

한국인 인면역결핍 바이러스의 V3 Loop 염기서열 분석 및 계통발생학적 분석

¹서강대학교 생명과학과, ²중근당 종합연구소, ³울산의대 미생물학교실

김영봉^{1,2} · 조영걸³ · 이희정³ · 정구현² · 김정우² · 김유겸³ · 양재명¹

=Abstract=

Sequence and Phylogenetic Analysis of V3 Region of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Strains Isolated from Korean Patients

Young-Bong Kim^{1,2}, Young-Keol Cho³, Hee-Jung Lee³, Koo-Hun Chung², Jung-Woo Kim², Yoo-Kyum Kim³ and Jai-Myung Yang¹

¹Department of Life Science, University of Sogang, ²Chong Kun Dang Research Institute,

³Department of Microbiology, College of Medicine, University of Ulsan

The V3 loop, a hypervariable domain of envelope glycoprotein, has an essential role in viral infectivity and has a major epitope for type-specific neutralizing antibody. In order to investigate genetic diversity of V3 region of gp120 of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) isolated from Korean patients, DNA sequences encoding the C2 to V3 region were amplified by nested polymerase chain reaction (PCR) from uncultured peripheral blood mononuclear cells obtained from 15 HIV-1 seropositive patients and nucleotide sequences were determined. All nucleotide sequences from fifteen patients were compared with 8 distinctive subtypes (A-H) and another subtype O. Phylogenetic analysis was carried out with PHYLIP ver 3.5 (Dnapars) program. Of the 15 isolates, 14 HIV-1 subjects were clustered with subtype B, while one was clustered with subtype C. Intra-subtype B distance at the nucleotide and deduced amino acid level were maximum 17.7% and 37.0%, respectively. Intra-patient distance at the nucleotide and deduced amino acid level were maximum 7.3% and 17.8%, respectively. Analysis of the nucleotide sequences revealed that Korean types have relatively well conserved sequences. These findings could be useful for assessing the source of infection and developing an AIDS vaccine.

Key Words: HIV, V3 loop, Subtype, Phylogenetic analysis.

서 론

후천성 면역 결핍증의 원인 바이러스인 인면역결핍 바이러스 (Human Immunodeficiency Virus type 1, HIV-1)는 특이적으로 변이가 심한 외피 당단백질 (gp120)을 지니며 특히 변이가 심한 세번째 변이부분을 V3 loop라 한다. V3 loop는 바이러스가 숙주세포에 감염하는데 중요한

역할을 하며 형특이 중화 항체 (type-specific neutralizing antibody)에 대한 주요 항원 epitope로 작용한다 [1-4]. V3 외피 당단백질에 대한 항체는 침팬지에 있어 감염을 억제하였으며 in vitro 에서 형특이적으로 바이러스의 세포감염을 억제함이 알려졌다 [5,6]. 변이가 심한 V3 env 유전자는 변이 정도에 따라 감염원의 전파방향 및 지역적 분포를 알려주는 분자역학의 기초 자료가 되며 각 바이러스간의 계통학적 분석을 가능하게 해

준다 [7-10].

HIV-1 subtype들은 주로 V3를 포함한 env 유전자와 gag 유전자의 염기서열분석에 의해 결정되며 [11,12], 그 외 분류 방법에는 DNA heteroduplex mobility assay 방법과 합성 펩타이드를 이용한 serotyping 방법이 있다 [13-15]. Myers 등은 HIV-1 env와 gag 유전자 염기서열에 따라 HIV-1을 크게 M 과 O 그룹으로 나누었으며, M 그룹은 major 그룹으로 8개의 subtype (subtype A-H) 로 분류하였다 [16]. 이들 subtype들은 지역적 위치에 따라 특징적으로 분포하고 있다. 예를 들면 HIV-1 subtypes A 와 C, D는 아프리카와 인도에 주로 분포하고, subtypes E 와 F, G는 태국 및 남아메리카와 아프리카에 각각 분포하고 있다 [11,17-23]. Subtype B는 북아메리카와 유럽에 주로 분포하고 있으며 아시아 일부 국가에서도 주요 바이러스주로 나타나고 있다 [16,24,25].

한국에서는 1985년 HIV 감염자가 처음 보고된 이래 매년 그 수가 증가하여 1996년 6월말까지 모두 570명이 감염자로 보고되었다. 이들의 역학적 감염 경로는 37.7%가 국외에서 감염이 되었고 나머지는 모두 국내에서 감염된 것으로 보고되고 있으나 [26], 정확한 감염 경로 및 국내 유행주에 대한 연구가 되어 있지 않은 실정이다. 따라서 본 연구는 국내 HIV-1 감염자 15명의 말초혈액 단핵 세포로부터 env 유전자의 C2/V3 부위의 염기 분석을 통해 바이러스의 유전적 변이와

계통 발생학적 분류를 알아보았다.

재료 및 방법

1. 대 상

1988년에서 1992년사이 국립보건원에서 혈청 검사를 통해 보고된 HIV-1 감염자중 임의로 20명을 선정하였다. 전체 검체 21건 중 16건에서 증폭된 유전자 산물을 얻을 수 있었으며 그중 2건은 동일 감염자 (KR13, KR14)로 부터 6개월 간격을 두고 분리된 것이다. 연구가 수행된 15명의 남녀 성비는 11:4 이며 감염자의 면역학적 수치는 Table 1과 같다. 이중 12명은 무증상감염자이며 3명은 검체 채취 후 본 연구 수행전 AIDS 나 AIDS관련 질환으로 사망하였다. 감염경로는 KR16을 제외한 14명 모두 국내에서 감염된 예들로 역학적 조사는 Table 1과 같다.

2. 말초혈액 단핵 세포 분리

EDTA가 처리된 진공시험관 (Becton Dickinson BD사 Lincoln Park, NJ) 에 감염자로부터 전혈을 채취한 후 동량의 3% dextran이 함유된 phosphate buffered saline (PBS)을 섞어 30분간 상온에 방치하였다. 비중이 높은 적혈구 세포가 아래층에 떨어진 말초혈액 단핵 세포가 많은 상층액을 분리하였다. 말초혈액 단핵세포만을 원심 분리한 후 2ml 용혈용액 (FACS Lysing solution, BD

Table 1. Characteristics of 15 HIV-1 infected patients

No. of Patient	Sex age ^a	Route of infection	Location of infection	Year of HIV Diagnosis	CD4+T cell count(/ul)	Subtype of HIV-1
KR1	F 37	Heterosexual	Domestic	1988	<200	B
KR2	F 41	Heterosexual	Domestic ^b	1992	>500	C
KR3	M 14	Transfusion ^c	Domestic	1991	200-500	B
KR4	M 20	Homosexual	Domestic	1992	>500	B
KR5	M 22	Homosexual	Domestic	1992	>500	B
KR6	M 47	Homosexual	Domestic	1992	200-500	B
KR7	M 32	Homosexual	Domestic	1990	200-500	B
KR8	M 26	Homosexual	Domestic	1992	200-500	B
KR9	F 32	Heterosexual	Domestic ^b	1991	200-500	B
KR10	M 25	Homosexual	Domestic	1992	>500	B
KR11	F 31	Heterosexual	Domestic	1986	<200	B
KR12	M 40	Homosexual	Domestic	1992	<200	B
KR13	M 28	Homosexual	Domestic	1992	200-500	B
KR14 ^d	"	"	"	"	"	B
KR15	M 28	Homosexual	Domestic	1992	<200	B
KR16	M 29	Heterosexual	Overseas	1988	>500	B

^athe age at the time of HIV diagnosis, ^bfrom husband(overseas sailor), ^ctransfusion-associated transmission, ^dfrom the same patient as the KR13 after 6 month.

Table 2. Nucleotide and Amino acid Similarity in the C₂/V₃ region of HIV-1 isdated from Korean patients Similarity distance matrices are showing pairwise comparisons of nucleotide (lower half) and amino acid (upper half) sequences.

KR	1-1	1-2	1-3	2-1	2-3	3-1	3-2	3-3	4-1	5-3	6-1	6-5	7-1	7-3	7-4	8-2	8-4	8-6	9-1	9-2	10-1	11-1	12-1	12-2	13-3	14-1	15-1	16-1	
1-1	82.2	86.3	61.6	63.0	71.2	69.9	76.7	74.0	71.2	64.4	67.1	68.5	71.2	72.6	72.6	69.9	72.6	74.0	74.0	69.9	71.2	63.0	67.1	74.0	72.6	72.6	67.1		
1-2	92.7 ^a	95.9	67.1	68.5	71.2	69.9	75.3	72.6	69.9	64.4	67.1	68.5	71.2	72.6	71.2	68.5	71.2	74.0	74.0	69.9	72.6	67.1	67.1	79.5	80.8	74.0	69.9		
1-3	94.5	97.3	68.5	69.9	74.0	72.6	78.1	75.3	72.6	67.1	69.9	71.2	74.0	75.3	74.0	71.2	74.0	76.7	76.7	72.6	75.3	67.1	67.1	79.5	80.8	74.0	69.9		
2-1	75.2	77.8	76.4	94.5	78.1	74.0	71.2	75.3	74.0	75.3	76.7	72.6	72.6	74.0	74.0	72.6	74.0	69.9	69.9	74.0	72.6	68.5	69.9	71.2	72.6	72.6	75.3		
2-3	75.0	77.7	77.7	97.7	79.5	75.3	76.7	76.7	75.3	76.7	78.1	74.0	74.0	75.3	75.3	74.0	75.3	71.2	71.2	75.3	74.0	69.9	71.2	72.6	74.0	74.0	76.7		
3-1	83.2	84.1	85.0	84.6	84.5	94.5	93.2	93.2	89.0	86.3	89.0	91.8	91.8	93.2	91.8	90.4	91.8	82.2	82.2	93.2	80.8	86.3	86.3	82.2	83.6	89.0	86.3		
3-2	84.5	85.9	86.8	81.4	81.4	96.4	93.2	93.2	89.0	84.9	89.0	93.2	93.2	94.5	91.8	89.0	91.8	79.5	79.5	93.2	79.5	87.7	86.3	80.8	82.2	89.0	89.0		
3-3	87.3	88.2	88.2	81.0	81.0	95.0	96.8	97.3	93.2	84.9	89.0	90.4	93.2	94.5	95.9	93.2	95.9	83.6	83.6	91.8	86.3	84.9	87.7	87.7	87.7	95.9	89.0		
4-1	85.9	86.8	87.7	80.5	80.0	84.5	96.4	98.6	93.2	84.9	89.0	90.4	93.2	94.5	93.2	90.4	93.2	80.8	80.8	91.8	83.6	84.9	87.7	84.9	84.9	93.2	89.0		
5-3	85.9	85.9	86.8	81.0	80.5	93.2	95.0	96.4	95.9	89.0	93.2	90.4	90.4	91.8	91.8	89.0	91.4	79.5	79.5	93.2	82.2	84.9	87.7	80.8	80.8	91.8	90.4		
6-1	82.3	83.2	84.1	81.9	80.5	91.8	93.6	92.7	92.3	94.5	95.9	86.3	84.9	86.3	84.9	82.2	84.9	74.0	74.0	89.0	76.7	83.6	80.8	74.0	75.3	83.6	83.6		
6-5	82.3	84.1	85.0	81.9	81.4	93.2	95.0	94.1	93.6	95.9	98.6	90.4	89.0	90.4	89.0	86.3	89.0	76.7	76.7	93.2	79.5	87.7	84.9	76.7	78.1	87.7	87.7		
7-1	85.5	86.4	87.3	80.5	80.5	94.5	96.4	95.5	95.0	95.5	94.5	95.9	94.5	95.9	91.8	89.0	91.8	79.5	79.5	94.5	94.5	91.8	78.1	79.5	91.8	89.0	89.0		
7-3	86.4	87.3	88.2	80.5	80.5	95.0	96.8	96.4	95.9	95.5	93.6	95.0	98.2	98.6	89.0	86.3	89.0	78.1	78.1	91.8	79.5	89.0	86.3	82.2	82.2	89.0	89.0		
7-4	86.8	87.7	88.6	81.0	80.9	95.5	96.8	96.4	95.9	94.1	95.5	98.6	99.5	90.4	87.7	90.4	79.5	79.5	93.2	80.8	90.4	87.7	82.2	83.6	90.4	90.4			
8-2	86.3	86.3	87.2	80.5	80.4	94.5	96.3	87.7	96.4	96.4	92.3	93.6	95.0	95.0	95.4	97.3	100.	83.6	83.6	93.2	82.2	86.3	89.0	83.6	83.6	94.5	87.7		
8-4	85.8	85.8	86.8	80.0	79.9	94.1	95.9	97.3	95.9	95.9	91.8	93.2	94.5	94.5	95.0	99.5	97.3	82.2	82.2	90.4	79.5	83.6	86.3	80.8	80.8	91.8	84.9		
8-6	86.3	86.3	87.2	80.5	80.4	94.5	96.3	97.7	96.3	96.3	92.2	93.6	95.0	95.0	95.4	100	99.5	83.6	83.6	93.2	80.8	90.4	87.7	82.2	83.6	94.5	87.7		
9-1	85.9	86.8	87.7	80.5	80.5	91.8	93.2	95.5	94.1	94.5	90.5	91.4	92.7	92.7	93.2	95.4	95.0	95.4	100	80.8	79.5	78.1	82.2	79.5	79.5	80.8	75.3		
9-2	86.3	87.3	88.2	79.2	79.1	88.6	90.0	91.8	90.5	90.9	87.7	88.6	90.0	90.0	90.5	91.8	91.3	91.8	98.5	80.8	79.5	78.1	82.2	79.5	79.5	80.8	75.3		
10-1	84.5	85.5	86.4	80.5	83.6	94.5	96.4	95.5	95.0	95.5	94.5	95.9	97.3	96.4	96.8	95.0	94.5	95.0	92.7	90.0	78.1	89.0	89.0	79.5	80.8	90.4	90.4		
11-1	82.3	83.2	84.1	78.3	77.7	87.7	87.7	90.0	88.6	89.1	85.5	86.4	87.7	87.7	88.2	89.1	88.6	89.1	89.5	87.7	87.7	75.3	76.7	86.3	86.3	84.9	78.1		
12-1	83.6	85.5	85.5	79.6	79.5	92.7	94.5	93.6	93.2	93.6	93.6	95.0	98.2	96.4	96.8	93.2	92.7	93.2	91.8	89.1	95.5	85.9	91.8	76.7	78.1	86.3	86.3		
12-2	85.0	85.9	85.9	78.7	78.6	92.7	94.5	95.0	94.5	95.0	91.8	93.2	96.4	95.0	95.5	95.0	94.5	95.0	93.2	90.9	94.5	87.3	96.4	78.1	78.1	89.0	86.3		
13-3	85.5	87.3	87.3	80.1	80.0	88.6	90.5	92.7	91.4	90.5	86.8	87.7	89.1	90.0	90.5	91.8	91.3	91.8	92.3	90.0	89.1	90.0	88.2	89.5	97.3	83.6	82.2		
14-1	84.5	87.3	87.3	80.5	80.5	89.1	90.9	92.3	90.9	90.0	87.3	88.2	89.5	90.9	90.9	91.3	90.9	91.3	91.8	89.5	90.5	89.5	88.6	89.1	98.6	83.6	83.6		
15-1	86.4	87.3	87.3	79.6	79.5	94.1	95.9	98.2	96.8	96.4	92.7	94.1	96.4	95.9	95.9	97.3	96.8	97.3	95.5	90.9	95.5	90.0	94.5	95.9	91.8	91.4	87.7		
16-1	84.5	85.5	85.5	79.6	79.5	93.2	95.9	95.5	95.0	95.5	92.7	94.1	95.5	95.5	95.9	94.5	94.1	94.5	92.7	89.1	95.5	86.8	94.5	95.0	90.0	89.5	95.5		

a indicate the percentage of homology of nucleotide between 1-1 and 1-2

사) 으로 10분간 반응 후 PBS로 세척하여 적혈구 세포가 제거된 말초혈액 단핵 세포만을 얻어 실험전까지 10% DMSO가 첨가된 PBS에 섞어 -70℃에 보관하였다.

3. Proviral DNA로 부터 HIV env 유전자 증폭

분리된 말초혈액 단핵세포로부터 template DNA를 얻기 위해 Sauvaigo의 방법을 이용 세포를 파쇄한 후 nest PCR을 통해 env 유전자를 증폭하였다 [27]. 말초혈액 단핵 세포 (약10⁷개) 에 lysis buffer (50 mM KCl, 10 mM Tris HCl [pH8.3], 0.5% Tween 20, 200ug proteinase K [Boehringer-Mannheim Indianapolis, IN] per ml) 500ul를 첨가하여 56℃에서 1시간 반응시킨후 Proteinase K의 활성을 제거하기 위해 95℃에서 10분간 가열하

였다. HIV-1 env 유전자 gp120의 C2와 V3 부위를 증폭하기 위해 파쇄된 lysate를 정제과정없이 nest PCR을 위한 template로 사용하였다. 첫번째 PCR은 반응액 50ul당 5ul의 PBMC lysate, 각각 50pM 일차 primer쌍 (G5,G6), 250uM dNTPs, 2.5 units의 Taq polymerase (Boehringer-Mannhem)를 넣고 Perkin-Elmer사 thermal cyler (Perkin-Elmer 2400)로 30회 주기로 증폭하였다. PCR조건은 처음 94℃ 1분간, 53℃ 2분, 72℃ 3분이며 이차 nest PCR조건도 동일하였다. 이차 PCR은 template로 일차 반응 산물 5ul를 사용했고 primer쌍은 G7과 G8을 사용하였다. 일차 primer쌍은 G5; CTTAAGGGATCAAAGCCTAAAGCCATGT (nucleotide, 6550-6577)과 G6; AGTAGAAGAAT-TCCCCTCCACAATC (nucleotide, 7343-7367)이며,

안쪽 이차 primer쌍은 G7; TGCTGTTGAATGGC-AGTGTAG- CAGAA (nucleotide, 6990-7015)과 G 8; GGAATTCCATTTTGCTCT-AC-TAATGTTACAA (nucleotide 7204-7234)로서 표지된 수는 Los Alamos HIV Database의 pNL4-3 sequence를 기준으로 하였다.

4. 클로닝 및 nucleotide sequence 분석

Nest PCR을 통해 증폭된 약 240bp 유전자 산물은 pGEM-T 벡터 (Promega 사, madison, WI)에 클로닝 되어 *Escherichia coli* JM-109 competent 세포를 형질 전환시켰다. Recombinant 벡터에 의해 형질 전환된 *E. coli* 는 50 ug/ml 의 ampicillin을 첨가한 MacConkey agar (Difco, Detroit, MI) 에서 white colony를 형성하였고, 이로부터 G7과 G8 primer쌍을 이용하여 colony PCR을 통해 insert 유전자가 들어간 것을 확인하였다. Plasmid DNA는 Wizard mini-prep(Promega 사)을 이용 분리한 후 G7과 G8 primer를 각각 이용하여 두 가닥의 상보적인 DNA의 염기서열을 Sanger방법으로 결정하였다 [28].

5. 계통학적 분석 (phylogenetic analysis)

각 클론들의 염기서열은 DNAsis version 7.0 프로그램을 이용하여 저장 분석하였다. Los Alamos National Laboratory의 Genbank database에서 제공된 각 subtype들의 대표적인 바이러스의 염기서열을 기준으로 본 연구에서 분석된 바이러스의 염기서열을 정돈하였다. PHYLIP (version 3.5)을 이용하여 이들 염기서열들의 계통수 및 subtype을 Dnapars 프로그램에서 subtype O인 ANT70 을 outgroup으로 하여 분석하였다 [29].

6. Nucleotide sequence accession number

염기서열이 밝혀진 각 클론의 데이터는 인터넷을 통해 European Molecular Biology Laboratory (EMBL)에 등록하여 다음과 같은 Genbank accession number들을 받았다: X93580, X94109-94115.

결과 및 성적

Nucleotide Sequence 분석

국내 HIV-1 바이러스의 유전적 변이와 계통발

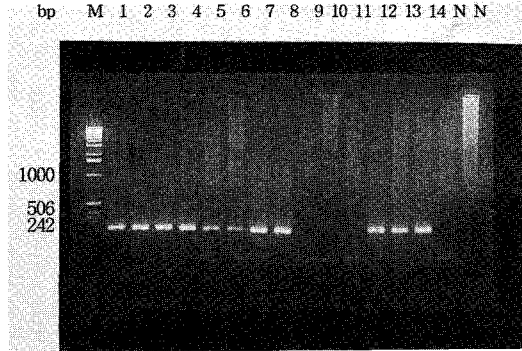


Fig. 1. PCR amplification of the V3 region of the envelope gene of HIV-1 from infected patients PBMC DNA. The first-round PCR amplification was performed with primer G5/G6, and 5ul of the PCR product was used for the second-round PCR by using primer pair G7/G8 to yield a 242bp fragment analyzed. M; 1kb marker, Lanes 1-14 each patient sample, N; negative sample.

생학적 분류를 통해 국내 유행하는 바이러스주의 특성을 알고자 HIV-1 감염자 15명의 림프세포로부터 gp120을 코딩하고 있는 env유전자의 C2/V3 지역을 PCR을 통해 증폭시켰다. 증폭된 유전자 산물은 Fig. 1. 에서와 같이 약 242 bp 위치에 나타나며 대조 균으로 정상인 계놈에서는 유전자 산물이 나타나지 않음을 볼 수 있어 예상된 유전자 산물과 함께 실험과정 중 오염이 되지 않았음을 확인 할 수 있었다. Lane 9, 10, 11은 유전자 산물이 나오지 않은 것으로 반응 조건이 안맞았거나 primer와 상보적 관계를 이루지 못한 것으로 사료되었다 (Fig. 1). 증폭된 유전자 산물은 클로닝 되어 *Escherichia coli* JM-109 competent 세포를 형질 전환시킨 후 염기서열이 분석되었다. Primer의 일부분을 제외한 220bp를 비교한 결과 subtype C로 분류된 KR2-1, KR2-3을 제외한 14명의 HIV감염자로부터 분리된 바이러스들의 DNA 염기서열 상동성은 약 82.3%에서 98.2%로 매우 유사함을 볼 수 있었다 (Table 2). KR 2-1, KR2-3 바이러스주는 다른 분리주와 약 20% 이상의 염기상의 차이를 볼 수 있었다. 동일 환자로부터 6개월의 간격으로 분리한 바이러스 KR13-3 과 KR14-1은 98.6%의 상동성을 보여주었으며 같은 검체내 바이러스간 염기차이는 5% 이내였으나 KR1-1 과 KR1-2에서 최고 7.3%의 차이를 보였다.

Deduced 아미노산 서열 분석

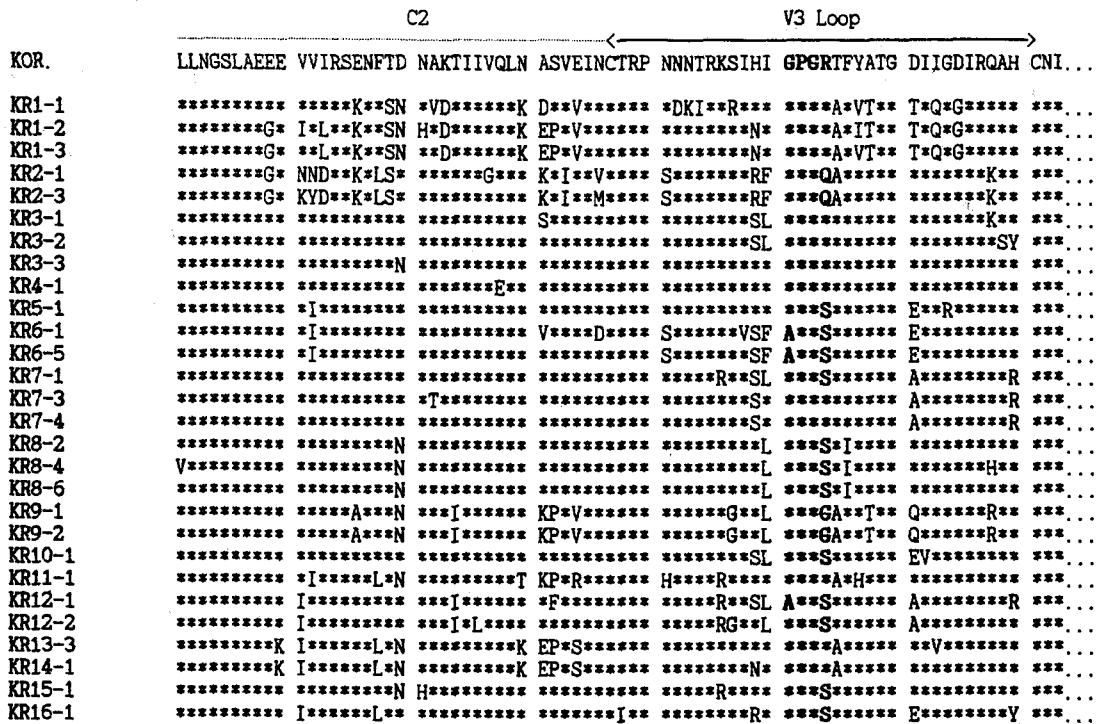


Fig. 2. Multiple alignments of deduced amino acid sequences of the C2/V3 region of the envelope gene of HIV-1 from 15 patients. KOR; Korean consensus sequence.

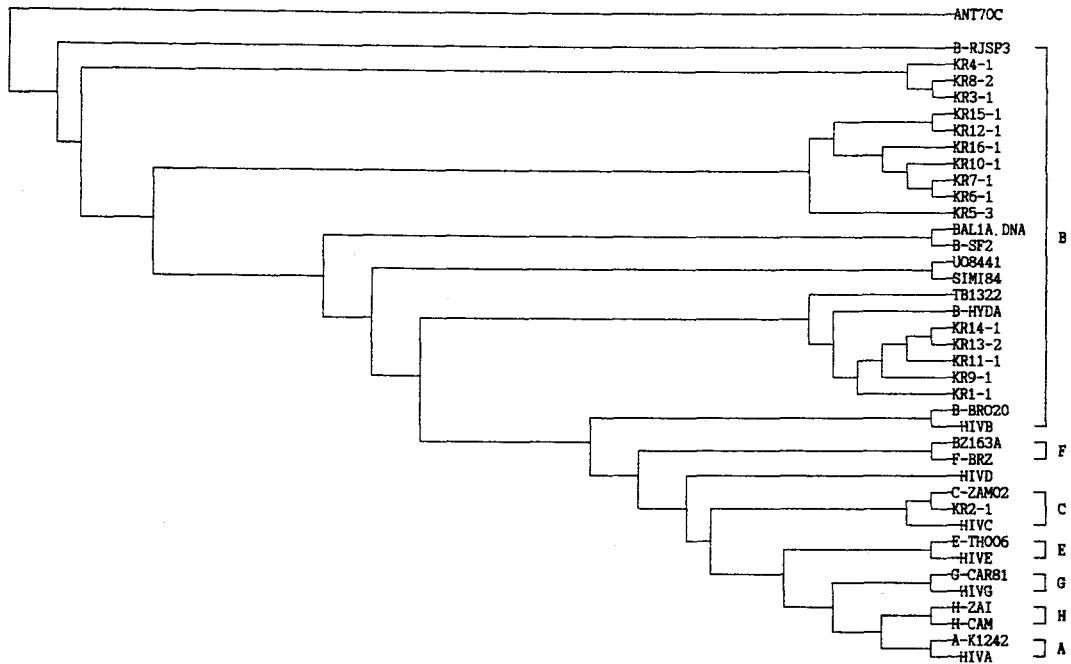


Fig. 3. Phylogenetic analysis of C2/V3 region sequences(200bp) from 16 HIV-1 isolates from Korean, including representative of each subtype strains from Los Alamos Database. The subtypes are indicated on the vertical axis.

DNASIS ver.7.0 프로그램을 이용하여 분석된 DNA 염기서열로부터 유추된 아미노산 서열을

통해 각각의 분리주간 아미노산 서열의 상동성을 비교하였다. 전체 28개의 클론에서 평균 80%

의 상동성을 보였으나 subtype C인 KR2와 subtype B인 KR1과 61.6%의 상동성을 보여 최고 38.4%의 차이를 보였다. 같은 subtype B에선 최고 37%의 차이를 보였고 같은 검체내 바이러스간에는 최고 17.8%의 차이를 보였다. 각각의 deduced 아미노산은 모두 73개의 아미노산으로 C2의 36개와 V3 35개의 아미노산을 포함하며 V3 지역에는 전형적인 2개의 cysteine이 양끝에 위치하여 loop를 형성함을 알 수 있었다. Loop의 가운데 tip으로는 subtype B의 전형적인 GPGR외에도 APGS, GPGG, GPGQ, GPGS 형을 볼 수 있었다 (Fig. 2).

계통학적 분석 (phylogenetic analysis)

PHYLIP ver. 3.5 Dnapars program을 이용 Los Alamos database에서 제공된 subtype 표준주 (subtype A-H, subtype O)와 함께 계통학적 분석을 하였다. 전체 29개 염기서열이 분석된 클론 중 같은 환자에서 분리된 클론을 제외한 16개의 220bp 염기서열을 통해 subtype O를 outgroup으로 하여 분석한 결과, KR2를 제외한 15 분리주 모두 북아메리카와 유럽에서 발견되는 subtype B에 속하였다. 같은 subtype B 내에서 KR13과 KR14는 동일인이며 KR1, KR9, KR11과 함께 방콕형 TB1322와 유사한 유연관계가 있음을 알 수 있었다. 나머지 subtype B에 속한 분리주는 대표적 북아메리카형인 SF2와 SP3 가운데 위치하고 있다. 전형적 subtype C로 분리된 KR2는 태국형보다 중앙아프리카에서 분리된 주와 더 유연관계가 있었으며 실제 역학조사결과와 일치하였다 (Fig. 3).

고찰

HIV에 대한 분자 유전학적 연구는 이미 많이 되어 왔으며 이를 이용한 계통학적 분류 및 혈청면역학적 분류가 HIV 감염자가 보고된 대부분의 나라에서 연구가 되어왔다. 국내 HIV 감염자는 1987년 보고된 이래 계속적인 증가를 보이고 있으나 분자 유전학적 연구는 미흡하여 아직 국내 유행주에 대한 자료가 없어 미국 Los Alamos HIV Database에 한국 자료는 빠져 있는 상황이다. 본 연구는 국내 감염자 15명의 HIV-1 감염자 혈액으로부터 게놈 DNA를 분리하여 이를 template로 하여 HIV env 유전자의 C2/V3 지역을 클

로닝하여 염기서열을 분석하였다. 동일인 2개의 검체 (KR13, KR14)를 포함하여 16개 검체로부터 분석된 HIV는 하나의 subtype C (KR2)를 제외한 15개 검체로부터 분리 분석된 HIV는 모두 subtype B로 국내 유행하는 HIV는 대부분 유럽과 북아메리카에서 유행하는 B 형임을 알 수 있었다. 실제 역학적으로 조사되어 알고 있는 몇몇의 자료를 토대로 비교해 보면 KR2는 외항 선원인 남편으로부터 감염된 사례로 중앙아프리카로부터 유래된 바이러스에 의해 감염되었음을 알 수 있다. Subtype B 내에는 크게 3개의 group으로 동남아시아에서 유래된 군과 북아메리카의 80년대 초에 분리된 SF2와 90년대 초기에 분리된 RJSP3 군으로 분류할 수 있다 (Fig. 3).

본 연구는 전체 20명의 검체로부터 분석되어진 15명의 결과로 14명이 subtype B에 속하는 바이러스주임을 알 수 있었다. Nest-PCR을 통해 유전자가 증폭되지 못한 5명은 반응 조건이 맞지 않았거나 G7, G8 primer쌍과 상보적인 염기서열을 지니지 못한 것으로 사료된다. 이후 재시험을 통해 유전자를 증폭해 보았으나 결과는 같아 다른 위치의 primer를 제작하여 연구해야 할 것으로 사료되며, 앞으로 좀 더 많은 대상을 분석함으로써 국내 HIV 감염전파의 분자 역학적 관계를 정립함과 함께 감염자 치료 및 백신연구에 필수적인 기초 자료를 제공하고자 하였다.

결론

1. 한국내 20명의 HIV-1 감염자 혈액으로부터 nest-PCR을 이용하여 15명의 HIV-1 env 유전자를 코딩하는 C2/V3지역 증폭하여 분석하였다.
2. 동일인 2개의 검체 (KR13, KR14)를 포함하여 16개 검체로부터 분석된 HIV는 KR2 (subtype C)를 제외한 나머지 모두 subtype B로 국내 유행하는 HIV는 대부분 유럽과 북아메리카에서 유행하는 B형이었다.
3. Subtype B 내에는 크게 3개 group으로 동남아시아에서 유래된 군과 북아메리카의 80년대 초에 분리된 SF2와 90년대 초기에 분리된 RJSP3 군으로 분류되었다.
4. 동일 환자로부터 6개월의 간격을 두고 분리된 바이러스 KR13-3과 KR14-1은 98.6%의 상동성을 보여주었으며 같은 검체내 바이러스간 염기차이점은 5% 이내로 유사하나 KR1-1과 KR1-

2에서 최고 7.3%의 차이를 보였다.

5. Deduced 아미노산서열은 DNA염기서열보다 더 많은 차이를 보여 최고 38.4%의 차이를 보였다. 같은 subtype B 에션 최고 37.0%의 차이를 보였고 같은 검체내 바이러스간에는 최고 17.8%의 차이를 보였다.

6. 국내 HIV감염자의 분자 역학적 관계를 정립함과 함께 감염자 치료 및 백신연구에 중요한 자료로 제공하기 위해 좀 더 많은 대상을 분석해야 할 것이다.

참 고 문 헌

1. Kuiken CL, Zwart G, Baan E, Coutinho RA, et al: Increasing antigenic and genetic diversity of the V3 variable domain of the human immunodeficiency virus envelope protein in variable domain of the human immunodeficiency virus envelope protein in the course of the AIDS epidemic. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 9061-9065, 1993.
2. LaRosa GJ, Davide JP, Weinhold K, et al.: Conserved sequence and structural elements in the HIV-1 principal neutralizing determinant. *Science* 249: 933-935, 1990.
3. Moore JP, Nara PL: The role of the V3 loop of gp120 in HIV infection. *AIDS* 5: S21-S33, 1991.
4. Rusche JR, Javaherian K, McDanal C, Petro J, et al: Antibodies that inhibit fusion of human immunodeficiency virus infected cells bind a 24-amino acid sequence of the viral envelope, gp120. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 3198-3202, 1988.
5. Emini EA, Schlieff WA, Numberg JH, Conley AJ, et al: Prevention of HIV-1 infection in chimpanzees by gp120 V3 domain-specific monoclonal antibody. *Nature (London)* 355: 728-730, 1992.
6. Neurath AR, Strick N: Confronting the hypervariability of an immunodominant epitope eliciting virus neutralizing antibodies from the envelope glycoprotein of the human immunodeficiency virus type 1. *Mol Immunol* 27: 539-549, 1990.
7. Ahmad N, Baroudy BM, Baker RC, Chappey C: Genetic Analysis of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Envelope V3 Region Isolates from Mothers and Infants after Perinatal Transmission. *J Virol* 69: 1001-1012, 1995.
8. Balfe P, Simmonds P, Ludlam CA, Bishop JO, Brown AJL: Concurrent Evolution of Human Immunodeficiency Virus Type 1 in Patients Infected from the Same Source: Rate of Sequence Change and Low Frequency of Inactivating Mutations. *J Virol* 64: 6221-6233, 1990.
9. Korber BTM, MacInnes K, Smith RF, Myers G: Mutational trends in V3 loop protein sequences observed in different genetic lineages of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 68: 6730-6744, 1994.
10. Ou CY, Ciesielski CA, Myers G, Bandea CI, et al.: Molecular Epidemiology of HIV Transmission in a Dental Practice. *Science* 256: 1165-1171, 1992.
11. Janssens W, Heyndrickx L, VandePeer Y, Bouckaert A, et al: Molecular phylogeny of part of the env gene of HIV-1 strains isolated in Cote d'Ivoire. *AIDS* 8: 21-26, 1993.
12. Louwagie J, McCutchan FE, Peeters M, Brennan TP, et al: Phylogenetic analysis of gag genes from 70 international HIV-1 isolates provides evidence for multiple genotypes. *AIDS* 7: 769-780, 1993.
13. Delwart EL, Sheppard HW, Walker BD, Goudsmit J, et al: Human Immunodeficiency Virus Type 1 evolution in vivo tracked by DNA heteroduplex mobility assay. *J Virol* 68: 6672-6683, 1994.
14. Delwart EL, Shpaer EG, Louwagie J, Grez M, et al. Genetic relationships determined by a DNA heteroduplex mobility assay: analysis of HIV-1 env genes. *Science* 262: 1257-1261, 1993.
15. Sherefa K, Sonnerberg A, Sternberg J, Sallberg M: Rapid grouping of HIV-1 infection in subtypes A to E by v3 peptide serotyping and its relation to sequence analysis. *Biochem Biophys Res Comm* 205: 1658-1664, 1994.
16. Myers G, Korber B, Wain-Hobson S, Smith RF, et al. *Human Retroviruses and AIDS*. Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, 1994.

17. Abimiku AG, Stern TL, Zwandor A, Markham PD, et al. Subgroup G HIV type 1 isolates from Nigeria. *AIDS Res Hum Retroviruses* 10: 1581-1583, 1994.
18. Bobkov A, Cheingsong-Popov R, Garaev M, Rzhabinova A, et al. : Identification of an env G subtype and heterogeneity of HIV-1 strains in the Russian Federation and Belarus. *AIDS Res Hum Retroviruses* 8: 1649-1655, 1994.
19. Bruce C, Clegg C, Featherstone, Smith J, et al. : Presence of multiple genetic subtypes of Human Immunodeficiency Virus Type 1 proviruses in Uganda. *AIDS Res Hum Retroviruses* 10: 1543-1550, 1994.
20. Dietrich U, Grez M, Von H, Panhans BB, Geinbendorefer M, et al. : HIV-1 strains from India are highly divergent from prototypic African and US/European strains, but are linked to a South African isolate. *AIDS Res Hum Retroviruses* 8: 23-27, 1993.
21. Janssens W, Heyndrickx L, Franssen K, Motte J, et al. : Genetic and phylogenetic analysis of env subtypes G and H in Central Africa. *AIDS Res Hum Retroviruses* 10: 877-879, 1994.
22. Janssens W, Heyndrickx L, Franssen K, Temmerman M, et al. : Genetic variability of HIV type 1 in Kenya. *AIDS Res Hum Retroviruses* 185: 217-228, 1994.
23. McCutchan FE, Hegerich PA, Brennan TP, Phanuphak P, Singharaj P, et al. : Genetic variants of HIV-1 in Thailand. *AIDS Res Hum Retroviruses* 8: 1887-1895, 1992.
24. Ou CY, Takebe Y, Weniger BG, Luo CC, et al.: Independent introduction of two major HIV-1 genotypes into distinct high-risk populations in Thailand. *Lancet* 341: 1171-1174, 1993.
25. Baskar PV, Ray SC, Rao R, Quinn TC, et al. : Presence in India of HIV type 1 similar to North American strains. *AIDS Res Hum Retroviruses* 8: 1037-1041, 1994.
26. Lee Duk H: AIDS Prevention and control in Korea. 1995. Symposium on AIDS/HIV infection p21-27, 1995.
27. Sauvaigo S, Barlet N, Guettari N, Innocenti P, et al.: Standardized nested polymerase chain reaction-based assay for detection of human immunodeficiency virus type 1 DNA in whole blood lysates. *J Clin Microbiol* 31: 1066-1074, 1993.
28. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR: DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 5463-5467, 1977.
29. Felsenstein J, PHYLIP (phylogeny inference package) version 3.5. Department of Genetics, University of Washington, Seattle. 1993.