|  |
| --- |
| **유전자재조합 캐놀라(T45)** **안전성평가자료 심사결과** |

***2005. 1.***

**식 품 의 약 품 안 전 청**

**유전자재조합식품안전성평가자료심사위원회**

**글루포시네이트-암모니아 내성 유전자재조합캐놀라 T45 심사 결과 보고서**

**1. 심사경위**

○ 바이엘크롭사이언스(대표 :앤드류옴)사가 글루포시네이트 제초제에 내성(PAT)을 갖는 유전자재조합캐놀라 T45에 대하여 「유전자재조합식품의 안전성평가심사등에 관한 규정」(식약청 고시 제2003-37호, 이하 '심사규정'이라 함)에 따라 안전성 평가가 이루어졌음을 확인 받기 위하여 2004년 9월 14일 식품의약품안전청장에게 관련 자료를 첨부하여 심사의뢰 하였다.

○ 이에 식품의약품안전청장은 본 제품이 심사규정에 따라 안전성 평가가 이루어졌는지 여부에 대하여 '유전자재조합식품 안전성평가자료 심사위원회'(이하 심사위원회라고 함)에 검토 의뢰하고,

○ 심사위원회는 신청인이 제출한 자료에 근거하여 아래와 같이 심사규정에 따라 안전성 평가가 이루어졌음을 확인하였다.

**2. 심사경과**

○ 심사대상품목

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 대상품목 | 신청자 | 개발자 | 제외국의 안전성 확인(승인) 현황 |
| 유전자재조합캐놀라 T45 | 바이엘크롭사이언스(주) | Bayer CropScience | 미국(1997), 캐나다(1997), 일본(1997), 호주(1999년),  |

○ 심사경과

    - 2004년  9월  1일  안전성 평가자료 심사의뢰

    - 2004년 10월  5일  서류 심사(온라인)

    - 2004년 10월 27일  1차 안전성평가 심사위원회

    - 2004년 12월  9일  2차 안전성평가 심사위원회

    - 2004년 12월 23일  자료 보완요청

    - 2005년 01월 18일  자료보완 접수

    - 2005년 02월 25일  3차 안전성평가 심사위원회

                         최종결과보고서(안) 검토

**3. 심사방법**

○ 본 제품과 관련하여 심사 의뢰된 유전자재조합체가 심사규정의 적용대상인지를검토하고

○ 제출된 안전성 평가자료가 심사규정에서 요구하는 자료를 갖추었는지를 확인하여, 미비한 부분에 대해서는 자료를 보완하도록 한 후 심사규정에 따라 안전성평가를 수행하였다.

**4. 심사의뢰 자료 검토**

**4-1. 심사 의뢰된 식품의 개요**

  ○ 바이엘크롭사이언스사가 개발한 T45 캐놀라는 phosphinothricin acetyltransferase(PAT) 단백질을 암호화하는 유전자인 pat 유전자가 포함되어 제초제에 내성을 나타내는 유전자재조합 캐놀라이다.

**4-2. 식품으로의 적합성 검토**

  ○ 본 제품과 관련하여 제출된 안전성 평가자료가 ‘심사규정’ 제12조 ①항의 규정에서 요구하는 자료를 만족시키는지 여부를 검토하고 미비한 부분에 대해서는 보완하도록 한 후

  ○ 자료의 내용을 토대로 식품으로서의 안전성이 확보되어 있는지를 심사하였다.

**4-2-1 유전자재조합체의 안전성**

  가. 유전자재조합체의 개발목적 및 이용방법에 관한 자료

   - T45 캐놀라는 PAT 단백질을 암호화하는 유전자인 pat 유전자 포함되어 있어 제초제내의 활성성분인 글루포시네이트 암모니아(glufosinate-ammonium)에 대한 내성을 나타나게 하기 위하여 개발되었다.

   - 특정 제초제에 내성을 가지는 특성이외에는 재배방법, 이용목적, 이용방법이 기존의 캐놀라와 동일하다.

  나. 숙주에 관한 자료

   (1) 분류학적 특성(일반명, 학명, 계통분류 등)

      과: Brassicacea

      속: Brassica

      종: napus

      아종: olifera

      일반명: oilseed rape 또는 canola

   (2) 재배 및 품종개량의 역사

 - 숙주인 캐놀라는 캐나다 캐놀라 위원회 소유 상표명으로서 glucosinolate와 erucic acid함량을 낮춘 캐놀라의 품종에 붙여진 이름으로 2차 대전 중 유채기름 부족에 대처하기 위한 육종계획으로 육성된 품종이다. 미국 FDA는 캐놀라 기름을 GRAS(generally regarded as Safe)로 분류하였다(21 CFR§184.1555). 캐놀라 종자는 정제유를 분리하며 나머지 탈지박은 사료로 사용된다.

 - 식품으로 주로 사용되는 것은 식용유(캐놀라 기름)로 중요한 salad 기름이다.

   (3) 기지의 독성 또는 알레르기 유발성

  - 캐놀라와 관련된 유해생리활성물질로서는 erucic acid, glucosinolate, phytic acid 등이 알려져 있으나, 일반적으로 식품에 이용되는 형태의 가공과정에서는 제거된다.

   (4) 안전한 식경험의 유무

      - 유채의 종자개량을 통해 erucic acid와 glucosinolate의 함량이 낮은 종자를 개발하여 식용으로 안전하게 이용된 역사가 있다

  다. 공여체에 관한 자료

   (1) 분류학적 특성(일반명, 학명, 계통분류 등)

     - Cauliflower Mosaic virus: 35S promotor와 terminator를 제공

     - *Streptomyces viridochromogenes*:  pat유전자를 제공

   (2) 안전한 식경험의 유무

     - 식품으로 직접 사용된 역사는 없지만 토양에 상존하는 미생물로 식품오염을 통한 섭취의 경험이 있으며, 인체에 유해성을 나타낸다는 보고는 없다.

   (3) 공여체 및 근연종의 독성, 항영양성, 알레르기성(미생물의 경우 병원성 및 기지의 병원체와의 관련성)

     - Cauliflower mosaic virus :

       Brassicaceae에 한정되는 이중나선구조 DNA를 가진 cauliflower mosaic virus로, 알려진 독성은 없으며 식물병도 초래하지 않는다.

     - Streptomyces 속 균류:

       ․ 스트렙토마이세스(streptomyces)속의 균종들은 그람양성의 포자형성 토양 세균이다. 이들 미생물은 수많은 항균성, 항암성 또는 항기생 활성을 포함하는 독특한 2차 대사산물과 화합물을 생산한다.

       ․ 공여체로부터 유래된 구성유전자와 T45에 삽입된 구성유전자는 동일하다. 공여체나 근연종에 의해 삽입 될 수 있는 독성, 항영양성, 알레르기성을 일으킬 수 있는 유전자는 없다.

  라. 유전자재조합에 대한 자료

   (1) 형질전환에 관한 정보

     (가) 형질전환방법 (아그로박테리움법, 입자총법, 원형질체법 등)

         Agrobacterium법으로 형질전환 되었다.

     (나) 재조합에 사용된 벡터에 대한 정보

       1) 기원

        - pHOE4/Ac(II)는 *E.coli* vetor pPCV002로부터 유래되었으며 oriV와 oriT부위는 *E.coli* vector RK2로부터 유래되었다.

        - 선택표지유전자는 *E.coli* plasmid R538-1로부터 유래되었으며 항생제 내성 유전자로 *E.coli*와 Agrobacterium plasmid만을 선택하도록 한다.

        - Right border sequence : Ti plasmid pTiT37에서 유래됨

        - Left border sequence : Ti plasmid pTiAch5에서 유래됨

        - pat 유전자 : promotor sequence를 구성

        - Promotor와 terminator sequence는 Cauliflower mosaic virus 35S trans- cript에서 유래됨.

      2) 숙주에서의 확인

       - 벡터에서의 T-region은 숙주내에서 southern blot hybridization으로 T-DNA 구조가 확인되었다.

      3) 숙주에서의 기능

        - pat 유전자만이 발현되도록 삽입되었으며, 글루포시네이트 제초제에 내성을 나타내도록 하는 효소인 PAT를 발현하게 한다.

    (다) 중간숙주에 대한 정보

       - 삽입유전자는 *Agrobacterium tumefaciens*에 삽입하여 전달된다.

    (라) 전달성에 관한 정보

       - 숙주에 T-DNA만 삽입되므로 숙주내의 염색체로 삽입된 후에는 전달성이 없다.

   (2) 도입 유전자에 대한 정보

    (가) 구성 유전자의 특성

      1) 선발표지유전자

        - 선발표지 유전자는 *E.coli* plasmid R538-1에서 유래되었으며 strepyomycin /spectinomycin adenyltransferase 유전자를 함유하여 해당 항생제 내성을 가진다. 중간숙주의 선발을 위하여 사용된 표지유전자이며, T-DNA 유전자외부에 있어 유전자재조합 캐놀라에는 삽입되지 않는다.

      2) 조절인자

        - promotor P-35S(510bp)와 terminator T-35S(205bp)는 cauliflower mosaic virus로부터 유래하며, pat의 전사개시와 전사종결인자이다.

      3) DNA의 기능에 영향을 주는 기타 인자

        - 벡터의 기본적인 역할을 하기 위한 기능을 가진 인자 외에는 다른 영향을 주는 기타 인자는 없다.

    (나) 크기 및 명칭

        - 형질전환을 위하여 사용된 벡터는 pHOE4/Ac(II)이며 크기는 6,652 bp(구조유전자포함)이다

    (다) 완성된 벡터내의 유전자 염기서열의 위치 및 방향성

        - 완성된 벡터내의 유전자 염기서열의 위치 및 방향성은 모두 제시되었다

    (라) 구성 유전자의 기능

        - pat 유전자를 발현시키기 위한 유전자 이외의 유전자는 없다.

        - pat유전자는 PAT를 암호화하고 식물세포에 암모니아를 축적시키면서 식물괴사를 초래하는 글루포시네이트 암모니아의 식물독성 활성에 내성을 부여한다.

    (마) 유해염기서열의 유무

        - 모든 염기서열과 기능은 나타나 있으며, 유해성을 나타낼 수 있는 유전자 염기서열은 없다.

    (바) 외래전사해독프레임의 유무와 그 전사 및 발현가능성

        - PAT 단백질의 식물체 내 발현과 관련한 것 이외의 외래전사해독프레임과 그 발현 가능성은 없다.

    (사) 목적하는 유전자 이외의 염기서열의 혼입(유전자의 순도)

        - 공여체 및 T45로부터 얻은 유전적 요소는 분류 및 동정이 잘 되었다. T45의 삽입 염기서열은 확인되었다.

  마. 유전자재조합체의 특성에 관한 자료

   (1) 유전자재조합체 내 도입된 유전자에 관한 정보

     (가) 유전자재조합체의 게놈에 삽입된 유전자의 특성 및 기능

        - pat유전자는 PAT를 암호화하고 식물세포에 암모니아를 축적시키면서 식물괴사를 초래하는 글루포시네이트 암모니아의 식물독성 활성에 내성을 부여한다.

    (나) 삽입부위의 수

       - 유전자재조합체에서 추출한 DNA로 Southern blot hybridization 확인결과 chromosome 상의 1개 부위에 삽입되어 있음이 확인되었다.

    (다) 각 삽입부위의 삽입유전자의 구성

       1) 복제수, 염기서열(주변염기서열 포함)

         - 1개의 완전한 T DNA가 삽입되어 있으며, 주변염기서열도 제시되었다.

       2) 기지의 독성이나 항영양소를 암호화하는 유전자가 없음을 입증하는 자료

         - 삽입된 유전자는 염기서열과 각각의 특성이 잘 나타나 있으며, PAT단백질의 유사물질연구에서 알려진 독성과 알레르기 유발원과의 유사성이 발견되지 않았다

    (라) 삽입유전자 및 인접하는 숙주 게놈 유전자의 외래전사해독프레임의 유무와 그 전사 및 발현가능성

      - 주변염기서열이 제시되었으며, 유전자삽입에 의하여 삽입유전자 주위에 새로운 외래전사해독프레임은 생기지 않았고, 그 발현가능성은 없다.

    (마) 안정성에 관한 사항

       1) 복수세대에서 삽입된 유전자의 서열, 크기

         - T45에서의 삽입위치는 잘 밝혀졌으며 복수세대에 걸친 유전자 안정성은 Southern blot에 의해 확인되었다.

       2) 복수 세대에서 발현부위, 발현시기, 발현량

         - 다른 세대에서의 PAT 단백질의 상세한 양적 분석은 수행되지 않았다. 그러나, 단백질 발현의 안정성은 잡초 통제를 위하여 살포된 글루포시네이트 암모니아 제초제에 대한 이 식물의 내성에 의하여 명백히 제시되었다. MS8/RF3 로부터 유래된 글루포시네이트 내성 재배종의 도입 이후로  제초제에 대한 내성 결여에 대한 어떠한 보고도 없었으며, 이는 단백질의 안정적인 발현을 의미 한다

   (2) 유전자산물에 관한 정보

    (가) 유전자산물의 화학적 성질(단백질이나 전사되지 않은 RNA)

      - pat 유전자가 암호화하는 PAT 단백질은 제초제 성분인 PPT (phosphino -thricin)를 무독화 시키는 효소인 phosphinothricin N-acetyl transferase이다.

      - PAT의 특성은 열과 산에 불안정하고, 동물이나 사람의 소화액에 존재하는 효소나 산에 의해 쉽게 분해되고 변성되며

      - 기질인 글루포시네이트에 대해 높은 특이성을 가지고 있으며 다른 아미노산은 기질이 되지 않는다.

    (나) 유전자산물의 기능

      - pHOE4/Ac(II)내에 있는 pat유전자는 *Streptomyce viridochromogenes* strain Tu 494로부터 분리한 pat 유전자로 PAT 효소를 암호화 하며,

      - PAT 효소는 글루포시네이트 제초제의 활성성분인 PPT를 아세틸화함으로써 글루포시네이트 제초제를 무독화 시킨다.

    (다) 발현단백질의 아미노산 서열의 번역 후 변이 유무

        숙주내에서의 단백질과 대장균에서 발현시킨 단백질이 동일하여 번역 후 변이는 발생하지 않은 것으로 확인되었으며, n-glycosylation도 없었다.

    (라) 발현단백질의 구조적 변화 여부

        - 대장균, 옥수수 T25(이미 승인되었음), T45에서 발현된 3종류의 단백질이 동일하며, 다른 구조적 변화가 없다.

    (마) 새로운 특성의 표현형

        - 유전자재조합 캐놀라 T45는 글루포시네이트 암모니아 제초제에 비선택적으로 내성을 가진다.

    (바) 유전자산물의 발현부위 및 발현량

        - PAT단백질은 식물의 녹색부위에 매우 낮은 수준으로 발현된다. T45 캐놀라에서 알곡 및 잎의 PAT 단백질 수준은 468～735ng/g범위이다.

   (3) 독성

    (가) 생산물이 단백질인 경우

       1) 안전한 식경험의 유무

         - 캐놀라는 오랫동안 먹어왔던 식경험이 있으며, 공여체 생물도 식품의 오염을 통하여 먹어온 경험이 있다.

       2) 기지의 독성 및 항영양소와의 아미노산 서열 유사성

         - 알려진 독소 및 알레르기 유발원과 특이한 유사성을 가지지 않는다

       3) 유전자 산물의 물리화학적 처리에 대한 감수성(대체산물의 경우 유전자            산물과의 생화학적, 구조적, 기능적 동질성에 관한 자료 포함)

         - PAT는 대부분의 식품 알레르기 유발물질과 달리 열과 산에 불안정하며, 인공위액에서 5초 내에 쉽게 분해된다.

       4) 안전한 식경험이 없는 단백질인 경우 경구독성실험 및 그 단백질을 가지  고 있는 것으로 알려진 식물에서 그 단백질의 생물학적 기능

         - 쥐에 대하여 10㎎/㎏의 양으로 정맥 주사한 결과 특별한 이상이 나타나지 않았다.

   (4) 알레르기성

    (가) 유전자산물이 알레르겐으로 알려지고 있는가에 관한 자료

      - PAT 자체는 알레르기 유발원으로 알려져 있지 않다. PAT는 식품 알레르기 유발원의 특성과 일치하지 않는다.

     - 유전자 산물인 PAT의 아미노산 염기배열이 알려져 있으며, SWIS와 EMBL 단백질 데이터베이스의 단백질 염기배열과 비교되어졌다. 알려진 식품 알레르기 유발원과의 어떠한 유사성도 발견되지 않았다.

    (나) 유전자 산물의 물리화학적 처리에 대한 감수성(대체산물의 경우 유전자 산물과의 생화학적, 구조적, 기능적 동질성에 관한 자료 포함)

      - PAT는 대부분의 식품 알레르기 유발물질과 달리 열과 산에 불안정하다. 사육동물과 사람의 소화액에 존재하는 효소와 산에 의해 쉽게 분해되고 변성된다. 인공위액에서 5초 내에 분해됨.

    (다) 유전자산물 중 이미 알려져 있는 알레르겐과 상동성에 관한 자료

       - PAT는 allergen으로 알려져 있지 않으며 기지의 allergen과 아미노산 서열의 유사성이 없다.

    (라) 유전자산물이 1일 단백섭취량의 유의한 양을 차지하고 있는지에 관한자료

      - 전체 알곡 단백질에서 PAT 단백질이 차지하는 비율은 0.00005%～ 0.00008% 정도이며,

      - T45의 종실에서 추출한 전분과 유지의 경우 PAT 단백질은 가공되지 않은 식물상태에서 보다 훨씬 작아 PAT 단백질은 전혀 검출되지 않았다.

      - 따라서 PAT는 캐놀라 혹은 그 제품의 섭취를 통한 1일 단백섭취량은 아주 작은 양을 차지한다.

    (마) (1) 내지 (4)의 자료에 의해 알레르기성을 판단하기 어려울 경우 다음 자료

       1) 구조 유사성이 확인된 알레르겐에 대한 환자 IgE 항체와 유전자산물과의 결합력에 관한 자료

         - 해당사항 없음

   (5) 숙주와의 차이

    (가) 주요영양성분

      - 유전자재조합 캐놀라 알곡에서 총 지방 함량이 가장 많은 부분을 차지하고 있었으며 알곡건조물의 45～46%정도였다. 총 단백질 함량은 24.6-24.5%, 탄수화물 함량은 24.4～25.0%으로 전통종의 함량과 유의적인 차이를 보이지 않았으며 문헌상의 범위내에 포함되어 있다.

      - 아미노산 함량도 유전자재조합 캐놀라와 숙주에 유의적인 차이를 보이지 않았으며 문헌상의 범위내에 포함되어 있다.

      - 지방산에 대한 분석결과도 숙주와의 유의적인 차이를 보이지 않았다..

    (나) 미량영양성분

      - 토코페롤 함량이 분석되어 있으며 알파, 베타, 감마, 델타, 총 토코페롤 모두 유전자재조합 캐놀라와 숙주간에 유의적인 차이를 보이지 않았으며 문헌상의 범위내에 포함되어 있다.

      - 캐놀라에 대한 미량 영양소의 분석 자료는 제시되지 않았음.

      - 비타민 등에 대한 분석결과 숙주와의 유의적인 차이를 보이지 않았다.

    (다) 내재성독소

      - 내재성 독소 없음

    (라) 영양억제인자 (항영양소)

      - Glucosinolate, erucic acid, phytic acid가 있으나 glucosinolate와 phytic acid는 주로 알곡에 존재하므로 식용으로 하는 oil에서는 포함되어 있지 않다. erucic acid의 경우는 “캐놀라”의 명칭이 국제식품규격위원회 기준에 의하면 총 지방산 중에서 최대 2%로 정하고 있어 이를 넘지 않으며, glucosinolate 및 erucic acid의 함량분석결과 숙주와의 유의적인 차이가 없었다.

    (마) 알레르기유발성분

      - 해당사항 없음

    (바) 삽입된 유전자의 대사산물

      - PAT 단백질은 글루포시네이트 암모니아에 기질특이성이 높아 동물이나 사람에게 비 특이적인 반응을 일으키지 않으며, 그 대사산물도 없다.

    (사) 영양성

      - 유지 및 고형분에 대한 캐놀라의 영양성분 함량은 T45로부터 유래된 것과 숙주 간에 실질적 동등성이 확인되었다

   (7) 유전자재조합체의 생존 증식에 대한 정보

     - 제초제 글루포시네이트에 내성을 가지는 특성 외에는 기존의 캐놀라와 생존 증식 능력이 동일하다

   (8) 유전자재조합체의 불활성화 방법

     - 글루포시네이트 제초제에 내성을 나타내는 특성이외에는 일반 캐놀라와 동일하다

   (9) 외국의 식품유통 승인 및 식용 등의 이용 현황

     - 캐나다(1997), 일본(1997), 미국(1997), 호주(1999) 등에서 식품으로 사용할 수 있도록 승인되었다. 1996년 이후부터 미국과 캐나다에서 재배되었으며, 2003년에는 북미지역에서 0.25% 이하로 재배되었다.

**5. 심사의뢰 자료 검토 결과**

  ○ 이상의 검토 내용과 같이 심사규정에 따라 제출된 자료의 안전성을 평가한 결과, 사용된 공여체, 숙주 및 유전자재조합 과정 등이 식품으로 이용시 안전성 문제를 유발하지 않는다고 판단되었고,

  ○ 유전자재조합체에 관해서도 도입된 유전자, 유전자산물, 알레르기 유발성, 독성 및 영양성 등에서 안전성 평가에 필요한 적절한 자료가 제출되었으며, 이 자료를 토대로 검토한 결과 지금까지 섭취해온 캐놀라와 차이가 없음을 확인하였다.