

제초제저항성단백질 Phosphinotricin Acetyltransferase (PAT)의 유전독성시험

정미혜* · 유아선 · 이제봉¹ · 신진섭¹ · 김진화 · 한증술²

농업과학기술원 유해물질과, ¹농업과학기술원 농약평가과, ²원예연구소 원예생명공학과

요약 : 제초제저항성단백질인 phosphinotricin acetyltransferase(PAT)에 대한 유전독성 영향을 평가하기 위하여 *in vitro* 시험으로 복귀돌연변이시험과 염색체이상시험을, 그리고 *in vivo* 시험으로 소핵시험을 수행하였다. *Salmonella typhimurium* 균주 TA98, TA100, TA1535 및 TA1537를 이용한 복귀돌연변이시험에서 직접법과 대사활성법(S9 mixture) 모두 5000 µg/plate에서 돌연변이 수는 음성대조군과 유의차가 없었다. Chinese hamster lung(CHL) 세포를 이용한 염색체이상시험 결과 직접법과 대사활성법의 경우 PAT를 처리한 모든 군(100, 10, 1µg/mL)의 세포에서 구조적, 숫적 염색체이상은 관찰되지 않았다. PAT를 복강 투여한 ICR계 숫컷 mouse의 골수세포에서 다염성 적혈구(polychromatic erythrocytes) 및 소핵(micronucleus)을 가진 다염성 적혈구의 출현율을 조사하기 위하여 mouse를 이용한 소핵시험을 수행한 결과, 모든 농도(1250, 625, 313 mg/kg)에서 음성대조군과 유의차가 관찰되지 않아, PAT는 소핵을 유발하는 독성은 없는 것으로 판단된다. 이상의 결과로 제초제저항성단백질 PAT는 미생물, 배양세포, 및 생체내에서 유전독성을 유발하지 않는 물질로 사료된다.(2004년 2월 25일 접수, 2004년 3월 24일 수리)

Key word : Phosphinotricin Acetyltransferase, Mutagenicity, Herbicide resistance.

서론

시험물질 phosphinotricin acetyltransferase(PAT)는 제초제 glufocinate에 저항성을 갖는 단백질로서 이는 *Streptomyces hygroscopicus*, *Streptomyces Viridochrogenes*에서 분리된 제초제저항성유전자 *bar* (bialaphos resistance; Thompson 등, 1987), 또는 *pat* (Phosphinotricin Acetyltransferase; Strauch 등, 1988) gene에 의해 생성된다. PAT는 glufocinate의 주성분인 phosphinotricin를 acetyl화하여 제초활성을 불활성화 시키므로 제초제에 대한 내성을 나타낸다.

Phosphinotricin(PTT)은 식물의 glutamine(Glu) 합성 효소를 저해하는 작용을 하며, 식물의 성장에 관여하는 효소를 저해하기 때문에 잡초와 작물을 구분하지 않고 고사시키는 특성이 있기 때문에 glufocinate는 비선택성제초제로 알려져 있다. 따라서 이러한 특성을 배경으로 유전자재조합기술을 이용하여 제초제저항성유전자를 도입함으로써 작물에는 피해를 줄이면서

잡초만 효율적으로 제거할 수 있는 작물을 개발하게 되었으며, 이 PPT 저항성유전자를 이용하여 개발된 작물로는 담배, 감자, 유채, 옥수수, 벼 등이 있다 (De Block 등, 1987; De Block 등, 1989; Spencer 등, 1990; Cao 등, 1992).

이러한 유전자재조합기술을 이용하여 개발된 작물을 유전자변형생물체(genetically modified organisms, GMOs)또는 유전자변형작물이라 부르고 있다. 유전자변형작물 개발은 1995년 미국 Monsanto사가 개발한 제초제저항성 콩이 안전성검사를 통과하여 본격적으로 상품화가 이루어지면서 더욱 활발히 진행되고 있다. 특히 제초제저항성 또는 병해충저항성을 가진 농작물은 농약사용량을 줄여 인간과 환경에 안전성을 부여하고 노동력과 투자비용을 줄이면서 편리성을 제공하며 또한 식량생산 증대, 영양학적 품질향상, 성분의 함량증가, 유용한 백신이나 약물제조, 질병이나 스트레스 등의 식물학적 방어 효과 등을 가지고 있는데, 이러한 유전자변형작물은 기존육종방식으로 개발된 것에 비해 분명 뛰어난 장점이 많다(권 등, 1993; Murphy, 1999; 농촌진흥청, 1999; Jail 등 2000;

*연락처

Parveez, 2000).

그러나 유전자변형작물은 생물체가 원래 갖고 있던 유전자를 인공적으로 개조하거나 원래 없는 새로운 유전자를 인위적으로 주입하여 만들어짐으로서 이러한 작물을 원료로 하는 식품을 섭취하는 사람에게 알레르기발생, 면역체계 약화, 발암성유발 등의 잠재적인 독성으로 인한 위해성 문제가 제기된 상태에서 식품에 대한 안전성이 입증되지 않았다는 이유로 끊임 없이 사회문제화 되고 있다.

따라서 소비자 건강보호를 위해 기술발전을 저해하지 않는 범위 내에서 정부의 식품규제가 필요하다는 FAO/WHO의 권고에 따라 실질적동등성에 근거하여 안전성을 평가하고 있다(OECD, 1993a; FAO, 1996). 한편 미국 EPA에서는 이러한 작물에 도입된 유전자 발현단백질의 포유동물에 대한 독성평가방법을 현재 검토 중에 있다. 그러나 특히 유전자변형 농산물에 대한 장기간 노출시의 안전성이나 도입유전자 발현단백질에 대한 안전성문제에 대한 연구결과는 현재로서는 상당히 부족한 실정에 있다.

따라서 본 연구는 발암성을 예비로 검색하는데 매우 유용한 시험으로 유전자변형작물의 장기노출을 통한 안전성을 수행하기에 앞서 도입유전자의 발현단백질에 대한 발암성유무를 평가하기 위하여 제조저항성 단백질 PAT에 대한 유전독성시험을 의약품등의 독성시험기준(식품의약품안전청 고시 제1999-61호, 1999. 12. 12)에 따라 실시하여 변이원성유무를 평가하였다.

재료 및 방법

시험물질 및 시약

본 시험에 사용된 시험물질인 PAT는 *pat*을 *E. coli*에 삽입하여 순수 분리 (그림 1) 후 방사선으로 멸균하여 시험기간 동안 냉장보관 하였다. 양성대조물질인 2-nitrofluorene(2NF), sodiumazide(SA), 6-chloro-9-[3-2(chloroethylamino)propyl-amino] 2-methoxy-acridine (ICR 191), 2-aminofluorene(2AF), mitomycin C 및 benzo[a]pyrene는 Sigma사에서 구입하여 사용하였다

복귀돌연변이 시험

본 시험에 사용된 균주는 *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537 로 대전 한국화학연구

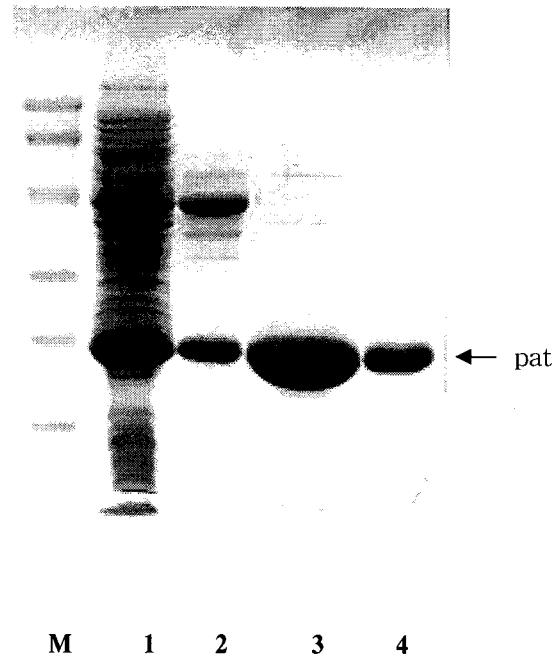


Fig. 1. Result of purified PAT from *E. coli*. by SDS-PAGE.

1. *E. coli* extracts
2. DEAE-cellulose chromatography
3. Affinity chromatography
4. Hydrophobic interaction chromatography

원에서 분양받아 사용하였다. 시험물질 PAT은 0.9% 생리식염수에 현탁시켜 제조하였다. 처리농도는 TA 100 균주를 이용하여 5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 를 최고농도로 제조하여 직접법과 S9 mixture를 이용한 대사활성법을 실시하였다. 예비독성시험결과 5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 의 농도에서 시험물질에 의한 세포독성을 보이지 않아 본 시험 농도로 설정하였다. 용매대조군으로는 0.9% 생리식염수를 사용하였으며, 직접법에 대한 양성대조물질로는 TA98 균주는 2-NF(1.0 $\mu\text{g}/\text{plate}$), TA100, TA1535 균주는 SA (1.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$), TA1537 균주는 ICR191(1.0 $\mu\text{g}/\text{plate}$)을, 대사활성법에서는 모든 균주에 대해 2-AF(10 $\mu\text{g}/\text{plate}$)를 사용하였다. *Salmonella typhimurium* 각 균주는 10 mL의 nutrient broth에 접종하여 37°C에서 약 16시간 회전식 진탕배양기에서 배양하였다. 시험시작 전 상층천배지를 50°C waterbath에 넣고 멸균한 시험관(13 mm × 100 mm, glass)에 *S. typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537 각각의 배양균액 0.1 mL, 시험물질 0.1 mL 및 0.2 M phosphate buffer saline(pH 7.4) 0.5 mL을 넣어 교반기로 잘 혼합한 후 37°C에서 30분간 배양하였다. 배양

종료후 바로 상층한천배지 2 mL을 첨가하여 혼합하고 변이원성 검색용 최소영양한천배지에 접종하였으며, 대사활성법에서는 S9을 cofactor 와 1:9의 비율로 섞은 S9 mixture를 0.5 mL씩 첨가한 다음 교반기로 잘 혼합하여 최소영양배지에 접종하였다. 접종한 plate는 실온에 30분간 방치 후 37°C incubator에서 48시간 배양 후 복귀변이 집락수를 수동식 집락 계수기로 계수하였다(OECD, 1993b).

복귀변이집락수는 각 처리군당 3매 plate의 평균치로 나타내었고, 돌연변이유발성 판정은 용매대조의 2배 이상의 복귀변이 집락수를 나타내거나 통계적 유의성을 나타낼 때 양성으로 판정하였으며, 이를 판단하기 위해서 음성대조군과 각각의 군주에 대해 유의수준 $p < 0.05$ 로 t-test를 실시하였다.

염색체이상시험

사용한 포유동물 세포는 Chinese hamster lung fibroblast(CHL) 세포주로 한국화학연구원에서 분양 받아 사용하였다. Modal chromosome number는 25이며, 세포주기는 15시간이다(Ishidate과 Odashima, 1977).

배양액은 10% fetal bovine serum(FBS, Gibco 16000-044)을 포함한 Eagle's minimal essential medium(EMEM, Gibco, 41500-034)을 사용하였으며, 포화 습도 하에서 5% CO₂를 공급하는 37°C의 배양기에서 배양하였다. 배양된 세포는 2~3일 간격으로 0.25% trypsin-EDTA 용액을 이용하여 계대 유지하였다.

시험물질인 PAT는 0.9% 생리식염수에 현탁하여 slide를 제작하였을때 관찰 가능한 농도를 시험농도로 설정하였다. 최고투여농도는 100 µg/mL로 하여 중간용량군 10 µg/mL, 저용량군 1 µg/mL 3단계의 투여농도군을 두었다. 용매대조군은 0.9% 생리식염수를, 양성대조군에서는 직접법에 mitomycin C 0.1 µg/mL을, 대사활성 존재하에서는 benz(a)pyrene 20 µg/mL을 사용하였다. 직접법은 CHL 세포를 직경 60 mm의 petri dish에 5 mL의 배양액에 1×10^5 cell/mL 되도록 파종하여 3일간 배양한 후, 각각 시험물질과 양성대조물질 등을 함유하는 배양액으로 교환하여 22시간 동안 배양하였다. 각 petri dish에 colcemid(Gibco)를 1 µM 되도록 처리한 후 2시간 더 배양하여 총 검체 처리시간이 24시간이 되도록 하였다. 0.25% trypsin-EDTA로 세포를 모은 후 37°C의 저장액(0.075 M KCl) 4 mL에 잘 현탁 시킨 후 37°C 수조에 20분간 방치하고, 고정

액(methanol:acetic acid=3:1)으로 3회 고정시킨 후 cell suspension을 만들어 냉동보관된 slide glass에 피펫을 이용하여 60~80 cm높이에서 고정세포부유액을 1방울씩 떨어뜨려 상온에서 건조 후, 5% Giemsa로 30분간 염색하여 광학현미경으로 관찰하였다. 대사활성법은 CHL 세포를 직경 60 mm의 petri dish에 1×10^5 cell/mL 되도록 3일간 배양한 후, S9분획을 cofactor와 3:7 비율로 혼합한 S9 mixture와 시험물질 또는 양성대조물질이 포함된 배양액으로 6시간 배양한 후, EMEM 배지로 교환하여 18시간 더 배양하였다. 세포의 수거 2시간 전에 colcemid를 처리한 후 세포를 수거, 표본을 제작하였다.(Galloway 등, 1997; OECD, 1993c)

한 시험 농도당 100개씩 3반복으로 세포분열 증상을 현미경하에서 판독하여 염색체이상 유무를 관찰하였다. 염색체이상은 크게 구조이상(structural aberrations)과 숫적 이상(numerical aberration)으로 분류하고, 구조이상은 ctg(chromatid gap), ctb(chromatid break), cte(chromatid exchange)으로 구분하였으며, 숫적 이상은 4배수체 이상만을 기록하였다. 염색체 이상의 수가 통계학적으로 유의성 있게 용량의존적으로 증가하거나 하나 이상의 용량단계에서 재현성 있게 양성반응을 나타낼 경우를 양성으로 한다. 통계처리는 유의수준 $p < 0.05$ 로 t-test를 실시하였다.

소핵시험

실험동물은 SPF(특정병원체 부재) 5주령 마우스(바이오제노믹스)를 사용하였다. 온도 23±1°C, 습도 55±5%, 배기 10~18회/hr, 형광등 명암 12 hr cycle 사육환경에서 1주일간의 순화기간을 거쳐 폴리카보네이트 사육상자(70 W×240 L×120 H mm)에 6마리씩 넣어 사육하였다. 사료는 실험동물용 고형사료((주)삼양사료)를 방사선 멸균하여 공급하였으며, 음수는 살균수를 공급하였다.

순화기간을 거친 모든 동물의 체중을 측정, 20~30 g의 범위에 드는 동물을 선별하여 무작위로 각 군에 배분하였다. 개체의 식별은 색소(피크린산액)에 의한 부위별 피모 염색법과 사육상자별 tag 표시법을 이용하였다. 체중저항성유전자 단백질의 급성독성시험 결과 LD₅₀이 2500 mg/kg으로 조사되어 시험물질 투여농도는 LD₅₀의 1/2농도부터 처리하여 1250, 625, 313 mg/kg 처리하였으며 Mytomycin C는 2 mg/kg을 양

성대조군으로 설정하였다.

3단계의 농도를 복강투여하고 24시간째에 Schmid (1975)의 방법에 따라 골수표본을 제작하였다. 경추탈구로 도살한 동물의 양쪽 대퇴골로부터 골수를 0.5 mL의 fetal bovine serum(FBS, Gibco)으로 채취한 후 골수세포 현탁액을 1,000 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 상등액을 제거한 후 적당량의 현탁액을 슬라이드에 도말하고 공기 중에서 충분히 건조시킨 다음 메탄올에 5분간 고정하였다. 표본을 5% Giemsa 용액 (1/150 M phosphate buffer, pH 6.8로 희석)에 30분간 염색하였다. 염색 후 동일 원충액에 1회 세척하고 0.004%의 구연산수용액에 수초간 담근 후 증류수에 수회 세척하여 건조시켰다.

1,000개의 적혈구에서 다염성적혈구(polychromatic erythrocyte, PCE)와 정염성적혈구(normochromatic erythrocyte, NCE)의 비를 구하고, 다시 1,000개의 PCE중에서 소핵을 가진 다염성적혈구(micronucleated PCE, MNPCE)의 출현빈도를 구하였다(Macgregor 등, 1987). 소핵이상의 판단은 용량의존적으로 소핵다염성적혈구수가 증가하였을때를 소핵유발성이 있다고 하고 총 적혈구수 중 다염성적혈구가 30%이하로 되었을 때를 조혈기능 억제 등의 세포독성이 있다고 판정하였다(Hayashi 등, 1989; Hayashi 등, 1994; Salomere, 1980; Schmid, 1975). PCE의 출현 빈도에 관한 유의차는 t-test에 의해 대조군과의 통계적 유의성을 검정하였다.

결 과

복귀돌연변이시험

*S. typhimurium*이용한 복귀돌연변이시험에서 시험물질 PAT는 TA98, TA100, TA 1535, TA1537등 4종의 시험균주에서 S-9을 적용하지 않은 직접법의 경우 전용량단계에 걸쳐 음성대조과 비슷한 정도의 복귀돌연변이 수를 나타내어 통계학적으로 유의성을 보이지 않았으며, S-9을 첨가한 대사활성법에서도 S9부재와 마찬가지로 유의적인 변화를 나타내지 않았다. 그러나 양성대조물질인 2-nitrofluorene, Sodium azide, 2-aminofluorene의 복귀돌연변이 빈도는 S9첨가 및 부재 모두 복귀돌연변이 집락수가 대조군에 비해 유의성 있는 증가를 나타내었다(표 1).

염색체이상시험

PAT에 대해 CHL cell을 이용한 *in vitro* 염색체 이상시험은 S9 mixture를 첨가하지 않은 직접법과 S9 mixture를 첨가한 대사활성법으로 수행하였다. 처리농도는 100, 10, 1 µg/mL 3농도로 설정하였다. 직접법과 S9 mixture를 첨가한 대사활성법 모두 전시험농도에서 음성대조군과 비교시 통계학적 유의성 및 용량 의존성을 보이지 않았으며, 또한 chromosome에 대한 이상은 관찰되지 않았다(표 2). 양성대조군 MMC는 직접법에서는 32.3%, 대사활성법에서는 31.0%로 음성대조군에 비해 유의성있는 증가를 나타내었다.

Polyploidy는 직접법에서는 고농도에서 1%, 대사활성법에서는 중간용량군에서 0.3%가 관찰되고 양성대조군을 비롯한 다른 군에서는 관찰되지 않았지만 염색체이상출현율이 3%이하로 자연발생을 수준으로 나

Table 1 . Results of reverse mutation test of PAT in *S. typhimurium*

Group	Dose (µg/plate)	S9 mix	No. of revertant/plate			
			TA 98	TA 100	TA 1535	TA 1537
Negative control		-	42.7± 7.0	110.7±8.5	13.3±5.5	11.7±4.0
PAT ^{a)}	5000	-	35.0± 8.7	181.0±17.6	14.0±1.0	14.0±1.7
2NF ^{b)}	1.0	-	347.7±44.0*			
SA ^{c)}	1.5	-		507.7±80.0*	495.3±71.3*	
ICR191	1	-				9407.0±410.5*
Negative control		+	34.7±1.5	102.3±1.5	18.3±1.5	8.0±3.0
PAT	5000	+	49.0±1.5	194.7±35.6	23.3±1.5	11.7±2.3
2AF ^{d)}	10	+	2090.7±100.7*	420.7±51.4*	456.0±90.1*	1872.0±183.0*

^{a)} Phosphinotricin Acetyltransferase, ^{b)} 2-Nitrofluorene, ^{c)} Sodium azide, ^{d)} 2-Aminofluorene.

*significantly different from negative control(p<0.05).

Table 2. Results of chromosomal aberration test of PAT on CHL cells

Group	Dose ($\mu\text{g/mL}$)	S9 Mix	No. of structural aberration ^{a)}			Frequency of cells with total aberration(%)	Polyploidy (%)
			chromatid				
			Gap	Breakage	Exchange		
Negative control			2	0	8	3.3	0(0)
PAT ^{b)}	100		0	1	8	3.0	3(1.0)
	10	-	0	2	8	3.3	0(0)
	1		0	0	5	1.7	0(0)
MMC ^{c)}	0.1		11	11	75	32.3*	0(0)
Negative control			0	0	6	2.0	0(0)
PAT ^{b)}	100		0	0	9	3.0	0(0)
	10	+	1	2	6	3.0	1(0.3)
	1		1	1	7	3.0	0(0)
B(a)P ^{d)}	20		6	2	85	31.0*	0(0)

^{a)}Three sample slides were prepared for each concentration and 100 cells were counted per slide.

^{b)}Phosphinothricin Acetyltransferase, ^{c)} Mytomycin C, ^{d)} Benzo[a]pyrene.

* significantly different from negative control(p<0.05).

타났다. 이와 같은 결과는 PAT가 염색체에 영향을 미치지 않는 물질로 판단된다.

소핵시험

숫컷 마우스를 이용한 PAT의 소핵시험 결과, 시험물질 투여후 특이한 임상증상은 관찰되지 않았으며, 소핵다염성적혈구와 총적혈구대비 다염성적혈구수의 계수 결과를 표 3에 나타내었다. 음성대조군에서의 다염성적혈구 1000개당 소핵다염성적혈구수의 관찰빈도는 0.2±0.10%였으며, 양성대조군은 2.4±0.49%으로

음성대조군에 비해 유의하게 증가하였다. 고용량, 중간용량 및 저용량군이 각각 0.3±0.05%, 0.3±0.18%, 0.2±0.10% 로 음성대조군에 비하여 시험물질 투여군 모두 통계학적 유의성은 없었다. 또한 총적혈구대비 다염성적혈구수의 관찰빈도를 조사한 결과(표 3), 고용량군, 중간용량군 및 저용량군의 빈도가 각각 47.5±10.9%, 44.2± 8.1% 및 47.8± 5.4%으로 음성대조군의 50.3± 2.6%과 비교해볼 때 유의적인 차이가 없었다. 또한 자연 소핵 발생율이 0.2% 내외이고, 음성대조군과 비교하여 볼때 차이가 없어 시험물질이 마

Table 3. Results of micronucleus test in ICR male mice treated intraperitoneally with PAT

Group	Dose (mg/kg)	Route	No. of animal	sample time (hr)	MNPCE ^{a)} (%)	PCE ^{b)} (%)
Negative control		i.p.	6	24	0.2±0.10	50.3± 2.6
PAT ^{c)}	1250	i.p.	6	24	0.3±0.05	47.5±10.9
	625	i.p.	6	24	0.3±0.18	44.2± 8.1
	313	i.p.	6	24	0.2±0.10	47.8± 5.4
	2	i.p.	6	24	2.4±0.49*	46.0± 6.3

^{a)} Micronucleated polychromatic erythrocytes/1000 polychromatic erythrocytes.

^{b)} Polychromatic erythrocytes/1000 erythrocytes.

^{c)} Phosphinothricin Acetyltransferase.

^{d)} Mytomycin C.

* significantly different from negative control(p<0.05).

우스의 골수적혈구아세포의 분화과정에서 염색체이상은 발현하지 않는 것으로 사료된다.

고 찰

유전공학적 기술을 이용하여 작물에는 피해를 줄이면서 잡초만 효율적으로 제거할 수 있는 작물을 개발하기위하여 다양한 작물에 적용되고 있는 제초제저항성유전자인 *pat*의 발현단백질 PAT에 대한 유전독성 영향을 평가하기 위하여 *Salmonella*를 이용한 복귀돌연변이 시험, CHL cell을 이용한 염색체이상시험 및 mouse 골수세포에서의 소핵시험을 수행하여 PAT의 변이원성을 평가하였다. 유전독성물질의 유전자손상으로 나타나는 암발생에 대한 관심이 높아지면서 변이원성시험은 돌연변이원성 및 발암물질을 단기적으로 쉽게 검색할 수 있도록 개발된 시험법으로 유전자, 염색체, 및 DNA등에 미치는 영향을 평가하고 그 결과를 토대로 발암성을 예측하는 시험법으로 널리 이용되고 있다(Maron과 Ames, 1983; Hayes, 1989). 따라서 시험물질 PAT와 같이 작물에 새로운 외부유전자가 도입되면서 발현되는 단백질이 알레르기유발 뿐만 아니라 발암 유발가능성에 대한 우려도 증가함에 따라 그에 따른 안전성 평가가 요구되고 있다.

본 시험은 이러한 시험법들을 이용하여 새로운 유전자가 도입 되면서 발현되는 단백질에 대한 변이원성을 평가하였다. 복귀돌연변이 시험에서 시험균주 TA98, TA100, TA1535, TA1537을 이용한 결과, 시험물질 PAT는 직접법 및 대사활성법에서 음성대조군과 비교하여 돌연변이수에 있어서 유의적인 증가가 관찰되지 않아 PAT는 돌연변이 유발성이 없는 것으로 평가되었다. 양성대조군은 음성대조군과 비교시 유의적인 증가가 관찰되어 본시험이 적정히 수행되었음을 나타내었다.

염색체이상시험에서는 PAT를 용매에 현탁하여 slide를 제작하였을 때 관찰 가능한 농도를 설정하여 본 시험에 적용하였다. 직접법 및 대사활성법에서 24시간 투여후 각 농도별 염색체이상세포의 출현빈도를 조사한 결과 음성대조군과 유의차가 없었으며 용량의 존적 증가도 관찰되지 않았으며, 이상세포의 평균출현율이 5% 미만으로 PAT는 염색체이상 유발성에 대해서 음성으로 판단되었다.

마우스 골수세포를 이용한 소핵시험에서는 시험물

질 투여 후 24시간동안 사망동물은 없었으며 특이한 임상증상도 관찰되지 않아, PAT는 소핵다염성적혈구의 관찰빈도는 음성대조군에 비해 유의성 있는 변화를 나타나지 않아 PAT는 소핵유발성이 없는 것으로 판단되었다.

이상의 실험에서 제초제저항성 유전자 발현 단백질 PAT는 유전자에 아무런 변화를 주지 않아 유전독성을 유발하지 않을 것으로 사료된다. 미국 EPA에서는 병해충 저항성 유전자가 도입되어 발현되는 단백질이 농약처럼 작용한다고 하여 plant-pesticide로 분류하고, 유전자변형농산물 및 유전자도입 발현단백질에 대한 안전성평가를 위한 포유동물에 대한 독성시험법은 기존의 화학농약의 시험기준과 방법에 면역독성시험을 추가하는 시험기준과 방법을 검토 중에 있다(EPA, 2000). 그리고 신규로 개발된 GMO이 영양성분, 독소성분, 알레르기 유발성질 등 기존작물과의 동질성을 고려하여 식품의 안전성을 평가하는 "실질적동등성(Substantial equivalence)" 개념이 도입되어 있지만(OECD 1993a; Padgett 등 1996; Kearns와 Mayers, 1999; Novak와 Haslberger, 2000), 이 개념 또한 생화학적, 면역학적 및 독성학적 시험이 제공되지 않기 때문에 과학적이지 못하는 주장이 제기되고 있어(Millstone 등 1999), 여전히 유전자변형작물인 GMOs에 대한 안전성 논란이 진행되고 있다.

본 시험에 사용된 재료는 극히 일부에 지나지 않으므로 모든 유전자변형농산물에 적용할 수는 없을 것으로 사료되며, 앞으로 더 많은 유전자변형 식품에 대해 신뢰성 있는 평가방법이 개발되어야 할 것으로 판단된다.

인용문헌

- Cao, J., X. Duran, D. McElory and R. Wu (1992) Regeneration of herbicide resistant transgenic rice plants following microprojectile-mediated transformation of suspension culture cells. *Plant Cell Rep.* 11:586~591.
- De Block, M., J. Botterman, M. Vandewiele, J. Dockx, C. Thoen, V. Gossele, V. Rao, N. Movva, C. Thompson and M. Van Montage (1987) Engineering herbicide resistance in plants by expression of a detoxifying enzyme. *EMBO J.* 6:2513~2518.

- De Block, M., D. De Brouwer and P. Tenning (1989) Transformation of *Brassic napus* and *Brassica oleracea* using *Agrobacterium tumefaciens* and the expression of the bar and neo genes in the transgenic plants. *Plant Physiol.* 91:694~701.
- EPA (2000) FIFRA Scientific Advisory Meeting(SAP) on Guidelines for Mammalian toxicity assessments for protein plant-pesticides. Environmental protection agency. U.S.A.
- FAO (1996) Biotechnology and food safety, report of a joint FAO/WHO consultation. FAO Food and Nutrition paper 61, Food and Agriculture Organisation of the united nations, Rome.
- Galloway, M. S., T. Sofuni, M. D. Shelby, X. Thlagar, V. Kumaroo, P. Kaur, B. Anderson, E. Zeiger, and M. Jr. Ishdate(1997) Multilaboratory comparison of *in vitro* tests for chromosome aberration in CHO and CHL cells tested under the same protocols, *Environ. Mutagens & Carcinogens* 29(2):198~207.
- Hayes, A. W. (1989) Genetic toxicology in principle and methods of toxicology. pp.407~435, Raven press, USA.
- Hayashi, M., I. Yoshimura, T. Sofuni and M. Jr. Ishdate (1989) A procedure for data analysis of the rodent micronucleus test involving a historical control. *Environ. Mol. Mutagen.* 13:347~356.
- Hayashi, M., S. Hashimoto, Y. Sakamoto, S. Hamada, T. Sofuni and I. Yosumura (1994) Statical analysis of data in mutagenicity assays : Rodent micronucleus assays, *Environ. Health Prespect.* 102 Suppl.(1):49~52.
- Ishdate, M. Jr. and S. Odashima (1977) Chromosome tests with 134 compounds on chinese hamster cells *in vitro* a screening for chemical carcinogens. *Mutat. Res.* 48:337~354.
- Jail, R.K., M. Coffey, K. Lai, A.Kumur and S.L. MacKenzie(2000) Enhancement of seed oil content by expression of glycerol-3-phosphate acyltransferase genes. *Biochemical Society Trans.* 28:958~961
- Kearns, P. and P. Mayers (1999) Substantial equivalence is a useful tool, *Nature* 401, 640.
- Macgregor, J. T., J. A. Heddle, M. Hite, B. H. Margolin, C. Ramel, M. F. Salamone, R. R. Tice and D. Wild (1987) Guidelines for the conduct of micronucleus assays in mammalian bone marrow erythrocyte, *Mutation Res.* 198:103~112.
- Maron, D. H and B. N. Ames (1983) Revised methods for the salmonella mutagenicity test. *Mutation Res.* 113:173~215.
- Millstone, E., E. Brummer, and S. Mayer(1999) Beyond 'Substantial equivalence'. *Nature* 401, 525-526.
- Murphy, D. J. (1999) Manipultion of plant oil composition for the production of valuable chemicals. Progress, problems, and prospects. *Adv. Exp. Med. Biol.* 464:21~35.
- Novak, W. K. and A. G. Haslberger (2000) Substantial equivalence of antinutrients and inherent plant toxins in genetically modified novel foods, *Food and Chemical Toxicology* 38:473~483.
- OECD (1993a) Safty evaluation of foods derived through modern biotechnology: concepts and principles. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, France.
- OECD (1993b) "OECD guideline for the testing of chemicals, Documents 471, genetic toxicolgy: *Salmonella typhimuriun*, Reverse Mutaion assay". Organization for Economic Co-operation and Development, Paris, France.
- OECD (1993c): "OECD guideline for the testing of chemicals, Documents 473, genetic toxicolgy: *in vitro* mammalian cytogenetic test". Organization for Economic Co-operation and Development, Paris, France.
- Padgette, S. R., N. B. Taylor, D .L. Nida, M. R. Bailey, J. Macdonald, L. R. Holden and R. L. Fuchs (1996) The composition of glyphosate-tolerant soybean seeds is equivalent to that of conventional soybeans. *J. Nutr.*126(3):702~716.
- Parveez, G. K. A., M. M. Masri, A. Zainal, N. A. Majid, A. M. M. Yunus, H. H. Fadiah, O. Rasid and S. C. Cheah(2000) Transgenic oil palm : Production and projection. *Biochemical Society Trans.* 28:969~972.
- Salamore, M. (1980) Towards an improved micro-

- nucleus test: Studies on 3 model agent, mitomycin C, cyclophosphamide and dimethylbenzanthracene. *Mutat. Res.* 74:347~356.
- Schimid, W. (1975) The micronucleus test. *Mutat. Res.* 31:9~15.
- Spencer, T. M., W. J. Gordon-Kamm, R. J. Daines, W. G. Start and P. G. Lemaux (1990) Bialaphos selection of stable transformants from maize cell culture. *Theor. Appl. Genet.* 79:625~631.
- Strauch, E., W. Wohlleben and A. Puhler (1988) Cloning of a phosphinotricin N-acetyltransferase gene from *Streptomyces viridochromogene* Tu494 and its expression in *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli*. *Gene* 63:65~74.
- Thompson, C. J., N. R. Movva, R. Tizard, R. Cramer, J. E. Davies, M. Lauwereys and J. Botterman (1987) Characterization of the herbicide-resistance gene *bar* from *Streptomyces hygroscopicus*. *EMBO J.* 6:2519~2523.
- 권창희, 권병준, 강영배, 윤용덕 (1993) 유전자 조작 Vector 이용 동물용 백신 개발 전망. *대한수의사회지* 29(12):728~734.
- 농촌진흥청 (1999) 유전자전환작물의 안전관리 방안에 관한 세미나. pp.3~10 농촌진흥청. 농업과학기술원.

Mutagenicity Studies of the Herbicide-resistance Phosphinotricin Acetyltransferase (PAT)

Mihye Jeong*, Aresun You, Jebong Lee¹, Jinsup Shin¹, Jinhwa Kim and Jeung-sul Han(Hazardous Substances Division, NIAST, RDA, Suwon 441-707, and ¹Pesticide Safety Division, NIAST, RDA, Suwon 441-707, Horticultural Biotechnology Division, NHRI, RDA, 440-706)

Abstract : To evaluate mutagenicity of Phosphinotricin Acetyltransferase(PAT) which is expressed by the glufosinate-resistance gene *pat*, *in vitro* reverse mutation test using *Salmonella typhimurium*, chromosome aberration test using chinese hamster lung(CHL) cells and *in vivo* micronucleus test of mice were performed. In the reverse mutation, the PAT did not induce mutagenicity in *Salmonella typhimurium* TA 98, TA 100, TA 1535, TA 1537 with and without metabolic activation at 5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$. In the chromosome aberration test, the results showed no incidence of increased structural and numerical chromosome aberrations at any doses tested(100, 10, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$). In micronucleus test, the ratio of micronuclei was measured in polychromatic erythrocytes of bone marrow of male ICR mice intraperitoneally administrated with PAT(1250, 625, and 313 mg/kg), the results showed no incidence of increased micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPCE). These results indicate that PAT might not have mutagenic potential *in vitro* and *in vivo* systems.

*Corresponding author (Fax : 031-290-0506, E-mail : mhjeong@rda.go.kr)