대한임상미생물학회지 1999:2;19-27

우리나라 AIDS환자에서 HIV-1의 V3 loop 염기서열에 관한 연구

김재석 박성섭 한규섭 김의종 김진규 박명희 조한익

서울대학교 의과대학 임상병리과학교실

DNA Sequence Analysis of the V3 loop of HIV-1 from Korean Patients with AIDS

Jae Seok Kim, M.D., Sung Sup Park, M.D., Kyou Sup Han, M.D., Eui Chong Kim, M.D., Jin Q Kim, M.D., Myoung Hee Park, M.D. and Han Ik Cho, M.D.

Department of Clinical Pathology, Seoul National University College of Medicine, Seoul, Korea

Background **: Phylogenetic analysis was used to determine the subtype and the probable source of transmission of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). The HIV-1 is an RNA virus characterized by extensive genetic variation. To determine the extent of HIV-1 genetic variation, HIV-1 envelope V3 domain structures were analyzed and compared. In this study, we analyzed phylogenetic relationships and the subtype of Korean isolates to help the epidemiological study of HIV-1 infection.**

Methods **: Peripheral blood mononuclear cells were collected from eight patients with AIDS. HIV-1 proviral DNA was directly amplified directly by polymerase chain reaction (PCR). V3 domain nucleotide sequences were determined using a direct sequencing method with PCR products. Phylogenetic analysis of V3 domain nucleotide sequences was performed comparing with previously documented HIV-1 strains.**

Results **: Six V3 loop sequences were obtained from eight HIV-1 infected patients. All of six HIV-1 strains were classified as subtype B by phylogenetic analysis of the V3 region. The distances between strains varied from 11.5% to 22.9% (mean; 15.9%), showing six strains were not related each other.**

Conclusions **: Six HIV-1 strains belong to subtype B, which is the prevalent type in North America, Europe, and Japan. Molecular epidemiological data supported the transmission of HIV-1 to Korea from these areas. Phylogenetic analysis revealed the absence of closely related strains in these isolates. Direct sequencing of V3 loop DNA would be a useful tool to determine the subgroup and the route of transmission of HIV-1.**

(Korean J Clin Microbiol 1999;2:19~27)

Key words : HIV-1, V3 sequence, Phylogenetic analysis, Molecular epidemiology

원본 접수 : 1998년 12월 접수번호 : CM99-3
수정본접수 : 1999년 2월 1일
교신저자 : 김 의 종
(110-744) 서울시 종로구 연건동 28번지
서울대학교 의과대학 임상병리과학교실
전화 : 02-760-3500 Fax : 02-764-3698
*이 연구는 '95년도 서울대학교병원 임상연구비(01-95-71) 지원에 의한 결과임.

서 론

HIV-1의 역학조사는 전통적인 역학조사와 함께 바이러스에 대한 분자생물학적인 조사를 병행할 때 객관적인 뒷받침을 할 수 있다. HIV-1 감염증의 경우 유전자 염기서열 분석을 시행하여 전세계적으로 분포하는 서로 다른 아형을 분류할 수 있으며, 또한 감염자에서

분리된 바이러스 유전자의 유사성을 분석하여 감염경로를 추정할 수 있다[1,3,6].

HIV-1의 염기서열 분석의 대상은 주로 *env* 유전자의 V3 loop 부위에 대하여 시행하는데 이 부위는 분리되는 바이러스마다 다양한 염기서열을 가지므로 분석시 감별능력이 좋은 부위이다. V3 loop는 principal neutralizing domain(PND)을 가지고 있는 약 35개 아미노산으로 구성되어 있으며, 기저부위에 S-S 결합이 존재하여 loop형태를 보이는게 특징적이다. 여기에는 중화항체, cytotoxic lymphocyte(CTL), antibody-dependent cell cytotoxicity(ADCC) 등의 면역반응이 작용하는 epitope를 가지고 있어 HIV-1의 병리기전, 백신개발, 아형의 분석에서 대상이 되는 부위로서[5] 우리는 이 가운데 유전적 유사성을 분석함으로써 우리나라에서 분리된 HIV-1의 아형 분석을 계통수 분석을 통하여 시행하려 한다.

V3 loop 부위에 대한 염기서열의 분석을 시행하면 역학적으로 중요한 자료를 얻을 수 있으며, 직접적인 전파경로를 알 수 있다. 즉, 어떤 환자에서 분리된 HIV-1의 염기서열과 상호감염의 가능성이 있는 다른 환자의 염기서열이 동일하다면 이는 전염의 직접적인 증거가 된다. 에이즈에 감염된 의료인과 환자에서 분리된 V3 loop의 유사성을 확인하여 직접적인 감염원의 여부를 증명한 예들이 있다[3,7]. 각 HIV-1 균주의 확인과정에 사용한 것으로는 초기에 수립된 HIV-1 균주가 실험실 내에서 상호 오염된 것을 Wain-Hobson 등이 V3 loop에 대한 염기서열 분석을 이용하여 증명한 바 있다[2].

HIV-1의 V3 loop에 대한 염기서열 분석은 국제적인 HIV-1 아형 분포 조사에도 사용되고 있어 국내의 HIV-1의 역학조사에도 필요하리라 생각된다. HIV-1의 염기서열 분석을 통해 전세계적으로 다양하게 분리되는 HIV-1의 아형을 분류할 수 있다. 아형의 분석은 *env*, *gag* 유전자의 염기서열분석에 기초하여 분류하고 있으며[4], 현재 A, B, C, D, E, F, G, H, O의 9개 아형으로 분류하고 있다. 각 아형의 분포가 HIV-1의 지역적인 분포를 말해주기도 한다. 국내에서 분리된 HIV-1의 아형 분석을 통해 HIV-1의 국내 감염경로를 객관적으로 추정할 수도 있다. 따라서, HIV-1의 염기서열 분석은 에이즈의 역학적인 연구에 필수적인 기법으로 요구된다. 본 연구에서는 국내분리 HIV-1의 염기서열과 각 아형의 대표적인 염기서열을 계통수로 분류하여 국내에서 분포하는 아형을 분석하려고 하며, 국내 분리균주간에 감염의 직접적인 연관 여부를 추정하려 한다.

방 법

HIV-1 V3 loop의 유전자 분석은 Chaix 등[6]의 방법을 변형하여 시행하였다. 환자의 림프구를 분리하여 환자의 DNA를 추출한 다음, HIV의 proviral DNA 중 V3 loop 부위에 대한 PCR을 시행하고, 전기영동하여 330 bp의 반응산물을 정제한 후 염기서열 분석을 시행하였다. 분석된 염기서열을 이전에 보고된 각 아형의 염기서열과 비교한 후 계통수 분석을 실시하였다.

1. 림프구 DNA의 분리

HIV-1에 감염된 환자의 혈액 4 mL를 EDTA 관에 넣어 채취하고, Phosphate buffered saline (0.01 M, pH 7.4) 4 mL가 든 15-mL conical tube에 가하였다. 혈청분리관을 사용하여 15-mL conical tube에 들어있는 Ficoll-Hypaque (비중:1.077) 4 mL 위에 희석혈액을 조심스럽게 중첩시켰다. 실온에서 1,500 rpm으로 30분간 원심한 후 림프구층을 혈청분리관으로 따내어 생리식염수 10 mL가 든 시험관에 옮겨 1,500 rpm으로 10분간 원심하였다. 상층액을 버리고 생리식염수 1 mL를 가하여 침전물을 푼 다음 생리식염수로 다시 10 mL까지 채운다음 1,500 rpm으로 10분간 원심하였다. 상층액을 버리고, 시험관을 뒤집어서 1분간 세워두었다. Lysis solution (5 X proteinase K buffer[0.375 M NaCl, 0.12 M EDTA, pH 8.0] 160 μL, proteinase K stock solution [10mg/mL] 40 μL, 10% SDS 80 μL, 증류수 300 μL) 540 μL를 침전물에 가한 후 1.5 mL microtube로 옮기고 37℃에서 하룻밤 방치하였다. 실온으로 식힌 다음 포화 염화나트륨 용액 200 μL를 가하고, 강하게 15-30초간 흔든 후 13,000 rpm으로 5분간 원심하였다. 상층액을 1.5-mL tube로 옮기고 13,000 rpm으로 5분간 원심한 후 상층액을 양분하여 두 개의 1.5-mL tube에 옮겼다. 실온의 100% 에탄올 900 μL를 가한 후 2분 동안 서서히 혼합하여 DNA 침전이 생기게 한 다음 blue tip 끝으로 DNA를 건져 말리고 증류수 25 μL에 DNA를 용해시킨 후 DNA 양을 측정하였다.

2. HIV-1 proviral DNA의 V3 loop 부위에 대한 PCR

HIV-1 PCR은 V3 loop 부위에 대하여 Chaix 등의 방법에 따라 실시하였다[6]. 시발체는 5'-ATC TCG AGT GCT GTT GAA TGG CAG TCT AGG CAG A-3'와 5'- AAG AAT TCA TTT CTG GGT CCC CTC CTG AGG A-3'를 사용하였다[2]. PCR반응의 조성은 DNA 2-10 μg/mL, primer 500 pM/mL, dNTP 200 mM/mL, 10 X 완충액 100 μL/mL, 증류수 675 μL/mL, Taq polymerase 25 U/mL로 하였으며 총 100 μL 용액에서 반응시켰다. DNA thermal cycler (Model 480, Perkin-Elmer, USA)를 사용하여 반응시켰으며 94℃에서 4분간 둔 후 94℃ 1분, 60℃ 1분, 72℃ 1분간 40회를 반복하고 72℃에서 5분간 반응시킨 후 냉장보관하였다.

3. PCR 반응산물의 순수분리

PCR 반응액 70 μL와 완충액(6 X loading buffer) 14 μL를 혼합하여 2% agarose gel의 well에 분주하였다. 0.5 XTBE

용액에서 100 V로 30분간 전기영동한 후 Longwave (366 nm) UV lamp로 비추면서 약 330 bp 크기를 보이는 band를 각각의 면도날을 사용하여 자른후 1.5 mL tube에 옮겼다. Qiaex Ⅱ(Qiagen, Chatsworth, California, U.S.A.)를 사용하였으며 그 과정은 다음과 같다. Gel 3배 부피의 QX1 용액을 가한 후 Qiaex II(silica matrix) 10 μL를 가하고 vortex 혼합한 후 50℃에서 10분간 방치하며 2분 간격으로 vortex하였다. 30초간 15,000 rpm에서 원심한 후 상층액을 버리고 Q1 buffer 500 μL를 가하고 vortex하여 침전물을 풀었다. 30초간 원심한 후 상층액을 버리고, PE buffer 500 μL로 3번 세척하였다. 공기중에서 뒤집어서 완전히 말린후 증류수 23 μL를 넣고 5분간 실온에서 두었다. 1분간 원심한 후 상층액 20 μL 정도를 취하였다. DNA 일부를 전기영동하여 단일 band를 확인하고 반정량한 후 -20℃에서 보관하였다.

4. HIV V3 loop 염기서열 분석

Thermo Sequenase radiolabeled terminator cycle sequencing kit(Amersham, Cleveland, Ohio, U.S.A.)과 radiolabeled ddNTPs set (Amersham, Cleveland, Ohio, U.S.A.)을 이용하여 염기서열을 분석하였다. 각 실험과정은 다음과 같다.

PCR product 100 fmol(약 20 ng)을 준비해 둔다. 얼음위에서 4개의 termination mix를 2 μL씩 준비한 후 labeled ddNTPs를 G, A, T, C 순으로 0.5 μL씩 분주하였다. 또한 검체당 4개의 tube에 termination mix를 2.5 μL씩 분주하였다. Primer를 0.5 pM 되게 준비한 후 증류수 5 μL, reaction buffer 2 μL, primer (0.5 pmol) 1 μL, thermo sequenase polymerase (4U/uL) 2 μL를 혼합하고, PCR product가 준비된 tube로 옮긴 후 혼합한다. Reaction mixture 4.5 μL를 G, A, T, C tube에 각각 분주한 후 혼합한 다음 mineral oil 12 μL를 덮고 PCR product의 양에 따라 30-50 cycle을 시행하였다. dITP를 dGTP대신 사용하였고, 반응온도와 시간은 95℃ 30초, 55℃ 30초, 60℃ 10분이었다. Stop solution 4 μL를 넣고 spin한 다음 75℃에서 3분간 가열한 후 전기영동 하였다. 전기영동에 사용된 gel판은 8%, 7 M urea로서 acrylamide 7.6g, bis-acrylamide 0.4 g, urea 42g, 20 X gly tolerance buffer 5 mL를 넣은후 증류수로 100 mL를 만들었다. 필터하고 공기제거과정을 거친후 10% ammonium persulfate 1 mL를 첨가하고 혼합한 후 N,N,N',N'-tetramethylethylnediamine 25 μL를 첨가하였다. 영동조건은 15분간 57 watt에서 prerun 하고 검체 3.5 μL씩 분주한 후 전기영동하였고 약 2시간 30분후 이차 loading을 시행하였다. Gel을 말린후 약 36시간 감광하여 판독하였다.

5. DNA sequence 입력과 계통수 분석

판독이 가능한 염기서열중 약 219개 정도의 V3 loop 부위의 염기서열을 Los Alamos National Laboratory에서 제공하는 각 아형의 대표 염기서열[9]과 함께 Clustal X 소프트웨어[10]를 이용하여 배열을 정리하였다. 계통수 분석은 PHYLIP (version 3.57c) 소프트웨어[11]를 이용하였다. 먼저 SEQBOOT로 1,000번의 replicate를 시행한 후 DNADIST로 Kimura 2-parameter 조건으로 distance를 구하였고 NEIGHBOR로 NJ 방법을 이용하여 얻은 treefile을 CONSENSE를 이용하여 최종 treefile을 얻었다. 또한 Parsimony 법도 시행하였는데, SEQBOOT으로 1000번의 replicate를 시행한 후 DNAPARS와 CONSENSUS를 이용하여 treefile을 얻어 distance법으로 얻은 결과와 비교하였다. TreeView 소프트웨어[12]를 이용하여 계통수 그림을 작성하였다. Outgroup은 O 아형으로 지정하였다.

결 과

이번 연구에 사용된 8건의 검체중 전 검체가 330 bp를 보이는 밴드가 관찰되었으나, 비특이적인 PCR 산물이 보였던 1건과, 염기서열 분석시 많은 비특이적 밴드를 보였던 1건을 제외한 6건의 검체에 대해 염기서열 분석과 계통수 작성이 가능하였다.

계통수 분석의 결과 우리나라에 분포하는 HIV-1는 B아형으로 분류되었다. 또한, 각 검출 균주간 염기서열간의 distance는 11.5%에서 22.9%의 다양성(평균 15.9%)을 보여 동일한 감염원에 노출된 것은 아닌 것으로 판단된다.

PHYLIP을 이용한 V3 loop 부위의 계통수 분석상 distance 법은 각 아형을 분리해 낼 수 있었다. 그러나, parsimony법은 B 아형과 D 아형을 분리하지 못하였다.

1. Genomic DNA 분리정도와 HIV-1 proviral DNA에 대한 PCR 결과

Genomic DNA는 반정량 방법으로 측정시 약 20-100 ng/uL 정도를 얻을 수 있었다. V3 loop에 대한 PCR반응으로 8개 검체중 7개에서 330 bp의 독립적인 밴드를 얻었다. 1개 검체에서는 해당 크기 이외의 비특이밴드가 5개정도 관찰되어 염기서열 분석에서 제외하였다.

2. HIV-1 V3 loop 염기서열의 다양성

PCR에서 독립적인 밴드를 보인 7검체중 6검체에서 염기서열 판독이 가능하였다. 한 검체는 비특이적인 밴드가 전반적으로 관찰되었고, 비특이 밴드를 다른 검체와 비교하여 유사성을 발견할 수 없어 상호오염의 경우는 배제하였다.

6개 검체의 염기서열 분석시 필름에서 확인한 염기서열 중 약 220 bp 개의 염기서열을 선택하였다. Clustal X

Fig. 1. Alignments of nucleotide sequences of the V3 region of the envelope gene of HIV-1 from six patients in Korea. (*): same nucleotides as K1; (-): gap introduced for maximal alignment. The meaning of symbol Y is C/T; W, A/T; S, G/C; K, G/T; M, A/C; D, A/G/T. The intra-patient genetic divergence in the V3 region varies from 0 to 13 nucleotides (0% to 6.0%). The inter-patient genetic divergence varies from 11.5% to 22.9%.

Table 1. The intra-patient and inter-patient genetic divergence in the V3 region

Patient	Intra-patient divergence (%)	Inter-patient divergence (%) to K1
K1	1.4	-
K2	1.4	15.6
K3	4.6	13.6
K4	0	20.3
K5	6.0	17.8
K6	0.9	11.5

소프트웨어를

이용하여 정렬이 가능한 213 bp에서 217 bp의 염기서열을 배치하였다. 다음에 한국에서 분리된 HIV-1의 V3 loop 부위에 대한 염기서열을 나타내었다(Fig. 1). K1, K2, K3, K4, K6 검체의 V3 loop 부위는 105 bp로 이루어져 있으며, K5 검체는 108 bp의 염기로 이루어져 있었다. 각 V3 loop 부위는 cystein, 즉 TGT 염기서열로 판단하였고, V3 loop의 정점부위의 tetramer의 구조도 참고하였다.

각 염기가 중복되는 경우 Y(C/T), W(A/T), S(G/C), K(G/T), M(A/C), D(A/G/T)로 표시하였다. 한 검체내에서 염기서열의 중복이 없는 K4 검체부터 최고 13개 염기(0 - 6.0%)가 중복된 K5 검체가 있어 염기서열의 다양성을 보였다. 각 검체내에서는 K1 3개(1.4%), K2 3개(1.4%), K3 10개(4.9%), K4 0개(0%), K5 13개(6.0%), K6 2개(0.9%)의 염기가 중복된 염기서열을 보였다. 중복되는

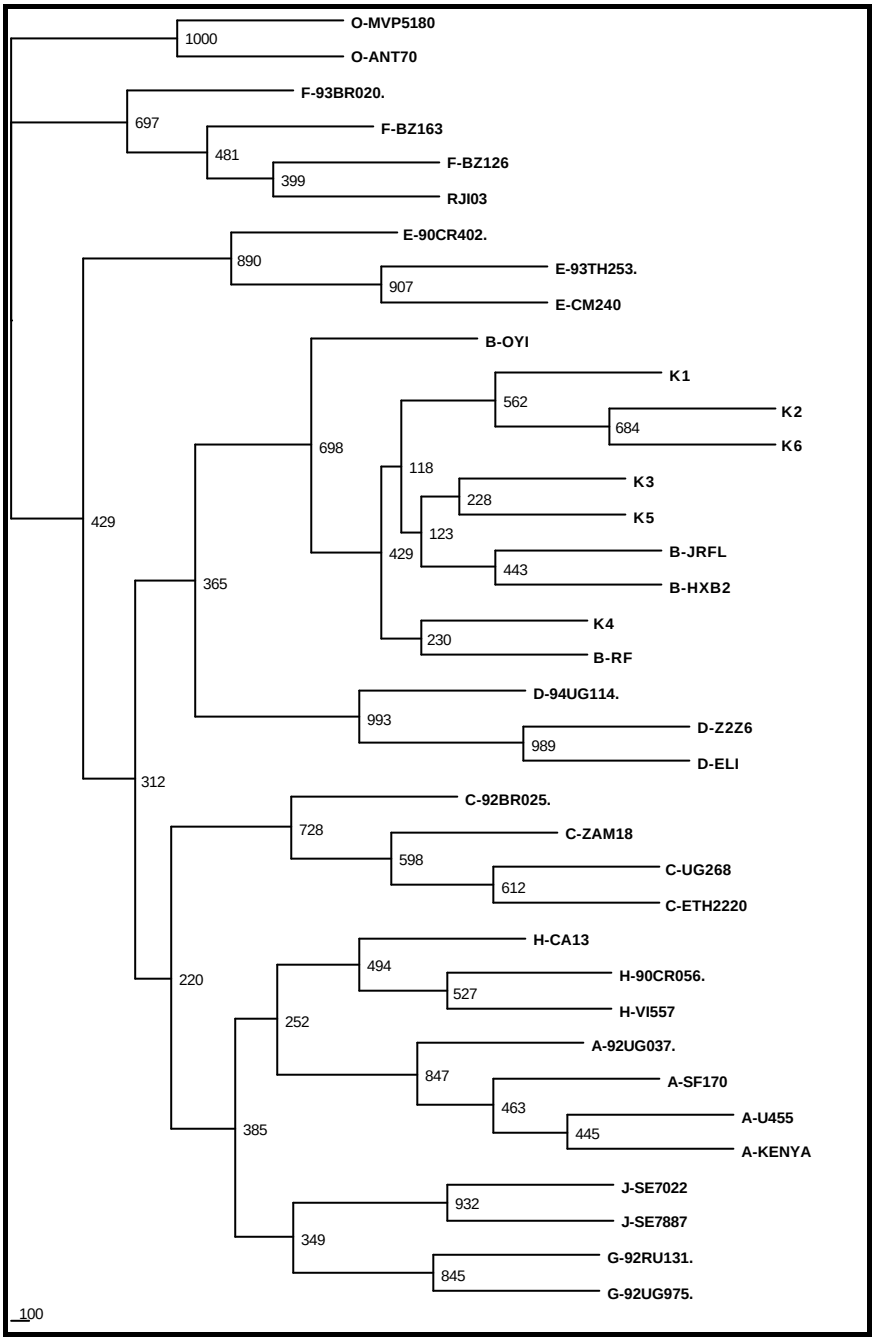

Fig. 2. Phylogenetic tree analysis comparing HIV-1 V3 loop sequences from 6 Korean and previously reported HIV-1 sequences. The sequences determined in this study are indicated by K. The lengths of horizontal branches and numbers mean the frequency of branches over 1000 bootstrap resampling of the sequences.

염기서열의 경우 다른 검체의 염기서열끼리 비교하여 일치되는 염기서열이 없어 상호오염의 가능성은 배제하였다. 각 검체간 염기서열의 차이는 24개에서 50개의 범위를 보여 11.5%에서 22.9%의 차이를 보였다. 아래에 검체내 염기서열의 다양성과 K1 검체와 나머지 각 검체간의 염기서열의 다양성을 제시하였다(Table 1).

3. HIV-1 V3 loop의 계통수 분석

각 아형중 대표적인 HIV-1 아형으로 A 아형은 U455, SF170, 92UG037, KENYA, B 아형은 JRFL, HXB2, RF, OYI, C 아형은 ZAM18, UG268, ETH2220, 92BR025, D 아형은 ELI, Z2Z6, 94UG114, E 아형은 90CR420, 93TH253,

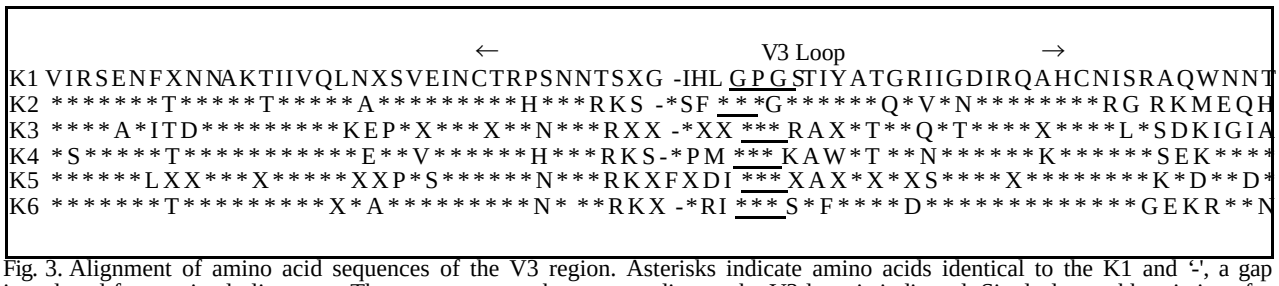

Fig. 3. Alignment of amino acid sequences of the V3 region. Asterisks indicate amino acids identical to the K1 and '-', a gap introduced for maximal alignment. The sequence stretch corresponding to the V3 loop is indicated. Single-letter abbreviations for the amino acid residues are: A, Ala; C, Cys; D, Asp; E, Glu; F, Phe; G, Gly; H, His; I, Ile; K, Lys; L, Leu; M, Met; N, Asn; P, Pro; Q, Gln; R, Arg; S, Ser; T, Thr; V, Val; W, Trp; and Y, Tyr. ' X' means an overlapping amino acid.

CM240, F 아형은 BZ 126, BZ 163, 93BR020, G 아형은 92RU131, 92UG975, O 아형은 ANT70, MVP5180를 이용하여 계통수 분석을 시행하였다.

PHYLIP 소프트웨어를 이용하여 계통수 분석을 하였다. SEQBOOT으로 1,000번의 replicate를 만들었다. 각 검체의 bootstrap된 결과는 DNADIST로 distance matrix를 구하였다. 계통수는 NEIGHBOR를 이용하여 Neighbor-Joining법으로 작성하였다. CONSENSE로 consensus tree를 얻은 결과를

다음에 표시하였다(Fig. 2). 각 가지사이에 HIV-1 V3 loop 염기서열의 bootstrap된 결과를 표시하였다. O 아형을 outgroup으로 지정하여 계통수를 작성하였다. 이 방법으로 기존에 알려진 염기서열은 다른 가지로 분리되어 각 아형으로 분류할 수 있었다. 한국에서 분리된 K1, K2, K3, K4, K5, K6는 계통수에서 기존에 보고된 B 아형과 동일한 가지에 위치하였다. 따라서, 국내에서 분리된 6종의 HIV-1는 계통수 분석을 통해 B 아형으로 판단하였다.

또한 Clustal X를 이용하여 1000번의 replicate를 구하고 NJ 법으로 분석하여도 거의 동일한 결과를 얻었으나, DNAPARS를 이용한 parsimony법은 B 아형과 D 아형이 동일한 가지내에 위치하여 아형을 분류하는데 부적절하였다(결과는 제시 않음).

4. HIV-1 V3 loop의 아미노산 배열

다음에 V3 loop 부위의 아미노산 배열을 나타내었다. V3 loop에 대해서는 cystein 연결부위 사이를 화살표로 표시하였다. 제일 중앙부분에 tetramer는 밑줄을 그어 표시하였다. K1은 GPGS, K2는 GPGG, K3는 GPGR, K4는 GPGK, K5는 GPGR과 GPGS가 중복되었고, K6는 GPGS를 보였다(Fig. 3).

고 찰

HIV-1의 아형 분석은 *env*, *gag* 유전자의 염기서열분석을 분석하여 A, B, C, D, E, F, G, H, O의 9개 아형으로 분류하고 있다. 전 세계에 유행하는 아형을 분석한 결과 B 아형은 주로 미국, 유럽, 호주, 일본에서 분리되며, A, D 아형은 중앙아프리카와 서부아프리카에서, C 아형은 남부아프리카와 인도, 남미에서, E 아형은 주로 태국에서, F 아형은 브라질에서, H 아형은 가봉과 러시아에서 분리된다. 최근에 문제가 된 O 아형은 아프리카, 프랑스, 에스파니아, 미국에서 분리되고 있으며 특히 아프리카에서는 A, B, C, D, E, G, H, O의 다양한 아형이 분리되고 있다. 또한, 전세계적인 전파가 계속되면서 다양한 아형이 분리되고 있는데, 아형의 분석은 HIV 감염의 분포를 추정하는데 유용하게 사용될 수 있다. 유럽에서는 A, B, C, D, F, G 아형이 다양하게 분리되고 있으며, 독일에서는 새로운 감염자의 3분의 1이 non-B 아형이며, 미국 뉴욕에서는 15%가 non-B 아형에 감염된 것으로 보고되고 있다[5]. 이런 보고들을 볼 때 전통적인 B 아형 분포지역에 non-B 아형의 발생이 증가하는 것을 보고하고 있다. 본 연구에서 사용한 기법을 이용하면 HIV-1의 아형분류는 국내에서도 에이즈 감염자의 역학적 분석이나 감염경로의 관리에 유용하게 사용할 수 있을 것으로 생각된다.

HIV-1의 염기서열을 분석하면 HIV-1에 감염된 환자를 대상으로 그 직접적인 전파경로를 추정할 수도 있다. 감염원과 환자의 관련이 있음을 밝히기 위해서는 변이가 심한 HIV-1의 염기서열이 각 환자내에서 어느 정도 분포를 가지는지, 다른 환자와는 어느 정도 다른지를 알아야 한다.

HIV-1 환자를 대상으로 감염경로를 밝힌 것은 Ou 등의 보고[3]가 대표적이다. Ou 등은 플로리다의 한 치과의사에서 진료를 받은 경력이 있는 7명의 에이즈 환자와 그 지역에 거주하는 35명의 에이즈 환자를 대상으로 HIV-1 *env* V3 loop 부위를 염기서열 분석을 시행하였다. 그 결과 치과의사와 5명의 환자가 한 감염원에 의해서 전파된 것으로 추정하였으며, 환자들이 치과의사에게서 진료중 HIV-1에 감염되었음을 시사하여, HIV-1 감염에서 분자역학적인 분석의 유용성을 보여주었다[3]. 또한 감염원으로 추정되는 사람과 관련이 없음을 증명하기 위해 실시할 수도 있다. HIV-1에 감염된 외과의와 그의 환자에서 분리된 HIV-1의 *gag* 부위에

대한 염기서열 분석을 실시하여 유전적 연관성이 없음을 밝혀 환자의 감염이 외과의에서 유래한 것이 아니라는 것을 증명한 보고도 있다[7].

Ou 등은 각 HIV-1에서 5개에서 12개의 클론에 대한 V3 loop 염기서열의 분석을 통해 한 감염원에 의해 전염된 몇몇 환자의 경우 환자간 HIV-1의 염기서열 다양성은 3.4-4.9%(클로닝한 전체 염기서열 기준; 0.8-7.0%)였으나, 다른 감염원을 가진 것으로 추정되는 환자들은 10.7%에서 13.6%(클로닝한 전체 염기서열 기준; 8.2-15.6%)의 다양성을 보였다고 보고하였다. 그리고, 그 지역내에서 무작위로 선택한 HIV-1과는 10.8-13.1%(클로닝한 전체 염기서열 기준; 5.4-17.3%)의 다양성을 보였다. Itescu 등[8]은 각 검체당 15-20개의 클로닝을 통하여 각 환자내에서 염기서열의 다양성은 0.8-6.9%(평균 4.9%)를 보였다 한다. Strunnikova 등[13]의 보고에서는 각 환자내에서 염기서열의 다양성은 에이즈 현증을 보이는 경우 평균 3.3%(0-8.5% 범위), 4.9%(0-9.6%범위)를 보이며, 무증상의 경우 0.8-1.9%(0-4.2%) 라고 보고하여 에이즈 현증과 염기서열의 다양성이 관련이 있을 수 있다고 하였다. Ahmad 등[14]은 10-30 개 클론을 분석하여 각 환자내의 염기서열의 다양성은 0-9.2%(메디안; 2.1%) 범위를 보였다고 하였다. 검체간 직접적인 연관을 밝히지는 않았지만 Chaix 등[6]은 임의의 환자간의 다양성은 3%에서 20% (중앙값 10%) 정도였다고 한다. 따라서 직접적으로 전염이 되지 않은 환자간에서는 유전자 염기서열의 다양성이 크며 감염에 서로 관련이 있는 경우 염기서열의 다양성이 적은 것으로 판단할 수 있다. 앞으로 HIV-1의 객관적인 전염의 증거를 제시하기 위해 HIV-1의 염기서열 분석을 시행하는 것이 유용하리라 생각한다.

본 연구에서는 분리된 HIV-1 6 균주의 염기서열 다양성은 11.5-22.9% (평균 15.9%) 범위를 보였다. 따라서 각 환자간 직접적인 전염의 경우는 없는 것으로 해석할 수 있다. 앞으로 HIV-1 감염의 직접적인 경로를 밝힐 필요가 있을 때에도 본 연구에서 시행한 기법이 유용하리라 생각한다.

이 연구에서 비특이적인 PCR 반응산물이 관찰된 1 검체는 시발체의 비특이성이나 반응조건의 문제 때문으로 추정된다. 시발체의 교체 또는 반응조건을 더 제한함으로써 PCR 반응의 특이성을 높일 수 있을 것으로 생각한다. 염기서열 분석을 할 수 없었던 1 검체는 비특이적인 밴드가 전반적으로 관찰되었고, 비특이 밴드를 다른 검체와 비교하여 유사성을 발견할 수 없었으므로 상호오염의 경우는 배제하였다. 이런 경우에는 HIV-1의 변이형이 아주 다양하거나 다른 아형의 HIV-1이 감염되었음을 배제할 수 없다. 또한 이 검체에서 PCR 반응의 특이성이 저하되었거나, 시발체가 genomic DNA와 반응하여 330 bp 정도 크기의 비특이적인 반응산물이 공존할 가능성도 있다. 따라서 이런 경우에는 클로닝을 시행하는 것이 도움이 되었을 것 같으며, 특이도를 높이기 위해 다른 시발체를 이용하여 염기서열 분석을 시도할 필요가 있을 것 같다.

HIV-1의 PCR에는 일반적인 PCR 기법보다 상당한 양의 genomic DNA를 이용해야 한다. 이번 연구에서는 genomic DNA를 0.2-1.0ug 정도 사용하여, 혈액내의 0.3 $\times 10^5$-1.5 $\times 10^5$ 개의 백혈구와 유사한 정도의 검체를 이용했는데, 약 10%의 HIV-1 감염자는 4$\times 10^5$ 개의 PBMC내에서 10 copy 이하의 DNA가 발견된다고 한다. 혈구세포에 대한 PCR로 proviral DNA를 검출하는 기법은 10 copy이상일 경우 대부분 검출 가능한 것으로 알려져 있다[15,16]. 따라서 앞으로 PCR단계에서 증폭산물이 관찰되지 않는 경우에는 1-2ug 이상의 genomic DNA를 주형으로 사용하거나, 다른 시발체를 이용해서 PCR을 재시도하는 것을 고려해야 한다. 이 연구에서 시도한 기법은 genomic DNA와 반응하여 생성되는 200 bp 크기의 특정 밴드를 관찰할 수 있기 때문에 PCR 억제인자 등에 의한 PCR 반응의 실패의 경우는 인지할 수 있었다.

본 연구에 사용된 염기서열 분석기법은 기존의 방식을 변형하여 고안하였다. HIV-1의 V3 loop 부위의 염기서열 분석시 환자혈액의 단핵구세포내에 존재하는 proviral DNA를 대상으로 하여 RNA보다는 단순한 과정을 선택하였다. 또한, PCR 반응산물을 클로닝 단계없이 직접 염기서열 분석하는 방법을 택하였다. HIV-1의 V3 loop 염기서열을 분석할 때 각 검체당 10개내지 30개의 클론을 선택하여 염기서열을 분석한 보고[6,8,14]도 있는 반면 1개 클론만 분석하여 아형을 분석한 보고[17]도 있다. 본 연구에서 클로닝 단계를 실행하지 않은 것은 HIV-1의 다양한 변이주를 확인하기 위해 상당한 수의 클론을 분석하려는 노력보다는 PCR을 통한 직접 염기서열 분석을 통해 우세한 염기서열, 혹은 대등한 염기서열을 분석하는 것이 더 실제적이라고 판단했기 때문이다. Wain-Hobson 등[2]이 10 종의 V3 loop의 염기서열을 각각 20개이상의 clone을 대상으로 분석한 결과 전체 클론의 염기서열중 한가지 염기서열이 차지하는 비율이 100%, 95%, 95%, 92%, 90%, 80%, 75%, 63%, 57%, 35%를 보였다고 한다. 즉, 대부분의 경우 몇 개의 염기서열이 중복되는 것을 감안한다면 직접 염기서열 분석법으로 우세한 염기서열을 검출할 수 있다고 생각된다. 또한 클로닝과 직접 염기서열분석을 병행한 결과 동일한 클론을 예측할 수 있다는 보고도 있다[24]. 이 연구에서 실시한 기법은 정확한 분석시 한 환자에서 15-20개의 클론을 선택하여 분석하는 클로닝 단계를 생략하여 한 환자내에서 증식시 발생할 수 있는 변형주의 경우는 전부 검출하지는 못하지만-동일 환자내에서 약 5%의 염기서열은 정확히 분리하지는 못할 것으로 추정[8]-, 비용과 노력이 절약되며, 빠르게 검사할 수 있으며, 유래가 다른 HIV-1과는 감별이 가능하므로,

병원검사실에서 실제적으로 적용할 수 있다고 생각한다. 시간과 노력이 많이 소요되는 클로닝 단계를 줄이려는 노력으로 heteroduplex analysis로 몇몇 클론을 선별[13]하거나 본 연구처럼 직접 염기서열분석을 한 보고들[18,22]이 있다.

또한, 클로닝을 하는 경우라도 적은 수의 클로닝을 통하여 분석하려는 경우에, 아형분석에는 큰 문제가 없다. 하지만, 직접 감염의 역학적인 조사목적으로 사용할 경우, 감염의 관련이 있으나 다양성이 큰 클론과, 관련이 없으나 감염원과 유사한 클론이 선택되는 경우라면 오류를 범하는 경우도 있을 것이다. 따라서 환자사이에 감염의 직접적인 경로를 증명해야 하는 경우라면 본 연구에서처럼 우선 직접 염기서열 분석을 통해 유사한 것으로 판단된 검체를 대상으로 충분한 수의 클로닝을 통하여 분석하는 것도 한 방법이라 생각된다.

V3 loop의 분석이 또다른 중요한 의미를 가지는 이유는 HIV-1의 기초적인 병인론을 밝히는데 중요한 부분이기 때문이다. 이 부분은 백신의 개발에 기초자료로 이용할 수 있다는 것인데, cell tropism을 결정하는 요소임이 밝혀지고[23] principal neutralizing domain(PND) 부위로서 중화항체가 반응하는 부위를 가지고 있다는 것이 알려져 있다[19]. 또한, V3 loop의 염기서열 다양성이 높을수록 면역계 반응이 강하다는 가정하에 HIV-1의 임상증세와 질환진행을 HLA allele과 연관짓기 위한 연구로 V3 loop 지역의 염기서열의 다양성의 정도를 분석하기도 한다[8]. 또한 HIV-1의 주산기 감염이 일어난 경우를 분석하여 모체에서 소수의 클론으로 존재하는 바이러스가 아이로 전염되는 것을 밝혀내어 전염방지를 위한 방책에 기초자료를 제공하기도 한다[14]. V3 loop의 염기서열분석을 통해 아미노산을 비교하여 V3 loop 부위의 전하변화와 임상경과의 차이에 대해 연구도 시행되고 있다. Chemokine에 의한 감염방어기전에 V3 부위가 상당히 중요한 역할을 하므로 에이즈 치료에 응용해야 한다는 보고[20]가 있으며, 바이러스가 세포의 보조수용체와 결합하는데 관여하는 V3 부위에 아미노산의 변화가 일어나면, 전하가 변화하게 되고 초기의 보조수용체로 CCR5를 이용하고 RANTES, MIP-1α MIP-1β 등에 의해 증식이 억제되던 바이러스가 CXCR4, CCR3 등을 이용하면서 chemokine의 항 바이러스 효과를 피하게 됨을 증명하기도 하여[21], V3 loop에 대한 염기서열분석 기법은 병리학적인 기전과 예후분석의 연구에 기초자료가 된다.

본 연구에서는 HIV-1 감염의 역학조사에 사용하기 위해 V3 loop 부위의 유전자 염기서열 분석을 시행하였다. 우리나라에서 분리된 6명 환자의 HIV-1의 아형은 미국과 유럽, 일본에서 많이 분리되는 것과 동일한 B 아형으로 분류되었다.

또한 이 연구에 포함된 환자들은 유전적 다양성이 높아서 서로 직접적인 감염 연관성이 없는 것으로 판단할 수 있었다. 이 연구에서는 HIV-1의 V3 loop 부위에 대해 genomic DNA내의 proviral DNA에 대해 PCR과 직접 염기서열분석을 시도하여 빠르고 경제적으로 HIV-1의 아형을 분류할 수 있어, 앞으로 에이즈환자의 국제적인 감염경로의 추정과 감염에 연관된 환자의 판정에 유용하게 사용할 수 있으리라 생각된다.

요 약

배 경 : HIV-1은 RNA 바이러스로서 다양한 유전적 변이형을 가지고 있다. HIV-1의 아형 분류는 각 개인간, 집단간의 전파양상을 추적하기 위하여 계통수 분석등의 방법을 통하여 아형 분류를 시행하고 있다. 아형 분류에는 HIV-1 *env* 유전자의 V3 loop부위의 염기서열 양상을 분석하는 것이 많이 시도되고 있다. 본 연구에서는 한국인에서 분리된 HIV-1의 V3 loop 부위의 염기서열에 대한 계통수 분석을 통하여 국내에 분포하는 아형의 분포를 조사하고 각 균주간의 유전적인 유사성을 분석하여 HIV-1 감염의 역학조사에 유용한 기법을 수립하려고 한다.

방 법: 에이즈로 확진된 환자 8명을 대상으로 단핵구내의 DNA를 분리한 후 HIV-1 proviral DNA의 C2- V3 부위를 대상으로 PCR을 시행한 후 직접적으로 염기서열을 분석하였다. 국내 분리 HIV-1과 각 아형의 대표적인 HIV-1의 염기서열에 대한 계통수 분석을 시행하였다.

결 과 : 에이즈환자 8명에 대한 330 bp 크기의 PCR산물을 얻을 수 있었다. 그 중 염기서열 분석이 가능하여 계통수 분석을 시행한 환자는 6명이었다. C2-V3 부위의 염기서열에 대한 계통수 분석으로 한국인에서 분리된 HIV-1은 B아형으로 분류되었다. 각 분리주간의 핵산의 거리(distance)는 최소 11.5%에서 최대 22.9%(평균 15.9%)를 보여 각 분리주는 계통수 분석으로 각각 독립적으로 구분되었다.

결 론 : 국내에서 분리된 6 분리주의 HIV-1 아형은 B형으로 미국과 유럽, 일본에 분포하는 아형과 유사하여 국내의 유행균주는 이들 지역에서 전파된 것으로 보인다. HIV-1 감염자에서 분리된 각 균주간 염기서열의 차이는 다양하여 서로 다른 감염원에서 감염된 것으로 추정할 수 있었다. 이 연구에서는 HIV-1의 V3 loop 부위에 대해 PCR과 직접 염기서열 분석을 시도하여 빠르고 적은 노력으로 HIV-1의 아형을 분류하였다. 이 기법은 앞으로 HIV-1 감염자의 감염경로의 추정에 유용하게 사용할 수 있을 것이다.

감사의 글

이 연구를 위하여 검체를 제공한 서울대학교병원 감염내과 오명돈 교수와 기술적인 지원을 해 준 서울대학교병원 임상병리과 분자유전검사실 주세익 수석기사와 이정희 연구원에게 감사를 드린다.

참 고 문 헌

1. Maslow JN, Mulligan ME, Arbeit RD. *Molecular epidemiology: Application of contemporary techniques to the typing of microorganisms. Clin Infect Dis 1993;17: 1753-64.*
2. Wain-Hobson S, Vartanian JP, Henry M, Chenciner N, Cheynier R, Delassus S, et al. *LAV revisited: Origins of the early HIV-1 isolates from Institute Pasteur. Science 1991;252:961-5.*
3. Ou CY, Ciesielski CA, Myers G, Bandea CI, Luo CC, Korber BT, et al. *Molecular epidemiology of HIV transmission in a dental practice. Science 1992;256: 1165-71.*
4. Karzon DT. *Preventive vaccines. In: Broder S, Merigan TC, Bolognesi D, eds. Textbook of AIDS medicine. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994:667-92.*
5. Birx DL, VanCott T, Micahel N, McNeil J, Stamatos N, Gilliam B, et al. *Summary of Track A: basic science. AIDS 1996;10 (suppl 3):S85-106.*
6. Chaix ML, Chappey C, Couillin I, Rozenbaum W, Levy JP, Saragosti S. *Diversity of the V3 region of HIV in Paris, France. AIDS 1993;7:1199-204.*
7. Holmes EC, Zhang LQ, Simmonds P, Rogers AS, Leigh Brown AJ. *Molecular investigation of human immunodeficiency virus(HIV) infection in a patient of an HIV-infected surgeon. J Infect Dis 1993;167: 1411-4.*
8. Itescu S, Rose S, Dwyer E, Winchester R. *Certain HLA-DR5 and -DR6 major histocompatibility complex class II alleles are associated with a CD8 lymphocytic host responses to human immunodeficiency virus type 1 characterized by low lymphocyte viral strain heterogeneity and slow disease progression. Proc Natl Acad Sci USA 1994;91:11472-6.*
9. Myers G, Korber B, Foley B, Jeang K-T, Mellors JW, and Wain-Hobson S. *ed. Human Retroviruses and AIDS 1996: a compilation and analysis of nucleic and amino acid sequences. Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, NM.*
10. Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, and Higgins DG. *The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucl Acids Res 1997.*
11. Felsenstein, J. *1993. PHYLIP: Phylogeny Inference Package, 3.52c ed. University of Washington, Seattle, WA.*
12. Page RDM. *1997. TreeView[Win16], version 1.40.*
13. Strunnikova N, Ray SC, Livingston RA, Rubalcaba E, Viscidi RP. *Convergent evolution within the V3 loop domain of human immunodeficiency virus type 1 in association with disease progression. J Virol 1995;69: 7548-58.*
14. 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 1995;69: 1001-12.*
15. Jackson JB, Drew J, Lin HJ, Otto P, Bremer JW, Hollinger

FB, et al. *Establishment of a quality assurance program for human immunodeficiency virus type 1 DNA polymerase chain reaction assays by the AIDS clinical trial group. J Clin Biol 1993;31:3123-28.*

16. Ferre F. *Polymerase chain reaction and HIV. Clin Lab Med 1994;14:313-33.*
17. Louwagie J, McCutchan FE, Peeters M, Brennan TP, Sanders-Buell E, Eddy GA, et al. *Phylogenetic analysis of gag genes from 70 international HIV-1 isolates provides evidence for multiple genotypes. AIDS 1993; 7:769-80.*
18. Antonioli IM, Baumberger C, Yerly S, Perrin L. *V3 sequences in primary HIV-1 infection. AIDS 1995;9: 11-7.*
19. Levy JA. *Pathogenesis of human immunodeficiency virus infection. Microbiol Rev 1993;57:183-289.*
20. Cocci F, DeVico AL, Garzino-Demo A, Cara A, Gallo RC, Lusso P. *The V3 domain of the HIV-1 gp120 envelope glycoprotein is critical for chemokine-mediated blockade of infection. Nature Med 1996;2:1224-47.*
21. Scarlatti G, Tresoldi E, Bj rndla , Fredriksson R, Colognesi C, Deng HK, et al. *In vivo evolution of HIV-1 co-receptor usage and sensitivity to chemokine- mediated suppression. Nature Med 1997;2:1259-65.*
22. Jameel S, Zafrullah M, Ahmad M, Kapoor GS, Sehgal S. *A genetic analysis of HIV-1 from Punjab, India reveals the presence of multiple variants. AIDS 1995; 9:685-90.*
23. Hwang SS, Boyle TJ, Lyerly HK, Cullen BR. *Identification of the envelope V3 loop as the primary determinant of cell tropism in HIV-1. Science 1991; 253:71-4.*
24. Cornelissen M, Mulder-Kampinga G, Veenstra J, Zorgdrager F, Kuiken C, Hartman S, et al. *Syncytium-inducing phenotype suppression at seroconversion after intramuscular inoculation of a non-syncytium-inducing/ SI phenotypically mixed human immunodeficiency virus population. J Virol 1995;69:1810-8.*