

제초제저항성 GM 잔디에서 발현된 PAT 단백질의 알레르겐 유발 가능성 및 독성 평가

정혜린 · 선현진 · 강지남 · 강홍규 · 이효연

Allergenicity and toxicity evaluation of the PAT protein expressed in herbicide-tolerant genetically modified *Zoysia japonica*

Hye-Rin Jeong · Hyeon-Jin Sun · Ji-Nam Kang · Hong-Gyu Kang · Hyo-Yeon Lee

Received: 2 December 2020 / Revised: 7 December 2020 / Accepted: 7 December 2020

© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract This study aimed to evaluate the potential allergenicity and oral toxicity of the phosphinothricin acetyltransferase (PAT) protein expressed in *Zoysia japonica*, a herbicide-tolerant genetically modified (GM) zoysiagrass. *In silico* analysis of PAT showed no similarities with any known allergenic or toxic proteins, with <35% amino acid sequence homology with known allergens across a length of 80 amino acids and no continuous eight amino acid identity with known allergens. The PAT protein expressed in *Z. japonica* degraded very rapidly in the simulated gastric fluid in the presence of pepsin, and, no glycosylation of PAT was observed. The oral toxicity test revealed no mortality or toxic effect in mice following PAT administration at 4,000 mg/kg body weight. Our findings indicate that the PAT protein expressed in *Zoysia japonica* does not exhibit allergenic or toxic properties.

Keywords Acute oral toxicity, Allergenicity, PAT, Herbicide-tolerant GM zoysiagrass

서 언

유전자변형(Genetically Modified, GM) 작물은 2017년 현재 전 세계 24개국에서 약 1억 9천만 헥타르에 이르는 면적에서 재배되고 있다. 세계 GM 작물의 재배 면적은 지속적으로 증가하여 상업 재배가 시작된 1996년의 재배면적인 170만 헥타르에 비해 약 112배까지 증가하였다. GM 작물은 4대 작물인 옥수수, 대두, 면화, 유채를 포함하여 알팔파, 사탕무, 파파야, 가지, 감자 등 더욱 다양한 작물들이 상용화되고 있으며, 2017년 현재 총 26개 작물 476개의 GM 이벤트를 대상으로 67개 국가에서 재배 또는 식품/사료 용도로 GM 작물이 채택되고 있다(Cho et al. 2020; ISAAA Brief 53. 2018). 국내의 경우에는 2020년 현재까지 GM 작물이 상업용으로 재배된 적이 없을 뿐만 아니라 국내에서 재배가 승인된 GM 작물도 없는 실정이다. 국내에서도 벼, 콩, 배추, 고추, 국화, 잔디 등의 작물에서 상용화를 목적으로 한 다수의 GM 작물이 개발되고 있지만 GM 작물에 대한 국내 시민사회의 부정적 인식과 상용화에 필요한 안전성평가에 대한 어려움 등으로 인해 실제 상용화가 추진되고 있는 GM 작물은 극히 적다. 2020년 현재 제주대학교에서 개발된 제초제저항성 GM 들잔디가 국내 개발 GM 작물 중 유일하게 재배 승인을 위한 안전성심사가 진행되고 있다. 제주대학교에서는 잔디의 관리에서 가장 많은 비용이 소요되는 잡초관리를 용이하게 하기 위한 목적으로 *Streptomyces hygroscopicus* 유래의 *bar* 유전자(Thompson et al. 1987)를 도입한 제초제저항성 GM 들잔디(JG21) 이벤트가 개발되었고(Toyama et al. 2003), ‘유전자변형생물체의 국

H.-R. Jeong
제주대학교 생명공학과
(Department of Biotechnology, Jeju National University, Jeju, 63243, Korea)

H.-J. Sun (✉) · J.-N. Kang · H.-G. Kang
제주대학교 아열대원예산업연구소
(Subtropical Horticulture Research Institute, Jeju National University, Jeju 63243, Korea)
e-mail: sunhj89@jejunu.ac.kr

H.-Y. Lee (✉)
제주대학교 생명공학부
(Department of Molecular Biotechnology, College of Applied Life Sciences, Jeju National University, Jeju 63243, Korea)
e-mail: hyoyeon@jejunu.ac.kr

기간 이동 등에 관한 법률’ 즉 ‘LMO 통합고시’ ‘별표 10-1’에 따라 재배 승인을 위한 각종 환경위해성평가가 수행되었다 (Bae et al. 2008; Kang et al. 2009; Lee et al. 2015a; Lee et al. 2015b; Sun et al. 2010). 제초제저항성 GM 들잔디 이벤트 (JG21)는 유전자이동성평가를 통해 화분비산에 의한 비의 도적 환경방출 가능성이 낮음이 확인되었으나 여러 전문가 들의 화분에 의한 환경방출 가능성에 대한 지적에 따라 화분 비산에 의한 유전자이동 가능성이 차단된 무추대 제초제저항성 GM 들잔디(JG21-MS1) 이벤트가 개발되었다(Bae et al. 2009; Kang et al. 2019). 무추대 제초제저항성 GM 들잔디 이벤트(JG21-MS1)는 현재 재배 승인 심사를 통한 상용화가 추진되고 있으며, 각종 안전성평가 연구도 지속적으로 수행되고 있다.

본 연구에서는 *S. hygroscopicus* 유래의 *bar* 유전자가 도입된 무추대 제초제저항성 GM 들잔디(JG21-MS1) 이벤트의 재배 승인을 위한 안전성평가로 GM 들잔디의 주요 영양 성분을 모품종(non-GM)과 비교하여 분석하였고, GM 들잔디에서 발현된 PAT 단백질의 잠재적 알레르기성 및 독성 평가 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

식물재료

본 연구에서는 *S. hygroscopicus* 유래의 *bar* 유전자(Thompson et al. 1987)가 도입된 제초제저항성 GM 잔디(Toyama et al. 2003)에 감마선(^{60}Co)을 조사하여 육성한 GM 들잔디 이벤트 JG21-MS1 (Bae et al. 2009)과 대조구 식물로서 JG21-MS1의 모품종 들잔디(*Zoysia japonica* Steud.)를 사용하였다.

일반성분 분석

일반성분 분석을 위한 잔디 시료는 LMO환경위해성평가기관으로 지정된 제주대학교 및 서귀포시 남원 LMO격리포장에서 재배하여 사용하였다. 일반성분 분석을 위한 시료는 제주대학교 및 남원의 격리포장에서 재배되고 있는 잔디의 지상부를 대상으로 7~9월 사이에 채취하였고, 채취한 잔디는 액체질소를 이용하여 분말화한 다음 동결건조하여 분석용 시료로 사용하였다. 일반성분 분석은 제주대학교 생명과학기술혁신센터에 의뢰하여 식품공전의 일반시험법에 따라 분석하였다.

아미노산 분석

아미노산 분석을 위한 잔디 시료는 일반성분 분석에 사용한 시료와 동일한 방법으로 준비하였고 아미노산 분석은 한국

기초과학지원연구원에 의뢰하여 분석하였다. 잔디 분말 약 0.3 g을 6 N HCl로 직접 가수분해하고 가수분해된 아미노산을 PITC (phenylisothiocyanate)로 유도체화한 다음 아미노산 분석기를 이용하여 분석하였다. 칼럼은 Nova-Pak C₁₈ (3.9×300 mm, Waters Co., Milford, MA, USA)을 사용하였다(Lee et al. 2013).

아미노산 서열 상동성 검색

제초제저항성 GM 들잔디에서 발현된 PAT (phosphinothricin acetyltransferase) 단백질의 아미노산 서열과 기존 알레르겐과의 아미노산 서열 상동성 분석은 AllergenOnline (<http://www.allergenonline.org>) 프로그램을 이용하여 수행하였다. Codex 지침(2009)과 FAO/WHO (2001)에서 권장하고 있는 방법에 따라 80개 단위의 아미노산 단편이 35% 이상 상동성을 가질 경우와 8개의 연속된 아미노산 서열이 완전히 일치하는 알레르겐의 존재유무를 검색하였다. 또한 NCBI의 BLAST 검색을 통하여 제초제저항성 GM 들잔디에서 발현된 PAT 단백질의 기존 독소와의 상동성 여부를 분석하였다.

PAT 단백질 정제

PAT 단백질의 인공위액에서의 안정성 평가 및 급성 경구투여 독성시험 연구를 수행하기 위해 대장균에서 PAT 단백질의 발현을 유도하고 대량으로 정제하였다. 제초제저항성 유전자인 *bar* 유전자가 도입되어 있는 형질전환 들잔디(JG21-MS1)에서 genomic DNA를 분리하고 이를 주형으로 PCR을 수행하여 *bar* 유전자를 클로닝한 다음 pET-30a(+) 벡터에 도입하였다. *Bar* 유전자를 도입한 발현 벡터는 *E. coli* BL21 (DE3)에 형질전환하고, kanamycin이 100 mg/L로 첨가된 LB 고체배지에 도말하여 형질전환된 콜로니를 선발한 다음 PAT 단백질의 발현 및 정제에 이용하였다. PAT 단백질의 발현은 IPTG를 최종농도가 1mM이 되도록 첨가하여 유도하였고, PAT 단백질은 Ni-Sepharose 6 Fast Flow (GE Healthcare Life Sciences) 칼럼을 이용하여 제조사의 메뉴얼에 따라 정제하였다. 정제된 PAT 단백질은 PBS buffer로 투석한 다음 항체 제작, 인공위액에서의 안정성평가 및 급성 경구투여 독성시험 연구에 사용하였다.

PAT 단백질의 인공위액에서의 안정성평가

대장균에서 정제한 PAT 단백질을 펩신을 첨가하지 않은 인공위액(0.084M HCl, 35mM NaCl, pH 1.2)과 펩신을 첨가한 인공위액(0.084M HCl, 35mM NaCl, 0.32% pepsin, pH 1.2)에 각각 처리하고 시간경과에 따른 PAT 단백질의 안정성을 SDS-PAGE를 통하여 분석하였다. 정제한 PAT 단백질 각 300 μL (PAT 단백질의 농도, 1 mg/mL)에 37°C에서 약 5분간 전배양

한 펩신을 첨가하지 않은 인공위액과 펩신을 첨가한 인공위액을 각각 300 μL 씩 첨가하여 37°C에서 60분간 반응시켰다. 각 반응액에서의 샘플은 0, 0.5, 1, 5, 10, 60분에 각각 50 μL 씩 채취하여 반응정지액[0.12 M Tris-HCl, 20% glycerol, 5% β -mercaptoethanol, 4% SDS, 0.04% bromophenol blue (pH 6.8) and 0.09 M NaOH] 50 μL 를 미리 넣어 둔 1.5 mL 튜브에 넣어 잘 혼합한 후 95°C에서 5분간 반응시킨 다음 각각 20 μL 씩을 SDS-PAGE 분석에 사용하였다. SDS-PAGE에 의해 분리된 단백질들은 CBB로 염색한 다음, 7.5% 아세트산 용액으로 탈색하여 PAT 단백질의 인공위액에서의 안정성을 평가하였다.

PAT 단백질의 glycosylation 여부 평가

JG21-MS1 잔디에서 발현된 PAT 단백질이 당화(glycosylation) 되지 않았음을 실험적으로 증명하기 위해, JG21-MS1 잔디에서 PAT 단백질을 정제하여 당단백 염색 실험을 수행하였다. 먼저 GM 잔디에서 PAT 단백질을 정제하기 위해 항체 및 항체칼럼을 제작하였다. PAT 항체(Rabbit polyclonal antibody)는 대장균에서 정제한 PAT 단백질을 항원으로 (주)영인프린터에 의뢰하여 제작하였고, 정제한 rabbit anti-PAT 항체를 이용하여 항체칼럼을 제작하였다. 항체칼럼은 Pierce사의 Kit (Pierce, product number 44894)를 이용하여 제조사의 매뉴얼에 따라 제작하였고, 이 항체칼럼을 사용하여 GM 잔디로부터 PAT 단백질을 정제하였다. 정제한 PAT 단백질의 생성 후 변이 여부(glycosylation)는 Glycoprotein Staining Kit (Pierce)를 사용하여 제조사의 매뉴얼에 따라 분석하였다.

단회 경구투여 독성실험 시험물질의 제조

단회 경구투여 독성실험은 대구경북첨단의료산업진흥재단 실험동물센터에 의뢰하여 수행하였다. 본 실험은 ‘의약품등의 독성시험기준’ 식품의약품안전처 고시 제 2015-82호에 근거하여 실시하였다. 또한 본 실험은 동물보호법에 근거한 대구경북첨단의료산업진흥재단 실험동물센터 동물윤리위원회(IACUC)에 의해 승인되었다(승인번호: DGMIF-17092102-00).

경구투여 실험의 부형제로는 PBS 버퍼가 사용되었으며 정제된 PAT 단백질은 투여 하루 전 무게를 측정하여 투여용량에 맞게 부형제에 3시간 용해시킨 후 3시간 방치하며 침전 여부를 확인하였고 투여시작 전까지 2~8°C에 냉장 보관한 뒤 투여직전 상온에서 차광한 상태로 보관하였다

실험동물

실험동물로는 6주령 ICR 마우스를 암수 각각 25마리를 입수하여 7일간 순화기간을 가졌으며, 순화기간 종료일에 체중

을 측정하고 일반증상을 관찰하였다. 마우스는 입수 후 IVC 케이지(391W×199D×130H mm)에 케이지당 5-6마리씩 수용하였고, 실험기간에는 케이지당 5마리로 분류하여 시험을 실시하였다. 사육실의 온도는 23 ± 3°C로 유지하였고 상대습도는 55 ± 10%, 환기횟수는 10 ~ 20회/시간, 명암주기는 12시간/일(07:00 ~ 19:00), 조도는 150 ~ 300 lux로 유지하였다. 마우스 사료는 (주)우정BSC로부터 공급받아 모니터링 정보를 확인하고 급이기에 고품사료를 넣어 자유 섭취시켰다. 음수의 경우 대구광역시 상수도물 RO수 장치를 통하여 정수한 뒤 자유 섭취시켰다.

실험동물의 군분리 및 실험물질 투여

실험동물의 군분리는 순화종료일에 평균체중에 가까운 수컷 및 암컷 각각 20마리를 선별하여 각 군 평균체중이 균등하도록 무작위로 8군, 군당 5마리로 군분리를 실시하였다. 실험동물 개체별 실험물질 투여액량은 절식 후(투여당일)의 체중을 기준으로 10 mg/kg으로 투여하였다. 경구투여용 카테터를 부착한 일회용 주사기(1 mL)를 이용하여 위내에 단회 강제 투여하였다. 모든 동물은 투여 전에 음수는 자유 섭취시키면서 약 4시간이상 절식시켰고, 투여 약 4시간 후 사료를 급여하였다. PAT 단백질은 대조군(G1)에는 0 mg/kg, 시험물질 저용량군(G2)에는 1,000 mg/kg, 시험물질 중용량군(G3)에는 2,000 mg/kg, 시험물질 대용량군(G4)에는 4,000 mg/kg 용량으로 각각 투여하였다.

실험동물의 임상증상 관찰

모든 동물은 매일 사료 및 음수 섭취, 운동성, 사망률 및 부상 여부 등을 관찰하였다. 실험동물의 관찰은 투여 1일차에 30분, 1시간, 2시간, 4시간, 6시간 이후 7일간 매일 1회 증상을 관찰하였다. 모든 동물은 군분리 전 체중을 측정하고 측정된 체중에 따라 군을 나누었으며, 실험물질 투여를 실시한 후에는 1일, 5일 및 7일차에 체중을 측정하였다. 모든 동물은 실험기간이 종료된 후 CO₂ 가스를 이용한 안락사를 실시한 후 부검을 통하여 5대장기(심장, 폐, 간, 신장, 비장)의 이상 여부를 육안으로 관찰하였다.

통계처리

본 실험에서 얻은 결과는 평균±표준편차(mean±SD)로 나타내었으며, 통계처리는 SPSS (20.0, Statistical Package for Social Sciences Inc., USA)를 이용하여 일원변량분석(One way ANOVA)을 실시한 후 영양성분 함량 분석 실험은 Student's t-test로 동물실험은 Duncan's multiple range test로 실험군 사이의 유의성을 p < 0.05 수준에서 검증하였다.

결과 및 고찰

일반성분 및 아미노산 분석

GM 작물의 상용화를 위한 재배 승인을 받기 위해서는 2008년 1월부터 시행된 ‘유전자변형생물체의 국가간 이동 등에 한 법률’ 즉, ‘LMO법’에 따라 인체위해성 및 환경위해성을 포함한 안전성평가를 수행해야 한다. GM 작물을 식품 용도로 사용할 경우에는 일반성분, 비타민, 지방산, 무기질 및 아미노산 함량 등을 분석하여 모품종인 non-GM 작물과의 실질적 동등성을 검증할 필요가 있다. 본 연구에 사용한 제초제저항성 GM 잔디는 식용작물이 아닌 비식용 원예작물이므로 일반성분과 아미노산 함량을 분석하고 대조구인 non-GM 들잔디와 비교하여 실질적 동등성을 평가하였다.

모품종과 JG21-MS1 들잔디의 일반성분 분석 결과를 Table 1에 제시하였다. 채취한 잔디 시료는 동결건조하여 분석에 사용하였고, 분석 결과의 수분함량은 생체시료의 수분함량을 나타내지 않으므로 결과에서 제외하고 모든 결과는 건물 100 g 당 함량으로 계산하여 제시하였다. 모품종과 JG21-MS1 들잔디의 일반성분 함량을 비교한 결과, 열량, 회분, 탄수화물, 단백질, 조지방, 조섬유 등 분석한 모든 성분에서 유의차를 보이지 않았다(Table 1). 모품종과 JG21-MS1 들잔디의 아미노산 조성비를 분석한 결과, 이들 들잔디 시료에는 asparagine과 glutamine 및 alanine이 각각 10% 이상으로 많이 함유되어 있었고, tryptophan 함량이 낮은 특성을 보였다. JG21-MS1 들잔디의 각 아미노산 조성비를 모품종의 조성비와 비교한 결과, GM 들잔디와 non-GM 들잔디 간의 아미노산 조성에는 차이가 없는 것으로 나타났다(Table 2).

PAT 단백질의 알레르겐 가능성 평가

특정단백질의 알레르겐 가능성 연구는 일차적으로 컴퓨터 생물정보 데이터베이스를 이용한 가상실험(*in silico study*)에 의존한다. 본 조사에서는 많은 연구자들에 의해 널리 이

Table 1 Proximate composition of herbicide-tolerant GM *Z. japonica* and in the parental non-GM species.

Component	Parental	GM
Calories (kcal/100 g)	376.50±3.79 ^a	378.41±5.10 ^a
Crude ash (g/100 g)	8.10±0.60 ^a	7.82±0.86 ^a
Carbohydrate (g/100 g)	79.83±0.82 ^a	79.07±1.65 ^a
Crude protein (g/100 g)	10.28±0.90 ^a	11.16±1.25 ^a
Crude lipid (g/100 g)	1.78±0.33 ^a	1.94±0.44 ^a
Crude fiber (g/100 g)	31.47±0.50 ^a	29.88±6.47 ^a

Values are means ± SD (n = 3) of the dry weight. Values with the same letters in each row are not significantly different (p<0.05) according to a t-test.

용되고 있는 알레르겐 아미노산 서열 상동성 검정 프로그램인 AllergenOnline Database를 이용하여 PAT 단백질의 알레르겐 가능성을 평가하였다. 그 결과 PAT 단백질은 80개의 아미노산으로 이루어진 절편에 걸쳐 기지의 알레르겐과 35% 이상의 상동성을 보이지 않았으며(Fig. 1A), 알레르겐 항원결정기를 나타내는 연속한 8개의 아미노산과 일치하는 서열도 확인되지 않았다(Fig. 1B). 따라서 *bar* 유전자의 발현산물인 PAT 단백질은 기지의 알레르겐과 구조적으로 유사성이 없으므로 알레르겐으로 작용할 가능성이 매우 낮을 것으로 판단된다. 이와 같은 PAT 단백질에 대한 안전성평가는 이미 수행된바 있으며 PAT 단백질이 알레르기를 유발할 가능성은 매우 낮을 것으로 보고되었고(Herouet et al. 2005), 모품종(non-GM) 들잔디와 제초제저항성 GM 들잔디의 알레르기접촉피부염을 비교 평가한 첩포시험에서도 PAT 단백질이 발현된 GM 들잔디의 잎 조직은 모품종 들잔디의 잎 조직과 유사한 양성반응을 보였다(Lee et al. 2015a). 또한, PAT 단백질의 아미노산 서열과 기존 독소 아미노산 서열의 상동성을 검색한 결과 대부분 PAT 단백질과 관련된 phosphinothricin acetyltransferase, acetyltransferase 등의 효소와 아미노산 서열 상동성이 높게 나타났고, 단백질독소와의 유의미한

Table 2 Amino acid content of herbicide-tolerant GM *Z. japonica* and the parental non-GM species

Amino acid (Mol %)	Parental	GM
Cysteine	1.91±0.23 ^a	2.03±0.22 ^a
Asparagine	13.48±4.75 ^a	11.86±1.94 ^a
Glutamine	11.70±0.63 ^a	11.37±1.09 ^a
Serine	6.15±0.63 ^a	5.96±0.55 ^a
Glycine	9.11±0.94 ^a	9.13±0.72 ^a
Histidine	1.66±0.19 ^a	1.59±0.17 ^a
Arginine	4.18±0.24 ^a	4.00±0.19 ^a
Threonine	5.09±0.50 ^a	5.20±0.47 ^a
Alanine	10.41±1.26 ^a	10.77±0.33 ^a
Proline	6.04±0.34 ^a	5.87±0.53 ^a
Tyrosine	1.96±0.30 ^a	2.01±0.08 ^a
Valine	6.49±0.75 ^a	6.52±0.13 ^a
Methionine	1.73±0.10 ^a	1.81±0.14 ^a
Isoleucine	4.31±0.32 ^a	4.71±0.62 ^a
Leucine	8.25±0.70 ^a	8.84±1.36 ^a
Phenylalanine	3.81±0.52 ^a	4.25±0.99 ^a
Tryptophan	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a
Lysine	3.73±0.86 ^a	4.11±1.38 ^a

Cysteine, cysteine+cystine; Asparagine, asparagine+aspartic acid; Glutamine, glutamine+glutamic acid. Values are means ± SD (n = 3). Values with the same letters in each row are not significantly different (p<0.05), according to a t-test.

A		80mer Sliding Window Search Results	
Database	AllergenOnline Database v20 (February 10, 2020)		
Input Query	> PAT protein from <i>Streptomyces hygrosopicus</i> MSPERPPADI PRATEADMPAVCTI VNHV IETSTVNFRTPEQEPQEWTDGLVRLPERYPWIL VAEYDGEVAGI AVAGPWKARNAYDWTAEESTVYVSPRHORTGLGSLTYHLLKSLAQGFK SWYAV IGLPNDPSVFMHEALGYAPRGM LRAAGFKHGNWHDVGFWQLDFSLPYPPRPVLPV TEI		
Length	183		
Number of 80 mers	104		
Number of Sequences with hits	0		
No Matches of Greater than 35% Identity Found			
AllergenOnline Database v20 (February 10, 2020)			
B > PAT protein from <i>Streptomyces hygrosopicus</i>			
number of 8mer = 176			
Number of Sequences with at least one 8mer match = 0			

Fig. 1 Amino acid sequence identity of the PAT protein from the Allergen Online Database. (A) 35% identity with known allergens across a length of 80 amino acids. (B) Continuous 8 amino acids identity.

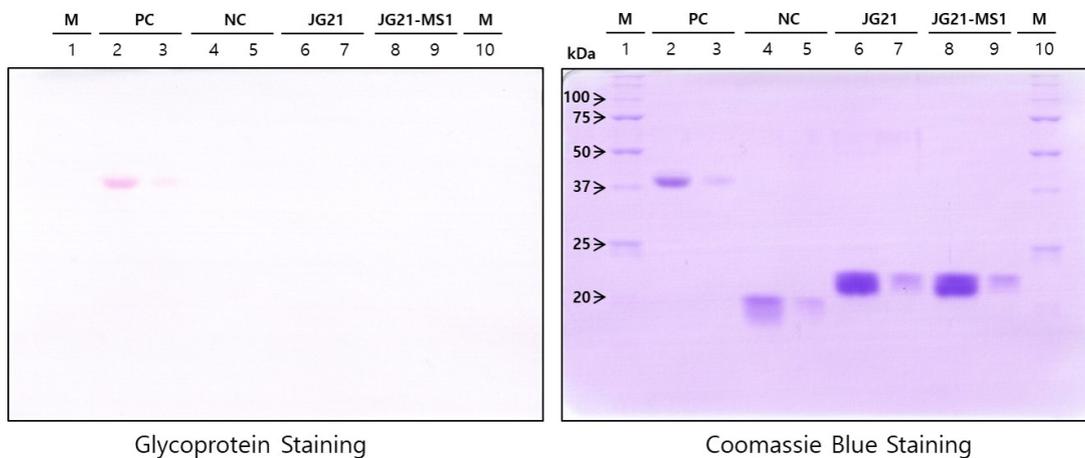


Fig. 2 Glycoprotein staining of the PAT protein purified from GM zoysiagrass events. M, protein size marker. Size of protein standard (kDa) is shown on the left (lane 1, lane 10); lane 2~3, horseradish peroxidase as a positive control (lane 2, 5 µg; lane 3, 1 µg); lane 4~5, soybean trypsin inhibitor as a negative control (lane 4, 5 µg; lane 5, 1 µg); lane 6~7, purified PAT protein from JG21 (lane 6, 10 µg; lane 7, 1 µg); lane 8~9, purified PAT protein from JG21-MS1 (lane 8, 10 µg; lane 9, 1 µg). After the glycoprotein stain, the gel was stained using Coomassie brilliant blue.

상동성은 검색되지 않았다(data not shown). 이상의 결과는 제조제저항성 GM 잔디에서 발현된 PAT 단백질이 알레르겐 또는 독성물질로 작용할 위험성이 없음을 시사한다.

많은 단백질 알레르겐은 당쇄가 부가되어 있고, 그 당쇄 그룹들이 단백질들의 알레르겐으로 작용할 가능성을 높이는데 기여하고 있다(Jenkins et al. 1996). 대부분의 알레르겐과 연관된 당쇄화(glycosylation)는 폴리펩타이드 체인의 아스파라긴에 N-glycosidic 결합을 한 것이며, N-glycosylation은 폴리펩타이드 체인에 Asparagine-Xaa-Serine/Threonine (Xaa는 Proline 이외의 아미노산)배열의 아스파라긴 잔기에서 일어난다. 유전자변형 식물에 도입된 *bar* 유전자 유래의 PAT 단백질의 아미노산 배열에서는 잠재적 당화 사이트(glycosylation site)가 없음이 보고된바 있다(Herouet et al. 2005).

본 실험에서는 JG21-MS1 잔디에서 발현된 PAT 단백질이 당화되지 않았음을 실험적으로 증명하기 위해, JG21-MS1 잔디에서 PAT 단백질을 정제하여 당단백 염색 실험을 수행하였다. 그 결과, Positive control로 사용한 Horseradish peroxidase는 5 µg(좌, 2번 lane)과 1 µg(좌, 3번 lane) 모두에서 염색되어 당단백질임을 확인할 수 있었고, Negative control로 사용한 Soybean trypsin inhibitor(좌, 4~5번 lane)는 염색이 되지 않아 당단백질이 아님을 확인할 수 있었다. JG21-MS1 잔디에서 정제한 PAT 단백질(좌, 8~9번 lane)은 Negative control로 사용한 Soybean trypsin inhibitor에서의 결과와 같이 염색되지 않았다(Fig. 2). 본 결과로부터 JG21-MS1에서 발현한 PAT 단백질은 glycosylation 되지 않았음을 확인할 수 있었다.

PAT 단백질의 인공위액에서의 안정성평가

본 실험에서는 JG21-MS1 들잔디에서 발현된 PAT 단백질도 가축이나 사람의 위액에서 빠른 속도로 분해된다는 사실을 실험적으로 검증하였다. 실험 결과, 펩신을 첨가하지 않은 인공위액에서는 처리 후 60분이 경과하여도 PAT 단백질이 분해되지 않은 반면, 펩신을 첨가한 인공위액에서는 처리 후 30초 이내에 PAT 단백질이 분해됨을 확인하였다(Fig. 3). 이 결과로부터 JG21-MS1에 도입된 *bar* 유전자의 발현산물인 PAT 단백질은 인공위액에서 안정하지 않고 매우 빠르게 분해됨을 확인할 수 있었다. 소화에 대한 PAT 단백질의 안정성을 평가한 다른 연구에서도 PAT 단백질은 인공위액 및 장액에서 5분 이내에 분해됨이 확인되었고(Herouet et al. 2005), 제초제저항성 GM 들잔디(JG21) 이벤트에서 발현된 PAT 단백질의 인공위액에서의 분해성 평가에서도 이와 유사한 결과가 보고되었다(Sun et al. 2010). 이상의 결과는 무추대 제초

제저항성 GM 들잔디(JG21-MS1)에서 발현된 PAT 단백질은 인공위액에서 빠르고 완전하게 분해되어 알레르겐으로 작용할 가능성이 낮을 것임을 시사한다.

PAT 단백질의 단회 경구투여 독성 평가

본 실험에서는 암수 ICR 마우스를 이용하여 PAT 단백질의 단회 경구투여 시 나타나는 독성반응과 치사량을 조사하기 위하여 실험물질 투여 후 7일간 관찰을 실시하였다. 총 4개 그룹의 마우스에 부형제 또는 실험물질을 0, 1,000, 2,000, 4,000 mg/kg의 용량으로 단회 경구투여하였고(Table 3), 투여 1일차에는 30분, 1시간, 2시간, 4시간, 6시간 증상관찰을 수행하였으며, 7일차까지의 증상을 관찰하였다.

실험 결과, 시험물질 투여 후 모든 시험구에서 체중에 큰 차이는 관찰되지 않았고(Table 3), 일반증상에서도 이상증상은 관찰되지 않았으며, 대용량군(4,000 mg/kg)을 포함한 모든 실험구에서 사망개체는 발생하지 않았다(Table 4). 부검결과에서도 대조군과 비교하였을 때 모든 실험구에서 5대장기의 이상증상은 관찰되지 않았다(data not shown). 본 연구를 통해 PAT 단백질의 마우스에 대한 단회 경구투여는 어떤 독성학적인 변화도 유발하지 않는 것으로 확인되었으며, PAT 단백질의 ICR 마우스에 대한 최소 치사량(minimal lethal dose)은 암수 모두 4000 mg/kg을 상회하는 것으로 나타났다. PAT 단백질은 동물모델을 이용한 독성 실험에서 위해성이 없음이 보고되었고, 동물이나 인체에 유해한 어떠한 결과도 발견되지 않았다(EPA 1997; Herouet et al. 2005; Jeong et al. 2004; Lee et al. 2012). 이는 PAT 단백질이 독성물질로 작용할 가능성이 매우 낮음을 시사한다. 따라서 제초제저항성 GM 들잔디(JG21-MS1) 이벤트에서의 PAT 단백질 발현이 들잔디 식물체의 독성 변화에 미치는 영향은 거의 없을 것으로 사료된다.

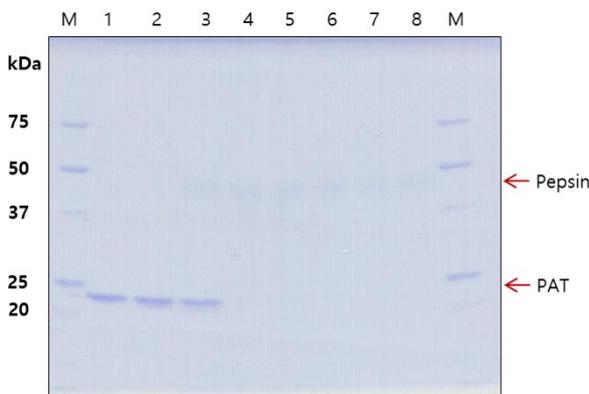


Fig. 3 SDS-PAGE analysis of the PAT protein after digestion in simulated gastric fluid (SGF). Purified PAT protein was incubated in SGF without [lane 1 (0 min) and 2 (60 min)] or with [lanes 3~8 (0, 0.5, 1, 5, 10 or 60 min)] pepsin. M, protein size marker. Size of protein standard (kDa) is shown on the left

Table 3 Change in body weight in male and female ICR mice after single oral administration of varying doses of the PAT protein

Sex	Group (dose: mg/kg)	Change in body weight (g/day)		
		1*	5	7
Male	G1 (0)	34.84±1.42 ^a	36.41±1.63 ^a	36.17±1.52 ^a
	G2 (1000)	34.25±2.12 ^a	35.49±2.17 ^a	35.94±2.19 ^a
	G3 (2000)	34.47±0.79 ^a	35.26±0.93 ^a	36.33±0.88 ^a
	G4 (4000)	35.16±1.33 ^a	35.94±1.17 ^a	35.98±1.26 ^a
Female	G1 (0)	29.96±0.86 ^b	29.60±0.93 ^{bc}	30.23±0.90 ^b
	G2 (1000)	29.94±0.62 ^b	30.94±1.22 ^b	30.49±1.24 ^b
	G3 (2000)	27.84±0.70 ^c	28.05±0.87 ^c	28.95±1.11 ^b
	G4 (4000)	29.86±1.30 ^{bc}	29.95±1.53 ^b	30.98±1.84 ^b

*Day after administration of PAT protein.

Body weights (g/day) are means ± SD (n=5). Values with different letters are significantly different between days and doses, as determined by Duncan's multiple range test (p<0.05).

Table 4 Clinical signs and mortality of ICR mice after a single oral administration of varying doses of the PAT protein

Sex	Group (Dose: mg/kg)	Sample size	Clinical signs	Mortality (%)
Male	G1 (0)	5	-	0
	G2 (1000)	5	-	0
	G3 (2000)	5	-	0
	G4 (4000)	5	-	0
Female	G1 (0)	5	-	0
	G2 (1000)	5	-	0
	G3 (2000)	5	-	0
	G4 (4000)	5	-	0

-, No abnormal findings

적 요

본 연구는 제초제저항성 GM 들잔디에서 발현된 PAT 단백질의 잠재적인 알레르기성 및 독성을 평가하기 위해 수행되었다. PAT 단백질의 *in silico* 분석에서 PAT 단백질은 알려진 알레르겐 또는 독성 단백질과 유사성을 보이지 않았다. PAT 단백질은 80개의 아미노산으로 이루어진 절편에 걸쳐 기지의 알레르겐과 35% 미만의 아미노산 서열 상동성을 보였고, 기지의 알레르겐과 연속한 8개의 아미노산에서 일치하는 서열도 확인되지 않았다. 또한 제초제저항성 GM 들잔디에서 발현된 PAT 단백질은 펩신 존재 하의 인공위액에서 매우 빠르게 분해되었고, GM 들잔디에서 발현된 PAT 단백질은 번역 후 수식(glycosylation)도 일어나지 않았음이 확인되었다. 경구투여 독성 시험에서는 체중 1 kg 당 4,000 mg 을 투여한 실험구에서도 PAT 단백질 투여 후 마우스에서 사망이나 독성 영향은 관찰되지 않았다. 이들 결과는 제초제저항성 GM 들잔디에서 발현된 PAT 단백질이 잠재적 알레르겐이나 독소로 작용할 가능성이 없음을 시사한다.

사 사

본 연구는 농촌진흥청 차세대바이오그린21 연구사업(과제번호: PJ01368501) 및 2019년도 정부(교육부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임(No. 2019 R1A6A1A11052070).

References

Bae TW, Kim J, Song IJ, Song SY, Lim PO, Song PS, Lee HY (2009) Production of unbolting lines through gamma-ray irradiation mutagenesis in genetically modified herbicide-tolerant *Zoysia japonica*. *Breed Sci* 59:103-105

- Bae TW, Vanjidorj E, Song SY, Nishiguchi S, Yang SS, Song IJ, Kang TW, Kim JI, Koh YJ, Park SY, Lee J, Lee YE, Ryu KH, Riu KZ, Song PS, Lee HY (2008) Environmental risk assessment of genetically engineered herbicide-tolerant *Zoysia japonica*. *J Environ Qual* 37:207-218
- Cho JI, Park SH, Lee GS, Kim SM, Lim SM, Kim YS, Park SC (2020) Current status of GM crop development and commercialization. *Korean J Breed Sci Special Issue*:40-48
- Codex Alimentarius Commission (2009) Foods derived from modern biotechnology. 2nd ed. WHO, FAO, Rome, Italy
- EPA (1997) Phosphinothricin acetyltransferase and the genetic material necessary for its production in all plants. Exemption from the requirement of a tolerance on all raw agricultural commodities. *Federal Register*. 62: 17717-17720
- FAO/WHO (2001) Evaluation of allergenicity of genetically modified foods. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Rome, Italy
- Hérouet C, Esdaile DJ, Mallyon BA, Debruyne E, Schulz A, Currier T, Hendrickx K, van der Klis RJ, Rouan D (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
- ISAAA Brief 53 (2018) Global status of commercialized biotech/GM crops in 2017
- Jenkins N, Parekh RB, James DC (1996) Getting the glycosylation right: implications for the biotechnology industry. *Nat Biotechnol* 14:975-981
- Jeong MH, You AS, Lee JB, Shin JS, Kim JH, Han JS (2004) Mutagenicity studies of the herbicide-resistance phosphinothricin acetyltransferase (PAT). *Korean J Pestic Sci* 8:22-29
- Kang HG, Bae TW, Jeong OC, Sun HJ, Lim PO, Lee HY (2009) Evaluation of viability, shedding pattern, and longevity of pollen from genetically modified (GM) herbicide-tolerant and wild-type zoysiagrass (*Zoysia japonica* Steud.). *J Plant Biol* 52:630-634
- Kang HG, Sun HJ, Kwon YI, Yang DH, Lee GS, Park KW, Lee HY (2019) Assessment of bolting recovery of an unbolting line produced by gamma-ray irradiation in genetically modified

- herbicide-tolerant *Zoysia japonica*. Weed Turf Sci 8:257-265
- Lee J, Sun HJ, Lee HY (2015a) Biohazard surveillance of allergic contact dermatitis in genetically-modified *Zoysia* grasses using patch testing. AARD 3:134-138
- Lee SM, Seo DS, Jeong MH, Sung HJ, Kim JK, Kim HJ, Yeo YS, Cho HS (2012) Safety evaluation of the phosphinothricin acetyltransferase proteins and herbicide resistant potato. J Korean Soc Int Agric 24:598-608
- Lee YE, Lee SH, Ryu GD, Kang HG, Kwon YI, Sun HJ, Lee HY (2015b). Investigation into effects of transgenic glufosinate-resistant *Zoysia* grasses with herbicide application on bacterial communities under field conditions. J Plant Biol 58:303-310
- Lee YT, Lee HM, Ahn BO, Cho HS, Suh SC (2013) Nutritional composition of drought-tolerant transgenic rice. J Korean Soc Food Sci Nut 42:730-735
- Sun HJ, Kang HG, Bae TW, Cho TG, Kim J, Lim PO, Riu KZ, Lee HY (2010) Assessment of phosphinothricin acetyltransferase (PAT) degradation from transgenic zoysiagrass digested with simulated gastric fluid (SGF). J Plant Biol 53:113-120
- Thompson CJ, Movva NR, Tizard R, Crameri R, Davis JE, Lauwereys R, Botterman J (1987) Characterization of the herbicide-resistance gene *bar* from *Streptomyces hygroscopicus*. EMBO J 6:2519-2523
- Toyama K, Bae CH, Kang JG, Lim YP, Adachi T, Riu KZ, Song PS, Lee HY (2003) Production of herbicide-tolerant zoysiagrass by *Agrobacterium*-mediated transformation. Mol Cells 16: 19-27