

고대DNA배열분석에 의한 진화연구

허동수, 강일

위대한 령도자 김정일동지께서는 다음과 같이 교시하시였다.

《세계최신과학기술의 성과를 널리 받아들이지 않고서는 나라의 과학기술을 최단기간에 전반적으로 세계적수준에 올려세울수 없습니다.》(《김정일선집》 증보판 제15권 500페이지)

세계적으로 고고학적시료에서 분리한 고대DNA의 염기배열을 해석하여 여러가지 진화문제를 연구하고있다.

고대DNA는 생물의 진화연구에서 매우 중요하다.

그것은 우선 DNA가 생물의 생물학적특징을 규정하기때문이다. 다시말하여 고대DNA의 연구를 통하여 고고학적시료에서 일부 생물학적특징을 확인할수 있기때문이다. 실례로 고고학적뼈를 리용한 고대DNA해석은 고대의 사람뿐아니라 동물의 성감별에서 가장 많이 리용되는 방법이다. 그리고 사람들이 식물을 처음으로 재배하기 시작한 후 종의 재배관련특징이 어떻게 변화하였는가를 고대DNA연구를 통하여 알아낼수 있다. 강냉이의 경우 이러한 특징들에는 식물초형에서의 변화와 단백질과 당이 낱알에 도입되는 방식에서의 변화가 포함된다. 각이한 시기에 보존된 강냉이시료에 대한 DNA연구를 통하여 사람들이 처음으로 작물을 어떻게 리용하였는가 하는것과 재배과정에 생기는 진화과정을 알수 있다.

다음으로 DNA를 연구하여 생물(특히 사멸종)이 속하는 종을 확인할수 있기때문이다.

끝으로 그것이 개체의 선조기록을 포함하고있기때문이다. 모든 산 생물의 DNA는 선대로부터 넘겨받으며 량친DNA의 특징을 가지고있다. 실례로 DNA가 두 사람이 친척인가 혹은 나이관계에서 부모와 자식사이인가를 확정하는데 리용될수 있다. 고고학적재료인 경우에는 산 사람의 DNA시료만큼 정확도를 보장하기 어렵지만 고고학적장소에 함께 묻힌 골격집단사이의 친족관계를 결정하기 위한 고대DNA리용에서는 많은 전진이 이루어졌다.[1, 3]

고대DNA는 산 생물의 DNA보다 분리하기 어렵기때문에 보통의 방법과는 다른 방법으로 분리한다.

먼저 시료에서 모든 가용성분자를 추출한 다음 이 혼합물속에서 DNA분자를 정제한 다. 산 생물의 시료에 대해서는 완충액에서 시료를 균마하여 가용성성분이 우러나오게 한 후 원심분리하면 가용성분자는 상청액에 남지만 대부분의 인류화석이나 뼈들에서는 고대DNA가 완전히 용해되지 않는다. 그것은 성암작용과정에 그것이 기질에 굳게 결합되거나 균마과정에 파괴되지 않기때문이다.

최근의 연구[2, 4]는 고대DNA의 일부가 뼈기질내에 결정침전물상태로 포함된다는것을 보여주었다. 이 침전물은 뼈를 분쇄할 때 추출되지 않는다. 칼시움이온을 제거하는 EDTA 용액에 뼈분말을 잠그면 고대DNA를 더 많이 얻을수 있다.

주요오염물질은 성암작용산물과 주위환경에서 얻은 시료에 의하여 흡수된 화합물이다. 주요한 성암과정은 단백질과 당질사이의 복잡한 호상작용인 마일라드반응이다.

환경오염물질의 성질은 연구되는 물질의 형태와 보존조건에 의존한다. 실례로 묻힌

빠인 경우 오염물질로서 식물이 토양속에서 분해되어 생긴 부식산과 같은 화합물들을 들 수 있다.

이러한 성암산물과 기타 오염물질은 현대DNA정제방법으로는 제거되지 않는다. 따라서 대부분의 고대DNA정제절차에서는 실리카결합을 이용한다. 구아니디움티오시안산염이 있는 조건에서 DNA는 실리카립자와 굳게 결합하기때문에 수용성추출물로부터 DNA를 회수하기 쉽다. 즉 실리카를 원기둥에 채워넣고 추출물을 넣으면 DNA의 실리카에 대한 결합 세기가 크기때문에 원기둥에 남지만 오염물질은 통과해나간다. 다음 구아니디움티오시안산염용액으로 남은 오염물질을 세척한 후 물을 넣어 DNA를 회수한다. 물은 DNA분자와 실리카사이의 호상작용을 불안정하게 한다.

고고학적발굴시료들에서 추출한 고대DNA는 기껏 $100\mu\text{L}$ 에 포함되게 된다. 실리카추출물로부터 얻는 체적이 이것보다 크면 고대DNA를 에타놀침전에 의하여 농축할수 있다.[5, 6]

초시기에는 분리한 DNA의 염기배열을 디데옥시법(사슬종결법)으로 결정하였지만 최근에는 피로배열결정법, 일루미나배열결정법, 이온분출배열결정법 등 새로운 원리에 기초한 DNA배열결정방법들이 개발되어 널리 이용되고있고 DNA증폭단계를 거치지 않고 1개의 DNA분자를 대상으로 하는 보다 신속하고 효과적인 배열결정방법들도 계속 개발되고 있다. 이 방법들에서는 자료를 처리하는데 효소학, 화학, 고해상도광학 등의 방법들을 결합하여 이용한다.

한가지 실례로 피로배열해석법을 들수 있는데 그 우점은 전기영동분리공정이 없고 사슬종결방법보다 간단하고 빠른것이다. 이 방법으로 한번의 실험에서 수천개의 짧은 염기배열을 결정할수 있다. 100Mb 이상의 염기배열을 한번에 결정할수 있기때문에 이 배열분석법은 전게놈배열결정에서 효과적이다. 이 방법은 털코끼리와 동굴곰과 같은 사멸한 동물, 네안데르탈사람의 게놈을 연구하는데도 이용되고있다.

이 고성능배열분석법에서는 우선 배열을 결정할 DNA단편들의 서고를 준비한다. 현대DNA경우 $300\sim 500\text{bp}$ 의 단편들로 분해한다. 고대DNA시료의 경우에는 배열길이가 짧은 경우가 많기때문에 이 조작을 하지 않을수도 있다.

피로배열해석법에서는 2개의 짧은 표리표를 매 DNA단편에 연결시키는데 이것은 다음의 두가지 역할을 한다.

첫째로, DNA단편이 작은 금속구에 결합되게 한다. 5'-말단에 비오틴화데핵산을 결합시키면 비오틴은 금속구를 덮은 스트렙타비딘에 대한 친화성이 강하기때문에 DNA단편이 비오틴-스트렙타비딘결합을 통하여 금속구에 결합되게 된다.

둘째로, 프라이머의 아닐링부위로 된다. 그러므로 단편자체는 각이한 배열이지만 같은 쌍의 프라이머가 모든 단편의 증폭에 이용된다.

피로배열결정법에서는 주형에 디데옥시뉴클레오티드(ddNTP)를 넣지 않고 사슬연장반응을 진행한다. 새로운 DNA사슬이 만들어질 때 뉴클레오티드트리핀산(dNTP)이 도입되는 순서를 검출하며 염기배열은 반응이 진행됨과 동시에 읽혀진다.

우선 염기를 dNTP형태로 넣는다. 1개의 뉴클레오티드가 부가될 때마다 피로린산이 방출되게 되는데 ATPsulphuryl라제는 아데노신린류산염(APS)과 피로린산을 ATP로 전환시킨다.

다음 이것이 반디의 루시페라제에 의하여 루시페린을 산화시켜 빛이 방출되게 한다. 리용되지 않은 dNTP와 ATP는 다음번 dNTP를 넣기 전에 아피라제로 분해한다.

루시페라제가 ATP와 dATP를 모두 리용하므로 dATP가 부가되지 못하는것과 관련하여 DNA폴리메라제는 리용하지만 루시페라제가 리용하지 못하는 류사체인 α -티오-dATP

를 넣어준다. 이것은 첫번째 린산기가 류산기로 바뀐것이다.

한번에 4가지 dNTP를 모두 넣으면 빛이 연속 발생하여 배열정보가 얻어지지 않기때문에 매 dNTP를 개별적으로 차례로 넣는다. 이때 아피라제를 반응액에 넣어주어 폴리뉴클레오티드에 도입되지 않은 dNTP를 다음의 dNTP가 첨가되기 전에 인차 분해해버린다.

이 순서로 dNTP가 DNA사슬의 연장때 도입되는 순서를 추적한다. 조작이 복잡한것처럼 보이지만 반응액에 단지 시약을 넣는 조작이 반복되므로 이 조작을 정확하면서도 쉽게 자동화할수 있고 따라서 고속대량화를 실현할수 있다.

피로배열결정법에 기초한 2세대DNA배열결정장치인 454배열결정장치에서는 4h동안에 4억bp의 배열정보를 생성할수 있다.

이 장치에서는 우선 혼합물을 충분히 희석하여 1개의 DNA분자가 1개의 구에 결합되게 한다. 다음 DNA가 결합된 구를 40만개의 pL크기의 우물이 규칙적으로 배열된 실리콘판에 분산시킨다. 우물의 크기가 작으므로 매 구멍에 1개의 구만이 들어가게 된다. 구에 결합된 DNA에 대하여 PCR를 진행하여 매 DNA분자를 증폭한다. 따라서 매 구멍에서 균일한 DNA분자무리가 만들어지며 다음 그것을 주형으로 하여 새로운 DNA를 합성한다. 이때 dATP와 dGTP, dCTP, dTTP를 하나씩 차례로 넣어주고 결합되지 않은 데옥시뉴클레오티드기질은 세척해버리면서 배열결정반응을 순차적으로 진행시킨다.

주형에 상보적인 염기가 있으면 1개의 데옥시뉴클레오티드가 부가되면서 피로린산이 방출된다. 이것이 효소반응에 의하여 빛을 내보내면 검출기가 검출하여 컴퓨터에 자료를 전송한다. 빛이 생겼다는것은 매 우물에서 어떤 염기가 부가되었다는것을 의미하며 따라서 40만개의 모든 우물에 있는 DNA의 배열에 대한 자료가 얻어진다.

매 DNA단편으로부터 약 220~250bp의 배열이 얻어질 때까지 매 뉴클레오티드를 순차적으로 넣어주면서 반응시킨 다음 그 자료들을 종합처리한다.

이러한 방법으로 많은 사멸종들의 DNA염기배열이 결정되었다. 고대DNA의 많은것들이 몇만년전의 시료에서 얻어졌는데 실제로 네안데르탈사람시료는 약 3만년전의것이고 기타 가장 오래된 시료는 5만~1억년전의것이다.

DNA염기배열이 결정된 대표적인 사멸종은 줄말(quagga), 유대승냥이(marsupial wolf), 검이발고양이(sabre-toothed cat), 모아(Moa), 털코끼리(mammoth), 동굴곰(cave bear), 푸른들양(blue antelope), 게으름뱅이(giant ground sloth), 유럽들소(aurochs), 마스토돈(mastodon), 뉴질랜드큰물닭(New Zealand coot), 남이슬란드피오피오(South Island piopio), 스텔라바다소(Steller's sea cow), 네안데르탈사람(Neanderthal man), 남이슬란드아드제빌(South Island adzebill, *Aptornis defossor*), 샤스터게으름뱅이(Shasta ground sloth), 돼지발피물쥐(pig-footed bandicoot), 모아-날로(moa-nalo), 발레아레스제도동굴염소(Balearic Islands cave goat, *Myotragus balearicus*) 등이다.[7]

배열결정된 고대DNA는 옛생물집단과 현대생물집단사이, 고고학적시료와 현대생물사이의 진화관계를 해석하는데 리용된다.

1984년에 사멸종으로부터 DNA배열을 결정하는데 처음으로 성공하였다. 1883년에 사멸된 줄말(*Equus quagga*)의 박물관시료로부터 마른 근육시료를 얻었는데 이 근육시료는 도이칠란드 역사박물관의 소금속에 보관되어있었다. 이 시료로부터 DNA를 추출하여 운반체에 클론화한 다음 줄말DNA의 배열을 결정하였다. 이 연구는 분자고생물학으로 알려진 고대DNA해석분야를 개척하였다.

DNA가 생물이 죽은 후에 얼마나 오래 남아있을수 있는가 하는것이 현재 중요한 논점으로 되고있다. 시간이 경과함에 따라 DNA구조는 물작용분해에 의하여 파괴되고 푸린

이 없어지지만 일정한 조건(실제로 저온, 저산소조건)에서 DNA시료는 50 000~100 000년 동안 안정하게 남아있을수 있다. 고대시료(특히 소금보존한 줄말시료보다 오랜것.)에 대한 대부분 연구에서 고대DNA는 뼈, 마른 근육, 피부로부터 추출하는데 이것은 고고학자들이 수집한 박물관시료로부터 흔히 얻을수 있다. 또한 DNA를 운반체에 직접 클론화할수 있을 만큼 충분한 량으로 얻기도 한다.[3, 4, 6]

고대DNA를 리용하여 날지 못하는 사멸된 조류종과 현대종사이의 진화관계를 조사하였다.[7] 날지 못하는 두 조류집단인 모아(moa)와 키위(kiwi)는 갱신세에 뉴질랜드에서 존재하였는데 이전에는 11종 있었지만 현재 모아는 사멸되었다. 이 연구에서 박물관시료로 리용할수 있는 4개의 사멸종모아, 3개의 뉴질랜드키위, 기타 몇종의 날지 못하는 조류사이의 계통관계를 조사하였는데 여기에는 에뮤(emu)와 카수아리(cassowary, 오스트랄리아와 뉴기니아), 타조(ostrich, 아프리카와 아시아), 두 레아(남아메리카)가 포함되었다.

다양한 종으로부터 얻은 시료를 가지고 PCR를 진행하여 rRNA유전자를 증폭하고 그 유전자배열을 결정한 결과 몇가지 놀라운 결과가 얻어졌다.

키위(뉴질랜드종)의 DNA배열의 일정한 부위는 타조(아프리카종)배열과 같지만 뉴질랜드의 모아배열과는 달랐다. 마찬가지로 키위DNA배열의 몇개 부위는 에뮤와 카수아리(오스트랄리아, 뉴기니아)와 같지만 모아와는 달랐다. 이처럼 초기예상과는 반대로 키위가 모아보다 오스트랄리아와 아프리카의 날지 못하는 새에 더 가깝다는 결론이 얻어졌다. 이로 부터 뉴질랜드에 있는 날지 못하는 새의 선조가 두번 정착했다고 보게 되었다.[7, 9]

고대사람DNA를 분류하여 전염병, 유전병을 연구할수 있다.

모든 전염병은 뼈에 생체분자흔적을 남긴다. 생체분자고고학의 초시기에 뼈와 기타 시료속의 고대DNA를 처음으로 검출한것은 고고학자료에서 새로운 병을 검출, 연구할수 있게 하는 전망을 열어놓았다. 결핵은 뼈의 생체분자시험에 의하여 가장 널리 연구된 병이다. 결핵균이 초기에는 폐에 영향을 미치지만 혈액, 림파계를 통해 뼈에 전파되어 특히 흉추, 요추를 손상시킬수 있다. 세균은 이러한 감염환자의 뼈와 골수에 존재한다. 결핵이나 다른 원인으로 환자가 죽으면 감염균은 척추나 골수에 남아있거나 혈관에 통해 다른 골격이나 초기감염부위와 가까운 부위로 이동하는데 폐와 가까이 접촉하고있는 갈비뼈겉면으로 이동할수 있다. 죽을 당시 세균이 뼈에 존재하였으므로 그 생체분자잔해가 고고학적표본에 남아있을수 있다.

병원체진화연구를 통하여 고고학적문제도 해결할수 있다.

감염병의 진화를 리해하는것은 병원체의 과거진화경로와 앞으로의 진화에 대한 단서를 주고 림상미생물학자들이 새로운 병발생을 막기 위한 치료법을 찾는 한가지 단계로 되기때문에 현대의학에서 중시되고있다. 일부 경우에 이 진화연구는 고고학적문제에 대한 정보를 제공하기도 한다.[2, 6, 8]

유전병을 고대사람의 DNA를 분류하여 연구할수 있다.

많은 병은 사람계놈에서의 변이에 의해 생기며 부모로부터 후대에 전달되는 유전병이다. 출생자 200명당 한명의 빈도로 개별적유전자의 결함으로 생기는 유전병은 6 000가지 이상이다. 가장 일반적인것은 낭포성섬유증과 한팅턴병, 운동이 비정상인 신경병이다. 다른 병은 훨씬 드물며 일부 병은 매우 적은 가족에서 생기는것으로 알려졌다.

고고학적발굴과정에 발견된 인류화석이나 인골들로부터 추출한 고대사람DNA에서 유전병을 일으키는 많은 변이가 동정되어 분류되었다.[2, 4, 8]

참 고 문 헌

- [1] 허동수; 진화학, 김일성종합대학출판사, 112~223, 주체105(2016).
- [2] R. Daniel et al.; Nature, DOI:10.1038 22335, 2017.
- [3] Kenneth M. Weiss et al.; Genetics and Logic of Evolution, Wiley-Liss, 313~456, 2004.
- [4] R. Kostova et al.; Journal of Archaeological Science: Reports, 29, 1, 2020.
- [5] Leland H. Hartwell et al.; Genetics: From Genes to Genome, McGraw Hill Companies, 791~821, 2008.
- [6] Michael Levy et al.; Evolution and Genetics, Britannica, 8~50, 2008.
- [7] Robert J. Brooker; Genetics: Analysis & Principles, McGraw Hill, 730~756, 2012.
- [8] Tom Strachan et al.; Human Molecular Genetics, Garland Science, 255~297, 2011.
- [9] William S. Klug et al.; Essentials of Genetics, Pearson Education, 419~545, 2017.

주체109(2020)년 4월 5일 원고접수

Study on Evolution by Ancient DNA Sequencing

Ho Tong Su, Kang Il

This review covers importance of ancient DNA in evolution research, isolation method of ancient DNA and successes in evolution research by them. Ancient DNA is difficult to isolate, so that the different methods than usual one should be used. Pyrosequencing, a new method recently developed uses complex interactions of enzymology, chemistry, high-resolution optics and other new method in analyzing sequence data. Ancient DNA sequences are used to examine the evolutionary relations between ancient organism population and modern population, and archaeological samples and modern organisms. In addition, classifying ancient human DNA can be used to research infectious and genetic diseases also.

Keywords: ancient DNA, pyrosequencing, evolution