

사천 및 경산 출토 인골의 미토콘드리아 DNA 분석

서민석 · 송철용*

국립문화재연구소 보존과학연구실, *중앙대학교 생명과학과

Mitochondrial DNA Analysis of an Ancient Human Bones Excavated in Sachon and Gyongsan

Min Seok Seo and Chul Yong Song*

Conservation Science Division, National Research Institute of Cultural Properties

*Department of Life Science, Chung-Ang University

1. 서론

미토콘드리아 DNA(mitochondrial DNA, mtDNA)는 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). 본 연구는 고대 한반도 거주 인류의 유전적 특징을 밝히기 위하여 사천시 늑도와 경산시 임당동에서 출토된 인골을 대상으로 mtDNA 고도 과변이 지역 I과 II에서 염기서열의 다형현상을 관찰하였다. 이러한 주요 발굴지에서 출토된 인골을 이용하여 과거에 매장되었던 한반도 거주민 mtDNA의 유전적 변이 양상을 표준 서열과 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.

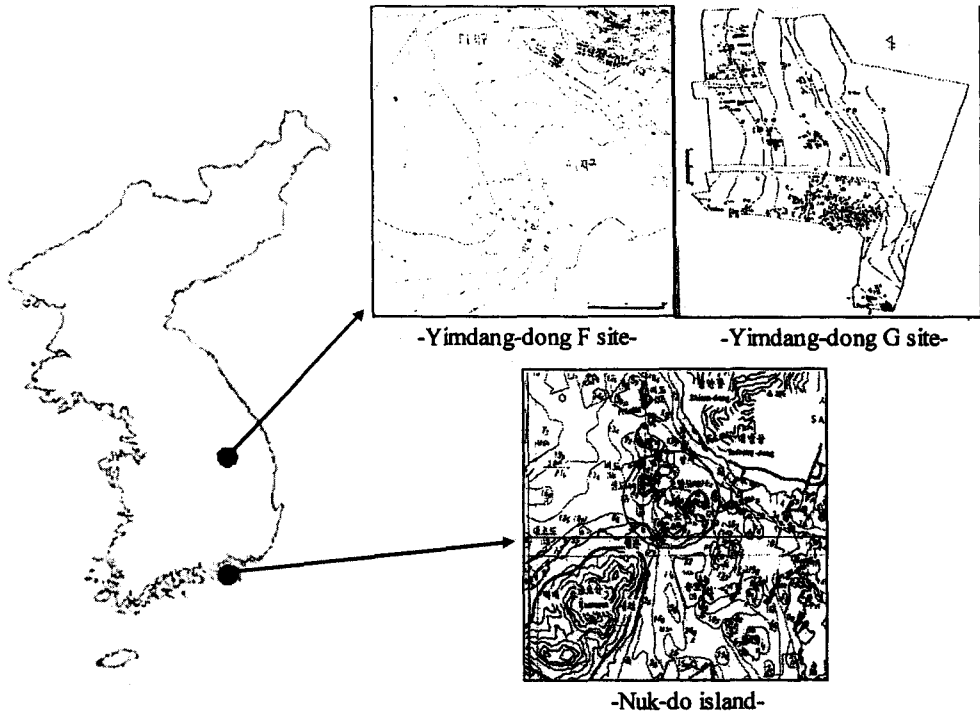


Fig. 1. Maps of Nuk-do and F, G site from Yimdang-dong remains.

2. 재료 및 방법

2.1. 시료

경상남도 사천시 늑도에서 2년('98~'99) 동안 동아대학교 박물관에서 출토한 인골 18구와 경상북도 경산시 임당동에서 2년('96~'97년) 동안 영남문화재연구원출토한 인골 48구를 시료로 사용하였다. 발굴지에서 출토된 유물(토기, 장신구, 의류)과 인골의 형태적 구분을 통하여 이미 검증되어 있는 연대를 사용하였다. DNA를 추출하기 위해 인수 받은 인골 시료는 -70°C에 냉동 보관하여 실험에 사용하였다.

2.2. DNA 추출

탈칼슘화가 이루어진 시료의 DNA 추출은 QIAamp DNA Mini kit(Qiagen, Germany)를 사용하였다. 키트(Kit)를 사용하기에 앞서 탈칼슘화가 이루어진 인골 분말에 0.5 M EDTA용액 0.5 ml, 10% SDS용액 20 μ l, 그리고 단백질 분해효소 K(10 mg/ml) 용액을 40 μ l 첨가하여 37°C에서 12시간 동안 혼합하면서 반응시켰다. 그 후 제반 실험과정은 키

Table 1. Primer sequence used for amplification of HV I and HV II in mtDNA of ancient human bone excavated in Korea

	Primer	Sequence
HV I	L15971	5'-TTA ACT CCA CCA TTA GCA CC-3'
	H16258	5'-TGG CTT TGG AGT TGG AGT TG-3'
HV II	L00015	5'-CAC CCT ATT AAC CAC TCA CG-3'
	H00389	5'-CTG CTT AGG CTG GTG TTA GG-3'

트에 제시한 방법에 따라 동일하게 실시하였다.

2.3. 중합효소 연쇄반응

순수하게 정제된 시료의 DNA는 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR) 증폭반응의 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.

2.4. 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 µl를 사용하여 반응용액과 함께 총 10 µl의 양으로 반응하였다. 반응조건은 초기에 95°C 2분, 그리고 94°C 10초, 50°C 5초, 60°C 4분을 기준으로 총 25회 반응시켰다. 각 주형은 HV I의 시발체인 L15971과 H16258, 그리고 HV II의 시발체인 L00015와 H00389를 이용하여 양방향으로 염기서열 분석을 실시하였다.

2.5. 계통학적 분석

본 실험에서는 DNA 염기서열 데이터 분석 컴퓨터 프로그램인 Vector NTI Suite Align X(InforMax, USA)를 사용하여 염기서열의 통합정렬, 유사도 및 계통도를 작성하였다.

3. 결과 및 고찰

늑도 인골 18구 중 10구에서 HV I과 II의 염기서열, 그리고 임당동 인골 48구 중 30구(HV I)와 35구(HV II)에서 염기서열이 분석되었으며, HV I의 염기부위 16041에서 16258까지, 그리고 HV II의 70에서 340까지 염기서열을 Anderson 등(1981)의 표준 염기서열과 비교 분석하였다. 그 결과 HV I은 19개, HV II는 38개의 염기변화가 차이를 보였는데, 이는 고도 과변이 조절지역에 고른 분포되어 있으나 염기에 따라서는 다양한 차이를 보였다. 또한 과도 변이 조절지역의 변이가 삽입(insertion), 결실(deletion) 및 전이(transition)보다 전환(transversion)이 90%이상 높게 나타났다.

고도 과변이 조절지역 HV I 중 염기 16,051, 16,150, 16,172, 16,223번과 HV II 중 73, 263번 염기변화가 인골 51구 중 90%이상 차지했으며, 늑도 인골 2구(N-4, N-9), 그리고 임당동 인골 8구(F-41, F-65, G-29, 과 G-31, G-51, G-76, G-80, G-113)에서 동일한 염기서열을 보였다.

HV I의 염기 16183번이 A에서 C로, 16,189번이 T에서 C로 치환되어 11개의 시토신

Table 2. 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	106(6)	
	T→C	18(3)	
	C→T	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)	

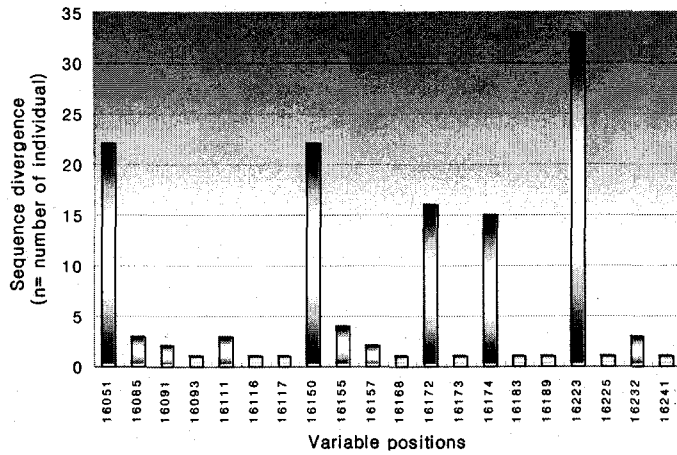


Fig. 2. Number and distribution of polymorphic positions in the human mitochondrial control region HV I among 51 individuals from bone and teeth of ancient Koreans. X-axis: Nucleotide position in the control region. Y-axis: Number of individuals who show certain deviation from the Anderson sequence.

(cytosine)이 배열되는 현상이 임당동 인골 1구(F-70)에서 확인하였고, HV II의 경우 312와 315번 염기배열 사이에 시토신이 삽입되어 6개의 C가 배열되는 현상을 시료 중 2구(N-2와 G-31)를 제외한 시료(98%)에서 동일한 결과를 보였다. 또한 인골 1구 당 6개 내지 8개의 염기 치환, 삽입 또는 결실이 전체 54%를 보였으며, 최고 13개의 염기가 치환된 것

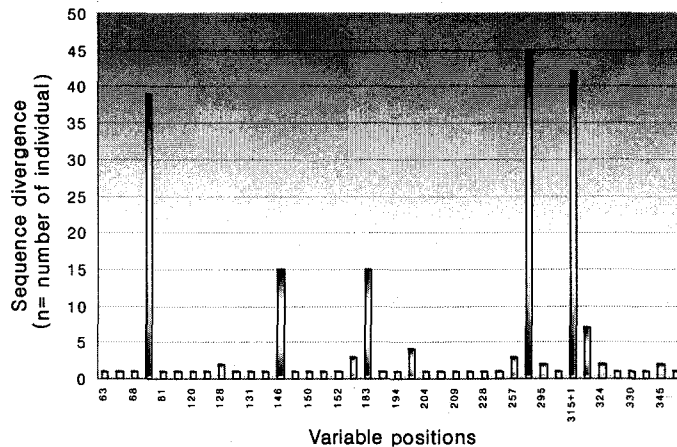


Fig. 3. Number and distribution of polymorphic positions in the human mitochondrial control region HV II among 51 individuals from bone and teeth of ancient Koreans. X-axis: Nucleotide position in the control region. Y-axis: Number of individuals who show certain deviation from the Anderson sequence.

Table 3. 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.

은 단 1구에서 확인되었다.

인골의 염기서열을 현존하는 일본인 및 중국인을 각각 비교한 결과, 염기서열은 모두 전환보다 이행이 각각 인골(90.3%), 일본인(88.0%), 중국인(89.0%)로 높았으며, 특히 인골이 C가 T로 치환이 58.3%로 일본인(36.7%)과 중국인(35.6%)보다 높게 나타났다.

염기 16183번은 A에서 C로, 16189번은 T에서 C로 치환되는 각각의 현상은 현존하는 한국인(A→C 21.7%, T→C 30.0%), 일본인(A→C 29.5%, T→C 37.7%), 중국인(A→C 21.7%, T→C 30.0%)에서 공통적으로 높게 나타났으나, 분석된 모든 인골에서 단 1구(2.0%)만이 위와 동일한 치환을 보였다.

또한 조사된 염기서열 결과를 현존하는 서양인(Caucasian)과 비교한 결과, 염기 16223번이 C에서 T로 치환되는 현상이 분석된 인골(64.7%) 뿐 아니라, 현존하는 한국인(75%), 일본인(73.8%), 중국인(62.5%)에서 공통적으로 높은 비율을 차지하였으나 서양인은 낮은 비율(10%)을 보였다. 따라서 16223 염기는 동북아시아 민족들의 특이 유전자임을 확인할 수 있었다.

Vector NTI DNA suite 컴퓨터 프로그램을 이용한 인골의 계통수 작성한 결과, 각 지역의 인골들은 모계 유전과 관련된 근연관계가 성립되었다. 또한 늑도 인골 2구(N-2와 N-5)의 염기서열을 이용하여 동남아시아인, 동북아시아인, 서유럽인, 시베리아인의 미토콘드리아 계통수를 작성한 결과, N-2는 서부 시베리아인과 유연관계가 보였지만, N-5는 동남아 계열인 인도네시아인 뿐만 아니라 중국 남서부의 윈난성 지역 주민과 유연관계가 높은 것을 확인하였다.

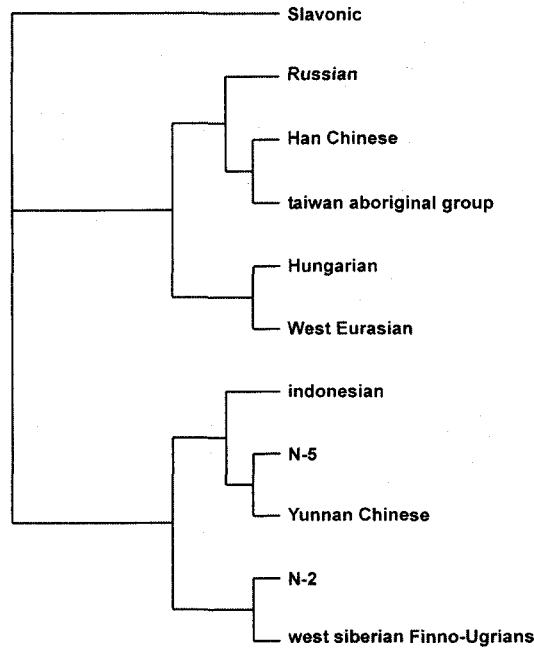


Fig. 4. Phylogenetic tree for 10 human population with human mtDNA. N-2 and N-5 are ancient human from Nuk-do prepared in this study.

이상의 결과를 종합한 결과, 고대 한반도 거주인의 mtDNA 고도 과변이 지역 I과 II의 염기서열을 분석하여 유전적 변이 양상과 특성을 알 수 있었다. 또한 mtDNA 염기서열을 계통학적으로 분석한 결과, 현존하는 동남아 및 시베리아 민족들과의 연관관계 및 고대 한반도 거주인의 모계 유전과 관련 있는 것으로 확인되었다. 이는 앞으로 민족의 기원과 인류 이동을 밝히는 기초 자료가 될 뿐 아니라 역사적 기록을 증명하는 귀중한 자료가 될 것으로 생각된다.

참고문헌

- 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.
- Cann, R.L., M. Stoneking, and A.C. Wilson. 1987. Mitochondrial DNA and human evolution. *Nature.* 325: 31-36.
- Paabo, S. 1989. Ancient DNA: extraction, characterization, molecular cloning, and enzymatic amplification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 1939-1943.
- Melton, T., M. Wilson, M. Batzer, and M. Stoneking. 1997. Extent of heterogeneity in mito-

- chondrial DNA of European populations. *J. Forensic Sci.* 42: 437-446.
- 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.
- 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.
- 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.
- Hagelberg, E., B. Sykes, and R. Hedges. 1989. Ancient bone DNA amplified. *Nature.* 342: 485.
- Hagelberg, E., and J.B. Clegg. 1991. Isolation and characterization of DNA from archaeological bone. *Proc. R. Soc. Lond. [B].* 244: 45-52.
- 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.
- Kings, M. 1997. Neandertal DNA sequences and the origin of modern humans. *Cell.* 90: 19-30.
- 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.