

고대 DNA의 분석과 검증

지 상 현 · 서 민 석

(국립문화재연구소 보존과학연구실,
국립문화재연구소 연구기획과)

I. 머리말

II. 본문

- 고대 생체분자 연구의 중요성
- 고대 DNA 분석의 활용
- 고대 DNA의 특징
- 외부 DNA에 의한 오염
- 발굴과정에서 일어나는 오염원의 차단
- 고대 DNA 연구와 검증을 위한 통합적 전략
- 고대 DNA 분석의 시간적 한계

III. 맺음말

고대 DNA 분석은 인류학, 고고학, 생물학자뿐만 아니라 대중의 관심사가 될 정도로 점차 중요성이 강조되고 있다. 고고학자와 생물학자는 인류의 기원과 집단의 이주, 민족의 형성 그리고 고대인의 질병과 매장문화를 규명하는데 있어 고대 DNA 분석을 접목하고 있으며, 이미 멸종된 동물의 계통진화학적인 연구에도 이를 활용하고 있다. 고대 DNA 분석의 새로운 전기가 마련된 계기는 고대 시료에서 추출되는 미량의 DNA 증폭을 가능하게 한 중합효소연쇄반응(Polymerase chain reaction, PCR)법이 개발되면서였다. 그러나 고대 DNA는 탈아미노화나 절편화 등의 분자 손상 정도가 심한데 이것은 PCR에서 중합효소의 정확한 DNA 증폭을 방해하는 요인으로 작용한다. 시토신이 탈아미노화되어 우라실을 형성하는 것은 DNA의 염기치환오류를 일으킬 수 있으며, 이런 현상은 증폭 과정에서 고유의 염기서열에 대한 고정치환(C→T, G→A)을 유도하게 된다. 또한 대부분의 고대 시료는 외부 오염물에 노출되어 있는데, 특히 외부 DNA의 오염은 고대 DNA의 염기서열을 결정함에 있어서 부정확한 결과를 도출시키는 심각한 문제를 초래하곤 한다. 이와 같이 고대 시료는 오랜 기간 동안의 자연 분해과정과 다양한 오염물질에 노출되어 있어 그 훼손 정도가 심한 것이 일반적이다. 고대 DNA 연구에 있어서 많은 생화학적 손상과 외부 DNA의 오염을 극복하기 위해서는 보통의 분자생물학적인 방법과 기준보다 더욱더 엄격한 검증 절차에 의하여 연구가 진행되어야 하며, 연구 결과의 신뢰성을 확보하는 것이 무엇보다 중요하다. 따라서 본 글에서는 고대 DNA의 손상과 오염물질에 의한 부정확한 염기서열결정과 오류를 보정하고 예방할 수 있는 연구 기준과 실험적 절차를 설명하고자 한다.

주제어 : 고대 DNA, DNA 손상, 탈아미노화, 오염, PCR

I. 머리말

1980년대에 이르러 인류학(anthropology)과 고고학(archaeology)은 분자생물학(molecular biology)적인 연구 분야로 확대되기 시작했다(Paabo 1985; Hagelberg et al. 1989). 특히 분자유전학(molecular genetics), 생화학(biochemistry)과 고고학의 접목은 발굴지에서 출토되는 다양한 생체분자(biomolecule)의 분석과 활용을 가능하게 함으로써 오랜 과거와 현재의 낯선 만남 속에서 새로운 해석과 신선한 정보를 우리에게 제공하고 있다(Larsen 1997). 이전에도 생물학 분야가 고고학에 활용되긴 하였으나 1980년대 이후 획기적인 기술적 발전이 이루어지기 전까지는 주변학문으로서의 역할에 머물러 있었다. 그러나 이러한 발전적 시도는 오늘날 신대륙과 유럽을 중심으로 '생물고고학(bioarchaeology)', '생체분자고고학(biomolecular archaeology)'이라는 분야로 정립되고 있는 단계에 이르렀다(Buikstra et al. 2006). 고대 생체분자를 연구하려는 시도는 점차 증가하고 있으며, 그 가운데 최근 고대 지질(lipid)과 DNA(deoxyribonucleic acid)의 연구는 많은 진전을 이루었다. 특히 고대 DNA(ancient DNA, aDNA)에 대한 연구는 인류의 진화학적 기원, 인류의 이동 경로와 사회의 형성, 문명과 문화의 전파, 매장양식, 멸종 동·식물의 연구 등 관련된 분야로 점차 적용 범위가 확대되어 가고 있으며, 고대 인류사와 자연사를 연구하는데 있어 그 중요성이 더해가고 있다.

유전체학(genomics)과 분자유전학(molecular genetics) 분야의 눈부신 발달로 인하여 인간 게놈 DNA(human genome DNA)의 염기서열이 완전히 해독되었으며, 이러한 기술을 습득해 온 DNA 분석 전문가들은 이미 20여 년 전부터 고대 DNA의 연구라는 흥미로운 분야에 관심을 기울이기 시작했다. 결국 오늘날 세계의 많은 연구기관에서 고대 DNA 분석을 위한 다양한 프로젝트가 만들어지고 있으며, 과거 수 만년을 거슬러 올라가는 동물과 고대 미라, 네안데르탈인 DNA의 성공적인 분석 결과가 발표되면서 세간의 이목을 집중시키고 있다(Serre et al. 2004).

1985년 미국의 화학자 캐리 멀리스(Kary Banks Mullis)에 의해 개발된 중합효소연쇄반응이라는 DNA 증폭방법은 전체 생물학 분야의 연구에 엄청난 발전과 파급효과를 불고왔으며, 고대 DNA 분석에 있어서도 획기적 진전을 가져왔다. 고대 DNA의 특성상 많은 DNA 손상(damage)과 자연적인 분해(degradation)로 인하여 추출되는 DNA가 극미량일 수밖에 없는데 이러한 어려움을 일시에 해결할 것으로 기대된 것이 PCR법이었으며, 실제 많은 고대 시료의 분석에 적용되어 왔다. 그러나 고대 DNA를 분석하던 연구자들은 연구 초반 인지하지 못했던 고대 DNA 분석의 심각한 오류와 기술적인 어려움을 깨닫게 되었으며, 이전에 발표된 엄청난 성과가 하루아침에 불거움이

될 수밖에 없는 이유를 스스로 지적하여야만 했다. 그러한 문제의 핵심은 바로 고대 DNA에 침투되어 있는 오염물질(contaminant)이 있었으며, PCR 방법과 분석 결과에 대한 지나친 맹신이었다. 고대 DNA의 연구결과에 대한 검증과 신뢰성의 논란은 지금도 이어지고 있으며, 초기에 간과되었던 고대 시료의 특성과 오염물질의 문제 그리고 PCR 결과의 명확한 해석을 위한 실험 기준과 그 방법들 또한 계속해서 제시되고 있다(Paabo et al. 2004).

국내에서 출토 인골을 대상으로 한 고대 DNA 분석은 1999년 나주 복암리 옹관 출토 인골의 미토콘드리아 DNA(mitochondrial DNA, mtDNA) 분석을 통하여 옹관 내에 매장되어있던 인골 2구의 혈연관계를 규명한 것이 최초이며(이규식 외 1999; 서민석 외 2003; 서민석 외 2004), 아직까지 우리나라의 고대 DNA에 대한 연구는 초기단계에 머물러 있다. 이 글은 고대 시료의 특징, 고대 DNA의 손상과 그것이 결과에 미치는 영향에 대하여 기술하였다. 또한 지금까지 고대 DNA 분석과 관련된 연구자들의 수많은 시행착오와 오류 속에서 연구결과와 신뢰성 확보를 위해 제시된 기준에 대하여 소개하고 있다.

II. 본 문

1. 고대 생체분자 연구의 중요성

출토 유기물을 분석하고자 하는 연구자는 유물에 묻어 있는 불순물을 세척 대상으로 생각하기 이전에 중요한 생체분자가 포함되어 있는 분석 대상으로 생각한다. 오늘날 유기시료를 분자수준으로 분석할 수 있는 기술과 장비가 발달함에 따라 유물에 잔존하는 미량의 유기물 시료는 유물의 쓰임새, 사용자 정보, 생활상 등을 추론할 수 있는 결정적인 단서를 제공하곤 한다. 생체분자는 생명 현상에서 비롯되는 유기물 시료로서 고고 정보 분석에 있어서 매우 중요한 연구 대상이다. 인간 또는 동물의 뼈, 곤충의 각피, 박테리아, 식물(씨앗, 꽃가루), 분뇨, 그릇 내부의 잔여물 등 유기물은 매우 다양한 종류가 출토되며, 핵산, 단백질, 탄수화물, 지방 등 포함하고 있는 주요 생체분자의 특성과 분석 방법에 따라 다양한 정보를 획득할 수 있다. 고대 인골의 연구를 통해 개체군의 이동, 정착, 이주방향과 집단의 크기, 외부 침입, 원주민의 대체 등 집단유전학적인 특성뿐만 아니라 친족 관계(kinship), 성 결정(sex determination) 등과 같은 개인정보를 분석할 수 있다. 동물 뼈는 가축화 과정, 고대인의 식습관, 제사의식, 매장풍습, 인간의 집단 이주 및 정착, 문물 및 문화의 전파 등과 연관이 있다. 고대 식물에 대한 연구는 농경문화 및 재배식물의 확산 고대인의 음식문화를 재구성하는데 필요하며, 당대의 기후변화 및 기후의 다양성을 식별하는데 중요한 단서를 제

시해 준다. 고대 미생물의 연구는 고대 인간과 동물에 존재했던 미생물을 동정하고 병원성 및 질병의 확산 등의 보건환경에 대한 정보를 제공한다. 발굴지에서 출토되는 다양한 생체분자에 대한 종합적인 분석과 연구는 고고학적 해석을 더욱더 풍부하게 할 뿐만 아니라 무형의 문화 정보를 복원하고 보존하는데 큰 몫을 차지하고 있다.

2. 고대 DNA 분석의 활용

핵산(nucleic acid)은 생명현상의 모든 정보를 담고 있는 중요한 고분자로서 DNA 분석기술의 발달로 말미암아 고대 시료의 분석연구에 있어서 매우 중요한 생체분자로 부상하였다. 대부분의 생체분자는 본질적으로 정성분석과 정량분석을 통하여 결과를 도출한다. 그러나 DNA는 그 자체가 수많은 정보를 담고 있는 설계도 또는 백과사전이며 그것을 정성, 정량적으로 분석할 뿐만 아니라 해독한다. DNA는 보존여부에 따라서 다른 생체분자를 통해서 얻을 수 있는 거의 모든 정보 분석에 활용될 수 있으며, 이런 기능성은 유전자 증폭과 클로닝이라는 기술과 함께 급격한 발전을 이루었다. 고대 DNA의 추출은 대부분 발굴된 뼈에 의하여 이루어진다. 특히 체내 칼슘의 99%를 구성하고 있는 수산화인회석(hydroxyapatite, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$)과 단백질 섬유조직인 콜라겐은 뼈의 주요 구성 성분이며, 다른 어떤 생체 조직보다도 DNA를 더욱더 안정적으로 보존하는데 기여한다.

DNA는 낮은 온도와 건조한 환경 등 생물, 화학적 분해를 느리게 진행시키는 이상적인 환경에서도 DNA 고유의 화학적인 특성으로 말미암아 수 만년 동안 존재할 가능성이 상당히 희박하다(Hoss et al. 1996b). 고대 시료의 연구에 있어서 현재의 기술로 시료 자체에서 유래한 DNA(endogenous DNA)를 검출할 수 없는 경우가 매우 많다. 그러나 그런 희박한 기능성은 분자생물학 기술의 발전으로 충분히 현실 속에서 재현되고 있다. 고대 DNA의 연구는 불과 20년 안팎의 역사를 갖고 있지만, 이미 수만 년 전 선사시대의 생명과 그들의 역사를 재해석할 수 있는 참신한 성과를 일궈내고 있다.

1) 인류 개체군의 역사와 계통지리학적 적용

지금까지 인류의 기원과 이동 경로에 관한 논쟁은 주로 화석 자료에 초점이 맞추어져 있었다. DNA가 남아 있을 확률이 거의 없는 수백만 년 전 화석의 형질인류학적 분석은 과거에 대한 유일한 정보를 제공하고 있다. 형질인류학적 연구는 선천적인 신체적 특징뿐만 아니라 질병, 나이, 생활 습관 등에 의하여 후천적으로 반영된 신체적 특징을 종합적으로 분석할 수 있기 때문에 인류의 기원을 규명하는데 있어서 앞으로도 유용하게 연구 될 것이다.

현대 분자생물학 기술은 수만 년 전의 화석에 남아 있는 DNA를 추출하고 염기서열을 분석할 수 있는 기술 수준에 거의 도달해 있다. 이것은 매우 획기적인 발전이며, 인류의 역사를 이해하는데 이전 보다 훨씬 많은 기회를 우리에게 제공할 것으로 기대되고 있다. 사람의 mtDNA는 모계유전(maternal inheritance) 현상에 의하여 자손세대에 전해지며 핵 DNA처럼 부계의 DNA와 섞이지 않고 모계유전자의 원형을 그대로 유지한다는 점에서 유전자의 조상형을 연구하는데 있어 장점을 가지고 있다. 또한 mtDNA의 고변위지역(hypervariable region, HVR)은 핵 DNA보다 변이율이 약 10배 정도 더 높기 때문에 개체군, 지역, 시대에 따른 미세한 유전적 다양성 변이를 핵 DNA에 비하여 보다 효율적으로 분석 할 수 있다. 개체군의 각 구성원에 대한 mtDNA의 변이를 분석하면 단일유형(haplotype)을 결정할 수 있는데 각각의 단일유형을 이용하여 계통도(phylogenetic tree)를 만들면 서로 연관관계가 높은 단일집단(haplogroup)을 확정할 수 있다. mtDNA 단일유형과 단일집단에 대한 통계적 유의성이 확보되면 단일집단의 지리적 분포를 분석함으로써 개체군의 이동 경로와 역사를 추적할 수 있다(Schurr 2000). 위와 같이 mtDNA 변이에 대한 통계적 연구 방법에 의하여 현 인류의 조상이 20만 년 전 아프리카에 살았던 한 여성(미토콘드리아 이브)으로부터 유래되었음을 주장하는 인류의 아프리카 기원설이 1987년 『네이처』지를 통해 발표되기에 이르렀다. 오늘날 개체군의 이주(migration)와 기원(origin)을 규명하기 위하여 mtDNA의 분석 뿐만 아니라 부계유전(paternal inheritance)되는 Y 염색체와 다양한 상염색체의 유전자 표지(genetic marker)가 연구되고 있으며, 이를 종합적으로 분석한다면 개체군의 이동과 기원을 규명하는 것도 가능할 것이다(Kivisild et al. 2002).

과거에 일어난 국가적 전쟁, 심각한 기근, 전염병의 만연, 기타 환경적, 정치적 원인에 의한 대규모 이주 등의 사건은 과거 개체군의 크기를 불안정하게 하는 주요 요인이었다. 이런 과거의 역사는 개체군의 유전자 평형을 무너뜨리는 병목효과(bottle effect)와 유전적 부동(genetic drift), 창시자 효과(founder effect) 등과 같은 변화를 초래하며, 이로 인하여 우리는 현대로 이어지지 못하고 사라진 유전자의 흔적을 현대 인류의 유전자 분석에 의해서 더 이상 찾지 못하게 된다. 바로 이러한 문제가 현생 인류의 유전자 정보를 이용하여 과거 인류의 역사를 해석하는데 있어 결정적인 한계로 작용한다. 이런 문제점은 현생 인류 집단과 동일 지역에 거주했던 고대인 집단 사이에 유전적 차이가 형성될 수 있음을 의미한다. 게다가 교통, 통신, 경제의 발달로 말미암아 인간의 이동과 정착이 훨씬 신속하게 이루어지기 때문에 현대인 집단의 유전자 분석결과가 동일 지역의 과거 고대인 집단의 유전자 흔적을 모두 담고 있다고 단정하기도 어렵다. 이런 이유에서 간혹 현대인의 유전자 분석결과를 이용하여 과거 인류의 이동과 정착을 연구하는데 있어 혼란과 논란을 불러일으키기도 한다. 따라서 지역, 시기별로 발굴된 고대 인골을 이용하여 DNA 분석을 시도하고 현대의 결과와 비교하고자 하는 것은 개체군의 역사를 밝히는데 있어 현재의 한계를 극복하고 보정할 수 있는 유일한 가능성이라 할 수 있다(Malhi et al. 2007; Tamm et al. 2007; Kemp et al. 2007).

고대 무덤에서 출토되는 인골을 대상으로 mtDNA를 분석하고자 하는 연구가 근래 활발히 진행되고 있는데, 이것은 바로 얼마 전 과거에서부터 길게는 수천, 수만 년 전 고대인의 숨겨진 유전정보를 밝혀내는 흥미로운 시도라 할 수 있다. 이러한 결과의 누적은 선사시대부터 현대에 이르는 인류의 유전적 특징을 복원하는데 있어 중요한 단서가 될 수 있다. 그러나 인간을 대상으로 하는 고대 DNA의 연구는 여러 가지 기술적 난제와 시료의 특성으로 인하여 상대적으로 최근 인간의 역사를 이해할 수 있는 정도에 국한되어 있으며 이러한 상황은 가까운 미래에도 계속될 것이다. 특히 출토 인골에 대한 고대 DNA 분석을 고대인 수수께끼를 풀 수 있는 만능열쇠 정도로 맹신하는 것은 지나친 자만이다. 그러한 이유는 바로 과거의 인간들과 동일한 DNA 서열을 공유하고 있는 현대 인간 DNA의 피할 수 없는 오염 때문이며 이에 대한 자세한 내용은 뒤에서 논하기로 한다.

2) 동물 개체군 역사의 연구와 멸종 동물의 계통학적 연구

고대 DNA의 연구는 인류 개체군의 역사뿐만 아니라 동물 개체군의 역사를 연구하는데 활용될 수도 있다. 자연과학자, 박물학자, 고고학자들에 의하여 수집된 고대 동물 개체에 대한 DNA 분석 연구는 고대 동물의 기원과 가축화(domestication) 과정, 이동 경로를 파악하는데 기여하고 있다. 인간이 가축을 사육한 시기는 농경과 목축이 가능했던 대략 기원전 일만 년 전후인 것으로 추정되고 있으나 그 시기는 지금도 의견이 분분하다. 국내의 많은 발굴지에서 식량과 제물 또는 농업과 목축을 위하여 사육되었을 것으로 추정되는 동물의 뼈가 많이 출토되고 있으나 고대 DNA 분석에 의한 분자유전학적 연구는 거의 전무한 실정이다.

캘리포니아 캥거루 쥐(kangaroo rat) 개체군에 대한 연구는 동물 개체군의 과거와 현재를 동물 뼈의 고대 DNA 분석에 의하여 비교한 좋은 예이다. 현대의 캘리포니아 지역에서 포획된 쥐의 개체들과 박물관에 보존되어 있던 과거 캘리포니아 캥거루 쥐의 개체들에 대해 mtDNA 분석 시도한 결과 과거의 캘리포니아 캥거루 쥐와 현대의 쥐들이 동일한 혈통의 개체군임을 확인할 수 있었으며, 이 쥐의 서식지가 지금까지 안정적으로 유지된 것으로 나타났다. 그러나 시카고 지역의 쥐 혈통은 최근 150년 전에 다른 종으로 대체된 것으로 분석되었는데 이것은 시카고의 도시사회 형성으로 많은 인구가 시카고에 유입된 것이 그 원인으로 추정되었다(Pergams et al. 2003). 위의 연구사례와 같이 현존하는 동물의 염기서열과 고대 DNA 염기서열을 비교분석함으로써 동물 개체군의 이동과 역사를 분석할 수 있다.

고대 DNA의 연구로 인하여 이미 멸종한 생물에 대한 분자 계통학적 연구도 가능해졌다. 특히 호주의 다스마니아승냥이(marsupial wolf)(Thomas et al. 1989), 뉴질랜드산 모아(moa), 아메리카산 땅늘보(ground sloth)(Hoss et al. 1996a), 하와이산 거위(goose)(Paxinos et al. 2002) 등 약 50여 멸종 동물의 DNA 분석 연구가 활발히 진행되고 있다. 세계 도처의 자연사박물관은 보유

하고 있는 멸종 동물 또는 식물 유해의 분류와 동정을 위한 계통진화학적 연구를 위하여 시료의 파괴 및 손상에 대한 지침과 관련 연구시설의 운영에 대한 규정을 만들어 놓고 있다. 멸종 동물의 계통학적 분석을 위해 mtDNA 몇 개의 유전자좌위(genetic loci)의 분석결과만으로는 한계가 있을 수밖에 없으나 NCBI(National Center for Biotechnology Information), EBI(European Bioinformatics Institute) 등과 같은 대규모 유전자 정보의 데이터베이스를 활용하여 염기서열을 비교분석함으로써 그러한 한계는 점차 극복되어 가고 있다.

3. 고대 DNA의 특징

1) DNA의 분해와 보존

생명의 기본 단위인 세포는 생명체가 살아 있는 동안 DNA 분자의 안정적인 보존 상태를 유지하기 위하여 물리 화학적인 요인에 의하여 손상된 DNA를 모니터링하고 복구할 수 있는 시스템(DNA repair system)을 끊임없이 가동한다(Lindahl 1993). 그러나 생물체가 죽은 이후 DNA 복구 시스템은 급격히 파괴되고 세포가 자체적으로 생산한 이화대사효소(catabolic enzyme)와 여러 가지 핵산분해효소(nuclease)에 의하여 가수분해(hydrolysis)되어 급격히 자연 분해되기 시작한다. 또한 단백질, 탄수화물, 지질과 같은 생체분자 또한 박테리아(bacteria), 곰팡이(fungi), 곤충(insect) 등의 에너지원으로 이용될 수 있기 때문에 쉽게 분해과정에 들어선다. DNA의 손상은 살아 있는 세포에서도 지속적으로 일어나고 있지만, 죽은 이후에는 이를 재합성하거나 복원할 수 있는 시스템이 결실되면서 DNA는 점차 분해되고 결국에 보유하고 있던 유전 정보를 잃어버리게 된다.

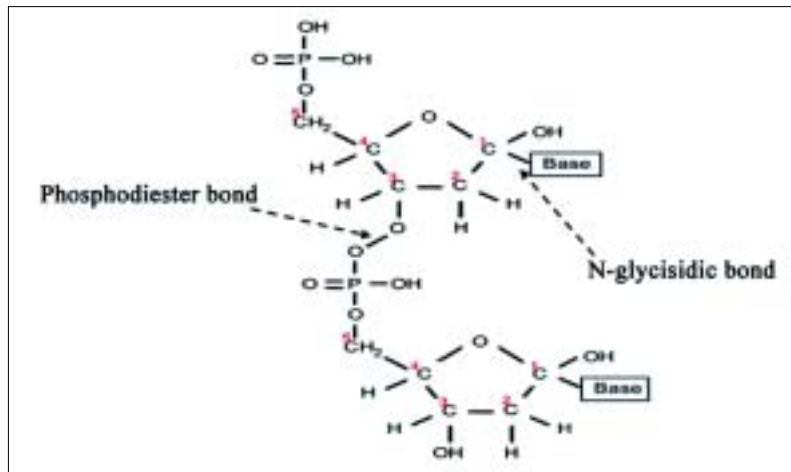


그림 1. DNA의 중합 구조

2) 고대 시료의 DNA 손상

고대 시료에서 추출된 대부분의 DNA는 작은 크기로 절편화(fragmentation)되어 있으며, 평균적으로 100bp에서 500bp 정도의 크기로 확인된다(Hofreiter et al, 2001b). DNA 크기의 감소는 앞서 언급한 효소의 자연 분해 작용 외 비효소성 손상(nonenzymatic damage) 작용에 의해서도 유발된다. 비효소성 손상은 과산화 라디칼(superoxide radical, $\cdot O_2^-$), 과산화수소(hydrogen peroxide, H_2O_2), 수산화 라디칼(hydroxy radical, $\cdot OH$)등의 강력한 산화제(oxidizing agent)나 EMS(ethyl methane sulfonate) 등과 같은 강력한 알킬화제(alkylation agent), 가수분해(hydrolysis) 등에 의해서 일어난다. 이러한 손상 요인은 DNA 이중나선(double helix) 중합체의 인-당 골격(phosphate-sugar backbone)을 형성하고 있는 인산-에스테르결합(phosphodiester bond)을 파괴하여 DNA 이중나선에 단일가닥 새김눈(single-stranded nick)을 발생시킬 수 있다(그림 1). 또한 당 골격과 질소염기(nitrous base)사이에 형성되어 있는 N-글리코시드결합(N-glycosidic bond)을 파괴시켜 염기의 결실 부위(abasic site)를 형성시키거나 염기의 아미노기만을 제거하는 탈아미노화를 과정을 유도할 수 있다(Schaaper et al, 1983).

고대 시료는 장기간 토양 속의 열악한 물리 화학적 환경에 노출되어 있으면서 많은 손상이 누적되게 되는데 이러한 DNA의 물리, 화학적 변성은 DNA의 유전자 분석 실험에 심각한 장애를 가져오게 된다. PCR 방법은 Taq DNA 중합효소(Taq DNA polymerase)에 의하여 DNA를 시험관(in vitro) 상에서 인공적으로 증폭할 수 있는 매우 강력한 분자생물학 기법이지만 고대 DNA를 증폭하는 것이 극히 제한적이고 어려운 이유는 바로 이런 DNA의 손상 때문이다. 엔도뉴클레아제 III(endonuclease III)는 DNA 복구효소로서 퓨린 결실 부위(apurinic site) 또는 피리미딘 결실 부위(aprimidinic site) 등 변성된 DNA 부위를 찾아내어 DNA의 인-당 골격부분을 절단함으로써 손상된 부위를 제거하는 역할을 한다(Tainer et al, 1995). 따라서 고대 시료에서 추출된 고대 DNA는 매장 환경과 기간에 따라서 엔도뉴클레아제 III에 대한 감수성이 대체로 높고 다양하게 나타난다. 고대 DNA의 절편화와 이러한 화학적 손상은 일반적인 현상으로서 PCR 과정에서 Taq DNA 중합효소의 활성을 방해하는 주요 원인으로 알려져 있다.

고대 시료에서 DNA를 추출하고 PCR에 의하여 성공적으로 DNA 증폭에 성공한다 하더라도 변성된 DNA를 주형으로 증폭을 시도할 경우 본래의 염기가 부정확한 염기로 뒤바뀔 가능성이 있기 때문에 이미 변성된 고대 DNA의 염기서열을 결정하는 문제는 매우 신중한 분석이 필요하다. 대부분의 변성은 DNA 염기인 아데닌(adenine, A), 시토신(cytosine, C), 5-methylcytosine, 구아닌(guanine, G)의 염기에서 아미노기(amino group)가 가수분해성 결실(hydrolytic loss)로 인해 탈락되면서 각각 하이포크산틴(hypoxanthine), 우라실(uracil, U), 티민(thymine, T), 크산틴(xanthine)과 같은 물질로 전환된다(그림 2). 또한 C(또는 U), 5-methyl-cytosine(또는 T),

A(또는 hypoxanthine)의 탈아미노화 과정은 고대 DNA의 증폭에 있어서 매우 중대한 문제를 야기시킬 수 있는데 그것은 탈아미노화된 DNA의 증폭결과 DNA 중합효소에 의하여 본래의 염기가 G-A, C-T 또는 A-G, T-C와 같이 치환되어 잘못 합성되는 결과를 초래할 수 있기 때문이다 (Banerjee and Brown 2004).

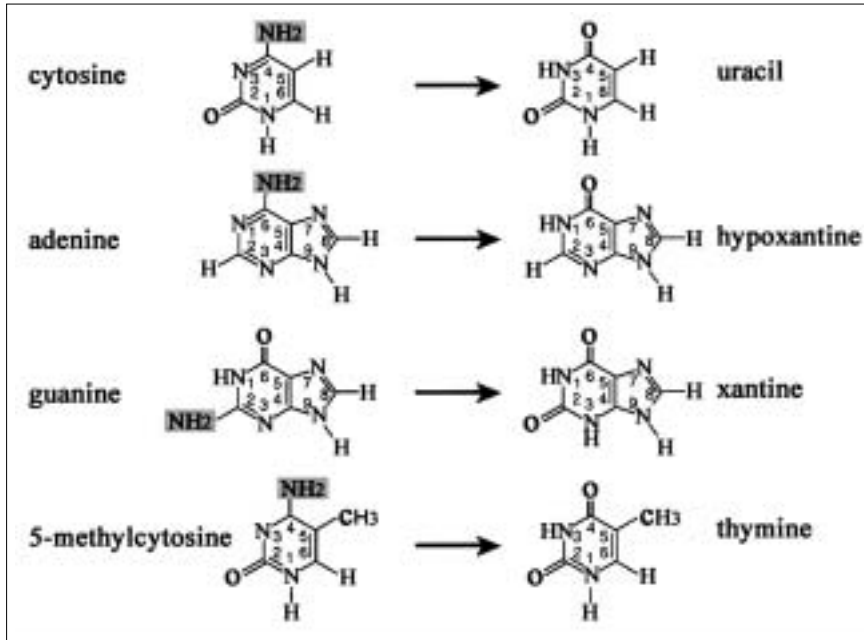


그림 2. DNA 염기의 탈아미노화 현상과 그 생성물

3) 고대 DNA 증폭의 문제점과 염기서열의 신뢰도

고대 DNA를 PCR 방법에 의하여 증폭하여 그 산물을 클로닝(cloning)한 후 임의로 몇 개 클론의 염기서열을 결정하여 비교해보면 동일한 고대 DNA 주형을 사용하였음에도 불구하고 본래의 증폭 서열과 다른 염기가 발견되는 예러 비율이 현대 DNA(modern DNA)를 증폭하여 얻은 결과보다 높게 나타난다(Hansen et al, 2001). 부정확한 염기가 증폭되는 주된 요인은 바로 염기의 탈아미노화 과정이다. 고대 시료에서 추출된 DNA는 화학적 손상으로 말미암아 시토신의 탈아미노화 과정으로 생성된 우라실 염기를 현대 DNA보다 많이 포함하고 있다. 따라서 DNA에서 우라실을 선택적으로 제거하는 역할을 하는 우라실-DNA-글리코실라아제(uracil-DNA-glycosylase)를 고대 DNA에 처리할 경우 현대 DNA에 비하여 더 큰 감수성을 나타낼 수밖에 없다. 또한 C→T와 G→A로의 염기 변화는 고대 DNA 분석 연구에서 매우 빈번하게 일어나는 것으로 보고되었는데 이것은

우라실에 상보적으로 G 잔기 보다는 A 잔기의 합성을 더 잘 일으키는 Taq 중합효소의 기능적 특성에 의하여 유도되는 염기치환오류(misincorporation) 때문인 것으로 알려져 있다<그림 3> (Hansen et al, 2001).

고대 DNA의 손상과 PCR 에러는 결과적으로 고대 DNA 염기서열의 정확한 결정을 매우 어렵게 한다. 이런 심각한 문제점을 해결하기 위해 고대 DNA의 손상에 의하여 일어나고 있는 염기치환 오류를 고유의 염기서열과 반드시 분별할 필요성이 있다. 이를 최대한 정확히 판단하기 위해서는 동일한 시료에서 동시에 추출된 아주 소량의 DNA를 주형으로 하여 반복적인 증폭(multiple amplification)을 수행하고 PCR 산물을 클로닝한 후, 몇 개 클론의 DNA 염기서열을 비교해야 한다. 이 방법에 의하여 염기치환오류로 인해 PCR의 첫 번째 사이클에서 일어날 수 있는 고정치환(consistent substitution)의 대부분을 분석할 수 있으며, Taq 중합효소에 의한 임의의 에러 식별도 가능하다. 그러나 아직까지 DNA의 손상과 PCR에 의한 증폭 과정에서 일어나는 염기치환 오류에 대한 정보는 부족한 실정이며 지금도 일부 논란이 되고 있다(Banerjee and Brown 2004; Gilbert et al, 2005).

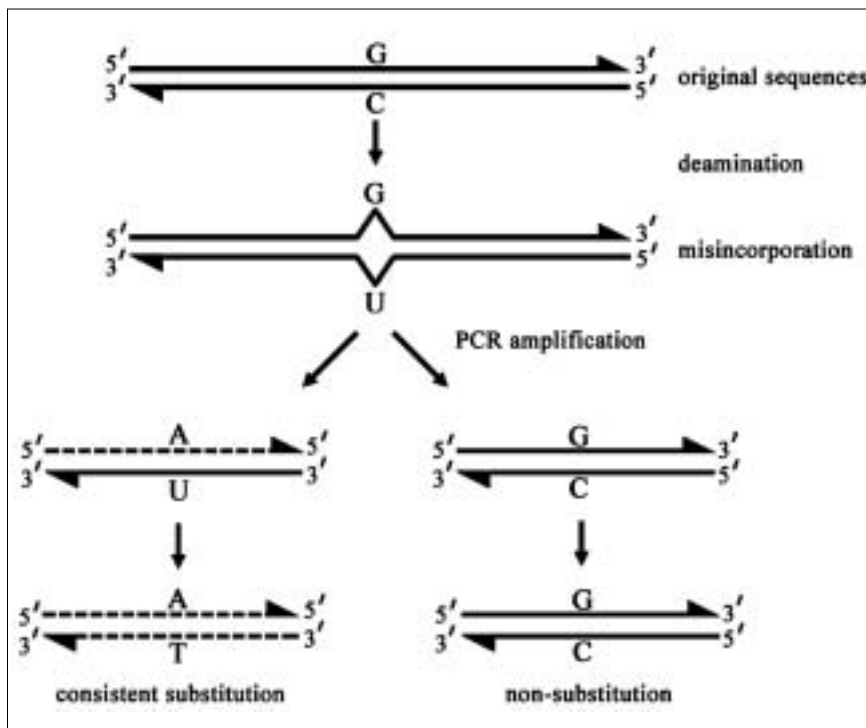


그림 3. 시토신의 탈아미노화에 의한 염기치환오류와 PCR에 의한 고정치환의 발생 과정

4. 외부 DNA에 의한 오염

홍적세(Pleistocene)의 동굴 곰(cave bear) DNA 분석 연구에서 동굴 곰의 뼈가 모두 인간의 DNA에 의해 오염되어 있는 것으로 밝혀졌다(Orlando et al. 2002; Serre et al. 2004). 이러한 사례는 기원전 3300-2500년 전 개(dog)의 뼈와 치아에서 DNA 추출을 시도한 연구 사례에서도 보고되었는데, 실험에 이용한 25개체의 시료 모두에서 인간 DNA의 오염을 확인할 수 있었으며, 그 양은 예상을 뛰어넘는 것이었다(Malmstrom et al. 2005). 국내에서 출토된 동물 뼈에서도 인간 DNA의 오염이 쉽게 확인되었다. 고려 강도시대 고분인 강화도 가릉의 횡구식 석실분에서 출토된 육식동물의 치아(KA96)는 이미 상아질(dentine) 및 치수(pulp)가 거의 분해되어 남아 있지 않고 에나멜(enamel) 층만이 남아 있는 상태로서 DNA를 추출하기 거의 불가능한 것으로 판단되었다. 인간 DNA의 오염 여부를 비교 분석하기 위하여 충청남도 서천군 장항읍 옥남리에서 발굴된 조선시대 합장묘에서 비교적 보존상태가 양호한 인골(KAB0001)의 대퇴골 시편을 이용하여 KA96과 함께 DNA를 추출하였다. 추출한 주형 DNA와 인간 mtDNA의 HVRI 부분을 특이적으로 증폭할 수 있는 프라이머를 이용하여 PCR을 수행한 결과 인골인 KAB0001과 함께 동물의 치아 KA96에서 HVRI의 증폭 산물을 확인하였다(그림 4). KA96의 증폭 산물이 인간의 DNA인지를 판별하기 위하여 염기서열 분석을 실시하였으며, <그림 5>에서와 같이 인간 DNA의 오염을 확인하였다.

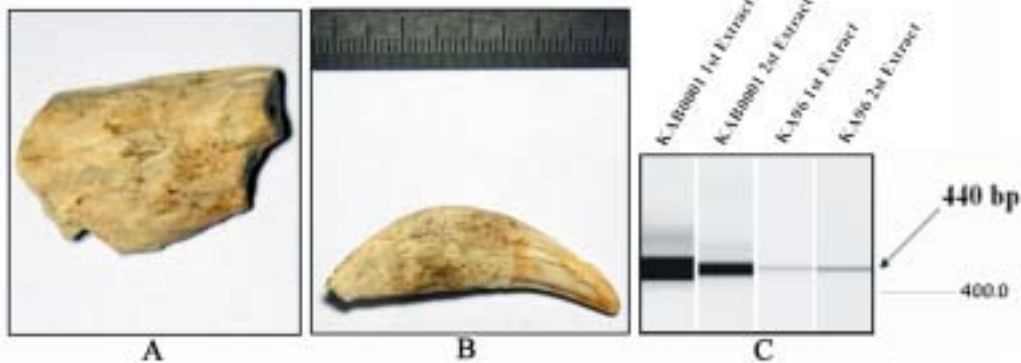


그림 4. 동물 뼈에 대한 인간 DNA 오염의 국내 사례. 각각 0.5g의 서천 옥남리 출토 인골 (KAB0001) 시료(A)와 강화도 가릉에서 출토된 동물의 송곳니(KA96) 시료(B)에서 DNA를 순수 분리하기 위하여 Malhi et al. (2007)의 페놀추출법을 이용한 인간 mtDNA의 HVRI의 증폭을 위해 L15971(5'-TTAACTCCACCATTAGCACC-3')와 H16410(5'-GAGGATGGTGGTCAAGGGAC-3')를 제작하여 PCR 반응에 사용함. PCR 반응액(2.5unit 중합효소(HotStarTaq, Qiagen)와 1X PCR 완충용액, 0.15mM dNTP, 0.5mM 프라이머, 1.5mM MgCl₂, 0.1μg BSA, 5μl 주형 DNA)을 50μl로 조성하여 PCR장치(ABI9600, Applied Biosystems)에서 94°C에서 15분 동안 초기 반응시키고 94°C(30초), 58°C(30초), 72°C(60초)의 반응을 순차적으로 40회 반복한 후, 마지막으로 72°C에서 7분 동안 반응 후 모세관 전기영동장치(HDA-GT12, eGene)를 통하여 증폭 산물을 확인함(C). DNA 추출 및 PCR 과정에 사용되는 시약은 오염 여부를 확인하기 위하여 2회에 걸쳐 분리된 시약을 사용함

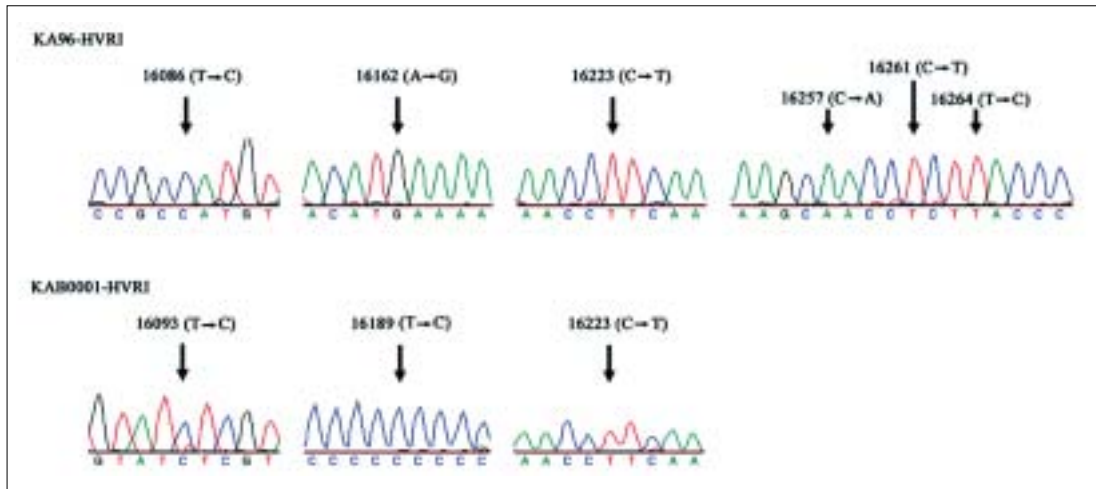


그림 5. 서천 옥남리 출토 인골(KAB0001)과 강화도 가릉 동물 치아(KA96) 시료의 HVR1 변이 부분에 대한 크로마토그램(chromatogram). 크로마토그램 아래 영문대문자는 DNA 염기를 나타내며 변이가 발생한 염기서열의 위치는 수직 방향의 화살표와 숫자로 표현하였음

외부 DNA, 특히 인간 DNA의 오염은 고대 DNA의 분석에 있어서 매우 심각한 문제이며, 이미 고대 DNA 연구의 초기부터 중요한 문제점으로 부각되어 왔다. 발굴당시 매장환경이 완전히 밀폐되어 있지 않고 외부에 노출되어 외부인의 출입이 가능했거나 도굴 등에 의하여 훼손된 경우 오염의 가능성은 더욱더 높을 수밖에 없으며, 오염원과 그 시기를 파악하는 것은 사실상 불가능에 가깝다고 할 수 있다. 동물 뼈의 DNA 분석은 염기서열 결정 단계에서 최종적으로 인간의 DNA 염기서열을 동물의 그것과 구별하여 결과에서 배제할 수 있다. 그러나 고대 인골 DNA의 분석에서 최근에 일어난 인간 DNA의 오염을 구별해 내는 것은 매우 어렵다. 동물 뼈에서 인간 DNA의 오염이 빈번히 확인된다는 것은 인골에서도 다른 인간의 DNA가 오염되어 있을 가능성이 매우 높다는 것을 의미한다. 불행하게도 이러한 DNA 오염은 매우 빈번할 뿐만 아니라 고대 인간 DNA 분석 결과의 신뢰성에 있어서 가장 치명적인 약점으로 작용할 수 있다.

따라서 이러한 외부 DNA 오염을 극복하는 것은 고대 DNA 연구의 핵심이며, 이러한 오염 가능성을 완화시키기 위해 기본적인 두 가지 방법이 제안되었다. 첫 번째는 연구 환경에 대한 문제로서 실질적으로 가장 오염 가능성이 높은 실험실 공간의 청결상태를 강조하는 것으로 다음과 같다. 기본적으로 먼지 등의 오염물질을 조절할 수 있는 클린룸(cleanroom) 시설을 겸비하는 것이 바람직하다. PCR 증폭 이후의 실험과정(post-PCR work)을 진행하는 실험실은 고대 시료의 전처리, DNA 추출, DNA 증폭을 준비하기 위한 실험실과 분리되어 있는 별도의 실험실에서 진행해야 하며, 현대인의 DNA 연구를 수행했던 연구실과 고대 DNA를 연구하는 실험실 또한 기급적 분리해야 한다. 모든 DNA 추출 작업은 클린룸 안에서 방호복(protective clothing)을 입은 상태로 진행하

여야 한다. 실험공간은 표백제(bleach)와 같은 산화제로 청결하게 세척해야 하며, 관련 시설과 장비를 수시로 UV를 이용해 조사함으로써 외부 DNA 오염원에 대하여 청결하게 유지될 수 있도록 한다. 두 번째는 고대 DNA 분석에 있어서 결과에 대한 신뢰성(authenticity)을 뒷받침하기 위한 과정으로서 1989년 Paabo 박사에 의하여 제안되었으나 최근까지 더욱더 엄격하게 그 기준이 확장되었다(Paabo et al, 2004). 특히 오염이나 염기 치환 오류의 양상을 보다 수월하게 결정할 수 있도록 하였으며, 고대 DNA에 대한 분석과 결과의 신뢰성 확보를 위해 제기된 명확한 검증기준을 다음과 같이 논리적으로 제시하였다.

1) DNA 증폭 산물의 클로닝 및 클론의 염기서열 분석

DNA 증폭 산물을 클로닝하여 염기서열을 분석하는 방법으로써 외부오염, DNA의 손상 등 모호한 염기 서열에 대한 이질성(heterogeneity)을 발견하였을 때 이를 분석하기 위해 수행할 필요성이 있다.

2) DNA 추출 및 증폭 실험의 대조군 설정

모든 DNA 추출 과정은 반드시 고대 시료를 포함하지 않는 대조군(blank)을 설정하고 대조군 역시 동일한 실험 과정을 수행함으로써 시약과 처리 과정에서 발생할 수 있는 오염 여부를 판단할 수 있도록 해야 한다. 모든 PCR 실험 역시 DNA를 추출하는 과정과 마찬가지로 PCR을 위한 시약과 실험기기에 의한 오염 여부를 검증하기 위하여 주형 DNA를 포함하고 있지 않은 대조군을 설정하여야 한다. 고대 시료에 포함되어 있는 당(sugar) 성분과 미생물 DNA(microbial DNA) 등의 물질은 대조군에서 증폭되지 않는 낮은 농도의 외부 DNA가 증폭되도록 보조해주는 "전달자(carrier)"의 역할을 할 가능성이 있기 때문에 대조군에서 오염이 확인되지 않았다 하더라도 주의해야 한다. 이러한 산발적인 오염원(sporadic contamination)의 문제를 해결하기 위해서는 시료에 잔존하는 미생물과 불순 물질을 제거하는 전처리 작업과 DNA를 최대한 순수하게 정제하는 것이 중요하며, 동일한 시료에서 추가적인 DNA의 추출과 PCR을 수행하여 염기서열을 비교 분석함으로써 해결해야 한다.

3) 고대 시료에서 추출한 DNA의 반복적인 증폭

이 과정은 앞서 언급한대로 각각의 DNA 추출 및 PCR 과정에서 발생할 수 있는 오염을 검출하기

위한 것이다. 동시에 극미량의 DNA 시료에서 나타날 수 있는 산발적인 오염원과 염기 치환오류에 의하여 유도되는 고정 치환을 반복적인 증폭에 의해서 감별하기 위하여 필요하다. 이러한 산발적인 오염과 DNA 손상을 체크하기 위해서는 동일 시료 당 3회 정도의 DNA 추출과 증폭을 반복하는 것이 적당하다.

4) 증폭 가능성이 있는 DNA 분자 수의 정량

적은 수의 고대 DNA 주형을 이용하여 DNA 증폭을 시도할 경우 PCR의 초기에 고정 치환이 일어날 가능성이 많아진다. 따라서 DNA 손상에 의한 고정 치환이 일어났는지 여부를 판단하기 위해서는 대략 1,000개 이상의 DNA 주형 분자를 PCR에 이용할 경우 고정 치환을 배제할 수 있는데, '3)'에 의하여 DNA를 증폭한 결과 한 가지 유형의 DNA 염기서열만이 예상된다면 더 이상의 DNA 증폭을 수행할 필요가 없다. 그러나 극미량의 DNA 주형을 이용하게 될 경우 추가적인 증폭을 요하게 된다. 가장 효율적으로 실험을 진행시키는 방법은 최초 2회에 걸친 증폭을 수행하는 것이며, 각각 몇 개의 클론에 대한 염기서열분석을 수행하여 비교하는 방법이다. 그러나 염기서열 분석 결과, 두 가지 유형의 DNA 서열이 관찰되었을 경우, 세 번째 증폭을 시도하여 결정하여야 한다. 특히 mtDNA이거나 또는 단일한 유형의 DNA 염기서열(Y 염색체 등)을 분석한 것이라면 세 번째 증폭에 의하여 비교적 수월하게 염기 서열을 결정할 수 있다. 비교적 많은 양의 DNA 분자를 주형으로하여 상염색체(autosome)의 증폭을 시도한 결과일 경우, 두 번의 증폭에서 두 대립인자(allele) 유형이 거의 비슷하게 나타난다면 더 이상의 증폭은 필요치 않을 것이다. 그러나 적은 양의 DNA 주형 분자를 사용하였다면 동일 개체의 것인지 아니면 다른 개체와 혼합된 것인지 구별하기 위하여 여러 번의 증폭이 추가적으로 요구된다. 증폭 가능한 DNA 주형의 분자 수를 결정하는 것은 실시간 PCR(Real Time PCR, RT-PCR)과 같은 방법을 이용하여 한번 증폭으로도 가능하지만, 증폭 부위의 길이, 프라이머와 주형 DNA의 감수성, 증폭 부위 염기의 조성 등에 따라서 증폭 가능한 DNA 분자는 매우 다양한 수로 나타날 수 있다는 사실을 감안해야 한다.

5) 증폭효율과 증폭 길이 사이의 역상관성(inverse correlation)

고대 DNA는 염기의 화학적 손상과 절편화 정도가 심하기 때문에 PCR에 의한 증폭효율은 증폭하고자 하는 부위의 길이와 반비례하는 경향이 있다. 물론 시료에 따라서 절편화 정도가 다르기 때문에 증폭 길이와 효율도 다양하게 나타날 수 있다. mtDNA를 대상으로 100-200bp 이상의 증폭은 잘 이루어지지 않는 것이 보통이다. 더구나 무리하게 긴 부위를 증폭하고자 했을 경우, 만일 최근에 일어난 오염(modern contamination)이 존재한다면, 본래 시료의 짧은 DNA는 읽히지

못하고 오염된 DNA가 증폭될 가능성은 더욱더 커지게 마련이다. 따라서 긴 부위의 증폭을 목적으로 한다면 그보다 짧은 부위를 나누어 증폭하되 프라이머의 제작을 서로 겹치게 하여 전체 염기 서열을 복원하는 것이 바람직하다.

6) 생체분자의 생화학적 검증

생체분자가 거의 남아 있지 않다는 것은 DNA를 거의 포함하고 있지 않을 가능성이 높다는 것을 의미하며, 반대로 생체분자의 보존이 잘 되어 있다는 것은 DNA의 존재를 간접적으로 검증할 수 있는 방법이 된다. 고대 시료에 남아 있는 아미노산의 양, 조성, 라세미화 비율을 분석하는 것은 뼈와 치아에서 DNA의 보존을 간접적으로 알아볼 수 있는 방법이다. 또 다른 방법으로는 단일한 아미노산과 그 중합체인 펩타이드의 비율을 질량분석기(mass spectrometry, MS)로 측정하는 방법, DNA의 탈아미노화에 의한 손상을 기체크로마토그래피/질량분석기(gas chromatography/mass spectrometry, GC/MS)를 이용하여 측정하는 방법, 뼈의 밀도와 간극률(porosity)을 계산하는 방법, 전자현미경에 의한 관찰 등 고대 DNA의 보존을 간접적으로 검증할 수 있는 여러 가지 방법이 있다.

7) 세포핵 DNA에 삽입된 mtDNA 증폭의 방지

mtDNA 증폭을 위하여 제작된 프라이머가 세포소기관(organelle)에서 핵 삽입(nuclear integration)에 의하여 유래된 DNA를 증폭시키는 경우가 종종 발생할 수 있다(Vanderkuyl et al. 1995). 이러한 현상을 방지하기 위해서 증폭하고자 하는 부위에 대하여 서로 다른 프라이머 세트를 사용함으로써 해결해야 한다. 그러나 mtDNA의 핵 삽입이 광범위하게 많이 일어난 생물종에서는 이러한 문제를 해결하기 어려운 경우가 있어 mtDNA 염기서열을 결정하는 것이 불가능한 사례도 있다(Thalmann et al. 2004).

8) 2차 연구기관에서의 재확인(cross-check)

이 기준은 연구실에서 시료를 처리하는 과정 중에 발생할 수 있는 시약 또는 시료에 대한 오염을 발견하기 위한 것으로 위에서 언급한 '2)', '3)' 기준의 목적과 동일하다. 이 방법이 모든 연구에 적용될 수 있는 것은 아니지만, 예상치 못했던 결과나 새로운 결과 또는 생물학적으로 매우 중대한 결과가 예상되거나 확보되었을 경우, 논란을 예방하고 결과를 검증하기 위하여 필요하다. 그러나 중요한 고대 시료가 다른 기관에서 연구되기 이전에 이미 오염되어 있었다면 2차 연구기관에서도

오염에 의한 결과가 재차 발생할 가능성이 높기 때문에 결과의 분석과 해석에 있어서 신중을 기할 필요가 있다.

5. 발굴과정에서 일어나는 오염원의 차단

발굴지에서 출토되는 고대 시료 분석 결과에 대한 신뢰성 확보는 출토 과정에서 일어날 수 있는 다양한 외부 오염으로부터 고대 시료를 보호하는 것에서 시작된다. 각종 출토 유물은 빛을 보는 순간 모든 오염원으로부터 가장 취약한 상태에 놓이게 된다. 고대 시료에 대한 분자 수준의 분석 결과는 매장 당시 시대적 상황과 환경 등을 추론하는데 주요한 기여를 하게 되는 경우가 많다. 그러나 출토과정에서 비롯된 각종 오염물은 분석결과의 심각한 오류와 잘못된 해석을 야기할 수 있다. 따라서 분자 수준의 연구를 위해서는 발굴 초기 단계부터 시료 보관 및 최종 분석 단계에 이르기 까지 전 과정에서 일어날 수 있는 오염을 차단하고 모니터링 할 수 있는 오염 방지 계획을 체계화 하여야 한다. 특히 고대 DNA 분석에서 일어날 수 있는 가장 치명적인 오염은 시료를 직접 다루는 발굴자나 실험자의 DNA에 의하여 발생하는 것이며 주의를 기울이더라도 대부분 인지되지 못한다. 따라서 다음과 같은 절차에 의하여 시료를 채취함으로써 최대한 오염을 줄일 수 있도록 해야 한다.

DNA 분석을 필요로 하는 시료에 대한 모든 발굴 과정은 멸균장갑, 마스크, 방호복을 착용하고 진행하여야 하며, 흔히 사용하는 작업용 면장갑은 적절하지 않다. 또한 시료가 있는 위치에서 담배를 피운다거나 시료가 있는 방향으로 말을 하고 숨을 내쉬는 것을 피해야 한다. 출토된 고대 시료는 멸균보관함(보통 50ml 실험용 튜브 사용), 멸균페이퍼백 또는 멸균비닐백 등을 미리 준비하여 외부노출 시간을 최대한 짧게 하고 신속하게 보관하여야 한다. 특히 토양 등 불순물을 제거하기 위하여 물 세척을 한다거나 경화처리 또는 방부처리를 하는 것은 더욱 심한 오염을 발생시키고 DNA 분석을 불가능하게 하는 요인이 되므로 발견 당시 상태 그대로 보관하여 분석 장소로 전달 하는 것이 중요하다.

오늘날 발굴 인골에 대한 DNA의 분석결과를 수록하고 있는 국제적인 저널은 연구과정에서 일어날 수 있는 외부 DNA의 오염의 방지 대책에 대하여 대단히 엄격한 심사를 하고 있으며, 인골 시료와 관계된 발굴자 및 실험자를 오염후보군(contamination candidate)으로 설정하고 DNA 분석을 요구하기도 한다. 만일에 있을 오염과 그 원인 및 근원을 파악하기 위해 발굴자 또는 실험자의 유전자 분석결과가 필요할 경우 '생명윤리 및 안전에 관한 법률'에 의하여 피검사자로부터 '유전자 검사 동의서'를 제출받은 후 유전자 분석을 실시하여야 한다. 따라서 오염을 최대한 줄이고 신뢰성을 확보하기 위해서는 최소 인원의 연구책임자나 연구실무자가 직접 시료에 접근하여 채취 하는 것이 가장 바람직하다.

6. 고대 DNA 연구와 검증을 위한 통합적 전략

위에서 언급한 고대 DNA 연구에 대한 기준은 잠재적으로 발생할 수 있는 모든 오염원에 대한 침입 가능성을 방지하고 고대 DNA 연구결과의 공개 활용(publicly available)을 위하여 매우 중요하고 엄격하게 적용되어야 한다. 그러나 고대 DNA 연구를 위해 위에서 언급한 기준을 모두 적용하는 것은 적당하지 않으며 사실상 불가능하다. 고대 DNA의 추출과 PCR에서 대조군을 설정하는 것은 기본적으로 항상 수행한다 하더라도 만일 DNA 손상에 의한 고정 치환을 보정할 수 있는 정도의 수천 개 DNA 주형을 이용하여 DNA를 증폭하였다면, 몇 번에 걸쳐 이루어지는 동일한 시료에 대한 DNA의 추출과 증폭은 시료와 시간에 대한 낭비일 수밖에 없다. 또한 생체분자에 대한 생화학적인 실험 역시 시료의 상태가 비교적 잘 보존되었을 경우 불필요한 과정이라고 할 수 있다. 그러나 생물학적으로 매우 중대하고 파급효과가 큰 연구결과에 대해서는 2차 연구기관에서의 반복적인 연구를 수행함은 물론 위에서 언급한 기준을 최대한 이행할 필요성이 있다.

7. 고대 DNA 분석의 시간적 한계

DNA 분석은 고고학자(archaeologist)와 동굴학자(speleologist)에 의하여 발견된 고대의 멸종 동물시료로부터 DNA를 추출하여 분석할 수 있을 정도의 기술 수준으로 향상되었으며 그러한 첫 사례는 기원전 3550년 정도로 추정되는 멸종된 뉴질랜드산 타조의 일종인 모아의 DNA 분석에 의하여 이루어졌다(Cooper et al. 1992). 또한 빙하기인 홍적세 후기까지 생존했던 매머드(mammoth)와 마스토돈(mastodon)의 DNA 분석 결과가 전 세계 9개 연구기관에서 보고되고 있다(Thomas et al. 2000). 그 외 플라이스토세(Pleistocene)의 포유동물 가운데 땅늘보(Greenwood et al. 2001), 동굴사자(cave lion)(Burger et al. 2004), 동굴곰(cave bear)과 홍적세 후기의 갈색곰(brown bear)(Orlando et al. 2002)의 DNA 서열이 분석되었으며, 현존하는 동물과의 이들 멸종 동물간의 유전적 유연관계(genetic relationships)가 연구되었다.

PCR을 과실했던 일부 연구자들은 고대 시료에 대한 DNA 증폭에 있어서 거의 제한이 없는 것처럼 생각하곤 했는데, 이러한 결과는 수백만 년 전의 DNA 서열에 대한 놀라운 보고로 이어졌다. 마이오세(Miocene)의 식물화석에서 염록체 DNA 서열의 동정(Soltis et al. 1992), 호박(amber)에서 곤충과 식물의 DNA 동정(Poinar et al. 1993), 미국 유타주에서 발견된 백악기(Cretaceous)의 공룡(다이노소어)의 뼈에서 mtDNA 서열 동정(Woodward et al. 1994), 호박 속에 갇힌 곤충의 내장 박테리아와 소금 크리스탈(salt crystal)안의 박테리아 DNA 서열 동정(Hofreiter et al.

2001a) 등 상상으로 가능했던 연구가 현실로 보고되었다. 그러나 DNA의 화학적 손상에 대한 통계학적 근거에 의하여 DNA가 수백만 년 동안 유지될 수 있다는 것에 대해 의문이 제기되기 시작하였다(Lindhahl 1993). 또한 마이오세의 식물화석과 호박속의 생물에서 DNA를 추출하려는 재실험에서 반복적인 결과를 얻지 못했다(Austin et al. 1997). 마이오세 식물에서는 리그닌(lignin) 분자가 완전히 소실되어 있었으며, 호박 안에 갇힌 곤충 역시 키틴(chitin)이 남아 있지 않았던 것으로 보고되었다(Logan et al. 1995). 이러한 보고서는 수백만 년 전 화석의 DNA가 보존되었다는 연구 결과에 대한 반박과 논란을 가중시켰다. 그러한 외증에 공룡으로부터 증폭된 mtDNA가 공룡에서 유래한 것이 아니라, 실험실의 오염으로 말미암아 인간의 DNA를 증폭시킨 경우로 판명되면서 고대 DNA 연구 분야에 큰 충격을 주고 말았다(Zischler et al. 1995). 아직까지도 논란의 여지가 많으나, 백 만년 이상의 DNA 서열을 분석하는 것은 현재로서 불가능한 것으로 알려져 있으며, 그러한 놀라운 결과는 외부 오염 또는 인위적인 결과일 가능성이 현재로서는 높다고 보고 있다.

Ⅲ. 맺음말

비록 고대 DNA의 연구방법이 대부분의 분자생물학 연구실에서 평범하고 단순하게 적용되는 것일지라도 고대 DNA에 대한 연구결과는 그 이상의 명백한 신뢰성을 확보해야 하며 재검증이 가능하여야 한다. 고대 DNA를 대상으로 하는 모든 프로젝트를 수행함에 있어서 연구자는 반드시 단 시간 내에 생물학적으로 직면한 여러 가지 문제(심각한 오염, DNA의 손상 등) 대하여 명확히 이해하여야 한다. 또한 그 문제를 현명하게 해결하기 위해서 어떤 방법과 기준으로 고대 DNA의 분석을 수행할 것인가를 결정하는 것이 매우 중요하다. 선사시대 묘지에서 발견된 인골에서 유전자분석을 하고자 하는 연구자는 인골의 DNA에서 얻을 수 있는 정보가 매우 적다는 사실을 미리 깨달아야 하며, 설명 DNA가 증폭되고 염기서열이 동정되었다 하더라도 DNA 오염이라는 심각한 문제를 해결하고 고유의 염기서열임을 명백히 증명할 수 있어야 한다. 고대 DNA 연구에서 많은 연구자들이 의지하고 있는 PCR 방법은 미생물과 토양성분, DNA의 화학적 손상으로 인하여 많은 오류와 부정확한 결과를 나타내는 것이 일반적이다. 따라서 고대 DNA의 분석을 수행하는 연구자는 자신이 수행하고 있는 모든 실험과정과 결과에 대하여 의심을 갖고 면밀하고 냉정하게 판단할 수 있어야 한다. 그것이 고대 DNA의 연구에 있어 성공적인 결과를 도출하는 지름길이다. 고대 DNA의 연구를 위하여 제시된 기준들은 결과의 타당성을 확보하기 위해 최소한 갖추어야 할 기본적인 지침에 불과하다. 즉 개별적인 연구 과제에 대하여 예상되는 문제점과 가능성을 추론하고 제시된 검증 기준을 연구과정에 적절히 반영할 때 비로소 연구결과가 논리적으로 인정될 것이다. 고대 DNA의 분석은

고대인과 멸종 동식물의 유전자에 대한 원형 복원과 당시 생활상에 대한 정보의 보존을 위한 과학적인 접근을 우리에게 허용하고 있는 유일한 분야이며, 그래서 지금도 고대 DNA를 분석하는 연구자들은 이러한 난관을 극복하기 위하여 도전과 노력을 게을리하지 않고 있다.

참고문헌

- 이규식 · 정용재 · 한성희 · 이명희 · 한면수 · 최동호, 1998, 「출토 인골 유전자 분석」 『보존과학연구』 20권, pp.5~20.
- 서민석 · 이규식, 2004, 「경산 임당동 및 사천 늑도 출토 인골의 유전자 분석」 『보존과학연구』 25권, pp.47~74.
- 서민석 · 정용재 · 이규식 · 박기원, 2003, 「시흥 목감동 출토 인골의 미토콘드리아 DNA와 STR의 유전적 특징」 『보존과학연구』 24권, pp.153~168.
- Austin J.J. · Ross A.J. · Smith A.B. · Fortey R.A. · Thomas R.H., 1997, 'Problems of reproducibility—does geologically ancient DNA survive in amber—preserved insects?', *Proc. R. Soc. London Ser. B*, v.264, pp.467~474.
- Banerjee M. · Brown T.A., 2004, 'Non-random DNA damage resulting from heat treatment: implications for sequence analysis of ancient DNA', *J. Archaeolog. Sci.*, v.31, pp.59~63.
- Buikstra J. · Beck L. eds., 2006, 'Bioarchaeology: the Contextual Study of Human Remains' Elsevier
- Burger J. · Rosendahl W. · Loreille O. · Hemmer H. · Eriksson T., et al, 2004, 'Molecular phylogeny of the extinct cave lion *Panthera leo spelaea*', *Mol. Phylogenet. Evol.*, v.30, pp.841~849.
- Cann R.L. · Stoneking M. · Wilson A.C., 1987, 'Mitochondrial DNA and human evolution', *Nature* v.325, pp.31~36.
- Cooper A. · Mourer-Chauvire C. · Chambers G.K. · von Haeseler A. · Wilson A.C. · Paabo S., 1992, 'Independent origins of New Zealand moas and kiwis'. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.89, pp.8741~8744.
- Gilbert M.T.P. · Shapiro B. · Drummond A. · Cooper A., 2005, 'Post-mortem DNA damage hotspots in Bison (*Bison bison*) provide evidence for both damage and mutational hotspots in human mitochondrial DNA', *J. Archaeolog. Sci.*, v.32, pp.1053~1060.
- Greenwood A.D. · Castresana J. · Feldmaier-Fuchs G. · Paabo S., 2001, A molecular phylogeny of two extinct sloths, *Mol. Phylogenet. Evol.*, v.18, pp.94~103.
- Hagelberg E. · Sykes B. · Hedges R., 1989, 'Ancient bone DNA amplified' *Nature*, v.342, pp.485.

- Hansen A. · Willerslev E. · Wiuf C. · Mourier T. · Arctander P., 2001, 'Statistical evidence for miscoding lesions in ancient DNA templates', *Mol. Biol. Evol.*, v.18, pp.262~265.
- Higuchi R. · Bowman B. · Freiberger M. · Ryder O.A. · Wilson A.C., 1984, 'DNA sequences from the quagga, an extinct member of the horse family', *Nature*, v.312, pp.282~284.
- Hofreiter M. · Jaenicke V. · Serre D. · Haeseler Av. · Paabo S., 2001a, 'DNA sequences from multiple amplifications reveal artifacts induced by cytosine deamination in ancient DNA', *Nucleic Acids Res.*, v.29, pp.4793~4799.
- Hofreiter M. · Serre D. · Poinar H.N. · Kuch M. · Paabo S., 2001b, 'Ancient DNA', *Nat. Rev. Genet.*, v.2, pp.353~359.
- Hoss M. · Dilling A. · Carrant A. · Paabo S., 1996a, 'Molecular phylogeny of the extinct ground sloth *Mylodon darwini*', *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.93, pp.181~185.
- Hoss M. · Jaruga P. · Zastawny T.H. · Dizdaroglu M. · Paabo S., 1996b, 'DNA damage and DNA sequence retrieval from ancient tissues', *Nucleic Acids Res.*, v.24, pp.1304~1307.
- Kemp B.M. · Malhi R.S. · McDonough J. · Bolnick D.A. · Eshleman J.A. · Rickards O. · Martinez-Labarga C · Johnson J.R. · Lorenz J.G. · Dixon E.J. · Fifield T.E. · Heaton T.H. · Worl R. · Smith D.G., 2007, 'Genetic analysis of early holocene skeletal remains from Alaska and its implications for the settlement of the Americas', *Am J Phys Anthropol.* v.132, pp.605-621.
- Kivisild T. · Tolk H.V · Parik J. · Wang Y. · Papiha S.S. · Bandelt H.J. · Villems R., 2002, 'The emerging limbs and twigs of the East Asian mtDNA tree', *Mol. Biol. Evol.*, v.19, pp.1737~1751.
- Larsen C.S., 1997, 'Bioarchaeology: interpreting behavior from the human skeleton' Cambridge University Press
- Lindahl T., 1993, 'Instability and decay of the primary structure of DNA', *Nature*, v.362, pp.709~715.
- Logan G.A. · Smiley C.J. · Eglinton G., 1995, 'Preservation of fossil leaf waxes in association with their source tissues, Clarkia, Northern Idaho, USA', *Geochim. Cosmochim. Acta*, v.59, pp.751~763.
- Malhi R.S. · Kemp B.M. · Eshleman J.A. · Cybulski J. · Smith D.G. · Cousins S. · Harry H., 2007, 'Mitochondrial haplogroup M discovered in prehistoric North Americans', *J. Archaeolog. Sci.*, v.34, pp.642-648.

- Malmstrom H. · Stora J. · Dalen L. · Holmlund G. · Gotherstrom A., 2005, 'Extensive human DNA contamination in extracts from ancient dog bones and teeth', *Mol Biol Evol.*, v.22, pp.2040-2047.
- Orlando L. · Bonjean D. · Bocherens H. · Thenot A. · Argant A., et al, 2002, 'Ancient DNA and the population genetics of cave bears (*Ursus spelaeus*) through space and time', *Mol. Biol. Evol.*, v.19, pp.1920-1933.
- Paabo S., 1985, 'Molecular cloning of ancient Egyptian mummy DNA', *Nature*, v.314, pp.644-645.
- 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.*, v.38, pp.645-679.
- Paxinos E.E. · James H.F. · Olson S.L. · Sorenson M.D. · Jackson J. · Fleischer R.C., 2002, 'mtDNA from fossils reveals a radiation of Hawaiian geese recently derived from the Canada goose (*Branta canadensis*)', *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.99, pp.1399-1404.
- Pergams O.R.W. · Barnes W.M. · Nyberg D., 2003, 'Rapid change in mouse mitochondrial DNA', *Nature*, v.423, p.397.
- Poinar H.N. · Cano R.J. · Poinar G.O., 1993, 'DNA from an extinct plant', *Nature*, v.363, p.677.
- Schaaper R.M. · Kunkel T.A. · Loeb L.A., 1983, 'Infidelity of DNA-synthesis associated with bypass of a purinic sites', *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.80, pp.487-491.
- Serre D. · Langaney A. · Chech M. · Teschler-Nicola M. · Paunovic M., et al, 2004, 'No evidence of Neandertal mtDNA contribution to early modern humans', *PLoS Biol.*, v.2, pp.313-317.
- Soltis P.S. · Soltis D.E. · Smiley C.J., 1992, 'An rbcL sequence from a Miocene *Taxodium* (Bald Cypress)', *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.89, pp.449-551.
- Schurr T.G., 2000, 'Mitochondrial DNA and the peopling of the New World', *American Scientist*, v.88, pp.246-253.
- Tamm E. · Kivisild T. · Reidla M. · Metspalu M. · Smith D.G. · Mulligan C.J. · Bravi C.M. · Rickards O. · Martinez-Labarga C. · Khusnutdinova E.K. · Fedorova S.A. · Golubenko M.V. · Stepanov V.A. · Gubina M.A. · Zhadarov S.I. · Ossipova L.P. · Damba L. · Voevoda M.I. · Dipierri J.E. · Villems R. · Malhi R.S., 2007, 'Beringian

- standstill and spread of Native American founders', *PLoS ONE* v.5, p.e829.
- Thalmann O. · Hebler J. · Poinar H.N. · Paabo S. · Vigilant L., 2004, 'Unreliable mtDNA data due to nuclear insertions: a cautionary tale from analysis of humans and other great apes', *Mol. Ecol.*, v.13, pp.321~335.
- Thomas M.G. · Hageberg E. · Jone H.B. · Yang Z. · Lister A.M., 2000, 'Molecular and morphological evidence on the phylogeny of the Elephantidae', *Proc. R. Soc. London Ser. B.*, v.267, pp.2493~2500.
- Thomas R.H. · Schaffner W. · Wilson A.C. · Paabo S., 1989, 'DNA phylogeny of the extinct marsupial wolf', *Nature*, v.340, pp.465-467.
- Tainer, J.A. · Thayer M.M. · Cunningham R.P., 1995, 'DNA repair proteins', *Curr. Opin. Struct. Biol.*, v.5, pp.20~26.
- Vanderkuyl A.C. · Kuiken C.L. · Dekker J.T. · Perizonius W.R.K. · Goudsmit J., 1995, 'Nuclear counterparts of the cytoplasmic mitochondrial 12S ribosomal-RNA gene—a problem of ancient DNA ad molecular phylogenies', *J. Mol. Evol.*, v.40, pp.652~657.
- Woodward S.R. · Weyand N.J. · Bunnell M., 1994, 'DNA sequence from Cretaceous period bone fragments', *Science*, v.266, pp.1229~1232.
- Zischler H. · Hoss M. · Handt O. · von Haeseler A. · van der Kuyl A.C. · Goudsmit J., 1995, 'Detecting dinosaur DNA', *Science*, v.268, pp.1192~1193.

Abstract**Analysis and Verification of Ancient DNA**

Jee Sang-hyun · Seo Min-seok

(National Research Institute of Cultural Heritage)

The analysis of ancient DNA (aDNA) has become increasingly considerable anthropological, archaeological, biological and public interest. Although this approach is complicated by the natural damage and exogenous contamination of aDNA, archaeologists and biologists have attempted to understand issues such as human evolutionary history, migration and social organization, funeral custom and disease, and even evolutionary phylogeny of extinct animals. Polymerase chain reaction(PCR) is powerful technique that analyzes DNA sequences from a little extract of an ancient specimen. However, deamination and fragmentation are common molecular damages of aDNA and cause enzymatic inhibition in PCR for DNA amplification. Besides, the deamination of a cytosine residue yielded an uracil residue in the ancient template, and results in the misincorporation of an adenine residue in PCR. This promotes a consistent substitution (cytosine thymine, guanine adenine) to original nucleotide sequences. Contamination with exogenous DNA is a major problem in aDNA analysis, and causes oversight as erroneous conclusion. This report represents serious problems that DNA modification and contamination are the main issues in result validation of aDNA analysis. Now, we introduce several criterions suggested to authenticate reliance of aDNA analysis by many researchers in this field.

Keywords : ancient DNA, DNA damage, deamination, contamination, PCR