

유전자변형 콩 DAS-44406-6
안전성평가자료 심사결과 보고서

2014. 12. 4.

〈차례〉

1. 심사경위	1
2. 심사경과	1
3. 심사방법	1
4. 심사 신청 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	2
(2) 재배 및 품종개량의 역사	2
(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	4
(1) 형질전환에 관한 정보	4
(2) 도입 유전자에 대한 정보	5
마. 유전자재조합체의 특성에 관한 자료	6
(1) 유전자재조합체 내 도입된 유전자에 관한 정보	6
(2) 유전자산물에 관한 정보	8
(3) 독성	10
(4) 알레르기성	12
(5) 숙주와의 차이	13
(6) 유전자산물이 대사경로에 미치는 영향	15
(7) 외국의 식품유통 승인 및 식용 등의 이용 현황	17
5. 심사 신청 자료 검토 결과	17
6. 기타	17

유전자변형 콩 DAS-44406-6 안전성평가자료 심사결과 보고서

1. 심사경위

- 다우아그로사이언시스 인터내셔널리미티드는 제초제 내성 콩 DAS-44406-6에 대해 식품위생법 제18조에 따른 안전성평가 심사를 받기 위하여 2012년 6월 12일 식품의약품안전처에 「유전자재조합식품등의 안전성 평가 심사 등에 관한규정」(이하 심사규정)에서 규정한 관련 자료를 첨부하여 심사 신청하였다.
- 이에 식품의약품안전처장은 본 품목이 심사규정에 따라 안전성 평가가 이루어졌는지 여부에 대하여 '유전자재조합식품등 안전성평가자료심사위원회'(이하 '심사위원회'라고 함)에 심사 의뢰하고,
- 심사위원회는 신청인이 제출한 자료에 근거하여 아래와 같이 심사규정에 따라 안전성평가가 이루어졌는지 여부를 확인하였다.

2. 심사경과

- 심사대상 품목

대상품목	신청자	개발자	제외국의 안전성 승인 현황
제초제내성 콩 다우아그로사이언시스 DAS-44406-6	다우아그로사이언시스 인터내셔널리미티드	Dow Agroscience LLC, M.S. Technologies LLC	남아공(2013), 호주/뉴질랜드(2013), 캐나다(2013), 미국(2013), 대만(2014)

- 심사경과
 - 2012년 6월 12일 안전성 평가자료 신청접수
 - 2012년 6월 12일 심사위원회 서류심사 의뢰
 - 2012년 10월 16일 1차 심사위원회 개최
 - 2013년 7월 30일 2차 심사위원회 개최
 - 2013년 12월 17일 3차 심사위원회 개최

3. 심사방법

- 본 품목과 관련하여 심사 신청된 유전자재조합체가 심사규정의 적용대상인지를 검토하였고,
- 제출된 안전성 평가 자료가 심사규정에서 요구하는 자료를 갖추었는지를 확인한 후 자료의 내용을 토대로 안전성 평가 자료를 심사하였다.

4. 심사 신청 자료 검토

4-1. 심사 신청된 식품의 개요

- 다우아그로사이언시스 인터내셔널리미티드에서 심사 신청한 유전자변형 콩 DAS-44406-6은 *aad-12*, *2mepsps*, *pat* 유전자가 도입된 것으로 제초제내성을 나타낸다.

4-2. 식품으로의 적합성 검토

- 본 품목과 관련하여 제출된 안전성 평가자료가 심사규정 제12조에서 요구하는 자료를 만족시키는지 여부를 검토하였으며,
- 자료의 내용을 토대로 다음과 같이 식품으로서의 안전성이 확보되어 있는 지를 심사하였다.

4-3 유전자재조합체의 안전성

가. 유전자재조합체의 개발목적 및 이용방법에 관한 자료

- 다우아그로사이언시스 인터내셔널리미티드에서 심사 신청한 DAS-44406-6은 *aad-12*, *2mepsps*, *pat* 유전자가 도입된 것으로 제초제 2,4-dichlorophenoxyacetic acid(2,4-D), 글리포세이트, 글루포시네이트에 대한 내성을 나타낸다.
- 그 밖의 재배방법 및 이용방법은 기존의 일반 콩과 동일하다.

나. 숙주에 관한 자료

(1) 분류학적 특성

- 종(Species) : *max*
- 속(Genus) : *Glycine*
- 과(Family) : *Leguminosae*
- 일반명(Common Name) : 콩, 대두

(2) 재배 및 품종개량의 역사

- 콩의 재배는 기원전 20세기 이래 재배되기 시작하여 4,000년 이상의 재배역사를 가지고 있다. 중국과 우리나라는 기원전 2000년부터 재배하기 시작하였으며, 일본은 1900~2000년 전부터, 인도는 18세기 이후, 유럽에는 1700년대, 미국은 1800년대부터 도입하여 재배하기 시작하였다. 우리나라는 2013년도 80,031헥타르에서 154,067톤을 재배 생산하고 있는 것으로 조사되고 있다.
- 주요 콩 생산국은 미국, 중국, EU, 브라질, 멕시코로 2003~2007년 이들 국가에서

생산된 콩은 세계 콩 생산량의 약 74%를 차지하였다.

(3) 기지의 독성 또는 알레르기 유발성

- 항영양소로서 트립신 저해제, 렉틴, 스타키오스, 라피노오스, 피틴산이 있으며, 일부 알레르기 유발 단백질이 포함되어 있다. 트립신 저해제나 렉틴은 가공 과정에서 열처리에 의해 불활성화되거나 분해된다. 그 외 항영양소는 식품 중 미량으로 존재하며, 오랫동안 섭취해왔기 때문에 인체에 위해하지 않다고 알려져 있다.

(4) 안전한 식경험의 유무

- 콩은 장류, 식용유, 두부 등 다양한 식품에서 사용되고 있다.

다. 공여체에 관한 자료

(1) 분류학적 특성

① *aad-12* 유전자

- 종(Species): *acidovorans*
- 속(Genus): *Delftia*
- 과(Family): *Commondadaceae*

② *2mepsps* 유전자

- 종(Species): *mays*
- 속(Genus): *Zea*
- 과(Family): 화본과(Poaceae)
- 일반명(Common Name): 옥수수

③ *pat* 유전자

- 종(Species): *viridochromogenes*
- 속(Genus): *Streptomyces*
- 과(Family): *Streptomycetadaceae*

(2) 안전한 식경험의 유무

- *Delftia acidovorans*은 vanilin 등 식품가공산업에서 사용되어 왔으며, *Streptomyces viridochromogenes*는 *pat* 공여체로 이미 여러 국가에 의해 유전자변형식품의 공여생 물체로 안전성 평가가 완료된 상태이다.

(3) 공여체 및 근연종의 독성, 항영양성, 알레르기성

- ① *Delftia acidovorans* 및 *Streptomyces viridochromogenes*

Delftia acidovorans 및 *Streptomyces viridochromogenes*는 유독물질을 생산한다거나, 식물이나 인간에 대한 독성, 항영양성 또는 알레르기성에 대한 보고는 없다.

② 옥수수

오랫동안 인류가 식품 및 사료로 사용해온 작물이며, 인체에 해로운 독성 물질의 생산은 없다. 항영양소가 알려져 있으나, 열 가공과정에 의해 쉽게 불활성화 되고 옥수수 중 함량이 낮아 알레르기 유발 가능성이 매우 낮다.

라. 유전자재조합에 대한 자료

(1) 형질전환에 관한 정보

(가) 형질전환방법

- 아그로박테리움법을 사용하였다.

(나) 재조합에 사용된 벡터에 대한 정보

1) 기원

- DAS-44406-6의 개발에 사용된 벡터 pDAB8264의 T-DNA영역은 *A. tumefaciens*의 pTi15955에서 유래하였으며, T-DNA 외부 골격부분에 있는 Ori-Rep과 *trfA*는 *E. coli*의 pTJS75에서 유래되었으며, 항생제 spectinomycin 저항성을 나타내는 *SpecR*은 *E. coli*의 transposon 7(Tn7)에서 유래되었다.

2) 숙주에서의 확인

- 플라스미드 pDAB8264는 *E. coli*와 *A. tumefaciens*에서만 증식되는 이중 벡터(binary vector)이기 때문에 콩에서는 독립적으로 증식될 수 없고, 플라스미드 pDAB8264의 T-DNA 삽입체 부위만 숙주인 콩의 유전체에 도입되어 형질전환 된다. 따라서 유전자변형콩 DAS-44406-6에는 벡터인 플라스미드 pDAB8264의 T-DNA 삽입체 부위를 제외한 다른 유전요소는 도입되지 않게 된다.
- DAS-44406-6에는 단일 유전자 자리에 플라스미드 벡터 pDAB4468 유래의 *aad-12*, *2mepsps*, *pat* 유전자 발현 카세트 1개가 존재하는 것이 확인되었다.
- 삽입된 DNA 서열은 상응하는 재조합 플라스미드 DNA 서열과 동일하다.

3) 숙주에서의 기능

- 플라스미드 pDAB8264는 T-DNA 삽입체 부위를 숙주인 콩에 도입시키는 형질전환 기능을 제외한 다른 기능은 없다. *aad-12* 유전자는 제초제 2,4-D에 내성을 타나내며, *2mepsps* 유전자는 글리포세이트, *pat* 유전자는 글루포시네이트에 내성을 나타내도록 단백질을 발현한다.

(다) 중간숙주에 대한 정보

- 플라스미드 벡터 pDAB8264는 *A. tumefaciens*에서 증식되었으며, 아그로 박테리움법으로 삽입유전자가 식물체로 전달되었다.

(라) 전달성에 관한 정보

- 플라스미드 벡터 pDAB8264는 숙주이외의 다른 생물체로 이동될 수 있는 전달성과 관련된 유전자를 포함하고 있지 않다. 따라서 자체적으로 숙주의 다른 유전체 부위나 다른 생물체로 이동할 수 없다.

(2) 도입 유전자에 대한 정보

(가) 구성 유전자의 특성

1) 선발표지유전자

형질전환된 유전자변형종 DAS-44406-6의 선발에 이용된 선발표지 유전자로는 제초제 글루포시네이트에 대한 내성을 제공하는 *pat* 유전자를 이용하였다.

2) 조절인자

① 프로모터 (promoter)

- *aad-12* 유전자 발현카세트 : *Arabidopsis thaliana* 유래 AtUbi10
- *2mepsps* 유전자 발현카세트 : *Arabidopsis thaliana* 유래 Histone H4A748
- *pat* 유전자 발현카세트 : 식물바이러스 CsVMV(cassava vein mosaic virus)

② 터미네이터 (terminator)

- *aad-12* 유전자 발현카세트 : *A. tumefaciens* pTi15955 유래 AtuORF23 3' UTR
- *2mepsps* 유전자 발현카세트 : *Arabidopsis thaliana* 유래 Histone H4A748 3' UTR
- *pat* 유전자 발현카세트 : *A. tumefaciens* pTi15955 유래 AtuORF1 3'UTR

3) DNA의 기능에 영향을 주는 기타 인자

- 삽입유전자 발현과 관련된 인자 이외의 다른 염기 서열은 삽입되지 않았다.

(나) 크기 및 명칭

- 16,018bp인 pDAB8264 플라스미드의 주요 구성 DNA 요소, 크기, 유래 및 기능이 제시되었다.

(다) 완성된 벡터내의 유전자 염기서열의 위치 및 방향성

- 제한효소지도, 벡터 내에서의 유전자위치 및 방향성이 제시되었다.

(라) 구성 유전자의 기능

① *aad-12* 유전자

AAD-12 단백질을 발현하며, 제초제 2,4-D에 내성을 갖도록 한다.

② *2mepsps* 유전자

2mEPSPS(double mutant 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase) 단백질을 생산하며 제초제 글리포세이트에 내성을 갖도록 한다.

③ *pat* 유전자

PAT 단백질을 생산하며, 제초제 글루포시네이트에 내성을 갖도록 한다.

(마) 유해염기서열의 유무

- 도입된 유전자에 대한 유해염기서열의 유무는 유전자변형종 DAS-44406-6에 도입된 삽입유전자 및 주변경계서열에 대한 염기서열분석을 통해 확인되었다. 또한, 삽입유전자 및 주변경계 염기서열에 대한 데이터베이스 검색을 통해 기지의 독소 단백질이나 항영양소를 암호화하는 유전자와 같은 유해염기서열이 없었다.

(바) 외래전사해독프레임의 유무와 그 전사 및 발현가능성

- 유전자변형종 DAS-44406-6에 도입된 T-DNA 및 인접경계부위에 대한 염기서열을 분석한 결과, 삽입 유전자에 의해 새롭게 형성된 전사해독프레임이 없었기 때문에 전사 및 발현가능성이 없다.

(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

① *aad-12* 유전자

*Delfia acidovorans*에서 유래되어 제초제 2,4-D를 불활성화시키는 α -ketoglutarate-dependent dioxygenase 효소를 발현하며, AAD-12단백질은 293개 아미노산으로 구성되어 있으며, 약 32 kDa의 분자량을 가지고 있다.

② *2mepsps* 유전자

옥수수 유전자 *epsps*의 변형 유전자인 *2mepsps*로부터 2mEPSPS 단백질을 발현하며, 2mEPSPS 단백질은 445 개의 아미노산으로 구성되어 있고, 분자량은 약 47.5 kDa이다.

③ *pat* 유전자

pat 유전자는 *Streptomyces viridochromogenes*에서 유래하였으며 PAT 단백질을 발현한다. 자연계에서 발견되는 PAT 단백질과 아미노산 서열이 동일하다. PAT 단백질은 183 개의 아미노산으로 구성되어 있으며, 약 21 kDa의 분자량을 가지고 있다.

(나) 삽입부위의 수

유전자변형 콩 DAS-44406-6의 게놈을 제한효소로 절단한 후 Southern blot으로 확인한 결과, 단일 유전자 자리에 *aad-12*, *2mepsps* 및 *pat* 유전자 각각 한 개씩 삽입되었다.

(다) 각 삽입부위의 삽입유전자의 구성

1) 복제수, 염기서열

유전자변형 콩 DAS-44406-6의 게놈을 제한효소로 절단한 후 Southern blot 분석한 결과, T-DNA 내부에 위치하는 *aad-12*, *2mepsps* 및 *pat* 유전자 각각 한 개씩 도입되었다.

2) 기지의 독성이나 항영양소를 암호화하는 유전자가 없음을 입증하는 자료

기지의 독성이나 항영양소를 암호화하는 것으로 알려진 유전인자는 DAS-44406-6의 삽입 DNA에 존재하지 않는다.

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

목적으로 하는 AAD-12 단백질, 2mEPSPS 단백질, PAT 단백질의 발현과 관련된 서열 이외의 전사 및 발현가능성이 있는 새로운 외래전사해독 프레임이 존재하지 않는 것으로 확인되었다.

(마) 안정성에 관한 사항

1) 복수세대에서 삽입된 유전자의 서열, 크기

DAS-44406-6에 존재하는 삽입 DNA의 안정성을 평가하기 위해 DAS-44406-6의 DNA를 사용하여 5세대에 걸친 Southern blot분석을 실시한 결과, 5세대에 걸쳐 DAS-44406-6의 삽입 DNA가 유지됨이 확인되었다.

2) 복수 세대에서 발현부위, 발현시기, 발현량

DAS-44406-6의 T4세대를 이용한 조직(잎, 줄기, 뿌리, 및 알곡)에 대한 단백질 발현량을 ELISA 시험법에 의해 실험한 결과, 각 단백질 모두 안정적으로 발현되었다.

(2) 유전자산물에 관한 정보

(가) 유전자산물의 화학적 성질

① AAD-12 단백질

유전자변형콩 DAS-44406-6에서 발현되는 AAD-12 단백질은 토양세균인 *Delftia acidovorans*에서 유래하였으며, 아미노산 서열 2번째에 alanine이 추가된 점을 제외하고는 자연계에 존재하는 AAD-12 단백질과 동일하다. 유전자변형콩 DAS-44406-6의 AAD-12 단백질은 293 개의 아미노산으로 구성되어 있으며, 약 32 kDa의 분자량을 가지고 있다.

② 2mEPSPS

유전자변형콩 DAS-44406-6에서 발현되는 2mEPSPS 단백질은 옥수수의 *epsps* 유전자로부터 변형된 *2mepsps* 유전자의 산물이다. 변형된 *2mepsps* 유전자는 원래의 유전자에서 생성되는 EPSPS 단백질과 비교하여 102번 아미노산 threonine이 isoleucine으로, 106번 아미노산인 proline이 serine으로 대체되어 있다. 2mEPSPS 단백질은 445 개의 아미노산으로 구성되어 있고, 분자량은 약 47.5 kDa이다.

③ PAT 단백질

유전자변형콩 DAS-44406-6에서 발현되는 PAT 단백질은 *S. viridochromogenes*에서 유래하였고, 자연계에서 발견되는 PAT 단백질과 아미노산 서열이 동일하다 (UniProt Accession Number: Q57146). PAT 단백질은 183개의 아미노산으로 구성되어 있으며, 약 21 kDa의 분자량을 가지고 있다.

(나) 유전자산물의 기능

① AAD-12 단백질

유전자변형콩 DAS-44406-6에서 발현되는 유전자산물인 AAD-12 단백질은

제초제 2,4-D에 대한 내성을 제공하는 기능을 갖는다. 제초제 2,4-D를 제초활성이 없는 물질인 DCP(2,4- dichlorophenol)로 전환시킨다. 또한, AAD-12 단백질은 achiral phenoxyacetate 제초제인 MCPA(4-chloro-2-methylphenoxy acetic acid)와 pyridyloxyacetate 제초제인 triclopyr와 fluroxypyr를 또한 제초활성이 없는 phenol과 pyridinol로 전환시킨다.

② 2mEPSPS 단백질

제초제 글리포세이트는 EPSPS 효소와 결합하여 효소활성을 억제시켜 제초 활성을 나타낸다. EPSPS 효소는 주로 식물과 일부 미생물에서만 발견되는데, 식물에서 방향족 아미노산의 생합성 과정에서 필수적인 효소이다. 유전자변형콩 DAS-44406-6은 *epsps* 유전자에서 TIPS 변이를 통해 2개의 아미노산이 대체된 *2mepsps* 유전자를 도입하였다. 유전자변형콩 DAS-44406-6에서 발현되는 변형된 2mEPSPS 단백질은 제초제 글리포세이트와 반응하는 민감도가 낮기 때문에, 제초제 글리포세이트에 의해서도 2mEPSPS의 효소활성이 영향받지 않기 때문에, 식물이 필요한 페놀 화합물의 생합성이 정상적으로 이루어지고 제초제 글리포세이트에 대한 내성을 제공한다.

③ PAT 단백질

PPT(phosphinothricin)의 L-isomer는 식물에서 GS(glutamine synthetase)의 활성을 억제하는 단백질(potent inhibitor)로, 비선택성 제초제인 글루포시네이트로 사용되고 있다. PPT에 의한 GS효소의 활성억제는 세포내 암모니아의 빠른 축적을 가져와 광호흡(photorespiration)이 중단되어 결국 식물세포가 죽게 되는 것으로 알려져 있다. *pat* 유전자는 PAT(phosphinothricin acetyltransferase) 단백질을 생성하는데, PAT 단백질은 acetyl coenzyme A가 있으면 PPT(phosphinothricin)의 자유아민기(free NH₂ group)를 아세틸화하여, GS 효소의 활성을 억제하지 않기 때문에, PPT(제초제 글루포시네이트)에 대한 내성을 제공한다.

(다) 발현단백질의 아미노산 서열의 번역 후 변이 유무

AAD-12, 2mEPSPS, PAT에 대해 당화분석을 실시한 결과, 당화되지 않은 것으로 확인되었다.

(라) 발현단백질의 구조적 변화 여부

AAD-12, 2mEPSPS, PAT 단백질의 Western blot을 통한 번역 반응성 분석, SDS-PAGE를 통한 분자량 확인, MALDI-TOF 질량분석, N-말단 서열 분석, 당화 여부 시험을 통해 *P. fluorescence* 유래 단백질과 DAS-44406-6 유래 단백질간에 구조적 변화가 없는 것으로 확인되었다.

(마) 새로운 특성의 표현형

유전자변형콩 DAS-44406-6은 제초제 2,4-D에 내성을 나타내는 *aad-12* 유전자가 도입되었으며, 또한 제초제 글리포세이트에 내성을 나타내는 *2mepsps* 유전자 및 제초제 글루포시네이트에 내성을 나타내는 *pat* 유전자가 발현되어, 각각의 유전자 산물인 AAD-12, 2mEPSPS 및 PAT 단백질이 형성되어 이들 제초제에 대한 내성을 가진다.

(바) 유전자산물의 발현부위 및 발현량

북미 10개 지역에서 유전자변형콩 DAS-44406-6의 생장단계별, 식물체 조직별 (잎, 줄기, 뿌리 및 알곡)로 AAD-12, 2mEPSPS, PAT 단백질 농도를 측정 (ELISA)한 결과, AAD-12 단백질 농도는 건물중량 기준으로 잎(V10-12)에서 118.57 ng/mg, 줄기(R3)에서 73.47 ng/mg, 뿌리(R3)에서 23.52 ng/mg, 알곡에서 27.37 ng/mg 이었다. 2mEPSPS 단백질 농도는 건물중량 기준으로 잎(V10-12)에서 2583.46 ng/mg, 줄기(R3)에서 357.09 ng/mg, 뿌리(R3)에서 89.71 ng/mg, 알곡에서 21.97 ng/mg 이었다. PAT 단백질 농도는 건물중량 기준으로 잎(V10-12)에서 10.59 ng/mg, 줄기(R3)에서 6.19 ng/mg, 뿌리(R3)에서 1.56 ng/mg, 알곡에서 2.12 ng/mg 이었다.

(3) 독성

(가) 생산물이 단백질인 경우

1) 안전한 식경험의 유무

① AAD-12 단백질

AAD-12 단백질은 토양 미생물인 *Delftia acidovorans*에서 유래하였으며, vanilin 등 식품가공산업에서 사용되어 왔다.

② 2mEPSPS 단백질

2mEPSPS 단백질은 옥수수(*Zea mays*)에서 유래되었고, 자연계의 야생형 (wild-type) 옥수수에 존재하는 EPSPS 단백질 중 두 개의 아미노산이 TIPS 변이로 대체된 변형단백질로, 아래와 같이 다른 유전자변형식품에도 도입되어 미국 등 다른 국가에서도 승인되었다.

③ PAT 단백질

*Streptomyces viridochromogenes*는 이미 여러 번 *pat* 유전자의 공여생물체로 유전자변형식품에 사용되었으며, PAT 단백질의 광범위한 이용 및 안전성에 대해서는 포괄적으로 보고되어 있다.

2) 기지의 독소 및 항영양소와의 아미노산 서열 유사성

① AAD-12 단백질

GenBank non-redundant 단백질 데이터베이스에서 BLAST 검색을 이용하여 기지의 독소 및 항영양소의 아미노산 서열과 비교 분석한 결과, BLASTp 검색결과 얻어진 단백질은 AAD-12 단백질과 유사한 계통의 dioxygenase 효소들이었고, 사람이나 동물에게 해로운 독소단백질과는 유의한 수준에서 아미노산 서열의 상동성이 없었다.

② 2mEPSPS 단백질

BLASTp 검색결과, 통계적으로 유의한 수준의 alignment(statistically significant alignment)는 대부분 EPSPS 단백질과 관련된 shikimic acid pathway에 관련된 단백질이고, 사람이나 동물에게 해로운 독소 단백질과는 유의한 수준에서 아미노산 서열의 상동성이 없었다.

③ PAT 단백질

검색결과 통계적으로 유의한 수준의 alignment는 대부분 PAT 단백질과 관련된 phosphinothricin acetyltransferase, acetyltransferases이었고, 사람이나 동물에게 해로운 독소단백질과는 유의한 수준에서 아미노산 서열의 상동성이 없었다.

3) 유전자 산물의 물리화학적 처리에 대한 감수성

① 인공위액 안정성 :

SDS-PAGE와 Western blot으로 단백질의 인공위액 중 소화성 실험결과, AAD-12 단백질은 인공위액에서 30초 이내 분해되었으며, 2mEPSPS 단백질은 1분 이내, PAT 단백질은 수초만에 빠르게 분해되는 것으로 확인되었다.

② 가열처리 안정성 :

AAD-12단백질은 50℃에서 완전히 불활성화 되었으며, 2mEPSPS 단백질은 55℃ 이후부터 효소활성이 10% 이하로 서서히 감소하였다. PAT 단백질은 열처리에 의해 쉽게 불활성화 되는 것으로 알려져 있다.

4) 발현단백질의 단회투여독성 등

① AAD-12 단백질

AAD-12 단백질을 2,000 mg/kg/bw 농도로 마우스에 단회투여한 결과, 투여와 관련된 특이한 병리적인 소견은 없었다. 어떠한 사망사례도 발견되지 않았으며, 처리에 따른 임상학적 징후, 체중, 병리소견에서 독성영향이 발견되지 않았다.

② 2mEPSPS 단백질

2mEPSPS 단백질을 5,000 mg/kg/bw 농도로 마우스에 단회투여한 결과, 투여와 관련된 특이한 병리적인 소견은 없었다. 어떠한 사망사례도 발견되지

않았으며, 처리에 따른 임상학적 징후, 체중, 병리소견에서 독성영향이 발견되지 않았다.

③ PAT 단백질

PAT 단백질은 유전자변형작물의 개발에 보편적으로 이용되고 인체나 동물에 대해 독성을 보일 가능성이 없는 것으로 알려져 있다. 고용량의 PAT 단백질은 마우스 급성독성시험에서도 PAT 단백질의 투여와 관련된 유의적인 독성은 없는 것으로 알려져 있다.

(4) 알레르기성

(가) 유전자산물이 알레르겐으로 알려지고 있는가에 관한 자료

유전자변형콩 DAS-44406-6에 도입된 삽입유전자에 의한 유전자 산물은 AAD-12, 2mEPSPS 및 PAT 단백질이고, 이들 유전자 산물 단백질은 알레르겐으로 알려져 있지 않다.

(나) 유전자 산물의 물리화학적 처리에 대한 감수성

AAD-12, 2mEPSPS 및 PAT 단백질은 인공위액에서 빠르게 분해되었으며, 물리화학적 처리(열안정성)에도 감수성이 낮아서 쉽게 불활성화 되는 것으로 나타났다.

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

연속하는 8개의 아미노산 잔기와 일치하는 아미노산 서열 검색 및 80개 이상의 아미노산 잔기 중 35 % 이상의 상동성을 가지는 아미노산 서열에 대해 검색한 결과 AAD-12, 2mEPSPS, PAT 단백질 모두 이미 알려진 알레르겐 및 글루텐 과민성 장질환에 관여하는 단백질과 유의적 상동성이 없었다.

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

- 유전자변형콩 DAS-44406-6에서 섭취 부위인 알곡에서 측정한 AAD-12 단백질의 발현량은 건조중량 기준으로 평균 26.73 ng/mg이었고, 2mEPSPS 단백질의 발현량은 평균 22.2 ng/mg, PAT 단백질의 발현량은 평균 2.12 ng/mg이었다. 따라서 삽입된 유전자 산물 단백질의 평균 발현량 합계는 51.05 ng/mg이었다.
- 국민건강영양조사(2005)에 따르면, 국민 1인당 1일 두류 및 그 제품의 평균 섭취량은 39.3g이고, 1~2세의 두류 및 그 제품의 평균 섭취량은 68.3g이며, 국민 1인당 1일 단백질 평균 섭취량은 75.8g이었다. 따라서, 1인당 1일 평균 단백질 섭취량의 전부를 유전자변형콩 DAS-44406-6으로부터 섭취한다고 가정하였을 경우, 국민 1인당 1일 평균 유전자 산물 단백질 섭취량은

2,006.26 μg 이고, 1~2세 국민 1인당 1일 평균 유전자 산물 단백질 섭취량은 3,486.71 μg 이다. 이는 국민 1인당 1일 평균 단백질 섭취량인 75.8g에 대해 $2.64 \times 10^{-3} \%$ 와 $4.60 \times 10^{-3} \%$ 의 비율이다. 따라서 유전자변형콩 DAS-44406-6의 알곡에서 발현되는 유전자 산물 단백질은 우리나라에서 1일 단백질섭취량에서 매우 낮기 때문에, 유의한 비중을 차지하지 않는 것으로 판단된다.

(5) 숙주와의 차이

2010년 미국의 10개 지역에서 포장시험으로부터 얻은 DAS-44406-6과 일반콩(대조군)의 잎 및 알곡 중 구성성분을 비교분석하였다.

(가) 주요영양성분

- 유전자변형콩 DAS-44406-6 및 참조군의 줄기와 알곡에 대한 각 체초제 처리 시험군의 주요영양성분(단백질, 지방, 회분, 수분 및 탄수화물)과 섬유질(ADF: acid detergent fiber, NDF: neutral detergent fiber)에 대하여 분석한 결과, 대조군 및 각 DAS-44406-6 간에 통계적 유의성이 인정되었지만, 알려진 기존 문헌값에 속하였기 때문에 생물학적으로 차이가 없음이 확인되었다.

(나) 미량영양성분

① 무기질

- 줄기에서 분석된 칼슘과 인은 대조군 및 각 유전자변형콩 DAS-44406-6 간에 통계적 유의성이 없었으며, 모든 평균값은 문헌값 범위 내에 속하였다.
- 알곡에서 분석된 무기물(칼슘, 구리, 철, 마그네슘, 망간, 인, 칼륨, 셀레늄, 나트륨 및 아연)중, 칼슘, 칼륨 및 아연은 일부 유전자변형콩 DAS-44406-6와 대조군간에 통계적 유의성이 인정되었으나, 모두 기존 문헌값과 참조군의 평균값의 범위 내에 속하였다.

② 아미노산

- 알곡을 대상으로 분석한 18개 아미노산중 alanine, arginine, aspartic acid, glutamic acid, glycine, isoleucine, leucine, methionine, phenylalanine, proline, serine, threonine 및 valine의 함량은 통계적 유의성이 없었다.
- cystine, histidine, lysine, tryptophan 및 tyrosine에 대해서는 일부 유전자변형콩 DAS-44406-6 시험군과 대조군간에 통계적 유의성이 있었으나, 모두 기존 문헌값과 참조군의 평균값의 범위 내에 속하였기 때문에 생물학적으로는 차이가 없는 것으로 확인되었다.

③ 지방산

- 알곡에서 분석된 지방산 중 caprylic(8:0), capric(10:0), lauric(12:0), myristic(14:0), myristoleic(14:1), pentadecanoic(15:0), pentadecenoic(15:1),

palmitoleic(16:1), heptadecanoic(17:0), heptadecenoic(17:1), γ -linolenic(18:3), eicosadienoic(20:2), eicosatrienoic(20:3) 및 arachidonic(20:4)은 정량한계 (LOQ) 미만이었으며, stearic(18:0) 및 eicosenoic(20:1)의 함량은 통계적 유의성이 없었다.

- palmitic(16:0), oleic(18:1), linoleic(18:2), linolenic(18:3), arachidic(20:0) 및 behenic(22:0)은 일부 유전자변형콩 DAS-44406-6 시험군과 대조군 간에 통계적 유의성 있었으나, 모두 기존 문헌값과 참조군의 평균값의 범위내에 속하였기 때문에 생물학적으로는 차이가 없는 것으로 확인되었다.

④ 비타민

- 알곡에서 분석된 비타민 중 vitamin A 및 β -tocopherol은 정량한계 미만 이었고, vitamin B3, B5, B6 및 δ -tocopherol은 통계적 유의성이 없었다.
- vitamin B9, E, δ -tocopherol은 일부 유전자변형콩 DAS-44406-6과 대조군간에 통계적 유의성이 인정되었으나, 모두 기존 문헌값의 범위 내에 속하기 때문에 생물학적으로는 차이가 없는 것으로 확인되었다.
- vitamin B1, B2, C, γ -tocopherol 및 전체 tocopherol은 유전자변형콩 DAS-44406-6과 대조군 간에 통계적 유의성이 인정되었으나 문헌범위에 속하기 때문에 생물학적으로는 차이가 없는 것으로 확인되었다.

(다) 내재성독소

- 콩은 오랫동안 인류의 식품으로 이용되어 왔기 때문에, 비교분석의 대상이 될 만한 내재성 독소는 알려져 있다.

(라) 영양억제인자

- 알곡에서 분석된 항영양소 중 phytic acid, stachyose 및 전체 glycitein equivalent 함량은 통계적 유의성이 없었다.
- lectin, raffinose, trypsin inhibitor, total daidzein equivalent 및 total genistein equivalent은 일부 유전자변형콩 DAS-44406-6 시험군과 대조군 간에 통계적 유의성이 인정되었으나, 모두 기존 문헌값과 참조군의 평균값의 범위 내에 속하였기 때문에 생물학적으로는 차이가 없는 것으로 확인되었다.

(마) 알레르기유발성분

- 콩은 미국에서는 8대 알레르기성 식품의 하나로 유럽에서는 12대 알레르기성 식품의 하나로 알려져 있다. 따라서 알레르기 유발성분에 대한 숙주와의 차이를 확인하기 위해 유전자변형콩 DAS-44406-6을 숙주인 비유전자변형 콩 (품종 Maverick)과 비교하여 내재하는 알레르기 유발성분을 분석하였다. 유전자변형콩 DAS-44406-6과 비유전자변형 콩의 추출물에 대한 IgE immunoblot 반응의 정성분석을 위해서, 콩에 대한 10명의 알레르기 양성

환자의 혈청을 이용하여 IgE 시험을 수행하였고, 정량분석을 위해서는 ELISA inhibition 시험을 수행한 결과, 유전자변형콩 DAS-44406-6은 비유전자변형 콩의 내재적인 알레르기성에 영향을 주지 않는 것으로 확인되었다.

(바) 삽입된 유전자의 대사산물

AAD-12, 2mEPSPS, PAT 단백질이 발현된다는 점을 제외하면, 일반 콩과 비교하여 DAS-44406-6에서 유래한 식품 성분에는 의도하지 않은 변화는 없을 것으로 판단된다.

(사) 영양성

주요 영양성분, 지방산, 아미노산, 무기질, 비타민 및 항영양소 등의 분석결과, DAS-44406-6과 일반 콩간 생물학적으로 유의적 차이가 없는 것으로 확인되었다.

(6) 유전자산물이 대사경로에 미치는 영향

① AAD-12 단백질

- AAD-12 단백질에 대한 식물체 내 기질탐색을 위해 AAD-12 단백질의 기질 특이적인 화합물 골격구조를 가진 “aryl-oxy-alkane-carboxylic acid”에 대해 천연물 데이터베이스(<http://www.molecular-networks.com/biopath/index.html>, 2012)로 검색한 결과, 일치되는 천연물 기질후보물질을 찾을 수 없었다.
- 알려진 생화학적 대사경로(http://www.expasy.ch/cgi-bin/show_thumbnails.pl 또는 <http://www.molecular-networks.com/node/2>)에 대한 검색에서도 식물유래 천연물에서는 기질후보 화합물을 찾을 수 없었다.
- 총 9개의 화합물(2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid, 2,4-dichlorophenoxyacetate, 2-carboxy-2-hydroxy-8-carboxychromene, 2-hydroxy-2H-benzo(h)chromene-2-carboxylate, 2-hydroxy-7-hydroxymethylchromene-2-carboxylate, 2-hydroxy-8-methylchromene-2-carboxylate, 2-hydroxychromene-2-carboxylate, 4-chlorophenoxyacetate 및 secalonic acid D)이 도출되었는데, 이 중 3개 화합물은 제초제로 자연계에 없는 합성물질(2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid, 2,4-dichlorophenoxyacetate 및 4-chlorophenoxyacetate)이었고, secalonic acid D는 곰팡이 독소(mycotoxin)이었고, 나머지 5개 화합물은 세균에서 methylnaphthalene의 xenobiotic degradation에 관련된 화합물로 AAD-12 단백질의 식물유래 기질후보 화합물이 아니었다. 이와 같이 AAD-12 단백질이 식물유래 천연물을 기질로 이용할 가능성은 매우 낮다.
- 콩에 존재하는 식물체 고유의 성분을 기질로 하여 반응할 가능성을 coupled

in vitro enzyme assay를 통해 추가적으로 확인하였다. 이들 화합물의 선정 기준은 화학구조 및 생리적 기능의 유사성과 식물체의 대사경로에 다량으로 존재하는 물질이었다. 선정 기준에 의해 분석된 기질은 크게 세 그룹으로, 1) 천연식물호르몬(indole acetic acid, abscisic acid, gibberellin, aminocyclopropane-1-carboxylate), 2) phenylpropanoid intermediates(cinnamate, coumarate, sinapate) 및 3) L-amino acid이었다.

- 양성대조군으로 사용된 제초제 2,4-D는 효소 활성 검정에서 매우 높은 활성을 나타냈으나, 다른 기질후보 화합물은 AAD-12 단백질에 대한 효소활성은 매우 낮았다. 따라서 유전자변형종 DAS-44406-6에 존재하는 AAD-12 단백질이 식물체 자체의 고유성분을 기질로 반응할 가능성은 매우 낮다고 판단되었다.

② 2mEPSPS 단백질

- 제초제 글리포세이트는 모든 식물, 세균 및 진균에 필수적인 방향족 아미노산의 생합성에 필수적인 EPSPS에 특이적으로 결합하여 EPSPS 효소활성을 억제한다. 2mEPSPS 단백질은 옥수수에서 유래된 EPSPS 단백질에서 2개의 아미노산을 대체하여, 제초제 글리포세이트의 효소 결합력을 감소시킨다. 따라서 DAS-44406-6은 제초제 글리포세이트에 대한 내성을 갖게 된다. 2mEPSPS 단백질은 이미 다수의 유전자변형 작물에서 이용되고 있고, 포괄적인 안전성 검토가 보고되어 있다. 따라서 DAS-44406-6에 존재하는 2mEPSPS 단백질은 비유전자변형 종의 EPSPS 단백질과 마찬가지로 식물체에서 방향족 아미노산의 생합성에 필요한 숙주 자체의 고유 성분을 동일하게 기질로 이용한다.

③ PAT 단백질

- 유전자변형종 DAS-44406-6에서 발현되는 PAT 단백질의 높은 기질특이성에 대해서는 이미 보고되어 있다. 식물을 포함한 모든 생체 단백질을 구성하는 기본 단위인 20개 L-아미노산과 추가적으로 ornithine에 대해서 PAT 단백질 효소에 의한 아세틸화 반응을 분석한 결과, 아세틸화 반응이 없다고 보고된 바 있다. Autoradiography를 이용한 competition assay를 통해, ¹⁴C-L-phosphinothricin과 ¹⁴C-L-phosphinothricin 보다 50배 높은 농도(2 mM)에서 모든 아미노산을 비교분석했을 때, 어떤 아미노산도 PAT 단백질 효소에 의해 아세틸화 되지 않았다. 특히, 아미노산 glutamate은 L-phosphinothricin과 구조적으로 유사하고 glutamine synthetase 반응에서 유사체로 작용하기 때문에 최고 150 mM L-glutamate의 농도까지 분석하였으나, PAT 단백질 효소에 의한 아세틸화는 관찰되지 않았다. 따라서 유전자변형종 DAS-44406-6에 존재하는 PAT 단백질이 식물체 자체의 고유 성분을 기질로 반응할 가능성은 매우 낮다고 판단되었다.

(7) 외국의 식품유통 승인 및 식용 등의 이용 현황

DAS-44406-6의 안전성 평가 승인 현황은 다음과 같다.

국가명	기관명	용도	승인 현황
남아프리카공화국	농림수산부(DAFF)	식품	승인 (2013. 2. 1)
호주/뉴질랜드	호주식품안전청(FSANZ)	식품	승인 (2013. 4. 18)
캐나다	보건부(HC)	식품	승인 (2013. 6. 7)
미국	식품의약품안전청(FDA)	식품	승인 (2013.12.16)
대만	식품의약품국(TFDA)	식품	승인 (2014. 9. 4)

5. 심사신청 자료 검토 결과

- 이상의 검토 내용과 같이 심사규정에 따라 제출된 안전성 평가 자료를 심사한 결과, 사용된 공여체, 숙주 및 유전자재조합 과정 등이 식품으로 이용 시 안전성 문제를 유발하지 않는다고 판단되었다.
- 유전자재조합체에 관해서도 도입된 유전자, 유전자산물, 알레르기성, 독성 및 영양성 등에서 안전성 평가에 필요한 적절한 자료가 제출되었다. 이 자료를 토대로 검토한 결과 지금까지 식품으로 섭취해온 콩과 비교하여 안전성에 문제가 없음이 확인되었다.

6. 기타

- 「유전자변형생물체의 국가간 이동 등에 관한 법률」에 의하여 유전자변형 콩 DAS-44406-6의 작물재배환경, 자연생태계, 해양생태계에 대한 환경위해성은 농촌진흥청, 환경부, 국립수산물과학원에서 심사 완료하였다.