

Single-dose Oral Toxicity Study of β -glucosidase 1 (AtBG1) Protein Introduced into Genetically Modified Rapeseed (*Brassica napus* L.)

Soonbong Lee¹, Kwangju Jeong¹, Kyung-Min Jang², Sung-Gun Kim³, Jung-Ho Park^{2*} and Shinje Kim^{1*}

¹Fungi and Plants Co., Ltd., 60, Noam-ro, Doan-myeon, Jeungpyeong-gun, Chungbuk 27902, Korea

²Bio-Evaluation Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Cheongju, Chungbuk 28116, Korea

³Department of Biomedical Science, U1 University, Youngdong, Chungbuk 29131, Korea

Received September 28, 2016 / Revised November 22, 2016 / Accepted December 5, 2016

Rapeseed (*Brassica napus* L.) is an oil crop classified as Brassicaceae, and it is widely grown worldwide. To develop a drought-resistant rapeseed, the β -glucosidase 1 (AtBG1) gene was introduced into rapeseed because drought- and salt-resistance phenotypes were observed when the AtBG1 gene was over-expressed in arabidopsis. Newly developed genetically modified crop must be proved to be safe. Safety assessments are based on the historical usage and scientific reports of a crop. In this study, we examined the potential acute oral toxicity of AtBG1 protein expressed in genetically modified (GM) rapeseed and calculated the minimum lethal dose at 6 weeks in both male and female ICR mice. AtBG1 protein was fed at a dose of 2,000 mg/kg body weight in five male and five female mice according to the marginal capacity concentration of OECD, 2,000 mg/15 ml/kg. Mortalities, clinical findings, and body weight changes were monitored for 14 days after dosing, and postmortem necropsy was performed on day 14. This study showed that no deaths occurred in the test group, and AtBG1 protein did not result in variations in common symptoms, body weight, and postmortem findings between the two groups. This showed that the minimum lethal dose of AtBG1 protein expressed in transgenic rapeseed exceed 2,000 mg/kg body weight in both sexes.

Key words : Genetically modified organism, ICR mice, rapeseed, single-dose toxicity study, β -glucosidase 1

서 론

유채(*Brassica napus* L.)는 십자화과에 속하며 세계적으로 널리 재배되고 있는 유성 작물 중에 하나[1, 9]로 유채 종자에는 지방산이 40~45% 포함되어 있어 식용뿐만 아니라 바이오디젤의 원료 산물로 그 수요가 증가하고 있다[10]. 세계적으로 전체 유채 재배면적의 24% 가량이 형질전환 유채를 사용하는 것으로 나타났으며 International service for the acquisition of agri-biotech applications (ISAAA)의 2015년 보고에 의하면 형질전환 canola는 2015년 현재 전세계에 8.5백만 헥타르가 재배되고 있는 것 나타났다. 대표적인 유채 형질전환 이벤트로써는 제초제 저항성 유채(herbicide resistance, HR)가 대표적이며 캐나다, 미국, 호주, 일본 그리고 칠레에서 재배 되는 것으로 2015년 보고된바 있다[8]. 국내에서도 애기장대의 가수분해하

는 활성을 가진 효소인 β -glucosidase 1 (AtBG1)을 도입하여 내건성 형질전환 유채를 개발하였고 모본 유채와 비교하여 건조한 지역에서 재배가 가능한 품종으로 확인되어 품종개량 중에 있다.

애기장대의 β -glucosidase 1 (AtBG1)은 abscisic acid (ABA)를 활성형으로 가수분해하여 탈수 환경(dehydration condition)에서 세포 내 ABA 농도를 증가하는 역할을 하는 호르몬으로 애기장대에서 AtBG1을 과발현 하는 형질전환체의 경우 가뭄과 염에 대한 저항성을 보인다[5]. 골프장의 잔디로 많이 사용되는 애기겨이삭(*Agrostis stolonifera* L.)에 AtBG1 유전자를 도입시킨 형질전환의 경우 높은 농도의 ABA를 유지하도록 함으로써 가뭄(drought)과 같은 수분 부족 환경에서 식물체의 생존율을 높일 수 있게 하는 것으로 나타났다[2].

형질전환생물체(Genetically modified organism)의 경우 도입된 유전자로 인하여 형질전환생물체의 환경 및 인체위해성을 평가해야 한다. 특히 형질전환 유채와 같은 GM작물의 경우에는 생태계를 교란할 수 있는 잡초화와 다른 생물종으로의 전이 등의 다양한 환경위해성 평가가 수반되어야 하며 유채를 이용할 때 비의도적으로 인체에 섭취되었을 경우를 대비하여 인체위해성 평가를 실시해야 한다. 현재 OECD의 합의보고서(Consensus documents)의 협의 내용을 근거로 GM작물의 위해성 평가를 수행 중에 있으며 GM작물 유래 식품에 대한

*Corresponding authors

Tel : +82-43-836-1751, Fax : +82-43-836-1751

E-mail : sjekim@fnpc.com (Shinje Kim)

Tel : +82-43-240-6547, Fax : +82-43-240-6549

E-mail : jungho@kribb.re.kr (Jung-Ho Park)

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

위해성 평가는 1993년 발표된 실질적 동등성 개념을 기본으로 이루어지고 있다. 국내에서는 2008년 1월 1일부터 「LMO 법률」과 유전자재조합 농산물·축산물·수산물 및 미생물은 「식품위생법」 제 18 조의 법적근거에 따라 “유전자재조합 농산물·미생물 안전성평가 심사”를 거쳐야 한다. 본 연구에서는 애기장대의 β-glucosidase 1 (AtBG1) 유전자가 형질전환된 GM 유체에 대한 인체 위해성 평가 중 단회경구투여 독성시험 실시하였고 암·수 ICR 마우스를 이용하여 OECD 테스트 가이드라인[6, 7]과 식품의약품안전처 고시 제2015-82호[4]에 따라서 AtBG1 단백질질을 단회 경구 투여하여, AtBG1 단백질이 독성으로 작용할 가능성을 평가하고자 하였다.

재료 및 방법

AtBG1 단백질 정제

AtBG1 유전자를 pET26 벡터에 넣기 위하여 PCR 증폭을 위한 주형(template)으로써 AtBG1 유전자가 포함되어 있는 GM유체 도입에 사용되었던 pFnP01_atBG1HA ((주)에프앤피 제공)를 사용하였고, 사용된 프라이머 서열은 표 1과 같다. PCR 증폭 후 AtBG1 유전자는 In-Fusion 방법(TaKaRa)을 사용하여 pET26a 벡터에 N-말단 또는 C-말단에 6 개의 histidine 을 추가하여 도입하였으며, 도입된 플라스미드는 colony PCR 및 DNA sequencing 분석을 통하여 플라스미드에 올바르게 도입되었는지 확인하였다. pET26-H6AtBG1 (N-말단에 6 개의 histidine 포함) 및 pET26-AtBG1H6 (C-말단에 6 개의 histidine 포함) 플라스미드를 *E. coli* STAR(DE3)Δ*slyD* strain에 도입(transformation)시킨 후 콜로니를 취하여 각각 800 ml LB broth에 접종(inoculation)하여 OD₆₀₀값이 0.6이 될 때까지 37°C에서 배양한 후, IPTG 1 mM로 induction하여 4시간 동안 단백질을 과발현시켰다. AtBG1 단백질의 대량 배양을 위하여 pET26-H6AtBG1 플라스미드가 함유된 균주를 5-L jar fermentor를 이용하여 유가식 배양 방법으로 배양하였다. 배양시작 후 약 7시간 후 초기 배지의 포도당(20 g/l)가 소모되어 추가적인 기질공급(feeding)을 시작하였다. O.D. 68까지 성장한 16시간에 최종농도가 1 mM이 되도록 IPTG를 첨가하여 H6AtBG1의 발현을 유도하였다. 유도 후에도 세포 농도는 지속적으로 증가하여 24시간에 O.D. 135까지 성장하였다. 4 M의 urea 포함 된 lysis buffer (50mM Na-phosphate pH 7.0, 4 M urea, 2%

Triton X-100)로 재현탁 후 microfluidizer를 이용하여 파쇄하였다. 파쇄된 H6AtBG1 발현 대장균을 12,000 rpm에서 20분간 원심분리 후 가용성(soluble) 및 불용성(Insoluble) 분획으로 나누는 후 1 M NaOH를 이용하여 pH 12까지 올려 가용화 시킨 후 원심분리(12,000 rpm, 20분)하여 세포벽 성분 등 추가적인 cell debris들을 제거하였고 상등액 내의 정제된 H6AtBG1는 1 M HCl을 이용하여 pH 7.0을 중성화 시켰으며 원심분리(12,000 rpm, 20분)를 수행하여 불용성 응집체 형태의 H6AtBG1를 회수하였다. 회수된 H6AtBG1의 불용성 응집체는 증류수로 재현탁시켜 동물실험을 위한 동결건조 시료를 제작하였다.

시험물질의 제조

실험동물에 투여하는 당일 투여 단백질인 AtBG1을 전자저울(CP323S, Sartorius, Germany)을 사용하여 측량 한 후 규정 농도(133.3 mg/ml)로 부형제(주사용수, Choongwae Pharma Corp., Republic of Korea)를 첨가하여 현탁하였다.

실험동물

본 시험은 동물보호법(제정 1991년5월31일 법률 제4379호, 일부개정2015년 1월20일 법률 제13023호)에 근거한 식품의약품안전처 GLP (good laboratory practice) 기관 인증을 가진 (주)바이오독스텍의 동물실험윤리위원회에 의해 승인되었다(승인번호: 160253). ICR 암·수 마우스(CrljOri:CD1(ICR), SPF) 5 주령을 (주)오리엔트바이오(Republic of Korea)부터 수령하여 검역 서류 확인 및 외관 육안 검사를 실시하고, 전자저울(CP323S, Sartorius, Germany)로 체중 측정하여 정상범위인 수컷 18.0~26.0 g, 암컷 17.0~25 g 범위 내에 있는지 확인하였다. 또한 검역 사육장에서 3일간 일반증상을 확인하고 순화를 위하여 순화 사육장에서 6일간 순화를 실시하였다. 순화 중에도 매일 1회씩 일반증상을 관찰하고 순화 종료일에는 체중, 일반증상 등 동물의 이상유무를 평가하였으며 평균체중에 가까운 암·수 각 10마리를 선발하여 균분리를 수행하였다. 실험 기간 동안 사육환경은 스테인레스 철망사육장(100 W ×200 D×130 H, mm)에 수용동물 수는 3마리(순화기간)/ 1마리(관찰기간), 온도는 19~25°C, 상대습도는 30.0~70.0%, 환기횟수는 시간 당 10~15회, 조명은 12시간 명암주기(오전 7시부터 오후 7시), 조도는 150~300 Lux로 유지하였으며, 사육 상자 및 급이

Table 1. Primers used in this study

| Target gene | Primer name | Primer sequence |
|-------------|-----------------|--|
| AtBG1H6 | AtBG1-IF-F | 5'-AAGGAGATATACATATGGTGAGGTTTCGAGAAGGTTTC-3' |
| AtBG1H6 | AtBG1H6-R | 5'-GTGATGATGATGATGGTGGAGTTCTTCCCTAGCGTA-3' |
| AtBG1H6 | H6-IF-XhoI-R | 5'-AGCCGGATCCCTCGAGTTAGTGATGATGATGATGGTG-3' |
| H6AtBG1 | H6AtBG1-F | 5'-CATCATCATCACCACCACATGGTGAGGTTTCGAGAAG-3' |
| H6AtBG1 | AtBG1-IF-XhoI-R | 5'-AGCCGGATCCCTCGAGTTAGAGTTCTTCCCTAGC-3' |
| H6AtBG1 | H6TEV-IF-NdeI-F | 5'-AAGGAGATATACATATGCATCATCATCACCACCAC-3' |

기는 2주당 1회, 급수병은 주당 1회 교환하였다. 그리고 실험 동물용 고품사료(Harlan Laboratories, Inc., U.S.A.)와 음수는 청주시 수돗물을 필터유수살균기로 여과 후 자외선을 조사하여 자유 섭취시켰다.

실험 군 구성 및 투여

AtBG1 단백질의 단회 경구투여 독성 평가를 위하여 실험군 구성을 두 군으로 분리하여 수행하였다. AtBG1 단백질을 현탁에 사용되었던 부형제만을 처리한 G1 군과 AtBG1 단백질이 부형제에 현탁되어진 G2군으로 나누어 진행 되었다. 또한 각 군은 군 분리일 기준으로 6 주령의 암컷 5마리와 수컷 5마리 총 10마리를 각각 사용하여 이번 분석에서는 총 20마리를 사용하여 AtBG1 단백질에 대한 단회 경구투여 독성 평가를 수행하였다. 각 실험동물에는 고유 식별번호를 부여하여 관리하였는데 4자리 숫자 중 첫 번째 자리는 수컷과 암컷을 각각 1과 2로 표기하였고 두 번째 자리는 G1군과 G2군을 각각 1과 2로 표기하였다. 나머지 두 자리는 각 군의 개체별로 순차적으로 번호를 부여하였다(Table 2). 실험동물 당 투여액은 15 ml/kg으로 통일하였고 투여당일의 체중을 기준으로 정하였으며 경구 투여용 존데를 부착한 일회용 주사기(1 ml)를 이용하여 위내에 단회 강제 투여하였다. 실험에 사용된 모든 동물은 투여 전 적어도 4시간 전부터 음수를 제외하고 절식시켰으며 투여 종료 2시간 이후 사료 제공하였다. 시험에 사용되는 AtBG1 단백질의 Organization for Economic Cooperation and Development (OECD)의 급성독성시험 허용 한계용량(OECD, 2001)인 2,000 mg/15 ml/kg에서 사망사례 및 이상증상이 관찰되는지 확인하기 위하여 본시험 전에 암·수 마우스 각 1마리에 단회 경구 투여한 결과 이상 변화가 확인되지 않아 허용 한계용량인 2,000 mg/kg의 농도를 단일 시험군 농도로 설정하였고 대조군인 G1군에는 동일한 액량의 부형제를 투여하였다.

임상 관찰 및 검사

G1대조군과 G2 AtBG1 투여군의 일반상태(독성징후의 종류, 발현시기, 회복시기 등) 및 사망유무를 확인하기 위하여 투여 시점을 기준으로 30분, 1, 2, 4 및 6시간째에 전체 실험동물들을 관찰하였으며, 2일부터 14일까지는 매일 1회 일반증상 및 사망유무를 관찰하였다. 체중변화도 모든 동물에 대하여 투여 시점을 기본으로 투여당일(투여 전), 투여 후 1, 3, 7 및 14일(부검일)에 체중변화를 기록하였다. 실험 종료 후에는

CO₂ 가스를 흡입 후 배대 동맥 방혈을 통하여 안락사 후 부검하여 장기 육안 검사를 통해 최종 병변 유무를 확인하였다.

자료의 통계처리

실험 완료 후 G1과 G2군에서 기록된 체중은 SAS (version 9.3, SAS Institute Inc., U.S.A.)를 사용하여 Folded-F 검정법을 사용하여 등분산성을 검정(유의수준: 0.05) 하였고, 등분산인 경우 Student t-test를, 등분산이 기각되면 Aspin-Welch t-test를 실시하여 유의성을 확인하였다(유의수준: 양측 0.05 및 0.01).

결과 및 고찰

AtBG1 단백질 정제

AtBG1의 위해성평가 중 단기투여독성 및 물리화학적 안정성 시험 등을 수행하기 위해 AtBG1 단백질을 대장균을 통하여 대량 발현 및 정제하였다. Organization for Economic Cooperation and Development (OECD)에서는 급성독성시험 허용 한계용량(OECD, 2001)을 2,000 mg/15 ml/kg으로 규정하고 있어 예비실험을 포함하여 약 2 g의 순수한 AtBG1 단백질의 대량 정제가 필수적이다. 이를 위하여 AtBG1 단백질의 N-말단(H6AtBG1) 혹은 C-말단(AtBG1H6) 부분에 6-histidine tag의 해당서열을 AtBG1 단백질에 각각 첨가 시켜 그 결과를 비교하였다. H6AtBG1 및 AtBG1H6가 발현된 대장균을 SDS-PAGE를 통해 분석해본 결과 H6AtBG1 및 AtBG1H6이 60 kDa 근처에서 과발현된 것을 확인 하였고 N-말단에 6-histidine tag이 융합된 H6AtBG1이 C-말단에 6-histidine tag이 융합된 AtBG1H6 보다 발현 수준이 2배 이상 높았다(Fig. 1A and B). 하지만 AtBG1 단백질이 수용성 분획에서 발현되지 않는 것을 확인하고 세포를 파괴하고 원심분리하여 내포체(inclusion body) 형태의 AtBG1 단백질이 포함된 불용성 분획을 분리하고 6 M urea를 처리하여 Ni-affinity chromatography를 수행하였다. 각 분획별로 용출되는 단백질을 sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 통하여 확인한 결과 대부분의 H6AtBG1은 flow-through에서 확인되었다. Ni-sepharose resin에 binding되어 용출된 분획(elution fraction)에 존재하는 H6AtBG1의 순도는 낮았고 H6AtBG1은 loading된 시료의 양에 대비해서 적은 것으로 확인되었다(Fig. 1C).

H6AtBG1을 대량 생산(fermentor scale)하기 위하여 5-L jar fermentor를 이용하여 유가식 배양 방법으로 배양하였다. 그

Table 2. Experimental design

| Group | Dose (mg/kg) | Inj. volume (ml/kg) | No. of animals (number) | | |
|-------|-----------------|---------------------|-------------------------|-----------------|-----------------|
| | | | Male | Female | |
| G1 | Control | 0 | 15 | 5 (1,101~1,105) | 5 (2,101~2,105) |
| G2 | AtBG1 treatment | 2,000 | 15 | 5 (1,201~1,205) | 5 (2,201~2,205) |

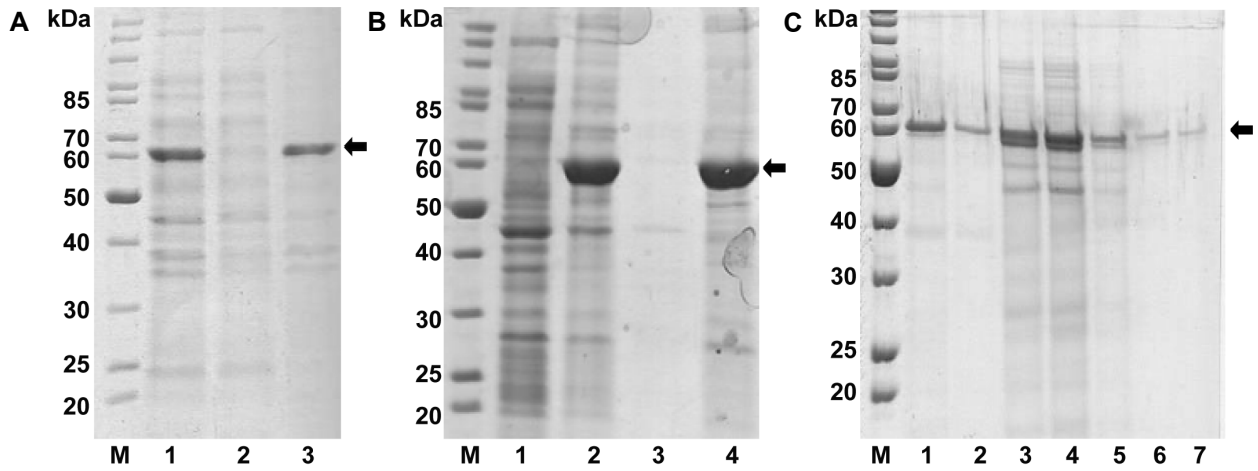


Fig. 1. Purification of AtBG1 protein with N-terminal or C-terminal six histidine tag. (A) Over-expression of AtBG1 protein with C-terminal on SDS-PAGE. M, Marker proteins; Lane 1, total cellular proteins after induction; Lane 2, soluble cellular proteins; Lane 3, insoluble proteins. (B) Over-expression of AtBG1 protein with C-terminal. Lane 1, total cellular proteins before induction; Lane 2, total cellular proteins after induction; Lane 3, soluble cellular proteins; Lane 4, insoluble proteins. (C) Purification of AtBG1 protein using Ni-affinity chromatography. Lane 1, sample; Lane 2, flow-through; Lane 3-7, elution fractions. Black arrow indicates AtBG1.

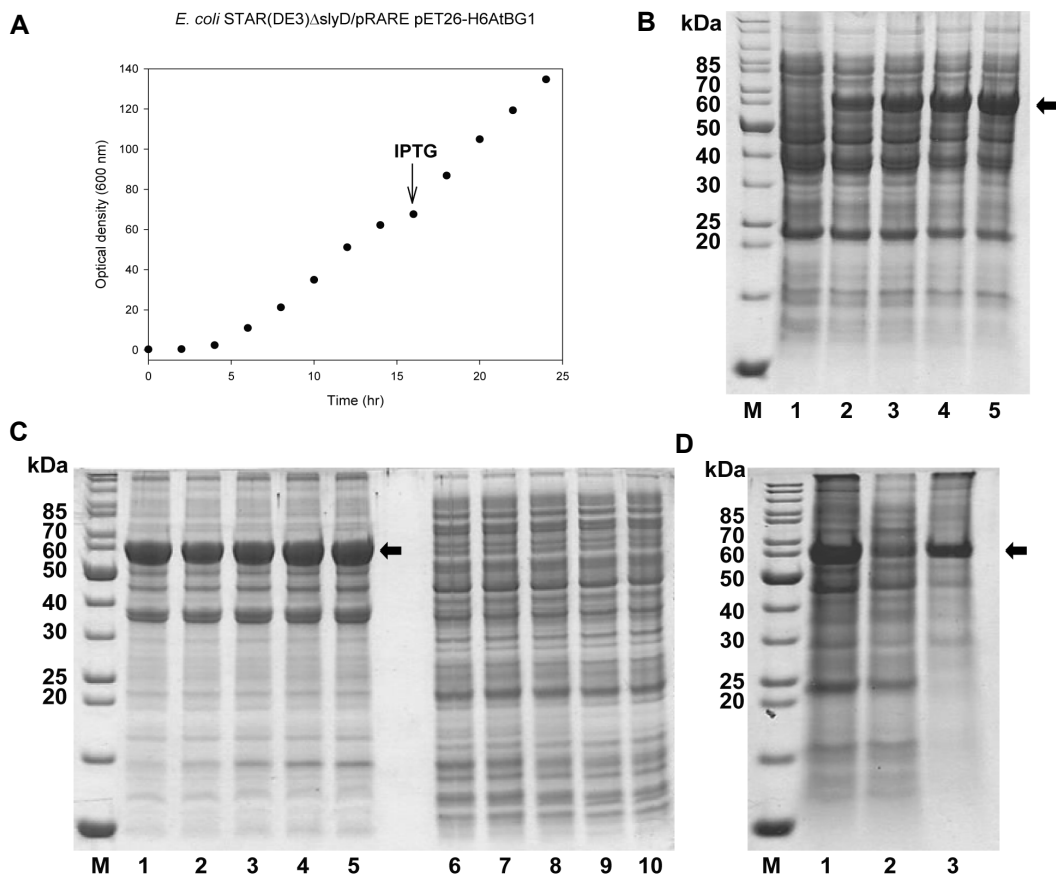


Fig. 2. Production of AtBG1 protein in a large amount. (A) Fed-batch culture of recombinant *E. coli* STAR(DE3) Δ slyD/pET26-H6AtBG1. (B) SDS - PAGE analysis after 16 hr of culture time. Lane 1 to 5, 16, 18, 20, 22, 24 hr after induction at 16 hr, respectively. (C) Isolation of AtBG1 protein in inclusion body according to urea concentration. Lane 1-5, insoluble fractions in 4, 3, 2, 1, 0 M Urea, respectively; Lane 6-10, soluble fractions in 4, 3, 2, 1, 0 M Urea (D). Isolation of AtBG1 protein. Lane 1, total cellular proteins after induction; Lane 2, soluble cellular proteins; Lane 3, insoluble proteins.

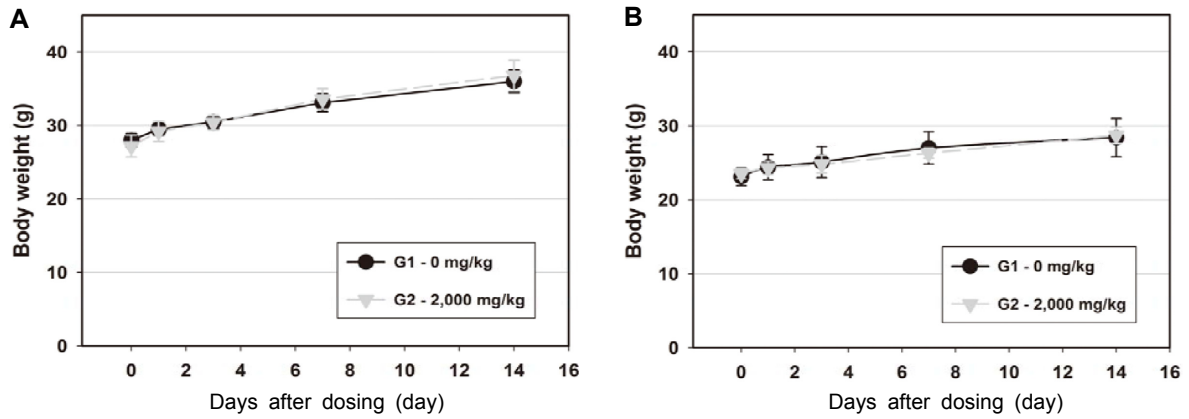


Fig. 3. Body weight increases of male (A) and female (B) ICR mice, treated orally on a single dose.

Table 5. Body weight of ICR mice treated with AtBG1 on single-dose toxicity test

Sex : Male (g)

| Group / Dose (mg/kg) | Animal ID | Days after dosing | | | | | Gain 0~14 |
|----------------------|-----------|-------------------|------|------|------|------|-----------|
| | | 0 | 1 | 3 | 7 | 14 | |
| G1 0 | 1101 | 26.9 | 29.2 | 30.3 | 33.0 | 35.9 | 9.0 |
| | 1102 | 29.0 | 30.3 | 31.8 | 35.0 | 38.6 | 9.6 |
| | 1103 | 27.5 | 28.2 | 29.4 | 31.9 | 37.8 | 7.3 |
| | 1104 | 28.9 | 29.8 | 30.6 | 33.3 | 35.4 | 6.5 |
| | 1105 | 27.9 | 29.8 | 30.3 | 32.5 | 35.5 | 7.6 |
| | Mean | 28.0 | 29.5 | 30.5 | 33.1 | 36.0 | 8.0 |
| | S .D. | 0.9 | 0.8 | 0.9 | 1.2 | 1.5 | 1.3 |
| N | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | |
| G2 2,000 | 1201 | 28.8 | 29.7 | 31.0 | 34.1 | 37.0 | 8.2 |
| | 1202 | 28.0 | 28.8 | 30.5 | 32.9 | 36.0 | 8.0 |
| | 1203 | 24.9 | 27.6 | 29.5 | 33.1 | 36.2 | 11.3 |
| | 1204 | 26.9 | 28.8 | 29.3 | 32.1 | 34.7 | 7.8 |
| | 1205 | 27.3 | 31.3 | 31.8 | 35.7 | 40.2 | 12.9 |
| | Mean | 27.2 | 29.2 | 30.4 | 33.6 | 36.8 | 9.6 |
| | S .D. | 1.5 | 1.4 | 1.0 | 1.4 | 2.1 | 2.3 |
| N | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | |

Sex : Female (g)

| Group / Dose (mg/kg) | Animal ID | Days after dosing | | | | | Gain 0~14 |
|----------------------|-----------|-------------------|------|------|------|------|-----------|
| | | 0 | 1 | 3 | 7 | 14 | |
| G1 0 | 2101 | 23.7 | 24.3 | 24.3 | 26.1 | 28.2 | 4.5 |
| | 2102 | 21.5 | 22.5 | 22.6 | 24.3 | 24.3 | 2.8 |
| | 2103 | 24.3 | 25.8 | 27.5 | 29.3 | 29.9 | 5.6 |
| | 2104 | 22.4 | 23.1 | 24.2 | 26.1 | 28.3 | 5.9 |
| | 2105 | 23.8 | 26.4 | 27.1 | 29.3 | 31.2 | 7.4 |
| | Mean | 23.1 | 24.4 | 25.1 | 27.0 | 28.4 | 5.2 |
| | S .D. | 1.2 | 1.7 | 2.1 | 2.2 | 2.6 | 1.7 |
| N | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | |
| G2 2,000 | 2201 | 23.1 | 24.1 | 24.2 | 26.0 | 27.7 | 4.6 |
| | 2202 | 23.8 | 24.8 | 25.1 | 26.6 | 30.0 | 6.2 |
| | 2203 | 24.3 | 25.3 | 26.5 | 27.5 | 29.6 | 5.3 |
| | 2204 | 22.5 | 23.0 | 23.4 | 26.0 | 27.5 | 5.0 |
| | 2205 | 23.8 | 24.1 | 24.8 | 25.6 | 28.9 | 5.1 |
| | Mean | 23.5 | 24.3 | 24.8 | 26.3 | 28.7 | 5.2 |
| | S .D. | 0.7 | 0.9 | 1.2 | 0.7 | 1.1 | 0.6 |
| N | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | |

에서 각 30.5 ± 0.9 g과 30.4 ± 1.0 g, 암컷에서 각 25.1 ± 2.1 g과 24.8 ± 1.2 g, 7일차 체중은 수컷에서 각 33.1 ± 1.2 g과 33.6 ± 1.4 g, 암컷에서 각 27.0 ± 2.2 g과 26.3 ± 0.7 g, 그리고 14일차 체중은 수컷에서 각 36.0 ± 1.5 g과 36.8 ± 2.1 g, 암컷에서 28.4 ± 2.6 g과 28.7 ± 1.1 g으로 모든 동물에서 시작 체중에 비하여 시간이 지남에 따라서 체중이 점차 증가하는 경향을 보였으며, 대조군인 G1과 비교하여 체중은 통계적으로 유의한 변화는 확인되지 않았다(Fig. 3, Table 5).

AtBG1 단백질 단회 투여일로부터 14 일(부검일)에 모든 암·수 ICR 마우스에 대하여 부검을 실시한 결과 암·수 대조군 및 시험물질 2,000 mg/kg 투여 군에서 육안으로 이상 소견은 관찰되지 않아(data not shown), 조직병리학적 검사를 실시하지 않았다.

현재 국내 유전자변형생물체에 대한 안전성에 대하여는 많은 논의가 진행 중에 있다. 그 규제 방식에 대해서도 전 세계적으로도 차이를 보인다. 대부분 나라에서 유전자변형이라는 방법에 대한 규제(method-based regulatory)를 두고 있고 일부에서는 가뭄 또는 병저항성이라는 특성에 따른 규제(trait-based regulatory)를 주장하는 학자들도 있다[3]. 국내에서는 유전자변형작물의 인체위해성 평가에서는 OECD가 발표한 실질적 동등성 개념에 따라 새로운 유전자변형작물의 위해성 평가를 수행 중에 있다. 실질적 동등성이란 결국 기준에 인류가 사용해 오던 작물과 동일한 안정성을 가진다는 것으로 현재 비임상 독성 시험으로는 단회투여급성독성 시험과 장기투여독성 시험이 있다. 본 연구에서는 AtBG1 유전자를 도입한 형질전환유체를 비의도적으로 인체에 섭취되었을 경우 인체에 미치는 영향을 확인하고자 실험동물을 사용하여 OECD 테스트 가이드라인(OECD, 2002, No.420)과 식품의약품안전처 고시 제2015-82호에 따라서 AtBG1 단백질을 단회 경구 투여하여, AtBG1 단백질이 독성으로 작용할 가능성을 평가하고자 비임상시험을 실시하였다. 그 결과 AtBG1 단백질의 마우스에 대한 최소 치사량(minimal lethal dose)은 2,000 mg/kg 이상의 고용량인 것으로 확인되었으며, 2,000 mg/kg 투여 용량에서도 임상증상에서 대조군과 비교하여 특별한 이상소견은 전혀 발견되지 않았고, 부검소견에서도 육안으로 이상소견이 발견되지 않았다. 또한 무게변화를 측정 하였을 때도 대조군과 통계적으로 유의한 차이가 관찰되지 않았다. 마우스를 이용한 급성독성 시험 결과로 AtBG1 단백질은 급성독성의 측면에서 안전한 물질은 것으로 판단된다. 따라서 본 실험에서 사용한 시험물질의 최소 치사량(minimal lethal dose)은 암·수 ICR 마우스 모두 2,000 mg/kg을 크게 상회하는 것으로 나타났다.

감사의 글

본 연구는 농림축산식품부 첨단생산기술개발(309007-3), 농생명산업기술개발사업(112134-5) 및 KRIBB 기관고유사업의 연구비 지원에 의해 수행하였습니다.

References

- Bouchet, A. S., Laperche, A., Bissuel-Belaygue, C., Baron, C., Morice, J., Rousseau-Gueutin, M., Dheu, J. E., George, P., Pinochet, X., Foubert, T., Maes, O., Dugue, D., Guinot, F. and Nesi, N. 2016. Genetic basis of nitrogen use efficiency and yield stability across environments in winter rapeseed. *BMC Genet.* **17**, 131.
- Han, Y. J., Cho, K. C., Hwang, O. J., Choi, Y. S., Shin, A. Y., Hwang, I. and Kim, J. I. 2012. Overexpression of an Arabidopsis beta-glucosidase gene enhances drought resistance with dwarf phenotype in creeping bentgrass. *Plant Cell Rep.* **31**, 1677-1686.
- Hunter, J. and Duff, G. 2016. GM crops-lessons from medicine. *Science* **353**, 1187.
- KFDA 2015. Partial amendment official announcement about toxicity test for Drug.
- Lee, K. H., Piao, H. L., Kim, H. Y., Choi, S. M., Jiang, F., Hartung, W., Hwang, I., Kwak, J. M., Lee, I. J. and Hwang, I. 2006. Activation of glucosidase via stress-induced polymerization rapidly increases active pools of abscisic acid. *Cell* **126**, 1109-1120.
- OECD 2001. OECD Guideline for Testing of Chemicals. Acute Oral Toxicity - Acute Toxic Class. Test guideline 423.
- OECD Publishing, P. 2002. Test No. 420: Acute Oral Toxicity - Fixed Dose Procedure, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4.
- Pandolfo, C. E., Presotto, A., Carbonell, F. T., Ureta, S., Poverene, M. and Cantamutto, M. 2016. Transgenic glyphosate-resistant oilseed rape (*Brassica napus*) as an invasive weed in Argentina: detection, characterization, and control alternatives. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* **23**, 24081-24091.
- Schmutzer, T., Samans, B., Dyrzka, E., Ulpinnis, C., Weise, S., Stengel, D., Colmsee, C., Lespinasse, D., Micic, Z., Abel, S., Duchscherer, P., Breuer, F., Abbadi, A., Leckband, G., Snowden, R. and Scholz, U. 2015. Species-wide genome sequence and nucleotide polymorphisms from the model allopolyploid plant *Brassica napus*. *Sci. Data.* **2**, 150072.
- Weselake, R. J., Taylor, D. C., Rahman, M. H., Shah, S., Laroche, A., McVetty, P. B. and Harwood, J. L. 2009. Increasing the flow of carbon into seed oil. *Biotechnol. Adv.* **27**, 866-878.

초록 : GM 유체에 도입된 β -glucosidase 1 (AtBG1)의 단회투여독성시험이순봉¹ · 정광주¹ · 장경민² · 김성건³ · 박정호^{2*} · 김신제^{1*}(¹농업회사법인주식회사 에프앤피, ²한국생명공학연구원 바이오평가센터, ³유원대학교 의생명과학과)

유체는 십자화과로 분류되는 유지작물로서 전 세계적으로 재배되는 작물이다. 이전 연구결과에서 가뭄저항성을 증대시키는 것으로 보고된 애기장대의 β -glucosidase 1 (AtBG1) 유전자를 도입함으로써 가뭄저항성 형질전환 유체를 개발하였다. 새로 개발된 형질전환 작물들은 그 이용에 대한 안전성에 대하여 어떠한 정보도 제공되지 않기 때문에 작물의 안정성에 대한 증거가 필수적이다. 이러한 안정성 평가는 작물의 역사적 사용과 과학적 증거를 기초로 한다. 이번 연구에서는 AtBG1이 도입된 형질전환 유체의 급성투여독성시험을 통하여 암수 마우스 각각에서 한계투여 용량을 확인하는 것을 목적으로 하였다. 이를 위해 OECD의 급성독성의 권고안에 따라 AtBG1 단백질질을 암수 각각 5마리의 ICR 마우스에 몸무게 1 kg 당 2,000 mg을 부형제에 녹여 강제구강투여 하였다. 투여일부터 14일 동안 운동성, 병리학적 이상, 몸무게를 측정하였고 마지막 14일에는 안락사 후에 부검을 통해 AtBG1 투여군과 비투여군의 차이를 확인하였다. 이상의 실험을 통하여 AtBG1 단백질이 운동성, 병리학적 이상, 몸무게 및 부검 결과에서 대조군과 실험군, 두 그룹간의 특이적인 차이를 보이지 않음을 확인하였다. 또한 AtBG1 단백질은 급성독성의 측면에서 안전한 물질로 판단되며, 한계허용치 용량이 2,000 mg을 상회함을 확인하였다. 따라서, 이는 차후 AtBG1 도입 유체의 인체위해성 평가 자료로 사용될 수 있을 것으로 사료된다.