

유전자변형 콩과 자연 콩의 알레르기 유발원 비교

박재현 · 정승태 · 김재희 · 김지영 · 노건웅* · 김동섭 · 김형수#
특수독성부 면역독성과, 국립독성연구소, 식품의약품안전청, *서울 알레르기 클리닉
(Received April 23, 2001; Revised May 23, 2001)

Comparison of Allergens in Genetically Modified Soybean with Conventional Soybean

Jae Hyun Park, Seung Tae Chung, Jae Hee Kim, Ji Young Kim,
Geun Woong Noh*, Dong Sup Kim and Hyung Soo Kim#

Department of Toxicology, National Institute of Toxicological Research,
Korea Food and Drug Administration, 5 Nokbun-Dong, Eunpyung-Ku, Seoul, 122-704, Korea
*Seoul Allergy Clinic, 547-4 Shinsa-Dong, Kangnam-Gu, Seoul 135-890, Korea

Abstract — Genetically modified organism (GMO) using recombinant DNA technique has been exponentially increased, however there are still arguments for the safety of GM foods. The objective of this research was to compare the allergens of GM soybean(Roundup Ready™) with conventional soybeans. Each soybean extracts were prepared as crude extracts, heated extracts, and as heated and simulated gastric fluid (SGF)-digested samples to characterize the stability of allergens to physicochemical treatment. Positive sera from 20 soybean-sensitive patients and control sera from 5 normal subjects were used to identify the endogenous allergens in soybeans. Specific-IgE binding activities to each soybean preparations were evaluated by ELISA and immunoblot technique. In ELISA result, IgE binding activities of positive sera to soy crude extracts generally showed two fold higher mean value than those of control sera, however there was no significant difference between GM soybean and natural soybean varieties. Extracted proteins from each of the soybean preparations were separated with SDS-PAGE. The band pattern of GM soybean was very similar to those of natural soybean varieties. Immunoblots for the different soybeans revealed no differences in IgE-binding protein patterns, moreover, disclosed five prominent IgE-binding bands (75, 70, 50, 44 and 34 kDa) in crude extracts, four (75, 70, 44 and 34 kDa) in heated preparations, one (50 kDa) in heated and SGF-digested preparations. These IgE binding bands were consistent with previously reported results on the soybean. These results indicate that GM soybean (Roundup Ready™) is no different from natural soybean in terms of its allergen.

Keywords □ Genetically modified (GM), GM soybean, SDS-PAGE, immunoblot, ELISA

유전자변형 농축산물은 유전자재조합기술을 활용하여 농축산물의 수확량을 증가시키거나 생산성을 향상시키기 위하여 등 여러가지 긍정적인 효과를 목적으로 생산되어 식품에 활용되고 있다. 유전자재조합식품이란 유전자재조합기술을 이용하여 재래의 품종에 병충해 내성, 제초제 내성 또는 내한성 등과 같은 유용한

성질을 가진 다른 생물의 유전자를 삽입하여 개량 생산된 농작물 그 자체 또는 이를 가공 처리한 것으로 정의할 수 있다.¹⁾ 그러나, 이러한 유전자재조합식품은 대다수 이를 소비하게 될 소비자들의 불안감과 더불어 최근에는 *Bacillus thuringiensis*(Bt) 유전자를 삽입한 유전자재조합작물의 나비 등에 대한 잠재적 독성 효과²⁾와 해충에 대한 저항성 증가 등이 보고³⁾되는 등, 환경 유해성 및 인체 안전성에 대하여 논란이 끊이지 않고 지속되고 있는 실정이다. 유전자재조합 식품의 인

본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 02-380-1797, 8 (팩스) 02-380-1799

체 안전성 평가에는 외형상의 특징과 영양성분의 변화, 독성성분의 증가, 항생제 내성 유전자의 장내 세균으로의 전달 등 여러 가지 요인⁴⁾이 고려되고 있으나, 이중 중요하게 논의되고 있는 것 중의 하나가 알레르기 유발 가능성이다. 식품의 알레르기에는 여러가지 형태의 면역학적인 반응이 매개되어 일어난다.⁵⁾ 식품의 알레르기 반응중에서 가장 일반적인 반응 형태가 알레르겐에 특정화 된 면역 글로블린 E(IgE) 항체의 매개로 야기되는 반응이다. 식품중에 단백질 외의 성분들은 합텐(hapten)으로 작용하지만 단백질은 알레르겐의 주요한 성분이다.⁶⁾ 유전자재조합식품의 경우에는 비의도적으로 일어나는 알레르기 유발성과 관련하여 야기될 가능성은 크게 두가지 형태로 볼 수 있다. 첫째는 유전자 삽입으로 숙주에 이미 존재하는 유전자 발현을 과도하게 활성화하거나 억제하여 특정 알레르겐 단백질의 생성량을 변화시키는 것이고, 둘째는 유전자 삽입으로 재래종과 비교해서 새로운 단백질을 생성하여 이의 알레르기 유발성에 관한 사항이다. 이렇듯, 유전자 도입으로 야기되는 알레르기 유발성의 변화뿐 아니라 새롭게 도입된 유전자 공여체 또는 숙주가 알레르기를 일으키는 것으로 이미 알려진 작물인 경우에는 이렇게 생산된 유전자재조합식품 역시 알레르기를 유발할 가능성이 높은 것으로 알려져 있는데,^{7,8)} 최근 Nordlee 등은 콩의 영양성분을 개선하기 위하여 Brazil nut에서 methionine-rich 2S albumin을 도입한 유전자재조합 콩의 경우 Brazil nut에 알레르기가 있는 사람에게 기존 콩에 비해 추가적인 알레르기를 유발할 수 있음을 보고 한 바 있다. 식품 알레르기는 일반적으로는 두드러기, 홍반, 설사(Gluten-sensitive enteropathy or celiac disease), 구토 등을 나타내나, 아나필락시스 쇼크를 유발¹⁰⁾이 심한 경우에는 생명을 위협하기도 하므로, 중요하게 고려되어야 할 안전성 평가 항목으로 주목받고 있다. 특히, 콩은 두부, 두유, 발효식품 등으로 폭넓게 사용되어 국내에서 소비가 많은 식품으로 본 연구에서 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase [EPSPS] 단백질이 삽입됨으로써 제초제 내성(glyphosate tolerant)을 나타내는¹¹⁾ 유전자재조합 콩(Roundup ReadyTM)의 알레르기 유발 가능성을 재래 콩과 비교하여 기존의 알레르기 유발성의 변화를 평가하고자, 임상시험결과(skin prick test, open food challenge test) 콩에 알레르기 반응을 나타낸 환자의 혈청을 이용하여 ELISA, SDS-PAGE 및 immunoblot을 실시하

였다. 한편, 열 및 인공위액을 처리에 따른 알레르기 유발성분의 물리화학적 특성을 평가하여 알레르겐의 열에 대한 안정성과 소화액에 대한 저항성을 비교 평가하였다.

실험방법

시약 및 재료

Acrylamide, bis-acrylamide, ammonium persulfate, TEMED, protein assay용 시약은 Bio-Rad사(Hercules, CA, U.S.A.)제품을, alkaline phosphatase-conjugated mouse anti-human IgE는 PharMingen(San Diego, CA, U.S.A.)에서 각각 구입하였으며, 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitro blue tetrazolium (BCIP/NBT) substrate, PNT tablet(p-Nitrophenyl Phosphate, Disodium), Pepsin 및 기타 그외 시약들은 Sigma Chem. Co.(St. Louis, U.S.A.)에서 구입하여 사용하였다. 또한 실험에 사용한 유전자재조합콩(Roundup ReadyTM)은 몬산토사에서, 국산콩 및 수입콩(Non-GMO)은 국내식품회사로부터 제공받아 사용하였으며, 각 콩은 식품의약품안전청 식품미생물과에서 유전자재조합여부를 확인 받아 시험에 사용하였다.

대상환자의 혈청

알레르기 임상진단법인 skin prick test 및 open food challenge test를 실시한 결과, 콩에 알레르기 양성반응이 관찰된 환자의 혈청(20명)을 서울알레르기 클리닉에서 제공받아 사용하였으며, 각 환자의 임상적 특징은 Table I에 요약하였다. 또한 각 혈청은 사용할 때까지 -70°C에 보관 후 사용하였으며, 대조군으로는 알레르기가 없는 정상인의 혈청(5명)을 사용하였다.

Crude extract 제조

Crude extract는 Helm등이 사용한 방법¹²⁾을 약간 변형하여 사용하였다. 우선 각 콩을 분쇄 후 n-hexan을 이용하여 3회 지방 성분을 추출하여 제거하고, 감압하에서 잔류하는 용매를 완전히 제거하였다. 단백질을 추출하기 위해서 탈지된 콩가루를 추출용매 PBS(phosphate buffered saline, 20 mM NaH₂PO₄, 1 mM NaCl, pH 7.2)를 5%(w/v) 비율로 넣고, 4°C에서 24

Table I - Clinical characteristics of soybean-allergic patients

Patients no.	Sex	Age at diagnosis	Symptoms	Other food allergies
1	F	20 years	AD, I, SL	No
2	M	14 years	AD, I, SL	No
3	F	15 years	AD, I, SL	Cow's milk, Chicken
4	F	15 years	AD, I, SL	No
5	F	5 years	AD, I, SL	No
6	M	2 years	AD, I, SL	Cow's milk
7	F	11 years	AD, I, SL	Cow's milk
8	F	3 years	AD, I, SL	Beef
9	M	1 years	AD, I, SL	Cow's milk, Egg yolk
10	M	18 years	AD, I, SL	Crab
11	M	31 years	AD	Pork, Mackerel
12	F	30 years	AD	Cow's milk
13	F	26 years	AD	No
14	F	25 years	AD, I	Mushroom
15	F	24 years	AD	Pork
16	F	28 years	AD, I	Cow's milk
17	M	28 years	AD, I, SL	No
18	M	14 years	AD	No
19	M	15 years	AD, I, SL	No
20	M	18 years	AD, I, SL, D	No

AD : atopic dermatitis, D : diarrhea, I : itching, SL : skin lesion

시간 교반하여 단백질이 잘 유출되도록 하였다. 그 후 4°C, 1000×g에서 10분간 원심분리하여 상등액을 취한 후, 다시 초원심분리기(Kontron Co., Switzerland)를 사용하여 4°C, 140,000×g에서 15분간 원심분리하여 상등액을 취한 후 사용할 때까지 -20°C에 보관하였다.

가열 및 인공위액의 처리

각 콩 성분 중 열 및 소화에 안정한 알레르기 유발원(allergen)을 동정하고, 그 특성을 확인하기 위하여 가열처리 및 가열 후 인공위액 처리를 각각 실시하였다. 가열처리를 위해서는 각 콩을 100°C에서 30분간 가열 후 분쇄하고, crude extract와 동일하게 단백질을 유출시켜 제조하였다. 또한 인공위액처리는 Astwood 등¹³⁾의 방법을 약간 변형하여, 가열처리(100°C, 30분)한 시료에 미리 37°C로 가온한 0.32%(w/v) 펩신을 함유한 인공위액(0.32%(w/v) pepsin in HCl soln, 0.03M NaCl, pH 1.2)을 2 mg/ml 농도로 처리하고, 37°C 항온조에서 교반하면서 일정 시간(10분, 30분) 반응시켰다. 그 후 상등액을 취하여 인공위액 200 µl당 160 mM Na₂CO₃ 용액을 75 µl 가하여 반응액을 중화하고, Amicon-YM2 filter system(Denver, MA, U.S.A.; M.W.C.O. <1 KD)을 사용하여 단백질을 농축하고 시

험에 사용할 때 까지 -20°C에 보관 하였다.

단백질 정량

Bradford법에 따라 표준물질인 bovine serum albumin과 처리한 시험물질을 Bio-Rad Protein assay 용 kit(Richmond, CA, U.S.A.)을 이용하여 반응시킨 후, ELISA reader(Molecular Devices Co., U.S.A.)를 이용하여 595 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다.

ELISA를 이용한 혈청 IgE 항체가 측정

유전자재조합 콩, 국산콩, 수입콩(Non-GMO)의 crude extract 각각을 50 mM carbonate buffer(pH 9.6)을 이용하여 5 µg/ml 단백질 농도로 희석하고, 평평한 96well plate(Costar Co., Cambridge, MA, U.S.A.)에 100 µl/well씩 가하여 37°C에서 2시간 동안 well을 부착도포하고, plate를 0.05% Tween 20 인산완충액(Phosphate buffered Saline, pH 7.4; washing buffer 및 dilution buffer)을 사용하여 각각의 혈청을 1:2 비율로 희석한 후 100 µl/well씩 가하고 실온에서 overnight 반응시킨 후 dilution buffer로 1:1000 비율로 희석한 alkaline phosphatase-conjugated mouse anti-human IgE를 100 µl/well씩 가하고 37°C에서 2

시간 반응시켰다. 매 단계마다 washing buffer를 사용하여 3회 세척하였으며, alkaline phosphatase 기질인 PNT(p-nitrophenyl phosphate tablet)를 사용하여 발색시킨 후, ELISA reader(Molecular Devices Co., Menlo Park, CA, U.S.A.)를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정 비교하였다. 모든 건강인과 알레르기 환자의 혈청은 3별로 하여 흡광도를 측정하여 그 평균값을 구하였으며, 알레르기 반응이 없는 정상인의 혈청과 인산원충액을 넣은 well의 평균값을 결과 분석의 대조군으로 활용하였다.

SDS-PAGE

유전자재조합 콩, 국산콩, 수입콩(Non-GMO)에 존재하는 단백질을 분리하고, 각 성분을 비교 확인하기 위하여 Laemmli 등¹⁴⁾이 사용한 방법에 따라 Mini Protein III 전기영동 system(Bio-rad Lab. Hercules, CA, U.S.A.)등 사용하여 SDS-PAGE를 실시하였다. 간단히 요약하면, 시험물질을 2×SDS sample buffer로 1:1로 희석하여 100°C에서 약 5분간 끓인 후, 6% stacking gel과 12% separating gel로 구성된 mini gel의 각 lane에 10 µg씩(단백질량) loading하고 100V로 전기영동을 실시한 후, Coomassie Brilliant Blue R-250, Silver stain kit(Bio-rad Lab. Hercules, CA, U.S.A.)로 염색하여 분리된 단백질 띠를 관찰하였다. 분자량의 확인을 위해서는 SDS-PAGE molecular weight standards(Bio-Rad Lab. Hercules, CA, U.S.A)를 함께 사용하였다.

Immunoblot

SDS-PAGE로 분리된 단백질은 Towbin 등¹⁵⁾이 사용한 방법에 따라 Transblot apparatus(Bio-rad Lab. Hercules, CA, U.S.A.)를 이용하여 polyvinylidene difluoride(PVDF)-membrane로 이행시킨 후, 이행된 전위막은 0.1% Tween 20을 함유한 PBS-T(41.5 mM PBS, pH 7.4)로 약 60분동안 실온에서 반응시켜 비특이적인 단백질 결합을 차단시키고, 1차 항체(Primary antibody)로서 콩 알레르기 환자의 혈청을 0.05% PBST(washing 및 dilution buffer)로 1:5로 희석하여 가한 후 실온에서 하룻밤 반응시켰다. PBS-T(0.05% Tween 20)로 5분간씩 3회 세척하고, dilution buffer로 1:1000으로 희석한 항체(secondary antibody; alkaline phosphatase-conjugated mouse anti-human

IgE)를 가하고 실온에서 2시간 반응시켰다. PBS-T(0.05% Tween 20)로 3회 세척한 후, 분리되어 반응하는 단백질 띠를 확인하기 위하여 기질로서 BCIP/NBT 용액을 증류수로 1:2로 희석하여 가하고 증류수로 세척, 건조 후 발색정도를 관찰하였다.

실험결과

각 콩의 혈중 특이 IgE 항체에 대한 반응성 측정

각각의 콩 단백질에 대한 알레르기 환자의 IgE 항체의 반응성을 측정·비교하고자 Open food challenge test 및 skin prick test등 임상시험에서 콩에 양성반응을 나타낸 환자(20명) 및 알레르기가 없는 정상인(5명)의 혈청을 이용하여 ELISA를 실시한 결과, 콩 알레르기 환자의 경우에는 유전자재조합 콩에는 평균 0.53, 국산콩에는 평균 0.52, 수입콩(Non-GMO)에는 평균 0.50정도의 흡광도치를 나타내었다. 각 콩에 대한 혈중 IgE 반응성에는 상호간 유의성 있는 차이를 관찰할 수 없었으며, 대조군으로 사용한 정상인의 혈중 IgE 수치 또한 유전자재조합 콩에서는 평균 0.18 ± 0.08 , 국산콩에서는 평균 0.18 ± 0.07 , 수입콩(Non-GMO)에는 평균 0.19 ± 0.07 정도로 나타나, 유전자재조합 콩과 일반 콩간의 IgE 항체에 대한 반응성의 차이를 관찰할 수는 없었다. 그러나, 정상인과 콩 알레르기 환자의 혈중 특이 IgE 항체 반응성을 비교한 결과 정상인의 경우에는 평균 0.18정도의 흡광도치를 나타낸 반면, 대부분의 콩 알레르기 환자의 특이 IgE는 0.2~1.2정도로 많은 편차를 보였지만, 평균 0.50정도의 흡광도치를 나타내어 정상인의 평균 IgE 수치에 비해 2배 이상의 IgE수치를 나타내었다. 특히 콩 알레르기 환자 20명중 11명인 55%가 음성반응 환자의 평균치에 2배 이상이었고, 이중 8명은 3배 이상의 수치를 나타내 등 대부분의 콩 알레르기 환자의 혈중 IgE는 높게 관찰되었고, 다만 2명만이 음성반응 환자의 평균치에 비해 낮은 혈중 IgE 농도를 나타내는 등 알레르기 환자의 경우는 비교적 높은 혈중 IgE 농도를 나타내었다(Fig. 1).

SDS-PAGE에 의한 콩 단백질 성분의 분리·비교

유전자재조합 콩, 국산 콩, 수입콩(Non-GMO) 추출물중 단백질 성분을 분리하기 위하여, 각 콩의 crude extract, 열처리한 것(30분), 가열처리 후 인공위액을

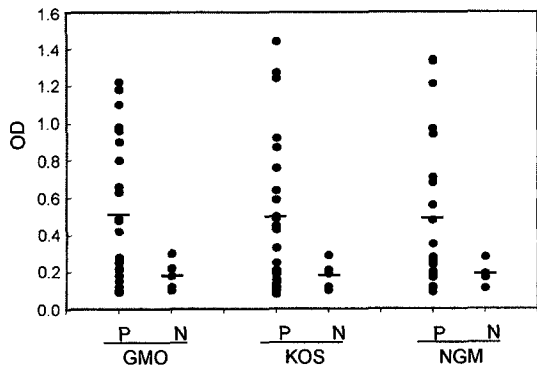


Fig. 1 - The absorbance distribution of specific IgE binding activities to 3 crude soybean protein extracts by ELISA. *GMO*, Genetically modified soybean. *KOS*, Korean natural soybean. *NGM*, Non-genetically modified soybean. *P*, soybean sensitive individuals (n=20) *N*, normal control subjects (n=5).

각각 10분, 30분 처리한 시료별로 SDS-PAGE를 실시한 후, Coomassie Brilliant Blue R-250 및 Silver stain kit로 각각 염색하여 분리된 단백질의 양상을 비교 관찰하였다. 그 결과 유전자재조합 콩, 국산 콩 및 수입콩(Non-GMO) 모두 crude extract의 경우에는 대략 21~97 kDa, 열처리 sample에서는 21~55 kDa의 성분이 주 단백질 성분임을 관찰 할 수 있었다. 또한 인공위액을 10분 처리한 경우에는 단백질 성분이 소화되어 대부분의 성분이 40 kDa이하에서 관찰되었으며, 인공위액을 30분 처리한 경우에는 대부분 25 kDa

이하의 성분이 주 단백질 성분임을 관찰할 수 있었다. 그러나, crude extract, 열처리. 가열 후 인공위액(10분, 30분)처리한 시료 모두에서 유전자재조합 콩, 국산 콩 및 수입콩(Non-GMO)간의 단백질 성분의 특별한 차이는 관찰되지 않았으며, 열 및 인공위액을 처리함에 따라, 원액에 비해 일부 단백질 성분이 불활성화되거나 분해되어 소실됨을 확인 할 수 있었다(Fig. 2).

IgE Immunoblot 에 의한 콩 알레르겐의 비교

유전자재조합 콩, 국산 콩 및 수입콩(Non-GMO)에 존재하는 알레르기 유발성분을 확인·동정하고, 각각의 콩 알레르겐을 비교·평가하기 위해서 SDS-PAGE에 의해 분리된 단백질을 PVDF membrane에 이행시키고, open food challenge test 및 skin prick test 등 임상시험에서 콩에 양성반응을 나타낸 환자(20명)의 혈청을 반응시킨 후, 콩 특이 IgE에 특이적으로 결합하는 2차 항체에 결합되어 있는 효소에 기질을 작용하여 발색시켜 분리된 단백질 성분을 확인하였으며, 대조군으로는 알레르기가 없는 정상인(5명)의 혈청을 사용하여 비교하였다. 그 결과 유전자재조합 콩, 국산 콩, 수입콩(Non-GMO) 모두에서 혈 중 IgE와 결합하는 단백질 성분은 환자에 따라 강한 반응성을 보이는 성분이 약간씩 차이가 있음을 확인할 수 있었으나, crude extract에서는 대략 75, 70, 50, 44, 34 kDa,의 성분에서 강한 반응성을 관찰 할 수 있었다. 그 중 분자

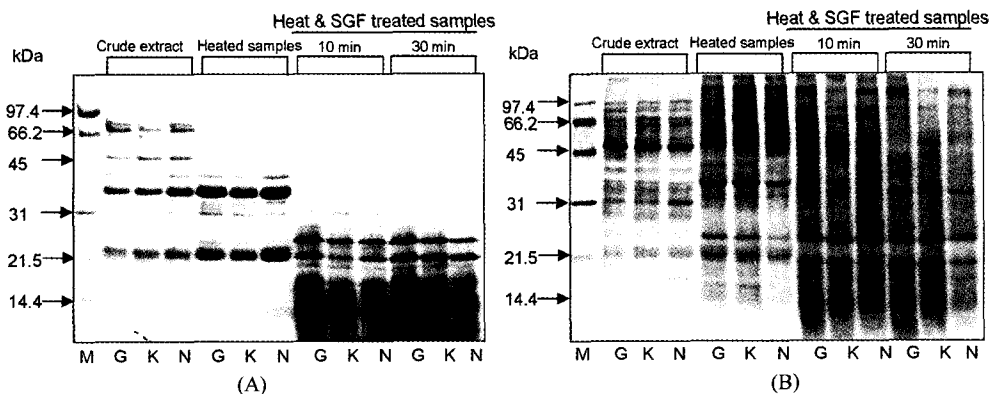


Fig. 2 - Coomassie blue R(A) and silver(B) stained 12% SDS-PAGE gels of 4 extracts of 3 kinds of soybeans prepared in the laboratory. Molecular weight markers are indicated on the left-hand side of the gels. Four extract groups were composed of crude extract (lane2~4), heated sample prepared by heating for 30 min (lane5~7), and both of heat-digest groups prepared by heating for 30 min and incubated in SGF for 10 min (lane8~10) or 30 min (lane11~13). About 10 µg of protein from each extract was applied per lane. Tentative identification of some bands is based on mobilities. *G*, Genetically modified soybean. *K*, Korean natural soybean. *N*, Non-genetically modified soybean. *M*, Marker, SGF, Simulated Gastric Fluid.

Table II – Results of common allergic polypeptides detected by SDS-PAGE immunoblot of each soybean extracts

Molecular weight in kDa	Positive responses (n=20)		
	Crude extracts N (%)	Heated samples N (%)	Heat & SGF treated (10 min) samples N (%)
118	3/20 (20)	1/20 (5)	-
110	-	2/20 (10)	1/20 (5)
85	3/20 (15)	3/20 (15)	3/20 (15)
75	6/20 (30)	5/20 (25)	5/20 (25)
70	6/20 (30)	7/20 (35)	1/20 (5)
54-56	5/20 (25)	7/20 (35)	3/20 (15)
50	7/20 (35)	2/20 (10)	8/20 (40)
49	12/20 (60)	4/20 (20)	1/20 (5)
44	8/20 (40)	11/20 (55)	1/20 (5)
34	15/20 (75)	5/20 (25)	-
30	6/20 (30)	-	-
24-26	6/20 (30)	8/20 (40)	-

량 34 kDa 성분은 75%(15/20명), 50 kDa의 성분은 60%(12/20명), 44 kDa의 성분은 40%(8/20명)에서, 75, 70 kDa의 성분은 30%(6/20명)에서, 각각 관찰되어 주 알레르기 유발성분으로 생각되었다. 또한 일반적으로 알레르겐으로 작용하는 단백질은 열과 산에서도 안정한 것으로 알려져 있는바 가열처리 또는 가열 및 인공위액처리 군에도 혈중 IgE와 결합하는 항원 단백질 성분을 비교 관찰하였다. 그 결과 열처리 시료에서는

crude extract와 비교하여 다소 반응성이 약하지만, 75, 70, 50, 44 kDa의 성분을 일부 환자에게서 관찰할 수 있었으며, 특히 44 kDa성분은 55%(11/20명)에서 관찰되어, 비교적 열에 안정한 성분으로 생각되었다. 한편 가열처리 및 인공위액을 처리한 경우에는(10분, 30분)에서는 대부분의 단백질이 분해되어 몇몇 환자에게만 관찰되었으나, 50 kDa의 성분은 콩 알레르기 환자 40%(8/20명)에서 관찰되어 비교적 열 및 소화효소에도 안정한 알레르기 유발성분으로 생각되었으며, 인공위액처리 시간에 따른 유의적인 변화는 관찰되지 않았으며, 국산콩, 수입콩(Non-GMO)과 비교하여, 유전자재조합 콩에만 나타나는 특이적인 알레르기 유발성분은 관찰할 수 없었다. 또한 이상의 결과로 보아, 대략 75, 70, 50, 44, 34 kDa,의 성분이 우리나라 환자에게서 주 알레르기유발 성분임을 알 수 있었으며, 이는 기존의 콩 알레르겐으로 보고된 성분과 일치하는 결과임을 알 수 있었다(Table II & Fig. 3).

고 찰

유전자변형 농산물의 개발 증가로 유전자재조합식품도 급증하고 있으나, 그 안전성에 관해서는 아직까지 논란의 대상이 되고있어 EU, 일본 등 각국에서는 이러한 유전자재조합식품을 규제하기 위한 지침을 마련하는 한편, 이를 뒷받침하기 위한 활발한 연구가 진행중이며, 특히 알레르기 유발성이 안전성 평가의 주요

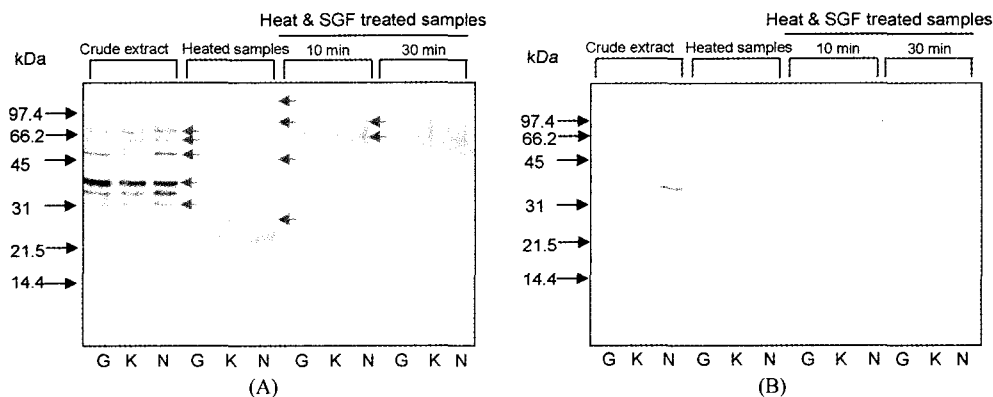


Fig. 3 – IgE binding to soybean fractions isolated on 12 SDS-PAGE western immunoblots with sera of soybean-allergic patient (A) and normal control (B). Four extracts of 3 kinds of soybeans prepared in the laboratory. Four extract groups were composed of crude extract (lane24), heated sample prepared by heating for 30 min (lane57), and both of heat-digest groups prepared by heating for 10 min and incubated in SGF for 10 min (lane810) or 30 min (lane1113). About 10 of protein from each extract was applied per lane. G, Genetically modified soybean. K, Korean natural soybean. N, Non-genetically modified soybean. M, Marker, SGF, Simulated Gastric Fluid

관심분야로 주목받고 있다.¹⁶⁾ 알레르기 유발성 평가를 위해서는 자국민에게 알레르기를 유발하는 식품 및 특정 성분에 대한 모니터링 및 database 구축, 혈청은행 (serum bank) 설립을 위한 작업이 활발히 진행 중인 상황이다. 특히 식품 알레르기에 관한 연구는 각 나라마다 고유의 식이 문화에 따라 그 지역에서의 특정식품에 대한 알레르기에 따라 주된 관심분야가 달라지는 경우가 대부분이며,¹⁷⁾ 인종간 또는 개인간에도 큰 차이를 나타내므로, 나름대로 자체적인 연구가 필요한 분야라 할 수 있겠다. 따라서 본 연구에서는 일차적으로 국내에서 여러 가지 가공식품으로 소비도가 높은 유전자재조합 콩(Roundup Ready™)을 대상으로 crude extract, 열처리, 열 및 인공위액을 처리한 후, SDS-PAGE 및 콩 알레르기 환자의 혈액을 이용한 immunoblot, ELISA를 실시하여, 재래 콩과 비교 평가함으로써, 유전자재조합에 따른 알레르겐의 양적인 변화 등 그 알레르기 유발성을 비교·평가하고자 하였다.

유전자재조합 콩 및 일반 콩에 대한 알레르기 환자의 IgE 항체의 혈중농도를 측정하고 비교하고자 콩 알레르기 환자의 혈청 및 정상인의 혈청을 이용하여 각각의 콩 crude extract를 항원으로 하여 ELISA를 실시하였다. 그 결과, 알레르기 환자 및 정상인 모두의 경우에서 유전자재조합 콩 과 일반 콩 사이에서 IgE 항체의 반응성에는 유의성 있는 차이를 관찰 할 수 없었으나, 정상인의 경우에는 평균 0.18정도의 흡광도치를 나타낸 반면, 콩 알레르기 환자의 경우에는 평균 0.50정도의 흡광도치를 나타내어 정상인에 비해 2배 이상의 높은 IgE 혈중농도를 나타낸 것으로 보아 대부분의 콩 알레르기 환자는 IgE 항체에 의해 매개된 제 1형 과민반응환자로 생각되었으나, 콩 알레르기 환자의 특이 IgE는 0.2~1.2정도로 큰 편차를 보여, 향후 IgG 등 다른 항체에 대한 반응성 평가 등이 추가로 연구되어야 할 것으로 생각되었다.

Crude extract, 열처리, 열 및 인공위액을 처리한 sample을 SDS-PAGE를 실시하여 유전자재조합 콩, 국산 콩 및 수입 콩(Non-GMO) 모두 crude extract의 경우는 대략 21~97 kDa, 열처리 sample에서는 21~55 kDa의 성분이 주요 단백질 성분임을 관찰 할 수 있었으며, 열 및 인공위액을 처리한 경우(10분, 30분)에는 소화되어 대부분의 성분이 40 kDa이하에서 관찰되어, 열 및 인공위액을 처리함에 따라, 원액에 비해 일부 단백질 성분이 불활성화되거나 분해되어 소실됨

을 확인 할 수 있었으며, silver stain 한 결과 가열 처리 또는 인공위액처리에도 분해되지 않은 단백질 성분이 일부 존재하며, 이는 대부분 glycoprotein으로 사려된다. 그러나 유전자재조합 콩, 국산 콩 및 수입 콩(Non-GMO)간의 단백질 성분의 특별한 차이는 관찰할 수 없었다. 한편, 본 실험에 사용한 유전자재조합 콩(Roundup Ready™)은 단백질 생합성에 필요한 방향족 아미노산을 합성하는 효소인 5-Enolpyruvylshikimate-3-phosphatase synthase(EPSPS)가 재래 콩에 비해 높게 발현되기 때문에 이 효소를 차단하는 제초제인 glyphosate에 내성을 가지는 것으로 알려져 있다.¹¹⁾ 특히, 삽입 유전자인 CP4 EPSPS는 *Agrobacterium* sp. strain CP4로부터 유래한 것으로 그 분자량이 47.6 kDa인 것으로 Harrison 등¹⁸⁾이 보고하였으나, 본 실험 중 SDS-PAGE결과 CP4 EPSPS로 생각되는 단백질 성분은 관찰 할 수 없었는데, 이는 삽입된 CP4 EPSPS단백질이 최대 전체 단백질 함유량의 0.1%정도로 전체적으로는 매우 낮은 함량¹⁹⁾을 차지하는 것에 기인한 결과로 생각된다.

또한, 혈청 중 IgE와 특이적으로 결합하여 알레르겐으로 작용하는 단백질을 확인하고자 immunoblot을 실시한 결과, crude extract에서는 대략 75, 70, 50, 44, 34 kDa, 열처리한 경우에는 75, 70, 50, 44 kDa, 열처리 및 인공위액을 처리한 경우에는 50 kDa의 성분이 주 알레르기 유발성분으로 관찰되었으며, 가열 및 인공위액을 처리함에 따라 대부분의 성분은 원액에 비해 그 반응성이 낮아짐을 관찰 할 수 있었으나, 그 중 특히 대략 50 kDa의 성분은 가열 및 인공위액 처리 후에도 콩 알레르기 환자의 40%(8/20명)에게서 관찰되어, 비교적 열 및 소화효소에도 안정한 성분으로 사료되었으나, 국산 콩, 수입 콩(Non-GMO)과 비교하여, 유전자재조합 콩에만 나타나는 특이적인 알레르기 유발성분은 관찰할 수 없었다. 한편, immunoblot 결과 각 개인마다 알레르기 유발 주성분이 조금씩 다르게 나타났으나, 대부분의 환자에서 공통적으로 관찰되는 혈청 중 IgE와 결합하는 주요성분으로 생각되는 대략 그 분자량이 75, 70, 50 kDa의 성분은 기존의 콩 알레르겐 중 β -conglycinin으로, 대략 44 kDa의 성분은 glycinin의 acidic polypeptide의 일부분²⁰⁾으로 생각되었으며, 대략 34 kDa의 성분은 P34/Gly m1으로¹²⁾ 생각되었다. 비교적 소수의 환자에게서 관찰된 성분 중 대략 30 kDa의 성분은 Gly m1²¹⁾으로, 24~26 kD의

성분은 glycinin의 basic polypeptide 또는 trypsin inhibitor의 일부로 생각되었으나, 명확한 규명을 위해서는 추가연구가 필요할 것으로 사려되며, 85, 110, 118 kDa의 성분에 대해서도 아직까지 그 구체적 성분이 명확히 알려져 있지 않아 그 성분 규명에 대한 추가적인 연구가 필요한 것으로 사료되었다. 이상의 연구결과를 통해 유전자재조합 콩은 국산 콩등 재래콩과 비교할 때 알레르기 유발성 측면에서 별다른 차이를 나타내지는 않는 것으로 사료되었으나, 향후 식품알레르기 반응에 관여하는 다른 항체(IgG, IgA)나, cytokine의 역할 등에 대한 연구 또한 추가되어야 할 것으로 생각된다. 식품 알레르기는 인종간, 개인간, 식생활 습관, 지리적 특성에 따라 많은 차이가 있고 나라마다 알레르기 유발 식품도 다르기 때문에 외국의 연구결과를 그대로 우리나라에 적용하기 어려운 바 우리나라 사람을 대상으로 한 식품 알레르기에 관한 연구가 꾸준히 진행되어야 될 것으로 생각된다.

결 론

유전자재조합 콩(Roundup Ready™)을 대상으로 crude extract, 열처리, 열 및 인공위액을 처리한 후, SDS-PAGE 및 콩 알레르기 환자의 혈액을 이용한 immunoblot, ELISA를 실시 함으로서, 그 알레르기 유발성을 재래 콩과 비교 평가하고자 하였다.

1. 각 콩의 crude extract에 대한 IgE 반응성을 ELISA로 측정할 결과 유전자재조합 콩, 국산콩, 수입콩(Non-GMO)간의 유의성 있는 차이는 관찰할 수 없었으나, 대부분 콩 알레르기 환자 20명중 11명인 55%가 음성반응 환자의 평균치에 2배 이상 수치를 나타내는 등 대부분의 환자가 비교적 높은 혈중 IgE 수치를 나타내었다.

2. SDS-PAGE 결과, 각 콩의 crude extract의 경우 21~97 kDa의 성분이 주 단백질 성분임을 관찰할 수 있었으며, 가열 또는 인공위액처리에 의해 단백질이 분해됨을 확인할 수 있었으나, 유전자재조합 콩에만 나타나는 특이적인 단백질 성분이나 기존 단백질의 발현에 미치는 영향은 관찰할 수 없었다.

3. Immunoblot 결과 기존의 콩 알레르겐과 일치하는 결과인 crude extract에서는 대략 75, 70, 50, 44, 34 kDa, 열처리한 경우에는 75, 70, 50, 44 kDa, 열처리 및 인공위액을 처리한 경우에는 50 kDa의 단백

질 성분을 주요 알레르기 유발성분으로 관찰할 수 있었으나, 국산 콩, 수입 콩과 비교하여, 유전자재조합 콩에만 나타나는 특이적인 알레르기 유발성분은 관찰할 수 없었다.

이상의 연구결과 유전자재조합 콩은 기존 콩과 비교하여 알레르기 유발성에 별다른 차이를 나타내지 않았으며, 우리나라 콩 알레르기 환자에게 알레르기를 유발하는 주요 성분은 70, 50, 44, 34 kDa의 성분으로 사려된다.

감사의 말씀

본 연구는 식품의약품안전청의 2000년도 유전자재조합식품안전관리사업의 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

문 헌

- 1) Miraglia, M., Onori, R., Brera, C. and Cava, E. : Safety assessment of genetically modified food products: an evaluation of developed approaches and methodologies. *Microchemical Journal*, **59**, 154 (1998).
- 2) Losey, J. E., Rayor, L. S. and Carter, M. E. : Transgenic pollen harms monarch larvae. *Nature*, **399**, 214 (1999).
- 3) Roush, R. T. and Shelton, A. M. : Assessing the odds: the emergence of resistance to Bt transgenic plants. *Nat. Biotechnol.*, **15**(9), 816 (1997).
- 4) Novak, W. K. and Haslberger, A. G. : Substantial equivalence of antinutrients and inherent plant toxins in genetically modified novel food. *Food and Chem. Toxicol.*, **38**, 473 (2000).
- 5) Sampson H. A. and Furks A. W. : Mechanism of food allergy. *Annual Review of Nutrition* **16**, 161 (1996).
- 6) Buckley, R. H. and Metcalf, D. : Food Allergy. *JAMA*, **248**(20), 2627 (1982).
- 7) Lehrer, S. B. and Reese, G. : Recombinant Proteins in newly developed foods : Identification of allergenic activity. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **113**, 122 (1997).
- 8) Bindslev-Jensen, C. : Allergy risks of genetically engineered foods. *Allergy*, **45**, 58 (1998).
- 9) Nordlee, J. A., Taylor, S. L., Townsend, J. A., Thomas, L. A. and Bush, R. K. : Identification of a brazil-nut

- allergen in transgenic soybeans. *N. Engl. J. Med.*, **334**, 688 (1996).
- 10) Yunginger, J. W., Sweeney, K. G. and Sturner, W. Q. : Fatal food-induced anaphylaxis. *JAMA*, **260**, 1450 (1988).
 - 11) Steinrucken, H. C. and Amrhein, N.: The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvyl shikimic acid-3-phosphoate synthase. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **94**, 1207 (1980).
 - 12) Helm, R. M., Cockrell, G., Herman, E., Burcks, A. W., Sampson H. A. and Bannon, G. A. : Cellular and Molecular characterization of a major soybean allergen. *Int. Arch. Allergy. Immunol.*, **117**, 29 (1998).
 - 13) Astwood, J. D., Leach, J. N. and Fuchs, R. L. : Stability of food allergens to digestion in vitro. *Nature Biotech.*, **14**, 1269 (1996).
 - 14) Laemmli, U. K. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680 (1970).
 - 15) Towbin, H. T., Staehelin, T. and Gordon, J. : Electrophoretic transfers of proteins fro polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **76**, 4350 (1979).
 - 16) Metcalfe, D. D., Astwood, J. D., Townsend, R., Sampson, H. A., Taylor, S. L. and Fuchs, R. L. : Assessment of the allergenic potential of foods derived form genetically engineered crop plants. *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.*, **36**(S), S165 (1996).
 - 17) Samuel B. Lehrer, W. Elliott, H. and Gerald, R. : Why are some proteins allergenic? Implications for biotechnology. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **36**(6), 553 (1996).
 - 18) Harrison, L. A., Bailey, M. R., Naylor, M. W., Reamn J. E., Hammond, B. G., Nida, D. L., Burnette, B. L., Nickson, T. E., Mitsky, T. A., Taylor, M. L., Fuch, R. L. and padgeete, S. R. : The expressed protein in glyphosate-tolerant soybean, 5-Enolpyruvylshikimat-e-3-phosphoate synthase from *Agrobacterium* sp. strain CP4, is rapidly digested in vitro and is not toxic to acutely gavaged mice. *J. Nutr.*, **126**, 728 (1996).
 - 19) Padgette, S. R., Kolacz, K. H., Delannay, X., Re, D. B., LaVallee, B. J., Tinius, C. N., Rhodees, W. K., Otero, Y. I., Barry, G. F., Eichholtz, D. A., Peschke, V. M., Nida, D. L., Taylor, N. B. and Kishore, G. M. : Development, identification, and characterization of a glyphosate-tolerant soybean line. *Crop. Sci.*, **35**, 1451 (1995).
 - 20) Burks, A. W., Brooks, J. R. and Sampson H. A. : Allergenicity of major component proteins of soybean determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and immunoblotting in children with atopic dermatitis and positive soy challenges. *J. Allergy clin. Immunol.*, **81**, 1135 (1988).
 - 21) Ogawa T, Bando, N., Tsuji, H., OKajima, H., Nishikawa, K. and Sasoka, K. : Investigation of the IgE binding proteins in soybeans by immunoblotting with the sera of soybean-sensitive patients with atopic dermatitis. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)*, **37**, 555 (1991).