ..........  ..........  ..........  .....................  944
Ab4         1081 ..........  ..........  ..........  ..........  ..................... 1140

HH1         1053 GTGGGGCCCA GCCCACTAGA TTTCCCAACT CGCTGGGTTT CCCAAGCTTT TTTCCATTGG 1112
BK343-3F     945 ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ......... 1004
Ab4         1141 ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ......... 1200

HH1         1113 GCTCCTCCCT TTTGGCTCTG GGTATTTAGC TTCCCTCCCA CCTCTCATTC CACTTTCTCC 1172
BK343-3F    1005 ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ......... 1064
Ab4         1201 ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ......... 1260
                                                  ↓ 1番遺伝子翻訳開始部位（HH1, Ab4)
HH1         1173 ACCTGCACCT TTTCCATCTC CTCTCCAACT CGCCGCCATG AGACCCGAGG GAGTTTCGCG 1232
BK343-3F    1065 ..........  ..........  ..........  .....G.....  ..........  ......... 1124
Ab4         1261 ..........  ..........  ..........  .....G.....  ..........  ......... 1320
                                                  ↓ 1-2番遺伝子翻訳開始部位（BK343-3F）
HH1         1233 GGGCCGCGCC TCCTCTGTCT CCATCTCCAT GTGCCCACCG CCGCCCAATG GGGCGCGCCG 1292
BK343-3F    1125 ..........  ..........  .....AT G.....  ..........  ..........  ..... 1184
Ab4         1321 ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ......... 1380

HH1         1293 CGCATCGCTG GGCTGTGCGC CCCCGCTGAA TAGCCGGCC- ---------- ---------- 1331
BK343-3F    1185 ..........  ..........  ..........  .....C ATCTCCCCCC GCAGCCAGCG 1244
Ab4         1381 ..........  ..........  ..........  .....- ---------- ---------- 1419

HH1              ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
BK343-3F    1245 TGGGGCCCAG CCCACTAGAT TTCCCAACTC GCTGGGTTTC CCAAGCTTTT TTCCATTGGG 1304
Ab4              ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
```

図26. HH1株、BK343株3Fクローンと Ab4株の各ウイルスDNAの *Bam* HI T断片の塩基配列（2）

```
                                                    ↓ 1-2 番遺伝子翻訳終了部位 (BK343-3F)
HH1             ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
BK343-3F   1305 CTCCTCCCTT TTGGCTCTGG GTATTTAGCT TCCCTCCCAC CTCTCATTCC ACTTTCTCCA 1364
Ab4             ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------

HH1             ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
BK343-3F   1365 CCTGCACCTT TTCCATCTCC TCTCCAACTC GCCGCCGTGA GACCCGAGGG AGTTTCGCGG 1424
Ab4             ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
                                                    ↓ 1-2 番遺伝子翻訳開始部位 (BK343-3F)
HH1             ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
BK343-3F   1425 GGCCGCGCCT CCTCTGTCTC CATCTCCATG TGCCCACCGC CGCCCAATGG GGCGCGCCGC 1484
Ab4             ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------

HH1             ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
BK343-3F   1485 GCATCGCTGG GCTGTGCGCC CCCGCTGAAT AGCCGGCCCA TCTCCCCCCG CAGCCAGCGT 1544
Ab4             ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------

HH1             ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
BK343-3F   1545 GGGGCCCAGC CCACTAGATT TCCCAACTCG CTGGGTTTCC CAAGCTTTTT TCCATTGGGC 1604
Ab4             ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
                                                    ↓ 1-2 番遺伝子翻訳終了部位 (BK343-3F)
HH1             ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
BK343-3F   1605 TCCTCCCTTT TGGCTCTGGG TATTTAGCTT CCCTCCCACC TCTCATTCCA CTTTCTCCAC 1664
Ab4             ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------

HH1             ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
BK343-3F   1665 CTGCACCTTT TCCATCTCCT CTCCAACTCG CCGCCGTGAG ACCCGAGGGA GTTTCGCGGG 1724
Ab4             ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
                                                    ↓ 1-1 番遺伝子翻訳開始部位 (BK343-3F)
HH1             ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
BK343-3F   1725 GCCGCGCCTC CTCTGTCTCC ATCTCCATGT GCCCACCGCC GCCCAATGGG GCGCGCCGCG 1784
Ab4             ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------

HH1        1332 ---------- ---------- ---------- -------TGT ATGCTGCGCC CCGTCGAGCG 1354
BK343-3F   1785 CATCGCTGGG CTGTGCGCCC CCGCTGAATA GCCGGCC... .......... .......... 1844
Ab4        1420 ---------- ---------- ---------- -------... .......... .......... 1442

HH1        1355 TCTCTCTGAG CTCATCATCC TCGCGAAGGT CCATGCCTTC GCTAGGCTCG TCCAGAAGCT 1414
BK343-3F   1845 .......... .......... .......... .......... .......... .......... 1904
Ab4        1443 .......... .......... .......... .......... .......... .......... 1502

HH1        1415 CGAGCCTGCC TTCTACCGGC TCCCTGAGAT CCATCACGCG GGACCCGGAG CGGCTTCCGT 1474
BK343-3F   1905 .......... .......... .......... .......... .......... .......... 1964
Ab4        1503 .......... .......... .......... .......... .......... .......... 1562

HH1        1475 CGAGGCCCCC GTCGTACACC GCCATCAACC CAGAGTGTTT ACTGGAACGC GGGGCAGAGC 1534
BK343-3F   1965 .......... .......... .......... .......... .......... .......... 2024
Ab4        1563 .......... .......... .......... .......... .......... .......... 1622

HH1        1535 GGCCGCGGGC GTGGACGGCG AGCGTGATGA CCGCCCCACC GAGTTACTCG GAAGCCCTGT 1594
BK343-3F   2025 .......... .......... .......... .......... .......... .......... 2084
Ab4        1623 .......... .......... .......... .......... .......... .......... 1682
```

図 26. HH1 株、BK343 株 3F クローンと Ab4 株の各ウイルス DNA の *Bam* HI T 断片の塩基配列 (3)

```
HH1         1595 GCCAGGCGCC ACCCGCGTAC GAGCTCGTTC CTGAACTTTC TTATCACCCC ACCCAGGACC 1654
BK343-3F    2085 .......... .......... .......... .......... .......... .......... 2144
Ab4         1683 .......... .......... .......... .......... .......... .......... 1742

HH1         1655 CGCGCGGCGT CTACTCGTCG CGCTCCGATC CCCACCAGAC CTCTCGAAGG AGACAGAACC 1714
BK343-3F    2145 .......... .......... .......... .......... .......... .......... 2204
Ab4         1743 .......... .......... .......... .......... .......... .......... 1802

HH1         1715 CGATATGTAT TTTTATTATT GTTGTTGCAA CCATGTTGTT GATACTGGGA CTGTTGCTCA 1774
BK343-3F    2205 .......... .......... .......... .......... .......... .......... 2264
Ab4         1803 .......... .......... .......... .......... .......... .......... 1862
                                                          ↓1, 1-1番遺伝子翻訳終了部位
HH1         1775 CTATAACGCT CAGTTCGTTA ACAAACGGCA AGAAGGAGAA ATAAAACGAC TGTAGTACCG 1834
BK343-3F    2265 .......... .......... .......... .......... .......... .......... 2324
Ab4         1863 .......... .......... .......... .......... .......... .......... 1922

HH1         1835 CAAAGGTTAA TCGCATTTAT TTTTACATGC ACTCCTTTCC AAACCCCCTG TACACTATTC 1894
BK343-3F    2325 .......... .......... .......... .......... .......... .......... 2384
Ab4         1923 .......... .......... .......... .......... .......... .......... 1982

HH1         1895 CGATCAGCAC CAGAATCTGG AGCATAAGCA GAATGATGTT TATTGCGGCA AACTTCCTGC 1954
BK343-3F    2385 .......... .......... .......... .......... .......... .......... 2444
Ab4         1983 .......... .......... .......... .......... .......... .......... 2042

HH1         1955 AAAAGGTTTT ACTGTAGAGC CGCCTTTTGA TGGGTCCCAT ACGACCGCTC GGGTCCTTGT 2014
BK343-3F    2445 .......... .......... .......... .......... .......... .......... 2504
Ab4         2043 .......... .......... .......... .......... .......... .......... 2102

HH1         2015 GTTGATCGCA GAAACCGTCG AGGTAAACTT CCGATGGTAG TGCGGCCGCC CCGCGGTGAT 2074
BK343-3F    2505 .......... .......... .......... .......... .......... .......... 2564
Ab4         2103 .......... .......... .......... .......... .......... .......... 2162

HH1         2075 TTCTAGTAAC GTCATCCAGA TGTAGCACAG CTGGACTTTC AGCGTATGCA TCGGTACAGC 2134
BK343-3F    2565 .......... .......... .......... .......... .......... .......... 2624
Ab4         2163 .......... .......... .......... .......... .......... .......... 2222

HH1         2135 GGCCAGTGGG GTCATCTTGT GTAGTAGTGG GTGAGTCGGT AAGCACATTG CTTGAGGTGG 2194
BK343-3F    2625 .......... .......... .......... .......... .......... .......... 2684
Ab4         2223 .......... .......... .......... .......... .......... .......... 2282

HH1         2195 CGGAACTTAT GCGGGTGTAC TCCTCGTTCT CGGAGTCGCT CTCATACCCG TAGGGGCTGA 2254
BK343-3F    2685 .......... .......... .......... .......... .......... .......... 2744
Ab4         2283 .......... .......... .......... .......... .......... .......... 2342
                                                          Asp
                                                          ←
HH1         2255 CGCGGGCCGG ACCCTGCCAG GCCGACGGGG GGAATGCGAC TCTGTCGTAC CACACGGTGG 2314
BK343-3F    2745 .......... .......... .......... .......... ....T..... .......... 2804
Ab4         2343 .......... .......... .......... .......... ....C..... .......... 2402
                                                          ←
                                                          Gly
HH1         2315 AGGGGCGCGT CTGGCGCTTC TTTTTAAACA GCTGTGACAT TTTCTTGAAA AACAACTGGG 2374
BK343-3F    2805 .......... .......... .......... .......... .......... .......... 2864
Ab4         2403 .......... .......... .......... .......... .......... .......... 2462
```

図26. HH1株、BK343株3Fクローンと Ab4株の各ウイルスDNAの *Bam* HI T断片の塩基配列（4）

```
HH1          2375  AGAGCAGCTG TCTTCTCAGA GACTCTCGTC TGGGACGTGG TTCAACGTTG ATTGTGGTAG  2434
BK343-3F     2865  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  2924
Ab4          2463  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  2522

HH1          2435  GGTTTGAGAC GTGTATGCGC CTCCTCCACG CTGGATC     2471
BK343-3F     2925  .......... .......... .......... .......     2961
Ab4          2523  .......... .......... .......... .......     2559
```

図 26. HH1 株、BK343 株 3F クローンと Ab4 株の各ウイルス DNA の *Bam* HI T 断片の塩基配列 (5)

表7. EHV-1のウイルスDNAの *Bam* HI T断片中の繰り返し配列

塩基配列	塩基数	コピー数（位置）		
		HH1	BK343-3F	Ab4
AGGCCACGCCCACTGGG	17	11	11	13
		(105-291)	(105-291)	(105-325)
TGGGGCTCACTGCTATGC	18	16	10	19
		(349-636)	(349-528)	(383-724)
CATCTCCCCC～ATAGCCGGCC	299	1	3	1
		(1,033-1,331)	(925-1,821)	(1,121-1,419)

```
HH1 1番遺伝子              1 MRPEGVSRGR ASSVSISMCP PPPNGARRAS LGCAPPLNSR PVCCAPSSVS LSSSSSRRSM  60
BK343-3F 1-1番遺伝子       1 ---------- -------... ......... ......... ......... .........  43
BK343-3F 1-2番遺伝子       1 ---------- -------... ......... ......... .ISPRSQRGA QPTRFPNSLG  43

HH1 1番遺伝子             61 PSLGSSRSSS LPSTGSLRSI TRDPERLPSR PPSYTAINPE CLLERGAERP RAWTASVMTA 120
BK343-3F 1-1番遺伝子       44 ......... ......... ......... ......... ......... ......... 103
BK343-3F 1-2番遺伝子       44 FPSFFPLGSS .LAL.I     59

HH1 1番遺伝子             121 PPSYSEALCQ APPAYELVPE LSYHPTQDPR GVYSSRSDPH QTSRRRQNPI CIFIIVVATM 180
BK343-3F 1-1番遺伝子       104 ......... ......... ......... ......... ......... ......... 163

HH1 1番遺伝子             181 LLILGLLLTI TLSSLTNGKK EK      202
BK343-3F 1-1番遺伝子       164 ......... ......... ..      185
```

図27.　EHV-1の１番遺伝子からコードされるタンパクのアミノ酸配列

－：配列をシフト、．：同一のアミノ酸

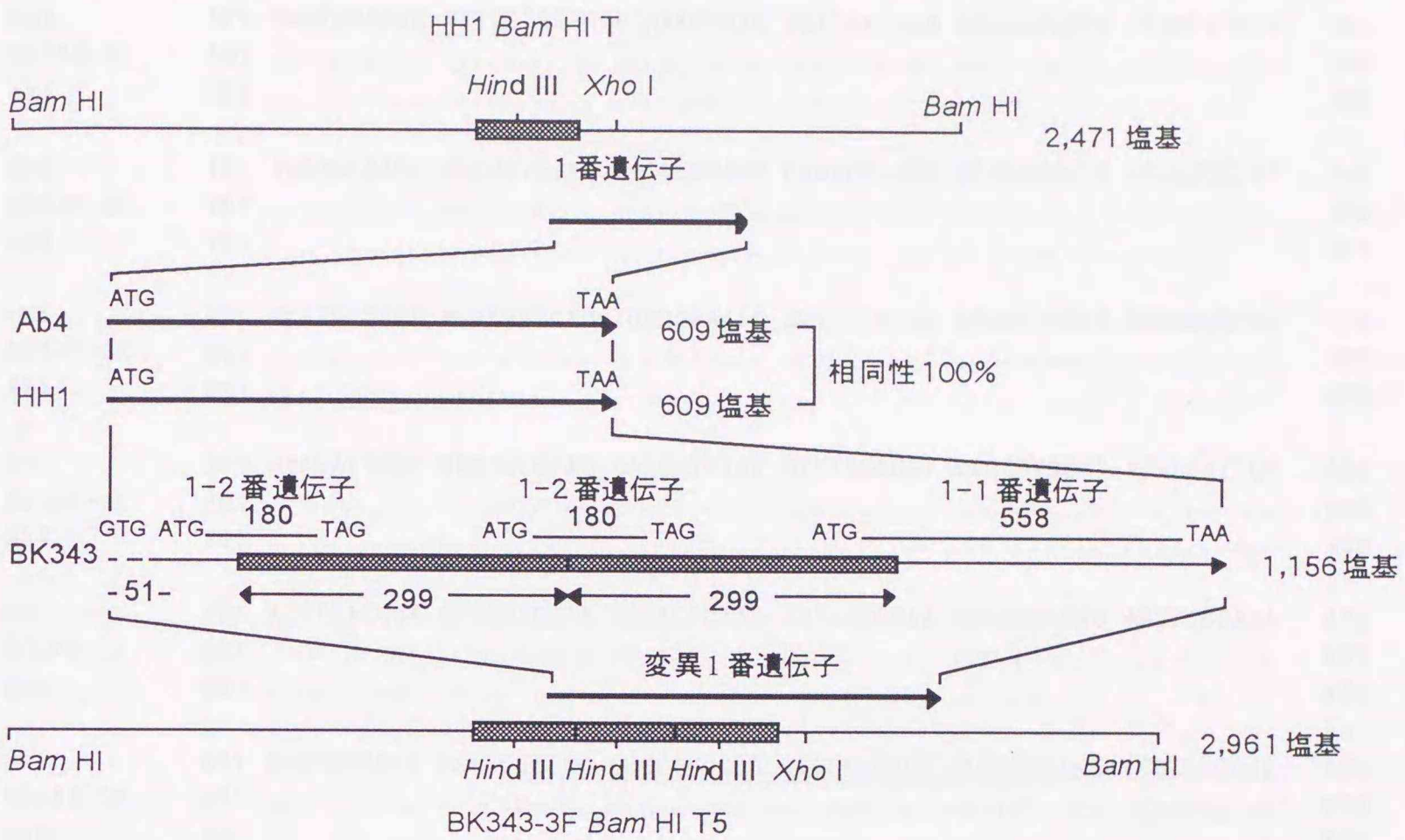


図28.　HH1株とBK343株3Fクローンの１番遺伝子の構造

```
HH1              1 GGTACCAGTT CCACCCACCG ATAAGCCGTC AACCACCACT CCCGCGGCAC TCAAACAATC    60
BK343-3F         1 .......... .......... .......... .......... .......... ..........    60
Ab4              1 .......... .......... .......... .......... .......... ..........    60

HH1             61 AGATGCAAGT AAACCTCCTA CTGCTGCAAT TCAACATCAG CAAAAATTAG GTACACCTGT   120
BK343-3F        61 .......... .......... .......... .......... .......... ..........   120
Ab4             61 .......... .......... .......... .......... .......... ..........   120

HH1            121 CACTCCAAAA GATTCTGGAG ATAAACCAAC CGATAACGCA AGCGCGCCTG TTGGTGTATC   180
BK343-3F       121 .......... .......... .......... .......... .......... ..........   180
Ab4            121 .......... .......... .......... .......... .......... ..........   180

HH1            181 TCCAGTAACT CCCGATGGAA CACCCGGAGC CAAACCACCC CCAAAAGACG CACCCCCTGT   240
BK343-3F       181 .......... .......... .......... .......... .......... ..........   240
Ab4            181 .......... .......... .......... .......... .......... ..........   240

HH1            241 GGATGACACT AAACAACCTG TGAGGAAATC GCTTCCATCA CAGGTGCGCG GCGGGCGTCC   300
BK343-3F       241 .......... .......... .......... .......... .......... ..........   300
Ab4            241 .......... .......... .......... .......... .......... ..........   300

HH1            301 GTACATACGC CCGTCTCTAG GACCATTTAA GTTTACGGGT CCGCCTGGTT ATACGATTCC   360
BK343-3F       301 .......... .......... .......... .......... .......... ..........   360
Ab4            301 .......... .......... .......... .......... .......... ..........   360

HH1            361 AGTTCATGGA CTTCCACCTA GTGACTCAAA CGTGACCCAA TCAACCAAGG AGCCCCCAAA   420
BK343-3F       361 .......... .......... .......... .......... .......... ..........   420
Ab4            361 .......... .......... .......... .......... .......... ..........   420

HH1            421 GCCTGCCGTA GAGACCCCCG CCGCGGCCCC GGCCAAATCT GCGGCGGCCC CCGCCGCGGC   480
BK343-3F       421 .......... ....______ __________ __________ __________ __________   480
Ab4            421 .......... ....______ __________ __________ __________ __________   480

HH1            481 CCCGGCCAAA TCTGCGGCGG CCCCCGCCGC GGCCCCGGCC AAATCTGCGG CGGCCCCCGC   540
BK343-3F       481 __________ __________ __________ __________ __________ __________   540
Ab4            481 __________ __________ __________ __________ __________ __________   540

HH1            541 CGCGGCCCCG GCCAAATCTG CGGCGGCCCC CGCCGCGGCC CCGGCCAAAT CTGCGGCGGC   600
BK343-3F       541 __________ __________ ______---- ---------- ---------- ----------   566
Ab4            541 __________ __________ __________ __________ __________ _________-   599

HH1            601 CCCCGCCGCG GCCCCGGCCA AATCTGCGGC GGCCCCCGCC GCGGCCCCGG CCAAATCTGC   660
BK343-3F           ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
Ab4                ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------

HH1            661 GGCGGCCCCC GCCGCGGCCC CGGCCAAATC TGCGGCGGCC CCCGCCGCGG CCCCGGCCAA   720
BK343-3F           ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
Ab4                ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
```

図29. EHV-1の24番遺伝子の*Kpn* Iサブフラグメントの塩基配列（1）

-：配列をシフト、.：同一の塩基、二重下線部：繰り返し配列の基本単位、

下線部：繰り返し配列領域

```
HH1          721 ATCTGCGGCG GCCCCCGCCG CGGCCCCGGC CAAATCTGCG GCGGCCCCCG CCGCGGCCCC  780
BK343-3F        ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
Ab4             ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------

HH1          781 GGCCAAATCT GCGGCGGCCC CCGCCGCGGC CCCGGCCAAA GACCAAACAA AATCAGCTGC  840
BK343-3F     567 ---------- -------... .......... .......... .......... ..........  609
Ab4          600 ---------- -------... .......... .......... .......... ..........  642

HH1          841 TGAAGTCCCA AAGCCGGCCA AGGACCAGGC CAAGGACCAG GCCAAGGACC AGGCCAAGGA  900
BK343-3F     610 .......... .....ggcca aggaccaggc caaggaccag gccaaggacc aggccaagga  669
Ab4          643 .......... .....ggcca aggaccaggc caaggaccag gccaaggacc aggccaagga  702

HH1          901 CCAGGCCAAG GACCAGGCCA AGGACCAGGC CAAGGACCAG GCCAAGGACC AGGCCAAGGA  960
BK343-3F     670 ggccaagg accaggccaa ggaccaggcc aaggaccagg ccaaggacca ggccaaggac  729
Ab4          703 ggccaagg accaggccaa ggaccaggcc aaggaccagg ccaaggacca ggccaaggac  729

HH1          961 CCA------- -----GGCCA AGTCAACAAC AGGCCAAAAG CTGGCTAAGG ACCCTAAATC 1008
BK343-3F     730 ...GGCCAAG GACCA..... .......... .......... .......... ..........  789
Ab4          730 ---------- -----..... .......... .......... .......... ..........  774

HH1         1009 TGATGGGCTC ACAGACGATG TTGCTTTAGA GATTGTGCCC GAAAAAACCC CTCTGCCGGA 1068
BK343-3F     790 .......... .......... .......... .......... .......... ..........  849
Ab4          775 .......... .......... .......... .......... .......... ..........  834

HH1         1069 TGACTCGCCC ATTGGGGCGG TTCCCGAAAA CACTCCCCTA CCAGATGACT CTCCCATTGG 1128
BK343-3F     850 .......... .......... .......... .......... .......... ..........  909
Ab4          835 .......... .......... .......... .......... .......... ..........  894

HH1         1129 AAGTCCAGAT TTGTCAGCAT CTAAAAACTC GCATACCACT GACGCAGTCA GCAGTGACCG 1188
BK343-3F     910 .......... .......... .......... .......... .......... ..........  969
Ab4          895 .......... .......... .......... .......... .......... ..........  954

HH1         1189 TTTTTCTGTT GCCTGCAAAG TACCGCTCCC AGATTCGCCG GAAGATGACT TCTACTCGTA 1248
BK343-3F     970 .......... .......... .......... .......... .......... .......... 1029
Ab4          955 .......... .......... .......... .......... .......... .......... 1014

HH1         1249 TGCCGTTGAC GTCCCATTGC CCGATTCTCC CACCGACGAC CCCTCAAGCG GCCGTTCTGA 1308
BK343-3F    1030 .......... .......... .......... .......... .......... .......... 1089
Ab4         1015 .......... .......... .......... .......... .......... .......... 1074

HH1         1309 TGCACGAGCA CCAACCGTCG GAGGTGTTGC CAGCATTCAT CGTAAGAGCG ACTCCAGAAA 1368
BK343-3F    1090 .......... .......... .......... .......... .......... .......... 1149
Ab4         1075 .......... .......... .......... .......... .......... .......... 1134

HH1         1369 CAACCGACAA TCAGACGCAT GGAGACGTGC CTTTGCTGAC ACGCTACATG GGCGTCCAAG 1428
BK343-3F    1150 .......... .......... .......... .......... .......... .......... 1209
Ab4         1135 .......... .......... .......... .......... .......... .......... 1194
```

図 29.　EHV-1 の 24 番遺伝子の *Kpn* I サブフラグメントの塩基配列（2）

```
HH1          1429  AAATAGAAGC GCTACTAAAC CATGTAAATC AGCACCGTAT AAAGTTCCTC ACGCCATTTC  1488
BK343-3F     1210  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  1269
Ab4          1195  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  1254

HH1          1489  CTATACGAAA ATACCTTCGG TACC       1512
BK343-3F     1270  .......... .......... ....       1293
Ab4          1255  .......... .......... ....       1278
```

図 29.　EHV-1 の 24 番遺伝子の *Kpn* I サブフラグメントの塩基配列（3）

表 8.　EHV-1 の 24 番遺伝子の *Kpn* I 断片中の繰り返し配列

塩基配列	塩基数	コピー数（位置）		
		HH1	BK343-3F	Ab4
CCCCCGCCGCGGCCCCGGCC-AAATCTGCGGCGG	33	11 (435-797)	4 (435-566)	5 (435-599)
GGCCAAGGACCA	12	9 (856-963)	10 (625-744)	6 (658-729)

```
HH1          1   VPVPPTDKPS TTTPAALKQS DASKPPTAAI QHQQKLGTPV TPKDSGDKPT DNASAPVGVS   60
BK343-3F     1   .......... .......... .......... .......... .......... ..........   60
Ab4          1   .......... .......... .......... .......... .......... ..........   60

HH1         61   PVTPDGTPGA KPPPKDAPPV DDTKQPVRKS LPSQVRGGRP YIRPSLGPFK FTGPPGYTIP  120
BK343-3F    61   .......... .......... .......... .......... .......... ..........  120
Ab4         61   .......... .......... .......... .......... .......... ..........  120

HH1        121   VHGLPPSDSN VTQSTKEPPK PAVETPAAAP AKSAAAPAAA PAKSAAAPAA APAKSAAAPA  180
BK343-3F   121   .......... .......... .....<u>.... .......... .......... ..........</u>  180
Ab4        121   .......... .......... .....<u>.... .......... .......... ..........</u>  180

HH1        181   AAPAKSAAAP AAAPAKSAAA PAAAPAKSAA APAAAPAKSA AAPAAAPAKS AAAPAAAPAK  240
BK343-3F   181   <u>.........</u>- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  189
Ab4        181   <u>.......... ..........</u> ---------- ---------- ---------- ----------  200

HH1        241   SAAAPAAAPA KSAAAPAAAP AKSAAAPAAA PAKDQTKSAA EVPKPAKDQA KDQAKDQAKD  300
BK343-3F   190   ---------- ---------- ------.... .......... .....<u>..... ..........</u>  223
Ab4        201   ---------- ---------- ------.... .......... .....<u>..... ..........</u>  234

HH1        301   QAKDQAKDQA KDQAKDQAKD QAK----STT GQKLAKDPKS DGLTDDVALE IVPEKTPLPD  356
BK343-3F   224   <u>.......... .......... ...DQAK</u>... .......... .......... ..........  283
Ab4        235   <u>.......... .</u>--------- ------... .......... .......... ..........  278

HH1        357   DSPIGAVPEN TPLPDDSPIG SPDLSASKNS HTTDAVSSDR FSVACKVPLP DSPEDDFYSY  416
BK343-3F   284   .......... .......... .......... .......... .......... ..........  343
Ab4        279   .......... .......... .......... .......... .......... ..........  338

HH1        417   AVDVPLPDSP TDDPSSGRSD ARAPTVGGVA SIHRKSDSRN NRQSDAWRRA FADTLHGRPR  476
BK343-3F   344   .......... .......... .......... .......... .......... ..........  403
Ab4        339   .......... .......... .......... .......... .......... ..........  398

HH1        477   NRSATKPCKS APYKVPHAIS YTKIPSV    503
BK343-3F   404   .......... .......... .......    430
Ab4        399   .......... .......... .......    425
```

図 30.　EHV-1 の 24 番遺伝子の *Kpn* I サブフラグメントがコードするアミノ酸配列

－：配列をシフト、.：同一のアミノ酸、二重下線部：繰り返し配列の基本単位、下線部：繰り返し配列領域

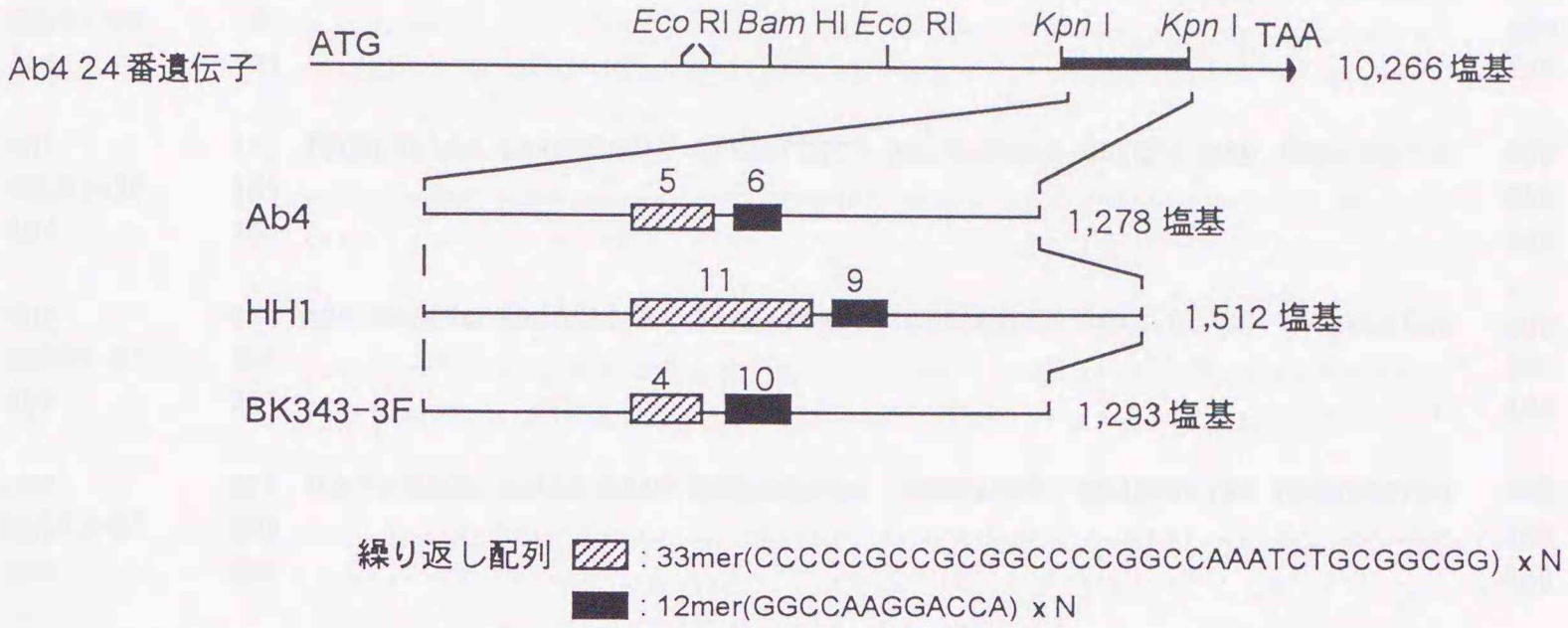


図31. HH1株とBK343株3Fクローンの24番遺伝子の*Kpn* Iサブフラグメントの遺伝子構造

```
HH1           1 AAAAATACTA AATCGCGGCA ATTCCGGAAA TAGCCCCATA CAAAAGGGAG GGTTGTTGGT    60
BK343-3F      1 .......... .......... .......... .......... .......... ..........    60
Ab4           1 .......... .......... .......... .......... .......... ..........    60
                                                  71 番遺伝子翻訳開始部位 ↓
HH1          61 GTTTAGAAAA TAGTTTCCCC GTTGATGAGT TTCGCGTAGA GGTCTAACTC ATCCGCGATG   120
BK343-3F     61 .......... .......... .......... .......... .......... ..........   120
Ab4          61 .......... .......... .......... .......... .......... ..........   120

HH1         121 GGGTTCATCT ATGCGCGCAA ACTGTTGCTG TGCATGGCTG TTAGTATATA CGCCATAGGG   180
BK343-3F    121 .......... .......... .......... .......... .......... ..........   180
Ab4         121 .......... .......... .......... .......... .......... ..........   180

HH1         181 TCCACTACAA CAACTGAGAC TACCACCTCT AGCTCGTCCA CGTCTGGGAG TGGCCAGTCT   240
BK343-3F    181 .......... .......... .......... .......... .......... ..........   240
Ab4         181 .......... .......... .......... .......... .......... ..........   240

HH1         241 ACATCCAGTG GGACCACTAA TAGTAGCAGT TCTCCCACCA CGAGTCCACC TACCACATCT   300
BK343-3F    241 .......... .......... .......... .......... .......... ..........   300
Ab4         241 .......... .......... .......... .......... .......... ..........   300

HH1         301 TCATCTCCCC CCACATCAAC CCACACATCC TCCCCATCTT CAACCTCTAC CCAATCGTCG   360
BK343-3F    301 .......... .......... .......... .......... .......... ..........   360
Ab4         301 .......... .......... .......... .......... .......... ..........   360

HH1         361 TCAACGGCGG CGACAAGCTC GTCTGCACCC TCTACAGCGT CCAGCACAAC CTCTATTCCA   420
BK343-3F    361 .......... .......... .......... .......... .......... ..........   420
Ab4         361 .......... .......... .......... .......... .......... ..........   420

HH1         421 ACATCCACAT CAACAGAAAC CACCACAACA ACCCCAACCG CATCTACAAC GACCCCAACA   480
BK343-3F    421 .......... .......... .......... .......... .......... ..........   480
Ab4         421 .......... .......... .......... .......... .......... ..........   480

HH1         481 ACAACGACCG CGGCTCCCAC AACGGCCGCT ACAACCACAG CTGTTACTAC AGCCGCGTCT   540
BK343-3F    481 .......... .......... .......... .......... .......... .........   540
Ab4         481 .......... .......... .......... .......... .......... .........   540

HH1         541 ACAGCCGCGT CTACATCAGC GGAAACCACC ACAGCTACTG CGACTGCTAC CTCAACCCCA   600
BK343-3F    541 ...------- -----..... .......... .......... .......... ..........   588
Ab4         541 ...------- -----..... .......... .......... .......... ..........   588

HH1         601 ACCACAACTA CGCCTACGTC CACAACAACT ACTACAGCTA CCACCACTGT TCCAACAACC   660
BK343-3F    589 .......... .......... .......... .......... .......... ..........   648
Ab4         589 .......... .......... .......... .......... .......... ..........   648

HH1         661 GCTTCTACAA CAACTGATAC GACCACAGCA GCAACGACCA CAGCAGCAAC GACCACAGCA   720
BK343-3F    649 .......... ........... .......... .......... .......... ..........   708
Ab4         649 .......... ........... .......... .......... .......... ..........   708
```

図 32.　EHV-1 の 71 番遺伝子の完全長を含む *Dra* I サブフラグメントの塩基配列（1）

－：配列をシフト、.：同一の塩基、二重下線部：繰り返し配列の基本単位、

下線部：繰り返し配列領域

```
HH1          721 GCAACGACCA CAGCAGCAAC GACCACAGCA GCAACGACCA CAGCAGCAAC GACCACAGCA  780
BK343-3F     709 .......... .......... .......... .......... .......... ..........  768
Ab4          709 .......... .......... .......... .......... .......... ..........  768

HH1          781 GCAACGACCA CAGCAGCAAC GACCACAGCA GCAACGACCA CAGCAGCA-- ----------  828
BK343-3F     769 .......... .......... .......... .......... .......AC GACCACAGCA  828
Ab4          769 ...------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  771

HH1          829 ---------- ---------- ---------- ---ACGACCA CCGCGGCTAC TACTTCCTCT  855
BK343-3F     829 GCAACGACCA CAGCAGCAAC GACCACAGCA GCA.......  ..........  ..........  888
Ab4          772 ---------- ---------- ---------- ---.......  ..........  ..........  798

HH1          856 GCAACCACCG CGGCTACCAC CACCGCGGCT ACCACCACCG CGGCTACCAC CACCGCGGCT  915
BK343-3F     889 .......   ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  948
Ab4          799 .......   ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  858

HH1          916 ACCACCACCG CGGCTACCAC CACCGCGGCT ACCACCACCG CGGCTACCAC CACCGCGGCT  975
BK343-3F     949 .......... .......... .......... .......... .......... .......... 1008
Ab4          859 .......... .......... .......... ...------- ---------- ----------  891

HH1          976 ACCACCACCG CGGCTACCAC CACCGCGGCT ACCACCACCG CGGCTACCAC CACCGCGGCT 1035
BK343-3F    1009 .......... .......... .......... .......... .......... .......... 1068
Ab4              ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------

HH1         1036 ACCACCACCG CGGCTACCAC CACCGCGGCT ACCACCACCG CGGCTACCAC CACCGCGGCT 1095
BK343-3F    1069 .......... .......... .......... ...------- ---------- ---------- 1101
Ab4              ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------

HH1         1096 ACCACAACGG GGTCTCCAAC CTCTGGTTCA ACATCTACTA CAGGGGCTTC CACGTCCACC 1155
BK343-3F    1102 ---.......  ..........  ..........  ..........  ..........  .......... 1158
Ab4          892 ---.......  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  948

HH1         1156 CCCTCAGCTT CCACTGCCAC ATCTGCCACT CCCACATCGA CGTCAACATC AGCTGCGGCT 1215
BK343-3F    1159 .......... .......... .......... .......... .......... .......... 1218
Ab4          949 .......... .......... .......... .......... .......... .......... 1008

HH1         1216 ACTACATCTA CCCCTACCCC AACTTCAGCT GCAACATCAG CAGAGTCTAC CACAGAGGCT 1275
BK343-3F    1219 .......... .......... .......... .......... .......... .......... 1278
Ab4         1009 .......... .......... .......... .......... .......... .......... 1068

HH1         1276 CCAACATCCA CACCCACTAC TGATACGACC ACCCCTTCGG AGGCAACCAC AGCTACTACA 1335
BK343-3F    1279 .......... .......... .......... .......... .......... .......... 1338
Ab4         1069 .......... .......... .......... .......... .......... .......... 1128

HH1         1336 TCACCGGAGT CTACCACAGT TTCAGCCTCG ACTACCTCTG CTACGACCAC GGCATTCACA 1395
BK343-3F    1339 .......... .......... .......... .......... .......... .......... 1398
Ab4         1129 .......... .......... .......... .......... .......... .......... 1188
```

図 32.　EHV-1 の 71 番遺伝子の完全長を含む *Dra* I サブフラグメントの塩基配列（2）

```
HH1          1396 ACCGAGTCCC ACACATCGCC GGATTCGTCT ACTGGGTCTA CATCCACAGC CGAACCCAGC 1455
BK343-3F     1399 .......... .......... .......... .......... .......... .......... 1458
Ab4          1189 .......... .......... .......... .......... .......... .......... 1248

HH1          1456 TCAACGTTTA CTTTAACACC TTCTACTGCG ACCCCCTCCA CGGATCAGTT CACAGGGTCA 1515
BK343-3F     1459 .......... .......... .......... .......... .......... .......... 1518
Ab4          1249 .......... .......... .......... .......... .......... .......... 1308

HH1          1516 TCTGCCTCAA CAGAGTCTGA CTCGACCGAC TCTTCCACCG TGCCCACGAC TGGGACTGAA 1575
BK343-3F     1519 .......... .......... .......... .......... .......... .......... 1578
Ab4          1309 .......... .......... .......... .......... .......... .......... 1368

HH1          1576 TCTATAACAG AAAGCTCATC GACCACCGAG GCGTCAACTA ACTTGGGATC GTCAACCTAC 1635
BK343-3F     1579 .......... .......... .......... .......... .......... .......... 1638
Ab4          1369 .......... .......... .......... .......... .......... .......... 1428

HH1          1636 GAGAGTACCG AAGCCTTGGA AACTCCAGAC GGGAATACAA CTTCCGGAAA TACCACCCCA 1695
BK343-3F     1639 .......... .......... .......... .......... .......... .......... 1698
Ab4          1429 .......... .......... .......... .......... .......... .......... 1488

HH1          1696 TCACCTTCCC CGCGTACCCC AAGCTTTGCT GATACCCAAC AGACCCCAGA CAATGGTGTA 1755
BK343-3F     1699 .......... .......... .......... .......... .......... .......... 1758
Ab4          1489 .......... .......... .......... .......... .......... .......... 1548

HH1          1756 TCAACCCAAC ATACCACCAT CAATGACCAC ACCACCGCCA ACGCTCAAAA ACACGCAGGG 1815
BK343-3F     1759 .......... .......... .......... .......... .......... .......... 1818
Ab4          1549 .......... .......... .......... .......... .......... .......... 1608
                  ↓                                        ↓
HH1          1816 CACCACAGAG GTCGCGCAGG GGGTCGTCGG GGTAGCCCTC AGGGGGGGTC ACACACAACA 1875
BK343-3F     1819 T......... .......... .......... ....T..... .......... .......... 1878
Ab4          1609 .......... .......... .......... .......... .......... .......... 1668

HH1          1876 CCACACCCAG ACCGTTTGAC TCCTTCTCCA GACGACACCT ATGACGATGA TACAAATCAC 1935
BK343-3F     1879 .......... .......... .......... .......... .......... .......... 1938
Ab4          1669 .......... .......... .......... .......... .......... .......... 1728

HH1          1936 CCTAACGGTA GGAACAATTC AATAGAGATC GTGCCTCAGC TCCCGCCAGA CCGACCCATC 1995
BK343-3F     1939 .......... .......... .......... .......... .......... .......... 1998
Ab4          1729 .......... .......... .......... .......... .......... .......... 1788

HH1          1996 ATAGAGCTGG GGGTGGCGAC TCTCAGAAAA AACTTTATGG AGGCGTCCTG TACTGTGGAG 2055
BK343-3F     1999 .......... .......... .......... .......... .......... .......... 2058
Ab4          1789 .......... .......... .......... .......... .......... .......... 1848

HH1          2056 ACTAACTCAG GCTTGGCGAT TTTTTGGAAA ATCGGCAACG CAAGCGTAGA CGCGTTTAAT 2115
BK343-3F     2059 .......... .......... .......... .......... .......... .......... 2118
Ab4          1849 .......... .......... .......... .......... .......... .......... 1908
```

図 32.　EHV-1 の 71 番遺伝子の完全長を含む *Dra* I サブフラグメントの塩基配列（3）

```
HH1         2116 CGGGGAACTA CTCACACTCG GCTGATGCGC AATGGGGTAC CGGTTTACGC CCTCGTATCT  2175
BK343-3F    2119 .......... .......... .......... .......... .......... ..........  2178
Ab4         1909 .......... .......... .......... .......... .......... ..........  1968

HH1         2176 ACGCTTAGAG TTCCGTGGTT AAATGTTATT CCACTAACAA AAATTACTTG CGCTGCTTGC  2235
BK343-3F    2179 .......... .......... .......... .......... .......... ..........  2238
Ab4         1969 .......... .......... .......... .......... .......... ..........  2028

HH1         2236 CCCACGAATC TAGTCGCCGG CGATGGGGTG GACCTCAACT CATGTACCAC CAAATCAACC  2295
BK343-3F    2239 .......... .......... .......... .......... .......... ..........  2298
Ab4         2029 .......... .......... .......... .......... .......... ..........  2088

HH1         2296 ACAATACCGT GTCCGGGCCA ACAGCGCACC CATATTTTTT TCTCTGCGAA AGGGGACAGG  2355
BK343-3F    2299 .......... .......... .......... .......... .......... ..........  2358
Ab4         2089 .......... .......... .......... .......... .......... ..........  2148

HH1         2366 GCTGTGTGTA TCACATCAGA ACTGGTGTCC CAGCCCACAA TAACTTGGTC AGTTGGATCA  2415
BK343-3F    2359 .......... .......... .......... .......... .......... ..........  2418
Ab4         2149 .......... .......... .......... .......... .......... ..........  2208

HH1         2416 GATAGGTTGC GTAACGATGG ATTTTCTCAG ACGTGGTATG GAATACAGCC CGGGGTGTGT  2475
BK343-3F    2419 .......... .......... .......... .......... .......... ..........  2478
Ab4         2209 .......... .......... .......... .......... .......... ..........  2268

HH1         2476 GGTATACTGC GCAGCGAGGT TCGCATTCAC CGCACCACCT GGCGCTTTGG ATCAACATCA  2535
BK343-3F    2479 .......... .......... .......... .......... .......... ..........  2538
Ab4         2269 .......... .......... .......... .......... .......... ..........  2328

HH1         2536 AAGGACTATC TCTGTGAGGT CAGCGCATCG GACTCAAAGA CGAGCGATTA CAAAGTGCTA  2595
BK343-3F    2539 .......... .......... .......... .......... .......... ..........  2598
Ab4         2329 .......... .......... .......... .......... .......... ..........  2388

HH1         2596 CCCAACGCCC ACTCAACTTC CAACTTCGCT TTAGTGGCTG CGACCACGCT AACAGTGACA  2655
BK343-3F    2599 .......... .......... .......... .......... .......... ..........  2658
Ab4         2389 .......... .......... .......... .......... .......... ..........  2448

HH1         2656 ATTTTATGCC TGCTGTGCTG CTTGTACTGT ATGTTAACCC GCCCCCGAGC GTCTGTATAT  2715
BK343-3F    2659 .......... .......... .......... .......... .......... ..........  2718
Ab4         2449 .......... .......... .......... .......... .......... ..........  2508
                       ↓ 71 番遺伝子翻訳終了部位
HH1         2716 TAACTCAAAA ATTATCCCTT GGCCTTTACA ACCAGTGGTG GCGTGTATGC AGAAGCGTGC  2775
BK343-3F    2719 ..........  .......... .......... .......... .......... ..........  2778
Ab4         2509 ..........  .......... .......... .......... .......... ..........  2568

HH1         2776 CACCGCCCTG GTACGTGTTT TTCAATAAAC GAAGCATGTC TACCTTCAAG CTTATGATGG  2835
BK343-3F    2779 .......... .......... .......... .......... .......... ..........  2838
Ab4         2569 .......... .......... .......... .......... .......... ..........  2628
```

図 32.　EHV-1 の 71 番遺伝子の完全長を含む *Dra* I サブフラグメントの塩基配列（4）

```
HH1          2836 ATGGACGTTT GGTTTTTGCC ATGGCAATCG CGATCTTGAG CGTTGTGCTC TCTTGTGGAA 2895
BK343-3F     2839 .......... .......... .......... .......... .......... .......... 2898
Ab4          2629 .......... .......... .......... .......... .......... .......... 2688

HH1          2896 CATGCGAGAA AGCCAAGCGT GCGGTTCGAG GACGCCAGGA TAGGCCAAAG GAGTTTCCAC 2955
BK343-3F     2899 .......... .......... .......... .......... .......... .......... 2958
Ab4          2689 .......... .......... .......... .......... .......... .......... 2748

HH1          2956 CACCCCGCTA TAACTATACA ATTTTAACAA GATACAACGC GACTGCGCTA GCATCACCGT 3015
BK343-3F     2959 .......... .......... .......... .......... .......... .......... 3018
Ab4          2749 .......... .......... .......... .......... .......... .......... 2808

HH1          3016 TTATTAACGA CCAAGTAAAA AATGTTGACT TGCGGATTGT TACTGCTACG CGCCCATGTG 3075
BK343-3F     3019 .......... .......... .......... .......... .......... .......... 3078
Ab4          2809 .......... .......... .......... .......... .......... .......... 2868

HH1          3076 AAATGATAGC GCTGATCGCT AAGACAAACA TAGACTCAAT CCTGAAGGAG CTGGCCGCTG 3135
BK343-3F     3079 .......... .......... .......... .......... .......... .......... 3138
Ab4          2869 .......... .......... .......... .......... .......... .......... 2928

HH1          3136 CCCAAAAAAC TTATTCCGCC AGACTCACCT GGTTT      3170
BK343-3F     3139 .......... .......... .......... .....      3173
Ab4          2929 .......... .......... .......... .....      2963
```

図 32.　EHV-1 の 71 番遺伝子の完全長を含む *Dra* I サブフラグメントの塩基配列（5）

表9.　EHV-1の71番遺伝子中の繰り返し配列

塩基配列	塩基数	コピー数（位置）		
		HH1	BK343-3F	Ab4
GCCGCGTCTACA	12	2	1	1
		(532-555)	(532-543)	(532-543)
ACGACCACAGCAGCA	15	10	13	7
		(679-828)	(667-861)	(667-771)
ACCACCGCGGCTACC	15	16	14	6
		(859-1,098)	(892-1,101)	(802-891)

```
HH1          1  MGFIYARKLL LCMAVSIYAI GSTTTTETTT SSSSTSGSGQ STSSGTTNSS SSPTTSPPTT   60
BK343-3F     1  .......... .......... .......... .......... .......... ..........   60
Ab4          1  .......... .......... .......... .......... .......... ..........   60

HH1         61  SSSPPTSTHT SSPSSTSTQS SSTAATSSSA PSTASSTTSI PTSTSTETTT TTPTASTTTP  120
BK343-3F    61  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  120
Ab4         61  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  120

HH1        121  TTTTAAPTTA ATTTAVTTAA STAASTSAET TTATATATST PTTTTPTSTT TTTATTTVPT  180
BK343-3F   121  .......... .........._____---- .... .......... .......... ..........  176
Ab4        121  .......... .........._____---- .... .......... .......... ..........  176

HH1        181  TASTTTDTTT AATTTAATTT AATTTAATTT AATTTAATTT AATTTAATTT AATTTAATTT  240
BK343-3F   177  .........._____.... .......... .......... .......... ..........  236
Ab4        177  .........._____.... .......... .......... .......... .- ----------  225

HH1        241  AATT------ ---------S SATTAATTTA ATTTAATTTA ATTTAATTTA ATTTAATTTA  285
BK343-3F   237  .... TAATTT AATTTAATT. ....._____ .......... .......... ..........  296
Ab4        226  ---------- ---------. ...._____ .......... .......... ....------  260

HH1        286  ATTTAATTTA ATTTAATTTA ATTTAATTTA ATTTAATTTA ATTTGSPTSG STSTTGASTS  345
BK343-3F   297  _____.... .......... .......... ....------ ----...... ..........  346
Ab4        261  ---------- ---------- ---------- ---------- ----...... ..........  276

HH1        346  TPSASTATSA TPTSTSTSAA ATTSTPTPTS AATSAESTTE APTSTPTTDT TTPSEATTAT  405
BK343-3F   347  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  406
Ab4        277  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  336

HH1        406  TSPESTTVSA STTSATTTAF TTESHTSPDS STGSTSTAEP SSTFTLTPST ATPSTDQFTG  465
BK343-3F   407  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  466
Ab4        337  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  396

HH1        466  SSASTESDST DSSTVPTTGT ESITESSSTT EASTNLGSST YESTEALETP DGNTTSGNTT  525
BK343-3F   467  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  526
Ab4        397  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  456
                                                          ↓          ↓
HH1        526  PSPSPRTPSF ADTQQTPDNG VSTQHTTIND HTTANAQKHA GHHRGRAGGR RGSPQGGSHT  585
BK343-3F   527  .......... .......... .......... .......... .Y........ ..I.......  586
Ab4        457  .......... .......... .......... .......... .•........ ..•.......  516
```

図33. EHV-1の71番遺伝子からコードされるタンパクのアミノ酸配列（１）

－：配列をシフト、.：同一のアミノ酸、二重下線部：繰り返し配列の基本単位、

下線部：繰り返し配列領域、↓：アミノ酸置換部位

```
HH1         586   TPHPDRLTPS PDDTYDDDTN HPNGRNNSIE IVPQLPPDRP IIELGVATLR KNFMEASCTV    645
BK343-3F    587   .......... .......... .......... .......... .......... ..........    646
Ab4         517   .......... .......... .......... .......... .......... ..........    576

HH1         646   ETNSGLAIFW KIGNASVDAF NRGTTHTRLM RNGVPVYALV STLRVPWLNV IPLTKITCAA    705
BK343-3F    647   .......... .......... .......... .......... .......... ..........    706
Ab4         577   .......... .......... .......... .......... .......... ..........    636

HH1         706   CPTNLVAGDG VDLNSCTTKS TTIPCPGQQR THIFFSAKGD RAVCITSELV SQPTITWSVG    765
BK343-3F    707   .......... .......... .......... .......... .......... ..........    766
Ab4         637   .......... .......... .......... .......... .......... ..........    696

HH1         766   SDRLRNDGFS QTWYGIQPGV CGILRSEVRI HRTTWRFGST SKDYLCEVSA SDSKTSDYKV    825
BK343-3F    767   .......... .......... .......... .......... .......... ..........    826
Ab4         697   .......... .......... .......... .......... .......... ..........    756

HH1         826   LPNAHSTSNF ALVAATTLTV TILCLLCCLY CMLTRPRASV Y......... ..........    866
BK343-3F    827   .......... .......... .......... .......... .......... ..........    867
Ab4         757   .......... .......... .......... .......... .......... ..........    797
```

図33. EHV-1の71番遺伝子からコードされるタンパクのアミノ酸配列（2）

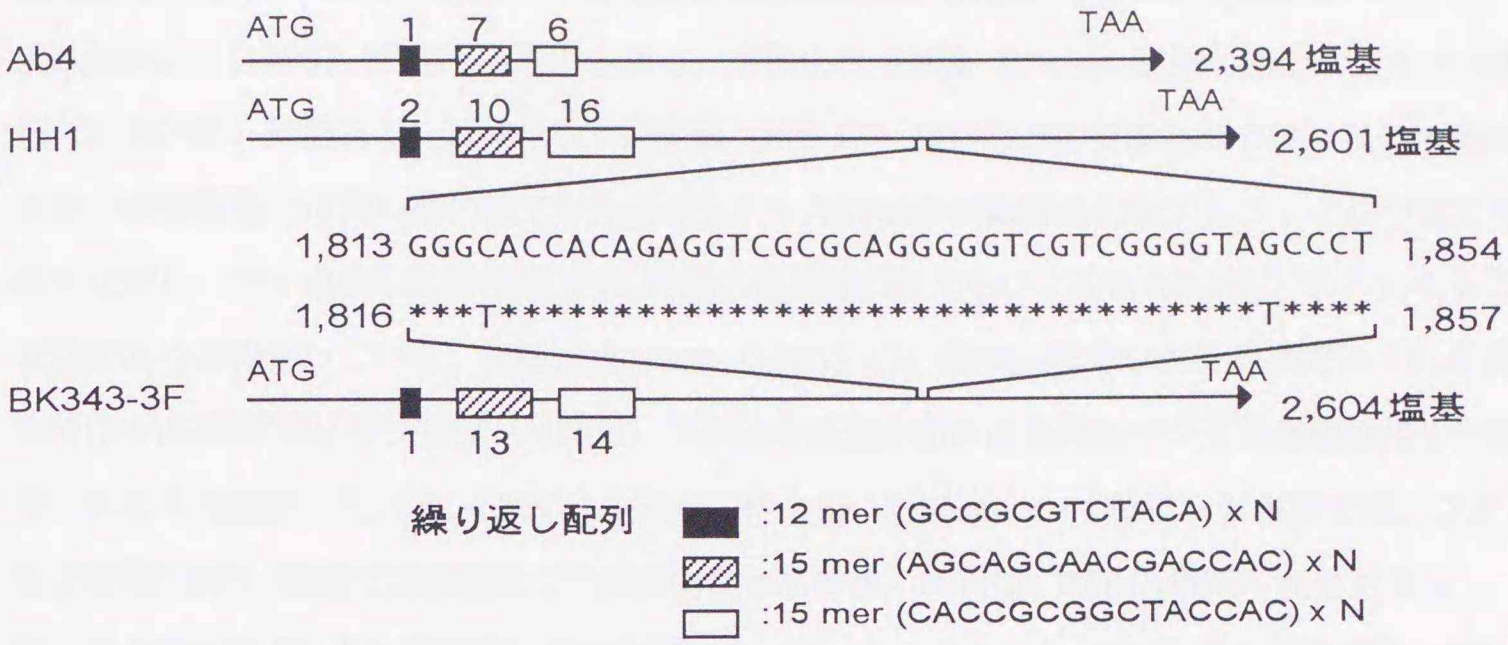


図34.　HH1株とBK343株3Fクローンの71番遺伝子の構造

考　察

今回の研究では、EHV-1 HH1株の4種類のBK細胞継代株のウイルスDNAについて*Bam* HI切断DNA 断片のプロファイルを解析したところ、161代までのプロファイルは親株のHH1株と同じであったが、271代以後の高継代株では変化が認められた。Allenら（1983a）とStuddertら（1986）はEHV-1をハムスターや株化サル腎臓（Vero）細胞、株化ハムスター腎臓（BHK-21）細胞あるいは株化ウサギ腎臓（RK-13）細胞などの実験動物やウマ以外の動物由来の培養細胞では低い継代数でも容易にウイルスDNAの制限酵素切断プロファイルが変化するのに対し、ウマ由来の培養細胞では100回の連続継代後でもウイルスDNAのプロファイルは安定であると報告している。AllenとBryans（1986）は、種々の弱毒ワクチン株でみられる固有のDNA制限酵素切断プロファイルは、強毒株を異種動物の培養細胞で長期間連続継代した結果であろうと推察している。EHV-1のRac-H株を用いたMeyerら（1987）の実験では、ブタ胎子腎臓（PK）細胞で連続継代して弱毒化させた場合、182代目でDNA構造に変化がみられ、この変化は421代まで継代しても安定していた。このことから、EHV-1を異種細胞のBK細胞で連続継代した場合は、PK細胞と同様に、比較的ウイルスDNAの構造に変化は起きにくいものと思われた。

Kawakamiら（1978）はHH1株のBK細胞継代株を子ウマに実験感染させると、268代以後の継代株では顕著な病原性の低下を示したと報告している。さらに、著者らはBK継代株をマウスに経鼻接種すると、継代数が増えるに従って肺でのウイルス増殖性が低下し、BK271株とBK343株ではほとんど増殖しないことを明らかにした（Inazuら, 1993; Kirisawaら, 1995）。BK継代株のDNA構造に変化のみられた継代数と子ウマやマウスに対する病原性の低下を示した継代数とがほぼ一致していたことから、今回みられたDNA構造の変化と病原性低下との間には深い関連があるものと考えられる。

BK343 株の 3F クローンの DNA 構造を親株の HH1 株のものと詳細に比較検討したところ、BK343 株では 9 種類の *Bam* HI 断片（A、B、D、E、N、P、QR、S、T）に分子量の変化あるいは制限酵素切断点数の増加が認められ、そしてこれらの断片に存在する遺伝子のうち、1 番、24 番と 71 番の 3 種類の遺伝子に変異の生じていることを明らかにした。1 番遺伝子を含むT 断片がサザンハイブリダイゼーションによって階段状に多数検出されたが、これは、BK343 株の T 断片の塩基配列を決定した成績から、299 塩基を基本とする繰り返し配列のコピー数の相違によることが明らかとなった。この繰り返し配列は 1 番遺伝子内に存在することか

ら、これがBK271株あるいはBK343株の感染した培養細胞でみられた1番遺伝子のmRNAが階段状に観察された原因である。さらに、BK343株では塩基置換により1番遺伝子の推定開始コドンのATGがGTGに変化していたため、読み枠の一致する51塩基下流のATGを開始コドンとしていると考えられる。この塩基置換はBK343株の3個の299塩基の繰り返し配列中に存在するため、1番目と2番目の繰り返し配列からは同一の59個のアミノ酸がコードされ、また、3番目の繰り返し配列以後からはHH1株より17残基少ないタンパクがコードされるものと思われる。これらのことは、コピー数の多いものについても同様と考えられる。

T断片が階段状に検出されたもう一つの原因として、ウイルス継代中に生じた不完全（DI）粒子の混入が考えられる。HSV-1を高濃度で連続継代するとクラスIとクラスIIと呼ばれる2種類のDI粒子が生じる（Frenkel, 1981）。これら2種類のDI粒子のゲノム構造はお互いに異なっているが、両クラスともhead-to-tailの繰り返し配列からなるため、適当な制限酵素で消化すると構成基本単位が切り出されてくる。Barnettら（1983）は適当な制限酵素消化で生じた構成基本単位をプラスミドベクターにリンカーの付加なしにクローニングした。しかし、BK343株のウイルスDNAの*Bam* HI T断片のプラスミドベクターへのクローニングはリンカーを付加しない場合不可能であったことから（データ示さず）、この断片は構成基本単位の一部ではなく、ウイルスゲノムの末端に存在することが確認された。さらに、種々の制限酵素でBK343株のウイルスDNAを消化したが、構成基本単位を見い出すことはできなかった。これらのことから、BK343株にはクラスIあるいはクラスIIのDI粒子は存在しないことが明らかとなり、これらのT断片の階段状化への関与を否定しえるものと思われる。EHV-1では、これまでのところ5.95 kbを構成基本単位とするクラスIIのDI粒子しか報告されていない（Baumannら, 1986; Yalamanchiliら, 1990）。

1番遺伝子の機能はHSV-1とVZVがともに相同遺伝子を保有しないこともあって不明であるが、1番遺伝子を欠くEHV-1 KyA株のマウス細胞継代株は培養細胞で良く増殖できることから、この遺伝子は培養細胞での増殖には不必要であることが知られている（YalamanchiliとO'Callaghan, 1990）。しかし、培養細胞での増殖に不必要とされた遺伝子であっても、生体内ではウイルスの体内伝播などに重要な役割をはたしている例が報告されていることから（Meignierら, 1988; RoizmanとSears, 1990; Nishiyamaら, 1993）、1番遺伝子のBK343株感染細胞内での翻訳状況を含め、その機能を明らかにすることが今後の課題である。

24番遺伝子はHSV-1のICP1/2（infected cell protein 1 and 2）をコードするUL36遺伝子（McNabbとCourtney, 1992a）と相同で、この塩基配列の中に繰り返し配列が存在してい

る。今回の成績によって、HH1 株とBK343 株とで塩基数に差が認められたが、この塩基数の差は繰り返し配列のコピー数の差によることが明らかとなった。ICP1/2 はテグメントタンパクでその機能は完全に解明されていない。しかし、HSV-1が細胞に感染した後、ICP1/2 はヌクレオカプシドからウイルスDNA を放出する過程や子ウイルスのヌクレオカプシドにウイルスDNA をパッケージする過程に関与していると考えられている（Batterson ら, 1983; Chou とRoizman, 1989）。Courtney（1991）はgB とgC とがエンベロープでクラスターを形成し、ある種のテグメントタンパクと結合している可能性を示唆している。また、McNabb とCourtney（1992b）はICP1/2 が主要なカプシドタンパクであるICP5 と結合していることを報告している。これらの報告と今回の成績をあわせて考えると、24番遺伝子内の変化がEHV-1の複製過程あるいは構造に影響を及ぼしている可能性がある。特に、Batterson ら（1983）はICP1/2 に変異をもつ温度感受性変異株では、非許容温度でウイルスDNA がカプシドから放出されなくなることを報告した。BK343 株も30℃で良く増殖するが40℃ではほとんど増殖しない温度感受性変異株であることから（Kawakami ら, 1978）、この増殖性の低下は繰り返し配列のコピー数の変化にもとづいてタンパクの構造あるいは機能に変化が生じ、カプシドからのウイルスDNA の放出を阻害している可能性も考えられた。

71番遺伝子の塩基配列が決定されたことにより、BK343株では、繰り返し配列のコピー数に変化があることと2箇所の塩基置換（図32の1,819番目と1,853番目の塩基）によってアミノ酸置換を起こすことが明らかとなった。最初の塩基置換により制限酵素*Kpn* Iの切断点が生じていた。71番遺伝子はUs領域に位置し、近年、エンベロープの糖タンパクをコードすることが明らかにされ、ウイルス複製に必須でないとされている（Sunら, 1994）。HSV-1のUs領域に存在する遺伝子のうちウイルス複製に必須のものはgD遺伝子だけであるが（Longneckerと Roizman, 1987 ; Weberら, 1987）、他の遺伝子を機能的に不活化したり欠損させると実験動物に対する病原性が著しく低下することが報告されている（Meignierら, 1988; Nishiyamaら, 1992）。PrVでは、培養細胞などを用いて弱毒化されたワクチン株の多くはUs領域の遺伝子に変異を起こしているが、培養細胞でのウイルス複製には影響を及ぼさず、病原性と強く関連していることが示唆されている（Bernsら, 1985; Gielkensら, 1985; Lomniczi ら, 1987b）。従って、BK343株でみられた71番遺伝子の変異がウイルスの病原性低下と関係している可能性が考えられる。

Bam HI N, P, QRとSの各断片でみられた分子量の変化は、これらの断片に含まれる繰り返し配列のコピー数の変化によるものと考えられた。EHV-1をウマ以外の培養細胞で継代する

と短期間でこれらの断片の分子量に変化の起こることが報告されている（Allenら, 1983a; Studdertら, 1986）。BK343株のQR断片内の多様性は、プラック形成法によりクローニングされたウイルスクローンでもみられたが、同様の成績はHSV-1でも得られている（Umeneら, 1984）。Maotaniら（1986）は、マレック病ウイルスの非腫瘍原性株ではウイルスDNAのIRs領域内の繰り返し配列のコピー数が腫瘍原性株に比べ増えていることを見い出し、コピー数と腫瘍原性との間に深い関連性があると推察している。しかし、EHV-1でみられたこれらの分子量の多様性と病原性との関連性については今後の検討が待たれている。

BK343株のE断片のUL部にみられた1.1 kbの脱落したDNA領域内にはタンパクをコードする遺伝子は含まれていなかった。しかし、ヘルペスウイルスDNAの非コード領域の機能はほとんどわかっていないことから、このDNA脱落と病原性低下との関連性を否定することはできない。

BK343株のウイルスクローニングを行ったのにもかかわらず、ウイルスクローン毎にB断片とQR断片にDNA分子量の多様性がみられた。これらの断片にはウイルスのDNA複製開始点が含まれており、B断片においては複製開始点を含む1.6 kbの断片が1ないし2個挿入されていた。QR断片の分子量の多様性は複製開始点の近くにある繰り返し配列のコピー数の変化によるものと考えられる。ヘルペスウイルスのDNA複製機構はいまだ完全には明らかとなっていないが、一般にDNA複製は1箇所あるいはそれ以上の複製開始点から始まりDNA複製に関与する種々のタンパクの働きで行われる（HammerschmidtとSugden, 1990; RoizmanとSears, 1990）。HSV-1の複製開始点に隣接する領域には複製開始を促進する転写制御領域が存在することから（Prestonら, 1984; WongとSchaffer, 1991）、HH1株とBK343株の転写制御領域の塩基配列を比較することで、B断片とQR断片の分子量に多様性を示した原因が解明されるかもしれない。

今回の研究により、HH1株をBK細胞で長期間連続継代を行うことによって弱毒化されたBK343株のウイルスDNAには1番、24番と71番の3種類の遺伝子ならびに8箇所のタンパク非コード領域で分子量に変化の起きていることが明らかとなった。特に、これら3種類の遺伝子はEHV-1の病原性と関係することが推察され、今後、さらに詳細な検討が必要と思われる。

第4章　71番遺伝子組み換えEHV-1のマウス肺における増殖性

要　旨

EHV-1 HH1株をウシ腎臓（BK）細胞で長期間連続的に継代して弱毒化されたBK343株で71番遺伝子に変異が認められたことから、この変異と病原性との関連を調べるために3種類の71番遺伝子の組み換えウイルスを作出して、その病原性をマウスモデルを用いて解析した。組み換えウイルスは相同組み換えにより、HH1株の71番遺伝子内にβ-ガラクトシダーゼ（β-gal）遺伝子を挿入したもの（β-71株）とβ-71株の71番・β-gal結合遺伝子をBK343株の71番遺伝子あるいはHH1株の71番遺伝子に置き換えたもの（それぞれ、3F-71株、Res-71株）を作出した。これらのウイルスの生物性状を培養細胞を用いて検討したところ、ウイルス複製に大きな差はみられないものの、β-71株の細胞外へのウイルス放出量の減少傾向がみられた。また、組み換えウイルスのプラック形成能は、株化ウマ皮膚（E. Derm）細胞を用いるとすべてHH1株と同様であったが、BK343株ではプラックサイズは小さかった。株化ウシ腎臓（MDBK）および株化ウサギ腎臓（RK-13）細胞を用いた場合、供試ウイルス株間に差は認められなかった。これらのウイルスをマウスに経鼻接種し、マウス肺でのウイルス感染価を測定したところ、β-71株とBK343株の感染価はHH1株の約1/100であったが、3F-71株とRes-71株の感染価はHH1株とほぼ等しかった。

以上の成績より、EHV-1のウマに対する病原性とマウス肺での増殖性は良く相関することから、71番遺伝子産物は病原性に関与することが示唆された。しかし、HH1株の71番遺伝子をBK343株の71番遺伝子に置き換えた3F-71株では増殖能の低下が認められなかったことから、BK343株の病原性低下には71番遺伝子の変異以外の要因も関与していることが示唆された。

序　文

EHV-1の病原性状ならびに生体内での免疫応答などの研究にウマを使用することは、経費や飼育管理上の問題から困難となっている。このため、EHV-1に感受性を示す実験動物としてハムスターが用いられてきたが、ハムスターでは肝臓がウイルス複製の主要臓器であるなど、病態はウマと大きく異なっている（Dollら, 1953, 1956; WilksとCoggins, 1977; RollinsonとWhite, 1983; Stokesら, 1989, 1991）。近年、Awanら（1990, 1991）は、BALB/cマウスにEHV-1を経鼻接種すると、主に肺でウイルスが増殖し、妊娠マウスに流産を起こすなど、ウマと非常に良く似た所見を示すことを報告した。その後、著者らによってマウスでもEHV-1の感染防御免疫が成立することが報告されて以来（Inazuら, 1993）、マウスを用いたEHV-1の病原性あるいは免疫原性に関する研究が増えている（AzmiとField, 1993a, b; Slaterら, 1993; Osterriederら, 1995; Tewariら, 1995）。さらに、著者らは、EHV-1をBK細胞で継代した場合、継代数が増加するに従ってマウス肺における増殖性が低下し、271代以後ではほとんど増殖しないこと、ならびにBK継代株でも弱いながらEHV-1に対する免疫が誘導されることを報告した（Kirisawaら, 1995）。これらの成績はウマを用いた場合とほぼ同様であったことから、マウスモデルがEHV-1の病原性あるいは免疫原性の評価に有用であることが強く示された。

PrVの病原性に関する遺伝子の多くは、これまで強毒株と弱毒株の遺伝子構造の比較により同定された（KitとKit, 1991）。前章では、PrVの場合と同様の解析をEHV-1について行い、弱毒株では3種類の遺伝子（1番、24番、71番）に変異が起きていることを明らかにした（Kirisawaら, 1994）。1番遺伝子の機能はいまだ不明であるが、24番遺伝子はテグメントタンパクを、また、71番遺伝子はエンベロープ糖タンパクをコードする（Telfordら, 1992; Sunら, 1994）。PrVの病原性に関与するタンパクの多くがエンベロープ糖タンパクであることから（KitとKit, 1991）、今回の研究では、EHV-1弱毒株で変異のみられた3種類の遺伝子のうち、エンベロープ糖タンパクをコードする71番遺伝子について病原性との関連を調べた。すなわち、強毒株の71番遺伝子を弱毒株のものと置き換えた組み換えウイルス、あるいは71番遺伝子産物の発現を抑えるためにβ-ガラクトシダーゼ（β-gal）遺伝子を71番遺伝子内に挿入した組み換えウイルスを相同組み換えにより作出し、これらのウイルスの生物性状ならびに病原性を培養細胞とマウスを用いて検討した。

材 料 と 方 法

1）ウイルス

HH1 株とBK343 株の 3F クローン（第 3 章の材料と方法の項参照）を用いた。

2）培養細胞

E. Derm 細胞、MDBK 細胞およびRK-13 細胞を用いた。E. Derm 細胞およびMDBK 細胞の増殖用ならびに維持用培養液は第 1 章の材料と方法の項で述べたものを用いた。RK-13 細胞にはMDBK 細胞用の培養液を用いた。

3）ウイルス価の測定

E. Derm 細胞あるいはRK-13 細胞を 96 ウエルマイクロプレートで単層培養し、検体をDME（E. Derm 細胞用 ）あるいはMEM（RK-13 細胞用）で 10 倍階段希釈した後、1 希釈あたり 3 ウエル、各ウエルに 25 μl ずつ接種して 37℃で 1 時間吸着させた。その後、5％FCS 加DME（E. Derm 細胞用）あるいは 1％FCS 加 MEM（RK-13 細胞用）をウエルあたり 100 μl 加え、37℃、5％CO_2 存在下で 5 日間培養した。CPE の有無を判定し、ベーレンス・ケルバー法によりTCID50（50% tissue culture infectious dose）を算出した。

4）ウイルスの精製

E. Derm 単層培養細胞にウイルスを接種し、第 1 章の材料と方法で述べた方法に従って部分精製ウイルスを得た。次に、PBS にショ糖を 20、30、40、50、60％濃度（w/v）に加えた各液を用いて作出した不連続密度勾配にこのウイルス液を重層し、4℃で 30,000 rpm 90 分間遠心後（RPS40T ローター）、40％と 50％ショ糖の境界部に形成されたウイルスバンドを回収した。PBS で 4℃ 30,000 rpm 1 時間の遠心洗浄後、ウイルス沈渣を初めのウイルス液量の 1/500 量の PBS に浮遊して精製ウイルスとし、小分けして-80℃に保存した。

5）ウイルス感染細胞からの DNA 抽出

第 1 章の材料と方法の項で述べた方法で行った。

6）DNA の制限酵素切断と電気泳動

第1章および第3章の材料と方法の項で述べた方法で行った。

7）プラスミドDNAの抽出と精製

第2章の材料と方法の項で述べた方法で行った。

8）組み換えプラスミド

pUC18にクローン化されたHH1株の *Bam* HI D 断片（pEh-D、第2章参照）とBK343株3Fウイルスクローンの *Bam* HI D 断片（pEb-3F-D、第3章参照）ならびにβ-gal遺伝子が組み込まれたプラスミドpCH110（Pharmacia社、スウェーデン）とプラスミドベクターpBluescript II (KS+) を用いて、71番遺伝子組み換え用の種々のプラスミド（図35）を以下のとおり構築した。

(1) β-gal遺伝子導入用プラスミド

正常な遺伝子産物の産生阻害と組み換えウイルスの検出を容易にするためにβ-gal遺伝子をpEh-Dの71番遺伝子内に挿入し、マーカープラスミドpBan β 13を作出した。すなわち、pEh-Dを制限酵素 *Ban* II で切断して71番遺伝子を含む4.5 kbの断片を回収し、T4 DNAポリメラーゼで両端を平滑化した後、脱リン酸化したpBluescript II の *Sma* I サイトに挿入した（第2章および第3章の材料と方法を参照）。このプラスミドを制限酵素 *Mlu* I で切断して71番遺伝子を開裂し、両端を平滑化した後、脱リン酸化した。この部位に、pCH110中のSV40（simian virus 40）初期プロモーターを上流に持つβ-gal遺伝子を制限酵素 *Tth*III 1 と *Bam* HI で消化して4.2 kbの断片として切り出し（Sakaguchiら, 1993）、両端を平滑化した後、この断片を挿入して導入用プラスミドpBan β 13を得た。

(2) BK343株3Fクローンの71番遺伝子導入用プラスミド

BK343株71番遺伝子の変異領域を含むDNAをpEh-D内の対応するものと置き換えて導入用プラスミドp3F-D-ESを構築した。すなわち、pEh-Dを制限酵素 *Cla* I と *Xho* I で切断して得た71番遺伝子の全長を含む7.0 kbの断片をpBluescript IIにサブクローニングした後、71番遺伝子の変異部分が存在する領域と相同の2.0 kbの断片を制限酵素 *Eag* I と *Sma* I で切断して除去した。次いで、この部位に、pEb-3F-Dから *Eag* I と *Sma* I で切り出して得られた相同断片を連結し、BK343株3Fクローンの71番遺伝子に置き換えた導入用プラスミドp3F-D-ESを得た。

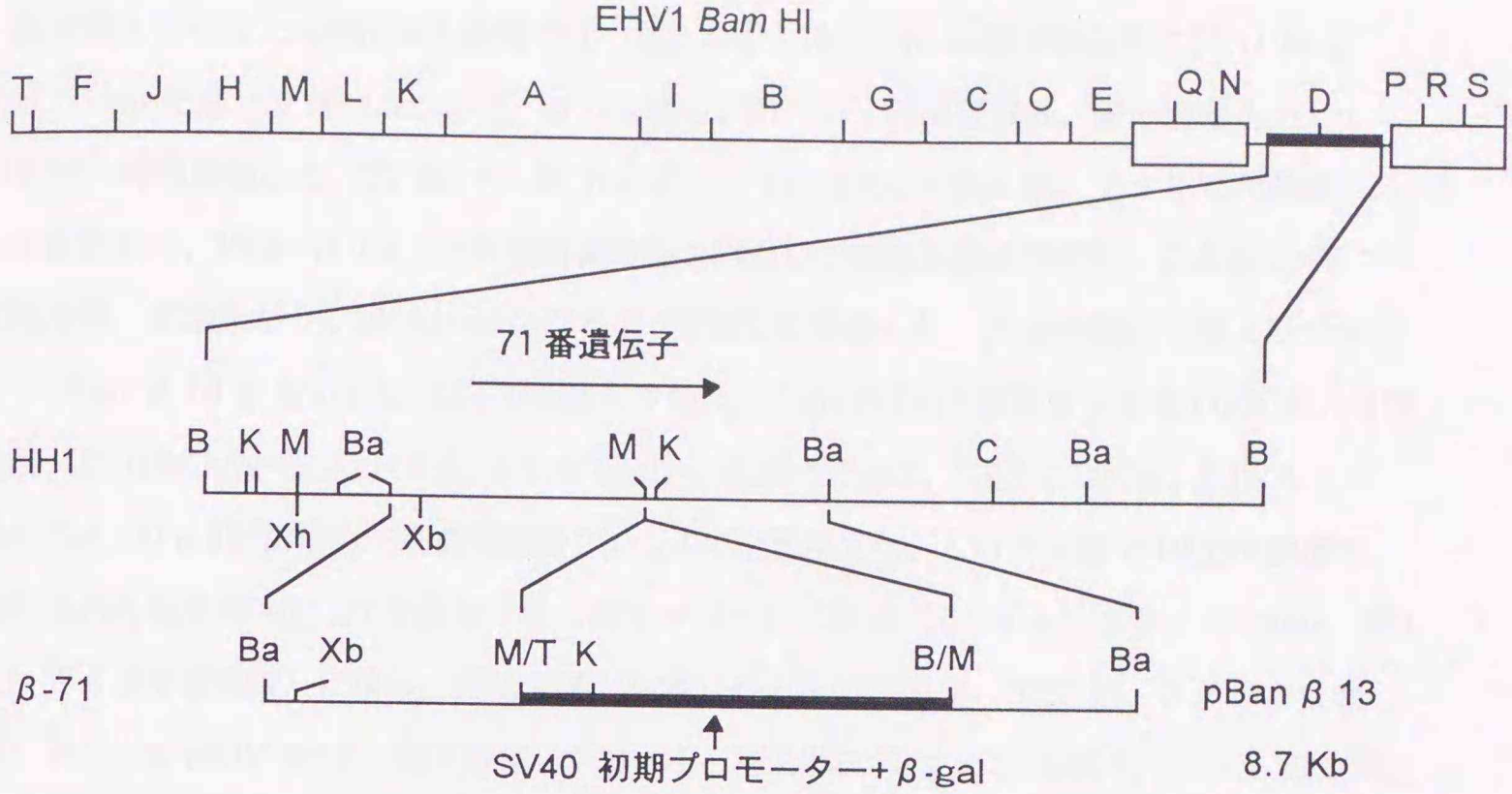


図 35. EHV-1 の 71 番遺伝子組み換えウイルス、β-71 株、3F-71 株と Res-71 株の構築に用いたプラスミド DNA

B, *Bam* HI; Ba, *Ban* II; C, *Cla* I; E, *Eag* I; K, *Kpn* I; M, *Mlu* I; S, *Sma* I; T, *Tth* III1; Xb, *Xba* I; Xh, *Xho* I

9）組み換えウイルスの作出

組み換えウイルスの作出は2段階で行った。まず、E. Derm 単層培養細胞にHH1 株をm.o.i.（multiplicity of infection）10で接種し、37℃で1時間吸着後、維持培地を加えて37℃で2時間培養した。TV 液［ 0.1％ トリプシン（1：250、Difco 社、アメリカ合衆国）、0.02%EDTA、PBS pH 7.2 ］で単層培養細胞を消化して細胞浮遊液を作り、これをDME で3回洗浄後、細胞数が1 x 10^7個/ml になるようDME に浮遊した。β-gal 遺伝子導入用プラスミドpBan β 13 を *Xho* I と *Not* I で切断して得た8.7 kb のDNA 断片6 μg をDNA 導入用緩衝液（10 mM Tris-HCl pH 8.0、1 mM EDTA、0.85 % NaCl、0.02 % $CaCl_2$、0.02 % $MgSO_4$）20 μl に溶解して細胞浮遊液380 μl に全量加えた。これを室温で10分間静置後、細胞-DNA 混合液400 μl を遺伝子導入用キュベット（620P/N・ギャップサイズ2mm、BTX 社、アメリカ合衆国）に移し、遺伝子導入装置（モデルECM600、BTX 社、アメリカ合衆国）を用いて500V モード、電気容量1,700 μF、電気抵抗72オーム（R4 モード）、設定電圧130V の条件でDNA を細胞にエレクトロポレーションで導入した。この細胞を室温で20分間放置後、15%FCS 加DME を増殖用培養液として直径100 mm のシャーレで37℃、5 % CO_2 存在下で培養した。翌日、新鮮なE. Derm 細胞を4 x 10^6個加えて培養を続け、2日後の約100％の細胞がCPE を呈した時期に培養上清を回収した。

相同組み換えによりβ-gal 遺伝子が導入されたウイルスのスクリーニングにはプラック形成法を用いた。すなわち、直径100 mm シャーレに培養したRK-13 単層細胞に、約2,000個のプラックを形成するよう調整された被検ウイルス液を接種し、37℃で1時間吸着させた後、これにβ-gal の基質であるX-gal を0.1 mg/ml の濃度になるように添加された0.9 % ノーブルアガー（Difco 社、アメリカ合衆国）・1 % FCS 加DME を重層して37℃、5 % CO_2 存在下で3～4日培養した。青色に染まるプラックを顕微鏡下で観察しながらウイルスを回収し、1ml の5 % FCS 加DME に浮遊させた。回収されたウイルス液をDME で10倍階段希釈し、直径60 mm シャーレに単層培養されたRK-13 細胞に接種し、上述のプラック形成法によるウイルスクローニング操作を2回反復して得られたウイルスをβ-71 株とした。

HH1 株の71番遺伝子をBK343 株3Fクローンのものと置き換えた組み換えウイルスは以下のように作出した。すなわち、E. Derm 単層培養細胞にβ-71 株をm.o.i. 10で接種し、上記の如く吸着、感染させて培養した後、細胞浮遊液を作製した。これに71番遺伝子導入用プラスミドp3F-D-ES を *Xho* I と *Cla* I で切断して得た7.0 kb のDNA 断片10 μg を20 μl のDNA 導入用緩衝液に溶解し、上記の条件でエレクトロポレーションした。相同組み換えで

BK343株3Fクローンの71番遺伝子に置き換わったウイルスは、X-galを添加した寒天培地下に形成された無色のプラックから回収され、さらに、2回プラッククローニングを反復して組み換えウイルス3F-71株を得た。対照として、HH1株の*Bam* HI D断片を同様に導入してリバータントウイルスRes-71株を得た。

10）サザンハイブリダイゼーション

第2章と第3章の材料と方法で述べた方法で行った。プローブにはジゴキシゲニン-11-dUTPで標識したHH1株ウイルスDNAのクローン化*Bam* HI D断片とpCH110のβ-gal遺伝子を含む*Tth*III 1-*Bam* HI DNA断片を用いた。

11）免疫血清

日本白色ウサギ（♀、体重2.5 kg）を用いて、HH1株に対する免疫血清を作製した。10^9 $TCID_{50}$の精製ウイルスを10日間隔で4回、耳静脈から接種して免疫した。4回目の免疫から1週間後にセラクタール麻酔下で心臓穿刺により血液を採取し、血清を得た。血清は56℃ 30分間加熱して非働化後、-20℃に保存した。

12）SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（PAGE）

被検サンプルに等量のサンプル処理液（2倍濃度：125 mM Tris-HCl pH 6.8、4% SDS、20% グリセリン、10% 2-メルカプトエタノール、0.01% ブロモフェノールブルー）を混合し、100℃5分間加熱した。サンプルはLaemmliの方法（1970）に従って10% SDS-ポリアクリルアミドゲルを用いて100Vの電圧下で泳動した。

13）ウエスタンブロッティング

SDS-PAGE終了後のゲルを転写用緩衝液（25 mM Tris、192 mMグリシン、20%メタノール）で15分間振盪して平衡化した後、Towbinらの方法（1979）に従ってタンパクをニトロセルロースメンブランに転写した。すなわち、60Vで5時間転写後、メンブランをTBS溶液（50 mM Tris-HCl pH 7.5、150 mM NaCl）で10分間振盪して洗浄した後、ブロッキング液［0.5%ブロッキング剤（Boehringer Mannheim社、ドイツ）、TBS溶液］に浸して4℃で一晩静置した。メンブランは0.05%ツイン20を加えたTBS（T-TBS）溶液で室温5分洗浄後、一次抗体としてウサギ抗HH1免疫血清を、また、二次抗体としてペルオキシダーゼ標識ヒツ

ジ抗ウサギIgG（Cappel社、アメリカ合衆国）をそれぞれ37℃で1時間反応させた。次に、これをT-TBS溶液で十分に振盪洗浄してから、ECLシステム（Amersham社、イギリス）を用いて反応タンパクをX線フィルム上に検出した。

14）感染性ウイルス産生量の推移

直径60 mmシャーレのE. Derm単層培養細胞に、ウイルスをm.o.i. 0.1で接種し、37℃で1時間吸着させた。未吸着のウイルスをDMEで4回洗浄して除去した後、5％FCS加DMEを5 ml加えて37℃、5％ CO_2 存在下で培養した。ウイルス吸着を始めて、2、4、8、12、24、48と72時間後に培養上清と細胞を別々に回収した。すなわち、培養上清は2,000 rpm 5分間遠心後-80℃に保存し、その細胞沈渣はDMEで2回遠心洗浄後、0.2 mlの5% FCS加DMEに浮遊させた。シャーレの細胞は培養液除去後、DMEで細胞表面を2回洗浄、ラバーポリスマンで剥離して0.8 mlの5％FCS加DMEに浮遊させ、先の細胞浮遊液を加えて-80℃に保存した。その後、細胞中のウイルスを3回凍結融解して細胞から遊離させ、8,000 rpm 10分間の遠心上清を感染価測定に用いた。ウイルスの $TCID_{50}$ は96ウエルマイクロプレートの単層培養E. Derm細胞を用いて前述の方法に従って測定した。

15）マウスへのウイルス接種

4週齢のBALB/cA Jcl ♀（日本クレア、東京）を用い、エーテル麻酔下で約 10^5 $TCID_{50}$/25 μlのウイルス液を経鼻接種した。これらのマウスは酪農学園大学動物実験施設のマウス飼育装置（P2レベル）で飼育した。ウイルス接種後1日目と3日目に、エーテル麻酔下でマウスの頚静脈を切断して放血殺後、肺を採取した。肺に9倍量のMEMを加えてガラスホモジナイザーで乳剤を作製し、4℃で8,000 rpm 20分間の遠心上清を感染価の測定に用いた。ウイルス感染価の測定は96ウエルマイクロプレートのRK-13単層培養細胞を用いて前述の方法に従って行い、肺25 mgあたりの $TCID_{50}$ を求めた。

ウサギとマウスを用いた実験は、酪農学園大学・北海道文理科短期大学・動物実験に関する指針に従って行った。

成　績

1）組み換えウイルスの作出

強毒HH1株のウイルスゲノムを基本に、相同組み換えによりHH1株の71番遺伝子内にβ-gal遺伝子を挿入したウイルスβ-71株を作出した。次いで、この株のウイルスゲノムを基本に、このウイルスの71番・β-gal結合遺伝子領域を相同組み換えにより弱毒BK343株3Fクローンの71番遺伝子に置き換えた組み換えウイルス3F-71株とHH1株の71番遺伝子に置き換えたリバータントウイルスRes-71株を得た。これら3種類の組み換えウイルスの71番遺伝子領域の組み換え状態をサザンハイブリダイゼーションで調べた（図36）。各ウイルスの71番遺伝子が存在するウイルスDNAのUs領域の推定制限酵素切断地図を図37に示した。各ウイルスの*Bam* HI切断断片を、HH1株の*Bam* HI D断片のプローブと反応させたところ、HH1株、Res-71株、3F-71株とBK343株3Fクローンの各ウイルスでは10.9 kbの*Bam* HI D断片のみが反応したのに対し、β-71株では8.9 kbと6.2 kbの2本の断片と反応した（図36-B）。これはβ-galをコードするDNA断片（pCH110の4.2 kbの*Tth*III 1-*Bam* HI切断断片）を平滑化した後、71番遺伝子を*Mlu* Iで開裂して平滑化した部位に挿入した結果、平滑化した*Bam* HI（5'-・・GGATC-3'）と*Mlu* I（5'-CGCGT・・-3'）の結合部（5'-・・GGA-TCCGCGT・・-3'）に*Bam* HIサイト（GGATCC）が生じたことによる。β-galプローブでは、β-71株の8.9 kbの断片とのみ反応した（図36-C）。次に、BK343株の71番遺伝子では親株のHH1株よりも*Kpn* I切断点が1個多いこと（第3章）を利用して、各ウイルスの*Kpn* I切断断片を上記と同様に反応させ、BK343株の変異71番遺伝子の検出を試みた。HH1株とRes-71株をD断片プローブと反応させた場合、いずれも9.0 kbと4.0 kbの断片と強い反応がみられたが、3F-71株とBK343株3Fクローンでは9.0 kbの断片と4.0 kbの断片が*Kpn* I開裂で生じた3.7 kbの断片と反応した（図36-E）。残りの開裂断片との反応は、塩基数が0.3 kbと少なすぎたため認められなかった。β-71株では9.0 kbと4.7 kbの断片が強く反応した。β-galプローブでは、β-71株の4.7 kbと3.6 kbの*Kpn* I断片とのみ反応がみられた（図36-F）。

β-71株を作出する際に用いた遺伝子導入用プラスミドは、まず、71番遺伝子の全長を含むHH1株の*Ban* II断片（4.5 kb）の両端を平滑化した後プラスミドベクターに組み込み、次いで、β-gal遺伝子を挿入して構築したため、遺伝子導入用DNA断片はベクターのクローニングサイトに存在する*Xho* Iと*Not* Iサイトを利用して切り出した。従って、この断片の両端に

はプラスミドベクターの塩基が一部存在し、組み換えウイルスにもプラスミドの塩基が導入されている可能性があったためサザンハイブリダイゼーションでプラスミドの塩基の有無を検討した（図38）。遺伝子導入用DNA断片の両末端部には*Ban* II サイトがないことから、β-71株にこのサイトが消失している場合、プラスミドベクターの塩基の導入があったと判定し、保持されている場合、塩基の導入はなかったものと判定した。各ウイルスの*Ban* II 切断断片を*Bam* HI D 断片プローブと反応させたところ、すべてのウイルスで3.6 kb、3.4 kb と2.5 kbの3種類の断片が共通かつ明瞭に検出され、発色直後では0.5 kb の断片も検出された（図38-B）。さらに、β-71株を除く4種類のウイルスでは遺伝子導入用に選択された4.5 kb の断片も共通に検出された。β-71株では4.5 kb の断片の代わりに5.5 kb と2.2 kb の断片が検出された。相同組み換えの際、β-71株にプラスミドの塩基が導入された場合、5.5 kb と2.2 kbの断片は、それぞれ、隣接する0.5 kb と2.5 kb の*Ban* II 断片と結合した6.0 kb と4.7 kb の大きさとなって検出されうる。β-galプローブではβ-71株のみが反応し、5.5 kb、2.2 kb と1.0 kb の断片が検出された（図38-C）。これらのことから、β-71株のDNAにはプラスミドの塩基が導入されていないことが確認された。

以上のサザンハイブリダイゼーションの成績は、図37に示した制限酵素切断地図のDNA断片の反応性と完全に一致していた。これらのことから、今回得られた3種類の組み換えウイルスは相同組み換えにより期待どおりのDNA断片に置き換わっていることが確認された。

2）ウイルスタンパク

組み換えウイルスのタンパクを、ウエスタンブロッティングで解析した（図39）。ウイルス感染E. Derm細胞を可溶化し、10% SDS-PAGEで分画後、HH1株に対するウサギの免疫血清を反応させた。β-71株では200キロダルトン（kD）を超えるタンパクとの反応性のみが他の4株に比べて明らかに低下していたが、他のウイルスタンパクに対する反応性はHH1株と同様であった。これらのことから、71番遺伝子は200 kDを超える巨大なタンパクをコードし、しかも、この遺伝子領域にβ-gal遺伝子が挿入されたβ-71株ではこのタンパクが正常に産生されていないことが示唆された。

3）組み換えウイルスの培養細胞における増殖性

71番遺伝子の変異と培養細胞におけるウイルス増殖との関連性を検討した。HH1株、β-71株、3F-71株、Res-71株とBK343株3Fクローンの5種類のウイルスについて、それぞれ

m.o.i 0.1 でE. Derm 単層培養細胞に接種し、接種後2、4、8、12、24、48、72時間後に上清と感染細胞を回収してウイルス感染価を調べた（図40、41）。その結果、培養上清でウイルスは接種後12時間目から検出され、その感染価はβ-71 株を除く4 種類のウイルスで48時間目に、β-71 株では72時間目に最高値に達した（図40）。さらに、48時間目のウイルス感染価はRes-71 株と3F-71 株が最も高く、次いで、BK343 株3Fクローン、HH1 株の順であってβ-71 株が最も低かった。細胞内のウイルスは接種後12時間目から検出され、その感染価は48時間目にピークに達していた（図41）。ウイルス感染価はRes-71 株と3F-71 株が最も高く、次いで、β-71 株、BK343 株3FクローンとHH1 株の順となり、各ウイルスの感染価の差は最高と最低でほぼ10倍であった。次に、各ウイルスについて総感染性ウイルス（細胞内の感染性ウイルスと培養上清中の感染性ウイルスの合計）に占める培養上清中の感染性ウイルスの割合を求めたところ、接種後48時間以降で、β-71 株を除く4 種類のウイルスで80%以上を占めていた。一方、β-71 株では培養上清中の感染性ウイルスは、48時間目で総感染性ウイルスの約20%、72時間目で約50%であった。これらの成績より、3 種類の組み換えウイルス、HH1 株とBK343 株3Fクローンの培養細胞での増殖性に大きな差は認められなかったが、β-71 株は細胞でのウイルス複製の後、他の4 種類のウイルスに比べて細胞外へのウイルス放出量が減少する傾向にあることが示唆された。

4）組み換えウイルスの細胞接触を介した感染性

5 種類のウイルスの細胞接触を介した感染性をE. Derm、RK-13 とMDBK の3 種類の細胞を用いて、プラック形成法により調べた（表10）。ウイルス接種後5 日目のプラックサイズを比較したところ、RK-13 細胞とMDBK 細胞においては5 種類のウイルス間で差は認められなかったが、E. Derm 細胞では、BK343 株3Fクローンのプラックサイズが他の4 種類のウイルスに比べて約30%小さかった。これらのことから、71 番遺伝子の変異は細胞接触を介した感染性に影響を及ぼさないことが示唆された。

5）組み換えウイルスのマウス肺における増殖性

組み換えウイルスの病原性をマウスモデルを用いて解析した。約10^5 TCID50 のウイルスを10匹の4 週齢マウスに経鼻接種し、1 日目と3 日目にそれぞれ5 匹のマウスから肺を採材し、肺のウイルス感染価を測定した（図43）。HH1 株、Res-71 株と3F-71 株接種マウスにおいて、肺（25mg）のウイルス感染価はいずれもほぼ等しく、1 日目では$10^{3.9\text{-}4.7}$ TCID50、3 日

目では $10^{3.3-3.6}$ TCID50 であった。これに対し、β-71 株と BK343 株 3F クローンでは感染価が低く、1 日目で $10^{2.3-2.7}$ TCID50、3 日目では $10^{1.0-1.8}$ TCID50 となり、感染価は先の 3 種類のウイルスの場合の約 1/100 に低下していた。これらのことから、β-gal 遺伝子の挿入により 71 番遺伝子産物の発現を抑えたウイルスのマウス肺における増殖性は低く、感染価は弱毒 BK343 株 3F クローンと同程度の水準にまで低下したが、BK343 株 3F クローンの変異 71 番遺伝子では感染価が高く増殖性に影響を与えていないことが示唆された。

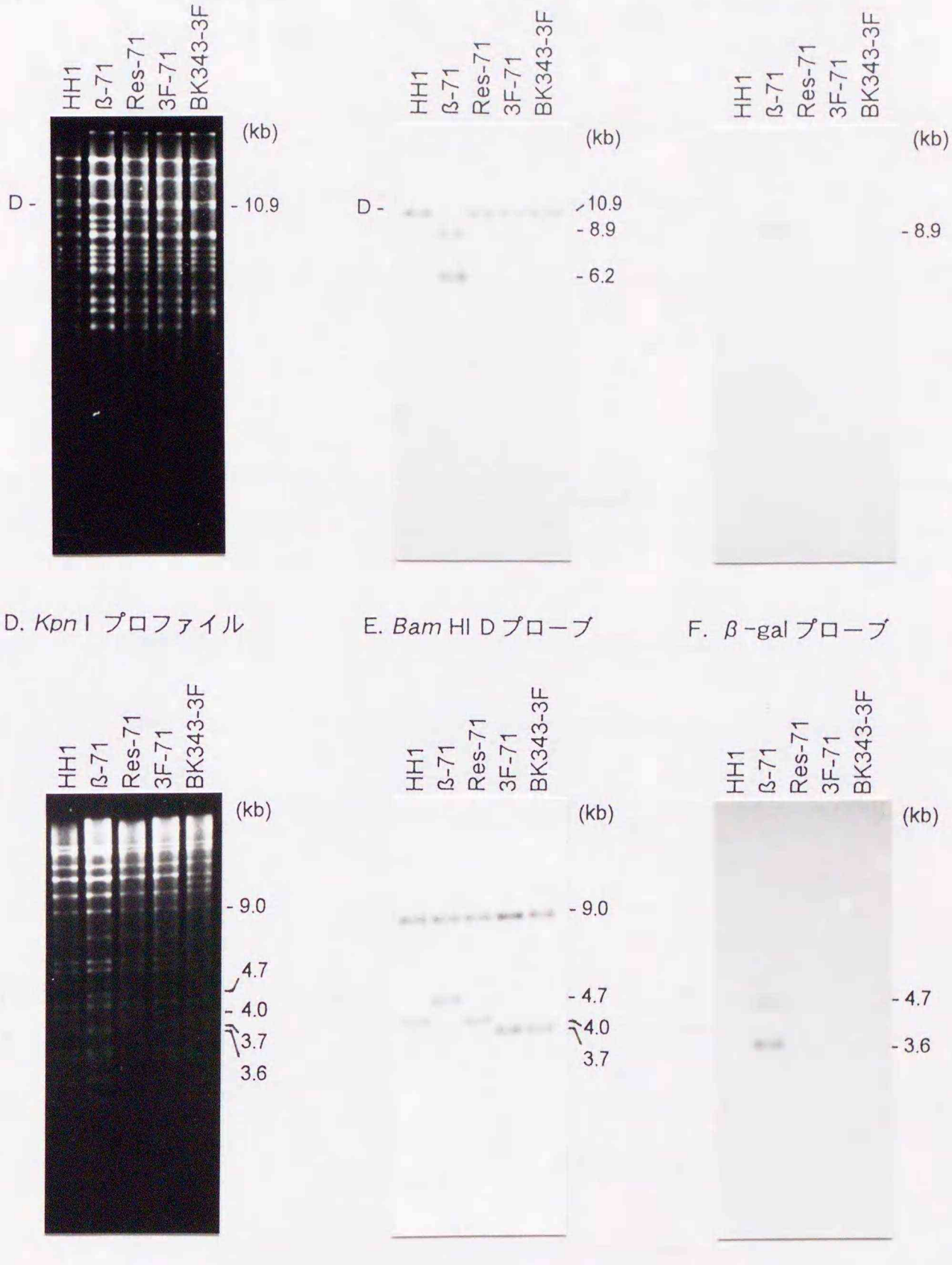
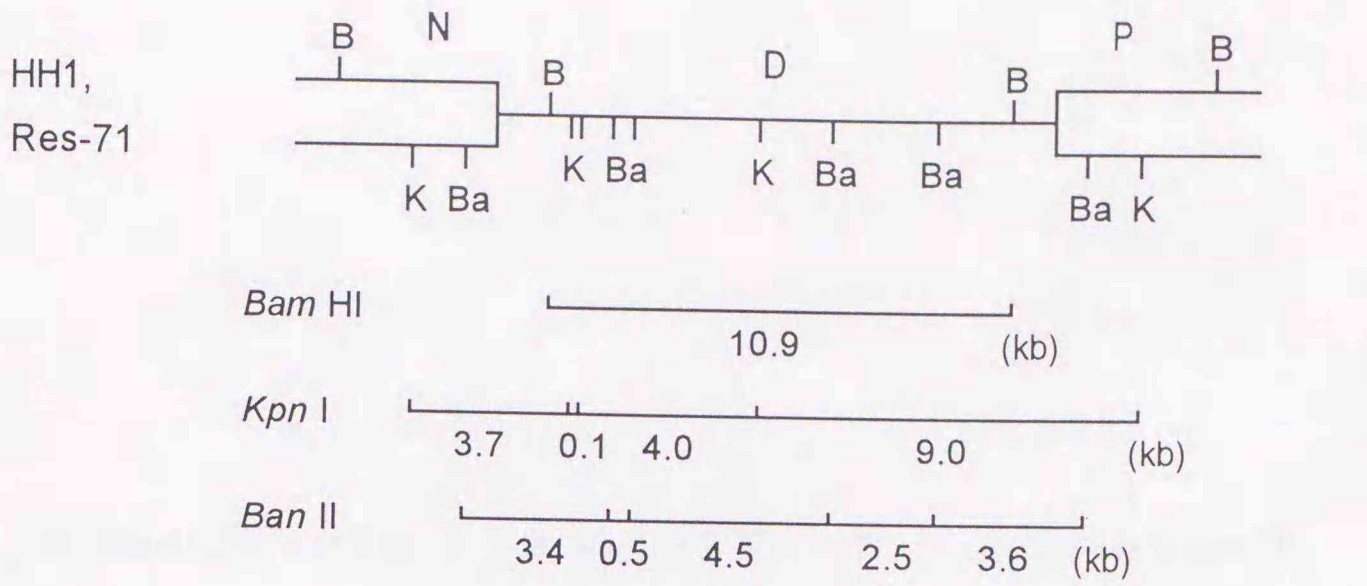
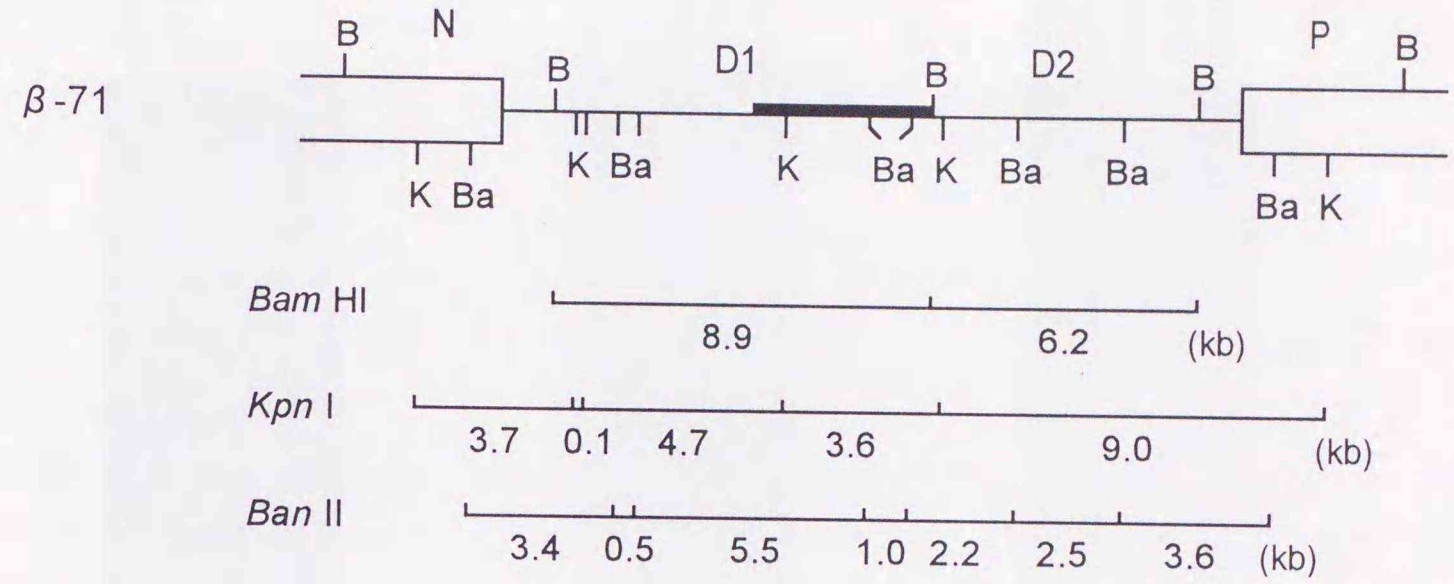


図 36.　71 番遺伝子組み換えウイルス DNA の組み換え部位のサザンハイブリダイゼーションによる解析

（A）ウイルス DNA の *Bam* HI 切断電気泳動プロファイル。（B、E）*Bam* HI D 断片プローブ。（D）ウイルス DNA の *Kpn* I 切断電気泳動プロファイル。（C、F）SV40 初期プロモーターを含むβ-gal 遺伝子プローブ。





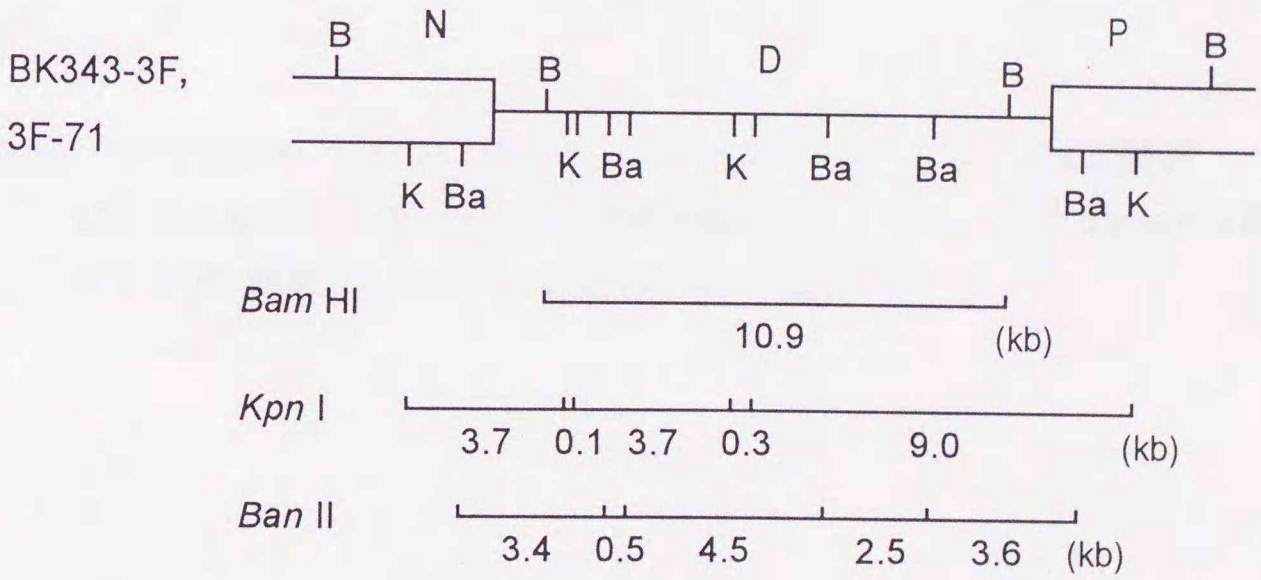


図 37. HH1 株、β-71 株、Res-71 株、BK343 株 3F クローンと 3F-71 株の各ウイルス DNA の Us 領域の *Bam* HI、*Kpn* I ならびに *Ban* II の制限酵素切断地図

制限酵素切断地図の上部には *Bam* HI DNA 断片名を記した。

SV40 初期プロモーターを含むβ-gal 遺伝子を太線でウイルスゲノム上に示した。

B, *Bam* HI ; Ba, *Ban* II ; K, *Kpn* I

A. *Ban* II プロファイル　　B. *Bam* HI D プローブ　　C. β-gal プローブ

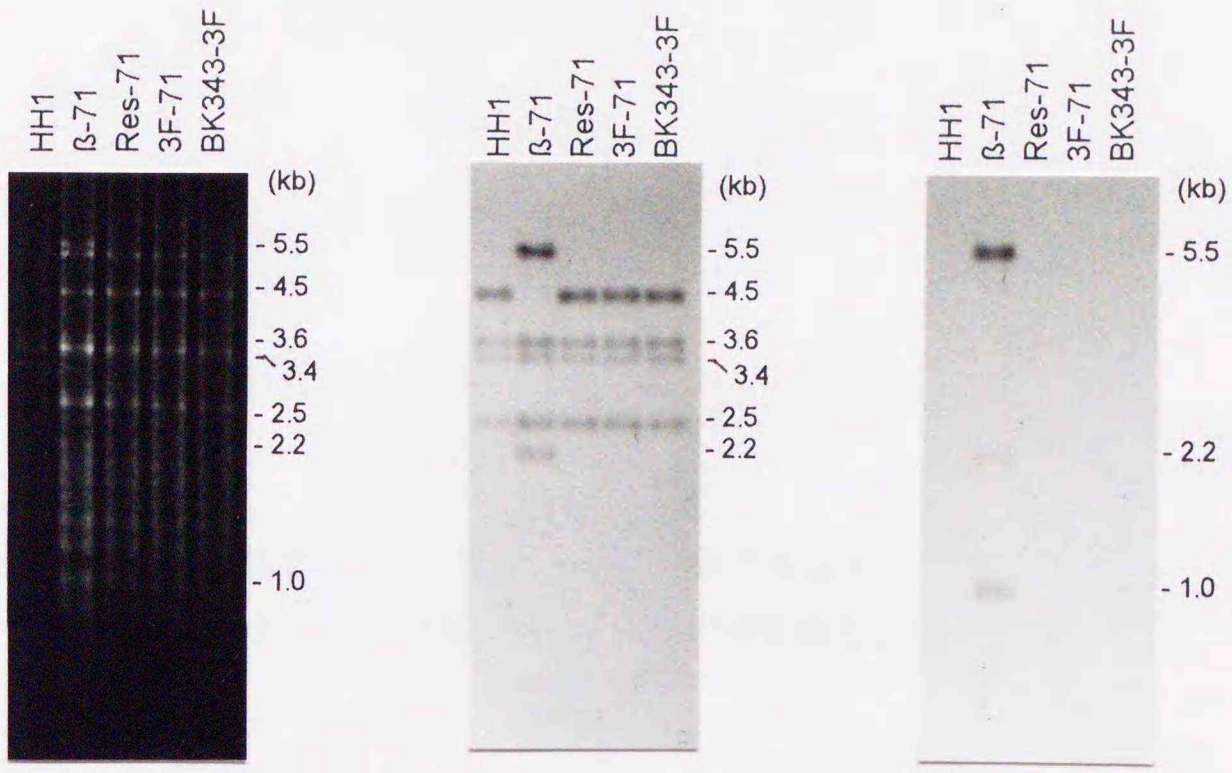


図 38.　β-71 株ウイルス DNA のサザンハイブリダイゼーションによる解析

（A）ウイルス DNA の *Ban* II 切断電気泳動プロファイル。（B）*Bam* HI D 断片プローブ。

（C）SV40 初期プロモーターを含む β-gal 遺伝子プローブ。



図 39.　71 番遺伝子組み換えウイルスタンパクのウエスタンブロット解析
ウサギの抗 EHV-1 HH1 株免疫血清を一次抗体として使用。

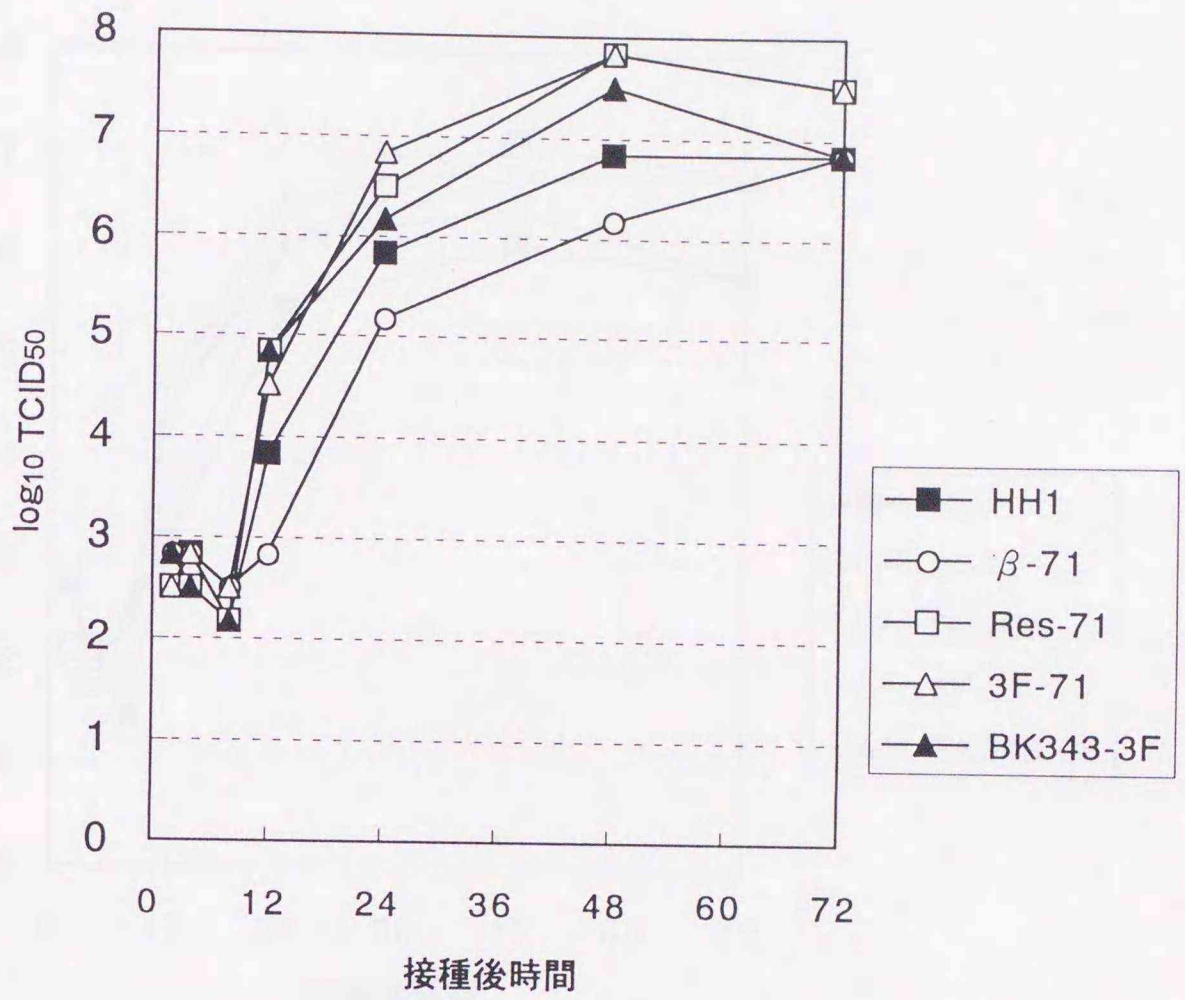


図40. 71番遺伝子組み換えウイルスの培養上清中の感染価の経時変化

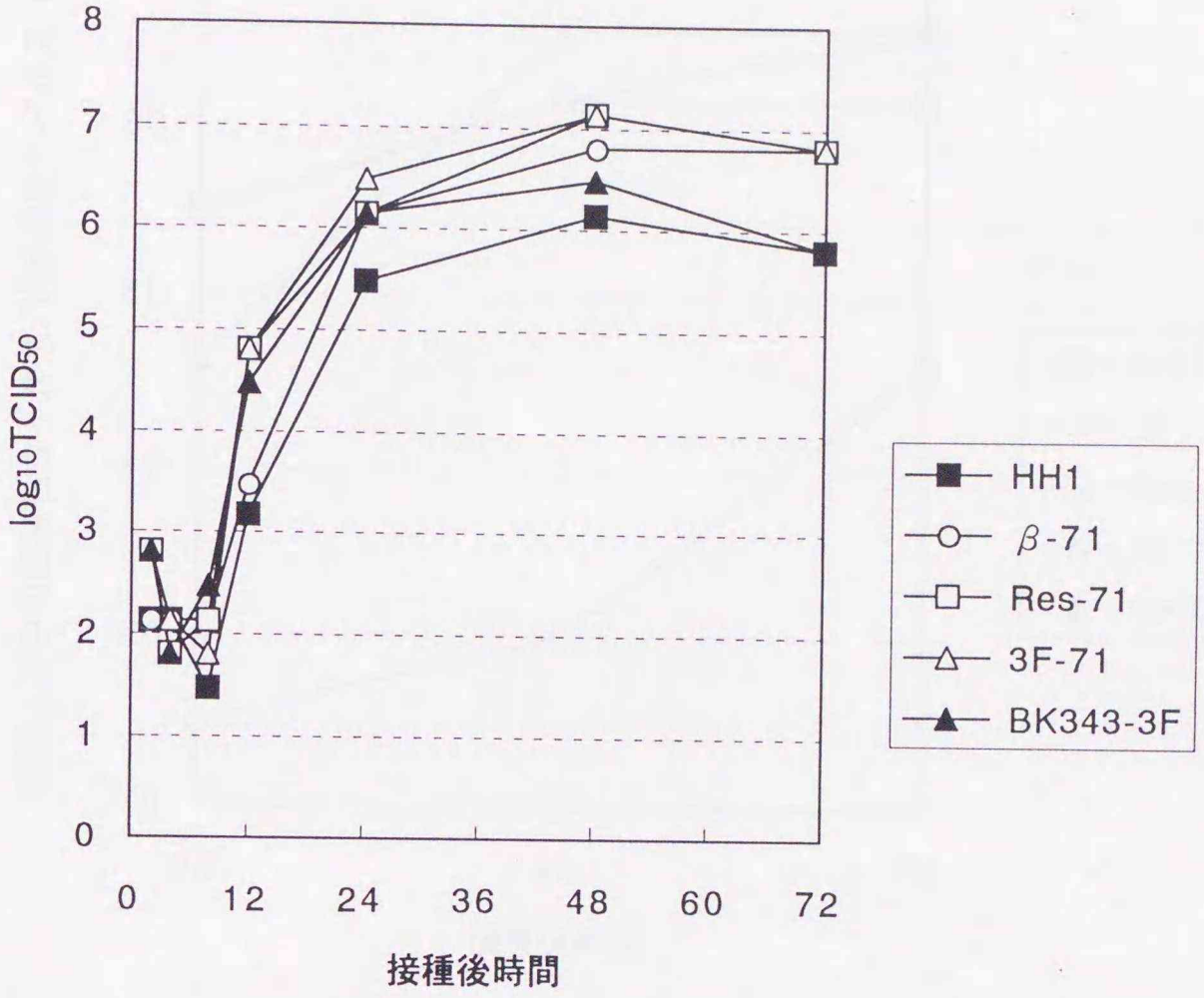


図41. 71番遺伝子組み換えウイルスの細胞内ウイルスの感染価の経時変化

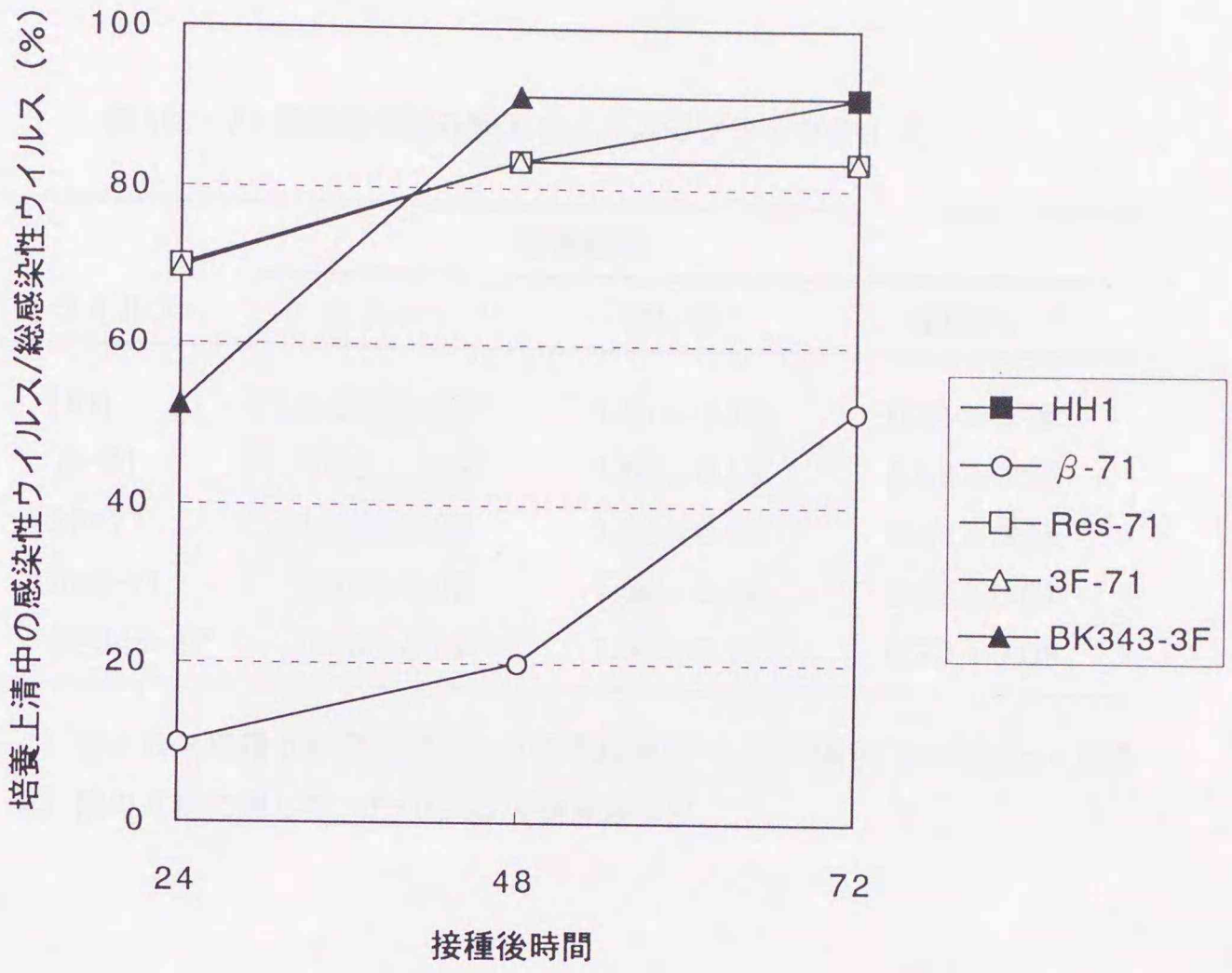


図42. 71番遺伝子組み換えウイルスの培養上清中の感染性ウイルスの総感染性ウイルス（細胞内の感染性ウイルスと培養上清中の感染性ウイルスの合計）に占める割合

表 10.　71 番遺伝子組み換えウイルスのプラックサイズ

ウイルス	培養細胞		
	E. Derm	RK-13	MDBK
HH1	1.02 ± 0.09[1)]	1.51 ± 0.12	0.91 ± 0.06
β-71	1.02 ± 0.08	1.50 ± 0.13	0.89 ± 0.07
3F-71	1.03 ± 0.09	1.62 ± 0.15	0.88 ± 0.05
Res-71	0.99 ± 0.08	1.59 ± 0.12	0.92 ± 0.07
BK343-3F	0.70 ± 0.06[2)]	1.58 ± 0.12	0.90 ± 0.08

1）ウイルス接種 5 日目のプラックの平均直径 ± 標準偏差（mm）（n = 20）

2）他の 4 株に対して、$P<0.005$ で有意差有り

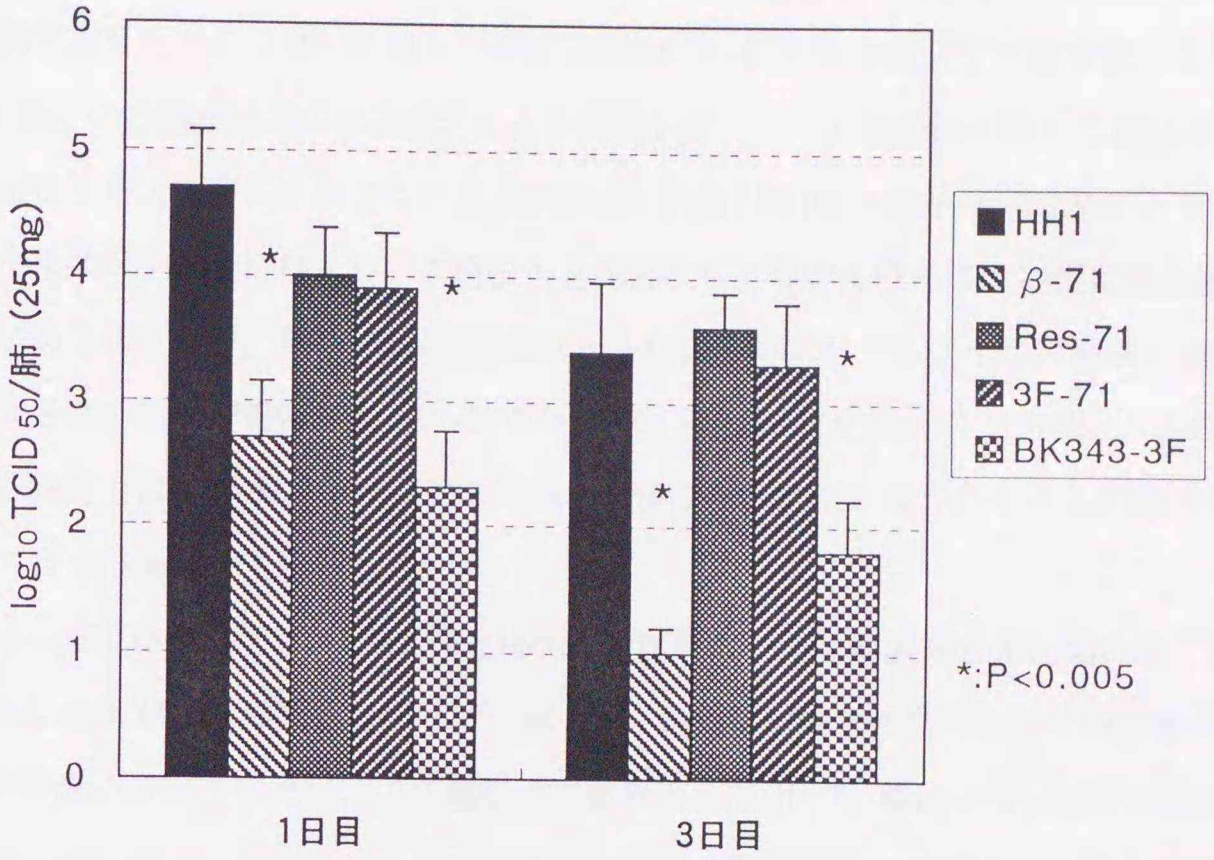


図43. 71番遺伝子組み換えウイルスのマウス肺における増殖性

考　察

EHV-1のエンベロープ糖タンパクの一つをコードする71番遺伝子と病原性との関連を明らかにするため、組み換えウイルスを作出して検討した。組み換えウイルスは、強毒HH1株の71番遺伝子のコード領域内にSV40の初期遺伝子プロモーターで発現するβ-gal遺伝子を挿入したもの（β-71株）、β-71株の71番・β-gal結合遺伝子をそれぞれBK343株の71番遺伝子に置き換えたもの（3F-71株）と再度強毒HH1株の71番遺伝子に置き換えたもの（Res-71株）の3種類を相同組み換えにより構築した。β-71株が得られたことにより、71番遺伝子はウイルス複製に必須でないことが確認された（SunとBrown, 1994）。β-gal遺伝子をウイルスゲノム内に挿入し、本遺伝子を発現させた場合、ウイルス複製に悪影響を生じる可能性が考えられるが、HSVでは培養細胞と生体内のいずれでもウイルス増殖にまったく影響を及ぼさないことが報告されている（MacLeanら, 1991; Balanら, 1994）。このことから、今回の研究では、71番遺伝子産物の発現の阻害ならびに組み換えウイルスの選択を容易にするためにβ-gal遺伝子を使用した。

BK343株の71番遺伝子は、HH1株と比べて2箇所のアミノ酸置換と3種類の繰り返し配列のコピー数に相違が認められており（第3章）、この変化が病原性にどのような影響を及ぼすかが興味の対象となっていたが、この遺伝子に置き換えた3F-71株はマウス肺で強毒株と同様に増殖した。ポリオウイルスのワクチン株Sabin 3型の神経毒性の欠除はウイルス構造タンパクVP3の1個のアミノ酸置換で生じ（Westropら, 1989）、また、狂犬病ウイルスでも神経毒性の欠除が糖タンパクgGの1個のアミノ酸置換で起きることが（Tuffereauら, 1989; Lafayら, 1991）報告されている。PrVでは、糖タンパクgIの主要な抗原決定領域の2個のアミノ酸の除去で神経指向性が低下し（Jacobsら, 1993a）、TK活性は1個のアミノ酸置換で低下することが（Prietoら, 1991）報告されている。これらのことから、BK343株でみられた71番遺伝子の変化は、病原性を規定する程の強いものでないことが示唆された。しかし、細胞継代あるいは動物継代で作出されたPrV弱毒株の病原性の低下は単一の遺伝子の変異ではなく複数の変異によって起きていることが報告されている（Lomniczi ら, 1984, 1987a, b）。PrVの病原性に関与するタンパクのうちgC、gEとgIの発現を単独で抑えた場合、病原性がほとんど低下しないのに対し、gCとgEあるいはgIの両方を除去すると相乗効果によって病原性が低下する（Mettenleiterら, 1988）。Kimmanら（1994）は互いに関連のないgEとTKあるいはプロテインキナーゼの両方の発現を抑えると病原性が低下すると述べている。また、

HSV-1 において、単独ではウイルス複製や病原性に影響を及ぼさない変異が入っているDNAポリメラーゼ遺伝子とTK遺伝子の両方を持つウイルスでは、病原性が顕著に低下したとの報告がなされている（Jacobson ら, 1995）。このようなことから、BK343 株においても、病原性に関与する遺伝子が複数存在することが考えられ、71 番遺伝子の変異も他の遺伝子と相乗的に関与して病原性を低下させているのかもしれない。

71 番遺伝子産物の発現を抑えたβ-71 株のマウス肺における増殖性は弱毒 BK343 株の場合と同程度にまで低下していた。この組み換えウイルスのタンパクを解析した結果、71 番遺伝子は200 kD を超す巨大なタンパクをコードすることが示され、Sun らの報告（1994）と一致していた。その他のウイルスタンパクの産生については、71 番遺伝子に変異があっても大きな影響はみられなかった。しかし、β-71 株のウイルス精製を密度勾配遠心で試みたところ、単一のバンド形成はほとんどみられなかったことから（データ示さず）、ウイルス粒子の比重あるいはウイルス粒子自体が71 番遺伝子産物の欠除によって不安定になっている可能性が示唆された。また、71 番遺伝子産物の発現を抑えたβ-71 株では細胞外へのウイルス放出量が対照のウイルスに比べて減少する傾向にあった。71 番遺伝子産物はO-グリコシド結合で糖鎖が大量に付加した糖タンパクであることが報告されている（Sun ら, 1994）。O-グリコシド結合したウイルスタンパクとして、HSV-1 の gC（Johnson と Spear, 1983; Dall'Olio ら, 1985）、HSV-2 の gG（Serafini-Cessi ら, 1985）、ヒトサイトメガロウイルスの 149 kD のテグメントタンパク（Benko ら, 1988）、アデノウイルス 2 型と 5 型のファイバータンパク（Mullis ら, 1990）、ロタウイルスの非構造タンパク NS26（González と Burrone, 1991）およびバキュロウイルスの構造糖タンパク gp41（Whitford と Faulkner, 1992）などが報告されている。O-グリコシド結合した糖鎖の機能はいまだほとんど不明であるが、タンパク機能の調節、複合タンパクの構造決定や安定化、細胞内でのタンパク変性の防止ならびに核膜あるいは細胞膜への輸送などに関与すると推定されていることから（Hart ら, 1989）、今回のβ-71 株でみられた成績は、71 番遺伝子産物がO-グリコシド結合したタンパクであることに起因することが推察された。また、Wagenaar ら（1995）は、Us3 遺伝子からコードされるプロテインキナーゼの発現が抑えられたPrV では核からのウイルス放出量が低下していると報告し、これにはプロテインキナーゼでリン酸化をうけるタンパクが関与すると考察している。71 番遺伝子のコード領域内には、DNA 解析の結果、リン酸化されうる部位が多数存在することから（データ示さず）、71 番遺伝子産物が細胞からのウイルス放出に直接関与する可能性も考えられる。

プラックサイズの比較では、弱毒 BK343 株のプラックだけが、71 番遺伝子産物の発現を抑

えたβ-71 株を含む他のウイルスと比べて小さくなっていた。このことは、供試した5 種類のウイルス株の培養細胞での増殖性はほぼ同様であったことから、BK343 株の細胞接触を介した感染性が低下していることを示唆し、β-71 株では強毒株と同程度の感染性であることを示唆している。PrV のgI を変異させると、培養細胞で形成されるプラックサイズが小さくなり病原性も低下することが報告されている（Jacobs, 1993b）。さらに、PrV のgD、gE、gG とgI の4 種類の遺伝子をすべて欠損させたウイルスでは、これらの遺伝子を単独で除去したときよりもはるかにプラックサイズが小さく、病原性も低下したとの報告もあることから（Mettenleiter ら, 1994）、BK343 株のプラックサイズの減少にも複数の遺伝子が関与するとともに病原性とプラックの大きさにも何らかの関連があると推測された。この成績から、BK343 株とβ-71 株でマウス肺におけるそれらの増殖性の低下機構は異なることが推察される。今回のBK343 株のプラックサイズの減少が、E. Derm 細胞でのみみられ、MDBK 細胞やRK-13 細胞でみられなかったことから、細胞接触を介するウイルス感染にはウイルスタンパクのみならず、細胞側の因子も深く関与することが推定される。

以上の成績より、71 番遺伝子産物は病原性に関与し、この遺伝子産物の発現を抑えることで病原性を低下させうることが示唆された。しかし、弱毒株の変異71 番遺伝子は単独では病原性を低下させることができず、他の変異遺伝子との協調作用が弱毒株の病原性低下の一因となっている可能性が考えられた。今後は弱毒株で変異のみられた残りの2 種類の遺伝子（1 番遺伝子と24 番遺伝子）について、病原性との関係を調べるとともに71 番遺伝子産物の機能の解明が待たれている。

総　括

ウマヘルペスウイルス１型（EHV-1）は、アルファヘルペスウイルス亜科に属し、妊娠馬の死流産や子ウマの鼻肺炎、また、ときには神経疾患を引き起こす。同じ亜科に属するウマヘルペスウイルス４型（EHV-4）は主として子ウマに呼吸器疾患、また、まれに妊娠馬に死流産を起こすウイルスでEHV-1と抗原的に近縁である。EHV-1による流産は毎年発生し、軽種馬生産業界に多大の経済損失を与えていることから、ウマのウイルス性疾病の中で最も重要視されている。流産防止用に不活化ワクチンが応用されているが、その効果が不充分であるため、有効なワクチンの開発が切望されている。

本研究では、EHV-1による流産の防止対策の一環として、EHV-1感染症の迅速な確定診断法の確立、日本で分離されたEHV-1のDNA解析ならびに遺伝子組み換えによるワクチン開発に必要な基礎的検討を行い、以下の成績を得た。

1. EHV-1とEHV-4 感染症を迅速に診断する目的でポリメラーゼ連鎖反応（PCR）の応用を試みた。両ウイルスのエンベロープ糖タンパクgB遺伝子の塩基配列をもとにプライマーを設定し、それぞれのウイルスに特異的なプライマーを混合してPCRを行なうことによって、容易に両ウイルスを型別することが可能となった。野外のウマ流産例に本法を応用したところ、PCRによる成績はウイルス分離の成績と完全に一致した。このことから、本PCR法は両ウイルス感染症の優れた迅速診断法であることが示唆された。
2. 日本で分離された9株のEHV-1のウイルスDNAを制限酵素*Bam* HI で切断して電気泳動プロファイルを比較したところ、EHV-1不活化ワクチンの実用化前に分離された3株と実用化後の6株との間に大きな変化はみられなかったが、9株の間ではいくつかの断片で分子量の違いが認められた。 そこで、これらの断片をサザンハイブリダイゼーションで調べたところ、*Bam* HI 消化で得られるA～Tまでの20断片のうち、A、D、E、N、P、QR、SとTの8断片に変化を認めた。特に、A断片の分子量の変化はこれまでに報告がなく、今回の研究で初めて明らかになった。
3. 日本で初めて分離されたEHV-1の強毒HH1株とこれをウシ腎臓（BK）細胞で77代（BK77株）、161代（BK161株）、271代（BK271株）と343代（BK343株）連続継代して作出された株のウイルスDNAを*Bam* HI で切断して電気泳動プロファイルを比較したところ、BK77株とBK161株は親株のHH1株と同一のプロファイルを示したが、BK271株とBK343株では明らかに親株と異なっていた。この変化を認めた株の継代数はウマに対する病

原性低下を示した株の継代数と一致していた。BK343株で変化を認めた断片は、*Bam* HI A、B、D、E、N、P、QR、SおよびTと同定された。各断片の変化領域を特定したところ、T断片上の1番遺伝子、A断片上の24番遺伝子とD断片上の71番遺伝子に変化を認めた。他の6断片には非コード領域あるいは繰り返し配列部位に変化を認めた。変化を認めた3遺伝子の塩基配列を決定したところ、1）1番遺伝子内には299塩基を単位とする繰り返し配列の挿入、2）24番遺伝子には繰り返し配列のコピー数の変化、3）71番遺伝子では繰り返し配列のコピー数の変化とアミノ酸置換を伴う2箇所の塩基置換が認められた。以上の成績より、BK細胞で長期間の連続継代で変化したウイルスゲノム領域のうち、これら3種類の遺伝子が病原性に関与している可能性が推察された。

4. BK343株でみられた71番遺伝子の変異と病原性との関連を調べるために、相同組み換えにより、親株であるHH1株の71番遺伝子内にβ-ガラクトシダーゼ遺伝子を挿入したもの（β-71株）、β-71株の71番・β-ガラクトシダーゼ結合遺伝子をBK343株の71番遺伝子あるいはHH1株の71番遺伝子に置き換えたもの（それぞれ、3F-71株、Res-71株）を作出した。これらのウイルスの生物性状を培養細胞を用いて検討したところ、ウイルス複製に大きな差はみられなかったが、β-71株の細胞外へのウイルス放出量が他の株に比べて減少する傾向にあった。これらのウイルスをマウスに経鼻接種し、マウス肺のウイルス感染価を調べたところ、β-71株とBK343株の感染価はHH1株の約1/100であったが、3F-71株とRes-71株ではHH1株と同様であった。以上の成績より、71番遺伝子産物は病原性に関与することが示唆された。しかし、BK343株の71番遺伝子で置き換えられた3F-71株の増殖性は低下しなかったことから、BK343株の病原性低下が71番遺伝子の変異だけによるものではないことが示唆された。

謝　辞

本研究を取りまとめるにあたり、終始懇切なる御指導と御助言ならびに御校閲を賜わりました北海道大学大学院獣医学研究科動物疾病制御学講座 小沼　操教授に謹んで感謝の意を表します。また、貴重な御助言と御校閲を賜わりました北海道大学大学院獣医学研究科環境獣医科学講座 橋本信夫教授、同研究科動物疾病制御学講座 喜田　宏教授ならびに同研究科動物疾病制御学講座 岡崎克則助教授に謝意を表します。本研究の遂行にあたり、絶大な御指導と御協力をいただいた酪農学園大学酪農学部獣医学科 岩井　洸教授ならびに酪農学園大学酪農学部獣医学科 川上善三元教授に謹んで感謝の意を表します。また、本研究について多大の御協力をいただいた酪農学園大学酪農学部獣医学科獣医微生物学教室員の各位に感謝します。

参 考 文 献

Allen, G. P., and Bryans, J. T. (1986). Molecular epizootiology, pathogenesis, and prophylaxis of equine herpesvirus-1 infections. *Prog. Vet. Microbiol. Immun.* **2,** 78-144.

Allen, G. P., and Coogle, L. D. (1988). Characterization of an equine herpesvirus type 1 gene encoding a glycoprotein (gp13) with homology to herpes simplex glycoprotein C. *J. Virol.* **62,** 2850-2858.

Allen, G. P., and Turtinen, L. W. (1982). Assessment of the base sequence homology between the two subtypes of equine herpesvirus 1. *J. Virol.* **44,** 249-255.

Allen, G. P., and Yeargan, M. R. (1987). Use of λgt 11 and monoclonal antibodies to map the genes for the six major glycoproteins of equine herpesvirus 1. *J. Virol.* **61,** 2454-2461.

Allen, G. P., Yeargan, M. R., and Bryans,J. T. (1983 a). Alterations in the equine herpesvirus 1 genome after *in vitro* and *in vivo* virus passage. *Infect. Immun.* **40,** 436-439.

Allen, G. P., Yeargan, M. R., Turtinen, L. W., and Bryans, J. T. (1985). A new field strain of equine abortion virus (equine herpesvirus-1) among Kentucky horses. *Am. J. Vet. Res*. **46,** 138-140.

Allen, G. P., Yeargan, M. R., Turtinen, L. W., Bryans, J. T., and McCollum, W. H. (1983b). Molecular epizootiologic studies of equine herpesvirus-1 infections by restriction endonuclease fingerprinting of viral DNA. *Am. J. Vet. Res.* **44,** 263-271.

Audonnet, J-C., Winslow, J., Allen, G., and Paoletti, E. (1990). Equine herpesvirus type 1 unique short fragment encodes glycoproteins with homology to herpes simplex virus type 1 gD, gI and gE. *J. Gen. Virol.* **71,** 2969-2978.

Awan, A. R., Chong, Y. -C., and Field, H. J. (1990). The pathogenesis of equine herpesvirus type 1 in the mouse: a new model for studing host responses to the infection. *J. Gen. Virol.* **71,** 1131-1140.

Awan, A. R., Gibson, J. S., and Field, H. J. (1991). A murine model for studing EHV-1-induced abortion. *Res. Vet. Sci.* **51,** 94-99.

Azmi, M., and Field, H. J. (1993a). Cell-mediated antiviral response to equine herpesvirus type 1 demonstrated in a murine infection model by means of adoptive transfer of immune cells. *J. Gen. Virol.* **74,** 275-280.

Azmi, M., and Field, H. J. (1993b). Interactions between equine herpesvirus type 1 and equine herpesvirus type 4: T cell responses in a murine infection model. *J. Gen. Virol.* **74,** 2339-2345.

Balan, P., Davis-Poynter, N., Bell, S., Atkinson, H., Browne, H., and Minson, T. (1994). An analysis of the *in vitro* and *in vivo* phenotypes of mutants of herpes simplex virus type 1

lacking glycoproteins gG, gE, gI or the putative gJ. *J. Gen. Virol.* **75,** 1245-1258.

Ballagi-Pordány, A., Klingeborn, B., Flensburg, J., and Belák, S. (1990). Equine herpesvirus type 1: detection of viral DNA sequences in aborted fetuses with the polymerase chain reaction. *Vet. Microbiol.* **22,** 373-381.

Barnett, J. W., Eppstein, D. A., and Chan, H. W. (1983). Class I defective herpes simplex virus DNA as a molecular cloning vehicle in eucaryotic cells. *J. Virol.* **48,** 384-395.

Batterson, W., Furlong, D., and Roizman, B. (1983). Molecular genetics of herpes simplex virus. VIII. Further characterization of a temperature-sensitive mutant defective in release of viral DNA and in other stages of the viral reproductive cycle. *J. Virol.* **45,** 397-407.

Baumann, R. P., Staczek, J., and O'Callaghan, D. J. (1986). Cloning and fine mapping the DNA of equine herpesvirus type one defective interfering particles. *Virology* **153,** 188-200.

Benko, D. M., Haltiwanger, R. S., Hart, G. W., and Gibson, W. (1988). Virion basic phosphoprotein from human cytomegalovirus contains O-linked *N*-acetylglucosamine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85,** 2573-2577.

Ben-Porat, T., Rixon, F. J., and Blankenship, M. L. (1979). Analysis of the structure of the genome of pseudorabies virus. *Virology* **95,** 285-294.

Berns, A., van den Ouweland, A., Quint, W., van Oirschot, J., and Gielkens, A. (1985). Presence of markers for virulence in the unique short region or repeat region or both of pseudorabies hybrid viruses. *J. Virol.* **53,** 89-93.

Bryans, J. T., and Allen, G. P. (1989). Herpesviral diseases of the horse. *In* "Herpesviral Diseases of Cattle, Horses and Pigs" (G. Wittmann, Ed.), pp. 176-229. Kluwer, Boston.

Bürki, F., Nowotny, N., Oulehla, J., Schmehlik, O., Möstl, K., Pallan, C., and Rossmanith, E. (1991). Attempts to immunoprotect adult horses, specifically pregnant mares, with commercial vaccines against clinical disease induced by equine herpesvirus-1. *J. Vet. Med. B* **38,** 432-440.

Chou, J., and Roizman, B. (1989). Characterization of DNA sequence-common and sequence-specific proteins binding to *cis*-acting sites for cleavage of the terminal *a* sequence of the herpes simplex virus 1 genome. *J. Virol.* **63,** 1059-1068.

Chowdhury, S. I., Buhk, H. J., Ludwig, H., and Hammerschmidt, W. (1990). Genomic termini of equine herpesvirus 1. *J. Virol.* **64,** 873-880.

Chowdhury, S. I., Kubin, G., and Ludwig, H. (1986). Equine herpesvirus type 1 (EHV-1) induced abortions and paralysis in a Lipizzaner stud: a contribution to the classification of equine herpesviruses. *Arch. Virol.* **90,** 273-288.

Chowdhury, S. I., Ludwig, H., and Buhk, H. J. (1988). Molecular biological characterization of equine herpesvirus type 1 (EHV-1) isolates from ruminant hosts. *Virus Res.* **11,** 127-139.

Cornick, J., Martens, J., Martens, R., Crandell, R., McConnell, S., and Kit, S. (1990). Safety and efficacy of a thymidine kinase negative equine herpesvirus-1 vaccine in young horses. *Can. J. Vet. Res.* **54,** 260-266.

Courtney, R. J. (1991). Membrane-associated antigens of herpes simplex virus. *Rev. Infect. Dis.* **13 (Suppl 11),** S917-S919.

Cullinane, A. A., Rixon, F. J., and Davison, A. J. (1988). Characterization of the genome of equine herpesvirus 1 subtype 2. *J. Gen. Virol.* **69,** 1575-1590.

Dall'Olio, F., Malagolini, N., Speziali, V., Campadelli-Fiume, G., and Serafini-Cessi, F. (1985). Sialylated oligosaccharides O-glycosidically linked to glycoprotein C from herpes simplex virus type 1. *J. Virol.* **56,** 127-134.

Davison, A. J., and Scott, J. E. (1986). The complete DNA sequence of varicella zoster virus. *J. Gen. Virol.* **67,** 1759-1816.

Dimock, W. W., and Edwards, P. R. (1936). The differential diagnosis of equine abortion with special reference to a hitherto undescribed form of epizootic abortion in mares. *Cornell Vet.* **26,** 231-239.

Doll, E. R., Bryans, J. T., McCollum, W. H., and Crowe, M. E. W. (1956). Propagation of equine abortion virus in Syrian hamsters. *Cornell Vet.* **46,** 68-82.

Doll, E. R., Bryans, J. T., McCollum, W. H., and Crowe, M. E. W. (1957). Isolation of a filterable agent causing arteritis of horses and abortion by mares: Its differentiation from the equine abortion (influenza) virus. *Cornell Vet.* **47,** 3-51.

Doll, E. R., Richards, M. J., and Wallace, M. E. (1953). Adaptation of the equine abortion virus to suckling Syrian hamsters. *Cornell Vet.* **44,** 133-138.

Doll, E. R., and Wallace, M. E. (1954). Cultivation of equine abortion and influenza viruses on the chorioallantoic membrane of chick embryos. *Cornell Vet.* **44,** 453-461.

Dumas, A. M., Geelen, J. L. M. C., Weststrate, M. W., Wertheim, P., and van der Noordaa, J. (1981). *Xba* I, *Pst* I and *Bgl* II restriction enzyme maps of the two orientations of the varicella-zoster virus genome. *J. Virol.* **39,** 390-400.

Edington, N. (1992). Latency of equine herpesviruses. *In* "Equine Infectious Diseases VI" (W. Plowright, P. D. Rossdale, and J. F. Wade, Eds.), pp. 195-200. R & W Publications, Newmarket, UK.

Elton, D. M., Halliburton, I. W., Killington, R. A., Meredith, D. M., and Bonass, W. A. (1992). Identification of the equine herpesvirus type 1 glycoprotein 17/18 as a homologue of herpes simplex virus glycoprotein D. *J. Gen. Virol.* **73,** 1227-1233.

Feinberg, A. P., and Vogelstein, B. (1983). A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* **132,** 6-13.

Frenkel, N. (1981). Defective interfering herpesviruses. *In* "The Human Herpesviruses, an Interdisciplinary Perspective" (A. J. Nahmias, W. R. Dowdle, and R. F. Schinazi, Eds.), pp. 91-120. Elsevier North-Holland, New York.

Fukusho, A., Shimizu, M., Kubo, M., Nanba, K., Shimizu, Y., Konno, S., Suzuki, K., and Otaki, T. (1981). The first outbreak of Aujeszky's disease in swine in Japan. II. Virus isolation (in Japanese). *Bull. Natl. Inst. Anim. Hlth.* **82,** 5-11.

Gielkens, A. L. J., van Oirschot, J. T., and Berns, A. J. M. (1985). Genome differences among field isolates and vaccine strains of pseudorabies virus. *J. Gen. Virol.* **66,** 69-82.

Gonzárez, S. A., and Burrone, O. R. (1991). Rotavirus NS26 is modified by addition of single O-linked residues of *N*-acetylglucosamine. *Virology* **182,** 8-16.

Hammerschmidt, W., Ludwig, H., and Buhk, H. J. (1986). Short repeats cause heterogeneity at genomic terminus of bovine herpesvirus 1. *J. Virol.* **58,** 43-49.

Hammerschmidt, W., and Sugden, B. (1990). DNA replication of herpesviruses during the lytic phase of their life-cycles. *Mol. Biol. Med.* **7,** 45-57.

Hart, G. W., Haltiwagner, R. S., Holt, G. D., and Kelly, W. G. (1989). Glycosylation in the nucleus and cytoplasm. *Annu. Rev. Biochem.* **58,** 841-874.

Hashiguchi, Y., Tokui, T., and Kawakami, Y. (1980). Development of a new inactivated vaccine for equine rhinopneumonitis virus in Japan. *J. Agric. Res. Q.* **14,** 169-175.

Henry, B. E., Robinson, R. A., Dauenhauer, S. A., Atherton, S. S., Hayward, G. S., and O'Callaghan, D. J. (1981). Structure of the genome of equine herpesvirus type 1. *Virology* **115,** 97-114.

Inazu, M., Tsuha, O., Kirisawa, R., Kawakami, Y., and Iwai, H. (1993). Equid herpesvirus 1 infection in mice. *J. Vet. Med. Sci.* **55,** 119-121.

Jacobs, L., Mulder, W. A. M., van Oirschot, J. T., Gielkens, A. L. J., and Kimman, T. G. (1993a). Deleting two amino acids in glycoprotein gI of pseudorabies virus decreases virulence and neurotropism for pigs, but does not affect immunogenicity. *J. Gen. Virol.* **74,** 2201-2206.

Jacobs, L., Rziha, H. J., Kimman, T. G., Gielkens, A. L. J., and van Oirschot, J. T. (1993b). Deleting valine-125 and cysteine-126 in glycoprotein gI of pseudorabies virus strain NIA-3 decreases plaque size and reduces virulence in mice. *Arch. Virol.* **131,** 251-264.

Jacobson, J., Kramer, M., Rozenberg, F., Hu, A., and Coen, D. M. (1995). Synergistic effects on ganglionic herpes simplex virus infections by mutations or drugs that inhibit the viral polymerase and thymidine kinase. *Virology* **206,** 263-268.

Johnson, D. C., and Spear, P. D. (1983). O-linked oligosaccharide are aquired by herpes simplex virus glycoproteins in the golgi apparatus. *Cell* **32,** 987-997.

Kaneko, S., Miller, R., Feinstone, S., Unoura, M., Kobayashi, K., Hattori, N., and Purcell, R. H. (1989). Detection of serum hepatitis B virus DNA in patients with chronic hepatitis using the polymerase chain reaction assay. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86,** 312-316.

Kawakami, Y., Kaji, T., Ishizaki, R., Shimizu, T., and Matumoto, M. (1962). Etiologic study on an outbreak of acute respiratory disease among colts due to equine rhinopneumonitis virus. *Jpn. J. Exp. Med.* **32,** 211-229.

Kawakami, Y., Kaji, T., Sugimura, K., Shimizu, T., and Matumoto, M. (1959). Preliminary survey for equine abortion virus infection by complement fixation test in Hokkaido, Japan. *Jap. J. Exp. Med.* **29,** 203-211.

Kawakami, Y., Murase, N., Shimizu, Y., and Kikuchi, N. (1978). Studies on a live equine rhinopneumonitis virus vaccine. I. Pathogenicity to colts of an attenuated strain of virus obtained by serial passage in bovine kidney cell culture (in Japanese with English summary). *Exp. Rep. Equine Hlth. Lab.* **15,** 31-36.

Kawakami, Y., Tokui, T., Nakano, K., Kume, T., Hiramune, T., and Murase, N. (1970). An outbreak of abortion due to equine rhinopneumonitis virus among mares in the Hidaka district, Hokkaido. I. Epizootiological survey and virus isolation (in Japanese). *Bull. Natl. Inst. Anim. Hlth.* **61,** 9-16.

Kimman, T. G., de Wind, N., de Bruin, T., de Visser, Y., and Voermans, J. (1994). Inactivation of glycoprotein gE and thymidine kinase or the US3-encoded protein kinase synergistically decreases *in vivo* replication of pseudorabies virus and the induction of protective immunity. *Virology* **205,** 511-518.

Kimman, T. G., de Wind, N., Oei-Lie, N., Pol, J. M. A., Berns, A. J. M., and Gielkens, A. L. J. (1992). Contribution of single genes within the unique short region of Aujeszky's disease virus (suid herpesvirus type 1) to virulence, pathogenesis and immunogenicity. *J. Gen. Virol.* **73,** 243-251.

Kirisawa, R., Endo, A., Iwai, H., and Kawakami, Y. (1993a). Detection and identification of equine herpesvirus-1 and -4 by polymerase chain reaction. *Vet. Microbiol.* **36,** 57-67.

Kirisawa, R., Ohmori, H., Iwai, H., and Kawakami, Y. (1993b). The genomic diversity among equine herpesvirus-1 strains isolated in Japan. *Arch. Virol.* **129,** 11-22.

Kirisawa, R., Terada, M., Sekiya, N., Kawakami, Y., and Iwai, H. (1995). Growth and protective potentials of attenuated strains of equid herpesvirus 1 in the lungs of mice. *J. Vet. Med. B* **42,** 391-396.

Kirisawa, R., Ui, S., Takahashi, A., Kawakami, Y., and Iwai, H. (1994). Comparison of the genomes of attenuated equine herpesvirus-1 strains with their parent virulent strain. *Virology* **200,** 651-660.

Kit, S., and Kit, M. (1991). Genetically engineered herpesvirus vaccines. *Prog. Med. Virol.* **38,** 128-166.

Kit, S., Kit, M., and Pirtle, E. C. (1985). Attenuated properties of thymidine kinase-negative deletion mutant of pseudorabies virus. *Am. J. Vet. Res.* **46,** 1359-1367.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* **227,** 680-685.

Lafay, F., Coulon, P., Astic, L., Saucier, D., Riche, D., Holley, A., and Flamand, A. (1991). Spread of the CVS strain of rabies virus and of the avirulent mutant Av01 along the olfactory pathways of the mouse after intranasal inoculation. *Virology* **183,** 320-330.

Liu, S. -T., Li, S. -N., Wang, D. -C., Chang, S. -F., Chiang, S. -C., Ho, W. -C., Chang, Y. -S., and Lai, S. -S. (1991). Rapid detection of hog cholera virus in tissues by the polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods* **35,** 227-236.

Lomniczi, B., Kaplan, A. S., and Ben-Porat, T. (1987a). Multiple defects in the genome of pseudorabies virus can affect virulence without detectably affecting replication in cell culture. *Virology* **161,** 181-189.

Lomniczi, B., Watanabe, S., Ben-Porat, T., and Kaplan, A. S. (1984). Genetic basis of the neurovirulence of pseudorabies virus. *J. Virol.* **52,** 198-205.

Lomniczi, B., Watanabe, S., Ben-Porat, T., and Kaplan, A. S. (1987b). Genome location and identification of functions defective in the Bartha vaccine strain of pseudorabies virus. *J. Virol.* **61,** 796-801.

Longnecker, R., and Roizman, B. (1987). Clustering of genes dispensable for growth in culture in the S component of the HSV-1 genome. *Science* **236,** 573-576.

MacLean, C. A., Efstathiou, S., Eliott, M. L., Jamieson, F. E., and McGeoch, D. J. (1991). Investigation of herpes simplex virus type 1 genes encoding multiply inserted membrane proteins. *J. Gen. Virol.* **72,** 897-906.

Maotani, K., Kanamori A., Ikuta, K., Ueda, S., Kato, S., and Hirai, K. (1986). Amplification of a tandem direct repeat within inverted repeats of Marek's disease virus DNA during serial *in vitro* passage. *J. Virol.* **58,** 657-660.

Matsumura, T., Kirisawa, R., Kondo, T., Sugita, S., and Kamada, M. (1994). Molecular epizootiological studies on respiratory and foetal strains of equid herpesvirus-1 isolated in Japan. *In* "Equine Infectious Disease VII" (H. Nakajima, and W. Plowright, Eds.), pp. 243-249. R & W Publications, Newmarket, UK.

Mayfield, J. E., Good, P. J., VanOort, H. J., Campbell, A. R., and Reed, D. E. (1983). Cloning and cleavage site mapping of DNA from bovine herpesvirus 1 (Cooper strain). *J. Virol.* **47,** 259-264.

McGeoch, D. J., Dalrymple, M. A., Davison, A. J., Dolan, A., Frame, M. C., McNab [sic], D., Perry, L. J., Scott, J. E., and Taylor, P. (1988). The complete DNA sequence of the long unique region in the genome of herpes simplex virus type 1. *J. Gen. Virol.* **69,** 1531-1574.

McNabb, D. S., and Courtney, R. J. (1992a). Analysis of the UL36 open reading frame encoding the large tegument protein (ICP1/2) of herpes simplex virus type 1. *J. Virol.* **66,** 7581-7584.

McNabb, D. S., and Courtney, R. J. (1992b). Characterization of the large tegument protein (ICP1/2) of herpes simplex virus type 1. *Virology* **190,** 221-232.

Meignier, B., Longnecker, R., Mavromara-Nazos, P., Sears, A. E., and Roizman, B. (1988). Virulence of and establishment of latency by genetically engineered deletion mutants of herpes simplex virus 1. *Virology* **162,** 251-254.

Mettenleiter, T. C., Klupp, B. G., Weiland, F., and Visser, N. (1994). Characterization of a quadruple glycoprotein-deleted pseudorabies virus mutant for use as a biologically safe live virus vaccine. *J. Gen. Virol.* **75,** 1723-1733.

Mettenleiter, T. C., Schreurs, C., Zuckermann, F., Ben-Porat, T., and Kaplan, A. S. (1988). Role of glycoprotein gIII of pseudorabies virus in virulence. *J. Virol.* **62,** 2712-2717.

Meyer, H., Hubert, P. H., and Eichhorn, W. (1987). Changes in restriction enzyme pattern of the equine herpes virus type 1 (EHV-1) strain Rac H DNA during attenuation. *J. Vet. Med. B* **34,** 310-313.

Mullis, K. B., and Faloona, F. A. (1987). Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalysed chain reaction. *Meth. Enzymol.* **155,** 335-350.

Mullis, K. G., Haltiwagner, R. S., Hart, G. W., Marchase, R. B., and Engler, J. A. (1990). Relative accessibility of *N*-acetylglucosamine in trimers of the adenovirus types 2 and 5 fiber proteins. *J. Virol.* **64,** 5317-5323.

Mumford, J. A., and Rossdale, P. D. (1980). Virus and its relationship to the 'poor performance' syndrome. *Equine Vet. J.* **12,** 3-9.

Nicolson, L., Cullinane, A. A., and Onions, D. E. (1990a). The nucleotide sequence of an equine herpesvirus 4 gene homologue of the herpes simplex virus 1 glycoprotein H gene. *J. Gen. Virol.* **71,** 1793-1800.

Nicolson, L., Cullinane, A. A., and Onions, D. E. (1990b). The nucleotide sequence of the equine herpesvirus 4 thymidine kinase gene. *J. Gen. Virol.* **71,** 1801-1805.

Nicolson, L., and Onions, D. E. (1990). The nucleotide sequence of the equine herpesvirus 4 gC gene homologue. *Virology* **179,** 378-387.

Nishiyama, Y., Kurachi, R., Daikoku, T., and Umene, K. (1993). The US 9, 10, 11, and 12 genes of herpes simplex virus type 1 are of no importance for its neurovirulence and latency in mice. *Virology* **194,** 419-423.

Nishiyama, Y., Yamada, Y., Kurachi, R., and Daikoku, T. (1992). Construction of a US3 lac Z insertion mutant of herpes simplex virus type 2 and characterization of its phenotype *in vitro* and *in vivo*. *Virology* **190,** 256-268.

O'Keefe, J. S., Murray, A., Wilks, C. R., and Moriarty, K. M. (1991). Amplification and differentiation of the DNA of an abortigenic (type 1) and respiratory (type 4) strain of equine herpesvirus by the polymerase chain reaction. *Res. Vet. Sci.* **50,** 349-351.

Osterrieder, N., Wagner, R., Brandmüller, C., Schmidt, P., Wolf, H., and Kaaden, O. -R. (1995). Protection against EHV-1 challenge infection in the murine model after vaccination with various formulations of recombinant glycoprotein gp14 (gB). *Virology* **208,** 500-510.

Preston, C. M., Cordingley, M. G., and Stow, N. D. (1984). Analysis of DNA sequences which regulate the transcription of a herpes simplex virus immediate early gene. *J. Virol.* **50,** 708-716.

Prieto, J., Martin Hernamdez, A. M., and Tabares, E. (1991). Loss of pseudorabies virus thymidine kinase activity due to a single base mutation and amino acid substitution. *J. Gen. Virol.* **72,** 1435-1439.

Riggio, M. P., Cullinane, A. A., and Onions, D. E. (1989). Identification and nucleotide sequence of the glycoprotein gB gene of equine herpesvirus 4. *J. Virol.* **63,** 1123-1133.

Robertson, G. R., Scott, N. A., Miller, J. M., Sabine, M., Zheng, M., Bell, C. W., and Whalley, J. M. (1991). Sequence characteristics of a gene in equine herpesvirus 1 homologous to glycoprotein H of herpes simplex virus. *DNA Sequence* **1,** 241-249.

Robertson, G. R., and Whalley, J. M. (1988). Evolution of the herpes thymidine kinase gene: Identification and comparison of the equine herpesvirus 1 thymidine kinase gene reveals similarity to a cell-encoded thymidylate kinase. *Nucleic Acids Res.* **16,** 11303-11317.

Roizman, B., and Sears, A. E. (1990). Herpes simplex viruses and their replication. *In* "Virology" (B. N. Fields, D. M. Knife, R. M. Chanock, M. S. Hirsh, J. L. Melnick, T. P. Monath, and B. Roizman, Eds), pp. 1795-1841, Raven Press, New York.

Rollinson, E. A., and White, G. (1983). Relative activities of acyclovir and BW759 against Aujeszky's disease and equine rhinopneumonitis viruses. *Antimicrob. Agents Chemother.* **24,** 221-226.

Sabine, M., Robertson, G. R., and Whalley, J. M. (1981). Differentiation of subtypes of equine herpesvirus-1 by restriction endonuclease analysis. *Aust. Vet. J.* **57,** 148-149.

Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A., and Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of β-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230,** 1350-1354.

Sakaguchi, M., Urakawa, T., Hirayama, Y., Miki, N., Yamamoto, M., Zhu, G. -S., and Hirai, K.

(1993). Marek's disease virus protein kinase gene identified within the short unique region of the viral genome is not essential for viral replication in cell culture and vaccine-induced immunity in chickens. *Virology* **195,** 140-148.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Schmitz, G. G., Walter, T., Seibl, R., and Kessler, C. (1991). Nonradioactive labeling of oligonucleotides *in vitro* with the hapten digoxigenin by tailing with terminal transferase. *Anal. Biochem.* **192,** 222-231.

Serafini-Cessi, F., Malagolini, N., Dall'Olio, F., Pereira, L., and Campadelli-Fiume, G. (1985). Oligosaccharide chains of herpes simplex virus type 2 glycoprotein pG.2. *Arch. Biochem. Biophys.* **240,** 866-876.

Sharma, P. C., Cullinane, A. A., Onions, D. E., and Nicolson, L. (1992). Diagnosis of equid herpesviruses -1 and -4 by polymerase chain reaction. *Equine Vet. J.* **24,** 20-25.

Shimizu, T., Ishizaki, R., Ishii, S., Kawakami, Y., Kaji, R., Sugimura, K., and Matumoto, M. (1959). Isolation of equine abortion virus from natural cases of equine abortion in horse kidney cell culture. *Jpn. J. Exp. Med.* **29,** 643-649.

Shimizu, T., Ishizaki, R., and Matumoto, M. (1963). Serological survey of equine rhinopneumonitis virus infection among horses in Japan. *Jap. J. Exp. Med.* **33,** 133-147.

Slater, J. D., Gibson, J. S., and Field, H. J. (1993). Pathogenicity of a thymidine kinase-deficient mutant of equine herpesvirus 1 in mice and specific pathogen-free foals. *J. Gen. Virol.* **74,** 819-828.

Southern, E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98,** 503-517.

Stokes, A., Allen, G. P., Pullen, L. A., and Murray, P. K. (1989). A hamster model of equine herpesvirus type 1 (EHV-1) infection; passive protection by monoclonal antibodies to EHV-1 glycoproteins 13, 14 and 17/18. *J. Gen. Virol.* **70,** 1173-1183.

Stokes, A., Coreyn, A. H., Pullen, L. A., Doel, T. R., Meredith, D. M., Killington, R. A., Halliburton, I. W., Whittaker, G. R., Wheldon, L. A., Nicolson, L., Onions, D. E., Allen, G. P., and Murray, P. K. (1991). Studies on glycoprotein 13 (gp13) of equid herpesvirus 1 using affinity-purified gp13, glycoprotein-specific monoclonal antibodies and synthetic peptides in a hamster model. *J. Gen. Virol.* **72,** 923-931.

Studdert, M. J. (1983). Restriction endonuclease DNA fingerprinting of respiratory, foetal and perinatal foal isolates of equine herpesvirus type 1. *Arch. Virol.* **77,** 249-258.

Studdert, M. J., Fitzpatrick, D. R., Browning, G. F., Cullinane, A. A., and Whalley, J. M. (1986). Equine herpesvirus genomes: heterogeneity of naturally occurring type 4 isolates and of a type 1 isolate after heterologous cell passage. *Arch. Virol.* **91,** 375-381.

Studdert, M. J., Fitzpatrick, D. R., Horner, G. W., Westbury, H. A., and Gleeson, L. J. (1984). Molecular epidemiology and pathogenesis of some equine herpesvirus type 1 (equine abortion virus) and type 4 (equine rhinopneumonitis virus) isolates. *Aust. Vet. J.* **61,** 345-348.

Studdert, M. J., Simpson, T., and Roizman, B. (1981). Differentiation of respiratory and abortigenic isolates of equine herpesvirus 1 by restriction endonucleases. *Science* **214,** 562-564.

Sun, Y., and Brown, S. M. (1994). The open reading frames 1, 2, 71, and 75 are nonessential for the replication of equine herpesvirus type 1 *in vitro*. *Virology* **199,** 448-452.

Sun, Y., MacLean, A. R., Dargan, D., and Brown, S. M. (1994). Identification and characterization of the protein product of gene 71 in equine herpesvirus 1. *J. Gen. Virol.* **75,** 3117-3126.

Telford, E. A. R., Watson, M. S., McBride, K., and Davison, A. J. (1992). The DNA sequence of equine herpesvirus-1. *Virology* **189,** 304-316.

Tenser, R. B., Ressel, S. J., Fralish, F. A., and Jones, J. C. (1983). The role of pseudorabies virus thymidine kinase expression in trigeminal ganglion infection. *J. Gen. Virol.* **64,** 1369-1373.

Tewari, D., Nair, S. V., de Ungria, M. C., Lawrence, G. L., Hayden, M., Love, D. N., Field, H. J., and Whalley, J. M. (1995). Immunization with glycoprotein C of equine herpesvirus-1 is associated with accelerated virus clearance in a murine model. *Arch. Virol.* **140,** 789-797.

Thomson, G. R., Mumford, J. A., Campbell, J., Griffiths, L., and Edington, N. (1976). Serological detection of equid herpesvirus 1 infections of the respiratory tract. *Equine Vet. J.* **8,** 58-65.

Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and application. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76,** 4350-4354.

Tuffereau, C., Leblois, H., Benejan, J., Coulon, P., Lafay, F., and Flamand, A. (1989). Arginine or lysine in position 333 of ERA and CVS glycoprotein is necessary for rabies virulence in adult mice. *Virology* **172,** 206-212.

Turtinen, L. W., Allen, G. P., Darlington, R. W., and Bryans, J. T. (1981). Serologic and molecular comparisons of several equine herpesvirus type 1 strains. *Am. J. Vet. Res.* **42,** 2099-2104.

Umene, K., Watson, R. J., and Enquist, L. W. (1984). Tandem repeated DNA in an intergenic region of herpes simplex virus type 1 (Patton). *Gene* **30,** 33-39.

Wagenaar, F., Pol, J. M. A., Peeters, B., Gielkens, A. L. J., de Wind, N., and Kimman, T. G. (1995). The US3-encoded protein kinase from pseudorabies virus affects egress of virions

from the nucleus. *J. Gen. Virol.* **76,** 1851-1859.

Weber, P. C., Levine, M., and Glorioso, J. C. (1987). Rapid identification of nonessential genes of herpes simplex virus type 1 by Tn5 mutagenesis. *Science* **236,** 576-579.

Welch, H. M., Bridges, C. G., Lyon, A. M., Griffiths, L., and Edington, N. (1992). Latent equid herpesviruses 1 and 4: detection and distinction using the polymerase chain reaction and co-cultivation from lymphoid tissues. *J. Gen. Virol.* **73,** 261-268.

Westrop, G. D., Wareham, K. A., Evans, M. A., Dunn, G., Minor, P. D., Magrath, D. I., Taffs, F., Marsden, S., Skinner, M. A., Schild, G. C., and Almond, J. W. (1989). Genetic basis of attenuation of the Sabin type 3 oral poliovirus vaccine. *J. Virol.* **63,** 1338-1344.

Whalley, J. M., Robertson, G. R., and Davison, A. J. (1981). Analysis of the genome of equine herpesvirus type 1: arrangement of cleavage sites for restriction endonucleases *Eco* RI, *Bgl* II, and *Bam* HI. *J. Gen. Virol.* **57,** 307-323.

Whalley, J. M., Robertson, G. R., Scott, N. A., Hudson, G. C., Bell, C. W., and Woodworth, L. M. (1989). Identification and nucleotide sequence of a gene in equine herpesvirus 1 analogous to the herpes simplex virus gene encoding the major envelope glycoprotein gB. *J. Gen. Virol.* **70,** 383-394.

Whitford, M., and Faulkner, P. (1992). A structural polypeptide of the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus contains O-linked *N*-acetylglucosamine. *J. Virol.* **66,** 3324-3329.

Whittaker, G. R., Bonass, W. A., Elton, D. M., Halliburton, I. W., Killington, R. A., and Meredith, D. M. (1992). Glycoprotein 300 is encoded by gene 28 of equine herpesvirus type 1: a new family of herpesvirus membrane proteins? *J. Gen. Virol.* **73,** 2933-2940.

Whittaker, G. R., Riggio, M. P., Halliburton, I. W., Killington, R. A., Allen, G. P., and Meredith, D. M. (1991). Antigenic and protein sequence homology between VP 13/14, a herpes simplex virus type 1 tegument protein, and gp 10, a glycoprotein of equine herpesvirus 1 and 4. *J. Virol.* **65,** 2320-2326.

Whittaker, G. R., Wheldon, L.A., Giles, L. E., Stocks, J. M., Halliburton, I. W., Killington, R. A., and Meredith, D. M. (1990). Characterization of the high Mr glycoprotein (gP 300) of equine herpesvirus type 1 as a novel glycoprotein with extensive O-linked carbohydrate. *J. Gen. Virol.* **71,** 2407-2416.

Wilks, C. R., and Coggins, L. (1977). Protective immunity in equine herpesvirus type-1 infection of hamsters. *Cornell Vet.* **67,** 385-403.

Wong, S. W., and Schaffer, P. A. (1991). Elements in the transcriptional regulatory region flanking herpes simplex virus type 1 *ori*S stimulate origin function. *J. Virol.* **65,** 2601-2611.

Yalamanchili, R. R., and O'Callaghan, D. J. (1990). Sequence and organization of the genomic termini of equine herpesvirus type 1. *Virus Res.* **15,** 149-162.

Yalamanchili, R. R., Raengsakulrach, B., Baumann R. P., and O'Callaghan, D. J. (1990). Identification of the site of recombination in the generation of the genome of DI particles of equine herpesvirus type 1. *Virology* **175,** 448-455.

Yeargan, M. R., Allen, G. P., and Bryans, J. T. (1985). Rapid subtyping of equine herpesvirus 1 with monoclonal antibodies. *J. Clin. Microbiol.* **21,** 694-697.

Zuckermann, F. A., Mettenleiter, T. C., Schreurs, C., Sugg, N., and Ben-Porat, T. (1988). Complex between glycoproteins gI and gp63 of pseudorabies virus: its effect on virus replication. *J. Virol.* **62,** 4622-4626.

Genetic diagnosis for equine herpesvirus-1 (EHV-1) infection and viral genomic analysis of EHV-1 isolates in Japan and attenuated EHV-1 strains

RIKIO KIRISAWA

Department of Veterinary Microbiology, School of Veterinary Medicine, Rakuno Gakuen University, Ebetsu, Hokkaido 069, Japan

Equine herpesvirus-1 (EHV-1), a member of the subfamily *Alphaherpesvirinae*, has long been causally implicated in the occurrence of abortion, respiratory disease, neonatal deaths and neurological disorders in horses. Antigenically related equine herpesvirus-4 (EHV-4), a member of the same subfamily, is primarily a causative agent of respiratory disease and, occasionally, abortion. Outbreaks of abortion due to EHV-1 have been observed almost every year and causes severe economic losses in the horse breeding industry. In attempts to prevent EHV-1 infection, inactivated vaccine was applied to pregnant mares but with little efficacy. A safe and effective vaccine is necessary to protect horses from diseases associated with EHV-1, particularly abortion.

The purpose of the present study was to establish polymerase chain reaction (PCR) technique as rapid and sensitive method to the detection and identification of EHV-1 and EHV-4 to control the spread of the infections, and to investigate the electropherotype of Japanese field isolates of EHV-1 before and after vaccine use and to determine the variable regions of the viral genome among the viruses. In addition, the genomes of virulent and attenuated EHV-1 strains were compared to delineate the architectural differences as a step toward elucidating the potential relationship between pathogenicity and passage-induced alterations incurred at the genomic level and an estimated virulence factor was investigated by constructions of recombinant EHV-1

viruses for a live vaccine development.

The results of the experiments were summarized as follows:

1. Detection and identification of EHV-1 and EHV-4 by PCR.

A rapid method for detection and identification of EHV-1 and EHV-4 was developed using PCR. Primers for PCR were designed from aligned nucleotide sequences of glycoprotein B genes of both viruses to amplify specific regions for EHV-1 or EHV-4. By using type specific primer mixture, amplified fragments were identified as EHV-1 or EHV-4 in a one-step reaction. This technique was applied on specimens from aborted fetuses. There was complete accordance between the results of PCR and virus isolation. The PCR system could differentiate the two virus types rapidly in a one-step reaction.

2. The genomic diversity among EHV-1 strains isolated in Japan.

The DNAs from nine field isolates of EHV-1 in Japan were analyzed by digestion with the restriction endonuclease *Bam* HI and Southern hybridization. EHV-1 DNA was cleaved to 20 fragments (fragments A - T) by *Bam* HI digestion. Comparing restriction profiles among the EHV-1 strains, there was no considerable difference between isolates before and after vaccine application, but some minor variations in the mobility of *Bam* HI fragments were observed. Eight fragments (*Bam* HI A, D, E, N, P, QR, S and T) were identified as variable fragments in molecular weight among the nine isolates by Southern blot analysis. The variability of the A fragment has not been reported yet.

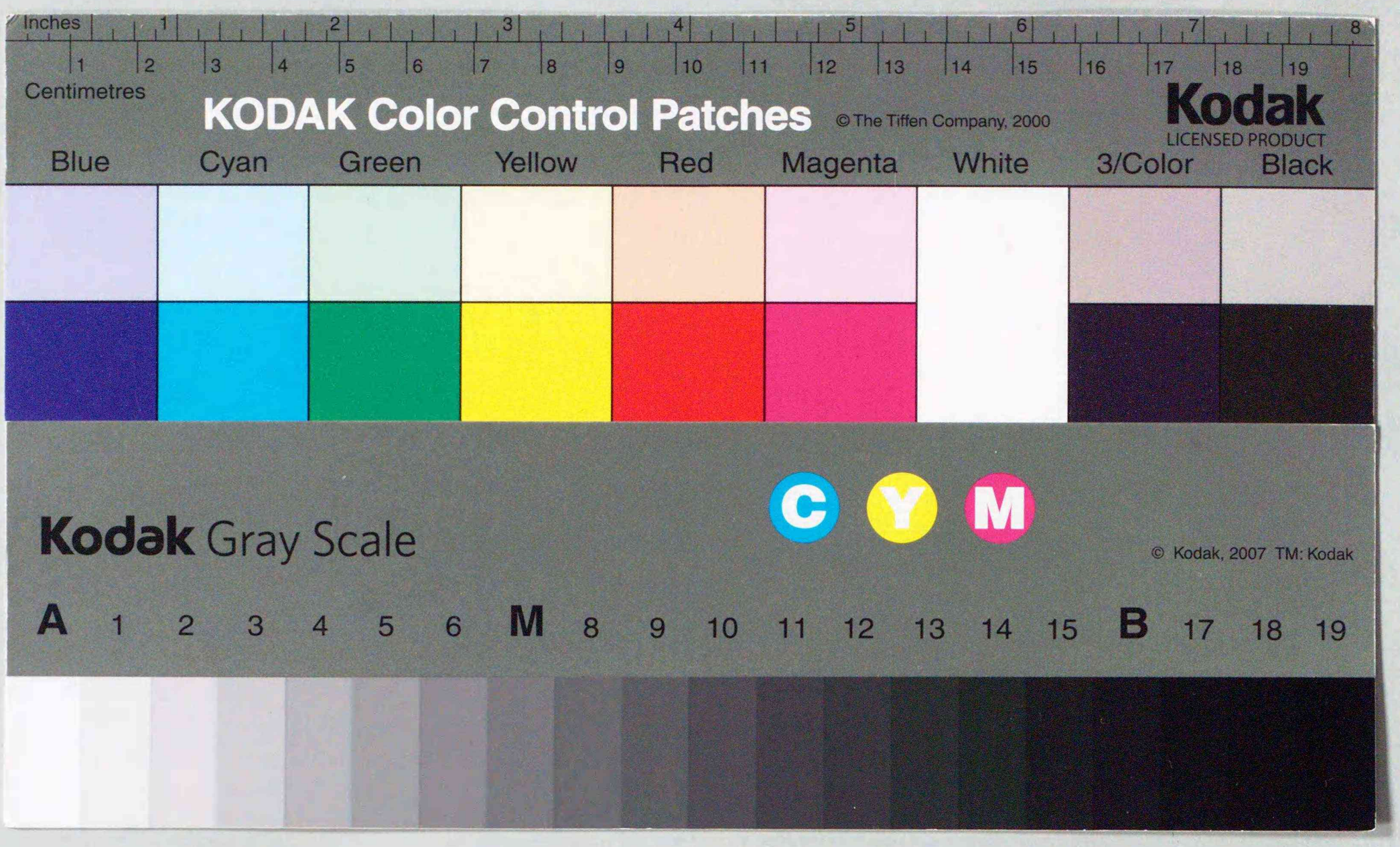
3. Comparison of the genomes of attenuated EHV-1 strains with their parent virulent strain.

To elucidate the virulence factor of EHV-1, the genomic architecture of the HH1 strain, the first Japanese isolate of EHV-1, was compared with that of its four

descendant strains obtained by serial passage in bovine kidney (BK) cells, i.e., BK77, BK161, BK271 and BK343. In preliminary studies high-passaged BK271 and BK343 lost virulence in colts, and in the present study digestion with restriction endonuclease *Bam* HI showed that the DNAs of BK271 and BK343 differed markedly from the DNA profiles of HH1, BK77 and BK161. BK343 involved nine variable fragments, i.e., *Bam* HI A, B, D, E, N, P, QR, S and T. Among the genes located in the variable fragments, three genes (1, 24 and 71) were found to have changed via serial passage in the BK cells. Nucleotide sequence analysis revealed that the three genes contained a different number of copies of repeat sequences compared to those of the genes of HH1. In addition, the gene 71 had two point mutations which affected the amino acid sequences. Thus these three genes are thought to play an important role on the pathogenicity of EHV-1.

4. Characterization of gene 71 mutants of EHV-1 in cell cultures and the lungs of mice.

The direct relationship of the gene 71 of EHV-1 with virulence was analyzed by constructing three recombinant EHV-1 viruses by homologous recombination. The gene 71 of EHV-1 HH1 strain was replaced by the mutant gene 71 of BK343, and designated 3F-71. The β-galactosidase (β -gal) gene of *Escherichia coli* was inserted within the gene 71 coding sequences of HH1 and designated β-71. Revertant virus, Res-71, was constructed by replacing the fusion gene 71 of β -71 with the gene 71 of HH1. Virus replications of these recombinant viruses in cell cultures were not affected, but release of β -71 from infected cells was partially affected compared to the other viruses. After intranasal infection of mice with the viruses, lung virus titers were determined. The growth abilities of β -71 were reduced to the level of BK343 and the titers were about 100 times lower than those of 3F-71, Res-71 and HH1. These results indicated that inactivation of the gene 71 affected the virulence of EHV-1. However, the mutant gene 71 of BK343 alone did not confer the attenuated nature to EHV-1.


Inches
1 2 3 4 5 6 7 8
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19
Centimetres
KODAK Color Control Patches
© The Tiffen Company, 2000
Kodak
LICENSED PRODUCT
Blue
Cyan
Green
Yellow
Red
Magenta
White
3/Color
Black
Kodak Gray Scale
C
Y
M
© Kodak, 2007 TM: Kodak
A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19