

해충저항성 GM감자와 non-GM감자의 Housekeeping gene 발현 분석

권미애 · 허진철 · 조현석¹ · 이상한[†]

경북대학교 식품공학과, ¹농진청 농업생명공학연구원 생물안전성과

Analysis of Housekeeping Genes in Mice Feeding on GM and non-GM Potatoes

Mi-Ae Kweon, Jin-Chul Heo, Hyun Seok Cho¹ and Sang-Han Lee[†]

Department of Food Science & Technology, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

¹National Institute of Agricultural Biotechnology, RDA, Suwon 441-707, Korea

Abstract

To develop human risk assessment protocols, we explored housekeeping gene and cytokine expression in mouse spleen cells using Rt-PCR. We normalized housekeeping gene expression by RT-PCR; gene expression was highly uniform in potato leaf and mouse spleen cells. We measured the expression of frequently used housekeeping genes, such as those encoding APRT, β -tubulin, Actin, Hsp 20.2, Cyclophilin, 18S RNA, Efla, Tbp, GAPDH, β -actin, Tuba2, Hprt, Cyclophilin A, Tfic, and RPL13A in mice fed GM or non-GM potatoes. Housekeeping gene expression did not show any significant differences between GM and non-GM potato-fed mice. The murine model of potato-fed mice did not express IL-4 and IL-13 at a significant levels.

Key words : genetically modified, risk assessment, housekeeping gene, RT-PCR

서 론

GM (Genetically Modified)작물은 최근 세계적인 식량위기를 타개할 수 있는 대안으로 많은 관심을 보이고 있다(1,2). 곤충 또는 해충에 대한 저항성을 가지게 하거나, 특정 살충제에 대하여 저항성을 가지게 함으로서 수확량을 늘리는데 그 목적이 있다. 이 외에도 가뭄과 추위에 강한 작물 등 환경을 극복할 수 있는 작물의 개발이 연구되고 있다(3,4). 그러나 이의 개발에 대한 반대의 우려 또한 만만치 않으며, 근본적으로 원래 작물체에 없는 인위적인 단백질의 생성으로 인간의 면역시스템에 부작용을 유발하는 등 risk assessment에 대한 과학적인 연구결과가 도출되어 있지 않다는 점과, 작물의 재배 환경을 파괴할 수 있다는 점에서 매우 심각한 문제를 야기할 수 있다. 실제 동물실험에서 알레르기를 유발하거나, 면역계에 이상이 있다는 보고(5)

가 있고, 특히 환경으로의 GM방출은 다른 2차 오염을 유발할 수 있는 것으로 우려되고 있으며, 토종작물에 대한 risk assessment가 또한 미미한 실정이다(6). 해충저항성 작물에서 생산하는 단백질은 비표적곤충 등에 악영향을 줄 가능성 또한 배제할 수가 없으며, 재배지역이 아닌 다른 지역으로의 이동을 막을 수 있는 방법이 거의 없다는 것 또한 우려스러운 문제이다(7-9). GM작물의 장점은 저렴한 생산비에 많은 수확을 이룰 수 있기 때문에 미국뿐만 아니라 아시아와 아프리카 등으로 경작지가 빠르게 확산되고 있다(10,11). 한국은 공식적으로 연구용을 제외한 GM작물을 생산하고 있지 않으며, 철저한 통관기준에 의하여 몇몇 GM작물이 수입되고 있다. 본 연구는 인체 및 환경 위해성 문제와 관련하여 해충저항성 유전자(cry1A)를 이입한 감자에서의 housekeeping 유전자의 발현을 이입하지 않은 감자와 비교하였으며, 이를 실험동물의 사료에 첨가하여 한 달간 섭취시킨 마우스의 특정 장기에서의 housekeeping 유전자의 발현을 확인함으로써 면역계와 관련된 안전성 여부를 판단하는 기초적인 자료로 삼고자 실험을 수행하였다.

[†]Corresponding author. E-mail : sang@knu.ac.kr,
Phone : 82-53-950-7754, Fax : 82-53-950-6772

재료 및 방법

재 료

실험에 사용된 형질전환된 감자는 해충저항성 유전자인 cry1A가 형질전환 되어 있는 감자와 이 유전자가 삽입되지 않은 감자를 농촌진흥청 생물안전성연구소에서 구입하여 사용하였다(12).

GM감자를 이용한 사료 제작 및 마우스 사육

수확된 감자는 분쇄기를 이용하여 곱게 갈은 다음 60℃ 오븐에서 완전히 건조시켰으며, 마우스 사료(효창사이언스)와 1:1의 비율로 배합하여 물과 교반하여 사료와 동일한 모양으로 만들었다. 마우스 (3 mouse/cage)는 BALB/c를 효창사이언스로부터 5주령을 구입하여 1주일 순화시킨 뒤 사용하였으며, 동물은 경북대학교 농업생명과학대학 실

험동물사육시설에서 KGLP 가이드라인에 준하여 사육을 하였다. 감자를 이용하여 만든 사료는 일반사료와 구분하여 마우스에 섭취토록 하였으며, 30일간 자유로운 상태에서 먹이를 섭취시켰다.

마우스 비장 세포의 사이토카인 측정

30일간 일반사료, GM 또는 non-GM감자를 섭취한 마우스에서 비장을 절취하여 IL-4와 IL-13의 양을 측정하였다. 절취한 비장을 RPMI 1640 배지에서 잘게 부순 다음, 지방을 제거한 후 수세하였으며, 적혈구를 파괴한 다음 백혈구만을 취해서 10% FBS가 들어간 RPMI 1640배지에서 24시간 배양하였다. 배양 후 상층액을 IL-4와 IL-13 ELISA kit (R&D)를 사용하여 sandwich ELISA방법에 의하여 양을 측정하였다.

Table 1. Housekeeping genes in potatos and their primer sequences used for RT-PCR analysis.

No	Gene name	Expected size (bp)	Gene symbol	Primer F/R	GenBank accession #
1	APRT	466	APRT	GGT CAA TTT CGT CCC AGA AA AAT AGC CAA TGC AAT GGG AG	CK270447
2	β-tubulin	499	β-tubulin	ACC TGA GGA AAT TGG CTG TG ATG TTG CTC TCG GCT TCA GT	609267
3	Actin	406	Actin	GTC TGT GAC AAT GGA ACA GGA A CAT ACA GCG AAA GAA CAG CTT G	X55749
4	Hsp 20.2	336	Hsp 20.2	AAT TCT TGC GGC AAA GGT ATT A GAC ATT CTT GGT GAC AAG GTG A	BQ511516
5	Cyclophilin	302	Cyclophilin	GAT GGG TAA GCC TTT GCA CTA C CCT TCT TAA TCA CAT CCA AGC C	AF126551
6	18S rRNA	374	18S rRNA	GGA AGT TTG AGG CAA TAA CAG G CCT ACG GAA ACC TTG TTA CGA C	X67238
7	Efla	478	Efla	ACT GTA CCT GTT GGT CGT GTT G GTG GGT ATT CAG CAA AGG TCT C	AB061263

Table 2. Housekeeping genes in mice and their primer sequences used for RT-PCR analysis.

No	Gene name	Expected size (bp)	Gene symbol	Primer F/R	GenBank accession #
1	β-actin	384	β-act	ACT GGG ACG ACA TGG AGA AG TCT CAG CTG TGG TGG TGA AG	NM_007393
2	Tbp	317	Tbp	ACT GCA GCA GCC TCA GTA CAG ATG ATG ACT GCA GCA AAT CG	NM_013684
3	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	370	GAPDH	ACT CCA CTC ACG GCA AAT TC CCT TCC ACA ATG CCA AAG TT	NM_008084
4	Tubulin alpha	315	Tuba2	TGG TTG AGC CCT ACA ATT CC GCT GCT CAT GGT AGG CTT TC	NM_011654
5	Hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase 1	361	Hprt	TGC TCG AGA TGT CAT GAA GG GAG AGG TCC TTT TCA CCA GCA	NM_013556
6	Peptidyl-prolyl isomerase A	312	Cyclophilin A	GTC TCC TTC GAG CTG TTT GC ATC CAG CCA TTC AGT CTT GG	NM_008907
7	Tfrc/Trfy/Tfr1	315	Tfrc	GTT TCC GCC ATC TCA GTC AT CCT GTT CCC ACA CTG GAC TT	NM_011638
8	Ribosomal protein l 13 A	371	Rpl13a	GTA CGC TGT GAA GGC ATC AA TTC TCC TCC AGA GTG GCT GTC	NM_009438

유전자 발현 측정

유전자가 이입된 감자와 이입되지 않은 감자 각각 3개체를 실험실로 이동시키고 이들의 잎을 각각 액체질소를 이용하여 냉동상태에서 분쇄하였다. 분쇄 후 Tri-Reagent를 이용하여 RNA 추출과정을 거치고, 마우스에서의 housekeeping gene의 변화정도는 GM감자와 non-GM감자를 한 달간 섭취한 마우스를 이용하였다. 비장 적출은 마취 후 복강을 절개한 다음 적출하였으며, 액체질소로 급속 동결을 하였으며, 동결 후 -70 °C에 보관 후 실험하였다. 동결된 조직을 막자사발을 이용하여 미세하게 분쇄 후 Tri-Reagent (MRC, USA)를 이용하여 RNA를 획득하였다. 획득된 RNA는 RT kit (Intron)을 이용하여 reverse transcription을 실시하였으며, PCR 반응 조건은 94°C (30"), 55°C (30"), 72°C (30")의 조건으로 32 cycle을 실시하였다(13). PCR primer로는 감자의 경우 housekeeping gene인 APRT, β-tubulin, actin, Hsp 20.2, cyclophilin, 18S RNA, efla를 사용(Table 1)하였으며, 마우스는 β-actin, ttp, GAPDH, tubulin-α, hprt, cyclophilin A, trfc, rpl13a를 사용하였다(Table 2).

결과 및 고찰

최근의 과학기술의 발달은 육종의 단계를 한 차원 뛰어넘어 특정 유전자의 삽입은 물론 생명의 복제까지 연구의 대상이 되고 있다. 현재 GM작물의 연구방향은 수확량 증대와 재배지역의 확대를 위하여 환경에 견딜 수 있는 작물을 만드는 것이다(14). 이는 특정 유전자의 이입에 의한 특정단백질의 생산을 가능하게 하는데, 이 과정에서 안전성의 문제가 대두될 수 있다. 실제 이러한 문제는 종종 무역 분쟁을 유발시키는데, 미국과 유럽이 그 대표적인 경우이다. 미국의 경우 GM작물의 상업적 확대에 많은 관심을 가지고 있지만 유럽의 경우는 정부 및 소비자 단체에 의해 GM작물의 안전성이 확보되기 전까지는 인체 위해성이나 환경 위해성 측면에서 매우 민감하게 반응하고 있다. GM작물을 섭취할 경우 안전성에 대한 우려는 단기적인 접근이 아닌 장기적인 연구를 통하여 비로소 가능하기 때문에 향후 이러한 문제에 대하여 세계적인 risk assessment의 SOP나 guideline이 필요하다(15,16).

본 연구는 현재 국내에서 개발 중인 해충저항성 유전자가 이입된 감자(12)를 이용하여 non-GM감자와의 housekeeping 유전자의 발현을 비교해 봄으로서, 이입된 유전자에 의한 타 유전자의 영향을 알아보고자 함이며, 또한 이를 섭취한 마우스를 이용하여 GM감자 또는 이입된 유전자(산물)에 의한 영향이 있는지를 housekeeping 유전자의 발현 수준에서 알아보고자 하였다. GM감자에 사용된 곤충저항성 유전자는 국내에서 벼, 배추 등에 이입되어 연구되고 있으며, 세계적으로 면화, 옥수수 등에 이용되어 그 효과가 탁월한

것으로 알려져 있다. Cry1A는 가장 많이 이용되는 곤충저항성 유전자로 *Bacillus thuringiensis* toxin의 일종이다. 이의 작용기작은 곤충의 중장상피에 삼투압의 변화를 일으켜 세포를 죽게 만드는 것으로 알려져 있다(17,18). 각종 저항성 유전자의 가장 큰 장점은 관련 해충에 대해 살충제의 사용을 획기적으로 줄일 수 있다는 것이다. 이는 생산비의 절감 뿐 아니라 양질의 농업산품을 생산하는데 큰 도움이 된다. 그러나 저항성 유전자에 의해 생산되는 단백질은 이

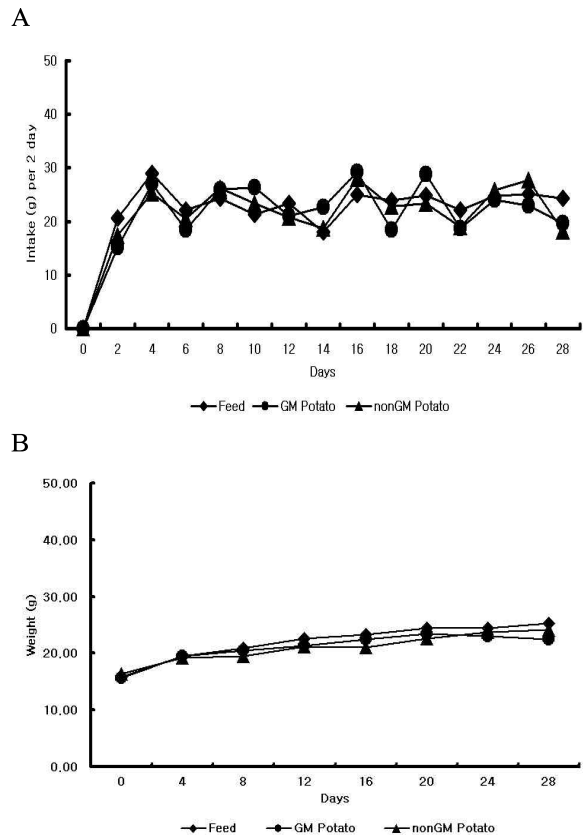


Fig. 1. Food intake and weight gain for 30 days with mice.

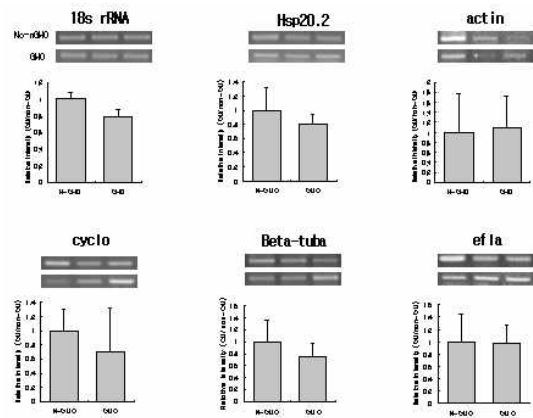


Fig. 2. Housekeeping gene expressions in GM and non-GM potatoes, by densitometric analysis using RT-PCR.

전의 작물이 가지고 있지 않은 것으로 다른 유전자의 발현 및 단백질의 변화에 관여하게 될 지도 모른다(19). 본 연구는 이와 관련하여 GM감자와 non-GM감자의 식이량과 housekeeping 유전자의 발현 및 비장세포의 사이토카인 활성을 비교하여 보았다. 사료로 만든 non-GM/GM 감자를 섭취한 마우스에서의 섭취량과 이에 따른 체중증가를 한 달간 관찰 해 본 결과, 일반사료와 비교하여 큰 차이를 나타

대조군으로 이용된다. GM감자와 non-GM감자의 housekeeping 유전자인 APRT, β -tubulin, actin, Hsp 20.2, cyclophilin, 18S RNA, efla을 RT-PCR을 통하여 비교한 결과, GM과 non-GM감자간 발현의 큰 차이는 나타나지 않았다(Fig. 2). non-GM/GM 감자의 섭취에 따른 비장에서 사이토카인 IL-4와 IL-13의 발현을 확인하기 위하여 sandwich ELISA를 통하여 분석을 시도하였다. IL-4와 IL-13은 면역조절반응에 중요한 역할을 담당하고 있으며 이의 과다한 분비는 천식을 유발하는 매개체로 알려져 있다. 그림3에서 나타난 바와 같이 non-GM/GM 및 사료의 섭취에 따른 이들 cytokine의 발현량의 변화는 나타나지 않았다(Fig. 3). Cry1A는 실제 면역관련 cytokine에 영향을 주는 것으로 보고된 바 있으며, 저항성단백질에 지속적으로 노출 될 경우 cytokine에 영향을 줄 수 있다고 한다. 이러한 연구들은 GM 작물이 작물의 생산량은 증가시키지만 안전성 면에서 문제점이 있음을 시사하는 것이므로 본 연구에 이어 보다 많은 노출량이나 동물의 연령을 다양하게 변화하여 시도해 볼 필요도 있다고 판단된다(5,6).

GM작물의 안전성 여부를 판단하는 과정에서 가장 예민한 부분이 면역계통에 이상을 유발하는지의 여부로 알려져 있다. GM콩과 non-GM콩을 이용한 IgE 발현 관련 실험에서 이들 시험물질 간에 부착단백질(adhesion protein)에 차이가 나타남을 보고하였고(20), 콩 추출물을 이용하여 면역반응을 유도한 마우스 모델에서는 IgE와 IgG1의 증가와 함께 IL-4와 IL-5가 증가하는 것으로 나타났으며 전반적으로 염증반응을 유도할 수 있는 Th2 관련 신호가 변화하는 것을 확인하였다(21). 본 연구에서는 GM감자를 식이한 경우 IL-4와 IL-13의 급격한 변화는 관찰되지 않았는데, 이는 실험방법에 따른 차이로 사료된다. 하지만 GM을 구성하는 새로운 단백질이 면역반응을 유도할 수 있다고 하는 것은 보다 많은 연구가 필요하다는 것을 의미한다. GM감자를 이용한 사료를 섭취시킨 쥐와 non-GM감자를 섭취시킨 쥐의 비장에서 β -actin, *tbp*, GAPDH, tubulin- α , *hprt*, cyclophilin A, *trfc*, *rpl13a*의 RNA의 발현양상을 알아본 결과, 해충저항성 GM감자를 이용한 사료를 섭취시킨 마우스와 일반 감자를 섭취시킨 마우스에서는 큰 차이를 보이지 않았다(Fig. 4).

본 연구에서는 곤충저항성 유전자 Cry1A가 이입된 감자와 이를 섭취시킨 마우스에서의 housekeeping gene의 변화가 큰 차이를 나타내지 않았다. 이 결과는 저항성유전자가 세포 내 다른 유전자의 발현에 영향을 주지 않는다고 할 수 있지만, 모든 유전자를 대상으로 한 것이 아니기 때문에 단정적으로는 말할 수 없다. 실험에 사용된 housekeeping gene는 비교적 외부 환경에 변화가 없는 유전자들로서 구성되어 있으며, 실제 많은 유전자들의 발현 및 억제를 통하여 세포가 유지되고 있음은 익히 아는 사실이다. 실제 저항성 유전자는 이러한 변화가 빈번한 유전자를 대상으로 더 많이 영향을 줄 수 있을 가능성을 배제 할 수 없으므로 이에

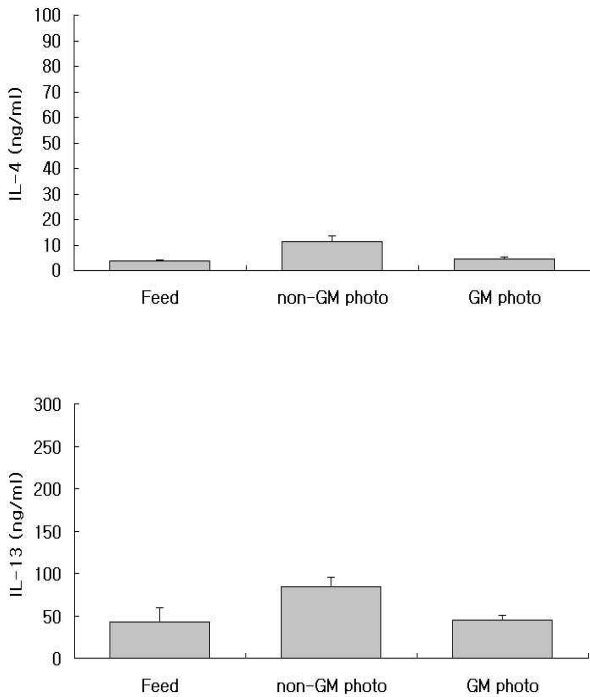


Fig. 3. Cytokine expressions of IL-4 and IL-13 in mouse spleen cells administered to GM and non-GM potatoes.

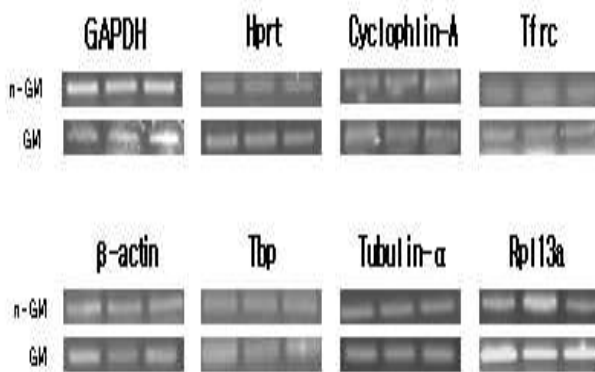


Fig. 4. Profile of housekeeping gene expression in mouse spleen cells administered to GM and non-GM potatoes.

내지 않았다(Fig. 1). Housekeeping 유전자는 세포 내에서 항상 발현이 되는 유전자로 많은 경우 외부에 큰 영향을 받지 않는 것으로 알려져 있으며, 유전자의 발현에 대한

대한 지속적인 모니터링 연구가 필요한데, 일례로 특정 식물에 대한 microarray 등을 통한 연구가 필요하다고 사료된다. 사료를 섭취시킨 마우스 또한 저항성 유전자 단백질이 영향을 줄 가능성을 배제할 수는 없다. 본 실험에서 housekeeping gene의 발현은 큰 차이를 보이지 않았지만, 저항성유전자는 곤충에 대한 식물의 방어기작으로 사용되며 곤충에는 해로운 물질이므로 이에 대한 유전자의 발현과 저항성 단백질에 의한 마우스의 영향 등에 대한 연구는 장기적으로 그리고 다각도로 이루어져야 GM작물에 대한 risk의 결과를 추정할 수 있다고 판단된다.

GM작물은 생산량 증대와 고품질 작물을 수확할 수 있다는 장점이 있지만, 원래 없던 새로운 유전자의 이입으로 일어나는 일련의 event를 모두 파악할 수는 없으므로 GM작물의 안전성에 대한 연구는 많은 표본을 가지고, 보다 장기적인 관점에서 다양한 모니터링 시스템을 도입하여 접근해야 한다.

요 약

GM 및 non-GM 감자의 인체 위해성 여부를 판단하기 위하여 마우스 비장세포에서 인터루킨과 housekeeping gene의 발현을 RT-PCR로 비교 분석하였다. 유전자변형 감자의 잎과 이를 섭취한 마우스의 비장세포에서 발현되는 housekeeping gene의 발현을 수행한 결과, APRT, β -tubulin, Actin, Hsp 20.2, Cyclophilin, 18S RNA and Efla, and Tbp, GAPDH, β -actin, Tuba2, Hprt, Cyclophilin A, Tfrc, and RPL13A의 발현에는 유전자 변형 감자와 그렇지 않은 감자와의 차이를 발견할 수 없었다. GM작물의 안전성에 대한 연구는 많은 표본을 가지고, 보다 장기적인 관점에서 다양한 모니터링 시스템을 도입이 필요하다고 판단되며 이의 향후 연구에 많은 관심이 필요하다.

감사의 글

본 연구는 바이오그린21사업(20050601-034-857)의 지원에 의하여 이루어진 것입니다.

참고문헌

1. Pinheiro, M.M., Gerhardt, L. and Margis, R. (2000) A technology with multiple applications. *Hist. Cienc. Saude Manguinhos*, 7, 465-479
2. Sakamoto, T. and Matsuoka, M. (2004) Generating high-yielding varieties by genetic manipulation of plant architecture. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 15, 144-147
3. Zhu, C., Naqvi, S., Gomez-Galera, S., Pelacho, A.M., Capell, T. and Christou, P. (2007) Transgenic strategies for the nutritional enhancement of plants. *Trends Plant Sci.*, 12, 548-555
4. Campbell, M.A., Fitzgerald, H.A. and Ronald, P.C. (2002) Engineering pathogen resistance in crop plants. *Transgenic Res.*, 11, 599-613
5. Mazza, R., Soave, M., Morlacchini, M., Piva, G. and Marocco, A. (2005) Assessing the transfer of genetically modified DNA from feed to animal tissues. *Transgenic Res.*, 14, 775-84.
6. Guerrero, G.G., Russell, W.M. and Moreno-Fierros, L. (2007) Analysis of the cellular immune response induced by *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins in mice: effect of the hydrophobic motif from diphtheria toxin. *Mol. Immunol.*, 44, 1209-1217
7. Oliveira, A.R., Castro, T.R., Capalbo, D.M. and Delalibera, I. Jr. (2007) Toxicological evaluation of genetically modified cotton (Bollgard) and Dipel WP on the non-target soil mite *Scheloribates praeincisus* (Acari: Oribatida). *Exp. Appl. Acarol.*, 41, 191-201
8. O'Callaghan, M., Glare, T.R., Burgess, E.P. and Malone, A. (2005) Effects of plants genetically modified for insect resistance on nontarget organisms. *Ann. Rev. Entomol.*, 50, 271-292
9. Dale, P.J., Clarke, B. and Fontes, E.M. (2002) Potential for the environmental impact of transgenic crops. *Nat. Biotechnol.*, 20, 567-574
10. Sinha, G. (2007) AGBIOTECH. GM technology develops in the developing world. *Science*, 315, 182-183
11. Vain, P. (2006) Global trends in plant transgenic science and technology (1973-2003). *Trends Biotechnol.*, 24, 206-211
12. 조현석. (2008) 주요 유전자변형작물(벼, 배추, 감자, 잔디)의 환경 위해성 평가 연구. *농촌진흥청*, p.1-350
13. Heo, J.C., Park, J.Y., Lee, J.M., Kwon, T.K., Kim, S.U., Chung, S.K. and Lee, S.H. (2005) *Wisteria floribunda* gall extract inhibits cell migration in mouse B16F1 melanoma cells by regulating CD44 expression and GTP-RhoA activity. *J. Ethnopharmacol.*, 102, 10-14
14. Murai, A., Kobayashi, T., Okada, T. and Okumura, J. (2002) Improvement of growth and nutritive value in chicks with non-genetically modified phytase product from *Aspergillus niger*. *Br. Poult. Sci.*, 43, 687-695
15. Davies, K.M. (2007) Genetic modification of plant metabolism for human health benefits. *Mutat. Res.*, 622,

122-137

16. Krayer von Krauss, M.P., Casman, E.A. and Small, M.J. (2004) Elicitation of expert judgments of uncertainty in the risk assessment of herbicide-tolerant oilseed crops. *Risk Anal.*, 24, 1515-1527
17. Schrøder, M., Poulsen, M., Wilcks, A., Kroghsbo, S., Miller, A., Frenzel, T., Danier, J., Rychlik, M., Emami, K., Gatehouse, A., Shu, Q., Engel, K.H., Altosaar, I. and Knudsen, I. (2007) A 90-day safety study of genetically modified rice expressing Cry1Ab protein (*Bacillus thuringiensis* toxin) in Wistar rats. *Food Chem. Toxicol.*, 45, 339-349
18. Soberón, M. Pardo-López, L., López, I., Gómez, I., Tabashnik, B.E. and Bravo, A. (2007) Engineering modified Bt toxins to counter insect resistance. *Science*, 318, 1640-1642
19. Akiyama, H., Sakata, K., Kondo, K., Tanaka, A., Liu, M.S., Oguchi, T., Furui, S., Kitta, K., Hino, A. and Teshima, R. (2008) Individual detection of genetically modified maize varieties in non-identity-preserved maize samples. *J. Agric. Food Chem.*, 56, 1977-1983
20. Yum, H.Y., Lee, S.Y., Lee, K.E., Sohn, M.H. and Kim, K.E. (2005) Genetically modified and wild soybeans: an immunologic comparison. *Allergy Asthma Proc.*, 26, 210-216
21. Gizzarelli, F., Corinti, S., Barletta, B., Iacovacci, P., Brunetto, B., Butteroni, C., Afferni, C., Onori, R., Miraglia, M., Panzini, G., Di Felice, G. and Tinghino, R. (2006) Evaluation of allergenicity of genetically modified soybean protein extract in a murine model of oral allergen-specific sensitization. *Clin. Exp. Allergy*, 36, 238-248

(접수 2008년 6월 5일, 채택 2008년 7월 25일)