

출토 인공의 분자유전학 및 조직학적
분석연구

| 지상현, 박지희, 서민석, 홍종욱, 정용재

출토 인골의 분자유전학 및 조직학적 분석연구

Molecular Genetic and Histological Analysis for the Excavated Human Bone

지상현, 박지희, 서민석, 홍종욱, 정용재

Jee Sang-hyun, Park Ji-hee, Seo Min-seok, Hong Jong-ouk, Chung Yong-jae

〈ABSTRACT〉

The ancient biomolecular remains are the potential source for paleobiology and paleoanthropology. Especially, ancient human specimens such as bone, teeth, and hair are powerful materials to identify historical origin and migration of ancestor population from the past. However, most excavated human specimens in archaeological sites have commonly problems as natural damage and exogenous contamination. We carried out histological and molecular analyses of excavated bone from the historic sites in South Korea from the recently discovered in tumulus of Seochun and Naju. Biological deterioration of bone was observed anatomically by optical and scanning electron microscope (SEM). We extracted degraded DNA, and amplified hyper variable region (HVR) of mitochondrial DNA (mtDNA) and amelogenin of nucleus DNA. This study applied and examined the relationships between histological preservation and DNA survival in excavated bone.

I. 서론

고대 인골에 대한 과학적 연구는 고대 집단의 이동 경로, 문화의 전파 등 고대 인류와 자연사를 규명하는데 있어 오늘날 그 연구 범위와 학문적 중요성이 더욱더 확대되었다(Cann *et al.*, 1987; Malhi *et al.*, 2007). 특히 고대 인골에서 추출한 고대 DNA(ancient DNA, aDNA)의 연구는 생물학

분야에서 진화유전학(evolutionary genetics), 분자생물학(molecular biology)과 최근 새롭게 주목 받고 있는 유전체학(genomics) 등의 학문이 이론과 방법론적으로 급속도로 발전하면서 근래 20년 동안 획기적으로 진전되었다(Paabo *et al.*, 2004). 그러나 고대 시료(인골, 동물의 뼈 등)에서 분리된 DNA는 장기간 노출에 의한 물리화화적인 주변 환경의 영향과 자연적인 분해(degradation) 작용으로 말미암아 극히 미량의 손상된 DNA가 남아 있는 경우가 대부분이다. 더욱이 고대 인골과 동물의 뼈는 과거 미상의 접촉자, 발굴자, 실험자 등에 의하여 매우 치명적인 인간 DNA의 오염이 빈번히 일어나는 것으로 보고되고 있다. 따라서 고대 DNA의 연구는 일반적인 연구자가 생각하는 것 이상으로 해결해야할 기술적 난제가 존재하며, 오염을 방지하고 분석 결과를 분명히 입증할 수 있는 아주 엄격한 실험 절차 및 분석 전략이 고려되어야 한다. 고대 DNA 연구에 사용되는 생물학적 원리는 그리 복잡하지 않으나 그 결과의 재검증과 신뢰성에 대한 문제가 학계에서 자주 논란을 일으키는 것은 바로 그러한 이유이며, 극복해야할 과제이기도 하다.

출토 고대 인골에서 DNA를 추출하는 실험은 일반적인 생체시료를 대상으로 하는 것에 비하여 많은 비용과 노력이 소모되지만, 그에 비하여 추출되고 분석할 수 있는 DNA 양은 보잘 것 없이 적다. 출토 인골의 DNA 보존 정도를 간접적으로 예측하고 고대 DNA의 분석 가능성 및 실험의 효율성을 재고하기 위하여 아미노산의 라세미화(amino acid racemization)나 질소원소의 함량 비 등의 분석을 수행할 수 있다(Poinar *et al.*, 1996). 또한 인골의 형태학적인 보존 상태를 조직학(histology)적으로 분석함으로써 단백질 및 DNA 등의 유기물질 개략적인 함량을 예측할 수 있다(Colson *et al.*, 1997 ; Haynes *et al.*, 2002). 본 연구에서는 발굴지에서 출토된 고대 인골에 대하여 주사전자현미경 및 생물실체 현미경에 의한 조직학적 분석을 시도하고 DNA에 대한 분자유전학적 분석을 수행함으로써 인골의 형태학적인 상태와 DNA의 보존관계를 분석하였다.

II. 본론

1. 재료 및 방법

1) 주사전자현미경 및 광학현미경에 의한 미세 구조 분석

Photo 3의 주사전자현미경(Scanning Electron Microscope, SEM) 분석을 위하여 치아 시료의 일정 부분을 취하여 검정판에 탄소 테이프를 붙이고 그 위에 고착시킨 후 금으로 도금한 후 관찰하였

다. 또한 인골 및 치아의 단면 분석(Photo 4, Photo 5)을 위해 5-7mm정도의 단편을 에폭시수지로 고착시켰으며, 고착된 시료를 연마지 #120, #500, #800, #1000, #1200, #2400, #4000을 순서대로 사용하여 단면에 스크래치가 없을 때까지 연마하고, 3 μ m와 1 μ m의 광택천을 이용하여 관찰 면을 가공하였다. 가공된 표면은 탄소 도금(Carbon Coating)하여 주사전자현미경(Scanning Electron Microscope)(JSM-5910LV, Jeol, Japan) 하에서 이차전자상(Secondary Electron Image)과 반사전자상(Backscattered Electron Image)으로 관찰하였다. 이때 관찰 조건은 20kV, 72 μ A, spotsize 34를 유지하였다. 실체현미경 Axiotech 100HD(Carl zeiss, Germany)에 의한 인골 및 치아 시료의 단면 관찰은 에폭시수지로 고착하고 연마한 후 x50, x100, x200 배율에서 관찰하였다.

2) DNA의 추출 및 정제

출토 인골의 DNA를 추출하기 위한 전처리는 다음과 같이 수행하였다. 인골의 경우 가로 5cm 세로 2cm로 절단하였으며, 치아는 전체를 실험에 사용하였다. 시료의 표면오염물질(토양 및 미생물 등)을 최대한 제거하기 위하여 치과용 연마기를 이용하여 표면으로부터 약 1mm 정도 연마한 후 6% 차아염소산나트륨을 상온에서 15분간 교반하면서 처리한 후, 멸균 증류수를 이용하여 2~3회 반복하여 세척하였다. 시료의 수분을 완전히 제거하기 위하여 5시간 이상 자연 건조 시킨 후, 자외선을 이용하여 40분 간 시료의 표면을 전체적으로 소독하였다. 표면오염물이 제거된 인골 및 치아 시료는 분말제조기 MM301(Retsch, Germany)를 이용하여 파우더 상태로 제조한 후, DNA 추출 전까지 -20℃에서 보관하였다. 분말시료 0.5g을 정량하여 0.5M EDTA(ethylenediaminetetraacetic acid) (pH8.0)에 의하여 탈칼슘화(decalcification) 반응을 48시간 이상 상온에서 실시한 후, 단백질을 분해제 proteinase K 3mg과 SDS(sodium dodecyl sulfate)를 0.5%가 되도록 추가하여 4~5시간 동안 65℃ 항온수조에서 진탕하였다. DNA를 추출하기 위하여 동일한 양의 phenol:chloroform:isoamyl alcohol(24:23:1)을 처리한 후, 원심분리하여 상층액을 분리하고, isopropanol과 ethanol 침전법을 이용하여 DNA를 순수 분리하였다.

3) 중합효소연쇄반응 및 염기서열분석

중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)을 위한 중합효소는 각 반응마다 Hot-Start Taq(QIAGEN, Germany) 0.5 unit를 사용하였으며, 반응액은 10× PCR buffer 5 μ l와 2.5mM의 dNTP 4 μ l, 1 μ g/ μ l BAS 5 μ l, 12pmol의 프라이머(primer)를 각각 3 μ l 씩 첨가한 후, 최종 반응액을 50 μ l에 맞추어 제조하였다. mtDNA HVRI 증폭을 위한 PCR 반응은 denaturation 95℃ 30초, annealing 55℃ 30초, extension 72℃ 1분 연쇄 반응을 40 cycle 수행하였으며,

predenaturation 95℃ 15분과 final extension 72℃ 10분을 유전자 증폭장치 ABI9600과 ABI veriti(Applied Biosystems, USA)에서 반응시켰다. HVR II의 증폭은 annealing 58℃ 30초, 성결정을 위한 아밀로제닌(amelogenin)의 유전자 증폭은 annealing 58℃ 20초에서 수행하였으며, 나머지 과정은 동일하게 진행하였다. 증폭된 DNA 산물은 전기영동장치 HDA-GT12(eGene, USA)를 이용하여 확인한 후, PCR purification kit(QIAGEN, Germany)를 이용하여 순수 분리하고 염기서열 자동 분석 장치인 ABI Prism 3100(Applied Biosystems, USA)을 이용하여 염기서열을 결정하였다. DNA 염기서열의 다중서열배열(multiple sequence alignment)은 GenDoc program(Nicholas *et al.* 1997)을 사용하여 분석하였다. 염기서열의 단상형(haplotype) 결정은 표준염기서열(cambridge reference sequence, CRS)과 비교하였다.

4) 시료의 오염 방지

출토 인골 시료의 전처리 및 DNA 추출의 전 과정과 PCR의 반응액 조성 등은 오염방지를 위하여 무균작업대에서 실험을 진행하였으며, 멸균된 실험 용기와 삼차 증류수 및 시약을 사용하였다. 분석 결과의 재현성 확인 및 검증을 위하여 동일한 시료에 대하여 1개월 간격으로 동일한 방법을 이용하여 2차에 걸쳐서 추출한 후, 유전자 증폭을 실시하였다. DNA의 1차 분리와 2차 분리에 사용된 시약은 별도로 제조하여 시료에 처리함으로써 시약의 오염에 의한 오류를 최소화 하였다. 이를 검증하기 위하여 시료를 전혀 포함하고 있지 않은 튜브(blank tube)를 이용하여 추출과정에서 처리되는 모든 시약 및 분석과정을 동일하게 수행한 후, 최종적으로 유전자 증폭을 통하여 외부 DNA에 의하여 오염되지 않았음을 확인하였다. 또한 mtDNA HVRI과 HVRII의 염기서열 분석은 본 연구와 관련된 실험자의 DNA를 채취하여 동시에 분석하고 유기질 시료의 염기서열결과와 비교함으로써 실험자의 부주의에 의한 오염 여부를 검증하였다.

Table 1. DNA 증폭을 위한 PCR primer 염기서열 목록

no.	application	name	sequences (5'-3')	size (bp)
01	amplification for HVR	H1-3F	TAAAACGACGGCCAGTCACCATTAGCACCCAAAGCT	208
02		H1-3R	AACAGCTATGACCATGCAGGTGGTCAAGTATTTATGGT	
03		H1-4F	TAAAACGACGGCCAGTGCCAGCCACCATGAATATTTGT	185
04		H1-4R	AACAGCTATGACCATGTGGCTTTG GAGTTGCAGTTG	
05		H1-6F	TAAAACGACGGCCAGTCCCATGCTTACAAGCAAGT	198
06		H1-6R	AACAGCTATGACCATGGGGATTGACTGTAAATGTGCTAT	

no.	application	name	sequences (5'-3')	size (bp)
07	amplification for HVR	H1-7F	TAAAACGACGGCCAGTCAACTGCAACTCCAAAGCCA	204
08		H1-7R	AACAGCTATGACCATGGAGGATGGTGGTCAAGGGAC	
09		H2-1F	TAAAACGACGGCCAGTCACCTATTAACCACTCACG	203
10		H2-1R	AACAGCTATGACCATGCCTG TAATATTGAAACG TAGGTGCGAT	
11		H2-4F	TAAAACGACGGCCAGTCCCTATG TGCAGTATCTGT	185
12		H2-4R	AACAGCTATGACCATGTCTGTGTG GAAAGTGGCTGT	
13		H2-6F	TAAAACGACGGCCAGTGGCGAACATACTTACTAAAGTG	202
14		H2-6R	AACAGCTATGACCATGGTTTGGCAGAGATGTGTTTAAG	
15		H2-7F	TAAAACGACGGCCAGTCTTAAACACATCTCTGCCAAAC	185
16		H2-7R	AACAGCTATGACCATGTGAGATTAGTAG TATGGGAG	
17	sequencing	SH1-1F	GCACCCAAAGCTAAGATTCTAA	
18		SH1-1R	GGTACCGTACAAATTTCATGGT	
19		SH1-2F	CCATGAATATTGTACGGTACCA	
20		SH1-2R	GCAGTTGATGTG TGATAGTTGA	
21		SH1-3F	CAAGTACAGCAATCAACCCCTC	
22		SH1-3R	GTGCTATGTACGGTAAATGGC	
23		SH1-4F	GATACCAACAAACCTACCCAC	
24		SH1-4R	TCAAGGGAACCCCTATCTGA	
17		SH2-1F	ACTCACGGGAGCTCTCCA	
18		SH2-1R	CGTAGGTGCGATAAATAATAGG	
19		SH2-4F	CTGTCTTTGATTCTGCCTC	
20		SH2-4R	GGCTGTGCAGACATTC AATTG	
21		SH2-6F	GTGTGTTAATTAATTAATGCTTG TAG	
22		SH2-6R	GTTTAAGTGCTGTGGCCAG A	
23		SH2-7F	CTCTGCCAAACCCCAAAAC	
24		SH2-7R	GGGAGGGGAAAATAATG TGT TA	
25	sex typing	Amelc01	CCCTGGGCTCTG TAAAGAA TAG TG	X ch. 106 bp
26		Amelc02	ATCAGAGCTTAAACTGGGAAGCTG	Y ch. 112 bp

2. 연구결과

1) 출토 인골의 확보

본 연구에서 사용된 시료는 국립나주문화재연구소가 호남권역유적조사연구 사업의 일환으로 실시한 전라남도 나주 대안리 방두고분의 유적발굴조사에서 발굴된 3기의 전용옹관(專用甕棺) 가운데 2호와 3호 옹관에서 각각 출토된 인골 및 치아와 충청문화재연구원에서 2006년 발굴한 충청남도 서천 군장산업단지지원도로건설현장에서 발굴된 7호 회곽묘 인골 1구를 이용하였다(Table 2). 나주 대안리 출토 인골은 2호와 3호 모두 광물화(mineralization)가 상당부분 진행된 상태로 밀도가 낮고 쉽게 부서지기 쉬운 상태로 출토되었다. 2호 옹관은 Table 2에서와 같이 다양한 부분의 인골이 수습되었으나 3호 옹관의 경우 인골 유해가 거의 남아 있지 않았으며, 상당부분 훼손된 치아 일부만 발견되었다. 서천 군장산업단지지원도로건설현장에서 출토된 7호 회곽묘의 인골은 조선시대로 추정되며 인골의 외형 보존상태가 매우 양호하게 출토되었다(Photo 1).

Table 2. 출토 인골 시료 목록

연 번	유 적 지 명	출 토 위 치	수 습 부 위
N2-1	나주 대안리 방두고분	2호 옹관 대웅	두개골
N2-2		2호 옹관 대웅	두개골 및 기타 뼈 일괄
N2-3		2호 옹관 대웅	치아
N2-4		2호 옹관 대웅	치아 및 하악골
N2-5		2호 옹관 대웅	어깨 및 팔
N2-6		2호 옹관 대웅	대퇴골 왼쪽
N2-7		2호 옹관 대웅	대퇴골 오른쪽
N2-8		2호 옹관 소웅	경골 왼쪽
N2-9		2호 옹관 소웅	경골 오른쪽
N3-1		3호 옹관 대웅	치아
G7-1	군장산업단지지원도로건설현장	7호 회곽묘	두개골 포함 일괄



Photo 1. 나주 대안리 방두고분 2호 옹관묘의 발굴 사진(위)과 서천 군장산업단지지원도로건설현장의 7호 회곽묘에서 출토된 인골의 대퇴골 사진(아래)

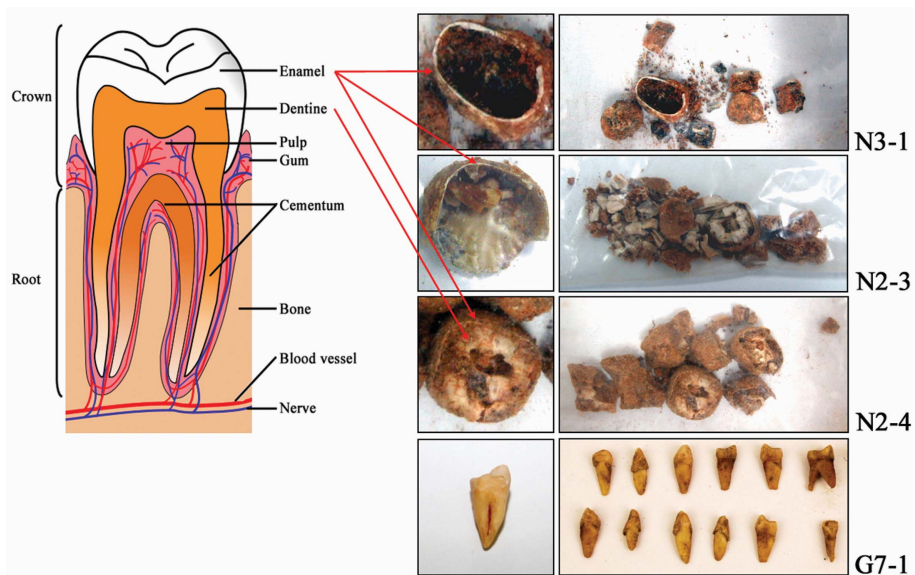


Fig. 1. 나주 대안리 방두고분 2호(N2-3, N2-4), 3호(N3-1) 출토 치아와 서천 군장산업단지지원도로 건설현장 출토 치아의 보존상태

2) 출토 치아의 조직학적 구조 및 특징

치아는 치관(crown)과 치근(root)의 상하구조로 구분되며 사기질(enamel)-상아질(dentine)-치수(pulp)-시멘트질(cementum)의 내부구조로 형성되어 있다(Fig. 1). 나주 대안리 방두고분의 인골 치아는 치근의 구조가 거의 남아 있지 않았으며, 치관부분의 단단한 사기질이 치아의 형태를 겨우 유지하고 있는 것을 관찰할 수 있었다. 치아의 부패는 특별히 충치에 의한 상처가 없는 한 대부분 치근의 가장 아래쪽에 있는 혈관과 신경의 통로로 미생물이 침입함으로써 시작된다. 대안리 방두고분의 2호, 3호 옹관의 치아 N2-3, N2-4, G7-1 모두 치근 부분이 부패되어 남아 있지 않았으며, 심한 경우 사기질만 남고 상아질까지 모두 부패된 것을 볼 수 있다. 이것은 치근의 혈관과 모공의 통로를 통하여 미생물의 부패가 상당부분 진행된 것을 의미한다. 치아에서 추출할 수 있는 DNA를 포함하는 세포는 상아질을 포함한 치수에 밀집되어 있기 때문에 대안리 방두고분의 치아에서 DNA를 추출하기란 거의 불가능하고 볼 수 있다. 이에 비하여 서천 군장산업단지지원도로건설현장의 치아 G7-1의 경우 치아가 거의 원형에 가깝게 보존되어 있으며, 상아질 내부 또한 거의 완벽하게 보존되어 있는 것으로 관찰되어 있기 때문에 DNA의 추출이 가능할 것으로 판단할 수 있다. 사기질 조직 부위를 전자주사현미경을 이용하여 관찰함으로써 각 시료에 대한 보존상태를 간접적으로 비교 분석하였다(Photo 2). 전체적으로 치아의 사기질은 대퇴골(N2-6)과 같은 치밀골(compact bone)에 비해서도 간극이 거의 없다. 치아의 사기질조직 또한 골조직과 마찬가지로 수산화인회석(hydroxyapatite)과 인산칼슘이 주요 구

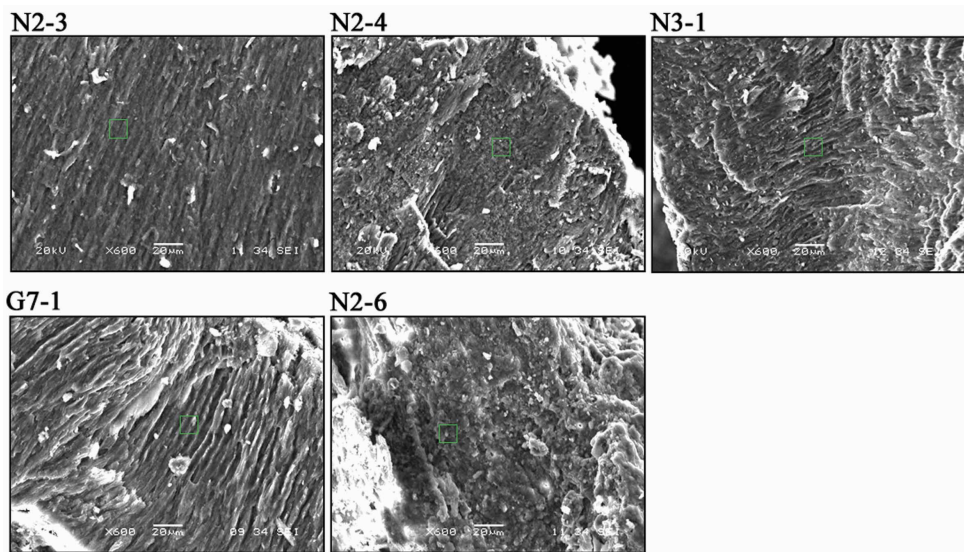


Photo 2. 나주 대안리 방두고분과 서천 군장산업단지지원도로건설현장 치아의 사기질 부위의 주사전자현미경 사진(N2-6은 나주 대안리 방두고분의 왼쪽 대퇴골 시료임)

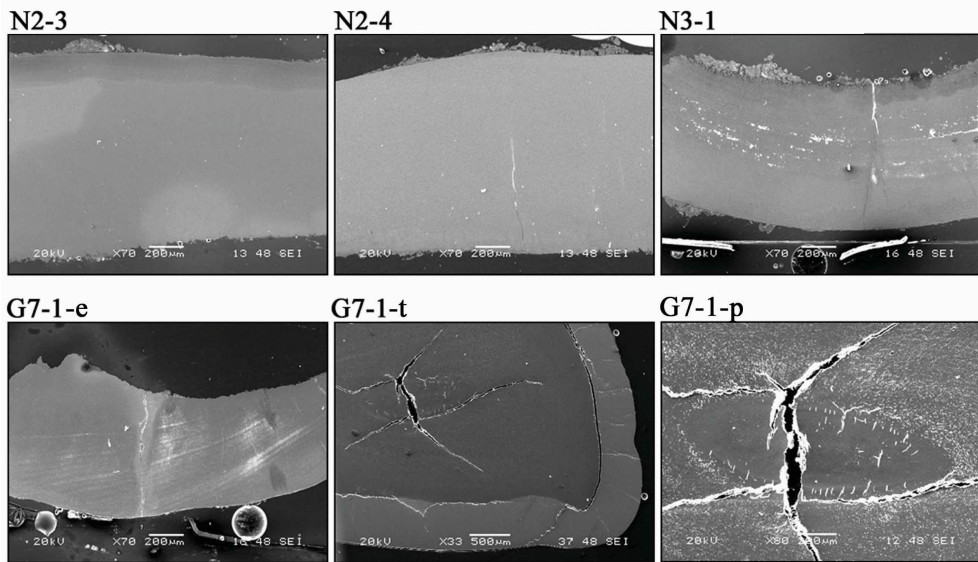


Photo 3. 나주 대안리 방두고분과 군장산업단지지원도로건설현장 치아의 사기질 부위의 주사전자현미경 사진(G7-1-e는 사기질 부위, G7-1-t는 사기질, 상아질, 치수를 포함한 부위, G7-1-p는 치수 부위)

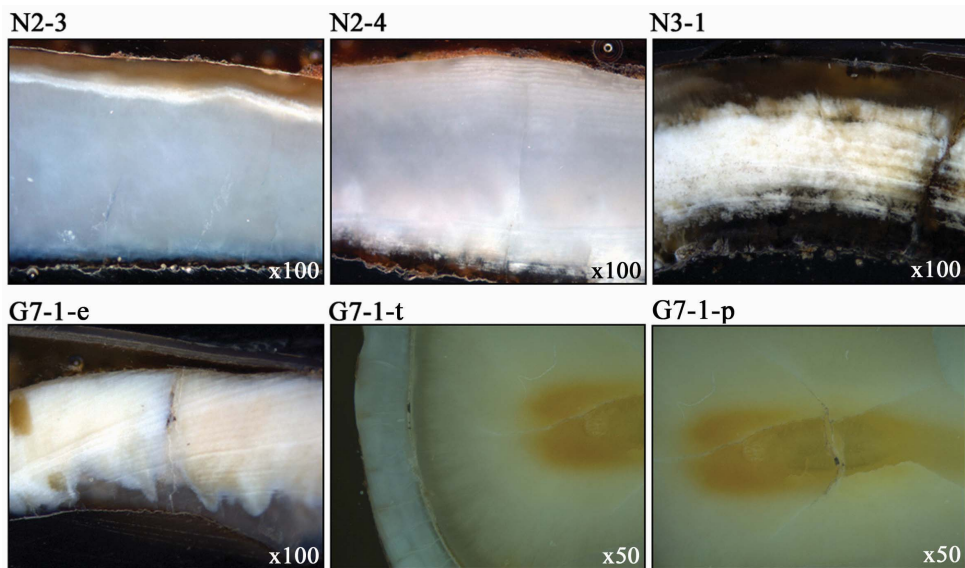


Photo 4. 나주 대안리 방두고분과 군장산업단지지원도로건설현장 치아의 사기질 부위의 실체현미경 사진 (G7-1-e는 사기질 부위, G7-1-t는 사기질, 상아질, 치수를 포함한 부위, G7-1-p는 치수 부위)

성 성분이나 골 조직은 사기질 조직에 비하여 많은 유기질(단백질)과 수분을 포함하고 있으며 모세혈관과 미세신경의 통로가 많기 때문에 구조상 모세관과 간극이 많다. 군장산업단지지원도로건설현장의 G7-1 치아의 사기질은 나주 대안리 치아의 사기질에 비하여 결이 촘촘하고 윤곽이 뚜렷하여 조직이 잘 보존되어 있음이 확인되었다.

나주 대안리 방두고분 3호 옹관에서는 대부분의 인골 부분이 광물화되어 남아 있지 않았으며 부분적인 치아의 사기질 부위만 남아 있었다. Photo 3과 Photo 4의 결과가 나타내듯이 N3-1의 내부 무기질 밀도가 다른 시료의 사기질 조직에 비하여 현저히 낮고 영성한 구조로 관찰되는 것을 볼 수 있다. 군장의 G7-1-t는 치아의 전형적인 조직학적 특징을 보여주고 있으며 수백 년의 시간이 경과했음에도 불구하고 치수가 거의 완전하게 보존되어 있었다. 이러한 결과는 매장환경과 방법에 따라 DNA 또는 단백질 같은 고분자 유기질이 분해되지 않고 오래 보존될 수 있다는 사실을 보여준다.

3) 출토 인골의 조직학적 특징

치밀골은 뼈의 표층 부위의 단단한 부분으로 골조직이 층판 구조로 배열되어 있다. 골원(osteons) 또는 골공동계(haversian system) 구조는 치밀골의 기본 단위로서 일반적으로 뼈의 긴 장축과 평행(횡단면과는 수직)한 방향으로 형성되어 있다. 골원은 원형 구조의 골층판(lamellae)과 골세포(osteocyte)를 포함하고 있는 골소(lacunae) 그리고 신경과 혈관이 통과하는 중심관(Haversian canal)으로 구성된다. 골원은 볼크만 관(volkmann's canal)에 의해 서로 연결되어 상호작용한다.

나주 N2-6과 서천 G7-1의 대퇴골 골조직의 형태적 조직학적 특성을 분석하기 위하여 대퇴골의 절편을 횡단면으로 하여 주사전자현미경과 실체현미경을 통하여 관찰하였다(Photo 5). 나주 N2-6의 대퇴골 시료는 대체로 골조직이 치밀하지 못하며 광물화에 의하여 불규칙한 많은 구멍을 가지고 있으며 골원의 외형적 구조 또한 선명하지 않다. 반면 서천 G7-1은 상대적으로 치밀하고 전형적인 골원의 기본구조를 선명하게 보여주고 있다. 골원이 잘 보존되어 있다는 것은 DNA를 포함하고 있는 골세포 및 기타 골조직 세포의 보존상태 또한 양호할 뿐만 아니라 DNA의 추출 가능성이 높다는 것 또한 암시한다. 고고학적으로나 법의학적으로 보존상태가 좋은 골원의 구조는 성감별(sex identification), 개인의 건강(health history), 이동(motor history)과 관련된 역사와 식습관(diet)에 관한 연구에 이용된다. 또한 골원과 그 배열상태를 관찰함으로써 형태적으로 종 동정이 불가능한 일부 뼈 조각을 이용하여 생물 종을 분류하고 감별하는데 사용할 수 있다.

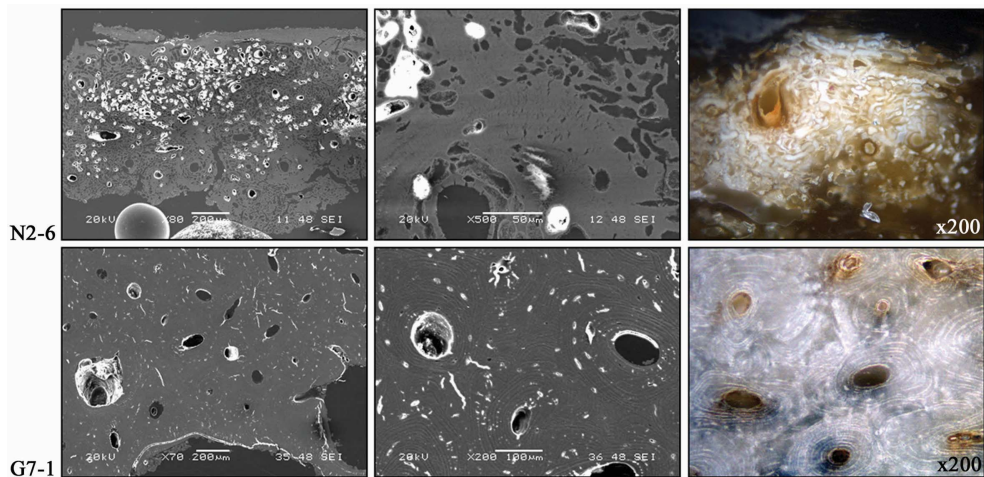


Photo 5. 나주 대안리 방두고분과 군장산업단지지원도로건설현장 출토 인골 대퇴골 부위의 주사전자 현미경 및 실체현미경 사진

4) 출토인골의 DNA 추출 및 미토콘드리아 DNA 염기서열 분석

나주 대안리 방두고분의 2호 옹관에서 출토된 대부분의 인골 시료는 매장환경 속에서 장기간 분해가 진행되어 광물화 과정에 접어든 상태로서 조직화적인 분석에 의하여 DNA 추출 가능성이 매우 희박한 것으로 판단하였다. 뼈의 골밀도가 매우 낮았으며(Photo 5), 약한 접촉에도 부서지기 쉬운 상태로서 인골의 겉 표면 오염제거를 위한 물리적 처리가 거의 불가능한 상태였다. mtDNA HVR에 대한 염기의 변이를 분석하기 위하여 외관상 보존상태와 가장 양호하게 판단된 대퇴골 N2-6 시료를 이용하여 3회에 걸쳐 DNA를 추출을 시도하였으며 유전자 증폭 결과에 의하여 DNA 추출 여부를 확인하였다. 나주 대안리 방두고분 2호 및 3호의 치아 시료(N2-3, N3-1)에서는 모두 유전자 증폭산물을 확인할 수 없었다. 군장산업단지지원도로건설현장 출토 7호 인골의 대퇴골은 전체적으로 보존상태가 매우 양호한 상태였기 때문에 2회의 실험에서 모두 DNA가 추출되었다. 모든 추출과정은 인골을 넣지 않은 빈 튜브(blank tube)를 대조군으로 하여 동일한 조건과 시약을 사용하여 추출실험을 한 후, DNA 증폭실험에 의하여 오염여부를 확인하였다.

mtDNA의 HVRI과 HVRII에 대한 DNA 증폭을 위하여 150bp 전후의 짧은 절편을 증폭할 수 있는 프라이머를 각 증폭 부위마다 중첩되게 제작하였다(Table 1). 나주 N2-6 대퇴골 시료에서 3회에 걸쳐 추출한 DNA를 주형으로 DNA를 증폭을 실시하였으나 HVRI은 프라이머 H1-7F, H1-7R에서만

증폭에 성공하였으며, HVRII에서는 프라이머 H2-4F, H2-4R을 이용한 반응에서만 증폭결과를 확인할 수 있었다. 서천 G7-1의 대퇴골 시료에서는 mtDNA 뿐만 아니라 아밀로제닌을 이용한 성감별이 가능하였다.

Table 3. 가릉·곤릉·능내리 고분 출토 인골의 mtDNA HVR의 변이서열 및 성 결정

유 적 지 명	성 별	HVR I	HVR II
		(nt16598 - nt16390)	(nt35 - nt464)
대안리방두고분 2호 옹관*	—	CRS	162
군장산업단지지원도로 7호 회곽묘	male	16223, 16362, 16390	73, 263, 315.1C

* 대안리방두고분 2호는 HVR I의 nt16240 - nt16360, HVR II의 nt133 - nt256만을 분석한 결과임

나주 N2-6과 서천 G7-1 대퇴골 시료에서 추출한 DNA를 이용하여 mtDNA HVR I (16001-16568)과 HVR II (1-574)를 대상으로 유전자 증폭을 실시한 후, 자동염기서열 분석 장치를 이용하여 염기서열을 결정하였다. N2-6은 HVR I과 HVR II에서 각각 121bp와 124bp를 증폭하였으며, 서천 G7-1은 각각 400bp와 430bp를 분석하였다. 분석된 염기서열은 mtDNA의 표준염기서열인 Cambridge reference sequence(CRS)와 비교하여 haplotype(단상형)을 확인하였다(Andrews *et al.*, 1999)(Table 3). 성 결정을 위한 프라이머 Amelo01과 Amelo02에 의하여 X 염색체에서 106bp, Y 염색체에서 112bp의 아밀로제닌 유전자의 일부를 증폭할 수 있는데 XY의 성염색체를 가지고 있는 남성의 경우 106bp와 112bp의 두 가지 증폭산물이 확인되며, XX의 성염색체를 가지고 있는 여성의 경우 106bp 한 가지의 증폭산물이 나타난다. 서천의 G7-1은 106bp와 112bp의 두가지 증폭산물이 확인되어 남자인 것으로 판명되었으나(Photo 5), 나주 N2-6에서는 아밀로제닌 유전자가 증폭되지 않아 성별을 판명할 수 없었다.

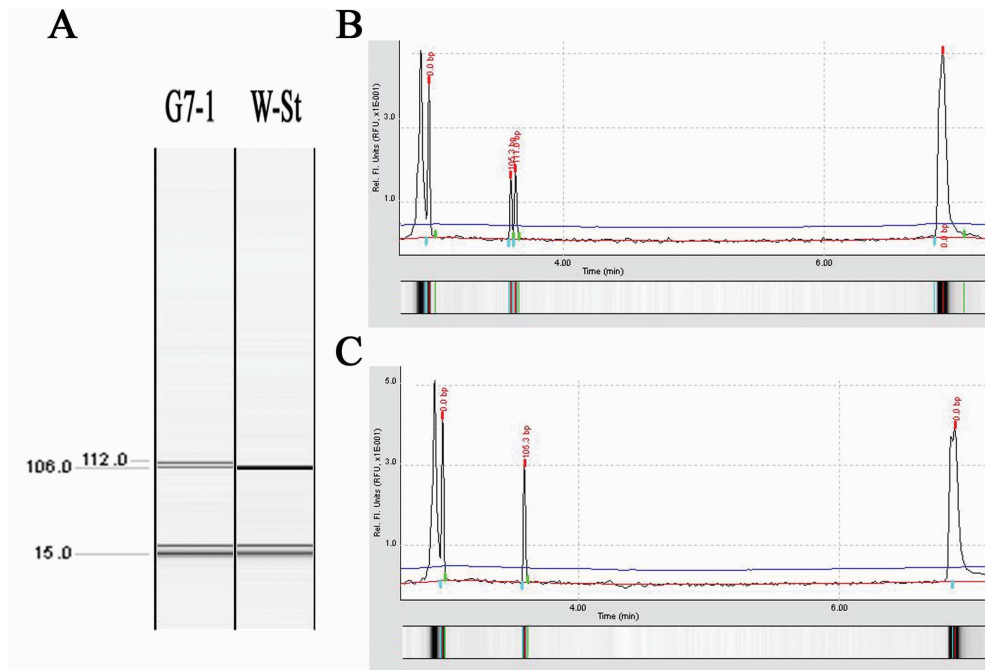


Fig. 2. 서천 군장산업단지지원도로건설현장 7호 인골의 아밀로제닌 유전자 증폭결과(A) 및 전기영동도(electropherogram) 결과(B). (X-axis=base-pair size; y-axis=relative intensity of fluorescence; C는 여성대조군의 아밀로제닌 증폭의 전기영동도 결과)

Ⅲ. 결론

핵산(nucleic acid)은 고대 유기체의 유전자 정보와 유전적 특징을 해석할 수 있는 중요한 생체분자로 부상하였다. 고대 DNA의 연구는 대부분 발굴지에서 출토된 인간과 동물의 뼈에 의해서 주로 이루어진다. 뼈는 수산화인회석(hydroxyapatite, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$)과 인산칼슘(calcium phosphate, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$)이 거의 대부분의 구성물질이며 단백질 섬유조직인 콜라겐은 뼈의 주요 단백질 성분이다. 뼈는 역시 다른 조직과 마찬가지로 많은 세포와 DNA를 포함하고 있으며, 뼈는 다른 어떤 생체조직보다 DNA의 보존에 유리한 환경을 제공한다. 그러나 이상적인 환경조건에서도 DNA가 수 만년 동안 존재할 가능성은 상당히 희박하다(Hoss *et al.*, 1996). 오랜 매장환경 속에서 DNA의 손상 분해는 필

연적일 수밖에 없으며, 점차 보유하고 있던 유전 정보를 잃어버리게 된다. 고대 인골에서 추출되는 DNA는 평균적으로 100bp에서 500bp의 크기로 절편화(fragmentation)되어 있을 뿐만 아니라 라디칼(radical)과 알킬화제(alkylation agent), 가수분해작용(hydrolysis) 등에 의하여 DNA의 인-당골격(phosphate-sugar backbone)인 인산-에스테르결합(phosphodiester bond)을 파괴하여 DNA 이중나선 염기에 많은 손상을 주기도 하며, 탈아미노화(deamination)를 과정을 유도할 수 있다 (Schaaper *et al.*, 1983; Hofreiter *et al.*, 2001). 고대 DNA 연구에 있어서 DNA의 보존상태를 예측하기 위한 기본적인 분석을 실시하고 그러한 방법을 숙지하는 것은 매우 중요한 과정이라고 할 수 있다. 고대 DNA의 손상과 분해는 DNA의 추출을 어렵게 하며, 유전자 증폭을 저해하거나 오류를 유발하여 염기서열의 정확한 결정을 불가능하게 한다. 나주 대안리 방두고분의 인골과 치아에 대한 유전자 분석결과에서 DNA의 보존상태와 조직학적 분석결과의 상관관계가 밀접하다는 것을 제시하고 있다. 특히 골조직의 기본단위인 골원의 상태는 뼈의 DNA 및 단백질(주로 콜라겐)의 보존상태를 가늠할 수 있는 중요한 지표로 볼 수 있다. mtDNA는 핵 DNA에 비하여 10배 이상의 복제 수(copy number)를 갖기 때문에 고대 DNA의 연구에 있어서 핵 DNA보다 mtDNA의 분석이 더 수월한 것으로 알려져 있다. 나주 N2-6에서 추출된 DNA에서 mtDNA 일부가 증폭되었으나 X와 Y염색체에 존재하는 아미로제닌이 증폭되지 않은 것은 그러한 복제 수의 차이에서 비롯된 것으로 볼 수 있다. 따라서 본 연구는 출토 인골로부터 DNA를 추출하고 증폭하는 일련의 실험과정의 효율성을 고려하고 분석가능성을 예측하기 위해서 출토된 뼈의 보존상태를 조직학적으로 분석하는 것이 중요하다는 것을 제시하고 있으며, 그러한 과정을 나주 대안리 방두고분 출토 인골과 서천 군장산업단지지원도로건설현장 출토 인골을 대상으로 적용하여 분석하였다.

참고문헌

1. Andrews RM, Kubacka I, Chinnery PF, Lightowlers RN, Turnbull DM, Howell N, 1999, Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nat. Genet.* 23:147.
2. Cann RL, Stoneking M, Wilson AC, 1987, Mitochondrial DNA and human evolution. *Nature* 325:31~36.
3. Colson IB, Richards MB, Bailey JF, Sykes BC, Hedges REM, 1997, DNA analysis of seven human skeletons excavated from the Terp of Wijnaldum. *J. Archaeol. Sci.* 24:911~917.
4. Haynes S, Searle J, Brett A, Dobney KM, 2002, Bone preservation and ancient DNA: the application of screening methods for predicting DNA survival. *J. Archaeol. Sci.* 29:585~592.
5. Hofreiter M, Serre D, Poinar HN, Kuch M, Paabo S, 2001, Ancient DNA. *Nat. Rev. Genet.* 2:353~359.
6. Hoss M, Jaruga P, Zastawny TH, Dizdaroglu M, Paabo S, 1996, DNA damage and DNA sequence retrieval from ancient tissues. *Nucleic Acids Res.* 24:1304~1307.
7. Malhi RS, Kemp BM, Eshleman JA, Cybulski J, Smith DG, Cousins S, Harry H, 2007, Mitochondrial haplogroup M discovered in prehistoric North Americans. *J. Archaeol. Sci.* 34:642~648.
8. Nicholas KB, Nicholas Jr HB, Deerfield II DW, 1997, GeneDoc: analysis and visualization of genetic variation. *EMBnet news* 4:1~4.
9. Paabo S, Poinar H, Serre D, Jaenicke-Despres V, Hebler J, Rohland N, Kuch M, Krause J, Vigilant L, Hofreiter M, 2004, Genetic analyses from ancient DNA. *Annu Rev Genet.* 38:645~679.
10. Poinar HN, Hoss M, Bada JL, Paabo S, 1996, Amino acid racemization and the preservation of ancient DNA. *Science* 272:864~866.
11. Schaaper RM, Kunkel TA, Loeb LA, 1983, Infidelity of DNA-synthesis associated with bypass of apurinic sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:487~491.