

유전자재조합 옥수수 DAS-40278-9 안전성평가자료 심사결과 보고서

2014. 7. 3



<차례>

1. 심사경위	1
2. 심사경과	1
3. 심사방법	2
4. 심사신청 자료 검토	2
4-1. 심사 신청된 식품의 개요	2
4-2. 식품으로의 적합성 검토	2
4-3 유전자재조합체의 안전성	2
가. 유전자재조합체의 개발목적 및 이용방법에 관한 자료	2
나. 숙주에 관한 자료	2
(1) 분류학적 특성	3
(2) 재배 및 품종개량의 역사	3
(3) 기지의 독성 또는 알레르기 유발성	3
(4) 안전한 식경험의 유무	3
다. 공여체에 관한 자료	3
(1) 분류학적 특성	3
(2) 안전한 식경험의 유무	3
(3) 공여체 및 근연종의 독성, 항영양성, 알레르기성	3
라. 유전자재조합에 대한 자료	3
(1) 형질전환에 관한 정보	3
(2) 도입 유전자에 대한 정보	4
마. 유전자재조합체의 특성에 관한 자료	6
(1) 유전자재조합체 내 도입된 유전자에 관한 정보	6
(2) 유전자산물에 관한 정보	8
(3) 독성	8
(4) 알레르기성	9
(5) 숙주와의 차이	10
(6) 유전자산물이 대사경로에 미치는 영향	12
(7) 외국의 식품유통 승인 및 식용 등의 이용 현황	12

유전자재조합 옥수수 DAS-40278-9 안전성평가자료 심사결과 보고서

1. 심사경위

- 다우아그로사이언시스 인터내셔널리미티드(주)는 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid(2,4-D) 제조제 및 ArylOxyPhenoxyPropionate(AOPP) 계통의 제조제에 내성을 가지는 유전자재조합 옥수수 DAS-40278-9에 대해 식품위생법 제18조에 따른 안전성평가 심사를 받기 위하여 2010년 3월 30일 식품의약품안전처에 「유전자재조합식품등의 안전성 평가 심사 등에 관한 규정」(이하 '심사규정'이라함)에 규정한 관련 자료를 첨부하여 심사 신청하였다.
- 이에 식품의약품안전처장은 본 품목이 심사규정에 따라 안전성 평가가 이루어졌는지 여부에 대하여 '유전자재조합식품등 안전성평가자료 심사위원회'(이하 심사위원회라고 함)에 심사 의뢰하였다.

2. 심사경과

- 심사대상품목

대상품목	신청자	개발자	제외국의 안전성 승인 현황
유전자재조합옥수수 DAS-40278-9	다우아그로사이언시스 인터내셔널리미티드(주)	Dow AgroDciences LLC (USA)	미국(2011), 멕시코(2011), 호주/뉴질랜드(2011), 캐나다(2012), 남아공(2012), 일본(2012)

- 심사경과
 - 2010년 3월 30일 안전성 평가자료 심사신청
 - 2010년 3월 31일 심사위원회 서류심사 의뢰
 - 2010년 6월 15일 1차 심사위원회 개최
 - 2011년 1월 18일 2차 심사위원회 개최
 - 2011년 7월 26일 3차 심사위원회 개최
 - 2012년 2월 21일 4차 심사위원회 개최
 - 2012년 8월 21일 5차 심사위원회 개최
 - 2012년 12월 18일 6차 심사위원회 개최
 - 2013년 4월 16일 7차 심사위원회 개최

3. 심사방법

- 본 품목과 관련하여 심사 의뢰된 유전자재조합체가 심사규정의 적용대상인지를 검토하고,
- 제출된 안전성 평가 자료가 심사규정에서 요구하는 자료를 갖추었는지를 확인한 후 자료의 내용을 토대로 안전성 평가 자료를 심사한다.

4. 심사의뢰 자료 검토

4-1. 심사 의뢰된 식품의 개요

- 다우아그로사이언시스 인터내셔널리미티드(주)가 개발한 유전자재조합 옥수수 DAS-40278-9는 *aac-1* 유전자가 도입된 것으로 2,4-D 제조제 및 AOPP 계통의 제조제에 내성을 나타낸다.

4-2. 식품으로의 적합성 검토

- 본 품목과 관련하여 제출된 안전성 평가자료가 「유전자재조합식품등의 안전성평가 심사 등에 관한규정」 제12조에서 요구하는 자료를 만족시키는지 여부를 검토하였으며,
- 자료의 내용을 토대로 다음과 같이 식품으로의 안전성이 확보되어 있는 지를 심사하였다.

4-3 유전자재조합체의 안전성

가. 유전자재조합체의 개발목적 및 이용방법에 관한 자료

- 다우아그로사이언시스 인터내셔널리미티드(주)는 2,4-D 제조제 및 AOPP 계통의 제조제에 내성을 나타내는 유전자재조합 옥수수 DAS-40278-9를 개발하였다.
- 그 밖의 재배방법 및 이용방법은 기존의 옥수수와 동일하다.

나. 숙주에 관한 자료

(1) 분류학적 특성

- 종(Species): *mays*
- 속(Genus): *Zea*
- 과(Family): *Gramineae*
- 일반명 : 옥수수(corn[미국], maize[그 외 지역])

(2) 재배 및 품종개발의 역사

- 옥수수는 전 세계 거의 모든 지역에서 재배되며, 밀(*Triticum sp.*)에 이어 총 재배면적이 두 번째로 많은 작물이다.
- 20세기 초에 옥수수 잡종이 자연적으로 수분된 품종에 비해 더 나은 수확량을 보이는 것으로 알려졌으며, 1930년대와 1940년대에는 점차적으로 잡종에서 유래한 품종이 자연적으로 수분된 품종을 대체하게 되었다.

(3) 기지의 독성 또는 알레르기 유발성

- 옥수수가 속하는 *Zea* 속 식물은 자연적으로 독소를 생산하지 않는 것으로 보고되었다(CFIA, 2003).
- 항영양소는 피틴산(phytic acid), 라피노스(raffinose), 트립신억제제(trypsin inhibitor)가 있다(OECD, 2002).
- 옥수수는 식품 알레르기를 유발하는 주요 원인 식품으로 분류되지 않지만, 일부 연구에서는 알레르기 반응이 보고되었다(OECD, 2002).

(4) 안전한 식경험의 유무

- 옥수수는 세계 3대 곡물 중의 하나로서 전분, 식용유, 옥수수가루 등으로 이용되어 오랜 기간의 안전한 식경험을 가지고 있다.

다. 공여체에 관한 자료

(1) 분류학적 특성

- 종(Species): *herbicidovorans*
- 속(Genus): *Sphingobium*
- 과(Family): *Sphingomonadaceae*

(2) 안전한 식경험의 유무

- *Sphingobium herbicidovorans*는 직접적으로 식용으로 이용된 적은 없다.

(3) 공여체 및 근연종의 독성, 항영양성, 알레르기성

- *Sphingobium herbicidovorans*의 유독물질의 생산가능여부, 항영양성, 알레르기성에 대해서는 일반적으로 알려진 바는 없다.

라. 유전자재조합에 대한 자료

(1) 형질전환에 관한 정보

(가) 형질전환방법

- 유전자재조합 옥수수 DAS-40278-9는 Whiskers 형질전환 방법을 사용하였다.

(나) 재조합에 사용된 벡터에 대한 정보

1) 기원

- 플라스미드 pDAS17406,236 bp)의 *FspI* 제한효소 절편을 이용하여 유전자재조합 옥수수 DAS-40278-9가 만들어 졌다. pDAS1740는 pUC19을 기본 골격으로서 제작되었다.

2) 숙주에서의 확인

- 유전자재조합 옥수수 DAS-40278-9에서 DAS1740(의 *FspI* 제한효소 절편으로부터 유래한 한 개의 카피가 삽입된 것이 확인되었다.

3) 숙주에서의 기능

- 유전자재조합 옥수수 DAS-40278-9에 삽입된 *aac-I*는 AryloxyAlkanoate dioxygenase(AAD-1) 단백질을 발현하여 2,4-D 제초제 및 AOPP 계통의 제초제에 내성을 갖게 한다.

(다) 중간숙주에 대한 정보

- pDAS1740는 *E. coli*에서 증식되었다.

(라) 전달성에 관한 정보

- 플라스미드 pDAS1740는 숙주이외의 다른 생물체로 스스로 이동될 수 있는 전달성과 관련된 유전자를 포함하고 있지 않다.

(2) 도입 유전자에 대한 정보

(가) 구성 유전자의 특성

1) 선발표지유전자

- *aac-I* : *aac-I* 유전자는 AAD-1 단백질을 암호화하며 제초제인 2,4-D 제초제 및 AOPP 계통의 제초제에 내성을 부여한다.

2) 조절인자

① 프로모터(promoter)

- ZmUbi1 promoter : 옥수수(*Zea mays*)에서 유래한 Ubiquitin 전사개시 인자이다.

② 터미네이터(terminator)

- Zmper5 3'UTR : 옥수수(*Zea mays*)에서 유래한 peroxidase 유전자의 3' 말단의 비번역 부분이다.

3) DNA의 기능에 영향을 주는 기타 인자

- MAR : 담배에서 유래하였으며, 발현 수준을 증가시킨다.

(나) 크기 및 명칭

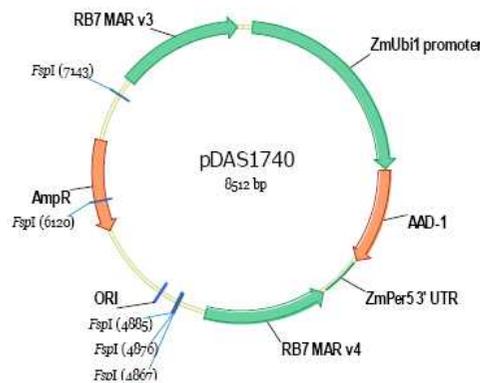
- 유전자재조합 옥수수 DAS-40278-9에 도입된 유전요소의 크기와 명칭은 [표 1]과 같다.

[표 1] 벡터(pDAS1740)의 *FspI* 제한효소 절편의 구성요소

유전요소	크기(bp)	기능
MAR v3	1166	담배에서 유래한 Matrix attachment region(MAR), 발현수준 증가
ZmUbi1 promoter	1991	옥수수에서 유래한 Ubiquitin 전사개시인자
<i>aad-1</i>	891	<i>Sphingobium herbicidovorans</i> 에서 유래하였으며, 2,4-D 제조제 및 AOPP 계통의 제조제에 내성을 가지는 AAD-1 단백질 발현 인자
ZmPer5 3'UTR	365	옥수수에서 유래한 peroxidase 유전자의 3' 말단의 비번역 부분
MAR v4	1166	담배에서 유래한 Matrix attachment region(MAR), 발현수준 증가

(다) 완성된 벡터내의 유전자 염기서열의 위치 및 방향성

- 제한효소지도, 벡터 내에서의 유전자위치, 방향성이 제시되었다[그림1].



[그림 1] 형질전환 플라스미드 pDAS1740 지도

(라) 구성 유전자의 기능

- 유전자재조합 옥수수 DAS-40278-9에 삽입된 *aad-1* 유전자는 AAD-1을 발현한다. AAD-1은 2,4-D 제조제를 활성이 없는 형태인 2,4-dichlorophenol 형태로 변환시키며, AOPP 계통의 제조제들을 불활성화된 phenol 형태로 변환시켜 각각의 제조제에 내성을 지닌다.

(마) 유해염기서열의 유무

- 플라스미드 pDAS1740에는 유해염기 서열이 존재하지 않았다.

(바) 외래전사해독프레임의 유무와 그 전사 및 발현가능성

- 목적하는 AAD-1 단백질의 발현과 관련된 유전물질 이외의 유전물질은 삽입되지 않았다.
 - 염기서열 분석 결과 유전자재조합 옥수수 DAS-40278-9 삽입유전자와 인접한 염기서열에 전사 및 발현가능성이 있는 새로운 외래전사해독프레임 (Open Reading Frame, ORF)은 존재하지 않는 것으로 나타났다.

(사) 목적하는 유전자 이외의 염기서열의 혼입

- 목적하는 유전자 이외의 유전자는 혼입되지 않았다.

마. 유전자재조합체의 특성에 관한 자료

(1) 유전자재조합체 내 도입된 유전자에 관한 정보

(가) 유전자재조합체의 계놈에 삽입된 유전자의 특성 및 기능

- 유전자재조합 옥수수 DAS-40278-9에 도입된 유전자 *aad-1*는 AAD-1을 발현하여 2,4-D 제조제 및 AOPP 계통의 제조제에 내성을 부여한다.

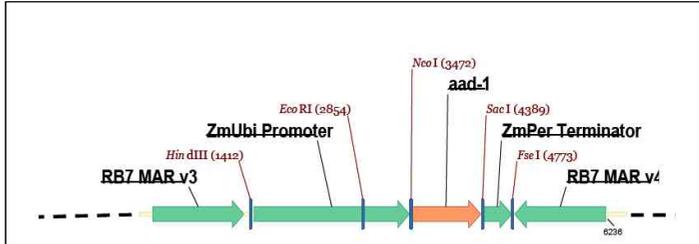
(나) 삽입부위의 수

- 염기서열 분석과 Southern blot 분석 결과 유전자재조합 옥수수 DAS-40278-9의 단일 유전자자리에 pDAS1740 유래 *FspI* 제한효소 절편으로부터 유래한 한 개의 카피가 삽입된 것으로 확인되었다.

(다) 각 삽입부위의 삽입유전자의 구성

1) 복제수, 염기서열

- 유전자재조합 옥수수 DAS-40278-9 삽입유전자의 염기서열분석 결과 삽입 유전자는 형질전환에 사용된 pDPG434 플라스미드의 6,236 bp *FspI* 제한효소 절편으로부터 유래한 한 개 카피로 이루어져 있는 것으로 확인되었다.



[그림 2] 유전자재조합 옥수수 DAS-40278-9 에서 플라스미드의 삽입 모식도

2) 기지의 독성이나 항영양소를 암호화하는 유전자가 없음을 입증하는 자료

- 염기서열분석 결과, 도입 유전자 내에 알려진 유해 염기서열은 존재하지 않는 것으로 나타났다. AAD-1 단백질은 알려진 알레르겐 혹은 독성물질과 아미노산 서열상동성을 나타내지 않는다.

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

- 유전자재조합 옥수수 DAS-40278-9 삽입유전자의 인접한 서열을 분석해본 결과, 외래전사해독프레임은 존재하지 않는 것으로 나타났다.

(마) 안정성에 관한 사항

1) 복수세대에서 삽입된 유전자의 서열, 크기

- 5세대(T3, T4, BC3S1, BC3S2, BC3S3)의 Southern blot 분석을 실시한 결과, 삽입 DNA가 유지됨이 확인되었다.

2) 복수 세대에서 발현부위, 발현시기, 발현량

- 2세대(BC3S1, BC3S3)의 ELISA를 이용한 분석 결과 AAD-1 단백질이 안정적으로 발현됨을 확인하였다.

(2) 유전자산물에 관한 정보

(가) 유전자산물의 화학적 성질

- AAD-1 단백질의 분자량은 33 kDa이며, 296개의 아미노산으로 구성되어 있다.

(나) 유전자산물의 기능

- AAD-1 단백질은 2,4-D 제초제 및 AOPP 계통의 제초제에 내성을 나타내게 한다.

(다) 발현단백질의 아미노산 서열의 번역 후 변이 유무

- 아세틸화가 되는 경우도 있었으나 N 말단 메티오닌 잔기의 잘려짐과 N 말단의 아세틸화는 진행 생물의 단백질 번역 과정에서 흔하게 보이는 현상이며, 생물학적으로 유의한 영향을 미치는 경우가 거의 없다. 또한, AAD-1 단백질에 대해 당화분석을 실시한 결과, 당화되지 않았음을 확인되었다.

(라) 발현단백질의 구조적 변화 여부

- *Pseudomonas fluorescens* AAD-1 단백질 서열은 DAS-40278-9에서 분리 정제한 AAD-1 단백질의 아미노산 서열과 비교를 위해 SDS-PAGE, western blot, 당화분석, MALDI-TOF MS, N말단 서열분석, C말단 서열분석 결과, N말단 서열분석의 차이가 없음을 확인하였다.

(마) 새로운 특성의 표현형

- 유전자재조합 옥수수 DAS-40278-9는 2,4-D 제초제 및 AOPP 계통의 제초제에 내성을 부여하는 AAD-1 단백질을 생산한다.

(바) 유전자산물의 발현부위 및 발현량

- 여섯 장소에서(아이오와, 일리노이(2개 지역), 인디애나, 네브라스카, 온타리오) 유전자재조합 옥수수 DAS-40278-9의 생육단계별, 식물체 조직 및 전체 식물체 내 AAD-1 단백질 농도를 조사한 결과는 [표 3]와 같다.
- AAD-1 단백질은 화분과 잎 등에서 주로 발현되었다.

(3) 독성

(가) 생산물이 단백질인 경우

1) 안전한 식경험의 유무

- AAD-1 단백질의 경우 직접 사람이 섭취한 경험은 없다.

2) 기지의 독성 및 항영양소와의 아미노산 서열 유사성

- AAD-1 단백질을 GenBank 데이터베이스에서 검색하였다. 그 결과 기지의 독소 단백질 및 항영양소의 아미노산 서열과 상동성이 없는 것으로 확인되었다.

3) 유전자 산물의 물리화학적 처리에 대한 감수성

- 유전자재조합 *Pseudomonas fluorescens* 유래 및 유전자재조합 옥수수 DAS-40278-9 유래 AAD-1 단백질간의 동등성을 확인한 결과, 분자량, 면역반응성이 유사함을 확인하였고, MALDI-TOF MS와 tandem MS를 이용한 C 말단 아미노산 서열의 동등성이 있음을 확인 하였으며, 번역 후 당화(post-translational glycosylation)가 일어나지 않았다. 그러나 tandem MS를 이용한 N 말단 아미노산 서열 비교에서 정확한 일치치를 보이지 않았다.
- 열 안정성 : AAD-1 단백질은 50℃, 30분 처리 시 효소활성도가 완전히 비활성화 되었다. 또한 50℃, 30분 처리 시 면역반응성 (ELISA 분석)을 완전히 상실하는 것으로 나타났다.
- 인공위액 안정성 : AAD-1 단백질은 인공위액에서 30초 이내에 쉽게 소화 되는 것으로 확인되었다.
- 인공장액 안정성: AAD-1 단백질은 인공장액에서 60초 이내에 쉽게 소화 되는 것으로 확인되었다.

4) 발현단백질의 단회투여독성

- AAD-1 단백질에 대해 급성경구독성 실험을 실시하였다. 단회 투여로 2,000 mg/kg 수준의 AAD-1 단백질을 각각 다섯 마리의 암수 Cr1:CD1 마우스(mouse)에게 존데(Sonde)를 이용하여 경구 투여하였다. 임상적 징후, 체중 검사, 조직병리학적 검사 등에서 이상이 없는 것으로 확인되었다.

(4) 알레르기성

(가) 유전자산물이 알레르겐으로 알려지고 있는가에 관한 자료

- AAD-1 단백질이 알레르기 유발성이 있다는 보고는 없다.

(나) 유전자 산물의 물리화학적 처리에 대한 감수성

- (3) (가) 3)에서 기술한 바와 같이 AAD-1 단백질은 열처리에 쉽게 면역반응성 및 효소활성을 잃으며, 인공위액 또는 인공장액 같은 소화효소에 의해 쉽게 분해됨이 확인 되었다.

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

- AAD-1 단백질을 FARRP(Food Allergy Research and Resource Program, University of Nebraska) 알레르겐 데이터베이스에서 연속하는 8개의 아미노산 잔기와 일치하는 아미노산 서열 검색 및 80개 이상의 아미노산 잔기 중 35% 이상의 상동성을 가지는 아미노산 서열에 대해 검색하였다. AAD-1 단백질은 알려진 알레르겐 혹은 알레르겐 추정 단백질과 유의한 아미노산 서열 상동성은 확인되지 않았다.

(라) 유전자산물이 1일 단백질섭취량의 유의한 양을 차지하고 있는지에 관한 자료

- 옥수수 및 옥수수 가공품을 모두 유전자재조합 옥수수 DAS-40278-9로 대체한다고 가정할 경우
 - 보건복지부의 국민건강영양조사 3기(2005) 통계를 바탕으로 옥수수를 가장 많이 섭취하는 만 3~6세의 단백질 1일 섭취량 중 AAD-1 단백질이 차지할 수 있는 비율은 각각 약 2.49×10⁻⁵%로 계산되었다.
 - 한국농촌경제연구원 의 식품수급표(2008) 통계를 바탕으로, 한국인의 단백질 1일 평균 섭취량 중 AAD-1 단백질이 차지할 수 있는 비율은 각각 약 4.50×10⁻⁴%로 계산되었다.
- 이상의 추정에 따르면 한국 소비자의 1일 AAD-1 단백질 섭취량은 한국 소비자의 1일 단백질섭취량과 비교하면 매우 낮은 것으로 판단되었다.

(5) 숙주와의 차이

(가) 주요영양성분

- 유전자재조합 옥수수 DAS-40278-9(제조체를 살포하지 않은 처리구, 2,4-D를 살포한 처리구, quizalofop를 처리한 살포구, 2,4-D와 quizalofop를 모두 살포한 처리구 및 이에 상응하는 비유전자재조합(near-isogenic) 옥수수를 2008년 미국 내 다섯 지역, 캐나다 내 한 지역에서 수확하였다. 각 지역에서 각각의 옥수수는 난괴법(randomized complete block design)으로

배치되어 재배되었으며 각 지역 당 3반복으로 성분 분석을 실시하였다.

① 일반 성분

- 분석한 주요성분(수분, 회분, 지방, 단백질, 탄수화물, 식이섬유(ADF, NDF, 식이섬유)) 중 단백질, 수분, 탄수화물의 경우 통계적 유의차를 보였으나, 문헌범위 이내에 존재하였으므로 생물학적으로 유의한 차이가 없음을 확인하였다.

② 아미노산

- 분석한 아미노산 18종 중 알라닌(Alanine), 아스파르트산(Aspartic acid), 시스테인(Cysteine), 글루탐산(Glutamic acid), 히스티딘(Histidine), 이소류신(Isoleucine), 류신(Leucine), 메티오닌(Methionine), 페닐알라닌(Phenylalanine), 프롤린(Proline), 세린(Serine), 트레오닌(Threonine), 발린(Valine)의 경우 통계적 유의차를 보였으나, 문헌범위 이내에 존재하였으므로 생물학적으로 유의한 차이가 없음을 확인하였다.

③ 지방산

- 분석한 지방산 22종 중 베헨산(Behenic acid)의 경우 통계적 유의차를 보였으나, 문헌범위 이내에 존재하였으므로 생물학적으로 유의한 차이가 없음을 확인하였다.

(나) 미량영양성분

- 분석한 비타민 11종 중 비타민 B₃, 비타민 C의 경우 통계적 유의차를 보였으나, 문헌범위 이내에 존재하였거나 지역별로 일관성 있는 차이를 보이지 않았으므로 생물학적으로 유의한 차이가 없음을 확인하였다.
- 분석한 무기질 13종 중 무기질 모두 통계학적 유의차가 나타나지 않았다.

(다) 내재성독소

- 옥수수의 독성물질에 대하여 보고된 바가 없다(CFIA, 2003).

(라) 영양억제인자

- 분석한 항영양소(coumaric acid, ferulic acid, inositol, phytic acid, trypsin inhibitor) 중 phytic acid의 경우 통계적 유의차를 보였으나, 문헌범위 이내에 존재하였으므로 생물학적으로 유의한 차이가 없음을 확인하였다.

(마) 알레르기 유발성분

- 옥수수는 식품 알레르기를 유발하는 주요 원인 식품으로 간주되지 않는다(OECD, 2002).

(바) 삽입된 유전자의 대사산물

- DAS-40278 옥수수에 도입된 유전자 *aac1-1*는 AAD-1을 발현하여 2,4-D 제초제 및 AOPP 계통의 제초제에 내성을 부여하는 것을 제외하면 일반 옥수수 와 비교하여 DAS-40278 옥수수에서 유래한 식품의 성분에 의도하지 않은 변화는 없을 것으로 판단된다.

(사) 영양성

- Ross 육계를 DAS-40278-9와 일반 옥수수, 근연종 옥수수, 상업화 옥수수가 들어간 사료를 44일간 섭취시킨 결과 폐사율, 증체량, 사료효율 등에서 특이적 영향은 관찰되지 않았다.

(6) 유전자산물이 대사경로에 미치는 영향

- 숙주가 함유한 고유 성분에 대해서 AAD-1 효소에 대한 기질 반응성을 확인한 결과, 기질로 사용될 가능성이 낮은 것으로 확인되어 AAD-1은 2,4-D 제초제 및 AOPP 계통의 제초제에 내성을 부여하는 것 외에 다른 대사경로에 영향을 미치지 않을 것으로 판단된다.

(7) 식품유통 승인 및 식용 등의 이용 현황

- 현재까지 미국(2011), 멕시코(2011), 호주/뉴질랜드(2011), 캐나다(2012), 남아프리카공화국(2012), 일본(2012) 등에서 식품으로 승인받았다.