

## 베타카로틴강화미 발현단백질에 대한 항원성연구

박수진·정미혜\*·장희섭·오진철·박경훈·박재읍

농촌진흥청 국립농업과학원 농산물안전성부 농자재평가과

(2011년 8월 23일 접수, 2011년 9월 16일 수리)

### A Study on Antigencity (Immunotoxicity Study) to the Expressed Proteins of $\beta$ -Carotene Biofortified Rice

Soo Jin Park, Mihye Jeong\*, Hee Seop Chang, Jin Cheol O, Kyung-Hun Park and Jae-Yup Park

Agro-Material Safety Evaluating Division, Department of Agro-Food Safety, National Academy of Agricultural Science, Rural Development Administration, Suwon 441-707, Korea

#### Abstract

As part of safety evaluation of 2A (amono acid), PAT (phosphinotricin Acetyl-transferase), CtrI (Carotene desaturase) and PSY (phytoene synthase), the expressed proteins inserted to  $\beta$ -carotene Biofortified rice were tested for antigencity test. As a result, the group of administering high-concentration PAT, the expressed protein, showed a great content of total WBC; however, other expressed proteins did not show much difference. Against ASA (Active Systemic Anaphylaxis) test, the group of administering high-concentration PAT, the expressed protein, showed mild or medium degree of symptoms, but there was no dead entity. According to the result of the PCA (Passive Cutaneous Anaphylaxis test), the group of administering high-concentration PAT, 2A, PSY, and mixture of expressed proteins indicated positive response in low anti-serum concentration, and the group of administering the clinical concentration of mixture indicated mild positive response. However, because the group of administering the clinical concentration of expressed proteins, PAT, 2A, PSY, and CtrI, did not show positive response, it is thought that IgE is not generated. Further studies are needed to verify the safety of  $\beta$ -carotene Biofortified rice.

**Key words**  $\beta$ -carotene Biofortified rice, Immunotoxicity (antigencity test), Anaphylaxis, GMO

## 서 론

GM작물은 전 세계적으로 가중되고 있는 ‘식량·기아문제’ 해소면에서 긍정적인 평가를 받아왔다(James, 2007).

최초의 베타카로틴 강화미는 수선화의 phytoene synthase (PSY)유전자와 세균 *Erwinia uredovora*의 phytone desaturase (Ctrl) 유전자를 삽입함으로써 재조합되었고(Ye 등, 2000), 2세대는 옥수수 PSY 유전자를 삽입하여 carotenoid 함량이 보다 높게 개발되었다(Paine 등, 2005).

최근, 국내 농촌진흥청 국립농업과학원에서는 숙과색의 고추 (*Capsicum*)에서 carotenoid의 생합성 조절기작을 규명하고 (Ha 등, 2007), 고추 PSY 유전자와 Ctrl(Carotene desaturase) 등 대사관련 다중 유전자를 배유에서 발현시켜 베타카로틴이 축적되는 베타카로틴 생합성 벼를 개발하였으며(Ha, 2009), 일반 백미가 도정과정 중에 호분층 미량의 베타카로틴이 제거되는 것과는 달리(Sautter 등, 2007), 베타카로틴 생합성 벼의 현미와 백미의 베타카로틴 함량은 각각 2.35, 2.03  $\mu\text{g/g}$ 으로 현미 뿐 아니라 백미의 배유에서도 비슷한 함량의 베타카로틴이 생합성 되었음을 보고하였다(Ha, 2009; Lee 등, 2009).

베타카로틴은 간에서 비타민 A로 전환되며, 당근, 호박 등

\*연락처 : Tel. +82-31-290-0593, Fax. +82-290-0508

E-mail: mhjeong@korea.kr

의 녹황색채소에 함유되어있는 항산화성분으로, 관상동맥질환 및 만성질환과 암 등의 성인병에 효과가 있고, 결핍 시 야맹증 등 시력의 이상증상을 야기할 수 있다(Buu, 2003). 세계보건기구(WHO)에서는 전 세계적으로 2억 3천만명 아이들이 비타민 A결핍이며, 그 중 1년에 백만명이 실명 또는 사망에까지 이르는 것으로 파악된다고 보고하였고(Buu, 2003), 따라서, 아시아지역 등 다수 나라에서 대중적으로 소비되는 백미를 대신하여 개발된 베타카로틴 강화미 품종들이 비타민 A결핍을 극복하는 도구가 될 것이라 기대를 모으고 있다(Buu, 2003).

GM 작물은 다양한 긍정적인 평가에도 불구하고, GM 작물의 알레르기 유발 및 독성발생가능성 등 환경 및 인체 위해가능성에 대한 우려가 증가하고 있어 안전성 입증의 중요성이 되고 있다(James, 2007).

국내 GM 작물의 안전성 평가는 발현 물질, 주요성분의 조성분석, 대사산물의 평가, 식품가공, 영양학적인 변화 등 크게 다섯 부분이고, 발현물질의 안전성 평가는 독성평가와 알레르기 유발성 평가가 있으나, 농산물 도입유전자 발현단백질에 대한 안전성 문제에 대한 연구결과는 부족한 실정이다.(식품의약품안전청, 2009).

유전자재조합식품의 알레르기유발 가능성은 삽입된 특정 유전자의 반복적인 노출에 의한 것으로 여겨지며, 베타카로틴강화미 또한 다양한 유전자들의 삽입으로 새롭고 복잡한 대사반응이 일어나므로, 이러한 대사과정을 통해 생체 내 새로운 반응이 나타날 수 있음을 배제할 수 없다(Ye 등, 2000).

유전자재조합식품 섭취에 따른 알레르기 증상 발생을 확인하는 것은 쉽지 않으며, 따라서 혈청 내 특이 IgE의 존재를 확인하는 혈청 선별검사가 알레르기 안전성을 평가하기 위한 보조적인 수단으로 사용되고 있다. 실험동물을 통한 연구도 진행되었으나, 알레르기 발생 위험성을 평가하는 방법으로 완전하지 못해 이에 대한 논의는 계속되고 있는 실정이다(Lee 등, 2009; Metcalfe, 2005; Goodman 등, 2005; Spok 등, 2005; Goodman 등, 2008).

식품 알레르기 모델에서 수동이나필락시스(passive cutaneous anaphylaxis) 반응과 생리반응이 항원 특히 IgE의 생성정도와 비례한다는 연구가 있는 후 IgE 생성을 유도하는 동물 모델을 확립하려는 연구가 다양하게 이루어지고 있다(Crowe과 Perdue, 1992).

따라서, 본 연구에서는 농촌진흥청에서 개발한 베타카로틴 강화미에 사용된 발현단백질에 대해 알레르기 유발성을 평가하기 위해 아나필락시스시험을 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 시험물질

본 시험에 사용한 시험물질 2A(amono acid, Mw: 220 Da, 순도: 95%이상), PAT(phosphinotricin Acetyl-transferase, Mw: 20 KDa, 순도: 85%), Ctrl(Carotene desaturase, Mw: 53 kDa, 순도: 82%), PSY(phytoene synthase, Mw: 46 kDa, 순도: 76%)는 농촌진흥청 국립농업과학원 생물안전성부에서 제공받아 사용하다.

시험에 사용된 각 발현단백질은 현미 배양에서 발현되는 양을 기준으로 하였으며, 성인 1인당 쌀 섭취량을 최대 500 g로 하여 4종의 발현단백질의 투여농도를 계산하였다. 4종의 단백질 발현비율로 혼합하여 혼합투여물질을 조제하였으며, 시험시료는 투여직전 멸균 증류수에 용해하여 사용하였고, 대조군으로는 멸균증류수를 사용하였다.

### 투여농도

각 단백질의 투여농도는 각각이 베타카로틴강화 현미에서 발현되는 양을 기준으로 임상농도(Low)를 계산하였으며, 공비를 10배로 하여 고농도(High)를 설정하였다. 각각 단백질 당 투여농도는 2A(Low): 0.2 µg/100 g, 2A(High): 2 µg/100 g, PAT(Low): 10 µg/100 g, PAT(High): 100 µg/100 g, Ctrl(Low): 4.45 µg/100 g, Ctrl(High) : 44.5 µg/100 g, PSY(Low) 45.4 µg/100 g, PSY(High): 454 µg/100 g으로 하였다. 4종 단백질 혼합투여물질은 Mix. (Low) : 2A:PAT:Ctrl:PSY = 0.2:10:4.45:45.4(v/v/v/v), Mix. (High) : 2A:PAT:Ctrl:PSY = 2:100:44.5:454(v/v/v/v)의 비율로 혼합하여 시료로 양성대조군으로는 ovalbumin을 5 mg/mL로 제조하여 사용하였다.

### 실험동물 및 사육조건

모든 시험은 국립농업과학원 동물실험윤리위원회 승인 후 (승인번호: NAAS1103) 수행하였다.

기니픽(Dunkin Hartley계)은 알레르기 등 면역생리학적 과정이 인간과 매우 유사하므로 아나필락시스유발시험 등 면역반응시험에 사용되는 실험동물이다(식품의약품안전청, 2010). 따라서, 실험동물로는 기니픽을 선발하였으며, 300 ± 50 g의 Hartley계 수컷 기니픽을 (주)한림실험동물연구소에서 제공받아 일주일의 순화기간을 거친 후 건강한 동물만을 선별하여 각 시험물질 당 5마리씩 사용하였다. 사육환경은 온도 23 ± 2°C, 습도 55 ± 5% 배기 10-15/hr, 조명 12시간 및 조도 200-300 Lux이었고, 기니픽 사료는 기니픽용 고형사료(LabDiet 5025)

를 음용수는 멸균수를 자유롭게 공급하였다.

### 총백혈구함량측정

체혈 한 혈액을 혈액분석기(Baker system 9118 Hematology Analyzer, Biochem Immunosystems Inc., U.S.)을 사용하여 총백혈구함량을 측정하였다.

### 아나필락시스쇼크반응시험

아나필락시스쇼크반응시험(ASA, Active Systemic Anaphylaxis test)에서는 300 ± 50 g의 Hartley계 수컷 기니픽에 각 시험군 및 음성대조군(Saline)은 일주일에 3회 씩 총 9회 피하 투여하였고, 양성대조군은 Ovalbumin과 FCA(Freund's complete adjuvant)와 FIA(Freund's incomplete adjuvant)를 사용하여 일주일에 1회씩 총 3회 감작하였다. 최종감작 2주일 후 각각의 투여용량 중 고용량의 항원을 정맥주사하고, 60분 동안 반응을 관찰하였다(식품의약품안전청, 1999).

### 아나필락시스쇼크반응 평가

아나필락시스는 종합적으로 쇼크정도에 따라 음성[-]은 아무런 임상증상이 관찰되지 않았을 때, 경증[±]은 불안(Restlessness), 기모(Piloerection), 진전(Tremor), 코를 문지르거나 핥음(Rubbing or licking nose)의 증상이 관찰되고, 중등도[+]는 경증의 증상과 함께 재채기(Sneezing), 기침(Coughing), 호흡축진(Hyperpnea), 배뇨(Urination), 배변(Evacuation), 유루(Lacrimation)의 증상이 나타나며, 중증[++]은 호흡곤란(Dyspnea), 짹짹거리는 소리(Rhonchus), 청색증(Cyanosis), 보행불안(Staggering gait), 도약(Jumping), 혈떡거리고 몸부림침(Gasping and writhing), 경련(Convulsion), 횡와(Side position), Cheyne-Stoke 호흡의 증상이 나타날 때이며, 사망 시 [+++]로 판정하였다(식품의약품안전청, 1999).

### 수동피부아나필락시스 반응시험

수동피부아나필락시스 반응시험(PCA, Passive Cutaneous Anaphylaxis test)은 동종(기니픽-기니픽)피부 아나필락시스 반응시험을 수행하였다.

300 ± 50 g의 Hartley계 수컷 기니픽에 각 시험군 및 음성대조군(Saline)은 일주일에 3회 씩 총 9회 피하 투여하였고, 양성대조군은 Ovalbumin과 FCA(Freund's complete adjuvant)와 FIA(Freund's incomplete adjuvant)를 사용하여 일주일에 1회씩 총 3회 감작하였다. 최종 투여 2주일 후에 기니픽의 복

대정맥에서 혈액을 채취하였으며, 4°C에서 3,500 rpm, 15분 동안 원심분리후 상층액을 분리해 항혈청을 제조하였다.

1주간 순화기간을 거친 300 ± 50 g의 Hartley계 수컷 기니픽을 피내투여 24시간 전 제모기를 사용하여 등 부위를 가능한 넓게 제모하였으며, 주사부위를 marker로 표시한 다음 대조군과 각 시험군의 항혈청 50 µL씩을 표시부위에 피내주사 하였다. 항혈청은 2<sup>0</sup>-2<sup>10</sup>배 희석하여 사용하였고, 한 개체의 항혈청을 2-3마리씩 피내주사하여 개체군간의 차이를 보정하였다.

항혈청 피내주사 24시간 후 야기항원과 2% Evans blue를 동량으로 혼합하여 기니픽의 미정맥에 주사하였고, 30분 경과 후 항혈청 주사부위에 나타나는 청색반점을 관찰하였다(식품의약품안전청, 1999).

### 수동피부아나필락시스반응 평가

청색반점의 장경과 단경의 평균치가 5 mm이상이면 양성으로 판정하고, 양성을 나타내는 가장 마지막 혈청 희석액의 희석 배수를 그 항혈청의 항체가로 결정하여 아나필락시스와 관련 있는 IgE가 생성된다고 판정하였다(식품의약품안전청, 1999).

## 결과 및 고찰

### 체중의 변화

체중은 독성을 판단할 수 있는 중요한 요소이다(Kwon 등, 2004).

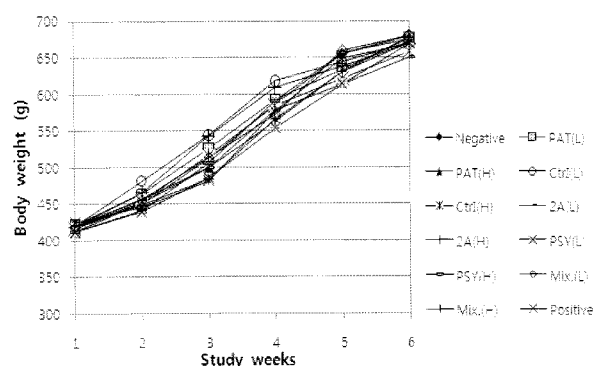


Fig. 1. Body weight of guinea pig for study weeks.

2A : amono acid, PAT : phosphinotricin Acetyl-transferase, Ctrl : Carotene desaturase, PSY : phytoene synthase, Negative : Saline, Positive : Ovalbumin, L : Low, H : High, 2A Low : 0.2 µg/100 g, 2A High 2 µg/100 g, PAT Low 10 µg/ 100 g, PAT High 100 µg/100 g, Ctrl Low : 4.45 µg/100 g, Ctrl High : 44.5 µg/100 g, PSY Low 45.4 µg/100 g, PSY High 454 µg/100 g, Mix. Low : 2A:PAT:Ctrl:PSY = 0.2:10:4.45:45.4 (v/v/v/v), Mix. High : 2A:PAT:Ctrl:PSY = 2:100:44.5:454 (v/v/v/v), Ovalbumin : 5 mg/mL

감작기간 동안 각 군당 기니픽의 체중변화를 살펴본 결과 투여군 간에 유의적 차이는 없었고, 이상독성증상 또한 관찰되지 않았다.

**Table 1.** Total WBC contents for guinea pig

Groups		WBC (10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )
Negative		3.20 ± 0.49
PAT	Low	4.65 ± 1.93
	High	9.60 ± 0.50***
Ctrl	Low	4.87 ± 2.60
	High	6.53 ± 1.69
2A	Low	5.67 ± 1.50
	High	5.67 ± 1.51
PSY	Low	3.40 ± 0.02
	High	5.13 ± 1.90
Mix.	Low	5.28 ± 1.80
	High	5.70 ± 1.16
Positive		7.56 ± 2.87**

2A : amono acid, PAT : phosphinotricin Acetyl-transferase, Ctrl : Carotene desaturase, PSY : phytoene synthase, Negative : Saline, Positive : Ovalbumin, 2A Low : 0.2 µg/100 g, 2A High 2 µg/100 g, PAT Low 10 µg/ 100 g, PAT High 100 µg/100 g, Ctrl Low : 4.45 µg/100 g, Ctrl High : 44.5 µg/100 g, PSY Low 45.4 µg/100 g, PSY High 454 µg/100 g, Mix. Low : 2A:PAT:Ctrl:PSY = 0.2:10:4.45:45.4 (v/v/v/v), Mix. High : 2A:PAT:Ctrl:PSY = 2:100:44.5:454 (v/v/v/v), Ovalbumin : 5 mg/mL \*\**p*>0.01, \*\*\**p*>0.001

**Table 2.** Anaphylaxis symptoms of each groups of guinea pig

Sensitization	Challenge	No. of animals	Severity of anaphylaxis					Positive ratio
			-	±	+	++	+++	
Negative	Saline	5	5	-	-	-	-	0/5
PAT	PAT High	Low	5	-	-	-	-	0/5
		High	5	-	2	-	3	5/5
Ctrl	Ctrl High	Low	5	-	-	-	-	0/5
		High	5	-	-	-	-	0/5
2A	2A High	Low	5	-	-	-	-	0/5
		High	5	2	-	-	-	0/5
PSY	PSY High	Low	5	-	-	-	-	0/5
		High	5	-	-	-	-	0/5
Mix	Mix. High	Low	5	-	-	-	-	0/5
		High	5	-	-	-	-	0/5
Positive	Ovalbumin	5	-	-	-	-	5	5/5

2A : amono acid, PAT : phosphinotricin Acetyl-transferase, Ctrl : Carotene desaturase, PSY : phytoene synthase, Negative : Saline, Positive : Ovalbumin, 2A Low : 0.2 µg/100 g, 2A High 2 µg/100 g, PAT Low 10 µg/100 g, PAT High 100 µg/100 g, Ctrl Low : 4.45 µg/100 g, Ctrl High : 44.5 µg/100 g, PSY Low 45.4 µg/100 g, PSY High 454 µg/100 g, Mix. Low : 2A:PAT:Ctrl:PSY = 0.2:10:4.45:45.4 (v/v/v/v), Mix. High : 2A:PAT:Ctrl:PSY = 2:100:44.5:454 (v/v/v/v), Ovalbumin : 5 mg/mL

**총 백혈구합량 측정**

각 군별 총 백혈구합량을 측정한 결과, PAT- High에서 총 백혈구합량은 유의성있는 차이를 나타냈으나(*p*< 0.001), 다른 투여단백질 간에는 큰 차이를 나타내지 않았다(Table 1).

병원균에 대한 신체방어 기능 감소 시, 생체 내 백혈구와 TNF-a 등의 염증단백질이 증가하게 되며(Kim 등, 2008), 따라서, 본 연구결과 PAT 고농도 투여로 인해 신체방어 기능이 감소될 수 있음을 알 수 있다.

**아나필락시스쇼크유발시험**

아나필락시스쇼크유발시험 결과, Ovalbumin군은 항원 정맥투여 후 심한 경련반응을 나타내다가 5마리 모두 사망하였으며, PAT-High 2마리에서 코를 문지르는 증상을 보였고, 3마리에서는 짹짹거리는 소리를 내어 경미한 또는 중등 정도의 아나필락시스반응을 나타냈으나 사망개체는 없었다. 그 외 다른 투여군에서는 양성반응이 관찰되지 않았다(Table 2).

아나필락시스는 항원에 의하여 이미 감작된 개체에 동일 항원 투입 시 IgE 항체에 의해 일어나는 즉시형 과민반응을 의미한다. IgE는 소량 존재하나, 아나필락시스반응을 일으키는 작용을 가지고 있다. 전신성 아나필락시스는 수초이내에 일어나며, 기도 및 기관지 수축으로 인하여 호흡곤란을 초래하고, 혈압강하로 쇼크에 이른다. 국소 아나필락시스반응은 피부, 비



Continued

	No. of Serum	Mark of animal	2 <sup>0</sup>	2 <sup>1</sup>	2 <sup>2</sup>	2 <sup>3</sup>	2 <sup>4</sup>	2 <sup>5</sup>	2 <sup>6</sup>	2 <sup>7</sup>	2 <sup>8</sup>	2 <sup>9</sup>	2 <sup>10</sup>	Challenging antigen	
2A	Low	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<0	
		2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<0	
		3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<0	
		4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<0	
		5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<0	
	High	1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<2 <sup>0</sup>
		2	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	<2 <sup>3</sup>
		3	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	<2 <sup>3</sup>
		4	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	<2 <sup>5</sup>
		5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<0
PSY	Low	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<0	
		2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<0	
		3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<0	
		4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<0	
		5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<0	
	High	1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<2 <sup>0</sup>
		2	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<2 <sup>1</sup>
		3	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<2 <sup>2</sup>
		4	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<2 <sup>1</sup>
		5	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	<2 <sup>3</sup>
Mix.	Low	1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<2 <sup>0</sup>	
		2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<0	
		3	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<2 <sup>1</sup>	
		4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<0	
		5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<0	
	High	1	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	<2 <sup>5</sup>
		2	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	<2 <sup>3</sup>
		3	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<2 <sup>2</sup>
		4	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	<2 <sup>3</sup>
		5	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	<2 <sup>3</sup>

‘+’ : Positive reaction, ‘-’ : Negative reaction, 2A : amino acid, PAT : phosphotriacetyl-transferase, Ctrl : Carotene desaturase, PSY : phytoene synthase, Negative : Saline, Positive : Ovalbumin, 2A Low : 0.2 µg/100 g, 2A High 2 µg/100 g, PAT Low 10 µg/100 g, PAT High 100 µg/100 g, Ctrl Low : 4.45 µg/100 g, Ctrl High : 44.5 µg/100 g, PSY Low 45.4 µg/100 g, PSY High 454 µg/100 g, Mix. Low : 2A: PAT: Ctrl: PSY = 0.2:10:4.45:45.4 (v/v/v/v), Mix. High : 2A: PAT: Ctrl: PSY = 2:100:44.5:454 (v/v/v/v), Ovalbumin : 5 mg/mL

구조적 상동성이 없고, 인공위액에 쉽게 분해되어 알레르겐으로 작용할 가능성이 적다고 보고되어있다(Herouet 등, 2005).

유전자재조합식품 대두와 옥수수에서 PAT를 클로닝하여 알레르기 항원성을 판정한 결과, 알레르기 항원성과 무관하다 보고되었고(Ko 등, 2008), 옥수수에서 PAT를 클로닝하여 실시한 연구에서 PAT가 알레르기 질환을 일으킬 위험성이 없다고 보고하였다(Lee 등, 2009). 또한 PAT에 대한 피부단자시험과 ELISA에서 혈청 내 PAT-특이 IgE의 존재를 증명하지 못하였다(Batista 등, 2005; Tagagi 등, 2006)고 하였다.

그러나, 본 시험에서는 백혈구수 증가와 아나필락시스반응 및 IgE역가가 높히 측정되었으며, 위의 연구들과 상반되는

결과를 나타냈다.

또한, 1세대 베타카로틴강화미 삽입단백질 PSY의 근원인 수선화에서 특정 사람들에게 발진 등 알레르기 증상 유발가능성을 보고하였고(Conway, 2000), 농촌진흥청에서 개발한 베타카로틴강화미 삽입단백질 중 PSY의 근원인 고추에서 또한 눈과 코의 알레르기성비염 및 피부자극, 아나필락시스반응 등 다양한 알레르기반응이 나타날 수 있다고 보고하고 있다(Fuchs 등, 2002; Charndra 등, 1995).

본 시험에서도 PSY 고농도투여군(High)에서 수동아나필락시스 양성반응을 나타냈으며, 위의 연구들과 유사하게 알레르기유발가능성을 시사하고 있다.

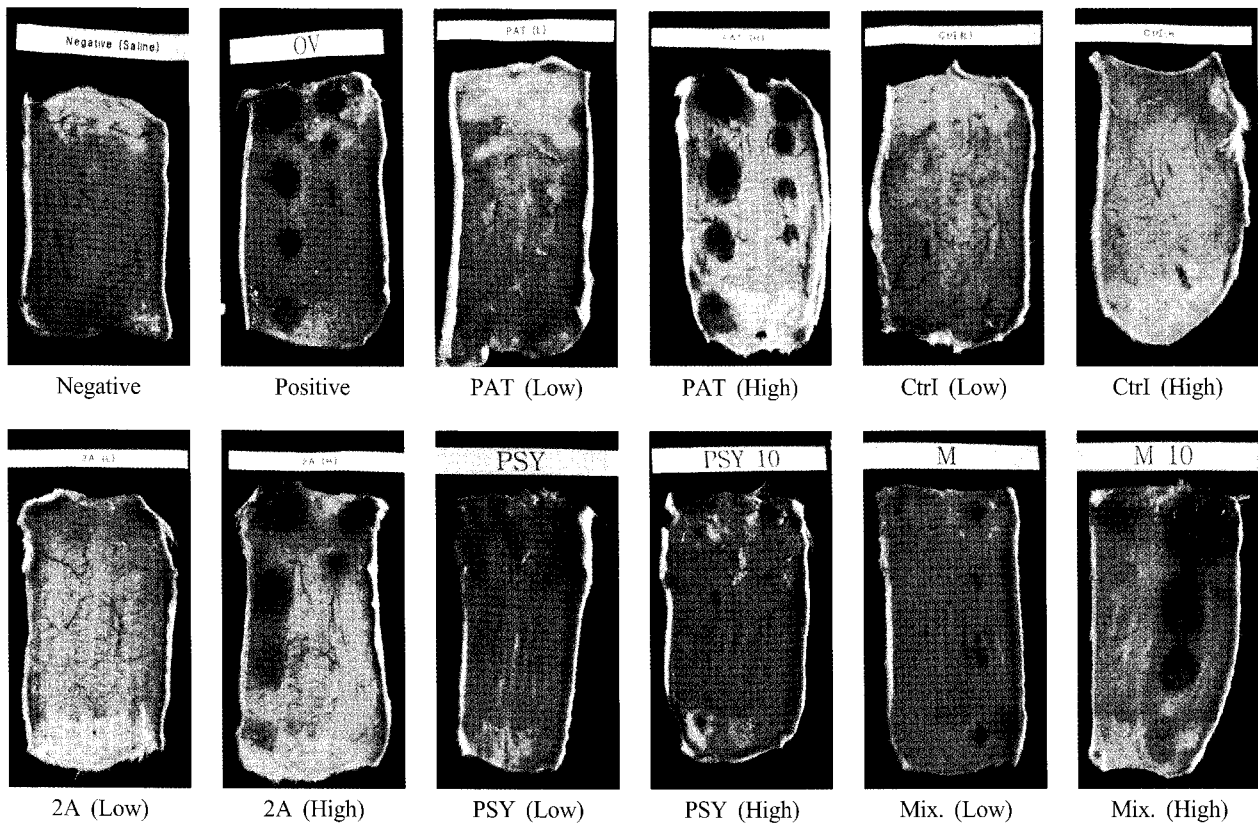


Fig. 2. Photographs of Passive cutaneous anaphylaxis test.

‘+’ : Positive reaction, ‘-’ : Negative reaction, 2A : amono acid, PAT : phosphinotricin Acetyl-transferase, Ctrl : Carotene desaturase, PSY : phytoene synthase, Negative : Saline, Positive : Ovalbumin, 2A Low : 0.2  $\mu\text{g}/100\text{ g}$ , 2A High 2  $\mu\text{g}/100\text{ g}$ , PAT Low 10  $\mu\text{g}/100\text{ g}$ , PAT High 100  $\mu\text{g}/100\text{ g}$ , Ctrl Low : 4.45  $\mu\text{g}/100\text{ g}$ , Ctrl High : 44.5  $\mu\text{g}/100\text{ g}$ , PSY Low 45.4  $\mu\text{g}/100\text{ g}$ , PSY High 454  $\mu\text{g}/100\text{ g}$ , Mix. Low : 2A:PAT:Ctrl:PSY = 0.2:10:4.45:45.4 (v/v/v/v), Mix. High : 2A:PAT:Ctrl:PSY = 2:100:44.5:454 (v/v/v/v), Ovalbumin : 5 mg/mL

현재 유전자변형 농산물의 발현단백질에 대한 안전성연구와 동일한 알레르겐에 감작된 인체 내 반응 연구 또한 부족한 실정이나(Lee 등, 2009), 발현단백질 단독 반응이 아닌 다른 기존의 단백질 및 화학물의 혼합으로 알레르기를 자극하거나 약화시킬 수 있는 가능성이 있어(Beroni과 Marsan, 2005), 안전성을 평가하는 것은 난해하며, 알레르기 발생 위험성을 평가하는 방법이 아직 불완전하므로 어느 한 가지 방법으로 알레르기 유발성에 관해 결론지을 수는 없다(Lee 등, 2009; Metcalfe, 2005; Goodman 등, 2005; Spok 등, 2005; Goodman 등, 2008).

현재 보고되어있는 베타카로틴강화미는 소비자의 환경 및 건강에 발생할 수 있는 위험과 과다섭취로 인한 위험성은 보고된바 없다(Potrykus, 2000).

베타카로틴 섭취 시 나타날 수 있는 반응은 개별적인 차이가 있을 수 있으나, 본 시험은 섭취기준보다 상한 범위인 성인 500 g/day을 베타카로틴 현미 100%(Low)로 섭취하였을 경우와 이의 10배 섭취(High)를 기준으로 시험되었고, 고농도로 설정된 시험군과는 달리 저농도로 설정된 각 발현단백질

4종에서 백혈구수 증가 및 아나필락시스 반응 등이 음성반응으로 나타나, 500 g/day 이하로 섭취한다면 알레르기 등의 면역반응에 크게 영향을 주진 않을 것으로 사료된다.

현대사회는 산업 및 과학의 발달에 따라, 알레르기 질환을 유발할 수 있는 알레르겐이 많아지고, 세계 영유아의 10-20%, 이 중 식품 식품알레르기 IgE 매개성 식품 알레르기는 미국 4%, 프랑스 3.5%라 보고되어 있다(Burks and Spampson, 1993; Kanny 등, 2001). 식품으로부터의 알레르기는 일부 예민한 사람에게서 발생되고, 섭취량이 소량 일 경우 또한 배재할 수 없어, 면역체계가 미숙하거나 약한 사람의 경우 예기치 못한 문제를 일으킬 소지가 있다.

따라서, 섭취에 대한 지속적인 모니터링을 실시 및 하루 섭취 기준량 설정, 그리고 다양한 체액성 면역반응 실험 등 베타카로틴강화미 알레르기 유발 가능성 연구가 필요하다고 판단된다.

## 감사의 글

본 연구는 2011년도 농촌진흥청 국립농업과학원 박사후연수과정지원사업에 의해 이루어진 것이며(과제번호 : PJ006835072011), 이에 감사드립니다.

### >> 인 / 용 / 문 / 헌

- Batista, R., B. Nunes, M. Carmo, C. Cardoso, H.S. Jose and Almeida, A.B. (2005) Lack of detectable allergenicity of transgenic maize and soya samples. *J Allergy Clin Immunol.* 116:403-410.
- Beroni, G. and P.A. Marsan (2005) Safety risks for animals fed genetic modified (GM) plants. *Vet Res Commun.* 29(2):13-8.
- Burks, A.W. and H. Spampson (1993) Food Allergies in children. *Curr Probl Pediatr.* 23:230-252.
- Buu, M.M. (2003) Golden Rice: Genetically Modified to Reduce Vitamin A Deficiency, Benefit or Hazard?. *Nutrition Byes.* 9:1-5.
- Cellier, D., J.S. Vendômois, F. Roullier and G.E. Séralini (2009) A Comparison of the Effects of Three GM Corn Varieties on Mammalian Health. *International Journal of Biological Sciences.* 5:706-726.
- Chandra, R.K., B. Gill and S. Kumari (1995) Food allergy and atopic disease: Introduction and overview. *Clin Allergy.* 13:293-314.
- Conway, G., Crop biotechnology: benefits, risks and ownership, Paper presented in an OECD conference: "Assessing the Safety of GM Food" held 28 February to 1 March 2000 at Edinburgh International Conference Center.
- Crowe, S.E. and M.H. Perdue (1992) Gastrointestinal food hypersensitive : basic mechanism of pathology. *Gastroenterology.* 103:1075-1095.
- Fuchs, H.C., K. Hoffmann-Sommergruber, B. Wagner, M. Krebitz, O. Scheinerm and H. Breiteneder (2002) Heterologous expression in *Nicotiana benthamiana* of cap a 1, a thaumatin-like protein and major allergen from bell pepper (*Capsicum annuum*). *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 109:S134-S135.
- Goodman, R.E., S.L. Hefle, S.L. Taylor and E. Ree (2005) Assessing genetically modified crops to minimize the risk of increased food allergy : a review. *Int Arch Allergy Immunol.* 137:153-166.
- Goodman, R.E., S. Vieths, H.A. Sampson, D. Hill, M. Ebisawa, and S.L. Taylor (2008) Allergenicity assessment of genetically modified crops-what makes sense?. *Nat Biotechnol.* 26:73-81.
- Ha, S.H., J.B. Kim, J.S. Park, S.W. Lee and K.J. Cho (2007) A comparison of the carotenoid accumulation in *Capsicum* varieties that show different ripening colours: deletion of the capsanthin-capsorubin synthase gene is not a prerequisite for the formation of yellow pepper. *J Exp Bot.* 58:3135-3144.
- Ha, S.H. (2009) Recombinant PIC gene including internal ribosome entry site sequence of crucifer-infecting Tobamovirus for beta-carotene biosynthesis, expression vector comprising thereof and a transformant cell. Korean Patent 10-2009-0084137.
- Herouet, C., D.J. Esdaile, B.A. Mallyon, E. Debruyne, A. Schulz and T. Currier (2005) Safety evaluation of the phosphinothricin acetyltransferase proteins encoded by the pat and bar sequences that confer tolerance to glufosinate-ammonium herbicide in transgenic plants. *Regul Toxicol Pharmacol.* 41:134-149.
- James, C. (2007) Global Status of Commercialized Biotech/GM Crop. ISAAA briefs No.32, pp.12. ISAAA: Ithaca, NY.
- Jeong, M.H., A.S. You, J.B. Lee, J.S. Shin, J.H. Kim and J.S. Han (2004) Mutagenicity studies of the herbicide-resistance phosphinothricin acetyltransferase (PAT). *The Korean Journal of Pesticide Science.* 8:22-29.
- Jo, E.H., S.D. Cho, N.S. Ahn, J.W. Jung, S.R. Yang, J.S. Park, K.S. Park, I.S. Hong, M.S. Seo, N.B. Tiep, Y.S. Lee and K.S. Kang (2003) Antigenicity study of nonspecific immunostimulator BARODON<sup>®</sup>. *Kor. J. Vet. Res.* 43:255-261.
- Kanny, G., D.A. Moneret-Vautrin, J. Flabbee, E. Beaudouin, M. Morisset and F. Thevenin (2001) Population study of food allergy in France. *J Allergy Clin Immunol.* 108:133-140.
- Kim, J.Y., Y.K. Lee, Y.J. Kang, K.J. Lee, I.W. Seo, K.S. Park, G.H. Jang, S.J. Kim, J.H. Yoo, S.Y. Yoo, H.Y. Lee, J.H. Hong and M.C. Kim (2008) Biomarkers and Study Design to Measure Immunomodulation in Health/ Functional Food. *Food Industry and Nutrition.* 13:34-40.
- Ko, M.S., S.W. Yoon, J.W. Oh and H.B. Lee (2008) Evaluation of Allergenicity to Genetically Modified Organic Foods. *Pediatr Allergy Respir Dis.* 18:292-304.
- Kwon, T.S., J.Y. Shin, S.C. Park and K.H. Kim (2004) Acute toxicity evaluation of Oregano oil in rats. *The Korean Journal of Laboratory Animal Science.* 20:419-425.
- Lee, S.I., J.Y. Kim, Y.S. Han, K.S. Lee, J.H. Kim, H.Y. Kim and K. Ahn (2009) Assessment of allergenicity in genetically modified herbicide-resistant foods using the serum screening test. *Pediatr Allergy Respir Di.* 19:250-259.
- Lee, Y.T., J.K. Kim, S.H. Ha, H.S. Cho and S.C. Suh (2010) Analyses of Nutrient Composition in Genetically Modified  $\beta$ -Carotene Biofortified Rice. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 39:105-109.
- Lehrer, S.B. and G. Reese (1997) Recombinant proteins in newly developed foods: Identification of allergenic activity. *Int Arch Allergy Immunol.* 1997: 122-124.
- Metcalf, D.D. (2005) Genetically modified crops and allergenicity. *Nat Immunol.* 6:857-860.
- Paine, J.A., C.A. Shipton, S. Chaggar, R.M. Howells, M.J. Kennedy, G. Vernon, S.Y. Wright, E. Hinchliffe, J.L. Adams, A.L. Silverstone and R. Drake (2005) Improving the nutritional



value of golden rice through increased pro-vitamin A content. *Nat Biotechnol.* 23:482-487.

Park, C.H. and M.J. Bae (2008) Immunotoxicity study of separated antigen from *Helicobacter pylori*. *Journal of Life Scienc.* 18:494-502.

Parsonnet, J., R.A. Harris, H.M. Hack and D.K. Owens (1996) Modelling cost-effectiveness of *Helicobacter pylori* screening to prevent gastric cancer; A mandate for clinical trials. *Lancet* 348:150-154.

Potrykus, I. (2000) Response to Golden Rice Critics, *Ag. Bio World* dated 28 June 2000, accessed through the web at <http://www.biotechknowledge.com>

Sautter, C., S. Poletti, P. Zhang and W. Gruissem (2006) Biofortification of essential nutritional compounds and trace elements in rice and cassava. *Proc Nutr Soc.* 65:153-159.

Spok, A., H. Gaugitsch, S. Laffer, G. Pauli, H. Saito and H. Sampson (2005) Suggestions for the assessment of the allergenic potential of genetically modified organism. *Int Arch Allergy Immunol.* 137:167-180.

Tagagi, K., R. Teshima, O. Nakajima, H. Okunuki and J. Sawada (2006) Improved ELISA method for screening human antigen-specific IgE and its application for monitoring specific IgE for novel proteins in genetically modified foods. *Regul Toxicol Pharmacol.* 44:182-188.

Ye, X., S. Al-Babili, A. Klöti, J. Zhang, P. Lucca, P. Beyer and I. Potrykus (2000) Engineering the provitamin A ( $\beta$ -carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free)rice endosperm. *Science.* 5:287-303.

식품의약품안전청. (2009) 유전자재조합식품 담당자 전문교육. pp. 28-31. 식품의약품안전청 신소재식품과. 대한민국.

식품의약품안전청. (1999) 의약품등의 독성시험기준. NITR/SOP/ITX/004\_02. pp127-138. 식품의약품안전청. 대한민국.

식품의약품안전청. (2010) 생약, 한약 제제의 효력시험 가이드라인, 알레르기비염. pp. 2. 식품의약품안전청 바이오생약국. 대한민국.

## 베타카로틴강화미 발현단백질에 대한 항원성연구

박수진 · 정미혜\* · 장희섭 · 오진철 · 박경훈 · 박재음

농촌진흥청 국립농업과학원 농산물안전성부 농자재평가과

**요 약** 베타카로틴강화미에 삽입된 발현단백질 PAT, 2A, CtrI, PSY의 안전성평가의 일환으로 항원성시험을 실시하였다. 그 결과, 발현단백질 PAT 고농도 투여군에서 총백혈구함량이 높게 측정되었으나, 다른 발현단백질 간에는 큰 차이를 나타내지 않았다. 아나필락시스쇼크반응에서는 발현단백질 PAT 고농도 투여군에서 경미한 또는 중등정도의 증상이 나타났으나 사망 개체는 없었다. 수동아나필락시스반응시험결과, 발현단백질 PAT, 2A, PSY 및 혼합 고농도투여군의 낮은 항혈청농도에서 양성반응이 나타났고, 혼합 임상농도 투여군에서는 경미한 양성반응을 보였다. 그러나, 발현단백질 PAT, 2A, PSY, CtrI 임상농도 투여군에서는 양성반응을 보이지 않아 IgE를 생성하지 않는 것으로 판단되며, 베타카로틴강화미의 안전성 입증에 위해 더 다양한 연구가 필요하다고 사료된다.

**색인어** 베타카로틴강화미, 면역독성(항원성시험), 아나필락시스, GMO