

유전자재조합 콩 MON87705
안전성평가자료 심사결과 보고서

2013. 8. 1

식품의약품안전처
유전자재조합식품등 안전성평가자료 심사위원회

<차 례>

1. 요약	1
2. 심사경위	2
3. 심사경과	2
4. 심사방법	2
5. 심사 신청 자료 검토	3
5-1. 심사 신청된 식품의 개요	3
5-2. 식품으로의 적합성 검토	3
5-3. 유전자재조합체의 안전성	3
가. 유전자재조합체의 개발목적 및 이용방법에 관한 자료	3
나. 숙주에 관한 자료	3
(1) 분류학적 특성(일반명, 학명, 계통분류 등)	3
(2) 재배 및 품종개량의 역사	4
(3) 기지의 독성 또는 알레르기 유발성	4
(4) 안전한 식경험의 유무	4
다. 공여체에 관한 자료	4
(1) 분류학적 특성(일반명, 학명, 계통분류 등)	4
(2) 안전한 식경험의 유무	4
(3) 공여체 및 근연종의 독성, 항영양성, 알레르기성(미생물의 경우 병원성 및 기지의 병 원체와의 관련성)	4
라. 유전자재조합에 대한 자료	5
(1) 형질전환 과정에 대한 정보	5
(2) 도입 유전자에 대한 정보	6
마. 유전자재조합체의 특성에 관한 자료	9
(1) 유전자재조합체 내 도입된 유전자에 관한 정보	9
(2) 유전자산물에 관한 정보	11
(3) 독성	12
(4) 알레르기성	13
(5) 숙주와의 차이	14
(6) 유전자산물이 대사경로에 미치는 영향(숙주가 함유한 고유의 성분을 기질로 하여 반 응할 가능성)	16
(7) 외국의 식품유통 승인 및 식용 등의 이용 현황	16
6. 심사 신청 자료 검토 결과	16
7. 기타	16

유전자재조합 콩 MON87705 안전성평가자료 심사결과 보고서

1. 요약

몬산토코리아(유)는 유전자재조합 콩 MON87705를 식품의약품안전처에 안전성 심사를 신청하였고, “유전자재조합식품등 안전성평가자료 심사위원회”는 「유전자재조합식품등의 안전성평가 심사등에 관한 규정」에 따라 안전성 심사를 수행하였다.

MON87705는 콩 유래 *FAD2-1A/FATB1-A* 억제 카세트와 *Agrobacterium sp.* 유래 *cp4 epsps* 유전자가 아그로박테리움법으로 도입되어 만들어진 다. 도입된 유전자에 의해 *FAD2-1/FATB1-A* 유전자 발현이 억제되며, CP4 EPSPS 단백질이 생성된다.

MON87705는 기존 콩보다 올레산(oleic acid) 생성을 증가시키고 리놀레산(linoleic acid) 생성을 감소시키며, 제초제인 글리포세이트에 대해 내성을 가진다. 도입된 *FAD2-1A/FATB1-A* 유전자와 *cp4 epsps* 유전자는 4세대에 걸쳐 안정적으로 유전되는 것으로 나타났다.

MON87705에 대해 랫드(rat)에서 90일 반복투여독성실험을 실시한 결과 독성 징후가 나타나지 않았다. MON87705와 일반 콩의 주요영양성분, 미량영양성분, 항영양소 등의 함량 차이를 비교한 결과 올레산이 증가하고, 리놀레산이 감소하였으나 영양성 및 독성에 문제가 없는 것으로 나타났으며, 기타 다른 성분들은 생물학적으로 차이를 보이지 않았다. MON87705의 대두박(약23%), 대두피(1%) 및 대두유(0.5%)를 브로일러(Broiler)에 42일 동안 계속해서 먹었을 때에도 일반 콩과 비교하여 영양성에 차이가 없는 것으로 나타났다.

결론적으로, MON87705는 지금까지 식품으로 섭취해온 콩과 비교하여 안전성에 문제가 없음이 확인되었다.

2. 심사경위

- 몬산토코리아(유)는 지방산 조성 변화 및 제초제내성을 나타내는 유전자재조합 콩 MON87705를 식품위생법 제18조에 따른 안전성 평가심사를 받기 위하여 2010년 7월 6일 식품의약품안전처에 「유전자재조합식품의 안전성평가 심사 등에 관한 규정」(이하 ‘심사규정’이라고 함)에서 규정한 관련 자료를 첨부하여 심사 신청하였다.
- 이에 식품의약품안전처장은 본 품목이 심사규정에 따라 안전성 평가가 이루어졌는지 여부에 대하여 '유전자재조합식품등 안전성평가자료 심사위원회' (이하 ‘심사위원회’라고 함)에 심사 의뢰하고,
- 심사위원회는 신청인이 제출한 자료에 근거하여 아래와 같이 심사규정에 따라 안전성평가가 이루어졌음을 확인하였다.

3. 심사경과

- 심사대상품목

대상품목	신청자	개발자	식품으로서 제외국의 안전성 확인(승인) 현황
유전자재조합 콩 MON87705	몬산토코리아(유)	Monsanto	미국(2011), 호주/뉴질랜드(2011), 멕시코(2011), 일본(2012), 대만(2013)

- 심사경과

- 2010년 7월 6일 : 안전성 평가자료 심사신청
- 2010년 7월 8일 : 심사위원회 서류심사 의뢰
- 2011년 2월 15일 : 1차 심사위원회
- 2011년 6월 21일 : 2차 심사위원회
- 2011년 11월 15일 : 3차 심사위원회
- 2012년 3월 20일 : 4차 심사위원회
- 2012년 8월 21일 : 5차 심사위원회
- 2012년 10월 17일 : 환경위해성 심사완료(농촌진흥청, 국립수산물과학원, 국립환경과학원)
- 2013년 2월 19일 : 6차 심사위원회
- 2013년 6월 19일 : 7차 심사위원회
- 2013년 7월 2일 ~ 7월 22일 : 공개의견 수렴 실시
- 2013년 7월 30일 : 8차 심사위원회 개최

4. 심사방법

- 본 품목과 관련하여 심사 신청된 유전자재조합체가 심사규정의 적용대상인지를 검토하였다.

- 제출된 안전성 평가 자료가 심사규정에서 요구하는 자료를 갖추었는지를 확인한 후 자료의 내용을 토대로 안전성 평가 자료를 심사하였다.

5. 심사 신청 자료 검토

5-1. 심사 신청된 식품의 개요

- 몬산토코리아(유)가 심사 신청한 유전자재조합 콩 MON87705는 콩 종자에서 지방산 생합성 경로에 관여하는 두 가지 효소인 FATB와 FAD2를 선택적으로 하향조정 하도록 개발되어, MON87705 대두유는 일반 대두유에 비해 낮은 수준의 포화지방산, 높은 수준의 18:1 올레산(oleic acid), 감소한 18:2 리놀레산(linoleic acid) 수준을 함유한다. 또한, *cp4 epsps* 유전자를 가져 제초제인 글리포세이트에 내성을 나타낸다.

5-2. 식품으로의 적합성 검토

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

5-3. 유전자재조합체의 안전성

가. 유전자재조합체의 개발목적 및 이용방법에 관한 자료

- 몬산토는 올리브유 및 카놀라유와 유사한 불포화지방산 프로파일을 가지며, 대두유의 포화지방산 수준은 일반 대두유 상품의 절반 이하인 유전자재조합 콩 MON87705를 개발하였다. 그로인해, MON87705 대두유는 일반 대두유와 비교하여 낮은 수준의 포화지방산(총지방산 중 6%←15%)을 함유하고, 높은 수준의 18:1 올레산(총지방산 중 76%←23%)을 함유할 뿐 아니라, 감소한 18:2 리놀레산(총지방산 중 10%←53%) 수준을 함유한다.
- 또한, MON87705에는 *cp4 epsps* 유전자도 도입되어 제초제 글리포세이트에 내성을 나타낸다.
- 재배방법 및 이용방법은 기존의 콩과 동일하다.

나. 숙주에 관한 자료

(1) 분류학적 특성(일반명, 학명, 계통분류 등)

- 종(Species): *max*
- 속(Genus): *Glycine* Willd.
- 과(Family): Leguminosae

- 품종명 (Cultivar/breeding line) : A3525

(2) 재배 및 품종개량의 역사

- 콩의 재배는 중국 은나라(기원전 1500 ~ 1027년경) 혹은 그 이전부터 시작된 것으로 사료되나(Hymowitz, 1970), 역사적·지리적 증거는 중국 동북부의 주나라(기원전 1027 ~ 221년)에서만 찾을 수 있다. 유럽에서는 16세기 후반부터 사용하기 시작했으며, 북아메리카에는 18세기에 도입되었다.
- 콩은 미국에 도입된 후 관행육종 프로그램을 통해 개량되어 식품 및 사료에서 주요 영양소 공급원으로 사용되고 있다.

(3) 기지의 독성 또는 알레르기 유발성

- 인간은 오랫동안 콩을 재배하고 섭취해 온 경험이 있으며, 세계 인구의 대다수는 콩단백질 함유 식품을 소비한다. 콩 종자에는 트립신 저해제 및 렉틴(lectin)과 같은 항영양소가 포함되어 있다.
- 이러한 물질로 인해 인간이나 동물에게 위대한 영향이 발견된 사례는 보고된 바 없다.

(4) 안전한 식경험의 유무

- 콩은 두부, 간장, 두유, 에너지바, 육제품 등 다양한 식품에서 사용되며, 정제유는 마가린, 쇼트닝, 샐러드유로 사용된다. 대두유는 세계적으로 소비되는 전체 식물성유의 약 30%를 차지하며, 시장점유율이 약 32%인 팜유에 이어 세계 2위의 식물성유 재료이다.

다. 공여체에 관한 자료

(1) 분류학적 특성(일반명, 학명, 계통분류 등)

cp4 epsps 유전자는 *Agrobacterium sp.* strain CP4에서 유래하였다.

- 속(Genus): *Agrobacterium*
- 과(Family): Rhizobiaceae

(2) 안전한 식경험의 유무

- *Agrobacterium sp.* strain CP4는 직접적으로 식용으로 이용된 적은 없다.

(3) 공여체 및 근연종의 독성, 항영양성, 알레르기성(미생물의 경우 병원성 및 기지의 병원체와의 관련성)

- *Agrobacterium sp.* strain CP4는 인간이나 동물의 병원성 생물체로 알려지지 않았다.

라. 유전자재조합에 대한 자료

(1) 형질전환 과정에 대한 정보

(가) 형질전환방법

- 아그로박테리움법(Agrobacterium) 매개 형질전환법을 사용하였다.

(나) 재조합에 사용된 벡터에 대한 정보

1) 기원

- 플라스미드 벡터 PV-GMPQ/HT4404는 Vector E와 Vector F로부터 구성되었다. Vector E는 *cp4 epsps* 발현 카세트, *FAD2-1A/FATB1-A*의 sense 단편을 포함한 부분적인 억제 카세트 및 backbone 인자를 포함하고 있다. 최종 벡터 PV-GMPQ/HT4404는 *Fse I* 제한 효소를 사용하여 Vector F에 있는 *FAD2-1A/FATB1-A*의 antisense 단편을 포함한 부분적인 억제 카세트를 Vector E로 삽입함으로써 만들어졌다.

2) 숙주에서의 확인

- 플라스미드 벡터 PV-GMPQ/HT4404에는 2개의 T-DNA가 포함되어 있다.
 - T-DNA I에는 *cp4 epsps* 유전자 발현 카세트와 *FAD2-1A* intron의 sense 단편 및 *FATB1-A* 5'UTR과 색소체 타겟서열의 sense 단편이 포함된 부분적인 억제 카세트가 포함되어 있다.
 - T-DNA II에는 *FAD2-1A* intron의 antisense 단편 및 *FATB1-A* 5'UTR과 색소체 타겟서열의 antisense 단편으로 이루어진 부분적인 억제 카세트가 포함되어 있다.
- 형질전환을 통해 생성된 MON87705에는 *cp4 epsps* 유전자 발현 카세트와 하나의 *FAD2-1A/FATB1-A* 억제 카세트가 통합된 상태로 포함되어 있다.

3) 숙주에서의 기능

- *cp4 epsps* 유전자는 CP4 EPSPS 단백질을 발현하여 글리포세이트에 대한 내성을 나타낸다.
- *FAD2-1A/FATB1-A* 억제 카세트의 영향으로 *FAD2* 및 *FATB* 유전자는 발현이 억제되어, 포화지방산 함량이 줄어들고, 올레산 함량이 증가하며, 동시에 리놀레산 함량이 줄어들게 된다.

(다) 중간숙주에 대한 정보

- 플라스미드 PV-GMPQ/HT4404는 *E. coli*에서 대량으로 증식된 후, 아그로박테리움을 통해 식물체로 형질 전달되었다.

(라) 전달성에 관한 정보

- 플라스미드 PV-GMPQ/HT4404는 숙주이외의 다른 생물체로 스스로 이동될 수 있는 전달성과 관련된 유전자를 포함하고 있지 않다.

(2) 도입 유전자에 대한 정보

(가) 구성 유전자의 특성

1) 선발 표지 유전자

- *cp4 epsps* : *A. tumefaciens* strain CP4의 *aroA* 유전자 서열에서 유래되어 합성된 것이다. *cp4 epsps* 유전자는 CP4 EPSPS 단백질을 암호화하며 글리포세이트에 대한 내성을 부여한다.

2) 조절인자

① *cp4 epsps* 유전자 발현 카세트 (T-DNA I)

- *FMV/Tsf1* 융합 프로모터 : *Arabidopsis thaliana*의 연장인자(elongation factor)를 암호화하는 *Tsf1* 유전자에서 유래한 프로모터 및 figwort mosaic virus 35S RNA 프로모터에서 유래한 enhancer 영역이 결합된 형태이다.
- *Tsf1* 리더 : *Arabidopsis thaliana Tsf1* 유전자에서 유래한 5'비번역영역이다.
- *Tsf1* 인트론 : *Arabidopsis thaliana Tsf1* 유전자에서 유래한 인트론영역이다.
- *CTP2* 표적서열 : *Arabidopsis thaliana* EPSPS의 엽록체 이동 펩타이드 영역을 암호화하는 *ShkG* 유전자에서 유래한 표적서열로, CP4 EPSPS 단백질이 엽록체로 이동하도록 유도한다.
- *E9* 터미네이터 : *Pisum sativum*의 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase small subunit(*rbcS2*) *E9* 유전자의 3'비번역영역으로, 전사를 종료하고 polyadenylation을 유도한다.

② *FAD2-1A/FATB1-A* 억제 카세트 (T-DNA I 및 II)

- *7Sa'* 프로모터 : 미성숙 종자에서 발현을 지시하는 *Glycine max 7Sa'* 종자 저장 유전자 프로모터이다.
- *H6* 터미네이터 : *Gossypium barbadense*의 *H6* 유전자의 3'비번역영역으로, 전사를 종결시킨다.

3) 기타 DNA 기능에 영향을 미치는 요인

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

(나) 크기 및 명칭

- 플라스미드 벡터 PV-GMPQ/HT4404로 통합된 개별 유전인자의 크기와 명칭은 [표 1]과 같다.

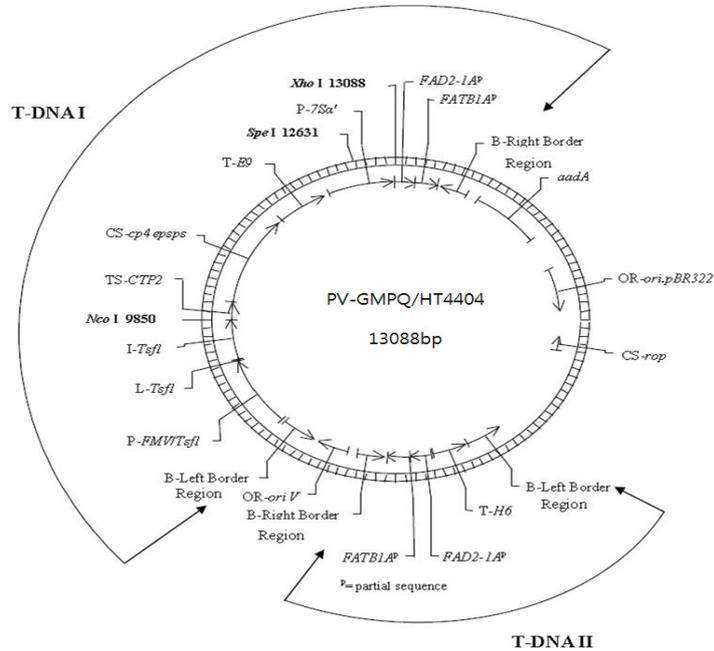
[표 1] PV-GMPQ/HT4404 플라스미드 벡터의 주요 구성 요소

명칭	벡터 내 위치	유전적 요소
T-DNA I		
LB	7657-8098	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> 에서 유래하여 T-DNA의 transfer에 관여하는 염기서열부분
Intervening Sequence	8099-8134	DNA 클로닝에 사용된 서열(개재서열)
<i>FMV/Tsf1</i> - promoter	8135-9174	Figwort Mosaic virus 35S RNA의 프로모터에서 유래한 enhancer 부위와 <i>Arabidopsis thaliana Tsf1</i> 유전자의 프로모터 부위가 결합된 융합(chimeric) 프로모터
<i>Tsf1</i> - leader	9175-9220	<i>Arabidopsis thaliana Tsf1</i> 유전자의 5'비번역영역
<i>Tsf1</i> - intron	9221-9842	<i>Arabidopsis thaliana Tsf1</i> 유전자의 인트론
Intervening Sequence	9843-9851	DNA 클로닝에 사용된 서열(개재서열)
<i>CTP2</i> - targeting sequence	9852-10079	<i>Arabidopsis thaliana</i> EPSPS의 엽록체 이동 펩타이드 영역을 암호화하는 <i>ShkG</i> 유전자에서 유래한 표적서열
<i>cp4 epsps</i> - coding sequence	10080-11447	<i>Agrobacterium sp.</i> strain CP4에서 CP4 EPSPS 단백질을 암호화하는 <i>aroA</i> 유전자의 코돈을 변형시킨 서열
Intervening Sequence	11448-11505	DNA 클로닝에 사용된 서열(개재서열)
<i>E9</i> - terminator	11506-12148	<i>Pisum sativum</i> (pea) <i>rbcS2</i> 유전자의 3'비번역영역
Intervening Sequence	12149-12236	DNA 클로닝에 사용된 서열(개재서열)
<i>7Sa'</i> - promoter	12237-13077	<i>Glycine max Sphas1</i> 유전자의 프로모터와 리더
<i>FAD2-1A^p</i> (sense)	12-277	<i>Glycine max</i> delta-12 desaturase를 암호화하는 <i>FAD2-1A</i> 유전자의 intron #1에서 유래한 부분염기서열 (partial sequence)
<i>FATB1-A^p</i> (sense)	278-578	<i>Glycine max</i> palmitoyl acyl carrier protein thioesterase를 암호화하는 <i>FATB1-A</i> 유전자의 색소체(plastid) 타겟서열과 5'비번역영역에서 유래한 부분염기서열 (partial sequence)
Intervening Sequence	579-616	DNA 클로닝에 사용된 서열(개재서열)
RB	617-973	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> 에서 유래하여 T-DNA의 transfer에 관여하는 염기서열부분
T-DNA II		

LB	5128-5569	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> 에서 유래하여 T-DNA의 transfer에 관여하는 염기서열부분
Intervening Sequence	5570-5667	DNA 클로닝에 사용된 서열(개재서열)
<i>H6</i> - terminator	5668-6103	<i>Gossypium barbadense</i> 에서 섬유단백질을 암호화하는 <i>H6</i> 유전자의 3'비번역영역
<i>FAD2-1A^p</i> (antisense)	6116-6381	<i>Glycine max</i> delta-12 desaturase를 암호화하는 <i>FAD2-1A</i> 유전자의 intron #1에서 유래한 부분염기서열 (partial sequence)
<i>FATB1-A^p</i> (antisense)	6382-6682	<i>Glycine max</i> palmitoyl acyl carrier protein thioesterase를 암호화하는 <i>FATB1-A</i> 유전자의 색소체(plastid) 타겟서열과 5'비번역영역의 부분적인 염기서열 (partial sequence)
Intervening Sequence	6683-6693	DNA 클로닝에 사용된 서열(개재서열)
RB	6694-7024	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> 에서 유래하여 T-DNA의 transfer에 관여하는 염기서열부분

(다) 완성된 벡터내의 유전자 염기서열의 위치 및 방향성

- 플라스미드 벡터 PV-GMPQ/HT4404의 유전인자의 위치와 방향성은 [그림 1]과 같다.



[그림 1] PV-GMPQ/HT4404의 유전자 위치 및 제한효소 위치

(라) 구성 유전자의 기능

- *cp4 epsps* 유전자는 CP4 EPSPS 단백질을 암호화하며, 제초제 글리포세이트에

대한 내성을 나타낸다.

- *FAD2-1A/FATB1-A* 억제 카세트로부터 생성되는 이중가닥 RNA(dsRNA)는 RNA 간섭(RNAi) 경로를 통해 내인성 *FAD2* 및 *FATB* RNA 수준을 감소시켜 궁극적으로 종자 내 지방산 조성을 변화시킨다.

(마) 유해염기서열의 유무

- 유해염기서열은 존재하지 않는다.

(바) 외래전사해독프레임의 유무와 그 전사 및 발현가능성

- 목적으로 하는 CP4 EPSPS 단백질 발현 및 *FAD2-1A/FATB1-A* dsRNA 생성과 관련된 서열 이외 전사 및 발현가능성이 있는 새로운 외래전사해독프레임이 존재하지 않는 것으로 나타났다.

(사) 목적하는 유전자 이외의 염기서열의 혼입 (유전자의 순도)

- 목적하는 유전자 이외의 유전자는 혼입되지 않았다.

마. 유전자재조합체의 특성에 관한 자료

(1) 유전자재조합체 내 도입된 유전자에 관한 정보

(가) 유전자재조합체의 게놈에 삽입된 유전자의 특성 및 기능

- 유전자재조합 콩 MON87705에 도입된 *cp4 epsps* 유전자는 CP4 EPSPS 단백질을 발현하여 제초제 글리포세이트에 대한 내성을 나타낸다.
- *FAD2-1A/FATB1-A* dsRNA는 콩 내재 유전자 단편을 사용하여 만들어지며, RNAi 경로를 통해 *FATB* 및 *FAD2* 유전자 발현을 억제한다. 유전자억제기작으로 인해 MON87705 종자에서는 포화지방산 수준의 감소, 단일불포화지방산 수준의 증가, 다중불포화지방산 수준의 감소를 나타낸다.

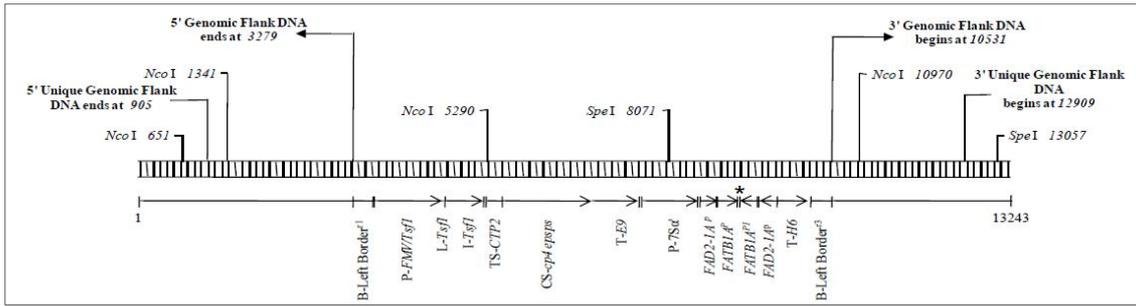
(나) 삽입부위의 수

- MON87705에는 단일 유전자 자리에 각각 한 개의 *cp4 epsps* 유전자 카세트 및 *FAD2-1A/FATB1-A* dsRNA 생성 서열이 삽입되어 있는 것이 확인되었다.

(다) 각 삽입부위의 삽입유전자의 구성

1) 복제수, 염기서열(주변염기서열 포함)

- Southern 분석 결과, MON87705의 게놈에는 각각 한 개의 *cp4 epsps* 유전자 카세트 및 *FAD2-1A/FATB1-A* dsRNA 생성 서열이 도입되었음이 확인되었다.



[그림 2] 유전자재조합 콩 MON87705에서 플라스미드의 삽입 모식도

2) 기지의 독성이나 항영양소를 암호화하는 유전자가 없음을 입증하는 자료

- 기지의 독성물질이나 항영양소를 암호화하는 것으로 알려진 유전인자는 유전자재조합 콩 MON87705의 삽입 DNA에 존재하지 않는다.

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

- MON87705 삽입유전자의 5' 및 3' 말단과 콩 내재 유전자 사이 접합부 및 T-DNA 결합으로 생성된 새로운 접합부에서 암호화되는 추정상의 폴리펩타이드를 이미 알려진 독소.알레르겐.유해한 생물활성 단백질과 생물정보학적 방법으로 비교분석하였다.
- 추정상의 폴리펩타이드는 모든 reading frame에서 총 18개가 확인되었으나, 동 폴리펩타이드는 발현되더라도 이미 알려진 독소.알레르겐.유해한 생물활성 단백질과 상동성이 없는 것으로 확인되었다.

(마) 안정성에 관한 사항

1) 복수세대에서 삽입된 유전자의 서열, 크기

- MON87705에 존재하는 삽입 DNA의 안정성을 평가하기 위해 MON87705 DNA를 사용하여 4세대(R3, R4, R5, R6)에 걸친 Southern blot 분석을 실시한 결과 4세대에 걸쳐 MON87705의 삽입 DNA가 유지됨이 확인되었다.

2) 복수세대에서 발현부위, 발현시기, 발현량

- MON87705 성숙종자에서의 CP4 EPSPS 단백질 발현량을 Western blot 분석으로 확인한 결과, 4세대(R3, R4, R5, R6)에 걸쳐 안정적으로 발현됨이 확인되었다.

(2) 유전자산물에 관한 정보

(가) 유전자산물의 화학적 성질 (단백질이나 전사되지 않은 RNA)

- 유전자재조합 콩 MON87705의 CP4 EPSPS 단백질은 455개의 아미노산으로

- 이루어져 있으며, 약 47.6 kDa의 분자량을 가진다.
- *FAD2-1A/FATB1-A* dsRNA는 단백질로 발현되지 않아 유전자산물이 존재하지 않는다.

(나) 유전자산물의 기능

- CP4 EPSPS 단백질이 발현됨에 따라 제초제 글리포세이트에 내성을 나타낸다.

(다) 발현단백질의 아미노산 서열의 번역 후 변이 유무

- MON87705 유래 CP4 EPSPS 단백질에 대해 당화분석을 실시하여, 당화되지 않았음이 확인되었다.

(라) 발현단백질의 구조적 변화 여부

- SDS-PAGE : MON87705 유래 CP4 EPSPS 단백질의 실험적 분자량 측정을 위하여 SDS-PAGE를 실시한 결과, 약 44.6kDa의 분자량이 측정되었다.
- Western blot : MON87705 유래 CP4 EPSPS 단백질의 면역반응성 측정을 위해 goat anti-CP4 EPSPS 항체를 이용하여 Western blot을 실시한 결과, 단백질 loading양에 따라 증가양상을 보이는 단일 신호가 확인되었다.
- N말단 서열분석 : MON87705 유래 CP4 EPSPS 단백질에 대해 최초 10개 아미노산의 N말단 서열분석을 실시한 결과, N말단의 메티오닌이 제거된 것 이외에는 예측되는(expected) 서열과 동등함이 확인되었다.
- MALDI-TOF 질량분석 : MON87705 유래 CP4 EPSPS 단백질에 트립신을 가하여 펩타이드화 시킨 후, MALDI-TOF 질량분석을 실시한 결과, 예측되는 서열 대비 30개의 펩타이드가 동정되어 80%(455개 아미노산 중 362개)의 적용범위(coverage)를 나타내었다.
- 효소활성 분석: MON87705 유래 CP4 EPSPS 효소활성을 평가하기 위해 EPSPS를 촉매로 하여 shikimate-3-phosphate(S3P) 및 phosphoenolpyruvate (PEP)로부터 생성되는 무기인(Pi)과 EPSP(5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate)의 생성을 측정하는 분석을 실시한 결과, 4.10 U/mg으로 효소활성이 측정되었다.
- 결론적으로, SDS-PAGE를 통한 분자량 분석, Western blot을 통한 면역 반응성 분석, MALDI-TOF 질량분석, N말단 서열분석, 효소활성 분석을 통해 MON87705 유래 CP4 EPSPS 단백질은 구조적 변화가 없는 것으로 확인되었다.

(마) 새로운 특성의 표현형

- MON87705에서 발현되는 CP4 EPSPS 단백질은 식물 고유의 EPSPS 효소와 구조적.기능적으로 유사하지만, 글리포세이트 친화력이 낮아 식물체로 하여금

제조제 내성을 부여한다.

- *FAD2-1A/FATB1-A* dsRNA는 RNA 기반 억제를 통하여 콩 종자의 지방산 생합성 경로에 관여하는 두 가지 중요한 효소(FAD 및 FATB)를 선택적으로 하향 조절한다. 그로인해, MON87705 대두유는 일반 대두유와 비교하여 낮은 수준의 포화지방산, 높은 수준의 단일불포화지방산(18:1 올레산), 그와 관련하여 감소된 다중불포화지방산(18:2 리놀레산)을 함유한다.

(바) 유전자산물의 발현부위 및 발현량

- MON87705 다양한 조직에서 CP4 EPSPS 단백질 발현 수준을 효소면역측정법(ELISA)으로 분석한 결과, CP4 EPSPS 단백질의 평균 발현 수준은 잎(OSL-2, V6-V8)에서 530 μ g/g 건조중량으로 가장 높았으며, 경엽>종자>뿌리 순으로 확인되었다.

(3) 독성

(가) 생산물이 단백질인 경우

1) 안전한 식경험의 유무

- 이미 승인되어 상업화 중인 유전자재조합 콩 2종류(GTS40-3-2, MON89788), 옥수수 NK603, 면화 GT73 등은 동일한 CP4 EPSPS 단백질을 함유하고 있다.

2) 기지의 독소 및 항영양소와의 아미노산 서열 유사성

- TOX_2010 독소 데이터베이스를 이용하여 이미 알려진 독소 및 항영양소의 아미노산 서열과 CP4 EPSPS 단백질의 아미노산 서열을 생물정보학적으로 비교 분석한 결과, 서열 상동성이 없는 것으로 확인되었다.

3) 유전자 산물의 물리화학적 처리에 대한 감수성

- SDS-PAGE를 통한 분자량 분석, Western blot을 통한 면역 반응성 분석, 효소활성 분석을 통해 *E. coli* 유래 CP4 EPSPS 단백질은 MON87705 유래 CP4 EPSPS 단백질과의 동등성이 확인되었다.
- 인공위액 안정성 : CP4 EPSPS 단백질(*E. coli* 유래)은 인공위액에서 15초 이내에 분해되는 것으로 확인되었다.
- 인공장액 안정성 : CP4 EPSPS 단백질(*E. coli* 유래)은 인공장액에서 100분 이내에 분해되는 것으로 확인되었다.
- 열 안정성 : CP4 EPSPS 단백질(MON87705 유래)은 190 $^{\circ}$ C 20분간의 열처리에 의해 분해되는 것으로 확인되었다.

4) 발현단백질의 단회투여독성

- CD-1 마우스(암수 각10마리)를 대상으로 *E. coli* 유래 CP4 EPSPS 단백질을 49, 154, 572 mg/kg body wt. 용량으로 단회 투여한 결과, 어떠한 사망 사례도 발

견되지 않았으며, 투여에 따른 체중 및 체중증가량, 임상학적 징후, 사료섭취량, 육안 병리소견에서 부정적 영향이 발견되지 않았다.

5) MON87705 사료를 이용한 90일 독성

- SD(Sparague-Dawley) 랫드(암수 각 12마리)를 이용하여 MON87705 유래 대두박이 약 30%(w/w) 들어간 사료를 약 90일간 섭취시킨 결과, 처리에 따른 폐사율 확인, 체중, 사료섭취량, 임상검사, 임상병리검사, 장기 중량 측정, 조직병리검사 등에서 부정적 영향이 발견되지 않았다.

(나) 생산물이 단백질이 아닌 경우

1) 생물학적 기능

- MON87705 콩에 도입된 *FAD2-1A/FATB1-A* dsRNA 생성 서열은 RNA기반 억제기작을 통하여 콩에서 지방산 생합성 경로에 관여하는 두 가지 효소(FAD 및 FATB)를 선택적으로 하향 조절 하였다.

2) 식이노출량

- *FAD2-1A/FATB1-A* dsRNA는 콩에 존재하는 *FAD* 및 *FATB* 유전자의 부분적인 서열로서 단백질을 생산하지 않으므로, MON87705를 통한 해당 RNA의 식이노출량은 일반 콩과 다르지 않을 것으로 판단된다.

3) 안전한 식경험의 유무

- *FAD2-1A/FATB1-A* dsRNA는 식경험이 있는 콩 내재 *FAD2* 및 *FATB1* RNA의 부분적인 서열이며, 핵산은 미국 식품안전청에 의해 GRAS로 인정되어 있는 등 안전한 식경험을 가지고 있다.

(4) 알레르기성

(가) 유전자산물이 알레르겐으로 알려지고 있는가에 관한 자료

- CP4 EPSPS 단백질이 알레르겐이라는 보고는 없다.

(나) 유전자 산물의 물리화학적 처리에 대한 감수성

- CP4 EPSPS 단백질은 인공위액 또는 인공장액과 같은 소화효소에 쉽게 분해되는 것으로 확인되었으며, 190℃ 20분간의 열처리 조건에서 안정성이 없는 것으로 확인되었다.

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

- CP4 EPSPS 단백질의 아미노산 서열과 이미 알려진 알레르겐의 아미노산 서열을 AD_2010(FARRP, 2010) 알레르겐 데이터베이스를 이용하여 생물정

보통적으로 비교 분석한 결과, 80개 이상의 아미노산 절편에 걸쳐 35% 이상의 상동성을 보이는 알레르겐 서열은 없었으며, 8개씩의 인접 아미노산과 일치하는 서열도 확인되지 않았다.

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

- MON87705가 상업화되어 한국에서의 모든 콩 수요량을 MON87705로 대체한다고 가정하더라도,
- 보건복지부의 국민건강영양조사 3기(2005) 통계를 바탕으로 kg 체중 당 콩을 가장 많이 섭취하는 만 1~2세의 단백질 1인 1일 평균 섭취량 중 CP4 EPSPS 단백질이 차지할 수 있는 비율은 $2.0 \times 10^{-2}\%$ 로 확인되었다.
- 한국농촌경제연구원의 식품수급표(2005) 통계를 바탕으로 한국인의 단백질 1인 1일 평균 섭취량 중 CP4 EPSPS 단백질이 차지할 수 있는 비율은 $3.5 \times 10^{-3}\%$ 로 확인되었다.

(5) 숙주와의 차이

- 2007 ~ 2008년 칠레 5개 지역에서 3반복으로 MON87705 종자와 대조군(A3525) 종자를 수확하여 성분 분석을 실시하였다.
- 통계방법으로는 분산분석 혼합모형(mixed model of variance)를 사용하였고, 통계학적으로 유의적 차이가 나는 성분에 대해 생물학적으로 유의적 차이 여부 확인은 허용범위(tolerance interval)와 문헌자료에 공개된 상업적 일반 콩 성분의 자연적인 변이 범위를 사용하였다.

(가) 주요영양성분

① 일반성분

- 분석한 일반성분(회분, 탄수화물, 수분, 단백질, 지방, 산성세재불용성섬유(ADF), 중성세재불용성섬유(NDF)) 중 지방은 통계적으로 유의차를 보였으나, 허용범위 이내에 존재하였으므로 생물학적으로 유의한 차이가 없음이 확인되었다.

② 아미노산

- 분석한 아미노산(18개) 중 Arginine, Cystein은 통계적으로 유의차를 보였으나, 모두 허용범위 이내에 존재하였으므로 생물학적으로 유의한 차이가 없음이 확인되었다.

③ 지방산

- 분석한 지방산(9개) 중 7개 지방산에서 통계적으로 유의차가 확인되었다. 비의도적인 변화 중 18:3 리놀렌산, 20:0 아라키드산, 20:1 Eicosenoic acid는 모두 허용범위 또는 문헌범위 이내에 존재하였으므로 생물학적으로 유의한 차이가 없음이 확인되었다.

- MON87705 종자에서 확인된 의도적인 변화는 16:0 팔미트산, 18:0 스테아르산 (포화지방산) 수준의 감소, 18:1 올레산(단일불포화지방산) 수준의 증가, 이와 관련하여 18:2 리놀레산(다중불포화지방산) 수준의 감소가 있다. MON87705 및 대조군 종자에서 차지하는 총지방산대비 함량은 아래의 표와 같다.

	16:0 팔미트산	18:0 스테아르산	18:1 올레산	18:2 리놀레산
MON87705	2.36 (%rel)	3.31 (%rel)	76.47 (%rel)	10.10 (%rel)
대조군(A3525)	10.83 (%rel)	4.50 (%rel)	22.81 (%rel)	52.86 (%rel)

(나) 미량영양성분

- 분석한 비타민 E는 통계적으로 유의차를 보이지 않았다.

(다) 내재성독소

- 콩에 대한 오랜 기간의 안전한 식경험에서 내재성 독소로 인하여 인간이나 동물의 건강에 부정적인 영향을 끼쳤다는 보고는 없었다.

(라) 영양억제인자 (항영양소)

- 분석한 영양억제인자(5개) 및 이소플라본류(3개)는 모두 통계적으로 유의차를 보이지 않았다.

(마) 알레르기유발성분

- MON87705의 단백질 추출물과 콩 알레르기 환자(13명)들의 혈청으로 시험(ELISA)한 결과, 일반 콩에 비해 알레르기성이 증가하지 않는 것으로 확인되었다.

(바) 삽입된 유전자의 대사산물

- *FAD2-1A/FATB1-A* dsRNA의 억제기작으로 인해 콩에서 지방산 생합성 경로에 관여하는 두 가지 효소(FAD 및 FATB)가 선택적으로 하향 조절되고, 특정 지방산 조성 변화가 나타났으나 영양성 및 독성에 문제가 없을 것으로 판단된다.

(사) 영양성

- Cobb×Cobb 500 육계(암수 각 50마리)를 이용하여 starter, grower/finisher 용 사료에 MON87705 대두박 및 대두유를 다음과 같이 배합하여, 21일령까지는 starter용 사료, 그 이후 42일령까지는 grower/finisher용 사료를 섭취시킨 결과, 폐사율·증체량·사료효율·도체 중량 등 모든 항목에서 특이적 영향은 관찰되지 않았다.

○ 육계 실험 사료 배합비

	대두박 (%)	대두유 (%)
Starter	33.09%	2.88%
Grower/Finisher	30.20%	3.33%

(6) 유전자산물이 대사경로에 미치는 영향 (숙주가 함유한 고유의 성분을 기질로 하여 반응할 가능성)

- MON87705에서 발견되는 CP4 EPSPS 단백질은 식물체에 존재하는 EPSPS 단백질과 구조적·기능적으로 유사하나, 글리포세이트에 대한 친화력이 식물 내재 EPSPS 단백질에 비해 훨씬 낮다. 결론적으로 도입된 CP4 EPSPS 단백질은 식물 내재 EPSPS 단백질을 대체함으로써 제초제 글리포세이트에 내성을 나타낸다.
- *FAD2-1A/FATB1-A* dsRNA 억제기작은 목적으로 하는 *FAD2-1* 및 *FATB1-A* 유전자 이외 60%의 서열 상동성을 나타내는 *FAD2-2* 및 *FATB2* 유전자에도 억제작용을 나타내는 것으로 확인되었으나, 40%의 서열 상동성을 나타내는 *FAD3A* 및 *FATA* 유전자에는 영향을 미치지 않는 것으로 확인되었다.

(7) 외국의 식품유통 승인 및 식용 등의 이용 현황

- 현재까지 미국(2011), 호주/뉴질랜드(2011)에서 식품으로 승인받은 바 있다.

6. 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.

7. 기타

- 「유전자변형생물체의 국가간 이동 등에 관한 법률」에 의하여 유전자재조합 콩 MON87705의 작물재배환경, 자연생태계, 해양생태계에 대한 환경위해성을 농촌진흥청, 국립환경과학원, 국립수산물과학원에서 심사 완료하였다.