

경산 임당동 및 사천 늑도 출토 인골의 유전자 분석

Genetic Analysis of Ancient Human Bones Excavated in Sacheon Nuk-do and Gyeongsan Yimdang-dong, Korea

徐民錫, 李奎植

Min Seok Seo, Kyu Shik Lee

<ABSTRACT>

We investigated the nucleotide substitution and insertion polymorphism of the hypervariable region I and II in mtDNA by sequencing ancient DNA from 51 ancient bones and teeth excavated at Nuk-do and Yimdang-dong in Korea. It revealed 35 sequence types from the ancient Korean. Of these, different sequences were 34 sequences. There were 19 and 38 base substitutions in HVI and HV II, respectively. Some substitutions were characteristic of East Asian populations as compared with data reported on Caucasian populations,

16051, 16150, 16172, 16223 in region I and 73, 263 in region II were noted as polymorphic sites, respectively. These were distributed evenly along the control region, though the frequency of each site was variable. Nucleotide substitution rather than insertion and deletion was the prevalent pattern of variation. Insertion of cytosine between 312 and 315 in region HV II were detected up to 98% in 51 ancient bone samples. This sequence data represents a phylogenetic tree using NTI DNA Suite computer program. The phylogenetic tree showed that mtDNA sequences of Nuk-do bones were relative to west Siberian and Indonesian.

The usefulness of mtDNA sequencing in ancient Korean population excavated at archaeological sites is based on biological and historical evidence for origin and migration of ancient Korean.

I. 서론

인류의 미토콘드리아 DNA(mitochondrial DNA, mtDNA)는 핵 DNA에 비하여 염기치환 비율이 높아서 돌연변이 비율이 매우 높는데, 개체 간에 매우 많은 변이를 보이는 고도 과변이 부위(hypervariable region)가 존재한다(Cann and Wilson, 1983). 조절 부위 내에 존재하는 이 부위는 핵 DNA에 비하여 2에서 10배가량 더 빠르게 진화하는 양상을 보여 많은 변이를 포함하게 된다. 이것은 모두 mtDNA가 DNA 복제 오류가 높고, 복구 효율은 낮은 데서 비롯된 것이다. 또한 mtDNA는 오직 모계로부터 전달되므로 한 가지 형태의 mtDNA만이 존재하여 그 형질을 계속해서 보존하고 있다. 그리고 핵 DNA는 2개의 딸세포만을 가지고 있지만, 인간의 세포 내에는 수백에서 수천 개의 mtDNA 딸세포가 존재함으로 아주 소량의 DNA이거나 손상된 DNA에서도 mtDNA의 검출이 가능하다(Lutz *et al.*, 1999). 이와 같은 특성을 가진 mtDNA는 모계 유전, 낮은 재조합율, 높은 변이율 등의 개념을 기초로 법의학, 분자 진화학, 종의 진화 등 연구에 사용되고 있으며, 그 뿐만 아니라 인류학과 고고학 분야로 그 응용 범위가 넓혀지고 있다(Piercy *et al.*, 1993; Handt *et al.*, 1994; Stoneking, 1994; Wilson *et al.*, 1995; Melton and Stoneking, 1996).

mtDNA는 보존성이 높은 유전적 특성 때문에 인류의 기원이나 인종의 유전적 경향을 밝히는데 가장 좋은 유전 표지인자로 사용되고 있다(Horai and Matsunaga., 1986; Cann *et al.*, 1987; Paabo, 1989; Melton *et al.*, 1997). 여러 민족의 mtDNA 조절부위를 염기서열 결정에 의해 다형을 분석하여 인종간의 유연관계를 규명함으로써 mtDNA가 다른 핵 DNA 보다 훌륭한 인류 유전학적 표지인자임이 입증되었으며, 또한 한 민족 집단 내에서 mtDNA 조절부위의 염기서열 다형 조사는 개인 식별을 위한 통계 자료로 활용되고 있다(Piercy *et al.*, 1993; Torroni *et al.*, 1993; Horai *et al.*, 1996). 이와 같이 mtDNA 염기서열 결정은 핵 DNA에서 분석이 곤란한 인체로부터 유래된 모발, 혈흔 등이나 오래된 인골에 대한 개인 식별에 이용되고 있으며, 특히 최근에는 고대 인골의 유전자 분석을 위해서 mtDNA의 다형 유전자 부위가 활발하게 이용되고 있다(Hagelberg *et al.*, 1989; Hagelberg and Clegg, 1991; Lassen *et al.*,

1994; Kings, 1997; Krings *et al.*, 1997).

고대 출토 인골에서 유전자 분석을 실시한 대표적인 예로, 유럽에서는 Handt 등 (1994)이 1994년에 5,100년에서 5,300년 전으로 추정되는 Tyrolean Ice Man으로부터 mtDNA 염기서열을 분석하였다. Hagerberg과 Clegg(1991)는 2,500년 전 고대 폴리네시아인의 골격 견본으로부터 mtDNA 염기서열을 분석한 결과, 현대 폴리네시아인과 동일하게 고대 폴리네시아 인골에서도 9개의 염기쌍이 삭제되어 있는 것을 확인하였다. Kings(1997)는 1856년 서쪽 독일의 Neander 계곡에서 발견된 네안데르탈인 골격에서 mtDNA 염기서열을 분석한 결과, 그것은 현대 유럽인의 mtDNA와 직접 관계가 없다고 보고하였다. 또한 Oota 등(1995)은 규슈지역의 14구(1개의 뼈와 13개의 치아)와 35구(13개의 뼈와 28개의 치아)에서 mtDNA의 염기서열을 분석한 결과, 출토 인골의 염기서열은 일본 조몬인 또는 현대의 아이누인과 일치하지 않는다는 것을 보고하였다.

이와 같이 일부 출토 인골에 대한 염기서열의 분석은 시행되고 있으나, 한반도를 중심으로 동북아시아 지역의 mtDNA 변화에 대해서 알려진 것은 거의 없다. 현재까지 mtDNA와 Y-염색체의 제한 절편 길이 다형성 분석(restriction fragment length polymorphisms, RFLP) 연구가 수행되어 왔는데, 이를 통하여 북방 아시아 사람과 여러 태평양 섬에 거주하는 원주민들의 기원이 동남아시아까지 퍼져 있다고 보고 되었다 (Ballinger *et al.*, 1992; Redd *et al.*, 1995; Horai *et al.*, 1996; Kolman *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 1997; Comas *et al.*, 1998; Melton *et al.*, 1998; Su *et al.*, 1999; Ding *et al.*, 2000). 하지만, 서유라시아, 아메리카, 그리고 시베리아와는 대조적으로, 동북아시아의 mtDNA 분석은 아직까지 확실한 과학적 정립이 이루어져 있지 않다(Torroni *et al.*, 1993; Macaulay *et al.*, 1999; Schurr *et al.*, 1999). 과거 유전적 교류 및 그 기원에 관한 보다 분명한 유전학적 정보를 얻기 위해서 문화 유적지에서 출토되는 고대 인골의 유전적 특징을 규명하는 것이 필요하다.

본 연구는 과거 한반도 거주 인류의 모계 유전과 관련된 변화 패턴을 관찰하기 위하여, mtDNA 염기서열 변화를 과거 200년에서 2,500년전 사이 한반도에 거주했던 인류의 인골을 조사하였다. 이들 유적지의 특징은 남한 지역에서는 처음으로 낙랑토기가

발견됨으로써 이 지역이 기원 전후시기 중국과 서해안, 그리고 남해안을 거쳐 일본으로 이어지던 동북아 지역의 중심 교역루트였음이 밝혀졌다. 낙랑 토기는 한반도 남부에서 한반도 출토되지 않았던 독특한 토기이다. 아울러 이 유적에서 중국 전한(前漢)때 사용됐던 동전인 반량전과 일본 야요이 토기가 출토됨으로써 늑도를 거점으로 2천여년 전 중국~늑도, 서해안~늑도, 일본~늑도의 교류항로였을 가능성이 추론되었다. 경상남도 늑도는 청동기 후기에서 철기시대 초기의 유물이 집중돼 이미 학계에서 관심의 초점이 되어 온 곳으로 독특한 매장유적(시신을 엮드린 형태로 묻은 복장)과 온돌시설, 그리고 부뚜막이 많이 발견되는 등 각종 유적이 풍부해 그동안 베일에 가려졌던 우리나라 남해안 고대사의 비밀을 풀 수 있는 유일한 유적으로 알려져 왔다. 또한 경산 임당동 유적지는 원삼국시대부터 조선시대까지 연대 층이 고루 분포하는 우리나라에서 보기 드문 유적지이다(박 등, 2001). 이와 같은 여러 시대의 거주민이 매장되어 있는 유적지의 조사는 지역 특이적인 유전자 분석에 중요한 자료를 제공한다.

이러한 주요 발굴지에서 출토된 인골을 이용하여 과거에 매장되었던 한반도 거주민의 mtDNA 고도 과변이 지역 I 과 II 의 염기서열을 관찰하고, 유전적 변이 양상을 표준서열과 비교하였다. 더 나아가 이미 발표된 현존하는 한국인 mtDNA와의 연관 관계를 통하여 고대 한반도 인류의 모계 유전과 관련된 민족의 이동과 유전적 교류에 관한 정보를 얻고 이를 통하여 과거 한반도 거주민의 유전적 구조 및 변이에 대하여 자세히 관찰하고자 본 연구를 시행한 바 그 결과를 보고한다.

II. 실험 방법

1. 시 료

경상남도 사천시 늑도에서 2년('98~'99)동안 동아대학교 박물관에서 출토한 인골 18구와 경상북도 경산시 임당동에서 2년('96~'97년) 동안 영남문화재연구원에서 출토한 인골 48구를 시료로 사용하였다. 발굴지에서 출토된 유물(토기, 장신구, 의류)과 인

골의 형태적 구분을 통하여 이미 검증되어 있는 연대를 사용하였다. DNA를 추출하기 위해 인수 받은 인골 시료는 -70°C 에 냉동 보관하여 실험에 사용하였다.

2. DNA 추출

탈칼슘화가 이루어진 시료의 DNA 추출은 QIAamp DNA Mini kit(Qiagen, Germany)를 사용하였다. 키트(Kit)를 사용하기에 앞서 탈칼슘화가 이루어진 인골 분말에 0.5M EDTA용액 0.5ml, 10% SDS용액 20 μl , 그리고 단백질 분해효소 K(10 mg/ml) 용액을 40 μl 첨가하여 37°C 에서 12시간 동안 혼합하면서 반응시켰다. 그 후 제반 실험과정은 키트에 제시한 방법에 따라 동일하게 실시하였다.

3. 중합효소 연쇄반응

순수하게 정제된 시료의 DNA는 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)의 주형으로서 사용되었다. 미토콘드리아 내의 두개의 고도 과변이 부위 HV I 지역(염기 16021~16380), HV II 지역(염기 31~408)은 Anderson 등(1981)의 대조 염기서열을 시발체(primer)로 이용하여 증폭되었다. PCR 증폭조건은 초기 95°C 15분의 반응시간을 주었으며, 그 후 94°C 20초, 56°C 30초, 72°C 45초를 총 38 반응주기로 수행하였다. 또한, 마지막으로 72°C 7분을 주어서 그 증폭 양을 최대한으로 높였다.

4. 염기서열 분석

염기서열 반응은 ABI Prism BigDye Cycle Sequencing Ready Reaction Kit 2.0(Applied Biosystems, USA)을 사용하여 9600 GeneAmp Thermal Cycler(Perkin Elmer, USA)에서 수행하였다. 주형 DNA로 정제된 PCR 산물 1 μl 를 사용하여 반응용액과 함께 총 10 μl 의 양으로 반응하였다. 반응조건은 초기에 95°C 2분, 그리고 94°C 10초, 50°C 5초, 60°C 4분을 기준으로 총 25회 반응시켰다. 각 주형은

HV I 의 시발체인 L15971과 H16258, 그리고 HV II 의 시발체인 L00015와 H00389를 이용하여 양방향으로 염기서열 분석을 실시하였다.

5. 계통학적 분석

분석된 염기서열들은 Sequence Navigator 컴퓨터 프로그램(Applied Biosystems, Sequence Navigator, version 1.0.1)을 이용하여 정렬되었고, 대조 염기서열(Anderson *et al.*, 1981)과 비교되었다. 그 결과들은 Microsoft Excel 표(Microsoft Corporation 2001, Microsoft Excel 2002)로 전환하여 각 뉴클레오티드의 치환, 결실, 삽입 등에 관하여 통계적인 자료로 사용하였다. 본 실험에서는 DNA 염기서열 데이터 분석 컴퓨터 프로그램인 Vector NTI Suite Align X(InforMax, USA)를 사용하여 염기서열의 통합정렬, 유사도 및 계통도를 작성하였다. 고대 출토된 인골의 mtDNA 고도 과변이 지역(HV I 과 HV II)에서 밝혀진 염기서열 데이터와 이미 인터넷 상에 공개되어 있는 mtDNA 고도 과변이 지역(HV I 과 HV II) 염기서열 데이터를 비교 분석하였다.

III. 실험 결과

1. DNA 중합효소 연쇄반응(Polymerase Chain Reaction)

사천 늑도 출토 인골 18구 중 10구의 HV I 과 11구의 HV II 염기들이 중합효소 연쇄 반응을 통하여 증폭되었으며, 경산 임당동 출토 인골 48구 중 30구(F 발굴구역-9구, G 발굴구역-21구)의 HV I 과 35구(F 발굴구역-11구, G 발굴구역-24구)의 HV II 염기들이 성공적으로 증폭되었다. 사천 늑도 출토 인골 총 8구와 경산 임당동 출토 인골 총 27구에서 각각 HV I 과 HV II 가 동시에 증폭되었다. 두 발굴지역 모두에서 HV I (40구)에 비하여 HV II (46구)가 상대적으로 더 많은 시료에서 분석이 이루어졌다.

2. 염기서열 분석

고대 한반도 출토 인골 66구 중 51구의 mtDNA 고도 과변이 지역 HV I 과 HV II 를 염료 종결 부위(dye terminator) 방법으로 염기서열 분석하였다. 모든 시료에서, 자동 염기서열 분석장치를 사용하여 PCR 산물의 직접적인 염기분석(direct sequencing)을 수행해서 최종 결과를 얻었다. HV I 의 16041부터 16258까지, 그리고 HV II 의 70부터 340까지의 염기 서열을 Anderson 등(1981)의 대조 염기서열과 비교하였다(Table 1~6). 그 결과 HV I 의 염기 서열은 19개의 염기에서 표준 염기서열과 다르게 나타났으며 HV II 에서는 38개의 염기에서 차이를 보였다. 이러한 다형적인 위치는 고도 과변이 조절지역에 고르게 분포되어 있었으나, 각 염기들의 변화 빈도는 염기에 따라 차이를 보였다.

Table 1. List of sequence polymorphisms observed in the mtDNA HV I region of ancient human bone excavated from Nuk-do

Samples	Anderson sequence			
	16155	16172	16174	16223
	A	T	C	C
N-2		C		T
N-3		C	T	T
N-4	C	C	T	T
N-5		C	T	T
N-6		C	T	T
N-7		C	T	T
N-8		C	T	T
N-9		C	T	T
N-13		C	T	T
N-14		C	T	T
N-23		C	T	T

Table 2. List of sequence polymorphisms observed in the mtDNA HV I region of ancient human bone excavated from Yimdang-dong F site

Samples	Anderson sequence												
	16051	16093	16117	16150	16155	16168	16172	16173	16174	16183	16189	16223	16241
F-46			A										
F-47	G			T					T			T	
F-52													
F-59												T	T
F-60	G			T								T	
F-65	G			T								T	
F-70		C				T	C			C	C		
F-77	G			T								T	
I-15	G			T	T			G					

Table 3. List of sequence polymorphisms observed in the mtDNA HV I region of ancient human bone excavated from Yimdang-dong G site

Samples	Anderson sequence													
	16051	16085	16091	16111	16116	16150	16155	16157	16172	16173	16174	16223	16225	16232
G-2	G	T	G	A		T	T	A						
G-6	G	T	G	A	G	T	T	A						
G-10	G					T					T	T	T	
G-20									C		T	T		
G-22									C		T	T		
G-24	G					T						T		
G-29	G					T						T		
G-46	G					T						T		
G-51	G					T						T		
G-53				G		T			C		T	T		T
G-59	G					T						T		T
G-73									C		T	T		T
G-75	G					T						T		
G-76	G					T						T		
G-78	G					T			C			T		
G-80	G					T						T		
G-81	G	T				T								
G-95	G					T						T		
G-112	G					T						T		
G-113	G					T						T		
G-131	G											T		

Table 4. List of sequence polymorphisms observed in the mtDNA HVII region of ancient human bone excavated from Nuk-do

sample	Anderson sequence															324	330								
	63	67	73	103	125	128	146	152	162	183	194	204	206	228	236			263	295	314	315+1	320			
n-2			G				C			G						G									
n-3			G		A		C			G						G								C	
n-4			G				C			G						G								C	
n-5			G				C			G			C		A	G			T				C		
n-8	C	T	G	A		T				T						G	T						C		
n-9			G				C			G						G							C		
n-12			G				C									G							C	T	G
n-13			G				C			G						G	T						C	T	T
n-14			G				C	C	T	G		A				G							C	T	
n-22			G																				C		
n-23			G				C			G	T			C		G							C	T	G

Table 5. List of sequence polymorphisms observed in the mtDNA HVII region of ancient human bone excavated from Yimdang-dong F site

Samples	Anderson sequence																				
	73	81	120	128	129	132	146	151	162	183	186	200	209	214	257	263	315+1	320	343	356	
F-41	G																G				
F-46	G																G	C			
F-48												G			G	G	C				
F-52	G																G	C			
F-59	G			T			C			G							G	C			
F-60			G						A	G		G					G	C		A	G
F-65	G																G	C			
F-70	G											G				G	G	C			
F-76	G														G		G	C			
F-77		C			A												G	C	T		
I-15	G					T					A			G							

Table 6. List of sequence polymorphisms observed in the mtDNA HVII region of ancient human bone excavated from Yimdang-dong G site

Samples	Anderson sequence													
	68	73	146	147	150	162	183	200	257	263	315+1	320	329	345
	G	A	T	C	C	C	A	A	A	A		C	G	C
G-2	T	G								G	C			
G-6		G	C				G			G	C			
G-10		G		T						G	C	T	T	
G-20		G	C				G			G	C			
G-22		G								G	C	C		
G-24		G			T					G	C			T
G-29		G								G	C			
G-31		G								G	C			
G-46		G						G	G	G	C			
G-51		G								G	C			
G-53		G								G	C			
G-57		G								G	C	T		
G-59										G	C			
G-65		G								G	C			
G-73		G	C				G			G	C			
G-75		G	C				G			G	C			
G-76		G								G	C			
G-78										G	C			
G-80		G								G	C			
G-81		G								G	C			
G-95		G				T		G		G	C			
G-113		G								G	C			T
G-117										G	C			
G-128			C				G			G	C			

대부분 염기들의 변화는 실험에 이용된 인골의 20%미만으로 소수의 변화를 보였지만, HV I 고도 과변이 부위 중 16051, 16150, 16172, 16223번 염기들의 변화는 주어진 인골수의 90% 이상을 차지했다. 또한 HV II 고도 과변이 부위 중 73, 263번 염기의 변화도 90%이상을 차지했다. 그러나 HV II 고도 과변이 부위 중 C-뻗기(C-stretch) 염기서열에서 315번 염기 뒤에 또 하나의 시토신(cytosine)이 삽입(insertion)된 경우가 조사 시료의 90% 이상을 차지했다.

본 실험을 통해 미토콘드리아 조절부위의 다형현상의 패턴은 염기의 삽입(insertion) 또는 결실(deletion) 보다 오히려 염기치환(substitution)이 염기서열 변화의 주된 요인으로 확인되었다. 본 실험에서 밝혀진 미토콘드리아 조절 부위의 염기 돌연변이를 살펴본 결과, 전이(transition) 타입이 전환(transversion) 타입보다 일반적인 것으로 나타났다(Table 7).

Table 7. Kinds of nucleotide changes compared with those of Anderson in control region of mtDNA in ancient Koreans. Each number represents cumulative number found in 51 ancient Koreans. Number of loci showing nucleotide change is showed in parenthesis

Type of nucleotide change		Hypervariable Region I	Hypervariable Region II
Nucleotide substitution			
Transition	G→A		1(1)
	A→G	25(3)	106(6)
	T→C	18(3)	18(4)
	C→T	78(7)	21(11)
subtotal		121(13)	146(22)
Transversion	G→T		3(3)
	G→C		2(2)
	A→T	4(2)	1(1)
	A→C	2(2)	
	T→G		
	T→A	3(2)	6(6)
	C→G	2(2)	6(5)
	C→A	2(1)	2(2)
subtotal		13(9)	20(19)
Insertion	C		42(1)
Total		134(22)	208(42)

51구의 출토 인골 미토콘드리아 HVI 과 II 부위의 염기서열을 통하여, 34개의 염기서열은 오직 하나의 출토 인골에서 확인되었다. 반면에 사천시 늑도 출토 인골 2구(N-4와 N-9)의 염기서열이 동일하게 나타났고, 경산시 임당동 출토 인골에서는 2구(F-41과 G-31)와 6구(F-65와 G-29, 51, 76, 80, 113)의 인골에서 각각 같은 염기서열이 나타났다. 하지만 HVI 과 HVII 염기서열이 동시에 밝혀지지 않은 7구의 나머지 인골(N-6, N-7 그리고 F-41, F-48, G-31, G-112, G-128)들에 대해서는 확인할 수 없었다.

HVI 의 경우에 단 1구만의 출토인골(F-70)에서 16189 염기가 T에서 C로 치환되는 C-뺀기 현상이 보였다. 또한 C-뺀기 현상 앞의 염기16183이 A에서 C로 먼저 치환되어 있어서 시료는 16183부터 16192 염기까지 총 11개의 시토신이 배열되어 있는 특이한 서열을 확인할 수 있었다. HVII 의 경우에는 출토된 인골들의 염기서열에서, 2구(N-2와 G-31)의 인골을 제외한 나머지 98%가 315 염기의 위치에 C가 삽입되는 다형 현상을 확인할 수 있었다.

4. 통계분석

통계처리 결과, Anderson 등(1981)의 염기서열과 비교해서 밝혀진 염기서열 중 54%가 하나의 인골마다 6개와 8개의 뉴클레오티드 사이에서 치환, 삽입 또는 결실되는 것을 확인하였다(Fig. 1). 또한 최고 13개에서 표준 염기서열과 다른 인골이 1구 존재했다. 반면 표준 염기서열과 동일한 염기서열을 가진 인골은 관찰할 수 없었고, HVI 에서 16051, 16150, 16172, 16174, 16223 위치에서 변이가 높게 나타났으며, HVII 에서 73, 263, 315번에서의 변이가 높게 나타났다(Fig. 2, 3). 특히 HVII 의 263 위치는 구아닌(G)으로 99% 치환되어 있으며, 311에서 315 위치는 95%이상 시토신(C)이 5개가 아니라 6개로 나타남을 확인하였다.

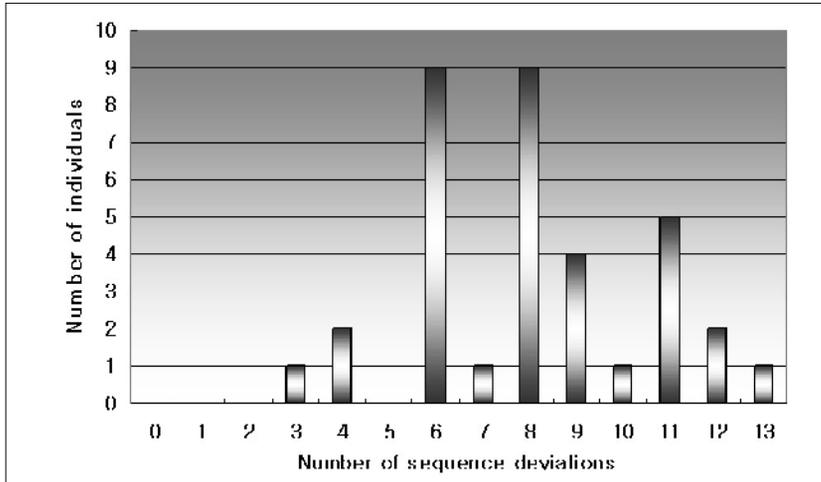


Fig. 1. Number of sequence polymorphisms in the human mitochondrial control region as compared to the Anderson reference sequence (Anderson et al., 1981). X-axis: Number of polymorphisms per control region; Y-axis: Number of individuals carrying a given number of polymorphisms; sample size: n = 36.

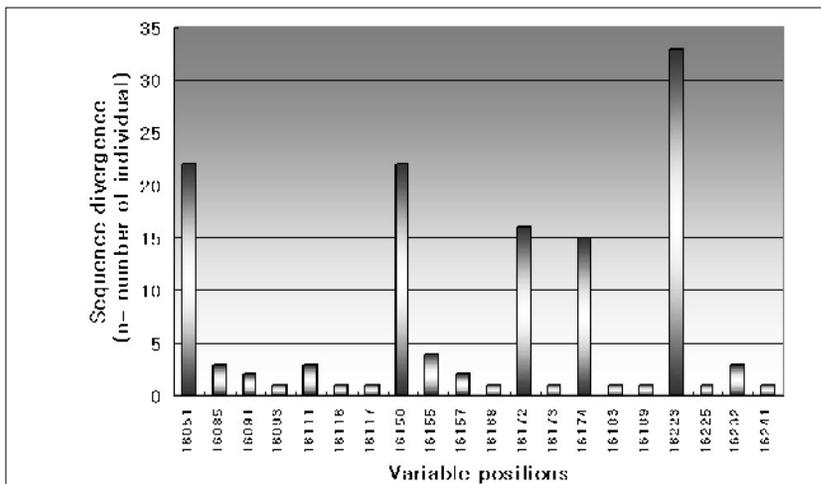


Fig. 2. Number and distribution of polymorphic positions in the human mitochondrial control region HV1 among 51 individuals from bone and teeth of ancient Koreans. X-axis: Nucleotide position in the control region, Y-axis: Number of individuals who show certain deviation from the Anderson sequence.

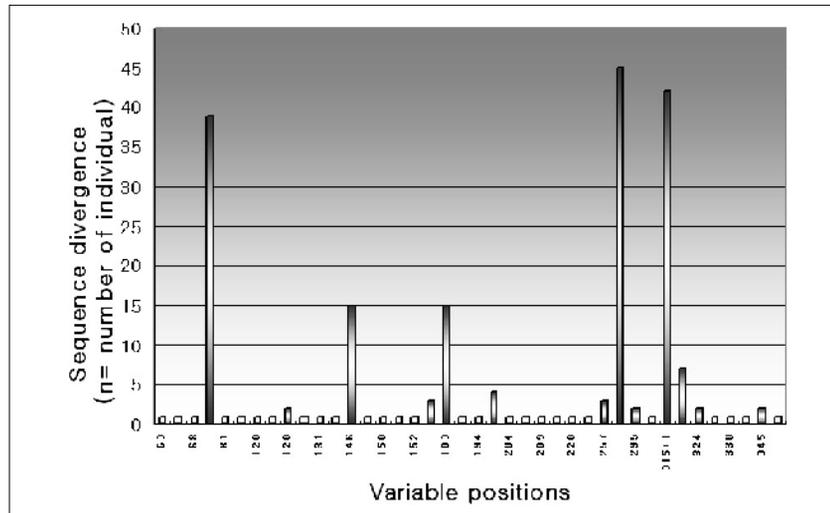


Fig. 3. Number and distribution of polymorphic positions in the human mitochondrial control region HVII among 51 individuals from bone and teeth of ancient Koreans. X-axis: Nucleotide position in the control region, Y-axis: Number of individuals who show certain deviation from the Anderson sequence.

5. 계통학적 분석

본 연구에서 출토 인골의 미토콘드리아 DNA 변화를 일본인과 중국인의 DNA 데이터를 이용하여 통계처리 하였다(Table 8). 현존하는 일본인, 중국인과 비교 분석한 결과, 세 민족 모두 미토콘드리아 염기의 치환에 있어 전이가 전환보다 높게 나타나는 변화 현상을 보였다. 특히 출토 인골과 현존하는 일본인에서 C가 T로 치환되는 비율(36.7%)이 가장 높게 나타났으며, 일본인과 중국인에서는 G가 A로의 전이가 각각 11.2%와 7.8% 알려져 있으나, 출토 인골에서는 0.0%로 전혀 확인되지 않았다. 전환은 세 민족 모두 G가 C로 되거나 C가 G로 치환되는 염기서열은 동일하게 보이지 않았지만, 나머지 전환과 삽입도 극히 일부만 확인될 뿐이라 세 나라 모두 전이가 가장 높음을 확인할 수 있었다. 이들 세 민족에 현존하는 사람들의 mtDNA 염기서열과 함께 서양인(Caucasian)인을 포함하여 모두 4개의 현존 집단의 mtDNA 염기서열을 출토 인골의 염기서열과 비교 관찰

하였다(Table 9). 현존하는 동북아시아 민족에서는 16183과 16189에서 A가 C(한국 21.7%, 일본 29.5%, 중국 21.7%)로, T가 C(한국 30.0%, 일본 37.7%, 중국 30.0%)로 각각 치환빈도가 높게 나타났다. 그러나 본 연구에서, 51구의 인골 분석에서는 단 1구(2.0%)만이 이러한 현상을 보였다. 또한, 코카시아인에서 낮은 빈도(10.0%)로 나타나는 16223 염기의 C가 T로 치환되는 현상은 한국(75.0%), 일본(73.8%), 중국(62.5%) 뿐만 아니라 출토 인골에서도 높은 비율(64.7%)로 나타났다. 특히 16111 부분에서 C가 A로 바뀌는 현상은 출토 인골(3.9%)과 중국인(2.0%)에서만 나타났다.

Table 8. Types of nucleotide replacement observed in three population of East Asia

Type of nucleotide change		Observed number (%)		
		Ancient Koreans ^a (n= 51)	Japanese ^b (n= 150)	Chinese ^b (n= 120)
Nucleotide substitution				
Transition	G→A	0(0.0)	61(11.2)	39(7.8)
	A→G	25(18.5)	19(3.5)	14(2.8)
	T→C	18(13.5)	204(36.6)	214(42.8)
	C→T	78(58.3)	203(36.7)	178(35.6)
subtotal		121(90.3)	487(88.0)	445(89.0)
Transversion	G→T	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
	G→C	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
	A→T	4(3.0)	4(1.0)	4(0.8)
	A→C	2(1.5)	30(5.5)	35(7.0)
	T→G	0(0.0)	0(0.0)	1(0.2)
	T→A	3(2.2)	3(0.5)	1(0.2)
	C→G	2(1.5)	2(0.5)	3(0.8)
	C→A	2(1.5)	14(2.5)	5(1.0)
subtotal		13(9.7)	53(10.0)	49(10.0)
Insertion	C	0(0.0)	10(2.0)	4(1.0)
Total		134(100)	550(100)	498(100)

^aPresent study

^bNishimaki et al. (1999)

Table 9. Characteristic nucleotide replacements and their frequencies observed in various populations

Ref.	This study	Pfeiffer <i>et al.</i> (1998)	Horai and Hayasaka (1990)	Nishimaki <i>et al.</i> (1999)	Rousselet <i>et al.</i> (1998)
Nucleotide positions and Replacement	Ancient Korean (n= 51)	Korean (n= 50)	Japanese (n= 61)	Chinese (n= 120)	Caucasian (n= 50)
16111 C→A	3.9	0.0	0.0	1.7	0.0
→T	0.0	6.7	0.0	3.4	2.0
16183 A→C	2.0	21.7	29.5	21.7	12.0
16189 T→C	2.0	30.0	37.7	30.0	18.0
16223 C→T	64.7	75.0	73.8	62.5	10.0

(%)

n : Number of examined individuals

6. 계통수(Phylogenic tree)

염기서열 결과를 기준으로 DNA 염기서열 데이터 분석 컴퓨터 프로그램인 Vector NTI Suite Align X(InforMax, USA)를 사용하여 염기서열의 종합적인 배열과 계통수를 작성했다. 계통수의 결과를 볼 때 녹도 출토 인골과 경산 임당동 출토 인골들은 모두 유사도가 높게 나타나, 출토 인골들이 가까운 근연관계를 가지고 있는 것을 확인하였다.

한편, Vector NTI Suite Blast Search 프로그램을 이용하여 NCBI(National Center for Biotechnology Information) 웹 서브 상에 존재하는 동남아시아인과 동북아시아인 그리고 서 유럽인과 시베리아인 등의 미토콘드리아 DNA 데이터베이스를 구축하였다. 이렇게 구축된 데이터베이스를 각 지역의 출토 인골의 미토콘드리아 DNA 염기서열과 비교하여 본 결과, 녹도 출토 인골들 중 대표적으로 염기서열이 확실하게 밝혀진 N-2는 서쪽 시베리아인과 유사한 유연관계를 보였지만, N-5 시료에서는 동남

아 계열인 인도네시아인과 중국 남서부지역인 윈난성(Yunnan) 집단과 유연관계가 더 가깝다는 사실을 확인할 수 있었다(Fig. 4). 또한 두 지역에서 발굴된 인골 시료들은 현존하는 일본인과의 유연관계가 먼 것을 확인하였다.

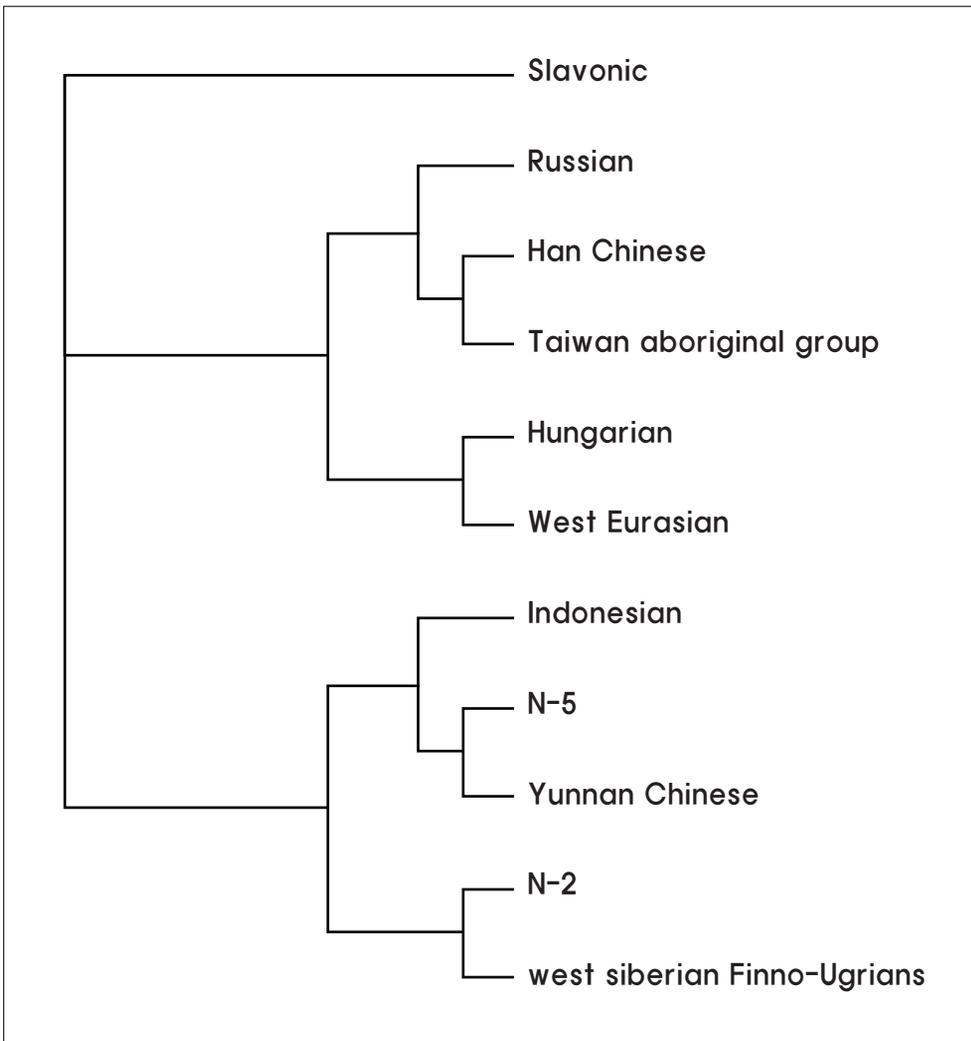


Fig. 4. Phylogenetic tree for 10 human population with human mtDNA. N-2 and N-5 are ancient human from Nuk-do prepared in this study.

IV. 고 찰

발굴된 인골들은 mtDNA 추출에 많은 어려움이 있기 때문에 지금까지 다른 생물학적 연구에 비교하여 많은 연구가 이루어지지 않았었다. 매장되어 있는 인골들의 보존상태가 좋지 않아 mtDNA가 추출되었어도 사용할 수 있는 양은 극히 한정적이다 (Handt *et al.*, 1994). 출토 인골의 mtDNA의 존재는 그 인골이 얼마나 오랜 기간 매장되어 있었는가 보다는 매장된 환경이 어떤가에 따라 달라진다(Paabo, 1989; Hss *et al.*, 1996). PCR은 손상되어 있거나 다른 외부 오염물질과 함께 존재하는 DNA 중에서도 특별한 DNA만을 증폭하지만 PCR을 사용하여 확실하고, 명확하고, 신뢰할 수 있는 mtDNA 염기서열을 얻을 수 있다는 것은 아직까지 완벽하게 풀지 못하는 문제로 남아 있다(Handt *et al.*, 1994).

본 연구는 고대 한반도 거주 인류의 유전적 특징을 밝히기 위하여 사천시 늑도와 경산시 임당동에서 출토된 인골을 대상으로 mtDNA 고도 과변이 지역 I 과 II에서 염기서열의 다형현상을 관찰하였다. 전통적인 DNA 추출법인 페놀-클로로포름-아이소아밀알콜법과 미세농축법으로 출토 인골시료의 DNA를 추출한 결과, 미생물 DNA의 오염이 관찰되어 본 실험에서는 사용하지 않았다. 매장되어 있는 인골들은 대부분 오염되어 있거나 손상되어 있으므로, 상품화된 Kit를 이용하여 보다 일관적인 결과를 얻을 수 있었다. 성공적으로 추출된 DNA의 염기서열 결과, 대부분의 다형현상은 C와 T 사이의 이행으로 나타나는데, 이러한 돌연변이는 mtDNA가 복제되는 동안 불일치(mismatch)로부터 기인된다고 보고된 바 있다(Sullivan *et al.*, 1992). 본 실험 결과에서 보여 지는 바와 같이 염기 16223은 한국, 일본, 중국 모두에서 전이가 일어나는 것을 확인할 수 있는데, 이 부분은 한국인과 일본인 사이에서 빈번하게 발생하는 부위로 알려져 있다(Lee *et al.*, 1997; Seo *et al.*, 1998). 서양인과 비교한 결과, 이 전이는 동아시아의 집단에 특이적으로 작용한다는 사실을 확인할 수 있었다. 그러나 Watson 등(1997)은 염기 16223의 치환이 조사된 아프리카인의 92%에서도 관찰되었다고 보고했다. 따라서 16223 염기의 치환은 동아시아 민족과 아프리카 민족과의 공통된 염기 치환의 경우를 공유하고 있다고 생각할 수도 있지만, 이런 염기 치환으로는 민족 및 지역적

인 특징을 짓기에는 무리가 따르는 것으로 사료된다.

HV I 지역에서 C-뺀기가 인골 1구(F-70)에서 확인되었다. 이 인골은 16189 부위의 T가 C로 치환되어 있으면서 바로 앞 16183 부위에서도 A가 C로 교체되어 있었다. 동일지역인 임당동의 다른 인골 시료에서는 전혀 확인할 수 없는 특징적이었다. 그리고 이 F-70 인골의 mtDNA 염기의 치환은 총 5개로 16093, 16168, 16172, 16183, 16189 부위에서 일어났다. 이 부위들 중 16172를 제외한 나머지 4개의 치환은 분석된 51구의 인골 염기서열에서 전혀 치환 현상을 관찰할 수 없었다. 이렇게 절대적으로 돌연변이가 일어난 인골의 경우에는 다른 민족과의 비교를 통한 계통수 데이터에서 배제시켜야 했다.

HV II 지역에서도 C-뺀기 현상이 일어나는데, HV II는 HV I 과 다르게 치환이 아닌 삽입에 의해 발생하였다. 311 부위부터 315 부위까지 총 5개의 C가 존재해야 하는데, 본 실험대상의 늑도와 임당동 출토 인골들 중 총 42구의 인골에서 C가 삽입되어 6개의 C가 배열되어 있는 것을 확인할 수 있었다. 하지만, HV II의 이러한 염기의 삽입으로 인한 C-뺀기 현상은 이미 다양한 집단들의 특징으로 여겨지고 있다(Hauswirth and Clayton, 1985).

본 실험결과에서 HV I 부위에서 22개, 그리고 HV II 부위에서 42개의 변이 부위가 관찰되었는데, HV I에서는 C가 T로 치환된 것이 78개로 제일 많았으며, HV II에서는 A가 G로 치환된 것이 106개가 보였다. HV I 부위에서 다형성의 분포를 보면 16223 부위가 가장 높으며 그 다음으로 16150, 16051, 16172, 16172 순서로 나타났다. HV II에서는 크게 3부분에서 다형성의 근거를 확인할 수 있었는데, 236 부위가 가장 높게 나타났으며 그 다음으로 311에서 315까지의 C-뺀기 부위 중 C가 삽입된 부위 그리고 73 부위가 순서대로 확인되었다. 염기 변화에 따른 다형성의 분포를 관찰한 결과, 가장 심한 인골의 염기 변화는 13개까지 표준 염기서열(Anderson *et al.*, 1981)과 비교하였을 때 차이를 보였다. 하지만 51구의 고대 인골 시료들은 대체로 6과 8사이를 오가는 염기 변화 폭을 가지고 있음을 관찰할 수 있었다. 이와 같이 여러 출토 인골들의 mtDNA는 삽입, 결실에서보다 치환에 의해 염기의 변이를 나타내고 있으므로, mtDNA의 다형성을 밝히기 위해서는 염기서열 결정법이 가장 좋을 것으로 생각된다. 하지만, 염기서열

결정법은 비용과 시간을 고려해야 하기 때문에 클로닝을 이용한 분석(cloning sequencing) 방법보다는 직접적인 염기분석(direct sequencing) 방법을 이용하여 PCR 산물 분석을 수행하여도 좋은 결과를 얻을 수 있을 것으로 생각된다.

발굴된 인골들 간의 관계를 알고 다른 민족과의 유연관계를 확인하고자 NTI DNA Suite 프로그램을 이용하여 계통수를 관찰하였다. 계통수를 관찰한 결과, 늑도 출토 인골과 경산 임당동 출토 인골들은 모두 염기서열 유사도가 높게 나타나, 출토 인골들이 가까운 근연관계를 가지고 있는 것으로 관찰되었다. 또한 늑도 인골의 N-2와 N-5의 염기서열을 통한 계통수에서 N-5가 동남아시아인 중 인도네시아인과 유연관계가 깊은 것으로 나타났다. 이는 동아대박물관 발굴팀이 늑도에서 국내서는 처음으로 복장된 인골과 당시 국제교역을 증명하는 일본 야요이 토기 및 중국 화폐 반량전 등 유물을 발굴했다는 사실은 이 지역이 2천여년 전 중국~늑도, 서해안~늑도, 일본~늑도의 교류항로일 가능성이 있으며, 청동기시대 말기에서 철기시대 초기에 걸쳐 중국-낙랑-일본을 잇는 국제무역의 거점이었다는 사실이 확인되었다. 이러한 역사적 배경과 함께 늑도 출토 인골의 mtDNA 분석한 결과, 2000년 전 한반도 거주 인류가 동남아계열을 포함하는 남방계가 주류를 이루었던 것이 아니라, 국제적 무역항으로의 역할을 하던 늑도에 동남아인들과 중국 남부 지역 사람들이 유입되어 정착하였을 가능성을 제시한다고 생각되어진다. 그러나 보다 확실한 고대인의 유입과 정착을 확인하려면 보다 많은 늑도 및 여러 지역의 출토 인골 mtDNA 연구가 추가적으로 분석되어야 할 것으로 사료된다.

참고 문헌

1. 박승규, 장용석, 유경원, 권태용, 이재홍, 안순천, 류미라. 1999. 慶山 林堂洞 遺蹟 I, II. 재단법인 영남문화재연구원.
2. Anderson, S., A.T. Bankier, G.B. Barrell, M.H.L. de Bruijn, A.R. Coulson, J. Drouin, I.C. Eperon, D.P. Nierlich, B.A. Roe, F. Sanger, P.H. Schreier, A.J.H. Smith, R. Staden, and I.G. Young. 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*. 290: 457-465.
3. Ballinger, S.W., T.G. Schurr, A. Torroni, Y.Y. Gan, J.A. Hodge, K. Hassan, K.H. Chen, and D.C. Wallace. 1992. Southeast Asian mitochondrial DNA analysis reveals genetic continuity of ancient mongoloid migrations. *Genetics*. 130: 139-152.
4. Cann, R.L., and A.C. Wilson. 1983. Length mutations in human mitochondrial DNA. *Genetics*. 104: 699-711.
5. Cann, R.L., M. Stoneking, and A.C. Wilson. 1987. Mitochondrial DNA and human evolution. *Nature*. 325: 31-36.
6. Comas, D., F. Calafell, and E. Mateu et al.(12 co-authors). 1998. Trading genes along the silk road: mtDNA sequences and the origin of central Asian populations. *Am. J. Hum. Genet.* 63: 1824-1838.
7. Ding, Y.C., S. Wooding, and H.C. Harpending et al.(11 co-authors). 2000. Population structure and history in east Asia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 97: 14003-14006.

8. Hagelberg, E., B. Sykes, and R. Hedges. 1989. Ancient bone DNA amplified. *Nature*. 342: 485.
 9. Hagelberg, E., and J.B. Clegg. 1991. Isolation and characterization of DNA from archaeological bone. *Proc. R. Soc. Lond. [B]*. 244: 45-52.
 10. Handt, O., M. Hoss, M. Krings, and S. Paabo. 1994. Ancient DNA—methodological challenges. *Experientia*. 50: 524-529.
 11. Hauswirth, W.W., and D.A. Clayton. 1985. Length heterogeneity of a conserved displacement-loop sequence in human mitochondrial DNA. *Nucleic Acids Res.* 22: 8093-8104.
 12. Horai, S., and E. Matsunaga. 1986. Mitochondrial DNA polymorphism in Japanese. Analysis with restriction enzymes of four of base pair recognition. *Hum. Genet.* 72: 105-117.
 13. Horai, S., and K. Hayasaka. 1990. Intraspecific nucleotide sequence differences in the major noncoding region of human mitochondrial DNA. *Am. J. Hum. Genet.* 46:828-842.
 14. Horai, S., K. Murayama, K. Hayasaka, S. Matsubayashi, Y. Hattori, G. Fucharoen, S. Harihara, K.S. Park, K. Omoto, and I.H. Pan. 1996. mtDNA polymorphism in east Asian populations, with special reference to the peopling of Japan. *Am. J. Hum. Genet.* 59: 579-590.
 15. Hss, M., P. Jaruga, T.H. Zastawny, M. Dizdaroglu, and S. Paabo. 1996. DNA damage and DNA sequence retrieval from ancient tissues. *Nucleic Acids Res.* 24: 1304-1307.
-

16. Kings, M. 1997. Neandertal DNA sequences and the origin of modern humans. *Cell*. 90: 19–30.
17. Kolman, C., N. Sambuughin, and E. Bermingham. 1996. Mitochondrial DNA analysis of Mongolian populations and implications for the origin of New World founders. *Genetics*. 142: 1321–1334.
18. Krings, M., A. Stone, R.W. Schmitz, H. Krainitzki, M. Stoneking, and S. Paabo. 1997. Neanderthal DNA sequences and the origin of modern humans. *Cell*. 90: 19–30.
19. Lassen, C., S. Hummel, and B. Herrmann. 1994. Comparison of DNA extraction and amplification from ancient human bone and mummified soft tissue. *Int. J. Legal Med.* 107: 152–155.
20. Lee, S., C. Shin, K. Kim, Y. Lee, and J. Lee. 1997. Sequence variation of mitochondrial DNA control region in Koreans. *Forensic Sci. Int.* 87: 99–116.
21. Lutz, S., H.J. Weisser, J. Heizmann, and S. Pollak. 1999. Location and frequency of polymorphic positions in the mtDNA control region of individuals from Germany. *Int. J. Legal. Med.* 106: 190–193.
22. Macaulay, V., M. Richards, and B. Sykes. 1999. Mitochondrial DNA recombination—no need to panic. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 266: 2037–2039.
23. Melton, T., and M. Stoneking. 1996. Extent of heterogeneity in mitochondrial DNA of ethnic Asian populations. *J. Forensic Sci.* 41: 591–602.

24. Melton, T., M. Wilson, M. Batzer, and M. Stoneking. 1997. Extent of heterogeneity in mitochondrial DNA of European populations. *J. Forensic Sci.* 42: 437-446.
 25. Melton, T., S. Clifford, J. Martinson, M. Batzer, and M. Stoneking. 1998. Genetic evidence for the proto-Austronesian homeland in Asia: mtDNA and nuclear DNA variation in Taiwanese aboriginal tribes. *Am. J. Hum. Genet.* 63: 1807-1823.
 26. Nishimaki, Y., K. Sato, L. Fang, M. Ma, H. Hasekura, and B. Boettcher. 1999. Sequence polymorphism in the mtDNA HV1 region in Japanese and Chinese. *Leg. Med(Tokyo)*. 1: 238-249.
 27. Oota, H., N. Saitou, T. Matsushita, and S. Ueda. 1995. A genetic study of 2,000-year-old human remains from Japan using mitochondrial DNA sequences. *Am. J. Phys. Anthropol.* 96: 133-145.
 28. Paabo, S. 1989. Ancient DNA: extraction, characterization, molecular cloning, and enzymatic amplification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86: 1939-1943.
 29. Pfeiffer, H., R. Steighner, R. Fisher, H. Mornstad, C.L. Yoon, and M.M. Holland. 1998. Mitochondrial DNA extraction and typing from isolated dentin-experimental evaluation in a Korean population. *Int. J. Legal. Med.* 111: 309-313.
 30. Piercy, R., K.M. Sullivan, N. Benson, and P. Gill. 1993. The application of mitochondrial DNA typing to the study of white Caucasian genetic identification. *Int. J. Legal. Med.* 106: 85-90.
-

31. Redd, A.J., N. Takezaki, S.T. Sherry, S.T. McGarvey, A.S. Sofro, and M. Stoneking. 1995. Evolutionary history of the CO II /tRNALys intergenic 9 base pair deletion in human mitochondrial DNAs from the Pacific. *Mol Biol Evol.* 12: 604–615.
32. Rousselet, F., and P. Mangin. 1998. Mitochondrial DNA polymorphisms: a study of 50 French Caucasian individuals and application to forensic casework. *Int. J. Legal. Med.* 111: 292–298.
33. Schurr, T.G., R.I. Sukernik, Y.B. Starikovskaya, and D.C. Wallace. 1999. Mitochondrial DNA variation in Koryaks and Itel' men: population replacement in the Okhotsk Sea–Bering Sea region during the Neolithic. *Am. J. Phys. Anthropol.* 108: 1–39.
34. Seo, Y.B., Stradmann–Bellinghausen, C. Rittner, K. Takahama, and P.M. Schneider. 1988. Sequence polymorphism of mitochondrial DNA control region in Japanese. *Forensic Sci. Int.* 97: 155–164.
35. Stoneking, M. 1994. Mitochondrial DNA and human evolution. *J. Bionerg. Biomembr.* 26: 251–259.
36. Su, B., J. Xiao, and P. Underhill et al. (21 co–authors). 1999. Y–Chromosome evidence for a northward migration of modern humans into eastern Asia during the last ice age. *Am. J. Hum. Genet.* 65: 1718–1724.
37. Sullivan, K.H., R. Hopgood, and P. Gill. 1992. Identification of human remains by amplification and automated sequencing of mitochondrial DNA. *Int. J. Legal. Med.* 105: 83–86.

38. Torroni, A., R.I. Sukernik, T.G. Schurr, Y.B. Starikovskaya, M.F. Cabell, M.H. Crawford, A.G. Comuzzie, and D.C. Wallace. 1993. mtDNA variation of aboriginal Siberians reveals distinct genetic affinities with Native Americans. *Am. J. Hum. Genet.* 53: 563-590.
39. Watson, E., P. Forster, M. Richards, and H.J. Bendelt. 1997. Mitochondrial footprints of human expansion in Africa. *Am J. Hum Genet.* 1997. 61: 691-704.
40. Wilson, M.R., J.A. DiZinno, D. Polanskey, J. Replogle, and B. Budowle. 1995. Validation of mitochondrial DNA sequencing for forensic casework analysis. *Int. J. Legal. Med.* 108: 68-74.