

## 애기장대 칼슘수송체를 발현하는 형질전환 현미의 생쥐 식이를 통한 안전성 평가

김경민 · 김창길 · 김병오<sup>1\*</sup>

경북대학교 생명자원과학대학 환경원예학과, <sup>1</sup>경북대학교 생명자원과학대학 생물응용학과

Received July 17, 2008 / Accepted October 25, 2008

**Safety Test of Brown Rice Expressing *Arabidopsis* Calcium Transporter by Feeding Trial in Mice.** Kyung-Min Kim, Chang-Kil Kim and Byung-Oh Kim<sup>1\*</sup>. Department of Environmental Horticulture, and <sup>1</sup>Department of Applied Biology College of Life Science and Natural Resources, Kyungpook National University, Sangju 742-711, Korea - Previously, we found that the transgenic rice plants over-expressing the *Arabidopsis* H<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> antiporter CAX 1 (accession no. U57411) gene accumulated 2.7 to 7.5-fold more calcium in the T<sub>3</sub> rice grains as compared to those of control. To examine physiological safety of the T<sub>3</sub> rice grains, the effect of the T<sub>3</sub> brown rice on change in levels of body weight and white blood cells was compared with that of the control Ilpum brown rice by feeding trial in mice. During the feeding trial for one month, there was no significant difference between two mice groups, which were fed by the T<sub>3</sub> brown rice or Ilpum brown rice. There were no detectable differences in their effects on immune functions including plaque-forming unit, peritoneal macrophage number, and NK-cell activity. In addition, biochemical analysis of the blood failed to exhibit any difference between two mice groups. Together, these results suggested that the T<sub>3</sub> brown rice, which was produced from a genetically modified organism (GMO), might be safe and possess a potential to be applicable as calcium-fortified feed or food. Long-term safety of the T<sub>3</sub> brown rice, however, remains to be elucidated.

**Key words :** Brown rice, CAX 1, nutrition stability, genetically modified organism (GMO) food, rice

### 서 론

벼(*Oryza sativa* L.)는 주식으로 이용하고 있으나, 쌀의 칼슘함량은 현미가 11~13 mg/100 g 백미가 6~9 mg/100 g 으로 다른 채소와 과일 등과 같이 그 함량이 그리 높지 않다. 따라서 만약 첨단 유전공학기술을 토대로 한 칼슘이 증가된 쌀의 생산이 가능해진다면 식품학적인 가치가 충분히 있는 기능성 식량자원의 확보가 가능하게 될 것이다. 또한 어린이나 현대인에게 부족해지기 쉬운 칼슘섭취가 용이해져 칼슘부족으로 야기될 수 있는 각종 질병 예방에도 기여할 수 있을 것이다[4,11]. 지금까지 칼슘 함량을 증가시키는 CAX 1 유전자에 의해 형질전환체를 획득한 작물은 감자, 토마토, 당근 등에서 목적유전자의 확인과 발현 여부를 검증하여 후대 검증실험 보고를 하였다[14-16]. 또한 형질전환된 당근을 이용하여 칼슘함량 분석과 식품학적인 결과가 보고되었다[7,12]. CAX 유전자 중에서 가장 칼슘 전환능력이 높은 CAX 1 유전자는 형질전환 벼가 보고되어 있으며[10], 모품종인 일품벼와 CAX 1이 도입된 T<sub>3</sub> 세대의 6계통 대상으로 종자 내 칼슘은 분석한 바 모품종보다 2.7~7.5배 높았다고 하였다[9]. 따라서 본 연구는 *Agrobacterium* 형질전환 방법에 의한 Ca<sup>2+</sup> transporter인 Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter 유전자로 벼에 도입하여 형질전환체를 만들어 칼슘 함량이 증가된 T<sub>3</sub> 종자를 이

용하여 생쥐의 사료로 섭취시켜서 GMO (genetically modified organisms) 식품의 식품적 안전성에 대한 기초자료로 이용하고자 한다.

### 재료 및 방법

GMO 안정성 검정을 위한 생쥐의 사료 조제 및 사육

본 연구는 *Agrobacterium* vector를 이용한 *Arabidopsis thaliana* Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup>수송체 CAX 1 (cation exchanger 1) 유전자가 T<sub>2</sub> 식물체에서 PCR 밴드가 확인된 식물체 T<sub>3</sub> 종자의 현미[9]를 이용하였다. GMO 식품의 식품적 안전성 검정을 위한 실험동물은 오리엔트바이오(주)에서 구입한 ICR계 3주령 암컷 생쥐(charles river)를 4일간 경북대학교 생명자원과학대학의 동물실에서 순화하여 사용하였다. Isolator Rack Cage System (MSRS, millenium-SPF rack system 주)오리엔트바이오)을 사용하고 동물실 내 명암은 12시간으로 조절시켰으며 실내온도는 23~25°C 내외로 유지하며, 습도는 60%로 유지하고 환풍기를 24시간 가동하여 공기를 순환시켰다. 사료와 제조용 사료를 각각 사용하였고 물은 증류수를 자유롭게 섭취하도록 하였다.

사료 제조 및 실험 동물군

본 실험에 사용된 식이는 미국 영양학회의 성분표 (AIN-76)를 참고로 직접 조제한 균형사료를 공급하고, GMO 현미(T<sub>3</sub> 종자의 현미) 섭취군과 대조군으로 일품벼의 현미

### \*Corresponding author

Tel : +82-54-530-1216, Fax : +82-54-530-1218

E-mail : kimb@knu.ac.kr

(일품현미) 섭취군과 일반 생쥐용 사료를 각각 구분하며 실시하였다. GMO 현미(평균 칼슘 함량 699.90 ppm/100 g)과 일품현미(평균 칼슘 함량 96.41 ppm/100 g)을 사료에 첨가하여 섭취시켰다[2]. 각각의 사료는 자유롭게 섭취하도록 하였다. 집단 구분과 사료 구성은 Table 1과 2와 같다. 생쥐의 변화는 3일에 1회 측정하여 1개월 동안 그 변화를 알아보고 기록하였고, 또한 이때 얻어지는 생쥐의 sample들을 활용하여 성장 촉진효과 시험과 면역기능 증식시험을 실시하였다.

### 성장 촉진 효과 시험

체중 측정과 백혈구 수의 변화 측정은 GMO 현미를 섭취한 생쥐의 체중 변화를 time schedule 별로 측정하였고, 면역장기인 비장과 흉선의 무게를 정확히 측정하여 장기중량과 체중의 비를 산출하였다. 백혈구 수의 측정은 생쥐의 정맥으로부터 10  $\mu$ l의 혈액을 취하여 2 ml glacial acetic acid, 1 ml 1% crystal violet 용액, 100 ml 증류수를 포함한 용액을 만들어 혈액을 20배 희석하여 hemocytometer를 이용하여 현미경 하에서 측정하였다. 생쥐의 혈중 성장호르몬(plasma IGF-1)은 ELISA 방식을 이용한 kit (Amersham Pharmacia Biotech, UK)를 사용하여 측정하였다. 생쥐의 혈중 전체 단백질 양, triglyceride, calcium은 자동혈액 생화학분석기(Spectrum, Abbott)를 사용하여 분석하였다. B 세포의 분화 능력에 대한 GMO 현미의 영향을 측정하기 위해 SRBC (sheep red blood cell)에 대한 항체생성능력을 Bullock과 Moller [3]에 의해 변형된 Jerne plaque assay [8]를 이용하여

측정하였다. 30일 동안 GMO 현미를 생쥐에 투여하고 투여 종료 4일 전에 SRBC ( $5 \times 10^8$  cells/ml)를 복강 내 투여하여 면역시키고 15일째에 비장을 적출하여 비장세포현탁액을 만든다. DEAE-dextran을 함유한 0.5% agar 용액 400  $\mu$ l를 시험관에 넣고 47°C의 수조에 유지시킨 후, 3회 세척한 25  $\mu$ l SRBC, 50  $\mu$ l 비장세포현탁액 및 3배 희석한 25  $\mu$ l guinea pig complement를 넣은 후 즉시 혼합한다. 혼합액 200  $\mu$ l를 petri-dish로 옮긴 후 cover glass (24 $\times$ 40 mm)로 덮고 3시간 동안 배양한 후 형성된 용혈반형성 세포수를 측정하고 비장현탁액의 희석배수를 계산하여 PFCs/ $10^6$  cells로 나타내었다.

### 면역 기능 조절 시험

대식세포가 면역증강효과를 나타내는 기전의 하나인 NO의 생성에 대한 GMO 현미의 영향을 알아보기 위하여 배양상등액 중의 NO 생성도를 Green 등[6]의 방법에 따라 측정하였다. GMO 현미를 섭취한 생쥐의 대식세포( $1 \times 10^5$  cells/well)를 LPS, LPS-r-IFN, Poly IC (polyriboinosinic: polyribocytidylic acid) 등으로 24시간 동안 활성화시킨 후 배양상등액 100  $\mu$ l를 취하여 100  $\mu$ l Griess reagent (0.1% naphthylethylenediamine dihydrochloride와 1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid)를 가하고 혼합한 후, ELISA reader (Quantikine Immunoassays from R&D systems, USA)로 540 nm에서 측정하였다. NO의 농도는 NaNO<sub>2</sub>를 사용하여 작성된 표준곡선으로부터 환산하였다. GMO 현미를 섭취한 생쥐의 혈청을 채취하여 혈청내의 IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , GM-CSF 등을 포함하는 다양한 cytokine들의 변화를 ELISA kit를 이용하여 측정하였다[5]. Goat anti-human IL-2, goat anti-human IL-4, goat anti-human IL-6, goat anti-human IL-8, goat anti-human INF- $\gamma$ , goat anti-human TNF- $\alpha$ , goat anti-human GM-CSF를 PBS (Phosphate buffered saline)로 희석하여 flat-bottomed 96 well plate에 분주한 후 4°C overnight 배양한 후 1% skim milk로 30분 동안 상온에서 blocking한다. Plate를 PBS로 세척한 후 PBS로 희석된 혈청 시료를 plate에 가하여 1시간 동안 반응시키고 세척한 후 alkaline phosphatase-conjugated second antibody (AP-goat anti-human IgG)를 1:1,000으로 희석하여 첨가하고 37°C에서 2시간 반응시켰다. Substrate인 p-nitro-phenyl phosphate를 넣은 후 ELISA reader를 사용하여 492 nm에서 OD를 측정하였다[1,5]. Phagocytic activity 측정은 Okimura 등[13]의 zymosan particle 도입방법을 이용하여 측정하였다. 96 well plate에 GMO 현미를 섭취한 생쥐의 대식세포를  $1 \times 10^5$  cells/well의 농도로 넣고 zymosan을  $5 \times 10^6$  particles/ml이 되도록 가한 후 0.6 mg/ml NBT를 가하고 1시간 동안 배양한다. 냉각된 N-ethylmaleimide의 생리식염수 용액으로 2회 세척한 후 생성된 formazan을 DMSO (dimethyl sulfoxide)로 녹인 다음 ELISA reader로 540 nm에서 측정하

Table 1. Animal grouping

| Groups     | Feed type                               | No. of mouse |
|------------|---|--------------|
| Control A  | Normal <sup>*</sup>                     | 10           |
| B          | Ilpum brown rice                        | 15           |
| Experiment | T <sub>3</sub> brown rice <sup>**</sup> | 15           |

<sup>\*</sup>Mouse feed, <sup>\*\*</sup>T<sub>3</sub> brown rice is GMO brown rice (*Oryza sativa* L.).

Table 2. Diet composition

| Item                                   | Control (g/kg) |        | Experiment (g/kg) |
|--|----------------|--------|-------------------|
|  | A              | B      |                   |
| Casein                                 | 250.90         | 250.90 | 250.90            |
| Cellulose                              | 180.80         | 180.80 | 180.80            |
| Sucrose                                | 50.00          | 50.00  | 50.00             |
| Corn oil                               | 50.00          | 50.00  | 50.00             |
| Mineral mix                            | 30.50          | 30.50  | 30.50             |
| Vitamin mix                            | 10.30          | 10.30  | 10.30             |
| DL-methionine                          | 00.20          | 00.20  | 00.20             |
| Ilpum brown rice                       | -              | 400.50 | -                 |
| T <sub>3</sub> brown rice <sup>*</sup> | -              | -      | 400.50            |

<sup>\*</sup> T<sub>3</sub> brown rice is GMO brown rice (*Oryza sativa* L.).

였다. NK 세포의 활성화도 측정을 위해서는 NK 세포에 대해 감수성을 지닌 YAC-1 세포를 사용하여 이에 대한 cytotoxicity로 조사하였다. GMO 현미를 섭취한 생쥐와 사료만 섭취한 생쥐의 비장을 각각 분리하여 96 well plate에  $5 \times 10^5$  cells/well의 농도로 넣은 후 YAC-1 세포를 target cell로 하여 25:1의 비율로 넣고, 20시간 동안 배양하였다. 세포 증식을 알아보기 위해 25  $\mu$ l MTT (2  $\mu$ g/ml)를 가하고 4 시간 동안 더 배양한 후 측정하였다.

결과 및 고찰

GMO 현미와 일품현미 및 일반적인 생쥐 사료를 30일 동안 섭취한 후 성장촉진효과 시험은 다음과 같다. 생쥐의 체중 변화량(Fig. 1)과 백혈구 수의 측정(Fig. 2)에서와 같이 체중변화량은 GMO 현미가 시간이 가면 갈수록 증가하는 편이고, 일품현미와 일반적인 생쥐사료를 섭취한 생쥐의 체중 변화량은 14일 동안에는 생쥐 사료가 체중 변화량이 크게 나타

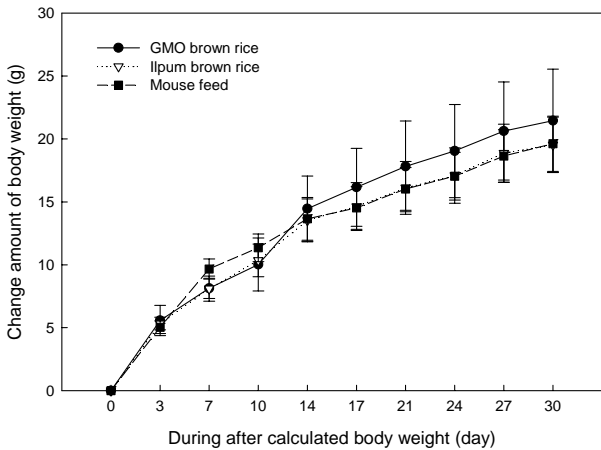


Fig. 1. Effect of GMO brown rice (*Oryza sativa* L.) on the change of body weight in mice following the feeding trial for one month.

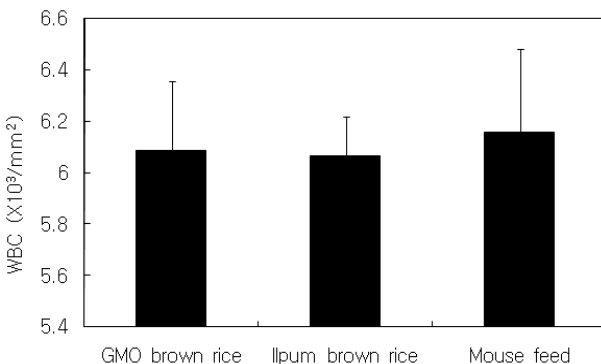


Fig. 2. Effect of GMO brown rice (*Oryza sativa* L.) on the number of white blood cells in mice following the feeding trial for one month.

났으나, 30일에는 체중 변화량이 거의 동일하였다. 따라서 GMO 현미가 30일째 대조구 사료보다 체중 변화량이 증가하였으나 3개의 사료 간에는 유의적인 차이는 없었다. 또한 백혈구 수의 GMO 현미와 일품현미 및 생쥐 사료는 각각  $6.086 \pm 0.267$ ,  $6.066 \pm 0.153$ ,  $6.156 \pm 0.325$ 로 측정되었으며, 3개의 사료 간에는 거의 차이가 없었으나 대조구로 사용한 사료의 경우는 조금 많게 나타났다.

GMO 현미의 면역기능 조절 시험은 다음과 같다. 항체생성능측정(Fig. 3)에서 GMO 현미( $179.26 \pm 19.030$ )가 일품현미( $165.22 \pm 18.364$ )보다 조금 높은 세포 수로 나타났고, 생쥐 사료의 경우는  $193.42 \pm 19.272$ 로 나타나, 생쥐 사료가 3개의 사료 중에서 가장 높게 나타났으나, 유의적인 차이는 없었다. 한편, 면역기능의 조절 및 발현에 중요한 역할을 담당하고 있는 대식세포의 수에 미치는 GMO 현미의 영향을 조사하기 위해 각 식이 생쥐집단의 복강 대식세포의 수를 측정한 결과, GMO 현미의 경우는  $24.4 \times 10^5$ 이었고 일품현미는  $24.3 \times 10^5$ 이며, 그리고 생쥐 사료는  $25.1 \times 10^5$ 으로 각각 조사되었으므로, 이들 3가지의 사료들 간에는 차이가 거의 없는 것으로 나타났다(Fig. 4).

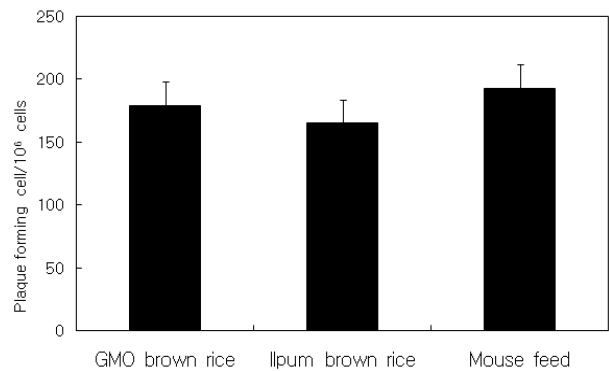


Fig. 3. Effect of GMO brown rice (*Oryza sativa* L.) on the plaque forming cell response in mice following the feeding trial for one month.

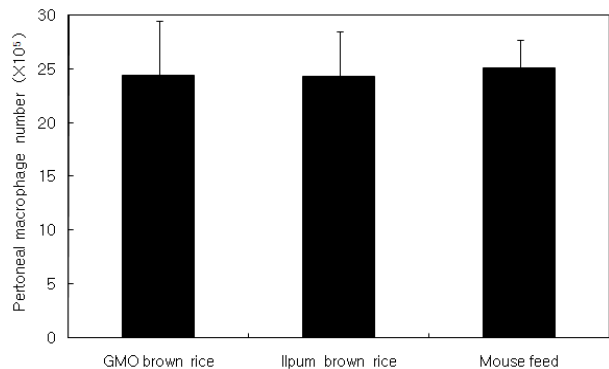
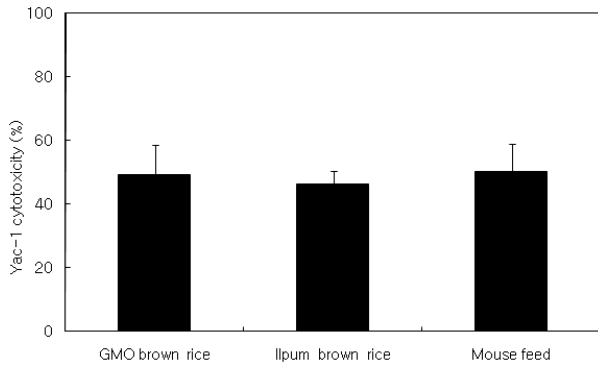


Fig. 4. Effect of GMO brown rice (*Oryza sativa* L.) on the number of peritoneal macrophage in mice following the feeding trial for one month.

Table 3. Biochemical analysis of blood from mice following the feeding trial for one month

| Group            | Ave.      |           |                |                     |                      |                 |             |                     |                      |
|------------------|-----------|-----------|----------------|---------------------|----------------------|-----------------|-------------|---------------------|----------------------|
|                  | GOT (U/L) | GPT (U/L) | Albumin (g/dl) | Cholesterol (mg/dl) | Triglyceride (mg/dl) | Glucose (mg/dl) | BUN (mg/dl) | T-Bilirubin (mg/dl) | Crcreatinine (mg/dl) |
| GMO brown rice   | 42.7      | 9.0       | 2.9            | 160.7               | 107.6                | 246.1           | 14.3        | -0.2                | 0.4                  |
| Ilpum brown rice | 41.2      | 7.9       | 2.8            | 150.6               | 107.9                | 227.7           | 15.9        | -0.2                | 0.4                  |
| Mouse feed       | 49.6      | 14.2      | 2.9            | 144.4               | 120.0                | 228.7           | 22.6        | -0.3                | 0.4                  |

Fig. 5. Effect of GMO brown rice (*Oryza sativa* L.) on the NK cell activity in mice following the feeding trial for one month.

NK cell의 활성화 측정은 NK cell-sensitive한 YAC-1 세포에 대한 cytotoxicity로 측정된 바(Fig. 5), GMO 현미는 49.2±9.2, 일품현미는 46.3±4.0, 생쥐 사료는 50.2±8.6%로 조사되어 3개의 사료는 차이가 나지 않았다. 또한 혈액의 생화학 특성 조사에서 GMO 현미는 GOT가 42.7 U/L, GPT가 9.0 U/L, albumin이 2.9 g/dl, Cholesterol이 160.7 mg/dl로 일품 현미보다 조금 높게 나타났으며, triglyceride, glucose, BUN은 오히려 조금 낮은 수치로 나타났고, T-bilirubin과 crcreatinine는 같은 수준으로 나타났다. 그러나 3개의 사료는 혈액의 생화학적 차이가 나타나지 않음을 확인하였다(Table 3). 그러나 본 실험에서 GMO 현미를 이용하여 만든 사료로 생쥐에게 섭취시키면서 식품학적인 효과를 연구한, Jeong과 Guerinot [7]가 CAX 1 유전자를 당근에 형질전환하여 칼슘 함량을 증가시킨 당근을 생쥐에게 섭취시킨 실험 결과와 일치한 결과로 나타났다. 따라서 앞으로 Jeong과 Guerinot [7]가 제시한 칼슘이 증가된 GMO 당근의 유해성과 사람과 생쥐에서 식품학적인 칼슘 흡수의 차이 및 식품학적인 안정성에 대한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## 요 약

선행연구에서 *Arabidopsis thaliana* Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> 역수송체 유전자인 CAX 1 (cation exchanger 1)이 도입된 벼 형질전환체의 T<sub>3</sub> 종자는 대조구에 비해 2.7~7.5배 정도 높은 칼슘을 함유하고 있음을 확인한 바 있다. 이 T<sub>3</sub> 종자 유래 현미의 생리학적

안전성을 조사하기 위해, 일품현미를 대조구로 하여 생쥐 식이 실험을 수행하고 체중 및 말초 백혈구 수의 변화를 조사하였다. 일 개월 동안의 식이의 결과, T<sub>3</sub> 현미의 경우는 체중의 변화량 혹은 말초 백혈구의 수에 있어서 대조구인 일품현미의 경우와 거의 차이가 없었다. 체액성 면역능의 지표인 플라크-형성능, 복강 대식세포의 수, 그리고 NK 세포의 활성화도 등을 비롯한 면역기능에 대한 영향에 있어서도 대조구와 유사하였다. 아울러 혈액의 생화학적 분석조사에서도 두 실험군 사이에 별다른 차이가 나타나지 않았다. 이상의 연구결과는 GMO 벼 유래의 T<sub>3</sub> 현미가 생리학적으로 안전하며 또한 칼슘 함량이 강화된 동물사료 혹은 식품으로 적용될 수 있는 잠재 능이 있음을 시사한다. 한편 장기적 안전성에 대한 평가를 위해서는 좀 더 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

## 감사의 말

본 연구는 농촌진흥청 현장협력기술개발사업(과제번호: 2007050108000402) 연구비 지원에 의한 일부 결과 및 경북대학교(2008년도) 학술연구지원금에 의해 연구되었음.

## References

1. Ausubel, F. M., F. Katagiri, M. Mindrinos and J. Glazebrook. 1995. Use of *Arabidopsis thaliana* defense-related mutants to dissect the plant response to pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**, 4189-4196.
2. Bonnet, M., C. Delavaud, J. Rouel and Y. Chilliard. 2005. Pregnancy increases plasma leptin in nulliparous but not primiparous goats while lactation depresses it. *Domest Anim Endocrinol.* **28**, 216-223.
3. Bullock, R. W. and E. Moller. 1972. Spontaneous B cell activation due to loss of normal mouse serum suppressor. *Eur. J. Immunol.* **2**, 514-517.
4. Choe, J. S., H. H. Ahn. and H. J. Nam. 2002. Comparison of nutritional composition in Korean rice. *J. Korean Soc. Food. Sci. Nutr.* **31**, 885-892.
5. Gaffney, T. D. and T. G. Lessie. 1987. Insertion-sequence-dependent rearrangements of *Pseudomonas cepacia* plasmid pTGL1. *J. Bacteriol.* **169**, 224-230.
6. Green, L. C., D. A. Wagner, J. Glogowski, P. L. Skipper and J. S. Tannenbaum. 1982. Analysis of nitrate, nitrite and [15N]nitrate. *Anal. Biochem.* **126**, 131-136.

7. Jeong, J. and M. L. Guerinot. 2008. Biofortified and bioavailable: The gold standard for plant-based diets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 1777-1778.
8. Jerne, N. K. and A. A. Nordin. 1963. Plaque formation in agar by single antibody-producing cells. *Science*. **140**, 405.
9. Kim, K. M., J. H. Nam, G. H. Park and J. K. Sohn. 2006. Evaluation of  $Ca^{2+}$ -enhanced rice plant expressing the *Arabidopsis*  $Ca^{2+}/H^{+}$  antiporter *CAX1* gene. *Korean J. Breed* **38**, 343-348.
10. Kim, K. M., Y. H. Park, C. K. Kim, K. D. Hirschi and J. K. Sohn. 2004. Development of transgenic rice plants over-expressing the *Arabidopsis*  $H^{+}/Ca^{2+}$  antiporter *CAX1* gene. *Plant Cell Rep.* **23**, 678-682.
11. Kim, M. S., H. R. Yang and Y. H. Jeong. 2004. Mineral contents of brown and milled rice. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **33**, 443-446.
12. Morris, J., K. M. Hawthorne, T. Hotze, S. A. Abrams and K. D. Hirschi. 2008. Nutritional impact of elevated calcium transport activity in carrots. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **105**, 1431-1435.
13. Okimura, T., M. Ogawa and T. Yamauchi. 1986. Stress and immune responses. III. Effect of restraint stress on delayed type hypersensitivity (DTH) response, natural killer (NK) activity and phagocytosis in mice. *Jpn. J. Pharmacol.* **41**, 229-235.
14. Park, S., C. Kim, L. Pike, R. Smith and K. Hirschi. 2004. Increased calcium in carrots by expression of an *Arabidopsis*  $H^{+}/Ca^{2+}$  transporter. *Mol. Breeding* **14**, 275-282.
15. Park, S., N. H. Cheng, J. K. Pittman, K. S. Yoo, J. Park, R. H. Smith and K. D. Hirschi. 2005. Increased calcium levels and prolonged shelf life in tomatoes expressing *Arabidopsis*  $H^{+}/Ca^{2+}$  transporters. *Plant physiol.* **139**, 1194-1206.
16. Park, S., T. S. Kang, C. K. Kim, J. S. Han, S. Kim, R. H. Smith, L. M. Pike and K. D. Hirschi. 2005. Genetic manipulation for enhancing calcium content in potato tuber. *J. Agri. Food Chem.* **53**, 5598-5603.