|  |
| --- |
| **유전자재조합 옥수수(Bt176)****안전성평가자료 심사결과** |

***2003. 12.***

**식 품 의 약 품 안 전 청**

**유전자재조합식품안전성평가자료심사위원회**

**병충해 저항성 옥수수 Bt 176 안전성평가자료 심사결과**

**1. 심사경위**

 ○ 신젠타종묘(주)는 인시류 해충인 옥수수 조명충(Corn borer)에 의한 피해를 줄이기 위하여 유전자재조합 기술을 이용하여 개발한 병충해 저항성(cryⅠAb) 옥수수 event Bt176에 대하여 「유전자재조합식품․식품첨가물 안전성평가자료 심사지침」에 따라 안전성 평가가 이루어졌음을 확인 받기 위하여 2003년 3월 28일 식품의약품안전청장에게 관련 자료를 첨부하여 심사 의뢰하였다.

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

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

**2. 심사경과**

 ○ 심사대상품목

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 대상품목 | 신청자 | 개발자 | 제외국의 안전성 확인(승인) 현황 |
| 병충해 저항성 옥수수 Bt176 | 신젠타종묘(주) | Syngenta Seeds AG | 미국(1995), 캐나다(1995), 일본(1996), EU(1997), 호주/뉴질랜드(2001), 남아프리카공화국(2001) |

 ○ 심사경과

   - 2003년  3월  28일  안전성 평가자료심사의뢰 접수

   - 2003년  4월  03일  유전자재조합식품 안전성평가자료 심사위원회에 전문분야별 평가

                        자료의 타당성 검토의뢰 (1차 서면심사)

- 2003년  9 월  30일  심사위원회 (2차 심사)

- 2003년 10 월  21일  보완요청

- 2003년 12 월  18일  보완자료 제출

- 2003년 12 월  23일  심사위원회 (3차 심사)

- 2003년 12 월  30일  최종보고서 작성

**3. 심사방법**

  ○ 본 제품과 관련하여 심사 의뢰된 유전자재조합체가 심사지침의 적용대상인지를 검토하고

  ○ 제출된 안전성 평가자료가 심사지침에서 요구하는 자료를 갖추었는지를 확인하여 미비한 부분에 대해서는 보완하도록 한 후 자료의 내용을 토대로 안전성 평가자료를 심사하였다.

**4. 심사의뢰 자료 검토**

**4-1. 심사 의뢰된 식품의 개요**

   - 심사 의뢰된 BT176옥수수는 유전자재조합기술에 의하여 *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kurstaki* 종에서 유래된 CryIAb 단백질의 일부분 (1,156개의 아미노산중 648개의 아미노산)을 발현 생산하여 인시류 (Lepidopterous) 곤충에 대한 저항성을 갖도록 개발되었다.

   - 변형된 CryIAb 단백질은 인시류 같은 해충에 대한 저항성을 갖도록 하며, PAT 단백질은 Bt 176 옥수수의 선발표지인자로 사용되었다.

   - 제출된 자료는 도입된 유전자와 그 발현 단백질인 CryIAb와 PAT 단백질의 안전성을 설명하고 있으며, Bt176은 도입된 유전자에 의한 변형이외에는 현재 판매되고 있는 일반적인 옥수수와 비교하여 유의적 차이가 없고, 안전성이나 영양적으로 유사하다는 것을 증명하고 있다.

**4-2. 식품으로의 적합성 검토**

 ○ 본 제품과 관련하여 제출된 안전성 평가자료가 「유전자재조합식품・식품첨가물안전성평가자료 심사지침」심사지침 제8조 ②항 및 ③항의 규정에서 요구하는 자료를 만족시키는지 여부를 검토하였으며,

 ○ 규정에 따라 제출된 자료가 유전자재조합식품 안전성연구회 보고서(2000) 세부지침 ‘안전성 평가 흐름도’에 따라 심사가 가능한지를 확인하여 미비한 부분에 대해서는 보완하도록 한 후

 ○ 일부 제출되지 않은 자료는 제8조 ④항에 의한 충분한 사유가 인정되거나 제9조 ④항 5호의 적용이 가능하여,

 ○ 자료의 내용을 토대로 식품으로서의 안전성이 확보되어 있는 지를 심사하였다.

**4-2-1 유전자재조합체의 안전성**

**가. 유전자재조합체의 이용목적 및 이용방법**

    - 재배방법, 이용목적, 이용방법은 기존의 옥수수와 동일하다.

    - Bt176옥수수는 유전자재조합기술에 의하여 *Bacillus thuringiensis subsp. Kurstaki* 종에서 유래된 CryI*A*b 단백질의 일부분 (1,156개의 아미노산중 648개의 아미노산)을 발현 생산하도록 개발하여 인시류 (lepidopterous) 곤충에 대한 저항성을 갖도록 하여, 재배과정에서 이들의 방제를 위한 약제사용을 줄일 수 있도록 하였다.

**나. 숙주**

   (1) 분류학적 특성(학명, 일반명, 품종, 계통명 등)

 - 학명 : *Zea mays* L.

 - 일반명 : 옥수수(corn(미국), maize(그 외 지역)

 - 품종명 : *Zea mays* L. CG00526

   (2) 식품에 이용된 역사

  - 숙주인 옥수수 *Zea mays* L.은 광범위한 사람의 안전한 식경험이 있으며,

      - 전분이나 식용유(옥수수기름)로 제빵, 유제품, 주류, 제과 및 육류의 구성요소로 광범위하게 사용되고 있다.

   (3) 유해생리활성물질 생산성

  - 옥수수의 유해 생리 활성 물질의 생성 등은 알려지지 않았다

   (4) 알레르기 유발성

  - 옥수수에 기인하여 알려진 알레르기 발생은 지금까지 없다.

   (5) 병원성 및 외래인자(바이러스 등)에 오염여부

  - 해당사항 없음

   (6) 생존 및 증식능력과 이를 제한하는 조건

  - 일반 옥수수 농작물의 생존・증식능력 및 그 제한과 같다.

**다. 벡터**

   (1) 명칭 및 유래(공여체)

  - 명칭 : 두 개의 플라스미드가 벡터로 사용되었다.

          ․ pCIB3064

          ․ pCIB4431

  - 유래 : 두 플라스미드는 *E.coli* 유래의 pUC18의 유도체이다.

            플라스미드에 삽입된 유전자의 유래는 다음과 같다.

   pCIB3064 : phosphinothricine acetyltransferase(PAT)를 코딩하는 *bar* 유전자의 유래는 *Streptomyces hygroscopicus*이며, 이 유전자는 CaMV (cauliflower 모자이크 바이러스)에서 유래된 35S 전사개시인자와 35S 전사종결인자에 의해 조절된다.

   pCIB4431 : *Bacillus thuringiensis* subsp*. kurstaki* 균주 유래의 합성 절단된 2개의 cryI*Ab* 유전자를 포함한다. 두 유전자는 옥수수 phosphoenolpyruvate carboxylase 유전자에서 유래된 인트론 #9을 갖는다. 첫 번째 cryI*Ab* 유전자는 옥수수 phosphoenolpyruvate carboxylase 유전자에서 유래된 전사개시인자(PEPC promoter)와 CaMV35S 전사종결인자의 조절을 받으며, 두 번째 cryI*Ab* 유전자는 옥수수의 calcium-dependent protein kinase 유전자에서 유래된 전사개시인자 (pollen promoter)와 CaMV35S 전사종결인자의 조절을 받는다.

   (2) 성질

    (가) DNA의 분자량

       - pCIB3064 : 3,986 bp(구조유전자 포함)

          - pCIB4431 : 11,043 bp(구조유전자 포함)

    (나) 제한효소에 의한 절단지도

        제시되었다.

    (다) 유해염기배열 등의 유무

           - pUC18 플라스미드에서는 어떤 유해염기서열도 일어났다는 보고가 없으며, pUC18 플라스미드로부터 유래한 pCIB3064/pCIB4431 역시 유해염기서열을 포함하고 있지 않다

   (3) 숙주에서의 복제수 및 안정성

  - 복제기점 (Ori)이 *E. coli* 플라스미드인 pBR322로부터 유래한 것이므로 일반 식물체에서는 독립적으로 생존․증식하지 않고, 다른 식물체로 전달되지 않는다.

   (4) 선발표지형질유전자

   - 선발표지형질유전자로 *bla* 유전자와  *bar* 유전자가 사용되었다.

   - *bla* 유전자는 Ampicillin 항생제에 대한 저항성을 제공하여  pCIB3064/pCIB4431 플라스미드를 함유한 세균의 선별을 위하여 사용된다.

   - *bar* 유전자는 glufosinate 제초제에 저항성을 제공하여 pCIB3064 플라스미드를 함유한 식물세포의 선별을 위하여 사용된다

   (5) 전달성

  - 세균간의 전달성은 전달에 관여하는 유전자인 tra 유전자와 이동에 관여하는 유전자인mob 유전자에 의해 일어나지만, pUC18 플라스미드는 이들 유전자를 포함하지 않기 때문에 전달성이 없다.

   (6) 숙주의존성

  - pUC 플라스미드로부터 유도된 플라스미드인 pCIB3064와 pCIB4431는 대장균에서만 증식이 가능한 ori배열이 포함되고 있어, 다른 식물 등에서는 증식 할 수 없다

   (7) 벡터의 제작방법 및 구조

      - 제시되었다.

   (8) 숙주에 발현 벡터의 삽입방법・위치

  - 입자총법으로 삽입되었으며, 옥수수의 염색체에 삽입되었다.

**라. 삽입 DNA 관련**

   (1) 공여체

    (가) 명칭 및 분류학적 특성 (학명, 품종명, 계통명 등)

- *cryIAb* 유전자는 *Bacillus thuringiensis var. Kurstaki* 부터 유래되었다.

- *bar* 유전자는 *Streptomyces hygroscopicus*로부터 기원한다.

    (나) 식품에 이용된 역사 및 섭취현황

     - *B. thuringiensi*s 및 *S. hygroscopicus*는 식품으로 직접 사용된 역사는 없지만, 토양에 상존하는 미생물로 식품오염을 통한 섭취의 경험이 있다. 그러나 이들이 인체에 유해성을 나타낸다는 보고는 없다.

- *B. thuringiensis* 제제는 생물학적 살충제(미생물 농약)로 30년 이상 사용되어 왔다

    (다) 공여체 및 근연종의 병원성 및 유해생리활성물질 생산성

     - *B. thurigiensis*와 *S. hygroscopicus*는 인체에 유해성을 나타내는 유해생리활성 물질의 생산은 보고된 바 없다

    (라) 알레르기 유발성

     - *B. thurigiensis*와 *S. hygroscopicus*가 알레르기를 유발한다고 보고된 바는 없다.

   (마) 병원성 외래인자(바이러스 등)에 오염여부

     - 해당사항이 없다.

   (2) 삽입 DNA

    (가) 구조

1) 전사개시인자(Promotor)

- pCIB3064 : CaMV의 35S 프로모터

- pCIB4431 : 옥수수의 PEPC 프로모터, 옥수수의 화분 promoter

2) 전사종결인자(Terminator)

- pCIB3064 : CaMV의 35S 전사종결인자

- pCIB4431 : CaMV의 35S 전사종결인자

3) 삽입염기서열 및 주변유전자 배열

- pCIB3064 : 0.6kb의 bar 유전자

- pCIB4431 : 1.94kb의 cryIAb 유전자, 0.11kb의 PEPC intron#9,

    (나) 성질

    1) 삽입 DNA의 기능에 관한 자료

           - 부분적인 cryIAb 유전자는 CryIAB 단백질을 합성하며 이 단백질은 인시류 (lepidopterous) 곤충에 대한 저항성을 갖도록 한다.

- *bar* 유전자는 glufosinate 제초제에 저항성을 제공하는 phosphinothricin acetyltransferase (PAT)를 합성하며, 형질 전환된 식물체에 대한 선별에 사용되었다.

    2) 제한효소에 의한 절단지도

       제시되었다.

    3) 분자량

       - 두 개의 플라스미드가 삽입되었으며 pCIB3064는 3,986bp(구조유전자 포함), pCIB4431은 11,043bp(구조유전자 포함)이다.

    4) 유해염기서열의 유무

       - 유해 염기서열을 포함하고 있지 않음.

    (다) 안정성

     - RFLP (restriction fragment length polymorphism) mapping 및 southern blot으로 안정함을 확인하였으며, 4 세대에 걸쳐서  삽입유전자의 안정성이 있었다.

    (마) 발현부위, 발현시기, 발현량

- CryIAb 단백질은 잎과 화분, 전체 식물체에서 검출되었다. 종자에서는 CryIAb의 양이 일관되게 정량한계 (<5ng CryIAb/g fr. wt.;<8ppb) 이하로 발현되었다.

- PAT는 잎, 줄기, 옥수수심 등 전체 식물체에 미량으로 존재하지만, 어떤 조직에서도 정량할 수 있는 양에는 못 미쳤다. 종자와 화분에서는 검출할 수 없었다.

- Ampicillin 내성 활성을 부여하는 *bla* 유전자는 원핵생물 전사개시인자의 통제하에 있기 때문에 그 발현은 없었다.

    (바) 외래 전사해독프레임의 유무와 그 전사 및 발현 가능성

     - CryIAb 단백질과 PAT 단백질을 생산하는 유전자 이외의 유전자는 없다.

**마. 유전자재조합체**

   (1) 재조합에 의해 새로이 부과된 성질(유전자산물)

   - 내충성 : CryIA(b) 단백질을 합성하며 이 단백질은 인시류 (lepidopterous) 곤충에 대한 저항성을 부여하였다.

- 제초제 내성 : phosphinothricin acetyltransferase (PAT)를 합성하여 glufosinate 제초제에 저항성을 부여하였다.

   (2) 유전자재조합체의 생존・증식에 대한 정보

   - Bt176 옥수수의 생존, 증식 능력은 기존의 옥수수 품종과 동일하여, 생존 증식력의 제한 요인에 대해서도 기존의 옥수수와 같다.

   (3) 유전자산물의 독성

   - 신규 삽입된 유전자에 의하여 발현되는 단백질은 CryIAb 단백질과 PAT 단백질이며, 이들에 대한 독성실험에서

- 암수 각각 5마리씩의 쥐에서 CryIAb 단백질을 3,283mg/kg의 양으로 투여한 결과는 어떤 쥐도 폐사하지 않았으며, 특이한 임상적 이상도 발견되지 않았다.

- 암수 각각 5마리씩의 쥐에서 PAT 단백질을 2,576mg/kg의 양으로 투여한 결과, 수컷 쥐 한 마리가 죽었으나 사인은 고체물질에 의한 식도 막힘 증상으로 독성에 의한 임상증상은 없다.

- PAT 단백질의 안전성에 대한 확인은 ‘PAT 단백질이 인간이나 기타 동물에 유독하다는 것을  나타내는 증거를 찾을 수 없다 (OECD, 1999; EPA, 1997).

        - PAT 단백질과 Cry1Ab 단백질의 알려진 독성과의 상동성 시험 결과 어떠한 상동성도 없었다.

     (4) 유전자 산물이 대사경로에 미치는 영향

   - 기존 대사경로와 반응하지 않는 두 개의 별도 단백질(CryⅠA(b), PAT)을 생산하므로 기존의 대사경로에 영향을 미치지 않는다

     (5) 숙주와의 차이

    - 자연적인 식물 방어 화합물인 DIMBOA (2,4-diydroxy-7methoxy- 2H-1,4-benzoxazin -3(4H)-one)을 더 안정한 MBOA (6-methoxy-2(3H)-benzoxazolone)으로 전환시킨 후에 HPLC를 이용하여 분석한 Bt-176 옥수수와 비유전자재조합 옥수수와의 MBOA 수치는 각각 0.84±0.36 와 0.86±0.38 mg/g wt.이었으며 통계적인 유의성은 없는 것으로 나타났다. 이는 유전자 변형 Bt-176 옥수수가 변형되지 않은 옥수수와 실질적으로 동등하다는 것을 나타낸다.

   (6) 알레르기성

  (가) 공여체인 생물이 식품으로 이용된 역사에 관한 자료

         - *B. thuringiensis* 및 *S. hygroscopicus*는 식품으로 소비되지는 않지만, 잘 씻지 않은 식품에 흔히 발견될 수 있는 미생물이다

- *B. turingiensis* 제제는 생물학적 살충제로서 30년 이상 사용되었다.

     (나) 유전자산물이 식품으로 이용된 역사에 관한 자료

         - 본 유전자재조합 옥수수는 미국(1995), 캐나다(1995), 일본(1996) 등에서 1995년부터 상업화되어 먹어온 경험이 있다. 또한 유전자 산물의 공여체 미생물이 식품에 오염된 형태로 섭취된 역사는 있다.

     (다) 유전자산물의 물리화학적 처리에 대한 감수성에 관한 자료

         - CryIAb는 인공위액 실험에서 펩신 농도인 0.001X 표준농도에서는 10분 안에, 0.01X 표준농도에서 5분 안에 신속히 분해되었다.

- PAT는 펩신을 0.01X 표준농도로 희석하였을 때, 2분안에 분해되었다.

     (라) 유전자산물 중 이미 알려져 있는 식품 알레르겐과 구조적으로 같은 성질에 관한 자료

  - Cry1Ab와 PAT 유전자의 이미 알려져 있는 알레르겐과의 상동성 비교 결과 알려진 독성단백질과의 유효한 상동성은 발견되지 않았다.

     (마) 유전자산물이 1일 단백질 섭취량의 유의한 양을 차지하고 있는지에 관한 자료

         - 습식 제분된 부분에서 Cry1Ab는 어떤 부분에서도 검출되지 않았고 건식 제분된 부분에서는 5 ppb 이하만이 발견되었다. Cry1Ab 단백질과 PAT 단백질은 모두 정량화 수준 이하였다

   (7) 유전자재조합체의 불활성화 방법

   - 인시류 해충인 옥수수 조명충에 저항성을 가지는 것 외에는 기존의 일반 옥수수와 불활성화 방법이 동일하다.

   (8) 외국의 인가・식용 등의 현황

   - 미국 (1995), 캐나다 (1996), 일본 (1996), EU (1997), 호주/뉴질랜드 (2001), 남아프리카공화국 (2001)

**4-2-2 유전자재조합식품 등의 안전성**

**가. 일반자료**

    (1) 사용방법

   - 식용 및 사료

 (2) 제조과정

  - 재배과정에서 Bt176 계통은 인시류해충에 대한 저항성 차이를 제외하고는 기존의 옥수수와 동일하다.

**나. 실질적 동등성에 의한 안전성 평가 자료**

     (1) 식품으로 사용된 역사

        - Bt176 계통은 미국, 일본 등에서 1995년부터 식품으로 허용되어 사용되었으며, 도입된 유전자에 의한 발현단백질이외는 기존의 사용역사가 오래된 옥수수와 동일하다.

     (2) 구성성분에 관한 자료

         (가) 주요영양성분

           - 다양한 구성성분들(단백질, 지방, 회분, 수분, 섬유질, 아미노산, 지방산 등)을 분석한 결과 기존의 옥수수와 통계적으로 유의한 차이는 없었다

         (나) 미량영양성분

       - 미량영양성분인 Ca. Mg 등에 대한 분석결과 문헌에 보고된 성분함량의 범위내에 있었다.

         (다) 내재성독소

           - 유전자삽입에 의한 내재성 독소의 생성은 없으며 기존의 옥수수와 동일하다

         (라) 영양억제인자

       - DIMBOA를 조사한 결과 기존 옥수수와의 유의차는 없다.

         (마) 알레르기유발성분

       - 옥수수는 알레르기 유발이 낮은 식품이며, 유전자재조합체에 의하여 생산된 두 단백질은 물리화학적 처리에서 빨리 분해되고, 알려진 알레르겐과의 서열 상동성 분석결과 유의적인 상동성이 없으므로 알레르기유발성에 대해서는 기존의 옥수수와 동일하다

         (바) 삽입된 유전자의 산물

            - 기존 옥수수와의 차이는 유전자 삽입으로 발현된 2개의 CryIAb와 PAT 단백질로 이들 단백질이 위해성을 나타나지 않으므로 기존의 옥수수만큼 안전하다

     (3) 예상 섭취량

        - 일반적으로 옥수수를 섭취하는 형태는 제분된 형태이다. 유전자삽입에 의해 발현되는 Cry1Ab는 습식 제분된 전분에서는 어떤 부분에서도 검출되지 않았고,  건식 제분된 부분에서는 5 ppb 이하 정도이다. PAT 단백질은 모두 정량화 수준 이하이다.

        - 그러므로 유전자삽입에 의해 발현되는 2개의 단백질은 예상 섭취량은 극미량이며, 기존의 옥수수와 거의 같다.

**다. 영양학적 실험 자료**

 - 가금류와 젖소를 이용한 동물 사료 식이 연구는 유전자재조합 옥수수와 재조합되지 않은 옥수수와의 차이가 발견되지 않았다.

**라. 독성학적 실험 자료**

   - 유전자 삽입에 의해 발현되는 유전자산물이 물리화학적 처리에 의해 신속하게 분해되고, 알려진 독성과의 아미노산 서열유사성이 없으며, 급성독성도 없었다.

   - 가금류를 이용한 14일간 64% 함유된 섭이시험 결과, 특이사항이 관찰되지 않았다.

**마. 알레르기 유발성 실험 자료**

   - 유전자 삽입에 의해 발현되는 유전자산물이 물리화학적 처리에서 신속하게 분해되고, 알려진 알레르기 유발물질의 아미노산 서열에서 유사성이 없으며,

   - 유전자삽입에 의해 생성되는 다른 단백질이 없으므로 기존의 옥수수와 동일하다

**바. 항생제내성 유전자 및 그 산물에 관한 실험 자료**

   - 선발표지형질유전자로 *bla* 유전자와  *bar* 유전자가 사용되었다.

   - *bla* 유전자는 Ampicillin 항생제에 대한 저항성을 제공하므로  pCIB3064/pCIB4431 플라스미드를 함유한 세균의 선별을 위하여 사용되었으나, 유전자재조합체내에서는 발현되지 않는 유전자이므로 그 산물의 없다.

   - *bar* 유전자는 glufosinate 제초제에 저항성을 제공하므로 pCIB3064 플라스미드를 함유한 식물세포의 선별을 위하여 사용되었다. 여기에서 안전성평가가 수행된 PAT를 발현시키는 유전자이다.

**5. 심사의뢰 자료 검토 결과**

  ○ 이상의 검토 내용과 같이 유전자재조합식품․식품첨가물 안전성평가자료 심사지침에 따라 제출된 자료의 안전성을 평가한 결과, 사용된 공여체, 숙주 및 삽입유전자 등이 식품으로 이용시 안전성 문제를 유발하지 않는다고 판단되었다.

  ○ 유전자재조합체에 관해서도 알레르기 유발성, 독성 및 영양성 등에서 안전성 평가에 필요한 적절한 자료가 제출되었고, 이 자료를 토대로 검토한 결과 지금까지 섭취해온 옥수수와 차이가 없음을 확인하였다.