

옛사람뼈 DNA에서 HLA-DRB1 염기서열의 분석

우지영, 김기정, 바좌라그좌 문호체첵, 김재현¹, 가와치멘 르학와수랭², 손동섭³,
박애자⁴, 이광호⁵, 김대진⁶, 정윤희⁶, 김성수⁶, 이원복⁶, 김경용⁶

중앙대학교 의과대학 미생물학교실, ¹동아대학교 인문과학대학 고고미술사학과,
²중앙대학교 대학원 문화재과학과, ³중앙대학교 의과대학 흉부외과학교실,
⁴중앙대학교 의과대학 진단검사의학교실, ⁵중앙대학교 자연과학대학 생명과학과,
⁶중앙대학교 의과대학 해부학교실

(2010년 3월 25일 접수, 2010년 4월 29일 수정접수, 2010년 5월 13일 게재승인)

간추림 : 옛사람 시료의 DNA 분석은 인류학 및 사람 진화 연구에서 최근 세계적으로 널리 이용되고 있는 추세이다. 인류의 유전자 연구에 있어서 사립체 DNA 및 Y 염색체 DNA와 더불어 널리 이용되고 있으나 옛사람으로부터 HLA 분석은 드문 형편이다.

본 연구에서는 고대 사람 시료로부터 HLA 유전자의 염기서열의 분석을 위해 PCR 증폭할 수 있는 방법을 개발하고자 하였다. 연구자들은 염기서열에 기초한 HLA-DRB1 분석을 위한 방법을 개발하였고, 3000년 전부터 500년 전에 해당하는 한국과 몽골 지역에서 출토된 옛사람뼈로부터 HLA-DRB1의 염기서열을 밝혀 대립유전자의 유형을 분석하였다.

유전자형은 HLA database (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/blast2/nucleotide.html>)에서 염기서열을 비교하여 대립유전자형을 결정하였다. 한국인과 몽골인의 HLA-DRB1의 대립유전자는 유형별로 분리하여 구분하였고, 이외에도 몽골의 지형적 분류를 근거로 서부, 중부, 동부, 그리고 북부로 구분하여 각 대립유전자형의 빈도를 나타내었다.

종합하면 옛사람뼈에서 분리 정제한 DNA로부터 성공적으로 HLA-DRB1을 증폭하여 대립유전자의 유형을 분석할 수 있었다. 이 방법은 앞으로 HLA 염기서열 분석을 통해 개인이나 개체군의 유연관계 분석을 위해 이용될 수 있을 것으로 기대한다.

찾아보기 낱말 : 옛사람뼈, DNA, HLA-DRB1, PCR

서 론

오랫동안 땅속에 묻혀 있던 생명체의 잔재물, 즉 사람을 비롯하여 동물이나 식물에서 유전자를 분석하는 연구는 점차 일반화되고 있는 추세에 있다. 이러한 고대 생명체 유전자 분석에서는 모계로부터 유전되는 사립체 DNA 염기서열의 다형성 (polymorphism) 분석이 주를 이루고 있는데, 이는 유전자의 증폭이 비교적 용이하기 때문이다. 고대 생명체에서 부계로부터 유전되는 Y 염색체의 염기서열 분석도 최근 활발하게 진행되

고 있다(Kim 등 2010).

그러나 오래된 생명체의 잔재물에 존재하는 DNA (ancient DNA, aDNA)를 추출하여 PCR 증폭에 성공하기까지는 어려운 점이 있다. 그 중 하나가 PCR 증폭이 가능한 aDNA를 분리하고 정제하는 것이다. aDNA는 매우 짧게 잘려져 있고, 손상되어 있으며 (Pääbo 1989, Hagelberg와 Clegg 1991, Handt 등 1994, Häss 등 1996, O'rouke 등 1996, Keyser-Tracqui와 Ludes 2005, Mulligan 2005), DNA 양도 적고 (Poinar 등 1996, Yang 등 1998, Kumar 등 2000), 다른 생명체나 현대인에게서 유래된 DNA에 의해 오염되어 있다 (Kolman과 Tuross 2000, Calacal과 De Ungria 2005, Kemp와 Smith 2005, Hunter 2006). 또한 aDNA에는 휴믹산 (humic acid) 나 풀빅산 (fulvic acid)과 같은 수많은 강력한 PCR 억제제

*이 논문은 2009도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구임(2009-0073831)

교신저자 : 김경용 (중앙대학교 의과대학 해부학교실)

전자우편 : skull@cau.ac.kr

Table 1. Primers designed in this study for the amplification of HLA-DRB1 alleles

Primer	Sequence	Group
KJ_GF	TGTCCCCMCAGCACGTTTC	Generic Forward
GR	TCGCCGCTGCACYGTGAA	Generic Reverse
AmpB1	CCGCTGCACTGTGAAGCTCT	Reverse
KJ_Amp1	CMCAGCACGTTTCTTGTG	01
KJ_Amp2	CAGCACGTTTCTCTGTGG	07, 15, 16
KJ_Amp3	CAGCACGTTTCTTGGAGTAC	03, 08, 11 (not 1122/1130), 12, 13, 14 (not 1410)
Oamp4	GTTTCTTGGAGCAGGTTAAAC	04 (not 0449), 1410, 1122
KJ_AMP09	CGTTTCTTGAAGCAGGATAAGTT	09
KJ_AMP10	CACAGCACGTTTCTTGGAGGA	10

가 함께 존재하여 PCR 증폭을 어렵게 하고 있다(Hänni 등 1995, Kalmar 등 2000).

이러한 복잡성으로 인해 다양한 방법들이 개발되어 aDNA를 가능한 한 순수하게 분리하는데 이용되어 오고 있다. 이러한 방법들 중 대표적인 것에는 페놀-클로로포름 추출법 (Faerman 등 1995), 에탄올-이소프로프라놀롤 침전법 (Kurosaki 등 1993, Cattaneo 등 1995), 텍스트란 블루를 이용한 변형된 에탄올 침전법 (Kalmar 등 2000), 아가로스 젤 침전법 (Fischer 등 2001), 미세농축기의 이용 (Blake 등 1992), 실리카 이용법 (Rohland와 Hofreiter 2007) 등이 있다. 이와 같은 방법들은 aDNA의 성공적 PCR 증폭을 위해 필요한 PCR 억제제를 제거하기 위해 개발된 방법들이다. 그러나 이러한 방법들도 보존상태가 좋지 않은 옛사람뼈에서 증폭가능한 aDNA 분리하기에 충분하지 않았다. 이와 같은 문제로 인해 본 연구자들은 aDNA의 PCR 증폭이 가능한 방법을 최근 개발하였다 (Kim 등 2008a).

진화의 연구 관점에서 사람백혈구항원 (human leukocyte antigen, HLA)의 유형분석은 널리 이용되고 있다. 일반적으로 HLA 유형분석은 조직이나 장기의 성공적인 이식에는 꼭 필요한 요소이다. 또한 HLA 유형분석은 시간적으로 다른 시대에 존재하거나, 지형학적으로 다른 곳에 거주해 온 인구집단의 유전적 상관관계를 분석하는데 이용할 수 있다 (Anzai 등 1999, Fischer 등 2001). 본 연구에서는 옛사람뼈에서 HLA-DRB1 유전자의 PCR 증폭을 위해 프라이머들을 개발하고 적절한 PCR 조건을 만들어 옛사람 뼈에서 분리한 DNA에 적용하였다.

본 논문에서는 옛사람뼈를 대상으로 HLA-DRB1 유전자 유형 분석에 성공하여 보다 심층적인 옛사람뼈 유전자분석이 가능하였으며, 그 방법과 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

1. 옛사람뼈의 처리 (탈오염처리 및 오염방지)

재료는 한국과 몽골에서 출토된 옛사람뼈에서 채취한 표본을 대상으로 하였다. 한국의 옛사람뼈의 시대는 기원전 5세기부터 기원후 5세기에 속하였다. 몽골의 옛사람뼈의 시대는 기원전 10세기부터 기원후 15세기에 속하였다. PCR 전처리실에서 약 3g 정도의 뼈조각을 2~4개로 조각내어 대조군을 제외한 실험군은 가압증기멸균한(121°C, 15분) 사포로 뼈 표면을 1~2mm 각아 내었다. 이후의 과정은 다시 가압증기멸균한 3차 증류수로 5분간 각 3회 세척하였다. 뼈조각들은 차아염소산나트륨(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 최소화하기 위하여 Gilbert 등(2005)의 기준에 따라 세 개의 독립적인 실험실, 즉 실험실은 PCR 전처리실, 청정실, PCR 후처리실로 구분하여 설치하였다. PCR 전처리실에서는 옛사람뼈의 표면처리, 절단, 세척과정을 처리하였고, 청정실에서는 옛사람뼈의 UV소독, 골분말의 제작, 옛사람뼈 DNA의 분리와 정제과정이 이루어졌다. PCR 후처리실에서는 PCR 반응이 이루어졌다. 이 중에서 청정실이 가장 중요한 요소로 헤파필터를 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, 보호면용 착용하도록 하였다. 모든 실험기구와 실험용액은 가압

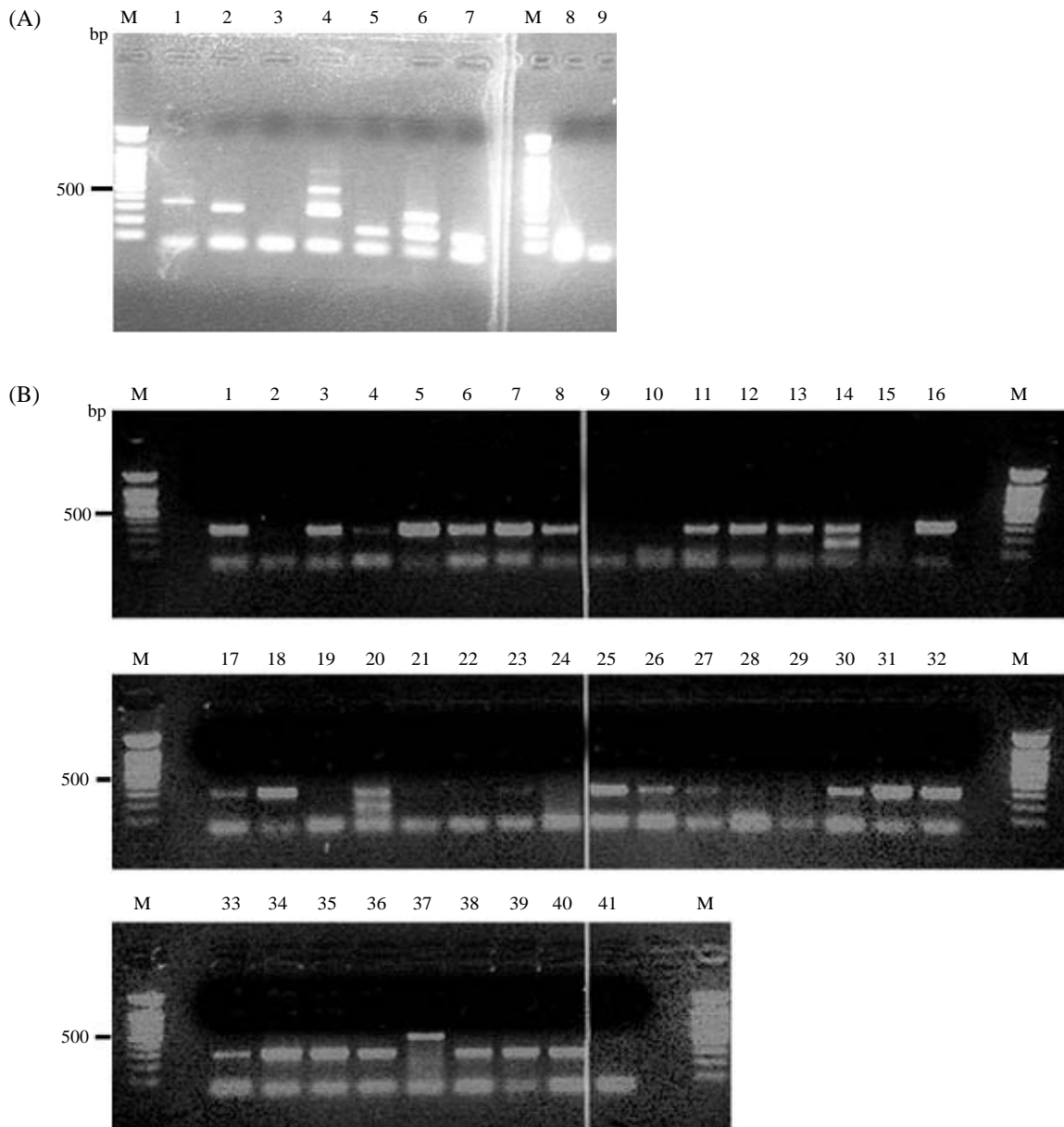


Fig. 1. Agarose gel electrophoresis analysis of PCR products using HLA DRB1 generic primers from Korean and Mongolian ancient bone DNAs. About 300 bp amplicons were observed. (A) Korean ancient bone DNA PCR. Lane 1, KR0022; lane 2, KR0028; lane 3, KR0029; lane 4, KR0033; lane 5, KR0036; lane 6, KR0044; lane 7, KR0051; lane 8, KR0052; lane 9, water control. (B) Mongolian ancient bone DNA PCR. Lane 1, MN0001; lane 2, MN0002; lane 3, MN0003; lane 4, MN0004; lane 5, MN0005; lane 6, MN0006; lane 7, MN0007; lane 8, MN0008; lane 9, MN0009; lane 10, MN0010; lane 11, MN0011; lane 12, MN0012; lane 13, MN0013; lane 14, MN0014; lane 15, MN0015; lane 16, MN0016; lane 17, MN0017; lane 18, MN0018; lane 19, MN0019; lane 20, MN0020; lane 21, MN0022; lane 22, MN0023; lane 23, MN0024; lane 24, MN0025; lane 25, MN0027; lane 26, MN0028; lane 27, MN0029; lane 28, MN0030; lane 29, MN0032; lane 30, MN0033; lane 31, MN0034; lane 32, MN0035; lane 33, MN0036; lane 34, MN0037; lane 35, MN0038; lane 36, MN0039; lane 37, MN0040; lane 38, MN0041; lane 39, MN0042; lane 40, MN0043; lane 41, water control.

증기멸균하였으며, 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 (Qiagen G-tip 20G, USA)를 이용하였다. QIAquick® spin column (Qiagen, USA)과 ion-exchange column을 이용한 DNA 추출과정은 다음과 같다. 사람뼈의 칼슘을 제거하기 위하여 3g의 뼈분말을 멸균 50mL 폴리프로필렌 시험관에 옮기고 pH 8.0, 40mL 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 15mL의 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 진탕하였다. 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 (Qiagen, USA)을 이용하여 제

조사 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. 중합효소반응 (PCR)

옛사람뼈 DNA에 적합하도록 새롭게 고안한 프라이머를 이용해 일부의 intron 1을 포함한 HLA-DRB1 exon 2를 증폭하였다 (Table 1). PCR 증폭은 20-µL 반응액에 GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems) 과 AmpliTaq Gold polymerase (Applied Biosystems)를 사용하여 수행하였다. 반응혼합액은 2 µL 10× PCR buffer (Applied Biosystems), 0.2 mM of each dNTP (Roche diagnostics), 2 mM MgCl₂ (Applied Biosystems), 1 µM of

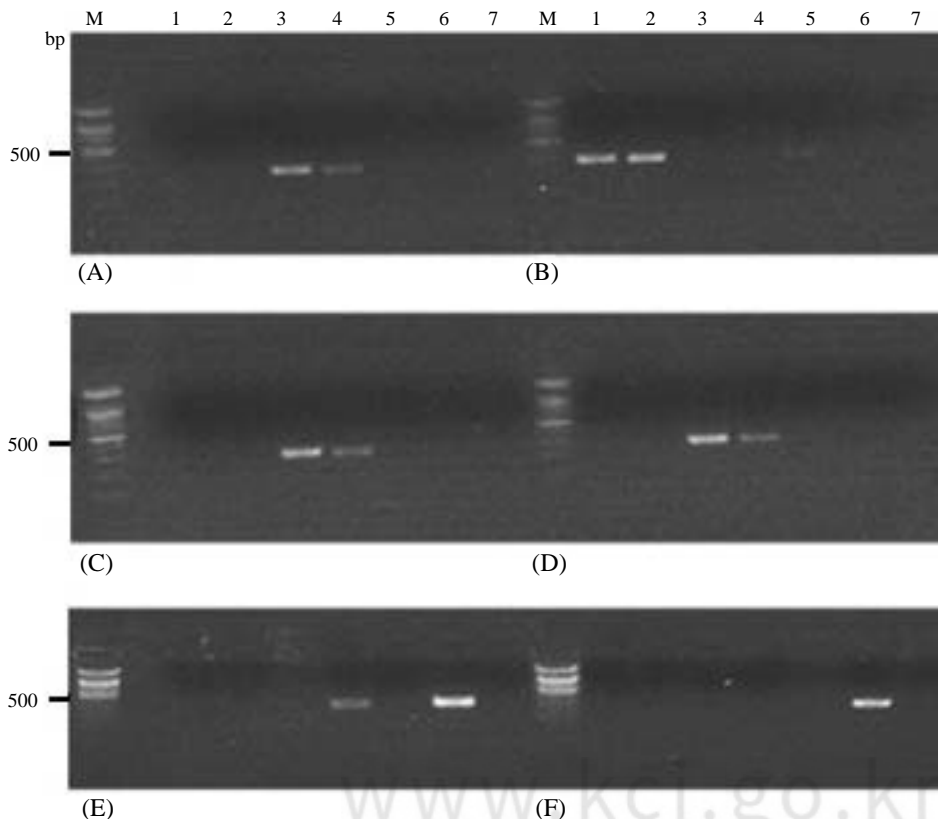


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis analysis of PCR products using HLA DRB1 group-specific primers from Korean and Mongolian ancient bone DNAs. Samples: (A), MN0001; (B), MN0016; (C), MN0003; (D), MN0034; (E), MN0004; (F), MN0022. Group specific primers: lane 1, NAMP-1; lane 2, NAMP-2; lane 3, NAMP-3; lane 4, AMP-4; lane 5, NAMP-7; lane 6, AMP-9; lane 7, NAMP-10.

KJ_GF and GR primers, 1 mg/mL BSA (New England Biolabs), 및 0.8 U of *AmpliTaq* Gold polymerase로 구성하였다. 템플레이트로서 3 µL와 1 µL의 표본추출액을 사용하였다. 증폭주기조건은 95°C에서 10분, 95°C 30초의 50주기, 63°C에서 1분, 그리고 72°C에서 1분, 마지막으로 72°C에서 7분의 1주기로 구성하였다. 에씨디움 브로마이드를 넣은 1.8% 아가로스겔로 전기영동하여 5 µL의 PCR 산물을 분리하였다. PCR 산물을 확인하고 7개의 group specific primer sets (Table 1)을 이용해 nested PCR을 하였다. PCR 조건은 위의 50주기 대신 25주기를 사용한 것 외에는 동일하였다.

4. DNA 염기서열 분석

PCR 증폭산물의 염기서열을 확인하기 위해 증폭산물

을 AccuPrep® PCR Purification kit (바이오니아, 대한민국)를 이용하여 정제하였고 Big Dye terminator Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, USA)와 ABI PRISM 3700 DNA 분석기 (Applied Biosystems, USA)를 이용하여 염기서열을 결정하였다. 이 염기서열을 기본으로 해서 HLA-DRB1 allele의 결정은 현재까지 모든 HLA 유전자기 보고되어 있는 IMG/HLA database (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/blast2/nucleotide.html>)를 이용하였다.

결 과

한국 옛사람 뼈 DNA와 몽골 옛사람 뼈 DNA로부터 HLA DRB1 대립유전자들을 증폭하기 위하여 1차 generic PCR과 아가로스 겔 전기영동을 통해 생산물을 확

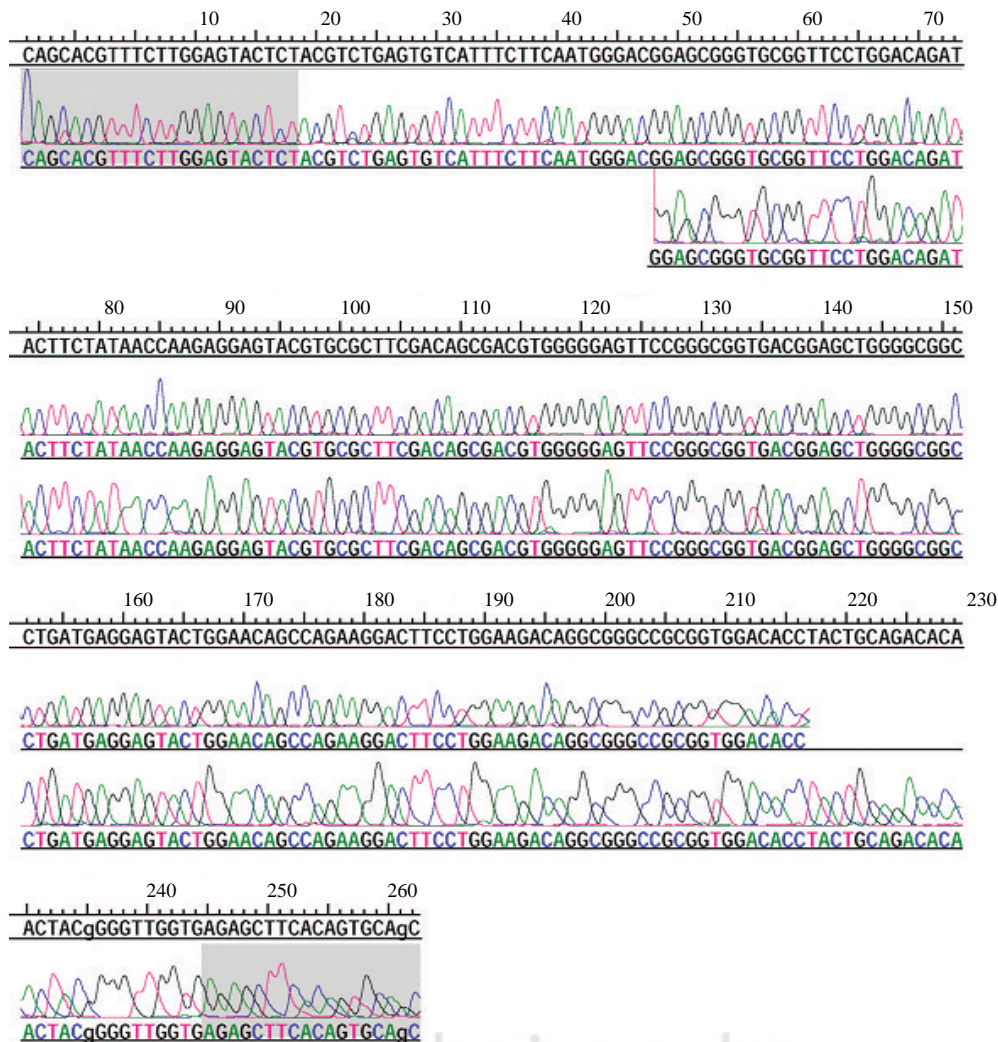


Fig. 3. DNA sequence electropherogram of Korean ancient bone sample KR0002 (DRB1* 1101).

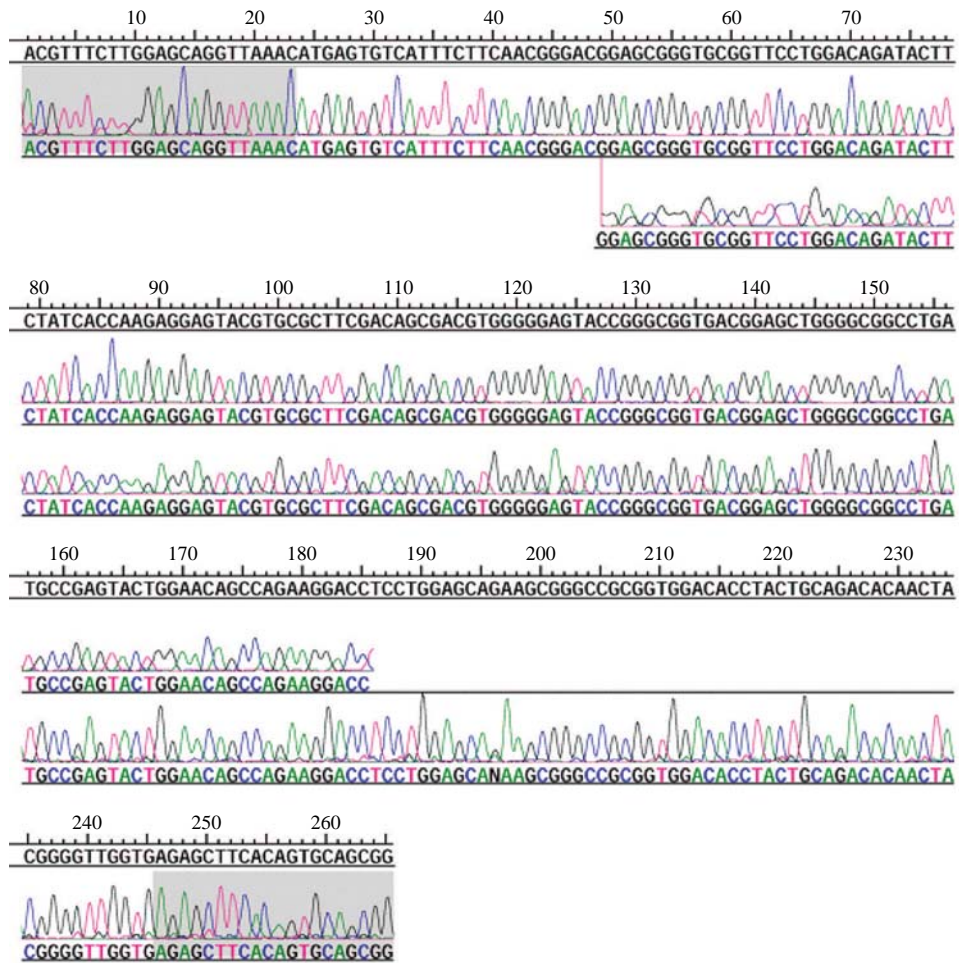


Fig. 4. DNA sequence electrophoregram of Mongolian ancient bone sample MN0001 (DRB1*0401).

Table 2. HLA-DRB1 allele gene frequency of Korean ancient bones

Korean ancient bones		
DRB1 allele	Number	GF (%)
DRB1*010101	1	9.09
DRB1*0405	1	9.09
DRB1*0701	5	45.46
DRB1*0802	2	18.18
DRB1*1101	1	9.09
DRB1*1301	1	9.09

인하였다(Fig. 1). 그리고 2차 그룹 특이 PCR의 결과를 가지고 증폭산물의 염기서열분석을 시행하였다(Figs. 2, 3). 각 증폭산물의 유전자형은 HLA database에서 염기서열을 비교하여 대립유전자형을 결정하였다(Tables 2, 3). 먼저 한국인과 몽골인의 HLA-DRB1의 대립유전자는 유형별로 분리하여 구분하였다(Tables 2, 3). 이외에

도 몽골의 지형적 분류를 근거로 서부, 중부, 동부, 그리고 북부로 구분하여 각 대립유전자형의 빈도를 나타내었다(Table 4).

한국 옛사람뼈의 유전자 분석에서는 11개의 표본에서 HLA DRB1 대립유전자형이 밝혀졌고, 빈도는 DRB1*0701이 가장 많았으며 모두 6개의 다른 형들이 발견되었다(Table 2). 몽골 옛사람뼈 유전자 분석의 결과를 보면, HLA-DRB1 대립유전자의 유형은 모두 87개의 표본에서 시행하였고 총 27개의 다른 유형들이 발견되었다. 몽골 옛사람뼈의 HLA-DRB1에서 가장 흔한 빈도를 가진 유전자형은 DRB1*0401 (14.94%), 다음으로 DRB1*1501 (13.79%)였다(Table 3). 몽골 옛사람뼈의 지역별 HLA-DRB1 대립유전자형은 Table 4에서 보이는 바와 같다. 서부지역에서는 지역적으로 볼 때 가장 다양한, 21종류의 대립유전자형이 나타났으며, DRB1*1501 (19.57%), DRB1 0401 (13.04%), DRB1 0802 (8.70%),

Table 3. HLA-DRB1 allele gene frequency of Mongolian ancient bones

Mongolian ancient bones		
DRB1 allele types	Number	GF (%)
DRB1*010101	1	1.15
DRB1*030101	2	2.30
DRB1*0401	13	14.94
DRB1*0402	1	1.15
DRB1*0403 (0452) ¹	8	9.20
DRB1*0405	3	3.45
DRB1*0406	1	1.15
DRB1*0408	1	1.15
DRB1*0451	1	1.15
DRB1*0701	4	4.60
DRB1*0801	3	3.45
DRB1*0802	6	6.90
DRB1*080302	1	1.15
DRB1*090102	6	6.90
DRB1*1001	2	2.30
DRB1*1101	4	4.60
DRB1*1104	1	1.15
DRB1*1130	1	1.15
DRB1*1201 (1210, 1206) ²	1	1.15
DRB1*1301	2	2.30
DRB1*130201	1	1.15
DRB1*140101 (1454, 1439) ³	5	5.75
DRB1*140301	4	4.60
DRB1*1412	1	1.15
DRB1*1501	12	13.79
DRB1*1502 (1519)	1	1.15
DRB1*160201	1	1.15

¹: DRB1*0403 or DRB1*0542

²: DRB1*1201, DRB1*1210 or DRB1*1206

³: DRB1*140101, DRB1*1454 or DRB1 1439

DRB1 1001 (8.70%), 그리고 DRB1 140301 (8.70%)의 빈도를 보여 이 다섯 개의 유형이 절반 이상의 출현빈도를 보이고 있다. 동부지역에서는 모두 11종류의 대립유전자형이 나타났으며, DRB1 0401 (20%), 그리고 DRB1 0403 (20%)이 가장 많은 유형이었다. 중부지역에서는 모두 8종류의 대립유전자형이 나타났으며, DRB1 0403 (15.39%), DRB1 0701 (15.39%), DRB1 090102 (15.39%)이 제일 많은 유형이었다. 북부지역에서 DRB1*0401만이 발견되었다.

고 찰

본 연구에서는 한국과 몽골에서 출토된 옛사람뼈에서 분리한 DNA를 대상으로 HLA-DRB1의 대립유전자형을 분석하고자 하였다. 이를 위해 새로운 프라이머를

Table 4. Area distribution of HLA-DRB1 allele types of Mongolian ancient bones

Area	DRB1 allele types	Number	GF (%)
East (n=15)	DRB1*030101	1	6.67
	DRB1*0401	3	20.00
	DRB1*0403 (0452)	3	20.00
	DRB1*0405	1	6.67
	DRB1*0801	1	6.67
	DRB1*0802	1	6.67
	DRB1*090102	1	6.67
	DRB1*1101	1	6.67
	DRB1*130201	1	6.66
	DRB1*140101 (1454, 1439)	1	6.66
	DRB1*1412	1	6.66
Central (n=13)	DRB1*0403 (0452)	2	15.39
	DRB1*0405	1	7.69
	DRB1*0701	2	15.39
	DRB1*0801	1	7.69
	DRB1*0802	1	7.69
	DRB1*090102	2	15.39
	DRB1*1001	1	7.69
	DRB1*1201 (1210, 1206)	1	7.69
North (n=5)	DRB1*140101 (1454, 1439)	1	7.69
	DRB1*1501	1	7.69
West (n=46)	DRB1*0401	5	100.00
	DRB1*010101	1	2.17
	DRB1*030101	1	2.17
	DRB1*0401	6	13.04
	DRB1*0402	1	2.17
	DRB1*0403 (0452)	2	4.35
	DRB1*0405	1	2.17
	DRB1*0406	1	2.17
	DRB1*0408	1	2.17
	DRB1*0451	1	2.17
	DRB1*0701	1	2.17
	DRB1*0802	4	8.70
	DRB1*080302	1	2.17
	DRB1*090102	2	4.35
	DRB1*1001	4	8.70
	DRB1*1104	1	2.17
	DRB1*1130	1	2.17
DRB1*1301	2	4.35	
DRB1*140301	4	8.70	
DRB1*1501	9	19.57	
DRB1*1502 (1519)	1	2.17	
DRB1*160201	1	2.17	
Unknown (n=8)	DRB1*0403 (0452)	1	12.50
	DRB1*0701	1	12.50
	DRB1*0801	1	12.50
	DRB1*090102	1	12.50
	DRB1*140101 (1454, 1439)	2	25.00
DRB1*1501	2	25.00	

개발하였고 기존에 개발한 DNA 분리정제 방법을 이용하여 옛사람뼈에서 분리한 DNA에 적용하여 성공적으

로 HLA-DRB1의 유형을 분석할 수 있었다.

HLA 유전자복합체는 사람의 유전체에서 가장 높은 다양성을 나타내며, 분포와 빈도는 개체군마다 다르게 나타난다. 그러므로 각기 다른 사람 사이나 개체군 사이에서 사립체 유전자형 분석이나 Y 성염색체 유전자형 분석뿐만 아니라, HLA의 유형분석을 추가하여 사람의 진화연구에 폭넓게 연구되고 있다(Anzai 등 1999, Caillat-Zucman 2009). 염기서열분석을 이용한 HLA 유형 분석은 높은 해상력을 가지고 있으며 현대인의 개체군 연구나 질병연구에 사용되고 있다. 최근 들어 옛사람의 유전자분석에서 HLA 분석이 가지는 의의는 고고학이나 형질인류학 분야에서도 커지고 있다. 그러나 옛사람의 잔존물에 적용하여 HLA를 분석하기는 쉽지 않아 연구 보고서도 비교적 적으며(Hansen과 Gutler 1983, Lawlor 등 1991, Rothschild 등 1992, Anzai 등 1999, Fischer 등 2001, Haak 등 2005, Fontecchio 등 2006), 이는 추출 DNA에서 유전자의 증폭이 어렵기 때문이다. 옛사람뼈에서 분리 정제된 DNA는 절단되어 짧아져 있고, 양도 작으며, PCR 억제물질들이 함께 존재하기 때문이다. 더욱이 양이 많이 있는 사립체 DNA와는 반대로 HLA 유전자와 같이 핵에 존재하는 DNA는 양이 적기 때문에 증폭이 상대적으로 어렵다. 최근에 본 연구자들은 옛사람뼈에서 DNA를 분리하고 PCR을 이용해 증폭할 수 있는 방법을 개발하였다(Kim 등 2008a). 이 방법으로 적은 양이 존재하는 시료에서도 성공적으로 유전자를 증폭해 왔다(Kim 등 2010). 본 연구에서는 옛사람에서 순수분리한 DNA를 대상으로 HLA-DRB1 유전자를 증폭하고자 개발한 최적의 프라이머를 이용하여 옛사람뼈 DNA에서 성공적으로 PCR 증폭에 성공하였다.

지금까지 옛사람의 잔존물에서 HLA 유전자 분석이 보고된 자료를 보면 다음과 같다. 그린란드에서 AD 1500년 경의 것으로 추정되는 동결 보존된 8 명의 에스키모의 시신(Hansen과 Gutler 1983)에서 처음으로 시도된 바 있다. 그 후 미국에서 발견된 BC 6000년부터 BC 4000년 사이의 아메리카 원주민 미이라에서 HLA-DQA에 대한 분석(Lawlor 등 1991)이 시도되었다. 일본에서는 BC 4000년부터 BC 3000년 사이로 추정되는 조몬문화(Jomon)를 가진 두 명의 옛사람뼈에서 HLA-DRB1과 HLA-DQA1을 분석하였다(Anzai 등 1999). 그 결과 두 개체군의 HLA 유형은 현대의 일본뿐만 아니라 아시아 북부지역의 개체군들과 유관하다는 결론을 내렸다. 1991년 알프스 티롤 지방에서 발견된 BC 3000년경의 동결 보존된 미이라에서는 HLA-DRB1 1402의 유형이 밝혀진 바 있다(Fischer 등 2001). 이 유형은 현

대유럽인에게서는 매우 드물며, 북극지방에 거주하고 있는 이누이트와 남아메리카의 원주민에서 흔하다. 이탈리아의 한 무덤군에서 발견된 AD 1400년에서 AD 1800년 사이의 한 남성 옛사람뼈에서 강직성척추염의 흔적이 발견되어 HLA-B27의 유전자형이 조사된 바 있다(Haak 등 2005). 또한 이탈리아의 다른 무덤군에서 발견된 16세기의 여성 미이라에서 류마티스 관절염의 소견이 관찰되어 HLA-DRB1 유전자형이 분석된 바 있다(Fontecchio 등 2006). 류마티스 관절염은 BC 5000년 경에 아메리카 대륙의 원주민에서 기원하였다고 알려져 있다(Rothschild 등 1992).

HLA는 장기이식 거부반응과 면역반응에 관련된 유전자를 포함하고 있으며(Cassinotti 등 2009), 사람에게서 수 백 종류의 질병과 관련이 있으며 특히 자가면역질환과 연관이 있다(Shiina 등 2004). 그러나 DNA의 분자적 수준에서 HLA가 질병과 관련이 있다는 기전은 아직 분명하지 않다. 이러한 이유중의 하나는 질병은 여러 원인들, 즉 다른 유전적 원인이나 환경적 원인에 연관되어 있어 복잡한 과정을 이루고 있기 때문이다(Caillat-Zucman 2009). HLA는 인간유전체에 존재하는 유전체계 중에서 가장 많은 다양성을 나타내는 부위로서, 서로 다른 민족 또는 인종이나 지형학적으로 다른 곳에 위치한 개체군에서 질병연구뿐만 아니라 집단유전학을 연구하는데 중요한 과제가 된다(Miao와 Wang 2007).

살아있는 조직과 달리 수백 또는 수천 년이 지난 옛사람뼈에 남아있는 극소량의 DNA를 효율적으로 추출하기는 쉽지 않다. 보존 상태가 좋지 않은 옛사람뼈의 경우 흔히 PCR 증폭을 억제하는 물질들이 다량 함유되어 있어 DNA의 순수정제가 더욱 쉽지 않다. 기존에 상품화되어 있는 GENE CLEAN[®] kit와 Qiaquick[®] 컬럼(Yang 등 1998) 보다는 이온교환수지를 이용한 DNA 추출법이 다른 두 가지 방법보다 우수하다(Kim 등 2007, Kim 등 2008a). 이온교환수지의 단점으로는 한 차례의 과정을 더 추가함으로써 오염의 소지가 높아진다는 점과, 이 과정에 의해 DNA의 소실이 있다는 점이다. 그러므로 기본 방법으로 옛사람뼈에서 DNA가 증폭이 안되는 경우에만 이온교환수지를 추가적으로 이용하는 것이 전략이라 할 수 있다(Kim 등 2008b).

본 실험의 결과를 볼 때, 한국인과 몽골인에서는 샘플 수가 적어 어떤 경향을 비교관찰하기는 어려운 형편이다. 앞으로 자료가 더 축적되면 현대의 한국인, 현대의 몽골인과 비교될 수 있으리라 생각한다. 또한 아시아와 유럽의 다른 개체군과의 비교도 가능해지리라 생각한다. 몽골의 결과를 단순하게 보면 다른 지역에 비해

샘플 수가 많기 때문인지는 몰라도 비교적 다양한 유전자 유형이 나타났다. 이는 서부 지방이 지리적으로 볼 때 중앙아시아와 유럽에 가까운 지역이고, 역사적으로 볼 때 서쪽지역의 많은 인종과 접촉이 활발한 결과를 반영하는 것으로 추정할 수도 있다.

이 연구에서는 옛사람뼈에서 순수분리한 DNA에서 HLA-DRB1의 유전자 연구가 가능한 방법을 밝히는 것이 주요 목표이다. 일반적으로 옛사람뼈 유전자 연구가 성공적인 결과를 가져오기 위해서 실험기법상 중요하게 다루어져야 할 요소는 PCR을 이용한 DNA 증폭이다. 일반적으로 PCR에 영향을 미치는 요소는 크게 다섯 가지인 MgCl₂, 프라이머, BSA, Taq DNA 중합효소, dNTP로 구분할 수 있다. MgCl₂는 표준양인 1.5mg에서 약간 높여 사용하면 민감도를 높일 수 있지만, 원하지 않는 산물이 형성되어 특이성을 낮추는 위험을 감수해야 한다(Kim 등 2008b). BSA의 함량에는 정해진 규칙이 없지만 필수적으로 함유가 되어야 PCR 성공률을 높일 수 있다. 프라이머는 처음 PCR을 시도할 경우에 보통 0.5 μM을 사용한다. PCR이 성공적이면 0.2 μM까지도 사용한다. 학자들에 따라서는 1 μM까지도 사용하기도 한다. 그러나 필요 이상으로 많은 양의 프라이머를 사용하면, 비특이적 산물이 생산될 수 있으며, 프라이머 중합체의 형성이 심하게 일어날 수 있다(Kim 등 2008b). Taq DNA 중합효소는 50 μL 반응부피 조건에서 흔히 1.25 unit이 표준양으로 알려져 있다. 옛사람뼈에서는 1.25 ~ 2.5 U/50 μL까지 다양하게 시도되고 있다. 일반적으로 Taq DNA 중합효소의 양이 많아지면 생산물의 양이 많아질 수 있지만, 더불어 비특이적 산물이 생산될 가능성이 높은 것으로 알려져 있다(Kim 등 2008b). dNTP는 핵산의 기질 성분으로서 PCR시 0.2 mM이 표준양으로 사용된다. 옛사람뼈 PCR의 경우에도 dNTP의 양은 변함없이 0.2 mM이 사용된다. 따라서 dNTP의 양이 PCR의 성능을 결정하는데 큰 영향을 끼치지 않음을 시사하고 있다(Kim 등 2008b). 이와 같은 점에서 볼 때 PCR 반응액을 구성하는 각각의 성분들의 양에 따라서 PCR의 민감도와 효율성이 증가되거나 감소되는 것을 알 수 있다. 그러나 서로 다른 양의 성분들이 서로 혼합되는 경우에 잠재적으로 일어날 수 있는 PCR 성공율은 예측할 수 없다.

현대인의 유전정보 분석에 의존해서 지난 과거의 정보를 유추될 때 발생될 수 있는 인류의 계통발생학적 결론의 오류, 편차, 왜곡 또는 모호성 등을 극복하는데 옛사람뼈 DNA에서 얻은 정보들은 중요한 역할을 한다(O'rouke 등 1996). 또한 오염된 DNA에 대한 결과

의 도출에 대해 유의해야 하며, 이미 많은 학자들이 밝힌 바와 같이 옛사람뼈 DNA를 연구하는데 필요한 주의사항들을 따라야 한다(Bar 등 2000, Alonso 등 2001, CarPELLI 등 2003).

본 연구자들은 극히 일부의 연구자에서만 가능했던 옛사람뼈에서 분리정제한 DNA에서 HLA의 연구, 특히 DRB1 연구의 가능한 방법을 본 논문을 통해 밝히고, 이 분야의 많은 연구자들이 보다 나은 연구결과를 도출해 낼 수 있기를 기대한다.

참 고 문 헌

- Alonso A, Andelinovic S, Martin P, Sutlovic D, Erceg I, Huffine E, de Simon LF, Albarran C, Definis-Gojanovic M, Fernandez-Rodriguez A, Garcia P, Drmic I, Rezic B, Kuret S, Sancho M, Primorac D : DNA typing from skeletal remains: evaluation of multiplex and megaplex STR systems on DNA isolated from bone and teeth samples. *Croatian Med J* 42: 260-266, 2001.
- Anzai T, Naruse TK, Tokunaga K, Honma T, Baba H, Akazawa T, Inoko H : HLA genotyping of 5,000- and 6,000-year-old ancient bones in Japan. *Tissue Antigens* 54: 53-58, 1999.
- 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.
- Blake E, Mihalovich J, Higuchi R, Walsh PS, Erlich H : Polymerase chain reaction (PCR) amplification and human leukocyte antigen (HLA)-DQ alpha oligonucleotide typing on biological evidence samples: casework experience. *J Forensic Sci* 37: 700-726, 1992.
- Caillat-Zucman S : Molecular mechanisms of HLA association with autoimmune diseases. *Tissue Antigen* 73: 1-8, 2009.
- 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.
- Cassinotti A, Birindelli S, Clerici M, Trabattoni D, Lazzaroni M, Ardizzone S, Colombo R, Rossi E, Porro GB : HLA and autoimmune digestive disease: a clinically oriented review for gastroenterologists. *Am J Gastroenterol* 104: 195-217, 2009.

- Cattaneo C, Smillie DM, Gelsthorpe K, Piccinini A, Gelsthorpe AR, Sokol RJ : A simple method for extracting DNA from old skeletal material. *Forensic Sci Int* 74: 167-174, 1995.
- Faerman M, Filon D, Kahila G, Greenblatt CL, Smith P, Oppenheim A : Sex identification of archaeological human remains based on amplification of the X and Y amelogenin alleles. *Gene* 167: 327-332, 1995.
- Fischer GF, Fae I, Mann D, Kriks D, Jager W, Platzer W, Mayr WR, Volc-Platzer B : An HLA class-II allele frequent in Eskimos and Amerindians is found in the Tyrolean Ice Man. *Ann Hum Genet* 65: 363-369, 2001.
- Fontecchio G, Ventura L, Azzarone R, Fioroni MA, Fornaciari G, Papola F : HLA-DRB genotyping of an Italian mummy from the 16th century with signs of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 65: 1676-1677, 2006.
- Gilbert MT, Bandelt HJ, Hofreiter M, Barnes I : Assessing ancient DNA studies. *Trends Ecol Evol* 20: 541-544, 2005.
- Haak W, Gruber P, Ruhli FJ, Boni T, Ulrich-Bochsler S, Frauendorf E, Burger J, Alt KW : Molecular evidence of HLA-B27 in a historical case of ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum* 52: 3318-3319, 2005.
- Hagelberg E, Clegg JB : Isolation and characterization of DNA from archaeological bone. *Proc Biol Sci* 244: 45-50, 1991.
- Handt O, Höss M, Krings M, Pääbo S : Ancient DNA: methodological challenges. *Experientia* 50: 524-529, 1994.
- Hänni C, Brousseau T, Laudet V, Stehelin D : Isopropanol precipitation removes PCR inhibitors from ancient bone extracts. *Nucleic Acids Res* 23: 881-882, 1995.
- Hansen HE, Gurtler H : HLA types of mummified Eskimo bodies from the 15th century. *Am J Phys Anthropol* 61: 447-452, 1983.
- Höss M, Jaruga P, Zastawny TH, Dizdaroglu M, Pääbo S : DNA damage and DNA sequence retrieval from ancient tissues. *Nucleic Acids Res* 24: 1304-1307, 1996.
- 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.
- Kalmar T, Bachrati CZ, Marcsik A, Rasko I : A simple and efficient method for PCR amplifiable DNA extraction from ancient bones. *Nucleic Acids Res* 28: E67, 2000.
- 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-Tracqui C, Ludes B : Methods for the study of ancient DNA. *Methods Mol Biol* 297: 253-264, 2005.
- Kim K, Brenner CH, Mair VH, Lee KH, Kim JH, Gelegdorj E, Batbold N, Song YC, Yun HW, Chang EJ, Lkhagvasuren G, Bazarragchaa M, Park AJ, Lim I, Hong YP, Kim W, Chung SI, Kim DJ, Chung YH, Kim SS, Lee WB, Kim KY : A western Eurasian male is found in 2000-year-old elite Xiongnu cemetery in Northeast Mongolia. *Am J Phys Anthropol* 2010 Jan 20. [Epub ahead of print]
- Kim K, Kim KY, Jeon E, Togloom A, Cho YO, Lee MS, Lkhagvasuren G, Choi JH, Tumen D, Ja Park A, Kim KC, Park KW, Kim JH, Noh M, Yoo KJ, Lee KH : Technical note: improved ancient DNA purification for PCR using ion-exchange columns. *Am J Phys Anthropol* 136: 114-121, 2008a.
- Kim KJ, Togloom A, Jeon EH, Lee MS, Cho YO, Lkhagvasuren G, Choi JH, Tumen D, Kim KC, Kim JH, Noh M, Park JW, Park AJ, Yoo KJ, Kim JD, Lee KH, Kim KY : Development of ancient DNA isolation method for improved PCR amplification. *Korean J Phys Anthropol* 20: 267-281, 2007.
- Kim KY, Woo JY, Kim KJ : Establishment of PCR reaction condition for highly successful ancient DNA PCR. *Korean J Anthropol* 21: 91-103, 2008b.
- Kolman CJ, Tuross N : Ancient DNA analysis of human populations. *Am J Phys Anthropol* 111: 5-23, 2000.
- Kumar SS, Nasidze I, Walimbe SR, Stoneking M : Brief communication: discouraging prospects for ancient DNA from India. *Am J Phys Anthropol* 113: 129-133, 2000.
- Kurosaki K, Matsushita T, Ueda S : Individual DNA identification from ancient human remains. *Am J Hum Genet* 53: 638-643, 1993.
- Lawlor DA, Dickel CD, Hauswirth WW, Parham P : Ancient HLA genes from 7,500-year-old archaeological remains. *Nature* 349: 785-788, 1991.
- Miao KR, Wang CY : The population genetics study in HLA field. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi* 24: 548-550, 2007.
- Mulligan CJ : Isolation and analysis of DNA from archaeological, clinical, and natural history specimens. *Methods Enzymol* 395: 87-103, 2005.
- O'rouke DH, Carlyle SW, Parr RL : Ancient DNA: methods, progress, and perspectives. *Am J Hum Biol* 8: 557-571, 1996.
- Pääbo S : Ancient DNA: extraction, characterization, molecular cloning, and enzymatic amplification. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 1939-1943, 1989.
- Poinar HN, Höss M, Bada JL, Pääbo S : Amino acid racemization and the preservation of ancient DNA. *Science* 272: 864-866, 1996.
- Rohland N, Hofreiter M : Comparison and optimization of ancient DNA extraction. *Biotechniques* 42: 343-352, 2007.

Rothschild BM, Woods RJ, Rothschild C, Sebes JI : Geographic distribution of rheumatoid arthritis in ancient North America: implication for pathogenesis. *Semin Arthritis Rheum* 22: 181-187, 1992.

Shiina T, Inoko H, Kulski JK : An update of the HLA genomic region, locus information and disease associations:

Tissue Antigens 64: 631-649, 2004.

Yang DY, Eng B, Wayne JS, Dudar JC, Saunders SR : Technical note: improved DNA extraction from ancient bones using silica-based spin columns. *Am J Phys Anthropol* 105: 539-543, 1998.

HLA-DRB1 Study of DNA from Ancient Human Skeleton by Sequence-based Typing

Ji-Young Woo, Kijeong Kim, Bazarragchaa Munkhtsetseg, Jae-Hyun Kim¹, Gavaachimed Lkhagvasuren², Dong-Suep Sohn³, Ae-Ja Park⁴, Kwang-Ho Lee⁵, Dae-Jin Kim⁶, Yoon-Hee Chung⁶, Sung-Su Kim⁶, Won-Bok Lee⁶, Kyung-Yong Kim⁶

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 Thoracic Surgery, College of Medicine, Chung-Ang University*

⁴*Department of Laboratory Medicine, College of Medicine, Chung-Ang University*

⁵*Department of Life Science, College of Natural Sciences, Chung-Ang University*

⁶*Department of Anatomy, College of Medicine, Chung-Ang University*

Abstract : The analysis of ancient human DNA is increasingly used recently in the study of anthropology and human evolution. Although mitochondrial DNA and Y chromosomal DNA has commonly been the target in the field of human DNA study, HLA analysis of ancient human DNA is extremely rare.

This study aimed to develop the PCR method of ancient human DNA for analyzing the sequence of HLA. Authors established a new method for HLA-DRB1 analysis by sequence-based typing. Alleles of HLA-DRB1 were analyzed and typed by sequencing with DNA of ancient human skeletons from Korea and Mongolia 3000-500 years ago.

The types of HLA-DRB1 were determined by comparing the sequences with those of HLA database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Tools/blast2/nucleotide.html>). The alleles of HLA-DRB1 of ancient human DNA from Korea and Mongolia were classified by types. The frequencies of HLA-DRB1 types of Mongolia were also presented according to the geography such as West, Central, East, and North.

In summary, our method was successful in the analyzing the type of HLA-DRB1 from DNA of ancient human bones. Authors anticipate that many researchers could do their research in a better way to get the genetic information for the kinship analysis between individuals or communities from ancient human bones.

Keywords : Ancient human bone, DNA, HLA-DRB1, PCR