

몽골 출토 옛사람 뼈와 치아에서 유전자 분석을 이용한 혈연관계조사

문호체책 바좌라그좌, 김기정, 김재현¹, 가와치멘 르학와수렝², 박애자³,
이광호⁴, 김대진⁵, 정윤희⁵, 김성수⁵, 이원복⁵, 김경용⁵

중앙대학교 의과대학 미생물학교실, ¹동아대학교 인문과학대학 고고미술사학과,

²중앙대학교 대학원 문화재과학과, ³중앙대학교 의과대학 진단검사의학과,

⁴중앙대학교 자연과학대학 생명과학과, ⁵중앙대학교 의과대학 해부학교실

간추림 : 몽골의 2000년 전의 한 고분군에서 발굴된 세 예의 옛사람뼈와 치아를 대상으로 유전자 분석을 이용해 혈연관계를 조사하였다.

각각의 옛사람에서 채취한 뼈와 치아의 처리는 오염방지시설인 청정실험실에서 실행하여 현대인 DNA에 의한 오염을 방지하였다. 핵산추출의 방법으로 ion-exchange column kit (Qiagen G-tip 20G, USA)를 이용하였다. 분리 정제한 옛사람뼈와 치아의 핵산에서 부계 반수체군(haplogroup), 모계 반수체군, 그리고 보통염색체 다형성표지자인 short tandem repeat (STR)을 대상으로 중합효소반응(polymerase chain reaction, PCR)을 하였다.

두 예에서 모계는 모두 D형이었으며, D형은 특히 현대 동북아시아지역에 흔한 유형 중의 하나였다. 이중 한 사람은 남성으로 부계는 C형으로 역시 현대 동북아시아 지역에 흔한 유형 중의 하나였다. 나머지 한 사람은 다른 두 사람의 것과는 달리 현대 유럽에서 가장 흔한 R형의 부계, 유럽과 동부지중해연안에 나타나는 U형의 모계이었다. 보통염색체 STR의 반복된 결과들이 동일한 값을 보여줘 DNA-VIEW 프로그램 (<http://www.dna-view.com>)을 이용해 STR 분석하였다. 두 예에서 모계의 반수체군은 같았으나, 세 예의 옛사람들 사이에 가까운 혈연관계는 없는 것으로 나타났다.

본 연구자들은 극히 일부의 연구자에서만 가능했던 옛사람뼈와 치아 DNA에서 보통염색체 STR의 연구의 가능한 방법을 이 연구를 통해 밝히고, 이 분야의 많은 연구자들이 보다 나은 연구결과를 도출해 낼 수 있기를 기대한다.

(2009년 8월 27일 접수, 2009년 10월 8일 수정접수, 2009년 11월 6일 게재승인)

찾아보기 낱말 : 옛사람뼈와 치아, STR, DNA, PCR, 혈연관계

서 론

몽골지역은 기원전부터 흉노제국의 중심부로 자리를 잡고 있었으며 그 영향력은 흉노제국의 멸망 시기인 기원후 1세기 후에도 지속되어 약 1600년 전까지 계속되었다(Ochir 2007). 흉노제국은 문자가

존재하지 않았기 때문에 역사적 자료는 없으나 중국 등의 주변국가의 사료에 나타나는 자료를 바탕으로 일부 이해되고 있다. 흉노제국의 인적구성은 다민족국가라는 것이 지배적이나, 그 직접적인 증거는 뚜렷하게 밝혀지고 있지 않다(Popova 등 2007). 저자들은 몽골의 한 고분군에서 발굴된 흉노제국시대의 세 예의 옛사람뼈와 치아를 대상으로 부계 및 모계의 반수체군과 혈연관계를 조사하였다.

옛사람에 관한 유전자정보는 최근 발전하고 있는

*이 논문은 2007년도 중앙대학교 학술연구비 지원에 의한 것임.
교신저자: 김경용 (중앙대학교 의과대학 해부학교실)
전자우편: skull@cau.ac.kr

옛사람뼈를 대상으로 하는 유전자분석법들을 활용하게 되면서 점차 밝혀지고 있다(Kim 등 2008). 유적지에서 발굴된 옛사람뼈에서 DNA의 보존상태는 환경적인 요인에 의해 크게 좌우된다(Burger 등 1999). 일반적으로 유적지에 남아 있는 사람의 시신은 뼈와 치아 같은 단단한 조직이며, 치아는 최악의 환경에서도 사람의 몸에서 온전히 보존될 수 있는 가장 견고한 조직이다(Ginther 등 1992, Alvarea 등 1996).

사람 DNA에서 유전자형을 비롯한 다형성표지자인 short tandem repeat (STR)은 사람유전학과 법의학에서 폭넓게 사용되어 오고 있다. 최근 급속히 발전한 분자생물학적 기법들은 의학을 포함한 생명과학 분야에서 유전학적 분석을 가속화시켰으며, 근래에 와서 이 방법은 고고학적 가설이나 역사적 이론을 인류학적 그리고 유전학적 증거와 함께 비교하여 역사인류학에 더욱 정확한 자료를 제공하고 있다. 따라서 체질인류학자들을 포함하는 많은 분야에서 고대 생명체의 잔재물로부터 유전정보를 획득하고자 하는 시도들이 끊임없이 진행되고 있다(Kacastle과 Horsburgh 2002). 인류학, 고고학, 범죄 수사학, 진화학 등의 분야에서도 흔히 단순 형질학적 기초만으로는 분명한 결론에 도달할 수 없을 때, 보다 자연과학적이고 심층적인 유전학적 증거를 제시할 수 있는 훌륭한 대체 또는 보충적 도구를 제공한다(Kim 등 2008).

현대인의 유전정보 분석에 의존해서 지난 과거의 정보를 유추할 때 발생할 수 있는 인류의 계통발생학적 결론의 오류, 편차, 왜곡 또는 모호성 등을 극복하는 데 옛사람뼈 DNA에서 얻은 정보들은 중요한 역할을 한다(O'Rourke 등 2000). 옛사람뼈의 DNA를 연구할 때의 가장 큰 주의점은 옛사람 자체의 DNA가 아닌 미생물이나 현대인 등 외부에서 유래된 DNA에 오염이 될 위험이 있다는 것이다(Calacal과 De Ungria 2005, Kemp와 Smith 2005, Hunter 2006). 오염된 DNA에 대한 결과의 도출에 대해 유의해야 하며, 이미 많은 학자들이 밝힌 바와 같이 옛사람뼈 DNA를 연구하는 데 필요한 주의사항들을 따라야 한다(Bar 등 2000, Hofreiter 등 2001, Car-

PELLI 등 2003, Alonso 등 2004).

옛사람뼈를 대상으로 한 혈연관계 연구는 지금까지 세계적으로 극히 일부의 제한된 학자에게서만 가능하였다. 본 논문에서는 옛사람뼈에서 부계 및 모계 반수체군 분석과 보통염색체 STR 분석이 성공하여 혈연관계의 분석이 가능하였으므로 방법과 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

1. 옛사람뼈와 치아의 탈오염처리 및 오염방지

재료는 몽골의 같은 고분군에서 출토된 세 개의 옛사람뼈와 치아에서 채취한 표본을 대상으로 하였다. PCR 전처리실에서 약 3g 정도의 뼈조각을 2~4개로 조각내어 대조군을 제외한 실험군은 고온습윤멸균한(121°C, 15분) 사포로 뼈 표면을 1~2mm 깎아 내었다. 이후의 과정은 다시 고압습윤멸균한 3차 증류수로 5분간 각 3회 세척하였다. 뼈조각들은 차하염소산나트륨(5.4%, w/v)에 30분 처리하고, 청정실(Clean room)로 반입하였다. 청정실에서 다시 세척한 후, UV 소독기(254 nm)에서 12시간 소독 후 뼈조각을 뒤집어 다시 12시간 소독하였다. 시료가 들어 있는 시험관들을 액체 질소에 10분간 담근 후 Mixer Mill MM301 시료파쇄기(Retsch, Germany)를 이용하여 고운 분말을 얻었다.

실험과정에서 일어날 수 있는 오염을 최소화 하기 위하여 세 개의 독립적인 실험실, 즉 실험실은 PCR 전처리실, 청정실, PCR 후처리실로 구분하여 설치하였다. PCR 전처리실에서는 고인골의 표면처리, 절단, 세척과정을 처리하였고, 청정실에서는 고인골의 UV소독, 골분말의 제작, 고인골 DNA의 분리와 정제과정이 이루어 졌다. PCR 후처리실에서는 PCR 반응이 이루어졌다. 이중에서 청정실이 가장 중요한 요소로 HEPA필터를 통해 외부공기가 유입되어 실험실내는 항상 양압이 형성되어 오염된 외부공기의 유입을 차단하였다. 또한 실험자가 없을 경우에는 UV 등이 켜져 실내를 살균하도록 하였으며, 실험자는 모두 마스크, 방진복, 장갑, 방진모, 방진신발, 보호

면을 착용하도록 하였다. 모든 실험기구와 실험용액은 고압멸균하였으며, 플라스틱기구는 사전에 멸균된 것을 구입하여 멸균되지 않은 것들은 실험실내로 가지고 들어오지 못하도록 하였다. 실험과정 중 오염의 여부를 판단하기 위하여 항상 추출음성대조군을 DNA 분리와 정제과정 및 PCR에 포함시켰다.

2. DNA 추출과 정제

DNA 추출 방법으로 ion-exchange column kit (Qia-gen G-tip 20G, USA)를 이용하였다. QIAquick[®] spin column (Quigen, USA)과 ion-exchange column을 이용한 DNA 추출과정은 다음과 같다. 사람의 칼슘을 제거하기 위하여 3g의 뼈분말을 멸균 50 mL 폴리프로필렌 시험관에 옮기고 pH 8.0, 40 mL 0.5 M EDTA를 가하였다. 시험관을 24시간 동안 느린 속도로 회전시키며 실온에 방치하였다. 시료를 2,000 ×g에서 15분 원심분리하고 상청액을 제거하였다. 이와 같은 탈칼슘과정을 3회 반복하였다. 칼슘이 제거된 시료에 15 mL의 DNA 용출 완충액 (20 mM EDTA pH 8.0, 50 mM Tris HCl pH 8.0, 1% sodium dodecyl sulfate, 0.1 M NaCl, 0.5 mg/mL proteinase K)을 가하고 55°C에서 12시간 느린 속도로 진탕하며 방치하였다. 동량의 페놀 클로로포름 이소아밀알코올 (25 : 24 : 1, v/v/v)을 첨가하고 섞은 후 원심분리하여 상청액을 모았고 상청액에 동량의 클로로포름 이소아밀알코올 (24 : 1, v/v)을 가하고 섞은 후 원심분리하여 상청액을 모았다.

상청액을 Amicon[®] Ultra PL-30 filters (Millipore, USA)을 이용하여 400 µL로 농축하였다. 농축액 절반 (200 µL)은 QIAquick[®] spin column (Quigen, USA)을 이용하여 제조사 제공 방법에 따라 DNA 정제를 시행하였으나 마지막 DNA 회수는 100 µL의 EB 완충액을 이용하였다. 나머지 절반의 농축액은 Qiagen G-tip 20G 컬럼을 이용하여 제조사 제공 방법을 조금 변경하여 정제하였다. 간단히 말하자면, 200 µL 농축액에 6 mL QBT 완충액을 섞고 이 완충액으로 평형화시킨 위 컬럼에 중력을 이용하여 통과시켰다. 컬럼을 15 mL QC 완충액으로 세척한 다음 6 mL QF

완충액으로 DNA를 용출시켰다. 용출액을 Amicon[®] Ultra PL-30 filters (Millipore, USA)를 이용하여 세척과 농축을 시행하였다.

3. 사립체 유전자 (mitochondrial DNA, mtDNA) 및 Y 염색체 단일염기다형성 (single nucleotide polymorphism, Y-SNP)의 PCR

실험에 사용한 부계와 모계의 primer 염기서열은 Table 1과 2와 같다. 모계유전을 확인하기 위해 사립체 DNA의 D-loop 중, 과변이부위 1 (hypervariable region 1, HV1)을 대상으로 하였다. 부계유전을 확인하기 위해 Y 염색체에서 X 염색체와 결합되지 않는 부위 (non-recombining region of Y chromosome)를 대상으로 하였다. PCR을 위한 기기로서 GeneAmp[®] 9700 (Applied Biosystems, USA) 장치를 사용하였고 반응 부피는 20 µL이었다. 1 × AmpliTaq Gold[®] 완충액, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP, 1 M, 0.8 µ AmpliTaq[®] Gold 중합효소, 0.625 mg/mL BSA와 멸균 증류수를 사용하였다. 검체 DNA는 4 µL 양을 실험에 이용하였다. 증폭주기조건은 95°C에서 10분간 1주기, 95°C 30초, 60°C 30초, 72°C 1분의 40주기, 72°C에서 7분의 1주기로서 구성하였다. PCR 증폭산물 확인은 반응물 5 µL를 브롬산 에티디움 (ethidium bromide)이 포함된 1.5% 아가로스 젤을 이용한 전기영동 분석법에 의하여 이루어졌다.

4. DNA 염기서열 분석

PCR 증폭산물의 염기서열을 확인하기 위해 증폭산물을 AccuPrep[®] PCR Purification kit (바이오니아, 대한민국)를 이용하여 정제하였고 Big Dye terminator Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, USA)와 ABI PRISM_s 3700 DNA 분석기 (Applied Biosystems, USA)를 이용하여 염기서열을 결정하였다.

5. 보통염색체 STR의 PCR

보통염색체 다형성표지자인 STR은 AmpFISTR[®] Minifiler[™] PCR Amplification Kit (Applied Biosys-

Table 1. Primers for the amplification of mtDNA HV1, HV2 and some coding regions

Regions ^a	Primer name ^b	Sequence (5'→3')	AT (°C) ^c	Size (bp)	Reference
5055-5324 (D)	F5047	TTCTACCGTACAACCCTAACATAAC	57	286	Present study
	R5313	AGGAGGGTGATGGTGGCTAT			
	FN5055	TACAACCCTAACATAACCATTCTTA	57	270	Present study
	RN5324	GATGGTGGCTATGATGGTG			
12243-12458 (U)	F12203	TACCGAGAAAGCTCACAAGAAGCTG	60	264	Present study
	R12447	AGGTGGATGCGACAATGGAT			
	FN12243	TGTCTAACAAACATGGCTTTCTCA	60	216	Present study
	RN12458	GCGACAATGGATTTACATAATGG			

mtDNA haplogroup nomenclature is based on the updated mtDNA haplogroup tree¹⁵

^aNumbers indicate nucleotide positions based on the revised Cambridge reference sequence,¹³ the haplogroup to determine is shown in the parenthesis.

^bF, forward primer; R, reverse primer; N, primers for nested PCR and sequencing; A, sequencing anchor primer in case of failed sequencing reaction due to the presence of a polycytosine tract.

^cAnnealing temperature.

Table 2. Primers for the amplification of Y-SNP markers used in this study

Marker (haplogroup ^a)	Sequence (5'→3')		Size (bp)	Mutation	
	Forward	Reverse		Site	Change
RPS4Y ₇₁₁ (C)	CAGGGCAATAAACCTTGGAT	CCACAAGGGGGGAAAAAACAC	188		
nested	GGGCAATAAACCTTGGATTT	CATTAAGAAACGAGAATTCCTG	167	22	C→T
M207 (R)	ACTATGGGGCAAATGTAAGT	GCTGTTCGCTGCTACGAAT	162		
nested	GGCAAATGTAAGTCAAGCAAGAA	CGCTGCTACGAATCTTTAATCTTA	149	29	A→G

^aY-SNP haplogroup nomenclature used here is based on the revised haplogroup tree.²⁰

Table 3. STR genotypes of 3-repeats in experiment

Samples	Amelo	D13S317	D7S820	D2S1338	D21S11	D16S539	D18S51	CSF1PO	FGA
No. 1	X/X	11/12	12	20/24	31/32.2	9/13	17/21	10/12	22/23
	X/X	11/12	12	20/24	31/32.2	9/13	17/21	10/12	22/23
Consensus profile	X/X	11/12	12	20/24	31/32.2	9/13	17/21	10/12	22/23
No. 2	X/Y	9/11	8	20/25	28.2/38.2	11/14	13/18	11	22
	X/Y	9/11	8	20/25	28.2/38.2	11/14	13/18	11	22
Consensus profile	X/Y	9/11	8	20/25	28.2/38.2	11/14	13/18	11	22
No. 3	X/Y	10/12	10/12	23/24	28/29	10/11	14/15	11	23/25
	X/Y	10/12	10/12	23/24	28/29	10/11	14/15	11	23/25
Consensus profile	X/Y	10/12	10/12	23/24	28/29	10/11	14/15	11	23/25

Table 4. Genotypes of Mongolian ancient samples

Ancient samples	Sample 1	Sample 2	Sample 3
Genotypes (haplogroups)	mt: D	mt: D, Y: C	mt: U, Y: R

mt, mtDNA haplogroup; Y, Y-SNP haplogroup.

tems)를 사용하여 동시에 보통염색체상에서 8개의 STRs (D13S317, D7S820, D2S1338, D21S11,

D16S539, D18S51, CSF1PO, and FGA)과 amelogenin 을 증폭하였다. PCR은 약간의 변형이 있었지만 제조사의 지침대로 하였다. 실험과정을 간략하게 서술 하면 다음과 같다. 증폭은 10 µL의 반응액 (4 µL master mix, 2 µL 프라이머 셋, 옛사람 뼈 DNA 농축액 2~4 µL, 0.5 nM BSA)이 포함되도록 하였다. 증폭조건은 초기변성반응 95°C 11분 1주기 시행하였고, 다음 변성반응은 94°C 20초, 어닐링 59°C 2분, 연

— 몽골 옛사람 혈연관계 —

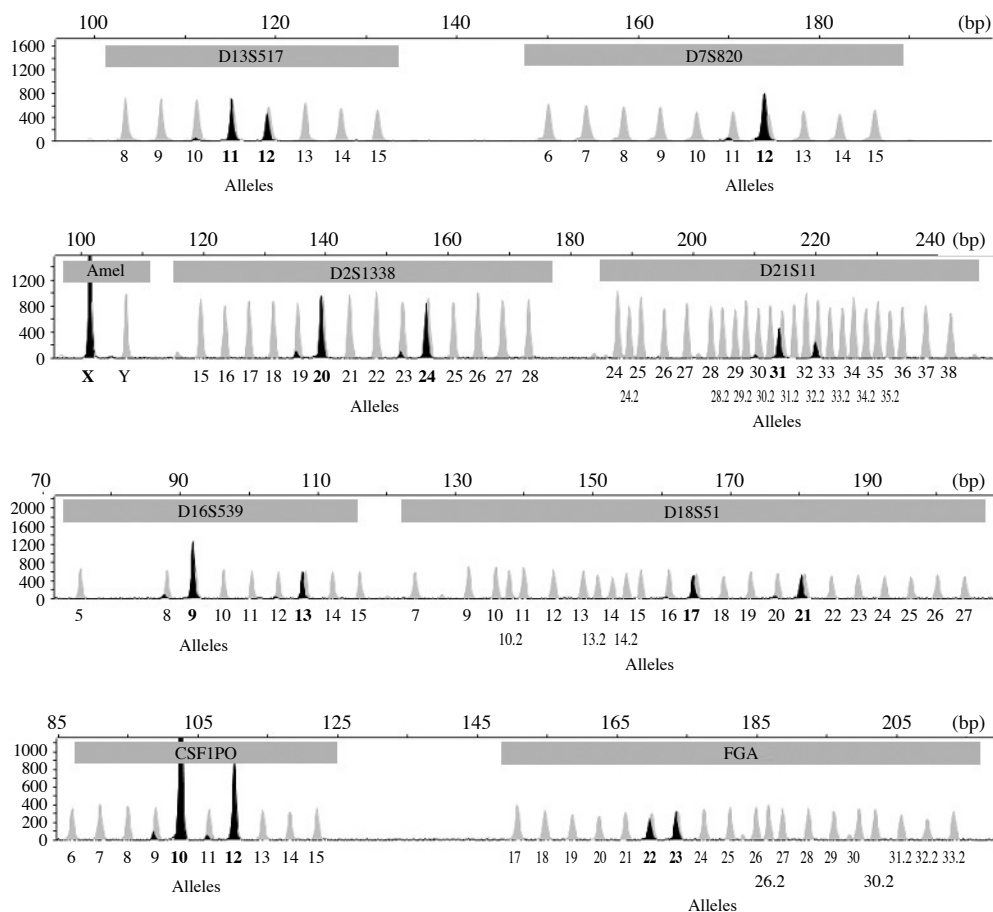


Fig. 1. Allele analysis of nine autosomal STR loci of the ancient Mongolian sample No. 3. Numbers at the bottom of X axis indicate the standard allele ladders and the determined alleles of the sample were shown in bold. Numbers at the top of X axis shows DNA size in base pair (bp). Shaded peaks, standard alleles; solid peaks in black, sample alleles; locus names are shown in shaded boxes.

장반응 72°C 1분으로 구성된 프로그램을 32주기 시행하였다. 마지막으로 60°C 45분 1주기 시행하였다. PCR 산물은 ABI Prism 310 automatic sequencer (Applied Biosystems, USA)로 분석하였다. 독립적인 실험을 3회 반복하여 실험의 신뢰성을 확인하여 대립인자(consensus allele)를 선택하여 분석하였다. 세 옛사람 사이의 혈연관계는 DNA-View 프로그램 (<http://www.dna-view.com>)을 이용하여 분석하였다.

결 과

몽골에서 출토된 옛사람뼈와 치아 세 예에서 혈연관계를 조사하고자 부계와 모계의 반수체군, 보통 염색체의 STR 유전자형 및 amelogenin 유전자를 조사하였다(Tables 3, 4). 표본 1은 오른쪽 정강뼈와 중앙리뼈의 몸통에서 치밀뼈를(Figs. 1, 5), 표본 2는 각기 오른쪽 위 둘째와 셋째 어금니를(Figs. 2, 4, 5),

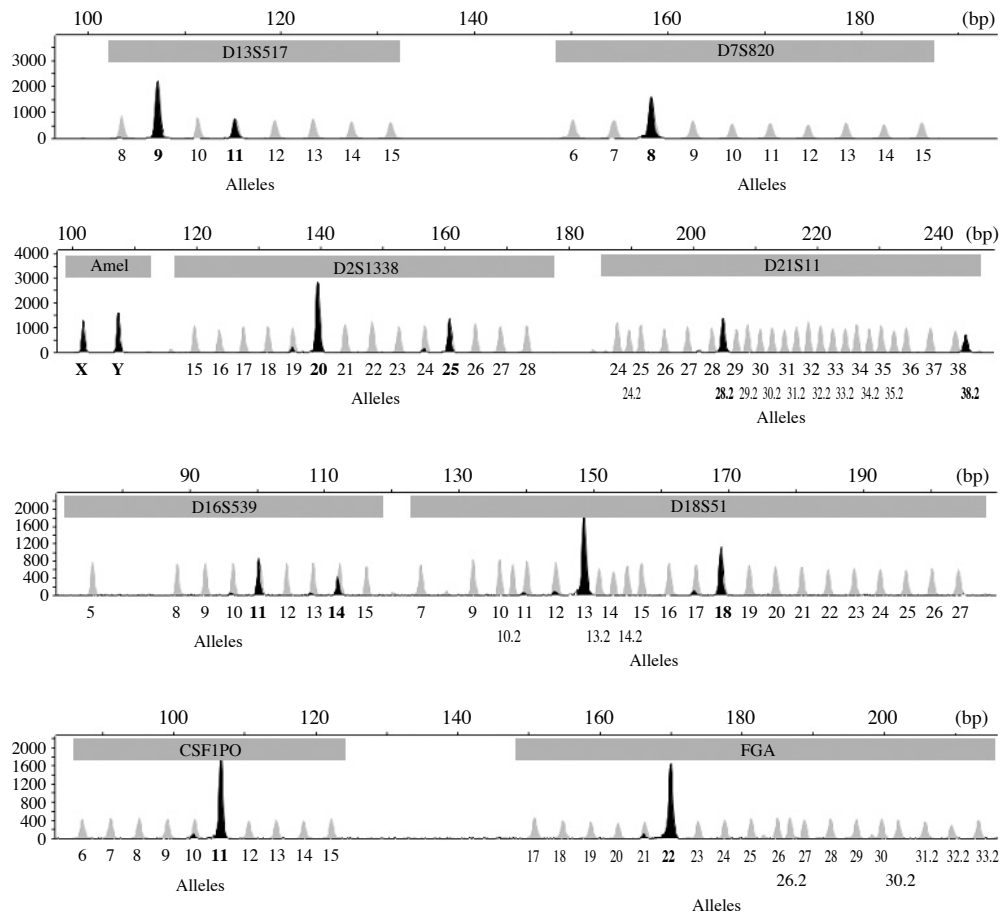


Fig. 2. Allele analysis of nine autosomal STR loci of the ancient Mongolian sample No. 4. Numbers at the bottom of X axis indicate the standard allele ladders and the determined alleles of the sample were shown in bold. Numbers at the top of X axis shows DNA size in base pair (bp). Shaded peaks, standard alleles; solid peaks in black, sample alleles; locus names are shown in shaded boxes.

표본 3은 오른쪽 넙다리뼈의 몸통에서 (Figs. 3, 4, 5) 치밀뼈를 분리해 각기 다른 두 조각으로 나누어 DNA를 추출하여 PCR을 하였다. 각 예에서 추출된 DNA에서 PCR을 3회 반복실험을 하였다. 이를 근거로 각 표본의 STR consensus profile (Table 3)과 부계와 모계의 반수체군을 결정하였다 (Table 4).

표본 1은 여성으로 모계의 반수체군 D형이었다. 표본 2는 남성으로 부계의 반수체군은 C형, 모계의 반수체군은 D형이었다. 표본 3은 다른 두 사람의 것

과는 달리 부계의 반수체군은 R형, 모계의 반수체군은 U형이었다 (Figs. 4, 5, Table 4).

표본 1의 보통염색체 STR 분석결과를 보면 총 3회의 실험에서 동일한 결과를 나타내었다 (Table 3). 실험자 DNA에 의한 오염의 가능성을 배제하기 위해 실험자들의 STR을 조사한 결과 일치하는 것이 없어 결과의 신빙성을 높여 주었다 (Table 5). DNA-VIEW 프로그램을 이용하여 세 예의 혈연관계를 조사한 결과 가까운 혈연관계는 없는 것으로 나타났

— 몽골 옛사람 혈연관계 —

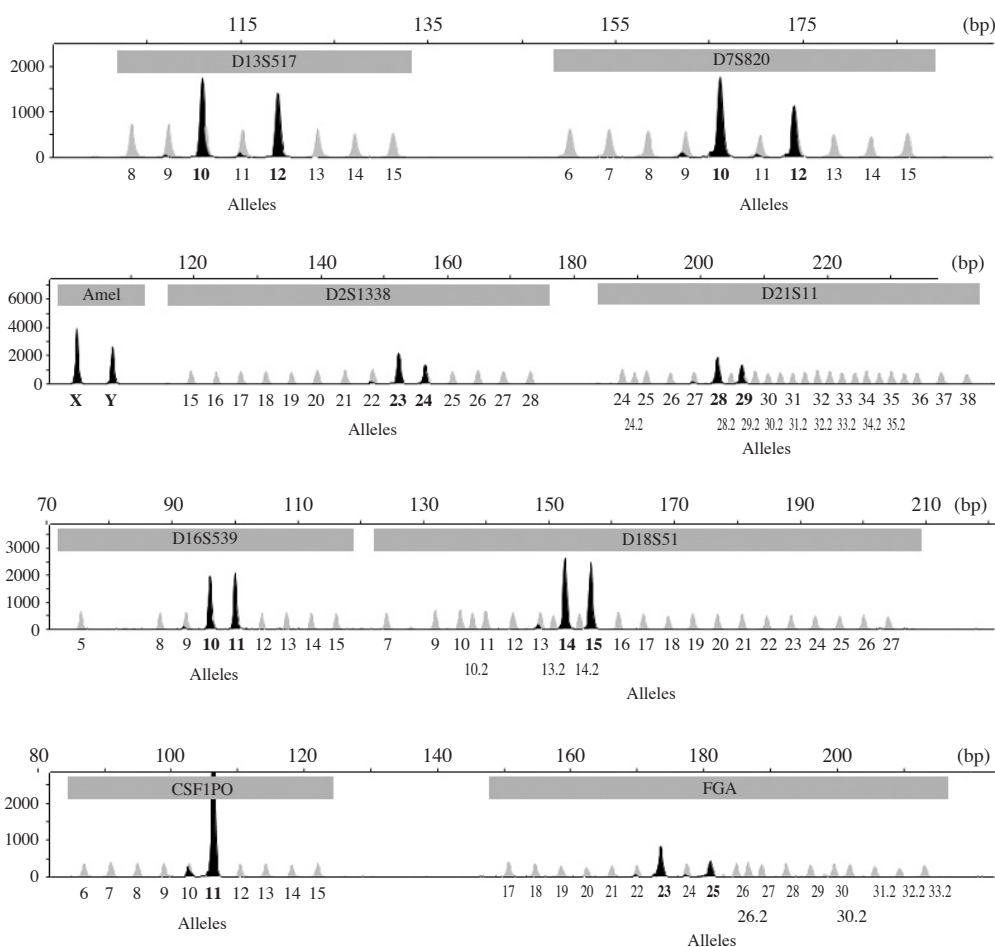


Fig. 3. Allele analysis of nine autosomal STR loci of the ancient Mongolian sample No. 2. Numbers at the bottom of X axis indicate the standard allele ladders and the determined alleles of the sample were shown in bold. Numbers at the top of X axis shows DNA size in base pair (bp). Shaded peaks, standard alleles; solid peaks in black, sample alleles; locus names are shown in shaded boxes.

다. 좀더 자세히 서술하면 표본 1을 표본 2와 표본 3에 비교해 보았을 때, 부모자식관계와 형제관계는 없었다(LR > 10). 또한 표본 1은 표본 2와 표본 3에 비교할 때, 삼촌/조카의 관계나 할아버지/손주의 관계도 없었다. 표본 2와 표본 3 사이의 관계를 볼 때 배다른 형제자매 또는 삼촌/조카 등의 가까운 친척 관계는 없었다. 각 표본의 성별은 표본 1만 여성이었으며, 표본 2와 표본 3은 남성으로 밝혀졌다

(Table 4).

고찰

본 연구에서는 약 200년 된 세 예의 몽골 옛사람 뼈와 치아에서 분리한 DNA를 대상으로 부계와 모계의 반수체군과 보통염색체의 STR 유전자형을 조사하였다. 본 실험에서는 제일 먼저 보통염색체의

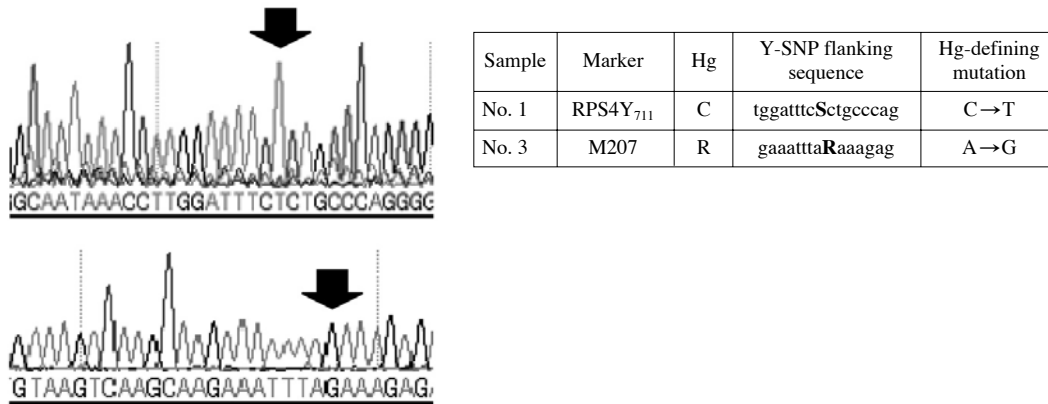


Fig. 4. Alignment of DNA sequencing electrograms of RPS4Y₇₁₁ (No. 1) and M207 (No. 3) Y chromosomal biallelic marker DNA of Mongolian ancient bones and teeth. Mutations were indicated by arrow.

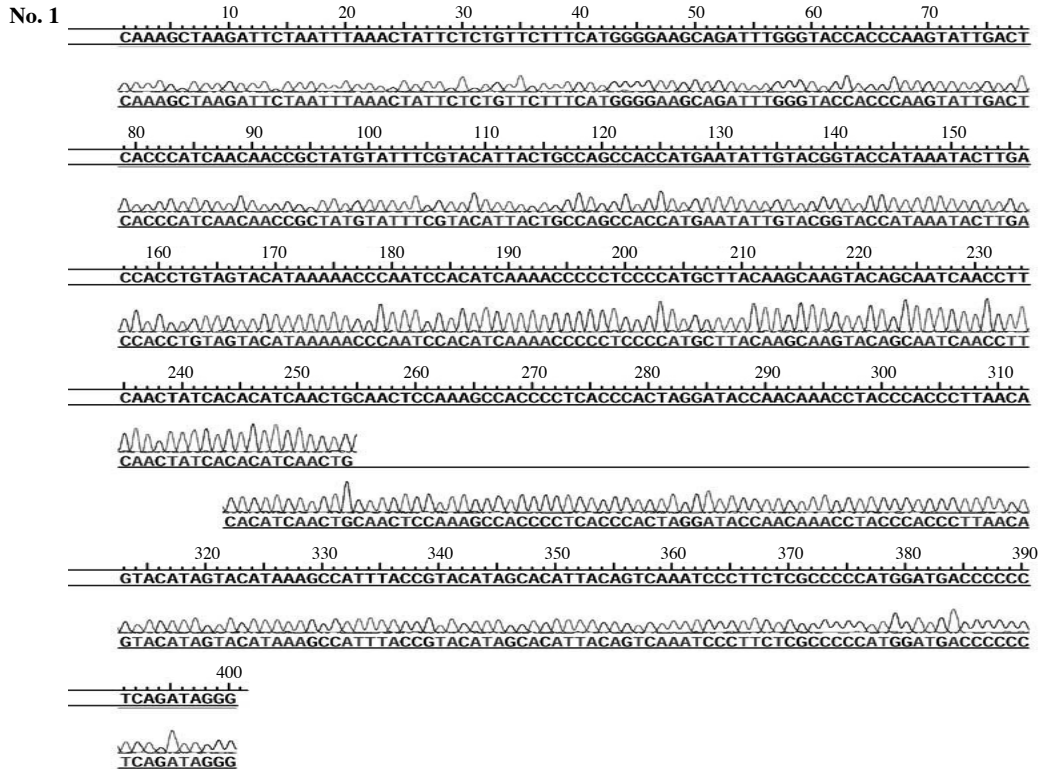
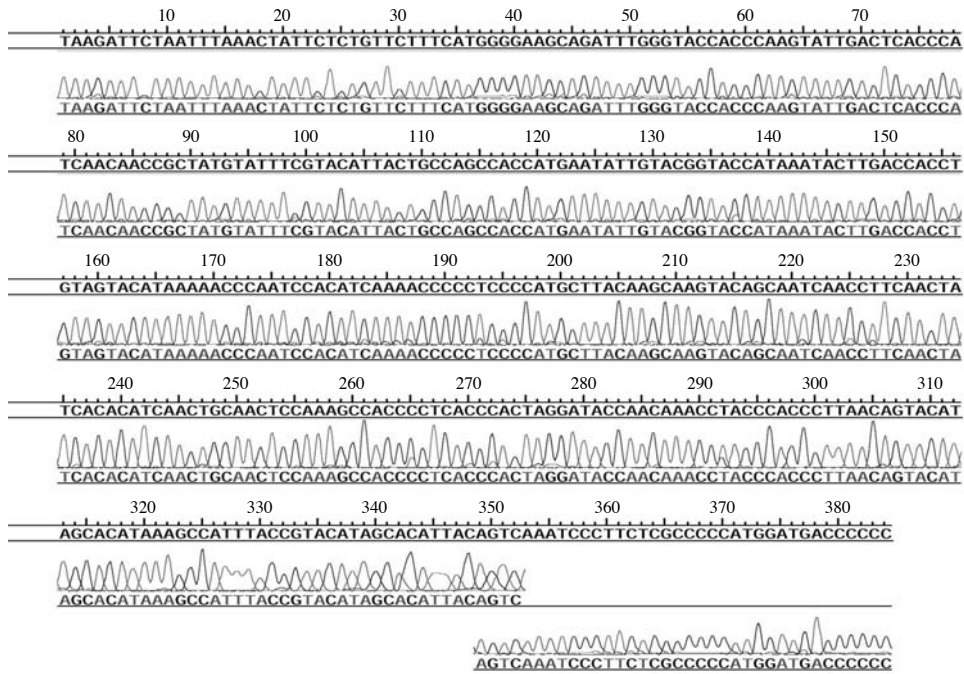


Fig. 5. Continued.

— 몽골 옛사람 혈연관계 —

No. 2



No. 3

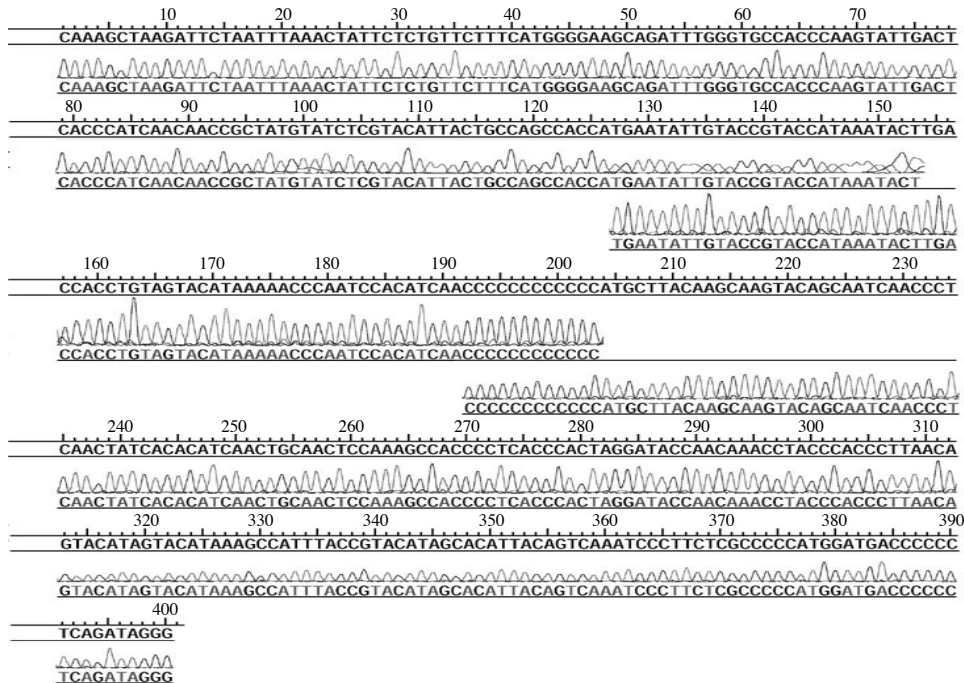


Fig. 5. DNA sequencing electrogram mitochondria HV1 of ancient Mongolian human remains (No. 1, No. 2, and No. 3). DNA sequences were obtained by direct bidirectional sequencing of PCR amplicons and were aligned by using Seqman software (DNASTAR Madison, USA).

Table 5. STR genotypes of all persons involved in experiment

Persons	STR genotypes								
	AMEL	D13S517	D7S820	D2S1338	D21S11	D16S539	D18S51	CSF1PO	FGA
1	X/X	9/13	8/11	18/20	28/29	11/12	16/17	9/11	22/22
2	X/Y	10/11	11/11	23/25	30/31	12/12	13/15	11/11	21/25
3	X/Y	10/11	9/10	19/24	29/30	10/11	15/17	10/11	18/23
4	X/Y	8/8	11/11	20/24	30/30	9/11	15/16	10/11	22/23
5	X/X	8/14	8/8	23/25	31/31.2	10/12	14/14	11/11	24/24

STR Kit를 이용해 유전자분석을 하였다. 그리고 보충적으로 부계쪽 Y-SNP 반수체군, 모계쪽 mtDNA 반수체군을 조사하여 분석하였다. 보통염색체의 STR 분석 이외에도 부계와 모계의 반수체군의 분석을 같이 하여 보통염색체의 STR 결과만으로 혈연관계를 분석할 때보다 더욱 신뢰성 있고 정확한 혈연관계를 얻고자 하였다.

옛사람뼈에서 부계와 모계의 유전자형을 비롯한 보통염색체의 STR 분석은 동일한 무덤에서 집단매장에 의해 여러 구의 시신이 발견되거나 서로 인접한 무덤 사이에서 혈연관계를 조사할 때 필수적인 방법이다. 그러나 옛사람뼈에는 짧고 적은 양의 DNA가 있으며 또한 오염의 소지로 인해 어려움을 겪어 왔다. 옛사람뼈에서 보통염색체 STR 분석은 가능성 있는 방법을 제시된 후 (Schmerer 등 1999), 극히 일부의 학자에 의해 2000년대 중반에 들면서 본격적인 연구가 가능해졌다 (Ricaud 등 2004a, b, 2005, 2006).

최근의 연구를 보면 4000년 된 북부유럽의 한 무덤군에서 보통염색체 STR의 복원 성공율은 13 예 중 한 예에서도 consensus profile을 얻지 못하고, 4 내지 5개의 loci에서만 성공하였다 (Haak 등 2008). 이 옛사람뼈의 발굴장소는 비교적 추운 지방으로 뼈가 상대적으로 잘 보존된 지역임에도 불구하고, 비교적 큰 206 bp와 341 bp보다 큰 loci에서 증폭할 수 없었다. 또한 시베리아 남부에서 발굴된 약 3500년 전부터 1600년 전 사이의 비교적 잘 보존된 옛사람뼈에서 32예 중 6예에서 실패하고, 나머지 26예 중 18예에서만 STR의 완전한 consensus profile을 얻었다 (Keyser 등 2009). 이는 DNA 분리나 정제

과정, PCR 방법의 문제점, 사용 Kit의 문제점 등에서 그 원인이 있을 수 있다.

본 실험에서는 사용된 세 예의 뼈와 치아는 몽골 북부지방에의 한 무덤군에서 발굴된 것으로 역시 추운 기후로 인해 비교적 뼈의 보존 상태는 좋았다. 본 실험에서는 모계의 유전자형을 알아보기 위해 동아시아에 흔한 A, B, C, D, F, G 유형을 조사하였고, 부계의 유전자형을 알아보기 위해 동북아시아에 흔한 O, C, D, N과 그 외 J, Q, R 유형을 조사하였다. 두 예에서 모계는 모두 D형이었으며, D형은 특히 동북아시아지역에 흔한 유형 중의 하나였다. 이중 한 사람은 남성으로 부계는 C형으로 역시 동북아시아 지역에 흔한 유형 중의 하나였다. 나머지 한 사람은 다른 두 사람의 것과는 달리 부계는 R형, 모계는 U형이었으며 유럽에서 많이 나타나는 형이었다. DNA-VIEW 프로그램을 이용하여 STR 결과를 분석하였으나 세 예의 옛사람들 사이에 가까운 혈연관계는 없는 것으로 나타났다.

이전의 연구 결과와는 달리 본 실험에서는 보통염색체 STR 증폭에 100% 성공하였다. 이 실험에서 사용한 STR kit는 AmpFISTR® Minifiler™ PCR Amplification Kit (Applied Biosystems)의 것으로, 부패된 DNA 나 옛사람뼈에서 분리한 DNA에 적합하게 개발된 것으로 본 실험에서 처음 사용한 것이다. 이 실험 이전에 보고된 연구는 AmpFI/STR profiler Plus Kit을 사용하여 왔다 (Haak 등 2008, Keyser 등 2009). 이를 사용한 자료와 비교분석하기 위해서는 동일한 부위인 D13S317, D7S820, D21S11, D18S51, FGA와 amelogenin의 자료를 추출해야 한다. 이러한 점을 근거로 러시아 쿠르간 지역 (Keyser 등 2000)의

옛사람 유전자 분석자료와 몽골 어진골(Keyser 등 2003, 2006) 지역의 옛사람 및 현대인 유전자 분석자료와 비교분석을 시도하였으나 혈연관계의 유사성이 있는 자료는 없었다.

모계의 mtDNA와 부계의 Y-SNP의 반수체군이 서로 다르면 가까운 혈연관계를 우선 배제할 수 있다. 표본 1과 표본 3은 각각 여성과 남성으로 밝혀졌고, 모계가 같은 D형으로 나왔기 때문에 하위의 그룹을 더 분석하면 같은 모계인지의 여부를 밝힐 수 있다. 그러나 이 방법은 하위의 그룹이 매우 다양하여 많은 시간과 경비가 드는 불리한 점이 있다. 또한 반수체군을 이용한 조사는 가까운 혈연관계를 조사하기에는 적합하지 않고 부계 또는 모계가 동일한 먼 혈연집단으로만 분류할 수 있다는 단점이 있다. 가장 빨리 혈연관계를 확인하는 것이 방법중의 하나가 보통염색체의 STR를 분석하는 것이다. 그러나 보통염색체의 STR이 단지 8개의 loci만을 조사할 수 밖에 없고, 이 결과와 더불어 부계와 모계의 반수체군의 결과를 가지면 혈연관계를 보다 빠르고 정확히 밝힐 수 있다.

시베리아 남부지역에서 발굴된 기원전 1800년부터 기원후 400년에 이르는 시대의 옛사람뼈의 유전자 분석자료를 보면 이 지역은 부계의 반수체군 R의 일부 집단이 있던 장소이다(Keyser 등 2009). 그 중에서도 특히 인도유럽인을 나타내는 R1a를 공유한 집단의 유적지로서 우크라이나 지역에서 점차 동부유럽으로 퍼진 고대인들의 이동과정을 보여주고 있다. 동부유럽의 가장 많은 반수체군인 R1a가 몽골지역에서는 발견되지 않고 있다. 본 실험에서 R 그룹이 발견되었고 이를 포함해서 몽골에서 발굴된 많은 옛사람뼈에서 더욱 깊이 있는 연구를 진행하고 있다. 보다 많은 옛사람의 뼈를 대상으로 유전자 측면의 연구를 계속 진행한다면, 몽골지역의 고대국가들이 한국을 비롯한 아시아 국가와 서양 사이에 오래 전부터 긴밀한 관계 특히 인적교류가 활발했다는 가설을 유전자 측면에서 증명할 수 있을 것이다.

아시아에서 흔히 나타나는 모계의 반수체군 D는 중앙아시아의 대초원지역에서 약 5만 년 전에 생겨

나 현재 동아시아지역 유전자풀의 20%를 차지하고 있다. 이 혈통은 북아메리카로 건너가 아메리카 인디언의 혈통 중 하나가 되었다. 부계의 반수체군 C는 약 5만 년 전 남아시아에서 생겨나 호주에서부터 몽골과 시베리아까지 이주하여 현재 이들 지역에서 분포하며 역시 북아메리카 인디언에서도 발견된다. 모계의 반수체군 U는 5만 년 전에 발생했을 가능성이 크며 유럽인, 북아프리카인, 인도인에게서 발견되며 유럽과 동지중해 연안에서 약 7%의 빈도로 발견된다. 부계의 반수체군 R은 중앙아시아에서 약 3~4만 년 전 유럽으로 이주한 집단과 1만 년 전 인도로 이주하기 시작한 집단으로 구분되어 현재 유럽과 인도에서 발견된다(Wells 2006).

본 연구의 가장 근본적인 중요성은 결과의 유효성이다. 옛사람뼈에서 유전자의 연구는 기술적인 문제 뿐만 아니라 결과의 신뢰성을 증명하기 위해 엄격한 기준이 요구된다. 이 연구에서는 재료 및 방법에서 일부 서술된 바와 같이 오염된 현대인의 DNA가 증폭이 되는 것을 방지하였다. 가능하다면 각각 다른 뼈에서 두 번의 독립적인 DNA 분리를 실행하였다. 매 번의 PCR 과정에서 추출음성대조군과 음성대조군을 포함하였으며 이곳에서 DNA가 증폭되지 않았다. 옛사람뼈와 치아의 DNA는 반복되는 실험에서 동일한 결과를 얻었다. 시료 중의 어느 것도 실험자의 DNA와 같은 결과를 나타내지 않았다. 이와 같은 엄격한 기준을 적용하여 오염의 가능성을 최대한 배제하였다. 몽골지역의 추운 기후로 인해 뼈의 부패를 억제시켜 DNA를 보존시킨 장점도 있다.

요약하면 몽골에서 출토된 옛사람뼈와 치아의 유전자연구에서 가족관계에 관한 조사는 보통염색체 STR 연구로 가능했으며, 이에 부수적으로 부계 반수체군과 모계 반수체군의 조사가 동반되어야 했다. 보통염색체의 STR을 이용해 혈연관계를 DNA-VIEW 프로그램을 통해 추적하였으나, 본 연구의 세 에에서는 가까운 혈연관계가 없었다. 본 연구자들은 극히 일부의 연구자에서만 가능했던 옛사람뼈에서 분리정제한 DNA에서 보통염색체 STR 연구의 가능한 방법을 이 연구를 통해 밝히고, 이 분야의 많은

연구자들이 보다 나은 연구결과를 도출해 낼 수 있기를 기대한다.

참 고 문 헌

- Alonso A, Martin P, Albarran C, Garcia P, Garcia O, de Simon LF, Garcia-Hirschfeld J, Sancho M, de la Rua C, Fernandez-Piqueras J : Real-time PCR designs to estimate nuclear and mitochondrial DNA copy number in forensic and ancient DNA studies. *Forensic Sci Int* 139: 141-149, 2004.
- Alvarez García A, Muñoz I, Pestoni C, Lareu MV, Rodríguez-Calvo MS, Carracedo A : Effect of environmental factors on PCR-DNA analysis from dental pulp. *Int J Legal Med* 109: 125-129, 1996.
- Bar W, Brinkmann B, Budowle B, Carracedo A, Gill P, Holland M, Lincoln PJ, Mayr W, Morling N, Olaisen B, Schneider PM, Tully G, Wilson M : Guidelines for mitochondrial DNA typing. *Vox Sanguinis* 79: 121-125, 2000.
- Burger J, Hummel S, Herrmann B, Henke W : DNA preservation: A microsatellite-DNA study on ancient skeletal remains. *Electrophoresis* 20: 1722-1728, 1999.
- Calacal GC, De Ungria MC : Fungal DNA challenge in human STR typing of bone samples. *J Forensic Sci* 50: 1394-1401, 2005.
- Capelli C, Tschentscher F, Pascali VL : Ancient protocols for the crime scene? Similarities and differences between forensic genetics and ancient DNA analysis. *Forensic Sci Int* 131: 59-64, 2003.
- Ginther C, Issel-Tarver L, King MC : Identifying individuals by sequencing mitochondrial DNA from teeth. *Nat Genet* 2: 135-138, 1992.
- Haak W, Brandt G, de Jong HN, Meyer C, Ganslmeier R, Heyd V, Hawkesworth C, Pike AW, Meller H, Alt KW : Ancient DNA, Strontium isotopes, and osteological analyses shed light on social and kinship organization of the Later Stone Age. *Proc Natl Acad Sci USA* 105(47): 18226-18231, 2008.
- Hofreiter M, Serre D, Poinar HN, Kuch M, Pääbo S : Ancient DNA. *Nat Rev Genet* 2(5): 353-359, 2001.
- Hunter P : Ancient DNA research goes nuclear: A new technique to extract sequence data from nuclear DNA may reveal exciting new insights into evolution and phylogeny. *EMBO Rep* 7: 136-139, 2006.
- Kaestle FA, Horsburgh KA : Ancient DNA in anthropology: methods, applications and ethics. *Am J Phys Anthropol* 45: 92-130, 2002.
- Kemp BM, Smith DG : Use of bleach to eliminate contaminating DNA from the surface of bones and teeth. *Forensic Sci Int* 154: 53-61, 2005.
- Keyser C, Bouakaze C, Crubézy E, Nikolaev VG, Montagnon D, Reis T, Ludes B : Ancient DNA provides new insights into the history of south Siberian Kurgan people. *Hum Genet*. 2009 May 16. [Epub ahead of print]
- Keyser C, Crubézy E, Ludes B : Nuclear and mitochondrial DNA analysis of a 2,000-year-old necropolis in the Egyin Gol Valley of Mongolia. *Am J Hum Genet* 73: 247-260, 2003.
- Keyser C, Crubézy E, Pamzav H, Varga T, Ludes B : Population origins in Mongolia: genetic structure analysis of ancient and modern DNA. *Am J Phys Anthropol* 131: 272-281, 2006.
- Kim KY, Woo JY, Kim KJ : Establishment of PCR reaction condition for highly successful ancient DNA PCR. *Korean J Anthropol* 21(2): 91-103, 2008.
- Ochir A : Xiongnu and the Mongolians, The first empire of the steppes, Seoul. National Museum of Korea, pp 35-46, 2007.
- O'roure DH, Carlyle SW, Parr RL : Ancient DNA: methods, progress, and perspectives. *Am J Hum Biol* 8: 557-571, 1996.
- Popova L, Hartley C, Smith A : Proceeding of the 2005 University of Chicago Conference on Eurasian Archeology (Cambridge: Cambridge Scholars Press). 2007.
- Ricaut FX, Keyser-Tracqui C, Cammaert L, Crubézy E, Ludes B : Genetic analysis and ethnic affinities from two Scytho-Siberian skeletons. *Am J Phys Anthropol* 123: 351-360, 2004a.
- Ricaut FX, Keyser-Tracqui C, Crubézy E, Ludes B : STR-genotyping from human medieval tooth and bone samples. *Forensic Sci Int* 151: 31-35, 2005.
- Ricaut FX, Kolodetsnikov S, Keyser-Tracqui C, Alekseev AN, Crubézy E, Ludes B : Genetic analysis of human remains found in two eighteenth century Yakut graves at At-Dabaan. *Int J Legal Med* 118: 24-31, 2004b.
- Ricaut FX, Kolodetsnikov S, Keyser-Tracqui C, Alekseev AN, Crubézy E, Ludes B : Molecular genetic analysis of

— 몽골 옛사람 혈연관계 —

- 400-year-old human remains found in two Yakut burial sites. *Am J Phys Anthropol* 129: 55-63, 2006.
- Schmerer WM, Hummel S, Herrmann B : Optimized DNA extraction to improve reproducibility of short tandem repeat genotyping with highly degraded DNA as target. *Electrophoresis* 20: 1712-1716, 1999.
- Wells S : Deep Ancestry: Inside the Genographic Project, Seoul. Malgulbitnem, pp 213-293, 2006.

Abstract

A Kinship Analysis of Ancient Human Bones and Teeth from Mongolia

Munkhtsetseg Bazarragchaa, Kijeong Kim, Jae-Hyun Kim¹,
Gavaachimed Lkhagvasuren², Ae-Ja Park³, Kwang-Ho Lee⁴, Dae-Jin Kim⁵,
Yoon-Hee Chung⁵, Sung-Su Kim⁵, Won-Bok Lee⁵, Kyung-Yong Kim⁵

Department of Microbiology, College of Medicine, Chung-Ang University

¹*Department of Archaeology and Art History, College of Humanities, Donga University*

²*Department of Science & Culture, Graduate School, Chung-Ang University*

³*Department of Laboratory Medicine, College of Medicine, Chung-Ang University*

⁴*Department of Life Science, College of Natural Sciences, Chung-Ang University*

⁵*Department of Anatomy, College of Medicine, Chung-Ang University*

The kinship was analyzed genetically on the three 2000 year old ancient human bones and teeth excavated in Mongolia.

The samples were processed in a clean room to prevent the contamination from modern human DNA. The DNA extraction and purification was done with ion-exchange column kit (Qiagen G-tip 20G, USA). The PCR was done with purified DNAs from ancient human bones for paternal Y-SNP haplogroup, maternal mtDNA haplogroup, and autosomal short tandem repeats (STR).

Two samples belonged to the maternal D major haplogroup, which is one of the most frequent types in the present North East Asia. One of them, showing male genotype, belonged to the paternal C major haplogroup, which is also one of the most frequent types in the present North East Asia. The remaining one belonged to the paternal R major haplogroup, frequent in the present Europe, and the maternal U haplogroup, frequent in the present Europe and East Mediterranean. The repeated results were consistent in the autosomal STR PCR. The STR data were analyzed with DNA-VIEW program (<http://www.dna-view.com>), which showed no close kinship among the three ancient humans.

Our method was successful in the analyzing kinship among ancient human bones, which has been possible in few restricted laboratories in the World. Authors anticipate that many researchers could do their research in a better way to get the genetic information from ancient human bones.

Key words : Ancient human bones, Teeth, STR, DNA, PCR, Kinship