

## 한국형 HIV-1 백신 개발을 위한 HIV-1 *nef*와 *vif* 유전자의 컨센서스서열과 조상서열의 비교

충북대학교 자연과학대학 생명과학부<sup>1</sup>, 전기전자컴퓨터공학부<sup>2</sup>, 정보통계학과<sup>3</sup>

박찬승<sup>1</sup> · 김미숙<sup>1</sup> · 이현아<sup>1</sup> · 이건명<sup>2</sup> · 김성수<sup>2</sup> · 이성덕<sup>3</sup> · 이찬희<sup>1\*</sup>

### Comparison of Consensus Sequences and Ancestor Sequences of HIV-1 *nef* and *vif* Genes for Development of Korean-Specific HIV-1 Vaccine

Chan Seung Park<sup>1</sup>, Mi Sook Kim<sup>1</sup>, Hyun Ah Yi<sup>1</sup>, Keon Myung Lee<sup>2</sup>, Sung Soo Kim<sup>2</sup>,  
Sung Duk Lee<sup>3</sup> and Chan Hee Lee<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>School of Life Sciences, <sup>2</sup>School of Electrical and Computer Engineering, and  
<sup>3</sup>Department of Statistics, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

Received : November 17, 2006

Accepted : December 11, 2006

There have been attempts to use consensus sequences or ancestor sequences for development vaccines against viruses with high diversity and variation. In this study, we generated and compared consensus sequences and ancestor sequences of *nef* and *vif* genes of HIV-1 isolated from Koreans. Phylogenetic analyses revealed that majorities of the Korean isolates were clustered to form the Korean clade within subtype B (KcB) where foreign isolates were not included. Consensus sequences inferred from the KcB as well as from all Korean isolates were almost identical but significantly different from subtype B consensus sequence or HIV-1 consensus sequence. The genetic distances from one of the Korean isolates to the other Korean isolates were much longer than to the consensus or ancestor sequences deduced from Korean isolates but similar to those of subtype B or HIV-1. Moreover, the genetic distances from the Korean isolates to the consensus sequences were shorter than to the ancestor sequences both in *nef* and *vif* genes. Thus, the consensus sequences may be useful in developing Korean-specific HIV-1 vaccine.

**Key Words:** HIV-1, Vaccine, Consensus sequence, Ancestor sequence

## 서 론

1985년 국내에서 최초로 HIV 감염자가 발견된 후 2006년 상반기 현재 국내의 HIV 누적 감염자 수는 총 4,227명이다. 이 숫자는 외국의 경우에 비해 적은 편이지만 매년 HIV 감염자가 증가하는 추세에 있기 때문에 보건 당국과 학계에서는 국내 HIV 감염자에 대해 꾸준히 분석하고 있다. 염기 및

아미노산 서열을 이용한 분자계통분류학적 분석 결과 한국 인으로부터 분리된 HIV는 대부분이 HIV-1이며, 이 중에서도 subtype B가 주류를 이루는 것을 알 수 있었다. Subtype B 내에서 한국인 HIV-1 서열 중 일부는 외국 분리주 서열과 혼재되어 있지만, 다수는 외국 분리주와 뚜렷이 구분되는 하나의 집단을 이루는 것을 알 수 있다. *Nef* 유전자 분석에서 최초로 관찰한 이 집단을 한국형 집단 (Korean clade)이라 하며 (8), 이후 *env*, *pol*, *vif* 유전자에서도 한국형 집단이 관찰되었다. 한국형 집단의 크기는 사용된 유전자나 모집단의 크기 등에 따라 차이는 있으나 대체적으로 전체 한국인 분리주의 60~70% 정도로 분석되고 있다 (9,10,12,16,17).

HIV가 처음 보고된 이후 HIV 감염 예방을 위한 백신 개발에 많은 시간과 노력, 돈, 그리고 최첨단 기술이 투자되었

\*교신저자: 이찬희. 361-763, 충북 청주시 흥덕구 개신동 12,  
충북대학교 자연과학대학 생명과학부  
Phone: 043-266-1554, Fax: 043-273-2451,  
e-mail: chlee@cbu.ac.kr

\*\*본 연구는 2006년도 교육인적자원부 지방연구중심대학 육성사업  
의 지원에 의하여 이루어진 것임.

지만 아직까지 효율적인 백신 개발에는 성공하지 못하고 있다. 가장 중요한 이유 중 하나는 HIV가 매우 빨리 변이한다는 점이다. 여러 감염자에서 분리한 HIV 서열은 매우 다양하고, 심지어는 한 개체 내에서도 시간 또는 감염 부위에 따라 충분히 다른 서열을 가지는 바이러스가 분리되기도 한다. 따라서 어느 한 바이러스 분리주로부터 개발된 백신은 그 분리주 또는 이와 유사한 서열을 가지는 바이러스에는 좋은 예방 효과를 보일 수 있으나, 대다수의 바이러스 변이주에는 효과가 떨어지고, 나아가 다양한 변이를 가지며 진화해 가는 후손 바이러스들에게도 면역 효과가 떨어질 수 있다. 이러한 단점을 극복하기 위해 최근 다양한 변이주로부터 컨센서스서열이나 조상서열을 찾아내 이들을 백신주로 개발하고자 하는 시도를 하고 있다 (1,3,5,7,11,13,14). 아직 이러한 시도의 성공 여부는 좀 더 검증되어야 하지만 그 가능성에 대해서는 많은 학자들이 공감하고 있는 상태이다.

한국인에서 분리된 HIV는 대다수가 한국형으로 상대적으로 균일한 집단을 형성하기 때문에 한국형 바이러스를 백신주로 개발하면 한국인에 대한 맞춤형 백신으로서의 효과가 높을 것으로 생각된다. 이에 본 연구에서는 한국형 바이러스의 컨센서스서열 및 조상서열을 규명하고, 이들의 백신주로서의 가능성을 알아 보고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 염기 및 아미노산 서열의 확보

NCBI GenBank에서 "Korea and HIV-1 and nef" 또는 "Korea and HIV-1 and vif"의 검색어로 한국인으로부터 분리된 HIV-1 *nef*와 *vif* 유전자 아미노산 서열을 각각 408개, 222개 다운로드 받았다. 이 숫자는 서열을 다운로드 받을 때 GenBank에 등록되어 있는 모든 한국인 분리주를 포함하며 다운로드 받은 일시는 각각 2005년 5월 (*nef*)과 2006년 3월 (*vif*)이며 공히 1991년부터 2004년 사이에 분리된 분리주들을 포함한다. 이 서열들의 계통분류학적 분석을 위해 참고주로 각각 41개 (*nef*)와 44개 (*vif*)의 서열을 HIV Sequence Database (<http://hiv-web.lanl.gov/content/hiv-db/mainpage.html>)로부터 확보하였다. 또한 외국 분리주 서열은 Blast 분석을 통해 한국 분리주들과 가장 가까운 서열들로 GenBank database에서 구하였다.

### 2. 계통분류학적 분석

NCBI GenBank에서 genbank 형식의 파일 (.gb)을 다운로드 받아 SeqAid program에서 fasta 형식의 파일 (.fst)을 만들었다. ClustalX (18) 프로그램을 사용하여 fasta 파일을 불러와서 gap을 제거해준 다음 다중서열정렬을 실시하였다. 서열

정렬의 결과 output file로 나온 phylip 파일 (.phy)을 이용해서 Phylip package (4)의 Dnadist, Protdist 그리고 Neighbor program을 이용하여 계통수를 구축하고 Seqboot, Dnadist, Protdist, Neighbor, Consense program을 이용해 bootstrapping을 하였다. 계통수는 TreeView 프로그램 (15)을 이용하여 나타내었다.

### 3. 컨센서스서열과 조상서열 규명

ClustalX 프로그램으로 다중서열정렬을 하고 output file로 얻어진 clustal 형식의 파일 (.aln)을 SeqAid 프로그램에서 불러와 각 위치에서 각 아미노산들이 차지하고 있는 비율을 구하였다. 이렇게 얻은 파일에서 각 위치에서 가장 많이 차지하고 있는 아미노산 서열만을 모아서 컨센서스서열을 만들고, HIV-1의 서열 비교에 사용되는 HXB2 분리주의 서열과 비교하여 아미노산의 위치를 표시하였다. 조상서열은 phyip 형식의 파일을 가지고 Phyip package의 Maximum-Likelihood method (DNAMLK 프로그램 사용)를 이용해서 만든 다음 HXB2와 비교하여 위치를 결정하였다.

### 4. 유전적 거리 계산

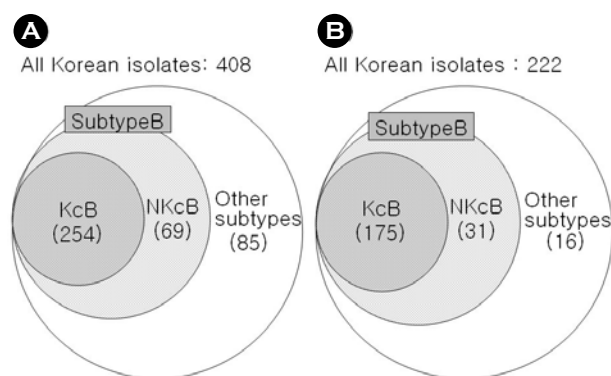
한 집단에 속해있는 서열들간 또는 이 서열들과 컨센서스서열이나 조상서열과의 유전적 거리 (genetic distance)는 본 연구진에서 개발한 SeqAid 프로그램을 사용하여 구하였다. 각 집단에 속한 서열들과 각각의 컨센서스서열이나 조상서열을 포함시켜 ClustalX 프로그램으로 서열을 정렬한 다음 clustal 형식의 파일 (.aln)을 얻었다. 이 파일을 이용하여 SeqAid 프로그램에서 서열간의 유전적 거리를 계산하고 그 결과를 Microsoft Excel 파일 형식으로 얻었다. 얻어진 결과로부터 유전적 거리의 평균과 표준편차 값을 계산하였다.

## 결 과

### 1. 한국 분리주로부터 컨센서스서열 및 조상서열의 추출과 특성 분석

NCBI GenBank에 등록되어 있는 한국인으로부터 분리된 HIV-1 *nef* 유전자 아미노산 전체 서열 408개와 *vif* 유전자 아미노산 서열 222개를 HIV-1 참고주 및 외국 분리주들의 아미노산 서열과 함께 다중정렬하여 계통분류학적으로 분석하였다. *Nef* 유전자의 경우 예상하였던 바와 같이 대다수의 한국 분리주들은 subtype B에 속하였고, 이 중에서도 다수는 참고주나 외국 분리주와 섞이지 않는 독립된 집단으로 묶이며 한국형 집단 (Korean clade subtype B: 이하 KcB)으로 분류할 수 있었다 (Fig. 1). Subtype B에 속하면서 한국형 집단이 아닌 분리주들은 비한국형 집단 (Non-Korean clade subtype B: 이하 NKcB)으로 명명하였다. 한국인으로부터 분리

앞에서 분류한 각 집단 중에서 KcB와 All-Kor 집단으로부터 컨센서스서열 및 조상서열을 구하여 그 서열을 HIV Database에서 얻은 HIV-1 subtype B 컨센서스서열 (SubB-con)과 조상서열 (SubB-anc), 그리고 대부분의 HIV-1이 속해 있는 M 그룹 컨센서스서열 (HIV-1-con) 및 조상서열 (HIV-1-anc)을 참고서열로 사용하여 비교하였다. Fig. 2에는 대표적으로 *nef* 유전자의 컨센서스서열과 조상서열들을 비교한 것을 보여주고 있으며, *vif* 유전자의 컨센서스 및 조상서열은 저자에게 요구하면 제공할 것이다. 한국 분리주들로부터 얻은 All-Kor-con과 KcB-con은 거의 서열이 비슷하여 *nef* 유전자의 경우 1개 (135번째, F/Y), *vif* 유전자의 경우에도 1개 (38번째, E/G)의 차이만 있을 뿐이다. 그러나 이 두 서열과 SubB-con 사이에는 15~17개, HIV-1-con 사이에는 17~36개의 차이가 있어 한국 분리주의 특이성을 보여주고 있다.



**Figure 1.** Composition of the Korean clade (KcB), non-Korean clade (NKcB) within subtype B and other subtypes of the HIV-1 isolated from Koreans. Amino acid sequences of *nef* and *vif* genes of HIV-1 isolated from Koreans were obtained from NCBI GenBank database. The sequences were multiple-aligned using ClustalX and subjected to phylogenetic analyses using Phylip package. KcB is, by definition, a subcluster of subtype B where foreign or reference sequences are excluded. **(A)** *nef* gene, **(B)** *vif* gene.

## 2. 컨센서스서열 및 조상서열과 한국 분리주 서열간의 변이율 비교

위에서 얻은 컨센서스서열 (KcB-con, All-Kor-con)들과 한국형 바이러스 (KcB) 및 모든 한국 분리주들 (All-Kor) 간의 유전적 거리를 계산하였다. SubB-con과 HIV-1-con도 참고서열로 사용하여 비교하였다. *Nef* 유전자의 경우, KcB-con과

[illegible]

**Figure 2.** Consensus and ancestor sequences of *nef*. Aligned *nef* amino acid sequences belonged to specific cluster were used to generated consensus or ancestor sequences. For comparison, references consensus or ancestor sequences including subtype B and HIV-1 were obtained from HIV-1 Database.

All-Kor-con이 다른 컨센서스서열과 비교해 한국 분리주들과의 유전적 거리가 상대적으로 짧았으며, 이 두 컨센서스서열 사이에는 큰 차이를 보이지 않았다 (Table 1). 특히 한국 분리주의 약 2/3가 속해 있는 한국형집단 (KcB)에서는 KcB-con과 All-Kor-con이 다른 컨센서스서열에 비해 유전적 거리가 현저하게 낮게 나타났다. 조상서열을 유추하여 비교하였을 시에도 한국형 바이러스의 조상서열 (KcB-anc)이 다른 조상서열에 비해 한국 분리주들과의 유전적 거리가 가장 짧았다 (Table 1). 각 집단과 KcB-con 또는 KcB-anc과의 유전적 거리를 비교하였을 때에는 KcB-con이 KcB-anc에 비해 항상 1.5% 정도 짧은 것을 알 수 있다. 각 집단과 KcB-con 또는 Korean-con의 유전적 거리가 거의 유사하게 나타났던

**Table 1.** Genetic distances from consensus, ancestor or individual sequences to the sequences of the Korean isolates: HIV-1 *nef* gene

	KcB (n=254, 62.3%)	All-Kor (n=408, 100%)
HIV-1-con	21.7±1.6	19.9±3.3
HIV-1-anc	20.8±1.6	19.2±3.1
SubB-con	13.8±1.7	15.1±3.6
SubB-anc	16.0±1.7	16.2±3.1
All-Kor-con	7.7±2.1	12.3±7.0
All-Kor-anc	13.8±2.0	15.2±4.3
KcB-con	7.4±2.1	12.3±7.0
KcB-anc	8.9±2.1	13.8±6.9
KcB	11.4±2.9	-
All-Kor	-	18.2±6.6

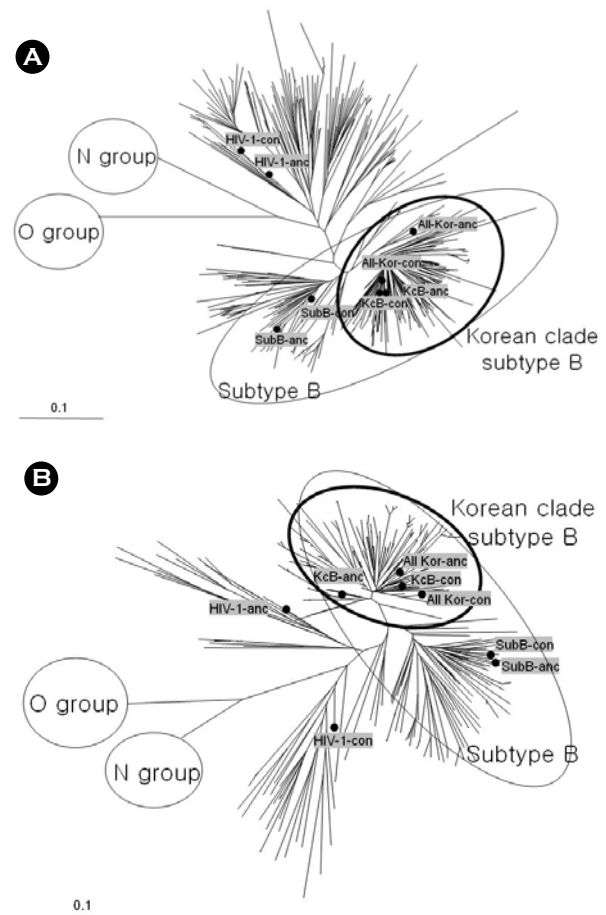
**Table 2.** Genetic distances from consensus, ancestor or individual sequences to the sequences of the Korean isolates: HIV-1 *vif* gene

	KcB (n=175, 78.8%)	All-Kor (n=222, 100%)
HIV-1-con	14.8±1.3	14.3±1.8
HIV-1-anc	14.9±1.5	14.5±2.0
SubB-con	11.4±1.5	11.2±2.5
SubB-anc	11.7±1.4	11.4±2.5
All-Kor-con	5.3±1.8	6.9±3.9
All-Kor-anc	5.6±1.8	7.3±3.9
KcB-con	5.3±1.8	7.1±4.1
KcB-anc	5.6±1.7	7.2±3.8
KcB	8.4±2.3	-
All-Kor	-	11.1±4.4

컨센서스서열 분석에서와는 달리, 조상서열 분석에서는 한국형 집단 또는 전체 한국 분리주 집단과 All-Kor-anc 사이가 KcB-anc에 비해 유전적 거리가 더 먼 것으로 나타나고 있다.

컨센서스서열이 아닌 임의의 한 서열을 선택하여 다른 한국 분리주와의 유전적 거리를 계산하였을 때에는 KcB 집단의 경우 11.4%로 KcB-con의 경우 (7.4%)에 비해 유전적 거리가 54% (11.4/7.4) 더 길었고, 모든 한국 분리주로부터 임의의 한 서열을 선정하였을 시에는 다른 한국 분리주와의 유전적 거리는 18.2%로 Korean-con과의 변이율 12.3%에 비해 48% (18.2/12.3) 더 길게 나타나고 있다.

*Vif* 유전자를 분석한 결과도 앞서 수행한 *nef* 유전자 분석 결과와 크게 차이가 나지 않았다. 모든 집단에서 KcB-con이나 KcB-anc가 다른 컨센서스서열 또는 조상서열에 비해 유전적 거리가 짧게 나타났다 (Table 2). 각 집단과 KcB-con 또는 KcB-anc를 비교하였을 때에는 KcB-con이 KcB-anc에 비해 0.1~0.3% 정도 짧은 유전적 거리를 보여 이 두 서열간의



**Figure 3.** Location of the consensus or ancestor sequences in the phylogenetic tree. Phylogenetic tree was constructed from HIV-1 *nef* (A) or *vif* (B) amino acid sequences together with the inferred consensus or ancestor sequences.

차이는 거의 없었다. *Nef* 유전자에서와는 달리 *vif* 유전자에서는 한국 분리주 서열과 컨센서스서열 또는 조상서열간의 유전적 거리에서 거의 차이가 없었다.

각 컨센서스서열들과 조상서열들의 계통수 상의 위치는 Fig. 3에 나타나 있다. 여기서 알 수 있듯이 각 컨센서스서열 또는 조상서열들의 위치는 그 서열이 속한 집단의 개별서열들과의 평균 유전적 거리가 가장 짧은 곳에 있음을 알 수 있다. 한국형 바이러스로부터 얻어진 KcB-con 또는 KcB-anc는 한국형 집단 내에 위치하고 있으며, 모든 한국 분리주로부터 유추한 All-Kor-con이나 All-Kor-anc 역시 한국형 집단 내에 존재하는 것을 알 수 있다. 반면 subtype B, 또는 모든 HIV-1의 컨센서스서열이나 조상서열은 한국형 집단 바깥에 위치하여 대조를 보이고 있다.

## 고 찰

본 연구의 결과 만약 한국인을 위한 HIV 백신주를 개발한다고 하였을 때 임의의 한 분리주를 사용하거나, 또는 외국 분리주를 포함하는 컨센서스서열을 사용하는 것보다는 국내 분리주로부터 유추한 컨센서스서열을 가지는 바이러스를 만들어 사용하는 것이 훨씬 효율적이라는 것을 의미하고 있다. 또한 조상서열 또는 컨센서스서열과 분리주들과의 유전적 거리를 비교해 보면 컨센서스서열과의 거리가 더 짧기 때문에 이를 토대로 이 두 서열의 백신으로서의 효율성을 비교한다면 컨센서스서열이 조금 더 좋을 것이라고 예상할 수 있다.

HIV는 변이가 매우 심하기 때문에 한 지역, 심지어는 한 개체 내에서도 분리된 시간에 따라 분리주들간의 서열에 차이가 많은 것으로 알려져 있다. 이와 같은 사실은 HIV에 대한 백신을 개발하는데 큰 장애가 되어 왔다 (2,6,7). 예를 들어 대부분의 HIV-1을 포함하는 M 그룹 사이에는 많게는 35%에 이르는 변이율을 보이고 있으며, M 그룹 내의 각 subtype 내에서도 20%에 이르는 변이율을 보이기도 한다 (7). 이를 극복하기 위해 여러 가지 방안이 제시되어 왔는데 그 중 하나가 컨센서스서열이나 조상서열을 사용하는 것이다 (3,7,13,14). 이론적으로 그리고 실제적으로 확인된 바에 의하면 현재 존재하는 서열들과 컨센서스서열이나 조상서열간의 유전적 거리는 이들 현존하는 서열들간의 유전적 거리보다 대략 절반 정도로 나타난다. 본 연구에서도 한국인 바이러스 분리주들간의 유전적 거리는 컨센서스서열과의 유전적 거리에 비해 대략 50% 긴 것으로 나타났다. 조상서열과의 유전적 거리는 컨센서스서열과의 유전적 거리에 비해 모두 높게 나타났다. 유전적 거리가 짧다는 것은 면역반응의 상호 반응성이 높을 수 있다는 것을 의미한다. 따라서 한국인들을

대상으로 백신주를 개발하기 위해서는 한국인 바이러스의 컨센서스서열을 가지는 바이러스가 가장 효과적일 것이라는 것을 의미한다.

이미 보고된 바와 같이 한국에서 분리된 HIV의 대다수는 한국형이라는 특수한 집단을 형성하고 있다 (9,12,16,17). 한국형 집단은 분석된 유전자의 종류나, 분석된 시기 또는 분석된 분리주의 수에 따라 차이는 있으나 한국 분리주 전체에서 적게는 62%에서 많게는 77%를 차지한다. 이와 같이 한국형 집단이 한국 전체 분리주의 대다수를 차지하고 있는 점은 한국형 집단 (KcB)의 컨센서스서열이 한국 전체 분리주 (All-Kor-con)의 컨센서스서열과 거의 유사한 사실을 설명하고 있다. 실제로 본 연구의 결과를 보면 *nef* 유전자에서는 상기 두 컨센서스서열 사이에 단 하나의 차이만 있을 뿐이다.

그러면 이론상 유추된 컨센서스서열이나 조상서열이 과연 백신으로서의 면역 효과가 있을 것인가? 최근의 연구 결과에 의하면 유추한 서열대로 합성하여 발현시켜 만들어진 단백질이 자연적인 (wild-type) 단백질과 비교하여 거의 차이가 없이 충분한 면역 효과를 보임을 알 수 있다 (1,5,11). 그러나 컨센서스서열 백신을 개발하는데 가장 중요하게 생각되는 더 광범위한 바이러스 분리주에 대해 상호반응적인 면역 효과를 나타내는데 대한 연구는 아직 수행되지 않고 있는 실정이다. 본 연구의 결과 얻어진 한국형 바이러스 또는 한국인으로 분리된 전체 바이러스의 컨센서스서열을 가지는 단백질로부터 만들어진 백신 단백질이 한국인에게 효과적일 것인지에 대해서는 아직은 알 수 없다. 그러나 앞의 예에서도 볼 수 있듯이 가능성은 있고, 향후 이 분야에 대한 연구를 더 진행하여 *nef*와 *vif* 뿐 아니라 HIV에 대한 면역반응에 중요한 역할을 하는 *env*, *gag* 그리고 *pol* 유전자에 대한 컨센서스서열을 규명하고, 특성을 알아보는 것이 중요하다.

## 참 고 문 헌

- 1) Doria-Rose NA, Learn GH, Rodrigo AG, Nickle DC, Li F, Mahalanabis M, Hensel MT, McLaughlin S, Edmonson PF, Montefiori D, Barnett SW, Haigwood NL, Mullins JI: Human immunodeficiency virus type 1 subtype B ancestral envelope protein is functional and elicits neutralizing antibodies in rabbits similar to those elicited by a circulating subtype B envelope. *J Virol* **79**: 11214-11224, 2005.
- 2) Douek DC, Kwong PD, Nabel GJ: The rational design of an AIDS vaccine. *Cell* **124**: 677-681, 2006.
- 3) Ellenberger DL, Li B, Lupo LD, Owen SM, Nkengasong J, Kadio-Morokro MS, Smith J, Robinson H, Ackers M, Greenberg A, Folks T, Butera S: Generation of a consensus

- sequence from prevalent and incident HIV-1 infections in West Africa to guide AIDS vaccine development. *Virology* **302**: 155-163, 2002.
- 4) **Felsenstein J**: PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.5c. Distributed by the author. Department of Genetics, University of Washington, Seattle. 1993.
  - 5) **Gao F, Weaver EA, Lu Z, Li Y, Liao HX, Ma B, Alam SM, Scarce RM, Sutherland LL, Yu JS, Decker JM, Shaw GM, Montefiori DC, Korber BT, Hahn BH, Haynes BF**: Antigenicity and immunogenicity of a synthetic human immunodeficiency virus type 1 group m consensus envelope glycoprotein. *J Virol* **79**: 1154-1163, 2005.
  - 6) **Garber DA, Silvestri G, Feinberg MB**: Prospects for an AIDS vaccine: three big questions, no easy answers. *Lancet Infect Dis* **4**: 397-413, 2004.
  - 7) **Gaschen B, Taylor J, Yusim K, Foley B, Gao F, Lang D, Novitsky V, Haynes B, Hahn BH, Bhattacharya T, Korber B**: Diversity considerations in HIV-1 vaccine selection. *Science* **296**: 2354-2360, 2002.
  - 8) **Kang MR, Cho YK, Chun J, Kim YB, Lee I, Lee HJ, Kim SH, Kim YK, Yoon K, Yang JM, Kim JM, Shin YO, Kang C, Lee JS, Choi KW, Kim DG, Fitch WM, Kim S**: Phylogenetic analysis of the nef gene reveals a distinctive monophyletic clade in Korean HIV-1 cases. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* **17**: 58-68, 1998.
  - 9) **Kim YB, Cho YK**: Monophyletic clade of HIV-1 subtype B in Korea: evolutionary pressure or single introduction? *AIDS Res Hum Retroviruses* **19**: 619-623, 2003.
  - 10) **Kim YB, Cho YK, Lee HJ, Kim CK, Kim YK, Yang JM**: Molecular phylogenetic analysis of human immunodeficiency virus type 1 strains obtained from Korean patients: env gene sequences. *AIDS Res Hum Retroviruses* **15**: 303-307, 1999.
  - 11) **Kothe DL, Li Y, Decker JM, Bibollet-Ruche F, Zammit KP, Salazar MG, Chen Y, Weng Z, Weaver EA, Gao F, Haynes BF, Shaw GM, Korber BT, Hahn BH**: Ancestral and consensus envelope immunogens for HIV-1 subtype C. *Virology* **352**: 438-449, 2006.
  - 12) **Lee DH, Yoon Y, Lee CH**: Phylogenetic analysis of the HIV-1 nef gene from Korean isolates. *J Microbiol* **41**: 232-238, 2003.
  - 13) **Nickle DC, Jensen MA, Gottlieb GS, Shriner D, Learn GH, Rodrigo AG, Mullins JJ**: Consensus and ancestral state HIV vaccines. *Science* **299**: 1515-1518, 2003.
  - 14) **Novitsky V, Smith UR, Gilbert P, McLane MF, Chigwedere P, Williamson C, Ndung'u T, Klein I, Chang SY, Peter T, Thior I, Foley BT, Gaolekwe S, Rybak N, Gaseitsiwe S, Vannberg F, Marlink R, Lee TH, Essex M**: Human immunodeficiency virus type 1 subtype C molecular phylogeny: consensus sequence for an AIDS vaccine design?. *J Virol* **76**: 5435-5451, 2002.
  - 15) **Page RD**: TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput Appl Biosci* **12**: 357-358, 1996.
  - 16) **Park CS, Kim MS, Lee SD, Kim SS, Lee KM, Lee CH**: Molecular phylogenetic analysis of HIV-1 vif gene from Korean isolates. *J Microbiol* **44**: 655-659, 2006.
  - 17) **Sung H, Foley BT, Bae IG, Chi HS, Cho YK**: Phylogenetic analysis of reverse transcriptase in antiretroviral drug-naïve Korean HIV type 1 patients. *AIDS Res Hum Retroviruses* **17**: 1549-1554, 2001.
  - 18) **Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG**: The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* **25**: 4876-4882, 1997.