

정부간행물발간등록번호

11-1352159-001366-01

2019

Ministry of Health & Welfare
Korea Centers for Disease Control & Prevention

유전자 변형생물체 위해성 평가심사가이드



보건복지부
질병관리본부

들어가는 말

유전자변형생물체(Living modified organism, LMO)로 인한 잠재적 위해를 사전예방하기 위하여 국제협약인 「바이오안전성의정서」가 2000년에 채택되었고, 우리나라 또한 국내 이행을 위하여 「유전자변형생물체의 국가간 이동 등에 관한 법률」을 제정하여 2008년부터 시행해오고 있습니다.

LMO는 용도에 따라 보건복지부 등 해당 부처별로 관리하고 있습니다. 보건복지부에서는 보건의료용 LMO 및 시험연구용 LMO 중 국민보건상 안전관리가 필요한 LMO가 인체 및 보건환경에 미치는 위해를 사전에 예방하기 위한 업무를 담당하고 있습니다.

이에, 보건복지부에서는 ① LMO가 인체에 미치는 위해를 사전에 예방하기 위한 인체위해성 협의심사 ② 국민보건상 안전관리가 필요한 LMO 수입 및 개발·실험의 위해성에 대한 승인심사 ③ 보건의료용 LMO 수입 및 이용의 위해성에 대한 승인심사 업무를 수행하게 되었습니다.

위해성심사는 유전자변형생물체법 통합고시에서 제시한 위해성평가 항목에 따라 위해성평가 일반원칙 및 방법을 준수하여 이루어집니다. 위해성 평가자료는 높은 전문성을 요구하므로 적절한 절차에 의해 수행되지 않을 경우 많은 비용과 시간이 소요됩니다. 따라서 질병관리본부에서는 LMO를 개발 및 실험하는 연구자, 위해성 평가자료 작성자 및 심사자가 위해성 평가·심사 업무를 원활히 수행하는 데 도움을 주기 위하여 「유전자변형생물체 위해성 평가·심사 가이드」를 2014년에 제정하였고, 2019년에 개정하게 되었습니다.

또한 본 가이드에서는 사례별 예시를 제시하였으므로 LMO 위해성평가 및 심사 업무를 수행하는 데 도움이 되기를 기대합니다.

CONTENTS

Chapter 01	보건복지부 소관 유전자변형생물체(LMO) 위해성평가·심사 안내	1
	1. 보건복지부 소관 LMO의 위해성평가·심사	3
	가. LMO 개발·실험	3
	나. 보건의료용 LMO	6
	다. 타 부처 소관 LMO	8
	2. 보건복지부 위해성평가 및 심사 안내	9
Chapter 02	위해성심사 신청자를 위한 안내	13
	1. LMO 개발·실험 승인 신청서 작성	15
	2. 보건의료용 LMO 위해성 평가자료	17
	가. 인체위해성 평가자료	17
	나. 환경위해성 평가자료	18
Chapter 03	위해성심사자를 위한 안내	25
	1. LMO 개발·실험 승인 위해성심사	27
	2. 보건의료용 LMO 위해성심사	30
	가. 직접적인 위해성	33
	나. 간접적인 위해성	34
	3. 타 부처 소관 LMO 인체위해성 협의심사	37
	가. 인체위해성 협의심사	37
	나. 인체위해성 평가항목 검토방향	39
	참 고	
01	LMO 개발·실험 승인신청을 위한 위해성 평가자료(작성예시)	45
02	보건의료용 LMO 위해성심사 신청을 위한 평가자료(작성예시)	90
03	타 부처 소관 LMO 인체위해성 협의심사자료(작성예시)	152
04	유전자변형 모기 환경방출 위해성평가 결과(사례 보고서)	175



2019

Ministry of Health & Welfare
Korea Centers for Disease Control & Prevention

01

보건복지부 소관 유전자변형생물체(LMO) 위해성평가·심사 안내

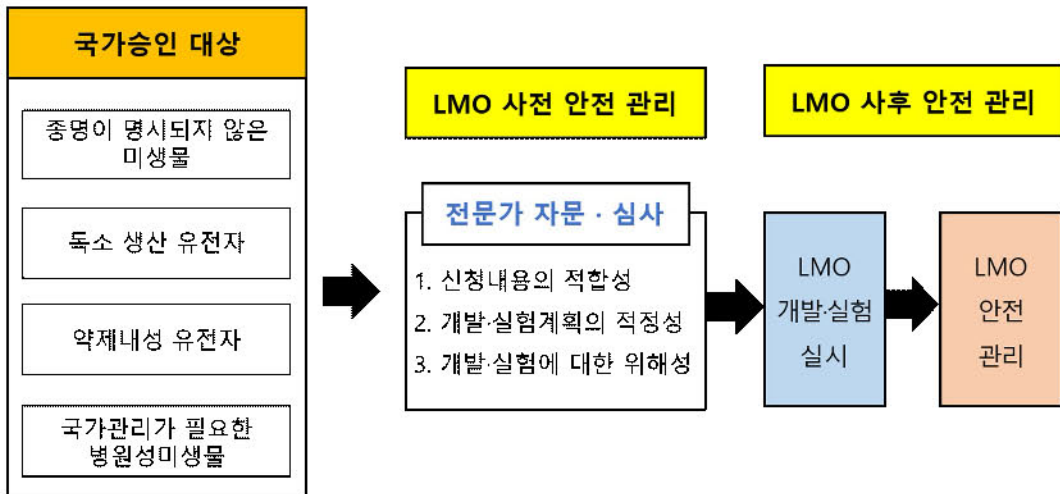
- | | |
|---------------------------|---|
| 1. 보건복지부 소관 LMO의 위해성평가·심사 | 3 |
| 2. 보건복지부 위해성평가 및 심사 안내 | 9 |



01 보건복지부 소관 유전자변형생물체(LMO) 위해성평가 · 심사 안내

1 보건복지부 소관 LMO의 위해성평가 · 심사

가. LMO 개발 · 실험



국가관리가 필요한 시험·연구용 LMO의 개발·실험은 질병관리본부장의 승인을 받아야 합니다.

※ 국가관리가 필요한 시험·연구용 LMO의 수입승인은 보건복지부 소관 유전자변형생물체 안전관리 가이드를 참고하시기 바랍니다.

- 유전자변형생물체의 국가간 이동 등에 관한 법률(이하 유전자변형생물체법) 시행령 제2조1항4호에 의거하여, 국민보건상 국가관리가 필요한 다음의 LMO는 질병관리본부장의 승인을 받습니다.

1. 종명까지 명시되어 있지 아니하고 인체병원성 여부가 밝혀지지 아니한 미생물을 이용하는 경우
2. 척추동물에 대하여 몸무게 1kg당 50% 치사독소량이 100ng 미만인 단백질 독소를 생산할 능력을 가진 유전자를 이용하는 경우
3. 자연적으로 발생하지 아니하는 방식으로 미생물에 약제내성 유전자를 의도적으로 전달하도록 하는 경우
4. 국민보건 상 국가관리가 필요한 병원성미생물의 유전자를 직접 이용하거나, 해당 병원성미생물의 유전자를 합성하여 이용하는 경우

- ✓ 해당 생물체 이용 또는 생물체의 유전자 자체이용·유전자를 합성하여 이용하는 모든 경우가 포함됩니다.
- ✓ 해당 LMO는 개발·실험을 위해 수입·사용할 경우 질병관리본부장의 승인을 받아야 하며, 박람회·전시회 출품을 위해 사용할 경우에는 질병관리본부에 사전신고하여야 합니다.

국가승인 대상 단백질성 독소 목록은 다음과 같습니다.

- | | |
|------------------------------|---|
| ✓ 보툴리눔 독소(A, B, C, D, E, F형) | ✓ 기타 척추동물에 대하여 몸무게 1kg당 50% 치사 독소량이 100ng 미만의 수치를 갖는 것으로 알려진 독소 |
| ✓ 파상풍 독소 | |
| ✓ 이질 신경독소 | |
| ✓ 디프테리아 독소 | |

국가승인 대상에서 제외되는 약제내성 유전자의 이용조건은 다음과 같습니다.

※ 약제내성 유전자 이용시 국가승인을 받아야하나, 국가승인 대상에서 제외되는 약제내성 유전자의 이용조건은 다음과 같습니다.

- Ampicillin, Chloramphenicol, Hygromycin, Kanamycin, Streptomycin, Tetracycline, Puromycin, Zeocin 내성유전자로 인정 숙주-벡터계를 이용하여 개발한 유전자변형미생물
 - ✓ 약제내성 유전자를 의도적으로 전달하도록 하는 경우, 자연 조건에서의 생존력이 낮은 숙주와 숙주 의존성이 높은 벡터를 조합시켜 특정 약제내성 유전자를 도입한 숙주-벡터계(인정 숙주-벡터계)

국민보건 상 국가관리가 필요한 병원성미생물의 목록은 다음과 같습니다.

세균 및 진균	바이러스	
<ul style="list-style-type: none"> ▶ 페스트균 <i>Yersinia pestis</i> ▶ 탄저균 <i>Bacillus anthracis</i> ▶ 브루셀라균 <i>Brucella melitensis, Brucella suis</i> ▶ 비저균 <i>Burkholderia mallei</i> ▶ 멜리오이도시스균 <i>Burkholderia pseudomallei</i> ▶ 보툴리눔균 <i>Clostridium botulinum</i> ▶ 이질균 <i>Shigella dysenteriae</i> Type 1 ▶ 클라미디아 시타시 <i>Chlamydia psittaci</i> ▶ 큐열균 <i>Coxiella burnetii</i> ▶ 야토균 <i>Francisella tularensis</i> ▶ 발진티푸스균 <i>Rickettsia prowazekii</i> ▶ 흥반열 리케치아균 <i>Rickettsia rickettsii</i> ▶ 콕시디오이데스균 <i>Coccidioides immitis, Coccidioides posadasii</i> ▶ 콜레라균 <i>Vibrio cholerae</i> O1 · O139 	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 헤르페스 B 바이러스 Cercopithecine herpesvirus 1, Herpes B virus ▶ 크림미안 콩고 출혈열 바이러스 Crimean-Congo haemorrhagic fever virus ▶ 이스턴 이콰인 뇌염 바이러스 Eastern Equine Encephalitis virus ▶ 에볼라 바이러스 Ebola virus ▶ 헨드라 바이러스 Hendra viruses ▶ 라싸 바이러스 Lassa virus ▶ 마버그 바이러스 Marburg virus ▶ 원숭이포क्स 바이러스 Monkeypox virus ▶ 니파 바이러스 Nipah virus ▶ 리프트 벨리얼 바이러스 Rift Valley fever virus ▶ 남아메리카 출혈열 바이러스 South American haemorrhagic fever; Flexal, Guanarito, Junin, machupo, Sabia ▶ 황열 바이러스 Yellow fever virus ▶ 서부 마 뇌염 바이러스 Western equine encephalitis virus 	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 진드기 매개 뇌염 바이러스 Central European Tick-born encephalitis virus, Far Eastern Tick-born encephalitis virus, Siberian Tick-born encephalitis virus, Kyasanur Forest disease virus, Omsk haemorrhagic fever virus ▶ 두창 바이러스 Variola virus ▶ 소두창 바이러스 Variola minor virus, Alastrim ▶ 베네주엘라 이콰인 뇌염 바이러스 Venezuelan Equine Encephalitis virus ▶ 중증 급성호흡기 증후군 코로나 바이러스(SARS-CoV) ▶ 조류 인플루엔자 인체감염증 바이러스 혈청형 H5N1, H7N7, H7N9 ▶ 고위험 인플루엔자 바이러스 1918 influenza virus의 8개 병원성 유전자중 하나 이상의 유전자를 포함하는 influenza virus ▶ 전염성 해면상 뇌병증 병원체 Bovine spongiform encephalopathy prion, variant Creutzfeldt-Jakob disease prion
<p>그 밖에 보건복지부장관이 외부에 유출될 경우 공중보건상 위해 우려가 큰 세균, 진균, 바이러스 또는 프리온으로서 긴급한 관리가 필요하다고 인정하여 지정 · 공고하는 병원체</p> <ul style="list-style-type: none"> ▶ 중동 호흡기 증후군 코로나 바이러스(MERS-CoV) 		

나. 보건의료용 LMO

질병예방, 공중보건 및 위생활동 등을 위한 제품에 포함된 LMO 또는 제품에 포함되지는 않으나 제품 생산용 원재료로 사용되는 LMO가 해당됩니다.

- 보건의료용 LMO는 보건의료 분야에 사용될 목적으로 연구·개발·수입·수출·판매·운반·보관·이용되는 LMO를 의미합니다.
 - ✓ 다시말해 질병예방·공중보건 및 위생활동을 위한 LMO 및 LMO를 재료로 사용한 생물학적 제품이 보건의료용 LMO입니다.
 - ✓ 인체·동물의약품과 식품, 의료기기 분야에 이용되는 LMO는 제외됩니다(유전자변형 생물체법 제3조, 동법 시행령 제2조1항6호 및 7호)

 - 보건의료용 LMO는 화장품, 의약외품, 위생용품(살생물제 포함)의 원재료 또는 완제품에 이용될 수 있습니다.
 - ✓ 화장품 및 화장품 원재료의 생산을 위해 이용되는 LMO는 보건의료용 LMO입니다.
 - ✓ 소독 및 살균을 위한 살생물제나 원재료로 이용되는 LMO는 보건의료용 LMO입니다.
- ※ 살생물제는 미생물의 활동을 저감하는 비농업용 멸균제, 소독제, 살균제, 방부제 및 살충제 등을 총칭하는 용어로 「생활화학제품 및 살생물제의 안전관리에 관한 법률」(이하 화학제품 안전법)에 따라 2019년부터 환경부가 관할하는 제제를 의미합니다.

	공중보건용 살생물제품(인체 감염성 미생물 저감용)				
	멸균제	소독제	살균제		방부 살균제
			식품 비접촉 살균제	식품 접촉 살균제	
사용 대상	병원 내과·외과용 기구·장비·시설 등 사용	병원 기구·시설 등 사용, 일반 가정용, 수영장, 정수기 등 사용	카페트, 공기, 세탁 첨가, 변기세정	접시, 주방용품, 낙농업체 등의 장비·기구, 식품가공공장 등	살아있는 인간이나 동물

※ 화학물질로 만들어진 살생물제는 보건의료용 LMO가 아닙니다.

- ✓ 보건의료용 공산품(위생용품 등)에 사용되는 생물학적 물질의 생산을 위해 이용되는 LMO는 보건의료용 LMO입니다.

- ✓ 그 외 모기, 파리, 쥐 등 질병매개체 방역을 위한 LM 모기 · 파리 · 바이러스도 보건의료용 LMO에 해당합니다.
- ✓ 약사법 제2조에 따라 인체용 의약품에 해당되는 의약품 원재료는 보건의료용 LMO의 대상이 아닙니다.
- ✓ 체외진단기에 사용되는 표준물질 생산용 LMO는 의료기기 분야에 속하므로 보건의료용 LMO의 영역에서 제외됩니다.

□ 이러한 보건의료용 LMO를 요약 정리하면 아래와 같습니다.

1. 화장품 원재료 생산을 위한 LMO 및 LMO 이용 제품
 - ※ 의약품 및 의료기기가 아닌 보건의료 용도 사용
2. 인체감염성 미생물 및 질병매개체 조절 목적 등을 위한 LMO 및 LMO 이용 제품
 - ※ 멸균제, 살균제, 소독제, 방부제 및 살충제 등 공공보건 용도 사용
3. 환경성 질환 예방 등, 보건의료 환경 개선 목적 등을 위한 LMO 및 LMO 이용 제품
 - ※ 비누, 샴푸, 핸드워시 등 공공/개인 위생용도 사용
4. 수술용 실, 거즈, 장갑 등을 위한 LMO 및 LMO 이용 제품
 - ※ 보건의료 용도로 사용되는 생물학적 공산품 및 의약품 등

- ✓ 제품의 분류에 따른 관련 안전관리 법률에 근거하여 HACCP, GMP 등 제조시설 설치운영기준이 적용될 수 있으므로, 식품의약품안전처 등 관계기관에 문의하시기 바랍니다.

다. 타 부처 소관 LMO

- 소관별 LMO를 담당하는 중앙행정기관은 전문가심사위원회를 구성하여 소관 LMO의 위해성을 심사합니다.
 - ✓ 유전자변형생물체법 제7조의2 제3항에 근거하여, 인체위해성에 대한 심사협의를 보건복지부(질병관리본부)가 수행하며, 환경위해성에 대한 심사협의를 LMO가 이용되는 환경에 따라 농림축산식품부·환경부·해양수산부가 수행합니다.

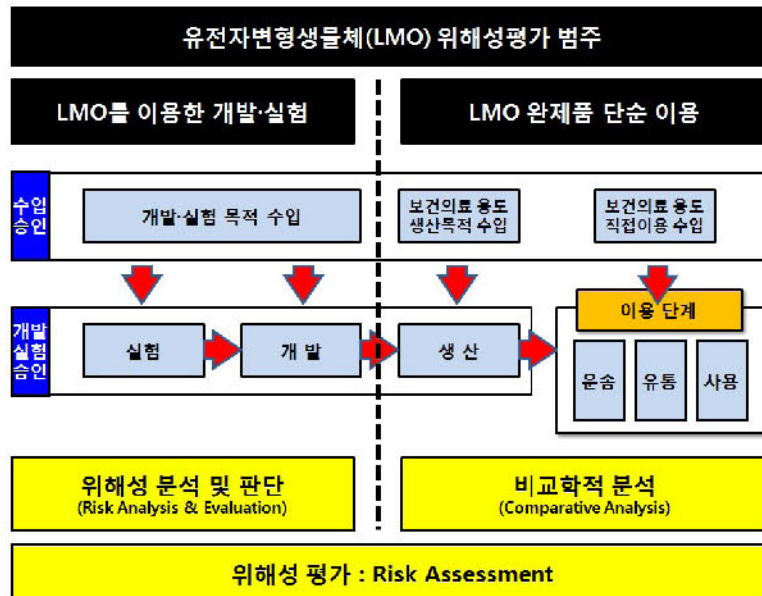
- 질병관리본부는 「유전자변형생물체 보건안전 전문가위원회」(이하, '전문가위원회')를 두어 인체위해성에 대한 협의심사를 수행합니다.
 - ✓ 동법 시행령 제4조의4에 근거하여, 협의를 요청한 관계 중앙행정기관의 장은 특별한 사유가 없는 한 질병관리본부의 심사결과를 위해성심사에 반영하게 됩니다.

2 보건복지부 위해성평가 및 심사 안내

LMO를 수입·생산·이용하고자 한다면 관계 중앙행정기관의 위해성심사를 받아야 합니다.

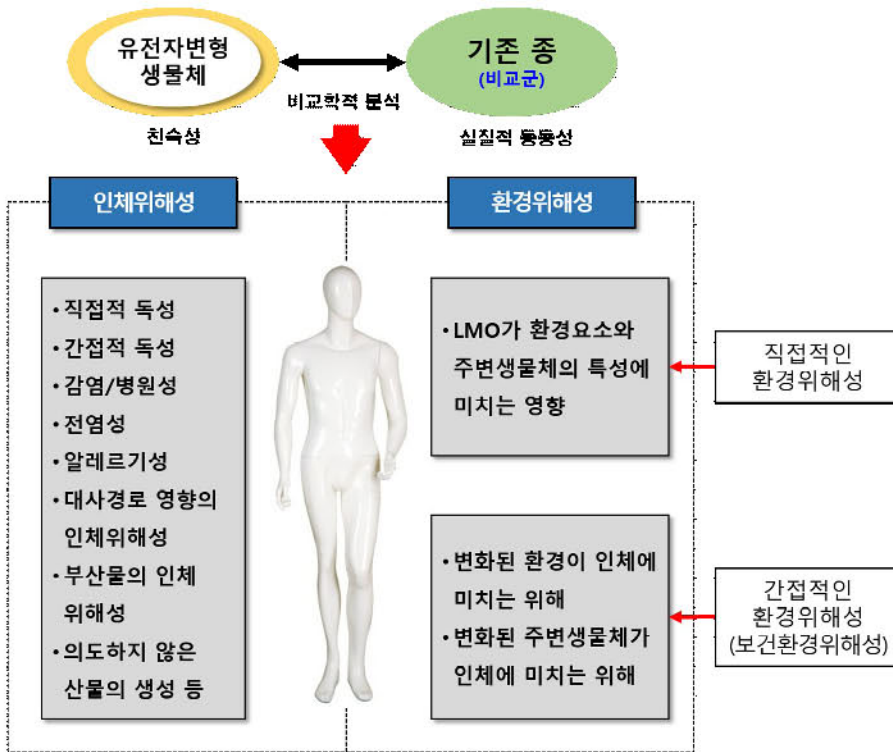
- 유전자변형생물체법 제7조의2에 의거하여, LMO를 수입 · 생산 · 이용하려 하는 신청자는 관계 중앙행정기관의 위해성심사를 먼저 받아야 합니다.
 - ✓ 국가관리가 필요한 LMO의 위해성심사는 질병관리본부에서 수행(유전자변형 생물체법 통합고시 제1-3조제5항) 합니다.
 - ✓ 위해성심사 신청은 유전자변형생물체 위해성심사신청서와 위해성심사에 필요한 자료(이하 위해성평가자료, 참고 1~3 참조)를 질병관리본부장에 제출하면 됩니다.
 - ✓ 위해성평가자료는 크게 인체위해성과 환경위해성을 평가하기 위한 자료로 구분 (통합고시 별표 9-7 및 10-1, 참고 4 참조)됩니다.

- LMO는 아래 조건에 따라 적용되는 위해성심사 방법이 다릅니다.



- ✓ 개발 · 실험에 이용하기 위한 LMO는 위해성 분석 및 판단(Risk Analysis & Evaluation)에 의해 위해성을 평가합니다.

- ✓ LMO 완제품(Event)은 기존 종(Conventional counterpart)과의 비교학적 분석(Comparative analysis)에 의해 위해성을 평가합니다.
- 위해성 분석 및 판단에 의한 위해성평가는 다음의 사항을 평가합니다.
 - ✓ LMO 개발·실험을 위한 공여체, 숙주, 벡터, 도입유전자, 실험방법, 실험시설, 독성 및 알레르기 유발유무, 안전관리 사항에 대해, 과학적이고 객관적인 자료를 바탕으로 안전성을 평가합니다.
- 비교학적 분석에 의한 위해성평가는 다음의 사항을 평가합니다.
 - ✓ 친숙성(Familiarity) : LMO의 생물학적 특성이 잘 알려진 생물체로부터 개발되었다는 사실에 근거하여, LMO가 미칠 수 있는 위해성을 증명하는 데 충분한 과학적이고 객관적인 자료가 제출될 수 있음을 바탕으로 합니다.
 - ✓ 실질적 동등성(Substantial equivalence) : 인간에게 안전하게 이용된 기존 종을 비교군으로 하여, LMO가 비교군만큼 안전함을 과학적이고 객관적인 자료를 바탕으로 평가합니다.
- 위해성심사를 위해 제출되는 평가자료는 LMO의 위해성을 객관적이고 과학적으로 증명한 연구결과입니다.
 - ✓ 이론적·기술적으로 불가능하거나 작성이 불가능하거나 불필요하다고 인정되는 경우, 해당 자료의 제출이 면제될 수 있습니다.
 - ✓ LMO통합고시 제5-2조에 근거하여, 다음의 연구결과만 인정됩니다.



1. 전문학술지에 게재된 자료
2. 우수실험실관리기준(GLP)에 의하여 시험한 자료
3. 대학 또는 연구기관 등 국내외 전문기관에서 시험한 것으로 해당 기관의 장이 발급하고 그 내용(이 경우 연구기관의 시험시설 개요, 주요설비, 연구 인력의 구성, 시험자의 연구경력 등이 기재되어야 함)을 검토하여 타당하다고 인정할 수 있는 자료
4. 외국에서 유전자변형생물체의 위해성심사 당시 제출된 자료. 이 경우 그 외국 정부가 유전자변형생물체의 사용을 승인하였음을 확인할 수 있는 자료

✓ 요약보고서가 외국어일 때에는 원문과 번역문을 모두 제출합니다.

위해성평가 자료는 적절한 시설에서 수행된 자료만이 인정됩니다.

- 위해성평가 실험은 적절한 연구 또는 생산시설에서 이루어져야 하며, 국내에서 수행될 경우 사전에 시설의 신고 또는 허가를 취득하여야 합니다.
 - ✓ 적절한 시설에서 수행되지 않은 평가는 위해성심사 시 인정되지 않습니다.

- 자체적인 위해성평가 실험이나 분석이 어려운 경우, 중앙행정기관에서 지정한 위해성평가 기관에 위탁하여 수행할 수 있습니다.
 - ✓ 유전자변형생물체법 시행령 제26조의2에 근거하여, 중앙행정기관은 위해성평가 기관을 지정하여 운영하고 있습니다.
 - ✓ 신청자는 위해성평가 기관에 LMO의 위해성평가 실험이나 분석을 의뢰할 수 있습니다.
 - ✓ 위해성평가 실험 및 분석에는 소정의 비용이 소요됩니다.

2019

Ministry of Health & Welfare
Korea Centers for Disease Control & Prevention

02

위해성심사 신청자를 위한 안내

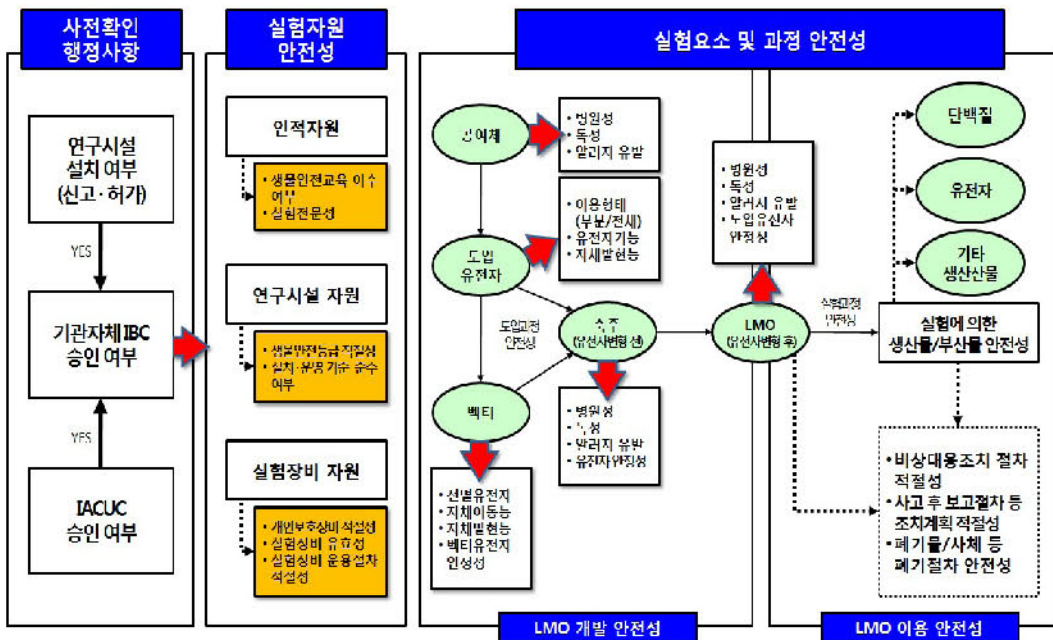
- | | |
|--------------------------|----|
| 1. LMO 개발 · 실험 승인 신청서 작성 | 15 |
| 2. 보건의료용 LMO 위해성 평가자료 | 18 |



02 위해성심사 신청자를 위한 안내

1 LMO 개발 · 실험 승인 신청서 작성

위해성심사 신청 전, 제출되어야 하는 생물안전 사항에 대하여 검토하시기 바랍니다.



□ 국가승인 대상 유전자변형생물체 개발 및 실험의 위해성심사 신청 전, 행정사항을 확인하시기 바랍니다.

- ✓ LMO 개발 및 실험이 수행되는 생물안전 연구시설이 관련 중앙행정기관에 설치 · 운영 신고 혹은 허가되었는지 확인하시기 바랍니다.
- ✓ 생물안전 1등급(BL1) 및 2등급(BL2) 연구시설은 과학기술정보통신부에 신고하며, 인체위해 생물안전 3등급(BL3) 및 4등급(BL4) 연구시설은 질병관리본부의 허가를 받아야 합니다.

※ 단, 국공립 연구기관의 생물안전 1등급(BL1) 및 2등급(BL2) 연구시설은 관계중앙행정기관의 장에게 신고하여야 합니다.

- ✓ 국가승인이 필요한 개발·실험은 승인 신청 전에 기관생물안전위원회(Institutional Biosafety Committee, IBC)의 승인을 받으시기 바랍니다.
- ✓ 실험동물을 이용한 연구를 계획할 경우, 사전에 동물이용 관련시설 신고·허가 여부를 확인하신 후 동물실험윤리위원회(Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC)의 승인을 받으시기 바랍니다.
- 사전에 취득하여야 하는 행정사항이 완료되었다면 실험자원, 실험요소 및 과정에 대한 안전성을 구체적으로 설명하는 위해성평가서를 작성하시기 바랍니다.

위해성평가서는 안전한 실험을 위한 계획 및 이를 수행하는 데 안전한지 여부를 기술합니다.

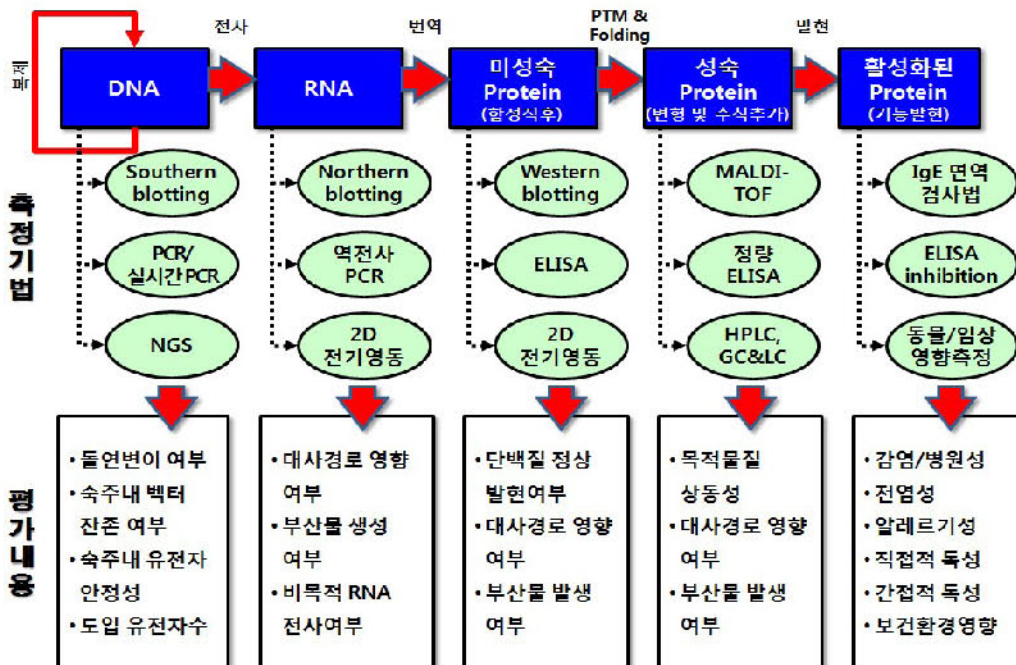
- 안전한 시설에서 안전하게 설계된 실험을 체계적으로 수행하고 점검하는지 여부를, 과학적 근거에 기반하여 설명하시기 바랍니다.
 - ✓ 국가승인 대상 실험의 공여체, 숙주, 벡터, 도입유전자, 실험방법, 실험시설, 독성 및 알레르기 유발유무, 안전관리 사항을 설명하여야 합니다.
 - ✓ 실험과정에서 발생하는 위해도와 해당 생물안전 연구시설 안전관리 등급이 적절함을 기술합니다.
 - ✓ 해당기관 자체의 생물안전규정이 마련되어 있으며 연구자는 표기를 준수하고 있음을 설명하여야 하고, 규정에는 생물안전 사고 등 비상시 대응 절차 등이 포함될 수 있습니다.
- 실험요소 및 실험과정의 안전성을 충분히 설명하시기 바랍니다.
 - ✓ 공여체가 병원성이라 할지라도 실험에 이용하는 유전자가 비병원성 또는 비독성 이라면, 위해성이 감소할 수 있습니다.
 - ✓ 인위적인 조치 없이 벡터가 다른 생물체로 이동하거나 전이될 수 있다면, 위해성이 증가합니다.
 - ✓ 유전자를 숙주에 도입함에 의해, 숙주의 위해성이 증가한다면 이를 충분히 설명하여야 합니다.
 - ✓ 개발된 LMO 자체를 이용 또는 개발된 LMO로부터 생산된 산물을 이용하는 실험의 과정 및 결과물에 대하여 충분히 설명하여야 합니다.
- 구체적인 위해성평가자료 기술사항은 ‘참고 1. LMO 개발·실험 승인신청을 위한 위해성평가자료(작성예시)’를 확인하시기 바랍니다.

2 보건의료용 LMO 위해성 평가자료

가. 인체위해성 평가자료

신청자는 LMO가 인체에 미치는 위해성에 대한 평가자료를 제출하여야 합니다.

- 인체위해성평가는 LMO가 인체에 미칠 수 있는 영향을 평가합니다.
 - ✓ 특정 조건에서 위험원에 노출 시, 인간에게 일어날 수 있는 악영향 및 그 가능성 그리고 수반되는 불확실성을 설명합니다.
- 인체위해성평가는 직접적인 위해성을 검토합니다.
 - ✓ 직접적인 위해성은 LMO가 인체에 미치는 독성, 알레르기성, 감염·병원성, 전염성, 대사경로 영향여부, 부산물 생성여부 등이 해당됩니다.



※ Post Translational Modification(PTM)의 형태 : 수식후가(당, 인산화 등) / 아미노산신기 새조합 / Protein 절단 및 재구성 등

- ✓ 각각의 검토요소에 대하여, 신청자는 과학적이고 객관적인 자료로 LMO의 인체위해성에 대한 안전성을 증명합니다.

나. 환경위해성 평가자료

신청자는 LMO가 환경에 미치는 위해성에 대한 평가자료를 제출하여야 합니다.

※ 환경위해성심사는 환경관련 부처 및 질병관리본부에서 심사합니다.

- 환경위해성평가(Environmental risk assessment, ERA) 심사는 보건의료용 LMO가 특정 생태계에 미치는 영향에 대해서 법률 제7조의2에 근거하여 관계부처의 협의심사를 거치게 됩니다.
 - ✓ 작물재배 환경에 미치는 영향은 농림축산식품부에 협의심사를 요청합니다.
 - ✓ 자연생태계에 미치는 영향은 환경부에 협의심사를 요청합니다.
 - ✓ 수산 환경 및 해양생태계에 미치는 영향은 해양수산부에 협의심사를 요청합니다.

- 질병관리본부는 보건의료용 LMO가 보건환경에 미치는 위해성을 심사합니다.
 - ✓ 보건의료용 LMO가 환경이나 주변생물체(병원체 등)에 1차적인 영향으로 인해, 2차적인 인체 위해가 발생하는지를 심사합니다.

- 환경 위해성심사는 2단계로 이루어집니다.
 - ✓ 1단계 : 보건의료용 LMO가 환경이나 주변생물체의 특성을 변화시킬 위해성이 있는지 여부를 심사합니다.
 - ✓ 2단계 : 변화된 환경이나 주변생물체가 인체에 위해를 미칠 수 있는지 여부를 심사합니다.
 - 1단계 환경위해성심사는 다음의 사항을 검토합니다.
 - ✓ 보건의료용 LMO가 환경요소와 주변생물체의 특성, 감염/병원성, 전염성 등에 영향을 주는지 심사합니다.
 - ✓ 이를 위해 LMO의 도입유전자 및 부산물 등이, 환경요소와 주변생물체에 전이되거나 영향을 주는지를 과학적이고 객관적인 자료를 근거로 검토합니다.
 - ✓ 만일 LMO가 환경요소와 주변생물체에 영향을 주지 않는다고 판단되면, 환경위해성심사는 1단계에서 종료됩니다.

○ 2단계 환경위해성심사는 다음의 사항을 검토합니다.

- ✓ 보건의료용 LMO가 환경요소와 주변생물체에 영향을 준다고 결정되면, 2단계 심사가 진행됩니다.
- ✓ 2단계 심사에서는 영향을 받은 환경요소와 주변생물체가 국민의 건강에 위해하지 않은지 여부를 심사합니다.
- ✓ 국민의 건강에 위해가 없다고 판단된다면, 환경위해성심사는 종료됩니다.

□ 위해성심사 결과는 현재 시점에서 "유전자변형생물체가 기존 종만큼 안전한가?"에 대해 과학적이고 객관적인 자료를 근거로 검토한 결과입니다.

- ✓ 위해성심사 결과는 현재까지의 과학적 기술로 작성된 위해성 평가자료를 심사한 결과이므로, LMO가 미치는 악영향(Adverse effect)에 대한 사실이 새로이 발견될 경우 추가적인 심사가 진행될 수 있습니다.

□ 구체적인 위해성평가자료 기술사항은 '참고 2. 보건의료용 LMO 위해성심사 신청을 위한 평가자료 (작성예시)'를 확인하시기 바랍니다.

□ 보건의료용 LMO가 환경에 미치는 영향은 일반적으로 다음의 7가지 항목에 대한 설명이 제출되어야 합니다.

1. 수직적 유전자 전이를 포함한 유전자변형생물체의 지속성 및 침입성
2. 수평적 유전자 전이
3. 병원성, 감염성 및 질병
4. 유전자변형생물체와 목적 생물체와의 상호작용
5. 유전자변형생물체와 비목적 생물체와의 상호작용
6. 유전자변형생물체의 관리에 이용된 특정 기술의 환경적 영향
7. 공중보건 및 동물보건에 유전자변형생물체가 미치는 영향

- ✓ 모든 환경위해성평가 요소에 대하여 종합적으로 검토하여, 보건의료용 LMO가 방출되는 환경에 미치는 영향을 체계적으로 평가합니다.

- 각 환경위해성평가 요소는 앞서 설명하였던 생물학적 위해성평가 방법론에 따라 각각 평가하여야 합니다.
 - ✓ 생물학적 위해성평가 방법론은 문제 확인(1단계)-유해 원인 판단(2단계)-노출성 판단(3단계)-위해성 판단(4단계)-관리 방안 평가(5단계)-종합적 위해성평가(6단계)로 이어지는 체계적 검토절차에 따라 수행하여야 합니다.
 - ✓ 각각 평가한 결과를 종합적으로 심사하여, 해당 보건의료용 LMO의 환경 도입에 대한 적절성 여부에 대해 총체적 결론을 내립니다.
 - ✓ 필요한 경우 시장출시 후 환경모니터링(Post-market environmental monitoring, PMEM)을 명령하거나 권고할 수 있습니다.
 - ✓ 구체적인 보건의료용 LMO의 환경위해성평가 사례는 ‘참고 4. 유전자변형 모기 환경방출 위해성평가 결과(사례보고서)’를 확인하시기 바랍니다.

LMO 및 형질전환 특성의 지속성과 침입성을 기존 종의 특성과 비교합니다.

- 수직적 유전자 전파(Vertical gene transfer, VGT)는 유전자가 자손에게 전달되는 과정으로, 스스로 번식이 가능한 LMO는 다음과 같은 영향을 미칠 수 있습니다.
 - ✓ 야생 동식물상의 다양성과 부하량을 변화시켜, 먹이사슬에 영향을 미치고 환경을 변화시킵니다.
 - ✓ 야생종의 감소 또는 지역적 멸종을 유발할 수 있습니다.
- 따라서 환경위해성평가에서 다음의 확인된 유해성의 심각성과 발생가능성을 기존 종 또는 적절한 비교측정자(surrogate, 기존 종이 아닌 비교대상 생물체)의 특성(번식성, 발달성, 표현형과 행동변화)과 상호 비교하여 확인합니다.
 - ✓ 환경으로의 탈출가능성 및 야생개체군에 대한 생존성과 영향성
 - ✓ 번식가능성
 - ✓ 야생종과의 교잡가능성
 - ✓ 충분한 수의 증식 후 환경 내 정착가능성
 - ✓ LMO 또는 교잡종의 새로운 환경에서의 정착가능성

LMO의 수평적 유전자 전파 발생가능성과 심각성을 기존 종의 특성과 비교합니다.

- 수평적 유전자 전파(Horizontal gene transfer, HGT)는 생물체가 다른 생물체의 유전물질을 그 생물체의 자손이 아닌 유전체로 통합하는 과정으로, 재조합 DNA의 노출 및 이동 가능성에 대한 분석과 다른 생물체로의 확산(dissemination)성을 평가합니다.
 - ✓ HGT는 일반적으로 미생물에서 일어납니다.
 - ✓ 다만 이동성 유전요소가 포함된 경우, 아주 드물게 고등 진핵생물에서도 HGT의 발생이 보고된 바 있습니다.

- 따라서 다음의 특성을 환경위해성평가에서 확인하여야 합니다.
 - ✓ LMO에 삽입된 DNA 서열의 상세한 분자 특성화(DNA 서열유사성, 이동성 유전자요소, 유전자접합성 여부 등)
 - ✓ 수용환경에서 DNA 획득이 가능한 관련 수용생물체의 존재
 - ✓ 수용환경에서 재조합 DNA와 유사한 다른 재조합 가능성 및 노출원
 - ✓ 수용환경에서 HGT 이벤트의 방향 선택 및 장기 정착을 유도할 수 있는 환경 조건
 - ✓ HGT 시나리오가 발생한다면 그 심각성
 - ✓ 수용환경에서의 평가 및 측정종점

LMO의 병원성, 감염성 및 질병관련 특성을 기존 종의 특성과 비교합니다.

- 효과는 직접적 효과와 간접적 효과로 구분됩니다.
 - ✓ 직접적 효과는 포식, 경쟁, 서식지 변경, 야생 생물상의 생존 및 행동 및/또는 생존에 영향을 미치는 새로운 병원소와 질병의 도입 및 종간 내 교배와 같은 다양한 수단을 통해 LMO 자체가 생성하는 효과를 의미합니다.
 - ✓ 간접적 효과는 LMO가 영향을 받는 개체와 접촉하지 않더라도 개체가 영향을 받는 효과로, 초기의 작은 직접적 효과가 시스템의 균형을 이동시킴으로써 생태계에 더 큰 영향을 미칠 수 있는 영양단계 연쇄효과(trophic cascades)를 야기할 수 있는지를 핵심종(keystone species)을 중심으로 평가하는 것을 의미합니다.

LMO와 표적 생물체와의 상호작용을 기존 종의 특성과 비교합니다.

- 표적 생물체(target organism, TO)는 의도적으로 LMO가 특별히 상호작용하도록 고안된 대상 생물체를 말합니다.
 - ✓ TO가 아닌 생물체는 모두 비표적 생물체(Non-target organism, NTO)로 분류됩니다.

- 환경위해성평가에서 LMO가 환경에서 비교측정자와 비교하여 병원체에 다르게 영향을 줄 수 있다면, 다음의 사항이 고려되어야 합니다.
 - ✓ LMO의 표현형이 병원체의 병독성을 변화시킬 것인가?
 - ✓ LMO가 병원체의 전파 범위와 빈도를 변화시킬 것인가?
 - ✓ LMO가 병원체의 무증상 보균체(silent carrier)가 될 것인가?
 - ✓ LMO는 병원체를 변화시키는 대사산물 및 유출물을 방출하는가?
 - ✓ LMO가 다른 환경이나 생활 조건에 진입할 수 있다면, LMO가 다른 환경에 병원체를 도입하게 되고, LMO는 병원소(pathogen reservoir)가 될 것인가?
 - ✓ 안전관리 절차가 LMO와 병원체 간의 상호작용을 변화시킬 것인가?
 - ✓ 병원체와 상호작용의 변화로 인해 LMO의 표현형이 달라질 것인가?

LMO와 비표적 생물체와의 상호작용을 기존 종의 특성과 비교합니다.

- LMO의 환경위해성평가 관련 비표적 생물체 상호작용은 다음의 두 가지 측면이 있습니다.
 - ✓ 의도적/비의도적 결과로 인한 LMO의 비생물학적 요인에 대한 내성 변화(증가 또는 감소)
 - ✓ LMO의 행동이 변화함으로써 다른 방식으로 비생물학적 환경에 영향을 줄 가능성 (직접적/간접적 효과)

LMO의 관리를 위한 기술이 환경에 미치는 영향을 비교합니다.

- LMO의 표현형 특성이 사육시설의 전체 크기를 증가시켜야 할 정도로 관리 및 취급에 의한 영향을 변화시킨다면, 환경위해성평가에서는 이러한 변화의 환경적 영향을 고려해야 합니다.
 - ✓ 새로운 수용환경을 포함하는 수용환경에서 생길 가능성이 있는 LMO 사육시설의 관리(예. 식이 조성의 변화 또는 소비된 양, 폐기물의 양, 수질의 변화)와 현재의 양식시설과 다른 시설의 관리방법
 - ✓ Non-LM 비교측정자의 관리와 비교하여 LMO(예. 폐기물 및 병원체)의 양식시설 관리의 차이와 관련된 잠재적인 환경적 영향
 - ✓ 사육시설 관리 및 환경적 영향의 변화와 관련된 총체적인 위해성

LMO가 인체 및 동물보전에 미치는 영향을 기존 종의 특성과 비교합니다.

- LMO를 취급하는 사람에게 위해를 증가시킬 수 있는 형태학적(예. 크기 증가) 또는 행동 변화에 대한 고려가 필요할 수 있습니다.
 - ✓ 환경위해성평가에서 LMO의 특성이 보건환경에 해를 끼칠 수 있는 정도로 변경되는지 여부를 평가해야 합니다.
- 환경위해성평가에서는 LMO가 동물보전에 미치는 영향을 고려하여야 합니다.
 - ✓ 질병저항성(disease-resistant) LMO는 특정 병원체에 감염되지 않습니다.
 - ✓ 질병내성(disease-tolerant) LMO는 그 병원체에 감염될 수 있으며, 질병을 나타내지 않는 무증상 보균체로서 작용할 수 있습니다.
 - ✓ 따라서 질병내성 LMO가 환경에 방출되었을 경우, 야생종 및 사육종에 비의도적으로 질병을 확산시키는 매개체가 될 수도 있습니다.

2019

Ministry of Health & Welfare
Korea Centers for Disease Control & Prevention

03

위해성심사자를 위한 안내

1. LMO 개발 · 실험 승인 위해성심사	27
2. 보건의료용 LMO 위해성심사	30
3. 타 부처 소관 LMO 인체위해성 협의심사	37

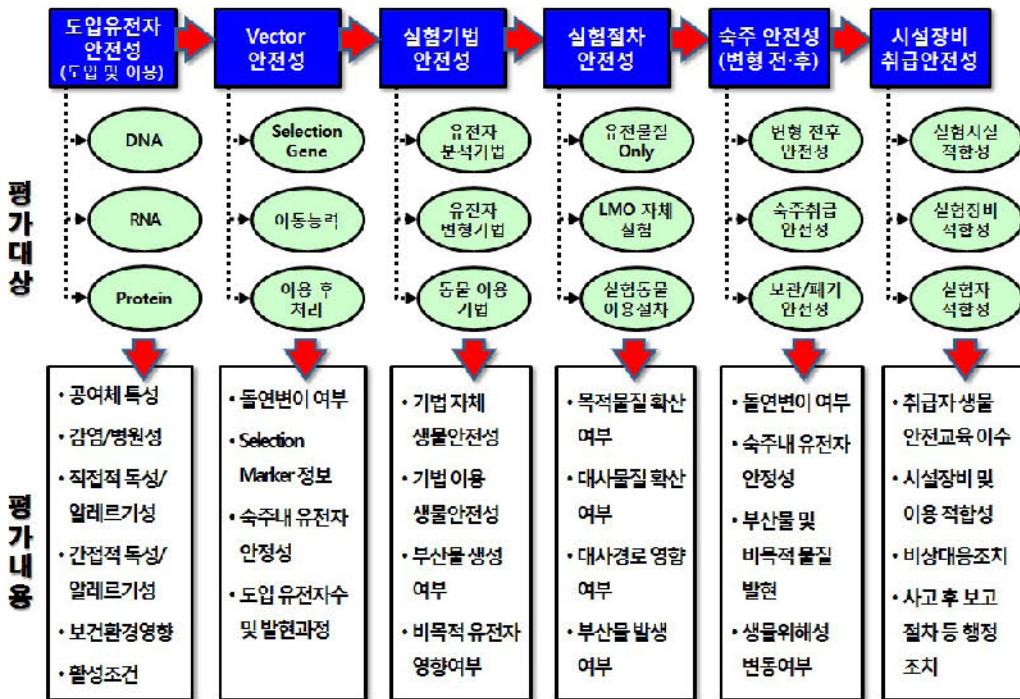


03 위해성심사자를 위한 안내

1 LMO 개발 · 실험 승인 위해성심사

국가승인 대상 LMO 개발 · 실험의 위해성심사는 과학적 근거에 기반하여 진행됩니다.

- 사전확인 행정사항이 확인된 국가승인 대상 시험·연구 위해성심사 신청에 대하여 실험자원, 실험요소 및 실험과정의 안전성을 과학적 근거에 기반하여 검토합니다.



✓ 공여체, 숙주, 벡터, 도입유전자, 실험방법, 실험시설 등에 대한 각 생물안전 요소의 사항을 종합하여, 5단계에 걸친 위해성분석결과를 바탕으로 판단합니다.

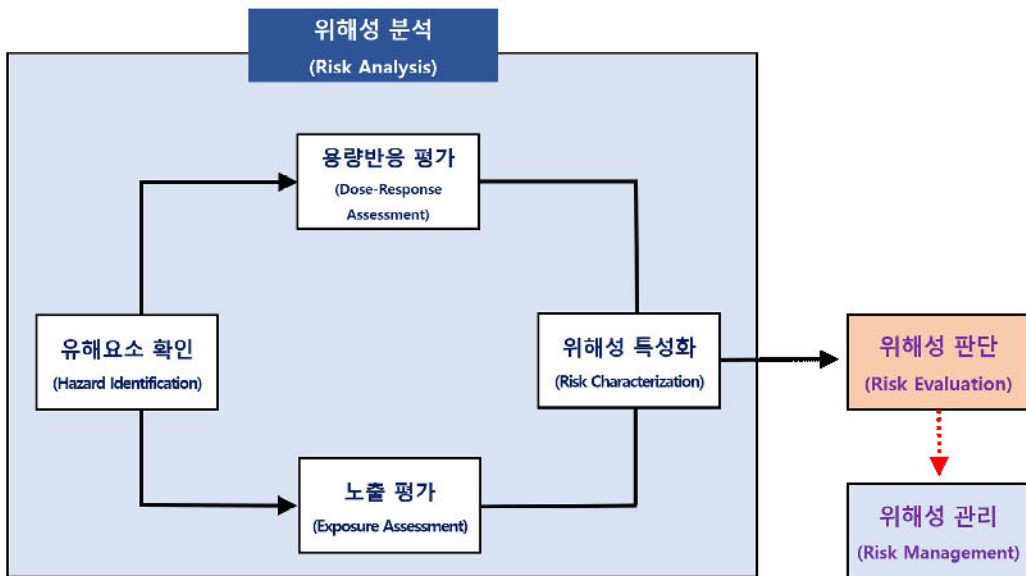
✓ 모든 생물안전 사항에 대하여, 심사자는 해당 항목의 적절성을 판단합니다.

01
02
03

참고

위해성 평가는 위해성분석 및 판단에 의해 이루어집니다.

- 국가승인 대상 시험·연구 위해성은 위해성분석 및 판단에 의한 생물학적 위해성 평가(Biological risk assessment)로 심사합니다.
- ✓ 추정된 위해를 제거하거나 최소화할 수 있는 연구시설 안전등급의 결정, 생물안전 장비 및 개인보호장비 등 생물안전 확보가 필요합니다.
- ✓ 위해성 평가과정에는 공여체, 숙주, 벡터, 도입유전자, 실험방법, 실험시설, 독성 및 알레르기 유발유무, 안전관리 사항 등 실험내용과 실험환경 및 안전관리 등 위험요소들이 평가 및 심사시 고려되어야 합니다
- ✓ 생물학적 위해성 평가는 아래와 같이 위해성 분석을 통해 이루어집니다.



- ▶ 유해요소 확인(Hazard Identification)
- ▶ 유해요소 특성화(Hazard Characterization)
- ▶ 노출 평가(Exposure Assessment)
- ▶ 위해성 특성화(Risk Characterization)

유해요소 확인은 시험연구 수행과정의 위험요소를 확정하는 과정입니다.

- 위험요소는 LMO 및 미생물 요소, 수행하고자 하는 실험내용 및 과정, 생물안전관리 등 실험환경 요소, 실험종사자의 생리학적 또는 면역학적 특성 및 생물안전 이행 요소 등을 포함합니다.

유해요소 특성화는 위험요소의 특성을 기술하는 과정입니다.

- LMO 및 병원체 정보, 실험내용 및 실험실 환경과 실험종사자의 건강 상태 및 실험습관 등의 상호 관련성을 포함하여 기술된 위험요소 특성을 심사합니다.
 - ✓ 미생물 요소: 해당 LMO 및 미생물의 감염량 및 전파경로, 병원성 및 독성, 환경 내 안전성, 유전물질 전달성, 항생제 내성 양상, 숙주의 범위, 미생물 위험군류, 실험실-획득 감염 정보 등
 - ✓ 실험종사자 요소: 실험종사자의 면역상태, 연령, 기저질환, 질병에 대한 과거력, 개별 숙주의 감수성, 임신 여부, 상재균총의 특성 등
 - ✓ 실험환경 요소: 실험 시 병원체의 농도 및 양, 노출 빈도 및 기간, 에어졸 발생 여부, 병원성 매개체의 접촉, 동물실험 및 유전자재조합실험 여부, 확보된 생물안전 밀폐 연구시설 등급, 안전 및 응급조치 등

노출 평가는 위험요인의 노출양 및 예상치에 대해 평가하는 과정입니다.

- 노출 평가는 정성적, 정량적 평가를 모두 포괄합니다.
 - ✓ 병원체 또는 독소의 농도, 노출량, 빈도 및 기간, 숙주의 면역 수준 및 병원체에 대한 감수성, 발생하는 위해 그리고 용량-반응 분석을 통해 얻어진 정보 등을 이용하여 병원체 또는 독소의 위해 가능성을 정성적, 정량적으로 심사합니다.

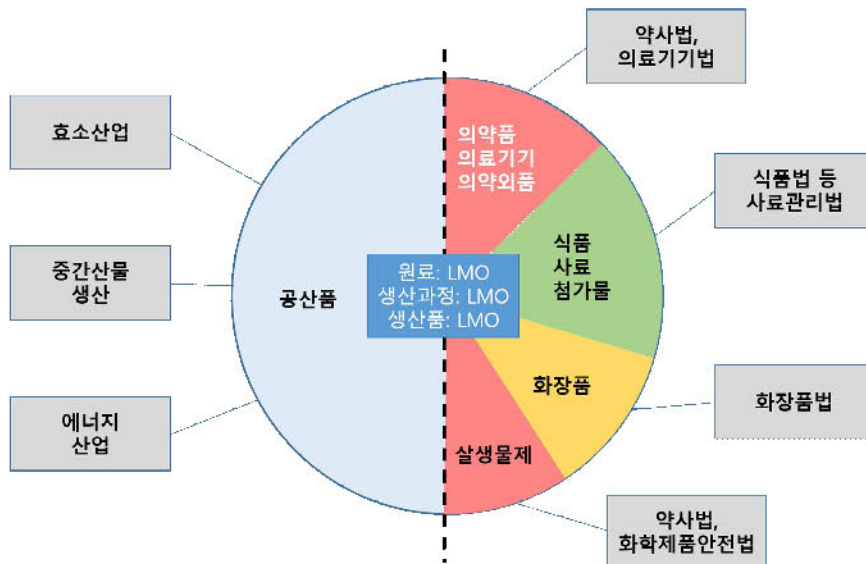
위해성 특성화는 위해발생 가능성과 심각성에 대해 평가하는 과정입니다.

- 위해 추정을 통하여 결과적으로 해당 실험의 위해 정도가 낮음, 중간, 높음, 매우 높음으로 나타낼 수 있습니다.
 - ✓ 위해 특성 결과는 발생 가능한 위해를 제거하거나 최소화할 수 있는 위해관리와 연계되어 적합한 연구시설 밀폐등급 결정 및 실험실 생물안전관리를 수립하는데 활용됩니다.

2 보건의료용 LMO 위해성심사

보건의료용 LMO의 이용을 위해서는 사전에 위해성심사 및 이용승인 등을 받아야 합니다.

- 생명공학기술을 이용하여 만들어지는 제품은 품목에 따라 적용되는 안전관리 법률이 다릅니다.
- ✓ 각 제품 안전관리 관련 법에서는 원료, 생산과정, 생산품의 안전성을 별도의 수준으로 평가하여 제품안전성을 확보합니다.
- ※ 약사법과 의리기기법, 화학제품안전법은 열거주의(Positive system)에 따라 원칙적으로 모든 것을 금지하고, 허가하는 제품만을 유통하게 합니다.
- ※ 그 외 제품 안전관리 관련 법은 포괄주의(Negative system)에 따라 제한하거나 금지하는 규정이나 사항을 나열하고, 나머지는 원칙적으로 자유롭게 유통하게 합니다.



- ✓ 2019년 『생활화학제품 및 살생물제의 안전관리에 관한 법률』이 시행됨에 따라, 살생물제는 환경부장관의 사전승인을 받아야 합니다.
- ※ 살생물제는 살생물질, 살생물제품, 살생물처리제품으로 구분되며, 유해생물의 제거, 제어, 무해화, 억제 등의 효과와 효능을 가진 물질과 미생물을 포함합니다.

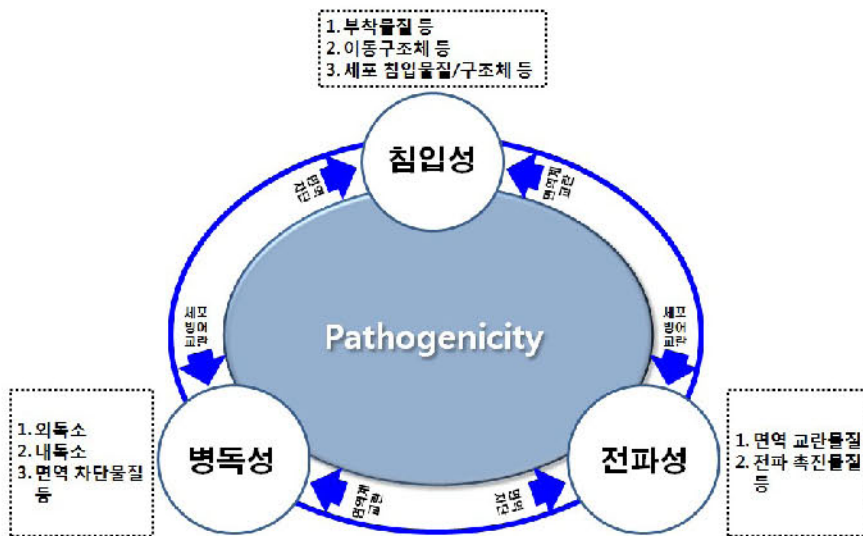
- 보건의료용 LMO는 이용목적 및 형태에 따라 제품의 원료, 생산과정, 생산품에 적합한 수준의 안전성이 평가됩니다.
 - ✓ 원료의 안전성평가를 위해, 생물체인 LMO 자체의 안전성을 심사합니다. LMO가 생산하는 물질의 위해성은 생물체의 위해성을 판단하기 위한 참고사항으로 이용됩니다.
 - ✓ 생산과정의 안전성평가를 위해, LMO 취급시 안전성을 심사합니다. 이를위해 LMO를 이용한 피부감작실험 등 취급시 위해요인을 증명하기 위한 자료가 요청될 수 있습니다.
 - ✓ 생산품의 안전성평가는 LMO 자체가 생산품인 경우에만 심사하며, LMO의 부산물이나 가공품이 최종제품인 경우는 유전자변형생물체법이 아닌 해당 제품의 안전관리 관련 법을 따릅니다.

- 생산공정이용시설은 기본적으로 제품 안전관리 관련 법에 적용을 받는 제조시설의 일부 또는 전부입니다.
 - ✓ 전체 제조과정 중 보건의료용 LMO가 이용되는 밀폐된 생산공정이 생산공정 이용시설입니다.

- 따라서 보건의료용 LMO의 이용을 위해서는 다음의 단계를 거치게 됩니다.
 - ✓ 1단계 : 보건의료용 LMO 위해성심사
 - ※ LMO 자체의 안전성을 판단하여 적절한 취급수준을 결정합니다.
 - ✓ 2단계 : 생산공정이용시설 설치 및 신고/허가
 - ※ 확정된 보건의료용 LMO의 취급수준에 따라 적절한 생산공정이용시설을 설치운영하여야 합니다.
 - ✓ 3단계 : 보건의료용 LMO 이용승인
 - ※ 제조시설이 여러 곳이 경우, 각 시설 단위별로 보건의료용 LMO의 이용승인을 받습니다.

보건의료용 LMO의 위해성은 비교분석학적 방법에 의해 심사됩니다.

- 보건의료용 LMO는 유전자가 변형되지 않은 기존 종과의 위해성을 비교하는 비교분석학적 위해성심사 기법을 이용합니다.
 - ✓ 비교학적 분석은 의도적 또는 비의도적 차이의 규명에 초점을 둔 위해성 평가의 시작이며 ‘실질적 동등성(Substantial equivalence)’과 ‘친숙성(Familiarity)’에 대한 개념이 그 근간을 구성합니다.
 - ✓ ‘기존 종’(Conventional counterpart)은 LMO와 같은 지역 및 환경 조건에서 성장된 유전적으로 변형되지 않은 대응종을 의미합니다.
- 심사자는 기존 종의 병원성(Pathogenicity) 여부를 검토합니다.
 - ✓ 심사자는 보건의료용 LMO가 의도적으로 변형된 기능 외 다른 특성이 기존 종과 동일하다는 것을 과학적 근거를 바탕으로 판단합니다.



- 보건의료용 LMO의 위해성은 직접적인 위해성과 간접적인 위해성으로 구별됩니다.
 - ✓ 위해성판단 절차는 기본적으로 생물학적 위해성평가 5단계의 사항과 유사합니다.
 - ✓ 세부적인 항목별 심사 검토사항은 ‘타 부처 소관 LMO의 인체위해성 협의심사 고려사항’의 방향과 유사합니다.

가. 직접적인 위해성

- 보건의료용 LMO의 위해성을 판단하는 기준은 병원성 요소의 유무 및 그 요소의 위해 발생가능성과 심각성을 심사합니다.
 - ✓ 병원성은 건강한 성인 질병대응 능력에 대한 병원체의 위해능력과 환경의 전파·확산·영향력에 대한 복합적인 검토에 의해 심사합니다.
 - ✓ 심사자는 개발자가 의도적으로 유전자변형한 부분을 제외하고 모든 특성이 기존 종과 동일함을 과학적 근거에 기반하여 확인하여야 합니다.
 - ✓ 과학적 근거에 기반한 보완사항이 확인될 경우, 심사자는 보완자료를 요청하여야 합니다.
 - ✓ 필요한 경우, 심사자는 해당 내용에 대하여 LMO 보건안전 전문가위원회와 논의를 통한 심사를 수행할 수 있습니다.

심사자는 기존 종과 보건의료용 LMO의 전염·확산성의 변화를 검토합니다.

- 심사자는 기존 종의 치명률, 이환율 등을 검토합니다.
 - ✓ 심사자는 LMO의 치명률, 이환율 등이 기존 종에 비해 얼마나 변화하였는지를 검토합니다.
 - ✓ 심사자는 변화된 특성이 환경 및 인체에 미치는 영향에 대하여 숙고하고 이를 검토합니다.
 - ✓ 과학적 근거에 기반한 보완사항이 확인될 경우, 심사자는 보완자료를 요청하여야 합니다.

심사자는 기존 종과 보건의료용 LMO의 침입·병독성의 변화를 검토합니다.

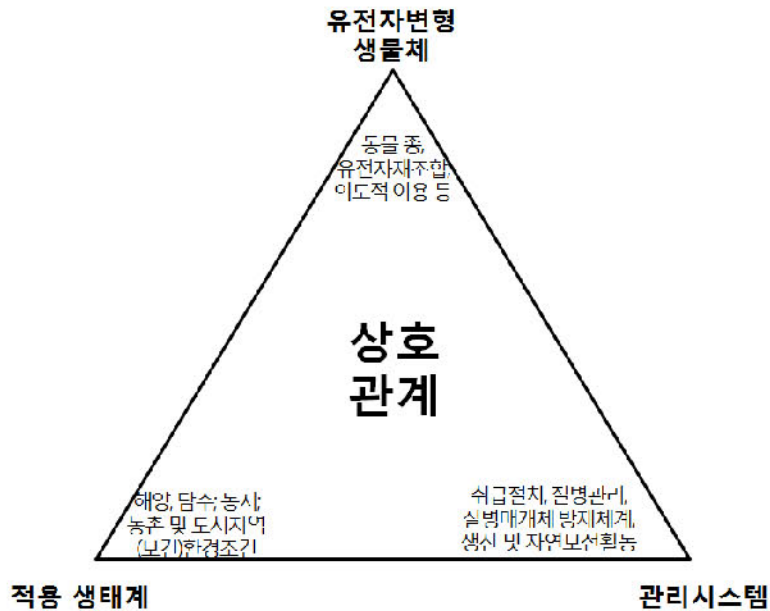
- 심사자는 기존 종의 침입성 및 병독성의 변화요인을 검토합니다.
 - ✓ 심사자는 개발자가 의도적으로 변형한 부분을 제외하고 LMO의 침입·병독성이 기존 종의 수준과 동일함을 확인하여야 합니다.
 - ✓ 과학적 근거에 기반한 보완사항이 확인될 경우, 심사자는 보완자료를 요청하여야 합니다.

심사자는 기존 종과 보건의료용 LMO의 병독 · 전파성의 변화를 검토합니다.

- 심사자는 기존 종의 병독성 및 전파성의 변화요인을 검토합니다.
 - ✓ 심사자는 개발자가 의도적으로 변형한 부분을 제외하고 LMO의 병독·전파성이 기존 종의 수준과 동일함을 확인하여야 합니다.
 - ✓ 과학적 근거에 기반한 보완사항이 확인될 경우, 심사자는 보완자료를 요청하여야 합니다.

나. 간접적인 위해성

- 심사자는 LMO가 환경에 영향을 미침으로서 기존의 병원성 요소가 변화함에 따른 2차적 피해의 발생여부도 함께 검토합니다.
 - ✓ 환경 요소는 LMO의 자체특성, 적용생태계의 특성, 관리시스템의 특성 간의 상호작용으로 판단할 수 있습니다.



- ✓ 필요한 경우, 심사자는 해당 내용에 대하여 LMO 보건안전 전문가위원회와 논의를 통한 심사를 수행할 수 있습니다.

심사자는 보건의료용 LMO가 병원소에 미치는 영향을 검토합니다.

- 심사자는 기존 종의 병원소 영향성 변화요인을 검토합니다.
 - ✓ 심사자는 개발자가 의도적으로 변형한 부분을 제외하고 LMO가 환경의 병원소에 미치는 영향이 기존 종의 수준과 동일함을 확인하여야 합니다.
 - ✓ 과학적 근거에 기반한 보완사항이 확인될 경우, 심사자는 보완자료를 요청하여야 합니다.

심사자는 보건의료용 LMO가 매개체에 미치는 영향을 검토합니다.

- 심사자는 기존 종의 매개체 영향성 변화요인을 검토합니다.
 - ✓ 심사자는 개발자가 의도적으로 변형한 부분을 제외하고 LMO가 환경의 매개체에 미치는 영향이 기존 종의 수준과 동일함을 확인하여야 합니다.
 - ✓ 과학적 근거에 기반한 보완사항이 확인될 경우, 심사자는 보완자료를 요청하여야 합니다.

- ▶ 2014년 브라질에서 수행된 유전자변형 *Aedes aegypti* 모기 방출 결과, 경쟁 질병매개체 모기종의 대량발생으로 인하여 뎅기열병이 오히려 확산되었음. 이러한 현상을 생태학적 틈새 (Ecological niche)라 함.
- ▶ 2010년 케이만 군도에서는 브라질의 사례와 달리, 경쟁 질병매개체가 없어 질병방제 효과를 보았음.
- ▶ 이러한 사례는 보건의료용 LMO의 이용환경 심사 및 검토가 필수적임을 보여줌.

심사자는 보건의료용 LMO가 감염·확산경로에 미치는 영향을 검토합니다.

- 심사자는 기존 종의 감염·확산경로 영향성 변화요인을 검토합니다.
 - ✓ 심사자는 개발자가 의도적으로 변형한 부분을 제외하고 LMO가 환경의 감염·확산경로에 미치는 영향이 기존 종의 수준과 동일함을 확인하여야 합니다.
 - ✓ 과학적 근거에 기반한 보완사항이 확인될 경우, 심사자는 보완자료를 요청하여야 합니다.

심사자는 보건의료용 LMO의 직접적인 위해성과 간접적인 위해성을 종합하여 검토합니다.

- 심사자는 직접적·간접적인 위해성의 상관관계를 종합적으로 검토합니다.
 - ✓ 일반적으로 직접적인 위해성은 단기적이며, 간접적인 위해성은 장기적으로 나타납니다.
 - ✓ 심사자는 보건의료용 LMO의 이용에 따른 영향을 종합하여 판단하여야 합니다.

3 타 부처 소관 LMO 인체위해성 협의심사

가. 인체위해성 협의심사

질병관리본부는 LMO의 간접적인 노출에 의한 인체위해성을 협의심사합니다.

- 질병관리본부는 LMO 취급자 등에 대한 비의도적 노출 및 취급시 노출에 국한하여, 인체위해성을 협의심사합니다.
 - ✓ 인체에 직접적으로 사용되는 의약품 또는 식품용 LMO는 식품의약품안전처의 소관사항입니다.

인체위해성 심사는 LMO의 노출로 인해 인체에 미치는 악영향에 대한 인체위해성 평가자료를 심사합니다.

- ‘인체위해성 평가’는 특정 조건에서 위험원에 노출 시 인간에게 일어날 수 있는 악영향 및 그 가능성 그리고 수반되는 불확실성을 규명하는 과정을 의미합니다.
 - ✓ LMO의 인체위해성 평가는 악영향의 원인을 규명하고 LMO의 새로운 특성에 의하여 부가된 위험 및 그 발생 가능성을 판단합니다.
- LMO 인체위해성 협의심사는 LMO와 유전적으로 변형되지 않은 ‘기존 종(Conventional counterpart)’ 과의 ‘비교학적 분석(Comparative analysis)’을 이용합니다.
 - ✓ 비교학적 분석은 의도적 또는 비의도적 차이의 규명에 초점을 둔 위해성평가의 시작이며 ‘실질적 동등성(Substantial equivalence)’과 ‘친숙성(Familiarity)’에 대한 개념이 그 근간을 구성합니다.
 - ✓ ‘기존 종(Conventional counterpart)’은 LMO와 같은 지역 및 환경 조건에서 성장된 유전적으로 변형되지 않은 대응 종을 의미합니다.
 - ✓ 비교학적 분석자료는 과학적이고 객관적인 사실에 의하여, 검증된 실험방법 등을 사용하여야 하며 실험 데이터는 적절한 수학적 기법을 이용하여 분석됩니다.
 - ✓ 인체위해성 평가는 LMO 특성에 따라 품목별 개별적(case-by-case)으로 심사합니다.

실질적 동등성은 LMO가 기존 종과 실질적으로 동등함을 증명하는 과정으로 이루어집니다.

- ‘실질적 동등성 개념’은 인간에게 안전하게 이용된 역사를 갖는 기존의 생물체가 LMO의 위해성평가 수행 시 비교군으로 사용될 수 있다는 것에 기초를 둡니다.
 - ✓ 기존 종과 LMO의 유사성과 차이점을 확인하기 위하여 사용되며, LMO에 대한 인체위해성 평가는 기존에 존재하였던 비교종(기존 종) 만큼 위해하지 않은가(또는 안전성을 갖고 있음)를 심사합니다.
 - ✓ 모든 비교학적 분석은 같은 지역과 환경 조건에서 성장된 LMO와 이에 대응하는 기존 종으로 수행됩니다.
 - ✓ 심사자는 LMO와 대응하는 기존 종 사이의 분자생물학적 특성, 농경학적 특성, 형태학적 특성 등을 비교하며 동등한지를 심사합니다.

친숙성은 LMO 및 숙주에 대한 풍부한 사전지식과 경험에 근거한 판단입니다.

- ‘친숙성 개념’은 개발되는 LMO가 생물학적 특성이 잘 알려진 생물체로부터 개발되었다는 사실에 기반을 둡니다.
 - ✓ 심사자는 생물체에 대한 사전 지식 및 경험에 대한 과학적 근거자료를 바탕으로 LMO의 위해성을 판단합니다.

나. 인체위해성 평가항목 검토방향

유전자변형생물체 개발에 관한 평가

- LMO가 인류 보건 및 삶의 질 향상을 위한 산물인지, 인간의 보편적 윤리와 건전성에 부합하는 산물인지에 대해 심사합니다.
 - ✓ 새롭게 부여된 특성의 목적과 방법 등이 유전자변형생물체법에서 제시하는 현대생명공학기술에 의한 것인지도 함께 판단합니다.

숙주 및 공여체에 대한 평가

- 분류학적 특성, 독소·알레르기·병원성 유발 가능성, 안전하게 사용되었던 경험을 확인하여야 합니다.
 - ✓ 숙주 및 공여체에 대한 평가는 LMO를 개발하면서 발생할 수 있는 위해성 문제를 간접적으로 사전에 예측하기 위하여 수행된 자료입니다.

유전자재조합분자에 대한 평가

- 새롭게 숙주에 삽입되는 벡터 및 도입유전자에 대해 심사합니다.
 - ✓ 심사자는 벡터에 대한 평가는 벡터 내 유전적 요소, 위치, 방향성, 제한효소 절단지도 및 염기서열 정보가 제시된 완성된 재조합벡터의 구조를 확인하여야 하며, 벡터가 다른 세포로 전이될 가능성과 기타 숙주 의존성에 대하여 심사합니다.
 - ✓ 도입유전자에 대한 심사는 도입유전자, 조절인자(전사개시인자 및 종결인자), 선발표지유전자의 염기서열을 확인하고 위해염기서열의 존재 여부를 확인하며, 도입유전자 및 인접한 숙주 게놈 유전자와의 외인성 전사해독프레임의 유무에 대한 과학적 근거자료를 바탕으로 이루어져야 합니다.

유전자변형생물체 개발 방법에 대한 평가

- 유전자재조합에 사용된 형질전환 방법 및 개발과정(재배, 배양, 육종 등)에 대해 심사합니다.
 - ✓ 도입유전자 표현형의 후대 안정성을 통하여 안정성을 판단합니다.
 - ✓ 심사자는 검증된 형질전환방법의 사용 유무 및 그 방법의 적절성을 확인하고, 발현벡터 등을 생산하기 위하여 사용된 중간숙주에 대한 독소·병원성·알레르기 유발 가능성을 확인합니다.

유전자변형생물체의 분자생물학적 특성에 관한 평가

- LMO 내에 삽입된 도입유전자 및 도입유전자로 인하여 표현되어지는 발현산물에 대하여 심사합니다.
 - ✓ 심사자는 삽입된 유전자에 대한 평가는 LMO 내의 삽입위치, 게놈에 삽입된 유전자의 삽입부위 및 복제수에 대하여 확인하여야 합니다.
 - ✓ LMO 게놈에 삽입된 유전자의 염기서열 및 인접부위의 주변 염기서열을 확인하여 숙주생물체의 게놈에 삽입된 유전자가 독소 및 알레르기 유발능력의 유무를 판단합니다.
 - ✓ LMO 내에 삽입된 유전자가 여러 세대 동안 안정하게 유지되며, 도입유전자의 발현부위, 발현시기, 발현량이 복수세대 동안 안정적으로 유지됨을 확인하여야 합니다.
 - ✓ 유전자산물에 대한 평가는 도입유전자로 인하여 LMO 내에서 발현되는 산물에 관하여 확인하며, 유전자의 삽입결과 변화되는 표적단백질의 발현정도, 발현시기, 발현위치 및 이를 위한 측정방법과 이에 따른 민감도를 확인하여야 합니다.
 - ✓ 삽입된 유전자의 단백질생성후변이(post-translational modification) 여부는 glycosylation, acetylation, phosphorylation 등의 확인을 통하여 발현산물의 구조적 변화 여부를 심사합니다.
- 유전자재조합분자 및 LMO의 일반적 특성에 대한 심사는 분자·생화학적 방법을 활용하여 이루어진 평가자료를 검토하여 이루어집니다.
 - ✓ 의도한 영향 이외에 예측 가능한 비의도적 영향 또는 예상치 못한 비의도적 영향을 확인하기 위한 기본적인 자료를 검토합니다.

유전자변형생물체 병원성 평가

- 개발된 LMO가 미생물인 경우, 공여체 및 숙주가 병원체 유발 가능성이 존재하는 경우 또는 발현산물이 병원성 유발 물질로 알려진 경우에 LMO의 병원성에 대하여 심사합니다.
 - ✓ LMO의 전염성 및 감염량을 조사하고, 숙주범위 및 숙주 밖에서의 생존 가능성 조사, 생물학적 안정성, 항생제 저항성, 군집 가능성 및 독소생성 능력에 대하여 제출된 평가자료를 바탕으로 심사합니다.

유전자변형생물체 독성학적 평가

- 도입유전자로부터 발현되는 산물이 유발할 수 있는 잠재적 독성을 조사하고, 기존에 알려진 독소와의 아미노산 서열에 대한 상동성을 비교하여 독성을 심사합니다.
 - ✓ 작업자, 이용자가 흡입, 접촉, 섭취, 감염 등의 방법으로 LMO에 노출되는 평균 노출량을 기존 종과의 비교를 통하여 독성 유발 가능성을 심사합니다.
 - ✓ 독성실험이 필요한 경우에는 독성실험을 수행하기 위하여 *E. coli* 등에서 생산된 목적단백질의 대체산물에 대해 심사합니다.
 - ✓ *E. coli* 등에서 생산된 대체산물과 LMO 목적단백질과의 생물학적 동질성은 분자량, 아미노산 서열 비교, 단백질생성후변이, 면역교차반응 등 생화학적, 구조적, 기능적 동질성 확인을 통하여 심사됩니다.
 - ✓ 필요한 경우, 동물을 이용한 단회투여 및 장기투여 실험을 통한 결과를 바탕으로 LMO의 독성에 대한 심사가 수행될 수 있습니다.

유전자변형생물체의 알레르기 유발성 평가

- LMO 또는 LMO로부터 유래된 물질 등의 피부 및 안점막 등의 접촉 또는 비강 등의 호흡기를 통한 잠재적 알레르기 유발성을 확인합니다.
 - ✓ 작업자 및 이용자가 접촉, 흡입 등의 방법으로 LMO 노출에 따른 알레르기 유발 빈도를 기존 종과의 비교학적 정보를 통하여 심사합니다.
 - ✓ 유전자산물에 대한 알레르기 유발성 평가는 알려진 알레르겐과의 아미노산 서열 상동성을 PIR, SWISS-PROT, EMBL, Protein DATA Bank 등의 국제적으로 인정되는 데이터베이스와 생물정보학적 기법을 이용하여 간접적으로 알레르기 유발물질인지를 심사합니다.
 - ✓ 아미노산 상동성에 대한 검색 및 평가가 의과학적으로 유의성 있는 결과를 도출하기 위하여 적절히 표준화된 방법이 사용되었는지를 확인합니다.
 - ✓ 실험이 필요한 경우, 아미노산의 구조 유사성이 확인된 알레르겐에 대하여 환자 IgE 항체와의 교차반응 또는 주요 알레르겐 환자 IgE 항체와의 교차반응을 확인하여 알레르기 유발성을 심사합니다.
 - ✓ 식용 이외의 LMO는 식용 LMO(유전자재조합식품)와는 인체 위해 유발 가능한 노출경로가 다르므로 사람의 위·장관계에 노출될 가능성은 매우 적습니다. 따라서 인공위액과 장액에 의한 목적단백질의 분해 여부에 관한 실험은 필요치 않을 수 있습니다.

LMO의 인체위해성 심사는 LMO의 이용 및 노출경로를 고려하여야 합니다.

- 식품이 포함된 보건의료용을 제외한 화훼용, 관상용, 기타 산업용 등의 LMO 인체 위해 유발의 주요 차이는 노출 경로의 상이함에 있습니다.
- 유전자재조합식품의 경우에는 위장관 루트를 통하여 인체에 위해가 표현될 수 있으며, 식용 이외의 LMO의 경우에는 공기 중의 흩날리는 화분, 분진 등에 따른 피부, 안점막 접촉 및 비강 등의 호흡기를 통하여 인체 위해가 표현될 수 있을 것입니다.
- 식용 이외의 LMO의 경우, 식품처럼 위·장관 루트를 통한 섭취는 이루어지지 않기 때문에, 이에 대한 주요 평가는 작업자, 이용자에 대한 피부, 점막 접촉 및 비강 등의 호흡기를 통한 독성과 알레르기성에 대한 위해 가능성 여부를 심사하게 됩니다.
- 유전자변형미생물의 경우에는 감염에 따른 병원성 등에 대한 평가가 별도로 수행됩니다.

2019

Ministry of Health & Welfare
Korea Centers for Disease Control & Prevention

참 고

1. LMO 개발·실험 승인신청을 위한 위해성 평가자료(작성예시) 45
2. 보건의료용 LMO 위해성심사 신청을 위한 평가자료(작성예시) 90
3. 타 부처 소관 LMO 인체위해성 협의심사자료(작성예시) 152
4. 유전자변형 모기 환경방출 위해성평가 결과(사례 보고서) 175



[참고 1] LMO 개발 · 실험 승인신청을 위한 위해성평가자료(작성 예시)¹⁾

1. 유전자변형생물체의 용도에 관한 자료

가. 개발·실험의 배경 및 목적



- ▶ 개발하고자 하는 LMO의 개발 배경 및 목적을 기술합니다(개발로 인한 효율성, 유용성 및 이로운 점 등).
- ▶ LMO를 이용하는 실험의 배경, 필요성 및 목적을 기술합니다.

Francisella tularensis (야토균)는 매우 적은 수의 병원체에 의해서도 인체에 치명적인 결과를 야기할 수 있는 고위험 병원체이며, 이 같은 특성으로 인해 생물무기로 사용될 가능성 또한 매우 높음. 그러나 아직 국제적으로 승인된 백신이 존재하지 않는 상황이며 그 위험성에 비한 대비전략은 매우 취약한 실정임.

따라서, 병원체의 생체분자영상 추적기술을 구축하고, 이를 이용하여 형광·발광 표지 야토균을 개체 내에서 분석함으로써, 야토균 감염기작 및 면역반응을 명확히 규명하고, 야토균에 대한 효과적인 백신 개발의 기반을 마련하고자 함.

1) 본 작성 예시는 국가승인 신청한 과제 중 연구책임자의 동의하에 공개하며, 일부 내용은 국가승인 신청서식(LMO 법률 통합고시 [별표 9-기 개발실험의 위해성 평가자료의 제출범위]에 맞추어 가공되었으므로 과학적인 사실과 상이할 수 있음을 알려 드립니다.

나. 주요 용도



- ▶ 개발하고자 하는 LMO의 용도 및 타당성을 기술합니다.
- ▶ 실험에 사용하는 용도 및 이로 인해 우려되는 사항을 기술합니다.
- ▶ 취급예정인 병원체가 고위험병원체일 경우 국가관리번호를 기입합니다.

1. 연구 계획

Francisella tularensis, subspecies tularemia (Type A) : Schu S4 strain 및 *Francisella tularensis*, subspecies holarctica (Type B) : Pohang strain 균주는 야토균의 각 아종별 감염양상 및 면역반응 기작에 대한 생체분자영상 연구에 사용될 계획임.

2. 주요 연구 내용

- 2.1. Type A 및 type B 야토균주의 형광표지화 작업 및 영상분석조건 확립
- 2.2. 야토균 각 아종별 형광·발광표지균주의 생체내 감염양상 및 면역반응 분석
- 2.3. 야토균의 감염경로별 감염양상 및 면역반응 분석

3. 사용예정 고위험병원체

- 3.1. *Francisella tularensis*, Schu S4 (관리번호 : 0-000-ABC-IS-2014001)
- 3.2. *Francisella tularensis*, Pohang (관리번호 : 0-000-ABC-IS-2014002)

다. 사용이 승인된 국가 및 승인 용도



- ▶ 개발하고자하는 LMO와 유사한 경우의 국외 승인여부 사례 및 용도를 기술합니다.
- ▶ LMO의 실험 사용이 승인된 현황 및 승인 용도를 기술합니다.

Schu S4 strain은 *Francisella tularensis*의 tularensis 아종이며, Pohang strain은 *Francisella tularensis*의 holarctica 아종으로서, 두 균주 모두 사람에게 병원성을 나타내는 고위험병원체임. 질병의 자연발생 및 생물테러의 원인이 되는 균주이기 때문에, 해당 병원체의 특성 연구 및 야토백신 후보물질의 실제적 효능 검증 연구에는 반드시 필요한 균주임. 연구의 특성에 따라 형광발현 및 발광발현 등의 표지화를 통해 해당 균주의 영상분석이 이루어지고 있음.

현재 미국, 스웨덴을 비롯한 세계 각국의 학계 및 연구기관에서 Schu S4 균주를 이용한 type A 야토병 특성연구, 백신후보물질의 효능검증 연구가 진행되고 있으며, Pohang 균주는 1998년 국내에서 처음 동정, 보고된 이후 국내분리 야토주의 특성 분석을 위한 일련의 연구들이 진행된 바가 있음.

Ref) Michael Green et al. (2005) Efficacy of the live attenuated *Francisella tularensis* vaccine (LVS) in a murine model of disease, *Vaccine*, 23, 2680-2686.

Ref) Joshua D. Hall et al. (2008) Infected-host-cell repertoire and cellular response in the lung following inhalation of *Francisella tularensis* Schu S4, LVS, or U112, *Infection and immunity*, 76(12), 5843-5852.

Ref) 김문연 등. (1998) *Francisella tularensis*에 의한 야토병 1예, *대한임상병리학 회지*, 18(1), 90-95.

2. 유전자변형생물체에 관한 자료

가. 명칭



- ▶ 개발하고자하는 LMO의 예상되는 분류학적 명칭(학명, strain명, 일반명) 및 혈청형 등이 있는 경우 기술합니다.
- ▶ 실험에 사용하는 LMO의 분류학적 명칭(학명, strain명, 일반명, 상품명) 및 혈청형 등이 있는 경우 기술합니다.
- ▶ 개발하고자하는 LMO의 명칭, 숙주, 벡터, 도입유전자, 예상되는 특성, 발현산물 등 요약하여 기술합니다(중간숙주 LMO 포함).

[표 1] 개발예정 LMO

개발예정 LMO명		숙주	사용한 벡터	도입한 유전자, bp	예상되는 특성	발현산물
LMO1	<i>E. coli</i> -GFP-Lux	<i>E. coli</i> (중간숙주)	pKK214	(1) M2-GFP(nt 1~717), 717 bp (2) Lux operon (nt 1~5,800), 5,800 bp	- tetracycline 내성 - 형광·발광 유전자 포함	-
LMO2	<i>F. tularensis</i> Schu S4-GFP-Lux	<i>F. tularensis</i> Schu S4 (최종숙주)	pKK214	(1) M2-GFP(nt 1~717), 717 bp (2) Lux operon (nt 1~5,800), 5,800 bp	- tetracycline 내성 - 야토균의 특성 및 형광·발광	형광·발광 단백질
LMO3	<i>F. tularensis</i> Pohang S4-GFP-Lux	<i>F. tularensis</i> Pohang (최종숙주)	pKK214	(1) M2-GFP(nt 1~717), 717 bp (2) Lux operon (nt 1~5,800), 5,800 bp	- tetracycline 내성 - 야토균의 특성 및 형광·발광	형광·발광 단백질

나. 도입유전자에 의하여 부여된 특성



- ▶ LMO에 삽입되거나 소실된 도입유전자로 인하여 새로이 부여된 특성 등에 대한 자료를 기술합니다. '제5항 제다호 도입유전자에 관한 자료'에서 상세하게 통합, 기술 할 수 있습니다.

Schu S4 및 Pohang 균주에 도입될 플라스미드는 GFP 유전자 및 Lux 유전자 군과 tetracycline 내성 유전자가 도입된 형태임. 해당 균주는 tetracycline 내성 유전자의 발현에 의해 tetracycline 내성을 지니게 되며, 이 같은 성질을 이용하여 해당 플라스미드가 도입된 균주만을 selection 할 수 있음.

도입된 M-2 GFP 유전자에 의해 green fluorescence protein이 발현되며, 그 결과 녹색형광을 나타냄으로써 형광측정기기를 이용한 연구에 활용될 수 있음. 또한, 도입될 Lux 유전자군에 의해서 발광이 이루어지며, 이를 이용하여 luminescence 측정기기를 통한 연구에 활용 가능함.

다. 숙주 또는 근연종과의 생물학적 특성의 차이점



- ▶ 개발하고자하는 LMO와 숙주(수용생물체) 또는 근연종과의 생물학적 특성의 차이점을 기술합니다.
- ▶ 실험에 이용하고자 하는 LMO와 해당 LMO 개발 시 사용된 수용생물체 또는 근연종과의 생물학적 특성의 차이점을 기술합니다.

기존 형광·발광 유전자 도입균주의 특성분석에 대한 선행연구결과들로 미루어 보아, *F. tularensis* Schu S4-GFP-Lux 및 *F. tularensis* Pohang S4-GFP-Lux 역시 녹색형광단백질 및 luminescence의 발현 이외에는 *Francisella tularensis* 와 동일한 생물학적 특성을 가질 것으로 예상된다.

Ref) Joshua D. Hall et al. (2008) Infected-host-cell repertoire and cellular response in the lung following inhalation of *Francisella tularensis* Schu S4, LVS, or U112, *Infection and immunity*, 76(12), 5843-5852.

Ref) Mark A. Miller et al. (2012) Visualization of murine intranasal dosing efficiency using luminescent *Francisella tularensis*: Effect of instillation volume and form of anesthesia, *PLoS ONE*, 7(2), 1-8.

라. 병원성, 독소 생산성, 알레르기 유발성 및 기타 유해 생리활성물질 생산가능성



- ▶ 개발하고자하는 LMO 또는 실험에 이용하는 LMO의 병원성, 독소 생산성, 알레르기 유발성 및 기타 유해 생리활성물질 생산가능성에 대해 기술합니다.
- ▶ 미생물인 경우, 해당 위험군, 감염량, 병독성, 전파경로 등 병원성 특성 정보를 제공합니다.

형광·발광유전자가 삽입될 Schu S4 및 Pohang 균주는 감염시 야토병을 유발하는 원인균주로서 알려져 있으며, 독소 생산성, 알레르기 유발성 및 기타 유해활성 물질은 생성하지 않는 것으로 알려져 있음.

Ref) World Health Organization (2007) WHO guidelines on tularaemia.

마. 유전자변형생물체 내 도입유전자의 위치 및 복제수



▶ 개발하고자하는 LMO 또는 실험에 이용하는 LMO 내 삽입되거나 소실된 도입 유전자의 위치 및 복제수를 기술합니다.

F. tularensis Schu S4-GFP-Lux 및 *F. tularensis* Pohang S4-GFP-Lux에 도입될 M-2 GFP 및 Lux operon은 생물체 내에서 플라스미드 형태로 존재함. pKK214Cm 플라스미드의 *PacI/EcoRI* enzyme cutting site에 bacterioferritin 프로모터 및 M-2 GFP가 삽입되어 있으며, M2-GFP 뒤쪽에 Lux operon이 삽입되어 있음. 각 균주내에 존재하는 플라스미드의 정확한 copy수를 예상측정하기는 쉽지 않으나, 선행연구에서 사용된 균주(*F. tularensis* LVS)의 형광발현량으로 미루어 보아 해당 플라스미드는 야토균 내에서 high copy로 존재할 것으로 예상됨.

Ref) Igor Golovliov et al. (2003) An attenuated strain of the facultative intracellular bacterium *Francisella tularensis* can escape the phagosome of monocytic cells, *Infection and immunity*, 71(10), 5940-5950.

바. 유전자변형에 사용된 벡터의 특성 및 존재여부



▶ 개발하고자하는 LMO 또는 실험에 이용하는 LMO 내 삽입된 벡터(플라스미드)의 접합성 여부, 선택마커(약제내성유전자 등) 및 프로모터 특성 및 LMO내에 존재 여부를 기술합니다.

1. 벡터의 특성

1.1. 명칭 : pKK214-GFP-Lux

1.2. 기능 : *Francisella tularensis* 와 *E. coli* 내에서 모두 복제가 가능하도록, 각각의 replication origin이 재조합된 shuttle 벡터이며, LMO 내 삽입된 벡터는 M2-GFP 유전자와 Lux operon을 포함함.

1.3. 프로모터 study를 위해 자체적인 프로모터를 가지지 않으며, LMO 내 삽입된 벡터는 bacterioferritin 프로모터를 포함함.

1.4. 선택마커 : tetracycline 내성 유전자

2. 존재여부

중간숙주 LMO인 *E. coli*-GFP-Lux 및 최종숙주 LMO인 *F. tularensis* Schu S4-GFP-Lux, *F. tularensis* Pohang S4-GFP-Lux는 벡터를 포함하고 있음. *F. tularensis* Schu S4-GFP-Lux, *F. tularensis* Pohang S4-GFP-Lux는 형광발광이 발현되나, *E. coli*-GFP-Lux에서는 형광발광이 발현되지 않음.

사. 유전자변형생물체 및 도입유전자의 검출 및 확인방법



- ▶ 개발하고자하는 LMO내에 도입된 유전자의 검출 및 확인 방법에 대하여 기술합니다.
- ▶ 개발하고자하는 LMO 또는 실험에 이용하는 LMO를 검출하고 확인할 수 있는 방법을 기술합니다.

1. LMO내에 도입된 유전자의 검출 및 확인방법

도입된 유전자에 대한 특이 프라이머를 이용하여 PCR법을 통해 검출 및 확인이 가능함.

2. 도입유전자 산물(LMO 특성) 검출 및 확인방법

2.1. *F. tularensis* Schu S4-GFP-Lux 및 *F. tularensis* Pohang S4-GFP-Lux에 도입될 플라스미드의 backbone 벡터는 *E.coli* - *F. tularensis* shuttle 벡터인 pKK214 플라스미드임. 해당 벡터는 tetracycline 내성 유전자를 지니고 있음.

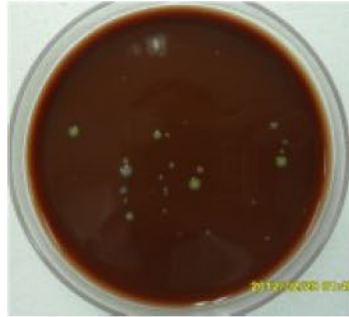
2.2. *F. tularensis* Schu S4-GFP-Lux 및 *F. tularensis* Pohang S4-GFP-Lux는 GFP를 발현하므로 형광현미경을 통한 녹색형광측정을 통해 검출 가능. 일정농도 이상의 균집은 육안으로 식별이 가능함. 또한 luminescence를 발현하기 때문에 luminometer를 이용하여 해당균주에 대한 확인이 가능함.

2.3. *F. tularensis* Schu S4-GFP-Lux 및 *F. tularensis* Pohang S4-GFP-Lux 균주에서 M-2 GFP 단백질이 생성되므로 Fluorescence assay, Western blotting을 통하여 단백질 발현을 측정할 수 있음.

3. 검출확인방법 예시

3.1. 육안 확인

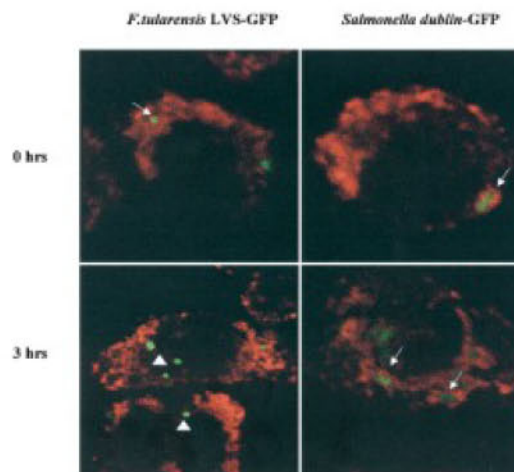
Agar plate에 균체를 도말한 후 48~72 hr 이후 colony의 색깔을 관찰



[그림 1] *F. tularensis* LVS 및 *F. tularensis* LVS-GFP 의 colony 모습.
F. tularensis LVS-GFP colony는 GFP의 발현으로 인해 녹색으로 관찰되므로
 타 colony와의 구별이 가능함.

3.2. 형광현미경을 통한 검출

- 3.2.1. Macrophage cell line(J774 등)에 균체(*F. tularensis* LVS-GFP)를 감염 시킴.
- 3.2.2. 감염된 cell을 포르말린으로 고정한 후, 붉은색 형광으로 표지된 lysosome 특이적 항체로 염색함.
- 3.2.3. 형광현미경 관찰을 통해 lysosome과 *F. tularensis* LVS-GFP와의 세포내 위치를 분석함.



[그림 2] 면역조직형광염색을 통해 관찰된 *F. tularensis* LVS-GFP.

감염초기에는 lysosome(붉은색)에 결합되어 있지만, 감염 3시간 이후에는 lysosome에서 분리됨을 확인.

3.3. 형광측정기기/Luminometer를 이용한 측정

3.3.1. 배양된 균체를 PBS에 고루 퍼지도록 녹인 후 단계회석함.

3.3.2. 단계회석된 균체용액을 96 well plate에 loading함.

3.3.3. 형광측정기기(SpectraMax, Molecular Devices)를 이용하여, 각 회석액에서 발현되는 형광값 측정함(excitation = 485 nm, emission = 510 nm).

3.3.4. luminescence 측정기기(Fluoroskan Agent FL, Thermo Scientific)를 이용하여, 각 회석액에서 발현되는 luminescence 값을 측정함.

Ref) Igor Golovliov et al. (2003) An attenuated strain of the facultative intracellular bacterium *Francisella tularensis* can escape the phagosome of monocytic cells, *Infection and immunity*, 71(10), 5940-5950.

3. 숙주에 관한 자료

가. 명칭, 유래 및 분류학적 특성



- ▶ 개발하거나 실험에 이용하는 LMO의 숙주(수용생물체)의 분류학적 명칭(학명, strain명, 일반명) 및 그 유래, 혈청형, 생물형 등 생물학적 특성을 기술합니다.
- ▶ 종명까지 명시되지 아니하고 인체병원성 여부가 밝혀지지 아니한 미생물인 경우, 생물학적 및 생화학적 실험결과에 근거한 분류학적 특성, 병원성 및 독소 생성실험 자료를 기술합니다.

*Francisella tularensis*는 야토병을 유발하는 그람 음성 구간균으로서, 호기성, 비운동성의 병원균임. 야토병은 일반적으로 *Francisella tularensis*에 감염된 동물의 조직/체액과 접촉하거나 감염된 곤충에게 물림으로서 주로 발병하는 것으로 보고되어 있음. Tularemia는 적절한 치료를 받지 않는 경우 사망에까지 이를수 있는 질병이며, *Francisella tularensis*는 매우 적은 수의 균체(~10 CFU)에 의해서도 질병을 일으킬 수 있기 때문에 bio-terror에 악용될 소지가 매우 큰 병원체임.

*Francisella tularensis*는 1912년 캘리포니아에서 야생다람쥐로부터 처음 분리되었으며, 최초에는 *Brucella* 속으로 분류되었다가 이후 *Pastuerella* 속으로 변경되었으며, 1961년 *Francisella* 속으로 최종 지정되었음. 현재 *Francisella tularensis*는 4가지의 sub-species (*Francisella tularensis tularensis*, *Francisella tularensis holarctica*, *Francisella tularensis mediasiatica*, *Francisella tularensis novicida*)로 구분되며, 이들 중 *Francisella tularensis tularensis* (Type A)와 *Francisella tularensis holarctica* (Type B)가 병원성을 지니는 것으로 알려져 있음. Type A *Francisella tularensis*에 의한 발병의 병증은 개체를 사망에 이르기까지 할 수 있을 정도로 심각한 반면, Type B *Francisella tularensis*에 의한 발병은 상대적으로 mild한 것으로 보고되어 있음.

Francisella tularensis, Schu S4는 야토균의 아종 중 tularensis 아종에 속하는 strain으로서, 높은 감염성 및 위험성으로 인해 생물테러에 악용될 가능성이 높은 균주임. 매우 적은 수의 병원체에 의해서도 감염이 일어날 수 있으며, 호흡감염의 경우 심각한 병증을 유발하는 것으로 알려져 있음.

Francisella tularensis, Pohang은 1988년 국내 포항지역에서 발생한 야토병 환자에서 최초로 분리, 동정된 균주임. 생화학적 특성 분석결과 야토균의 holarctica

아종으로 판단되었으며, 역시 감염될 경우 야토병을 유발하지만, *tularensis* 아종에 비해 병원성은 낮은 것으로 알려져 있음.

Ref World Health Organization (2007) WHO guidelines on tularaemia.

Ref 김문연 등. (1998) *Francisella tularensis*에 의한 야토병 1예, *대한임상병리학 회지*, 18(1), 90-95

나. 개발·실험하고자 하는 유전자변형생물체와 유사한 용도의 유전자변형 생물체의 숙주로 이용된 사례



▶ 개발하거나 실험에 이용하는 LMO와 유사한 용도로 사용되고 있는 LMO의 숙주 (수용생물체)로 이용된 사례를 기술합니다.

미국 Tennessee 대학의 연구그룹에서 발광인자(luciferase)를 발현하는 *Francisella tularensis* Schu S4 균주 및 LVS (약독화 균주) 균주가 제작되어, 이를 이용한 생체분자영상 분석에 대한 일련의 연구결과가 발표된 바 있음.

또한, 선행연구를 통해, 형광/발광표지 *Francisella tularensis* LVS가 제작되어 이를 이용하여 야토백신 후보물질에 대한 효능검증 연구가 수행되었음.

Ref Brendan P. Cormack et al. (1996) FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP), *Gene*, 173, 33-38.

Ref Mark A. Miller et al. (2012) Visualization of murine intranasal dosing efficiency using luminescent *Francisella tularensis*: Effect of instillation volume and form of anesthesia, *PLoS ONE*, 7(2), 1-8.

다. 숙주 및 근연종에서의 독소 생산성, 알레르기 유발성 및 기타 유해 생리활성물질 생산성 여부



- ▶ 숙주(수용생물체) 및 근연종이 독소 및 독성, 알레르기 유발체 및 기타 유해 생리활성 물질을 생산하는지 여부와 생산물에 대한 특성을 기술합니다.

*Francisella tularensis*의 경우 야토병의 원인이 되는 병원성 균주이나, 독소 생산성, 알레르기 유발성 및 유해 생리활성 물질의 생산성 여부에 대해서는 아직 보고된 바가 없음.

라. 미생물인 경우, 병원성 존재 여부 및 알려진 병원체와의 관련성



- ▶ 해당 미생물의 위험군 제시, 사람 및 동·식물에 대한 병원성 여부, 기존에 알려진 병원체와의 연관성 등에 대하여 기술합니다. 병원성이 있는 경우 감염량, 전파경로, 역학자료 등 정보를 제공합니다.

*Francisella tularensis*는 감염시 야토병을 유발하며, 높은 감염성을 지니는 국민 보건 상 국가관리가 필요한 병원성미생물임.

Ref) World Health Organization (2007) WHO guidelines on tularaemia.

4. 공여체에 관한 자료

가. 명칭, 유래 및 분류학적 특성



- ▶ 개발하거나 실험에 이용하는 LMO의 공여체에 대한 자료로 분류학적 명칭(학명, strain명, 일반명), 그 유래, 혈청형, 생물형 등 생물학적 특성을 기술합니다.
- ▶ 종명까지 명시되지 아니하고 인체병원성 여부가 밝혀지지 아니한 미생물인 경우, 생물학적 및 생화학적 실험결과에 근거한 분류학적 특성, 병원성 및 독소 생성 실험 자료를 기술합니다.

형광, 발광유전자는 상업적으로 판매되는 벡터로부터 도입예정이므로 특정 공여체는 없으나, GFP 단백질 및 Lux operon을 도입 당시의 정보는 아래와 같음.

GFP 단백질은 최초로 *Aequorea victoria* (jellyfish)에서 추출되었으며, 이후 높은 활용가치로 인해 여러 연구 및 실험에 널리 사용되고 있음. 일반적으로 유전자의 유지 및 증폭을 위해 플라스미드 벡터의 형태로 *E. coli* 내에 도입되어 유지됨.

Lux operon은 bacterial luciferase 및 luciferin 유전자로 구성된 operon으로서, luminescent bacteria (주로 *Photobacterium luminescens*)로부터 분리되어 여러 luminescence 실험에 이용되고 있음. 본 연구에 사용될 operon은 luminescence 신호발현을 위한 세 개의 luciferase 유전자(Lux A, Lux B, Lux C)와, luciferase의 substrate로 역할하는 두 개의 luciferin 유전자(Lux D, Lux E)가 동시에 발현, 조절되는 유전자군으로서, 발현된 luciferin이 luciferase에 의해 분해되면서 luminescence 신호가 발현됨. 해당 operon은 유전자 재조합 등을 이용하여 특정 프로모터에 대한 발현세기 조사분석 등에 널리 이용되고 있으며, 이용의 편의성을 위해 *E. coli* 내에 도입된 플라스미드 벡터의 형태(pXen 벡터 등)로 상용화되어 있음.

Ref) Brendan P. Cormack et al. (1996) FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP), *Gene*, 173, 33-38.

Ref) Edward A. Meighen (1991) Molecular biology of bacterial bioluminescence, *Microbiology review*, 55(1) 123-142.

나. 개발·실험하고자 하는 유전자변형생물체와 유사한 용도의 유전자변형 생물체의 공여체로 이용된 사례



- ▶ 개발하거나 실험에 이용하는 LMO와 유사한 용도로 사용되고 있는 LMO의 공여체로 이용된 사례를 기술합니다.

GFP 및 Lux operon을 이용하기 편리하도록 제작된 플라스미드 벡터들은, 기본적으로 selection에 필요한 선발표지유전자(ex. Amp^R) 및 특정 bacteria에서 replication을 가능하게 해 주는 origin을 포함한 구조로 되어 있으며, 필요에 따라 특정 프로모터 및 유전자의 삽입을 위한 multi-cloning site가 포함되어 있음.

플라스미드 벡터의 형태로 *E. coli* 내에 도입되어 유지되는 유전자(본 연구의 경우에는 GFP 및 Lux)를 이용하여 숙주의 형질전환을 유도하는 방법은, 현대생물학 전반에 널리 사용되는 방법임.

Ref) Brendan P. Cormack et al. (1996) FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP), *Gene*, 173, 33-38.

Ref) Caliper Life Science, Product information of xenogen bioware plasmid-pXen-13.

다. 공여체 및 근연종에서의 독소생산성, 알레르기 유발성 및 기타 유해 생리활성물질 생산성 여부



- ▶ 공여체 및 근연종이 독소 및 독성, 알레르기 유발체 및 기타 유해 생리활성물질을 생산하는지 여부와 생산물에 대한 특성을 기술합니다.

GFP 단백질은 jellyfish에서 도입하여 플라스미드 벡터의 형태로 *E. coli* 내에서 안정하게 발현되도록 개발되었고 본 연구에서는 GFP 단백질의 공여체인 jellyfish를 취급하지 않고 상용화된 벡터를 이용하므로 jellyfish로부터 발생하는 독소생산성, 알레르기 유발성 및 기타 유해 생리활성물질 생산성 여부를 확인하지 않았음.

Lux operon 역시, 공여체를 직접 취급하지 않으므로 공여체로부터 발생하는 독소생산성, 알레르기 유발성 및 기타 유해 생리활성물질 생산성 여부를 확인하지 않았음.

라. 미생물인 경우, 병원성 존재 여부 및 알려진 병원체와의 관련성



- ▶ 해당 미생물의 위험군 제시, 사람 및 동·식물에 대한 병원성 여부와 기존에 알려진 병원체와의 연관성 등에 대하여 기술합니다. 병원성이 있는 경우 감염량, 전파경로, 역학자료 등 정보를 제공합니다.

GFP 단백질은 및 Lux operon의 직접적인 공여체를 취급하지 않으므로 확인하지 않았음.

5. 유전자재조합 특성에 관한 자료

가. 유전자변형에 사용된 현대생명공학기술 상세 실험방법



▶ LMO를 개발하기 위하여 인위적으로 유전자를 재조합, 삽입 또는 소실하는데 이용되었거나 이용될 현대생명공학기술을 상세하게 기술합니다.

1. 유전자변형에 사용된 현대생명공학기술

F. tularensis Schu S4 및 *F. tularensis* Pohang 균주에 삽입될 pKK214-GFP-Lux 플라스미드는, 플라스미드 내에 *Francisella tularensis* Live Vaccine Strain의 bacterioferritin 프로모터 부위와 M-2 mutant GFP (형광발현률이 높은 GFP) gene 및 Lux operon이 각각 삽입되어, 야토균 내에서 green fluorescence 및 luminescence의 발현을 유도할 수 있음.

각 형광/발광 표지균주의 제작을 위한 형질전환방법으로는, 전기충격을 통해 세포내로 DNA를 도입시키는 electroporation 기법을 이용하고자 함. 실험과정은 아래와 같음.

2. Electroporation에 대한 실험방법

- 2.1. 형질전환대상균체(*F. tularensis* LVS)를 액체배양하여 OD⁶⁰⁰=0.3~0.4 정도로 배양시킴.
- 2.2. 원심분리를 통해 균체만을 모은 후, electroporation buffer (glycerol, KCl, Tris-Cl)로 2~3회 washing함.
- 2.3. 적정량의 electroporation buffer에 균체를 suspension 시킨 후, 플라스미드 DNA (pKK214-GFP-Lux)를 섞고 ice에 위치시킴.
- 2.4. Electroporator (Eppendorpe or Bio-Rad)를 이용하여 플라스미드 DNA가 포함된 균체액에 전기충격을 가함(약 2000~3000 V, 25 μ F).
- 2.5. 균체액을 항생한천배지(choco agar plate with tetracycline)에 도말한 후 48~72 hr 동안 36 $^{\circ}$ C에서 배양하여 형질전환된 colony를 selection함.

Ref) Igor Golovliov et al. (2003) An attenuated strain of the facultative intracellular bacterium *Francisella tularensis* can escape the phagosome of monocytic cells, *Infection and immunity*, 71(10), 5940-5950.

Ref) Conrad P. Quinn et al. (1990) Transformation of vegetative cells of *Bacillus anthracis* with plasmid DNA, *Journal of general microbiology*, 136, 1211-1215.

나. 벡터에 관한 자료

1) 명칭, 기능 및 유래된 생물체



▶ 유전자변형을 위한 현대공학기술에 이용되는 벡터의 명칭, 벡터가 유래된 생물체에 대한 자료, NCBI의 Genbank 등 국제유전자은행 등록번호, 벡터의 주요 기능 및 용도 등을 기술합니다.

1. 명칭 : pKK214

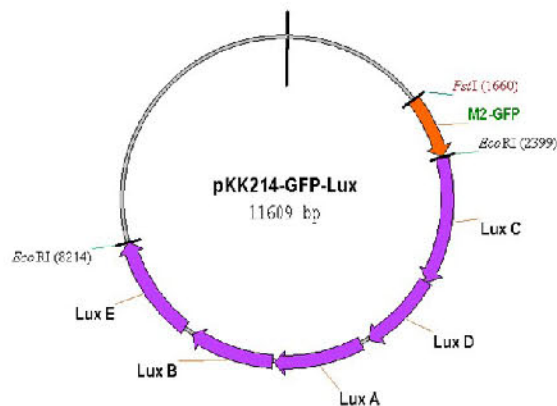
2. 기능 : *Francisella tularensis* 와 *E. coli* 내에서 모두 복제가 가능하도록, 각각의 replication origin이 재조합된 shuttle 벡터이며, 프로모터 study를 위해 자체적인 프로모터를 가지지 않음. 해당 벡터는 tetracycline 내성 유전자를 발현함.

Ref) Kerstin Kuoppa et al. (2001) Construction of a reporter plasmid for screening in vivo promoter activity in *Francisella tularensis*, *FEMS Microbiology letters*, 205, 77-81.

2) 구성요소 및 도입유전자를 포함한 지도



▶ 벡터 구성 유전자, 제한효소에 의한 절단위치, 프로모터, 선발표지유전자 및 도입유전자를 포함하는 지도를 제공합니다.



[그림 3] pKK214-GFP-Lux 벡터 지도

M2-GFP 유전자 앞에 bacterioferritin 프로모터가 존재하며, Lux operon (LuxCDABE) 뒤쪽 부위에 tetracycline 저항 유전자가 존재함. 각 위치에 표기된 restriction enzyme site는 cloning에 사용된 enzyme임.

[표 2] 벡터 내 각 구성 요소의 크기 및 구성요소의 origin

요소	크기		origin
bacterioferritin 프로모터	약 200 bp		Genomic DNA of <i>Francisella tularensis</i> LVS
M2-GFP	약 700 bp		pKK214-GFP 벡터 (from Umea University)
Lux operon (Lux CDABE)	약 5,800 bp		pXen-13 벡터 (Caliper Life Science)
	Lux A	1,026 bp	
	Lux B	987 bp	
	Lux C	1,446 bp	
	Lux D	927 bp	
	Lux E	1,188 bp	

Ref Kerstin Kuoppa et al. (2001) Construction of a reporter plasmid for screening in vivo promoter activity in *Francisella tularensis*, *FEMS Microbiology letters*, 205, 77-81.

Ref Igor Golovliov et al. (2003) An attenuated strain of the facultative intracellular bacterium *Francisella tularensis* can escape the phagosome of monocytic cells, *Infection and immunity*, 71(10), 5940-5950.

3) 병원성, 독소 등 위해염기서열의 존재여부



▶ 벡터가 가지는 병원성, 독소 등 위해염기서열 존재 여부와 존재하는 위해염기서열을 제거하고나 무력화한 경우 그 방법 및 안전성에 대하여 기술합니다.

pKK214 벡터는 병원성, 독소 등의 위해염기서열을 가지지 않음.

4) 다른 생물체로의 전달 가능성 및 숙주 범위



- ▶ 숙주 내에서 벡터의 복제수 및 안전성에 대한 정보와 숙주의 범위 및 다른 생물체로 벡터가 전달될 가능성에 대하여 기술합니다.

pKK214 벡터는 재조합 DNA를 *Francisella tularensis*에 전달하기 위해 사용되어 왔으며, 숙주의 범위 변화 및 다른 생물체로 벡터가 전달될 가능성에 대해서는 아직 보고된 것이 없음.

5) 선발표지유전자



- ▶ 벡터 내 존재하는 선발표지유전자의 존재여부 및 해당 표지유전자의 염기서열 및 기능 등 특성을 기술합니다.

pKK214 벡터 내에 선발표지 유전자로 tetracycline 내성 유전자(Tc^r)가 존재하기 때문에 벡터가 삽입된 균주는 tetracycline 배지 배양을 통해 선별이 가능함.

Ref) Igor Golovliov et al. (2003) An attenuated strain of the facultative intracellular bacterium *Francisella tularensis* can escape the phagosome of monocytic cells, *Infection and immunity*, 71(10), 5940-5950.

다. 도입유전자에 관한 자료

1) 도입유전자의 기능 및 특성(해당되는 사항만 기술)



- ▶ LMO에 도입되거나 소실된 유전자의 유래, 변형여부, 도입유전자의 기능 및 특성 등에 대한 자료를 기술합니다.

가) 병원성, 독성 등 위해 발현 가능성



- ▶ 종명까지 명시되어 있지 아니하고 인체병원성 여부가 밝혀지지 아니한 미생물의 유전자를 도입하여 이용하는 경우, 유전자의 삽입 또는 소실로 인하여 변화 또는 발현된 단백질의 생물학적 특성, 병원성 및 독소 생성 가능성, 항생제저항성 증가 등 인체 위해 발생 가능성에 대하여 기술합니다.
- ▶ 아래의 내용은 (가)항에만 해당되는 예시입니다.

종명까지 명시되어 있지 않고 인체 병원성 여부가 밝혀지지 않은 *Bacillus* 균속에 해당하는 미생물에 대한 병원성 발현을 확인하기 위하여 병원성 단백질과 유사한 spot을 보이는 A 단백질 발현 유전자를 *E. coli* expression 숙주-벡터 시스템을 이용하여 도입하여 유전자변형생물체(Bacillus1234-A E)를 개발하고자 함.

개발된 LMO(Bacillus1234-A E)를 배양하여 A 단백질을 정제한 후 병원성 및 병독성 시험을 위하여 마우스, 기니피, 토끼 등 실험동물에 접종하여 LD50 등을 측정하고, A 단백질의 아미노산 서열분석을 실시하고자 함.

나) 독소 생산성 및 독력, 생산 독소의 생물학적 및 생화학적 특성



- ▶ 척추동물에 대하여 몸무게 1kg당 50% 치사독소량이 100ng 미만인 단백질 독소를 생산할 능력을 가지는 유전자를 이용하는 경우, 도입유전자의 발현으로 생성된 단백질의 독력, 적용범위 및 생화학적 특성, 척추동물에 대한 유독성(LD50), 독소의 환경 내 생존력 등 인체 위해성을 기술합니다.
- ▶ 아래의 내용은 (나)항에만 해당되는 예시입니다.

보툴리눔 신경독소(Botulinum neurotoxins, BoNT)는 사람에게 매우 치명적인 단백질 독소로 이들 독소의 혈청형은 antibody neutralization의 특이성에 따라 결정됨. 화학적으로 불활성화된 보툴리눔 신경독소로부터 생산되는 백신은 매우 제한적임으로 받은 중요함.

보툴리눔 신경독소(BoNT)의 마우스에 대한 LD₅₀은 아래와 같음.

Toxin	LD50 ng/kg	비 고
<i>C. botulinum</i> toxin A	1.2	i.p.
<i>C. botulinum</i> toxin B (proteolytically activated)	1.2~2.0	i.p.
<i>C. botulinum</i> toxin C1 (proteolytically activated)	1.1	i.v.
<i>C. botulinum</i> toxin C2 (proteolytically activated)	1.2	i.p.
<i>C. botulinum</i> toxin D	0.4	i.p.
<i>C. botulinum</i> toxin E	1.1	
<i>C. botulinum</i> toxin F (proteolytically activated)	2.5	i.v.

보툴리눔 신경독소(BoNT)는 zinc proteases로 ~150kDa single chain protein로 3가지 기능적 domains를 가짐. 즉 N-terminal catalytic domain (light chain, LC), internal translocation domain (heavy chain, HCT)과 C-terminal receptor binding domain (heavy chain, HCR)임. BoNT는 flaccid paralysis를 유도하기 위하여 SNARE protein을 분할하는데 plasma membrane 상의 SNAP25 불활성화를 위하여 BoNT/A는 SNAP25 197과 198 residues를 분할하고, BoNT/E는 SNAP25 180과 181 residues를 분할하며, BoNT/C는 SNAP25와 syntaxin을 모두 분할함. BoNT는 분할을 위하여 SNAP25의 광범위한 regions을 인지하는데 그 기전은 명확하지 않음.

본 연구과제에서는 LC/A와 LC/E에 의한 optimal cleavage domain을 조사하고자 LC/A와 LC/E fragment를 코드하는 DNA를 각각 pET-15b에 클로닝하여 LMO(BoNT 1234 LC/A-E 및 BoNT 2345 LC/E-E)를 개발하고자 함. 또한, 개발한 유전자변형 물체(BoNT 1234 LC/A-E 및 BoNT 2345 LC/E-E)를 배양하여 His-LC/A, His-LC/E를 정제하고 병독성 및 항혈청 생산에 이용하고자함.

다) 약제 내성 발현성 및 교차 내성 등 특성



- ▶ 자연적으로 발생하지 아니하는 방식으로 생물체에 약제내성유전자를 의도적으로 전달하는 경우, 도입유전자로 발현된 단백질로 인하여 감수성이 저하되거나 교차내성 발현이 예상되는 항생제 종류 및 MIC 값의 변화 여부, 내성을 나타내는 항생제의 치료 효능성 등에 대하여 기술합니다.
- ▶ 아래의 내용은 (다)항에만 해당되는 예시입니다.

β -lactam계 중 penicillin이나 cephem계는 포도알균 감염 등 다양한 병원성 미생물 감염에 의한 질병 치료를 목적으로 사용되고 있는데, mecA와 mecR1 유전자는 β -lactam계 중 penicillin이나 cephem계 내성 발현에 관여하는 약제 내성 유전자로 mecA 유전자의 기능은 세균의 PBP(penicillin-binding protein) 2' 생성과 관련이 있는데 PBP 2'는 세균의 PBP와 pentapeptide 및 pentaglycine의 가교 반응을 저해하여 세포벽 완성을 저지하는 penicillin제(methicillin제)나 cephalosporine치로시 내성을 나타냄. mecA 유전자의 유래는 포도알균속 공통의 기원인 어떤 세균에서 수직 유전되었거나 포도알균 사이에서 수평으로 전달되었을 것으로 추정되고 있음. mecA operon에는 PBP 2' 생산 억제인자인 MecI를 코드하는 mecI 유전자 와 PBP 2'의 생산 유도에 필요한 signal 전달 단백질 MecR1을 코드하는 mecR1 유전자가 있음.

본 연구과제에서는 mecR1의 일부 유전자를 결실시켜 MecA 및 PBP 2' 발현을 비교하고, penicillin이나 cephem계에 대한 MIC 값의 변화 여부, 교차내성 발현이 예상되는 항생제 종류 등을 분석하고자 함.

라) 병원성 및 병독성, 감염대상 범위의 변이성 등 생물학적 특성



- ▶ 국민보건 상 국가관리가 필요한 병원성미생물의 유전자를 직접이용하거나 해당 병원성미생물의 유전자를 합성하여 이용하는 경우, 도입유전자의 발현 단백질로 인하여 유발되는 병원성 및 감염정보(질병발생, 감염량, 전파경로 등)에 대하여 기술합니다.
- ▶ 아래의 내용은 (라)항에만 해당되는 예시입니다.

1. M2-GFP : 녹색형광을 발현하는 형광단백질로서, 특정 sequence의 mutation을 통해 형광신호의 세기가 상대적으로 증대되어 있음.
2. Lux operon : 3개의 bacterial luciferase 유전자 및 2개의 luciferin 유전자로 구성되어 있으며, 생체내에서 발현되는 경우 luciferase 단백질에 의해 luciferin 이 분해되면서 luminescence 신호가 발현됨.

Ref) Brendan P. Cormack et al. (1996) FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP), *Gene*, 173, 33-38.

Ref) Michael K. Winson et al. (1998) Engineering the *luxCDABE* genes from *Photobacterium luminescens* to provide a bioluminescent reporter for constitutive and promoter probe plasmid and mini-Tn5 constructs, *FEMS microbiology letters*, 163, 193-202.

2) 도입유전자의 크기, 명칭 및 염기서열(위해염기서열의 존재여부 포함)



- ▶ 도입유전자의 염기서열을 제공하고 다른 유전자와의 재조합 등 변형 여부 및 그 내용, 위해염기서열의 존재 여부에 대하여 기술합니다.

1. M2-GFP 유전자

도입유전자중 첫 번째 유전자인 M2-GFP 유전자는 717 nucleotide로 구성되어 있음. Original GFP 유전자에서 3가지 부분의 아미노산 잔기의 치환(말줄)에 의해 원 GFP의 30배 이상의 형광세기를 가지도록 modify 되었음. 해당 유전자 내에 위해염기서열은 존재하지 않음.

1 ATG AGT AAA GGA GAA GAA CTT TTC ACT GGA GTT GTC CCA ATT CTT GTT GAA TTA GAT GGT 60
 61 GAT GTT AAT GGG CAC AAA TTT TCT GTC AGT GGA GAG GGT GAA GGT GAT GCA ACA TAC GGA 120
 121 AAA CTT ACC CTT AAA TTT ATT TGC ACT ACT GGA AAA CTA OCT GTT CCA TGG CCA ACA CTT 180
 181 GTC ACT ACT TTC GCG TAT GGT CTT CAA TGC TTT GCG AGA TAC CCA GAT CAT ATG AAA CAG 240
 241 CAT GAC TTT TTC AAG AGT GCC ATG CCC GAA GGT TAT GTA CAG GAA AGA ACT ATA TTT TTC 300
 301 AAA CAT GAC GGG AAC TAC AAG ACA CGT GCT GAA GTC AAG TTT GAA GGT GAT ACC CTT GTT 360
 361 AAT AGA ATC GAG TTA AAA GGT ATT GAT TTT AAA GAA GAT GGA AAC ATT CTT GGA CAC AAA 420
 421 TTG GAA TAC AAC TAT AAC TCA CAC AAT GTA TAC ATC ATG GCA GAC AAA CAA AAG AAT GGA 480
 481 ATC AAA GTT AAC TTC AAA ATT AGA CAC AAC ATT GAA GAT GGA AGC GTT CAA CTA GCA GAC 540
 541 CAT TAT CAA CAA AAT ACT CCA ATT GGC GAT GGC CCT GTC CTT TTA CCA GAC AAC CAT TAC 600
 601 CTG TOC ACA CAA TCT GCC CTT TCG AAA GAT CCC AAC GAA AAG AGA GAC CAC ATG GTC CTT 660
 661 CTT GAG TTT GTA ACA GCT GCT GGG ATT ACA CAT GGC ATG GAT GAA CTA TAC AAA TAA 717

2. Lux operon

두 번째 도입유전자인 Lux operon은 약 5.8 Kb의 길이이며, 3개의 luciferase 유전자(Lux A,B,C)와 2개의 luciferin 유전자(Lux D,E)로 구성되어 있음. 5개의 각 유전자들은 동시에 발현되어 luminescence 신호를 발현함. 해당 유전자 내에 위해염 기서열은 존재하지 않음.

1 ATG ACT AAA AAA ATT TCA TTC ATT ATT AAC GGC CAG GTT GAA ATC TTT CCC GAA AGT GAT 60
 61 GAT TTA GTG CAA TOC ATT AAT TTT GGT GAT AAT AGT GTT TAC CTG CCA ATA TTG AAT GAC 120
 121 TCT CAT GTA AAA AAC ATT ATT GAT TGT AAT GGA AAT AAC GAA TTA CCG TTG CAT AAC ATT 180
 181 GTC AAT TTT CTC TAT ACG GTA GGG CAA AGA TGG AAA AAT GAA GAA TAC TCA AGA CGC AGG 240
 241 ACA TAC ATT OGT GAC TTA AAA AAA TAT ATG GGA TAT TCA GAA GAA ATG GCT AAG CTA GAG 300
 301 GCC AAT TGG ATA TCT ATG ATT TTA TGT TCT AAA GGC GGC CTT TAT GAT GTT GTA GAA AAT 360
 361 GAA CTT GGT TCT CGC CAT ATC ATG GAT GAA TGG CTA OCT CAG GAT GAA AGT TAT GTT CCG 420
 421 GCT TTT CCG AAA GGT AAA TCT GTA CAT CTG TTG GCA GGT AAT GTT CCA TTA TCT GGG ATC 480
 481 ATG TCT ATA TTA CGC GCA ATT TTA ACT AAG AAT CAG TGT ATT ATA AAA ACA TCG TCA ACC 540
 541 GAT OCT TTT AOC GCT AAT GCA TTA GCG TTA AGT TTT ATT GAT GTA GAC CCT AAT CAT CCG 600

601 ATA ACG CGC TCT TTA TCT GTT ATA TAT TGG CCC CAC CAA GGT GAT ACA TCA CTC GCA AAA 660
 661 GAA ATT ATG CGA CAT GCG GAT GTT ATT GTC GCT TGG GGA GGG CCA GAT GCG ATT AAT TGG 720
 721 GCG GTA GAG CAT GCG CCA TCT TAT GCT GAT GTG ATT AAA TTT GGT TCT AAA AAG AGT CTT 780
 781 TGC ATT ATC GAT AAT CCT GTT GAT TTG ACG TCC GCA GCG ACA GGT GCG GCT CAT GAT GTT 840
 841 TGT TTT TAC GAT CAG CGA GCT TGT TTT TCT GCC CAA AAC ATA TAT TAC ATG GGA AAT CAT 900
 901 TAT GAG GAA TTT AAG TTA GCG TTG ATA GAA AAA CTT AAT CTA TAT GCG CAT ATA TTA CCG 960
 961 AAT GCC AAA AAA GAT TTT GAT GAA AAG GCG GCC TAT TCT TTA GTT CAA AAA GAA AGC TTG 1020
 1021 TTT GCT GGA TTA AAA GTA GAG GTG GAT ATT CAT CAA CGT TGG ATG ATT ATT GAG TCA AAT 1080
 1081 GCA GGT GTG GAA TTT AAT CAA CCA CTT GGC AGA TGT GTG TAC CTT CAT CAC GTC GAT AAT 1140
 1141 ATT GAG CAA ATA TTG CCT TAT GTT CAA AAA AAT AAG ACG CAA ACC ATA TCT ATT TTT CCT 1200
 1201 TGG GAG TCA TCA TTT AAA TAT CGA GAT GCG TTA GCA TTA AAA GGT GCG GAA AGG ATT GTA 1260
 1261 GAA GCA GGA ATG AAT AAC ATA TTT CGA GTT GGT GGA TCT CAT GAC GGA ATG AGA CCG TTG 1320
 1321 CAA CGA TTA GTG ACA TAT ATT TCT CAT GAA AGG CCA TCT AAC TAT ACG GCT AAG GAT GTT 1380
 1381 GCG GTT GAA ATA GAA CAG ACT CGA TTC CTG GAA GAA GAT AAG TTC CTT GTA TTT GTC CCA 1440
 1441 TAA TAG GTA AAA GTA TGG AAA ATG AAT CAA AAT ATA AAA CCA TCG ACC ACG TTA TTT GTG 1500
 1501 TTG AAG GAA ATA AAA AAA TTC ATG TTT GGG AAA CGC TGC CAG AAG AAA ACA GCC CAA AGA 1560
 1561 GAA AGA ATG CCA TTA TTA TTG CGT CTG GTT TTG CCC GCA GGA TGG ATC ATT TTG CTG GTC 1620
 1621 TGG CGG AAT ATT TAT CGC GGA ATG GAT TTC ATG TGA TCC GCT ATG ATT CGC TTC ACC ACG 1680
 1681 TTG GAT TGA GTT CAG GGA CAA TTG ATG AAT TTA CAA TGT CTA TAG GAA AGC AGA GCT TGT 1740
 1741 TAG CAG TGG TTG ATT GGT TAA CTA CAC GAA AAA TAA ATA ACT TCG GTA TGT TGG CTT CAA 1800
 1801 GCT TAT CTG CGC GGA TAG CTT ATG CAA GCC TAT CTG AAA TCA ATG CTT CGT TTT TAA TCA 1860
 1861 CCG CAG TCG GTG TTG TTA ACT TAA GAT ATT CTC TTG AAA GAG CTT TAG GGT TTG ATT ATC 1920
 1921 TCA GTC TAC CCA TTA ATG AAT TGC CGG ATA ATC TAG ATT TTG AAG GCC ATA AAT TGG GTG 1980
 1981 CTG AAG TCT TTG CGA GAG ATT GTC TTG ATT TTG GTT GGG AAG ATT TAG CTT CTA CAA TTA 2040
 2041 ATA ACA TGA TGT ATC TTG ATA TAC CGT TTA TTG CIT TTA CTG CAA ATA ACG ATA ATT GGG 2100
 2101 TCA AGC AAG ATG AAG TTA TCA CAT TGT TAT CAA ATA TTC GTA GTA ATC GAT GCA AGA TAT 2160
 2161 ATT CTT TGT TAG GAA GTT CGC ATG ACT TGA GTG AAA ATT TAG TGG TCC TGC GCA ATT TTT 2220
 2201 ATC AAT CCG TTA CGA AAG CCG CTA TCG CGA TGG ATA ATG ATC ATC TGG ATA TTG ATG TTG 2280

2281 ATA TTA CTG AAC CGT CAT TTG AAC ATT TAA CTA TTG CGA CAG TCA ATG AAC GCC GAA TGA 2340
 2341 GAA TTG AGA TTG AAA ATC AAG CAA TTT CTC TGT CTT AAA ATC TAT TGA GAT ATT CTA TCA 2400
 2401 CTC AAA TAG CAA TAT AAG GAC TCT CTA TGA AAT TTG GAA ACT TTT TGC TTA CAT ACC AAC 2460
 2461 CTC CCC AAT TTT CTC AAA CAG AGG TAA TGA AAC GTT TGG TTA AAT TAG GTC GCA TCT CTG 2520
 2521 AGG AGT GTG GTT TTG ATA CCG TAT GGT TAC TGG AGC ATC ATT TCA CGG AGT TTG GTT TGC 2580
 2581 TTG GTA ACC CTT ATG TCG CTG CTG CAT ATT TAC TTG GCG CGA CTA AAA AAT TGA ATG TAG 2640
 2641 GAA CTG CCG CTA TTG TTC TTC CCA CAG CCC ATC CAG TAC GCC AAC TTG AAG ATG TGA ATT 2700
 2701 TAT TGG ATC AAA TGT CAA AAG GAC GAT TTC GGT TTG GTA TTT GCC GAG GGC TTT ACA ACA 2760
 2761 AGG ACT TTC GCG TAT TCG GCA CAG ATA TGA ATA ACA GTC GCG CCT TAG CGG AAT GCT GGT 2820
 2821 ACG GGC TGA TAA AGA ATG GCA TGA CAG AGG GAT ATA TGG AAG CTG ATA ATG AAC ATA TCA 2880
 2881 AGT TCC ATA AGG TAA AAG TAA ACC CCG CGG CGT ATA GCA GAG GTG GCG CAC CGG TTT ATG 2940
 2941 TGG TGG CTG AAT CAG CTT CGA CGA CTG AGT GGG CTG CTC AAT TTG GCC TAC CGA TGA TAT 3000
 3001 TAA GTT GGA TTA TAA ATA CTA ACG AAA AGA AAG CAC AAC TTG AGC TTT ATA ATG AAG TGG 3060
 3061 CTC AAG AAT ATG GGC ACG ATA TTC ATA ATA TCG ACC ATT GCT TAT CAT ATA TAA CAT CTG 3120
 3121 TAG ATC ATG ACT CAA TTA AAG CGA AAG AGA TTT GCC GGA AAT TTC TGG GGC ATT GGT ATG 3180
 3181 ATT CTT ATG TGA ATG CTA CGA CTA TTT TTG ATG ATT CAG ACC AAA CAA GAG GTT ATG ATT 3240
 3241 TCA ATA AAG GGC AGT GGC GTG ACT TTG TAT TAA AAG GAC ATA AAG ATA CTA ATC GCC GTA 3300
 3301 TTG ATT ACA GTT ACG AAA TCA ATC CCG TGG GAA CGC CGC AGG AAT GTA TTG ACA TAA TTC 3360
 3361 AAA AAG ACA TTG ATG CTA CAG GAA TAT CAA ATA TTT GTT GTG GAT TTG AAG CTA ATG GAA 3420
 3421 CAG TAG ACG AAA TTA TTG CTT CCA TGA AGC TCT TCC AGT CTG ATG TCA TGC CAT TTC TTA 3480
 3481 AAG AAA AAC AAC GTT CGC TAT TAT ATT AGC TAA GGA GAA AGA AAT GAA ATT TGG ATT GTT 3540
 3541 CTT CCT TAA CTT CAT CAA TTC AAC AAC TGT TCA AGA ACA AAG TAT AGT TCG CAT GCA GGA 3600
 3601 AAT AAC GGA GTA TGT TGA TAA GTT GAA TTT TGA ACA GAT TTT AGT GTA TGA AAA TCA TTT 3660
 3661 TTC AGA TAA TGG TGT TGT CGG CGC TCC TCT GAC TGT TTC TGG TTT TCT GCT CGG TTT AAC 3720
 3721 AGA GAA AAT TAA AAT TGG TTC ATT AAA TCA CAT CAT TAC AAC TCA TCA TCC TGT CGC CAT 3780
 3781 AGC GGA GGA AGC TTG CTT ATT GGA TCA GTT AAG TGA AGG GAG ATT TAT TTT AGG GTT TAG 3840
 3841 TGA TTG CGA AAA AAA AGA TGA AAT GCA TTT TTT TAA TCG CCC GGT TGA ATA TCA ACA GCA 3900
 3901 ACT ATT TGA AGA GTG TTA TGA AAT CAT TAA CGA TGC TTT AAC AAC AGG CTA TTG TAA TCC 3960

3961 AGA TAA CGA TTT TTA TAG CTT CCC TAA AAT ATC TGT AAA TCC CCA TGC TTA TAC GCC AGG 4020
 4021 CGG ACC TCG GAA ATA TGT AAC AGC AAC CAG TCA TCA TAT TGT TGA GTG GGC GGC CAA AAA 4080
 4081 AGG TAT TCC TCT CAT CTT TAA GTG GGA TGA TTC TAA TGA TGT TAG ATA TGA ATA TGC TGA 4140
 4141 AAG ATA TAA AGC CGT TGC GGA TAA ATA TGA CGT TGA CCT ATC AGA GAT AGA CCA TCA GTT 4200
 4201 AAT GAT ATT AGT TAA CTA TAA CGA AGA TAG TAA TAA AGC TAA ACA AGA GAC GCG TGC ATT 4260
 4261 TAT TAG TGA TTA TGT TCT TGA AAT GCA CCC TAA TGA AAA TTT CGA AAA TAA ACT TGA AGA 4320
 4321 AAT AAT TGC AGA AAA CGC TGT CGG AAA TTA TAC GGA GTG TAT AAC TGC GGC TAA GTT GGC 4380
 4381 AAT TGA AAA GTG TGG TGC GAA AAG TGT ATT GCT GTC CTT TGA ACC AAT GAA TGA TTT GAT 4440
 4441 GAG CCA AAA AAA TGT AAT CAA TAT TGT TGA TGA TAA TAT TAA GAA GTA CCA CAT GGA ATA 4500
 4501 TAC CTA ATA GAT TTC GAG TTG CAG CGA GGC GGC AAG TGA ACG AAT CCC CAG GAG CAT AGA 4560
 4561 TAA CTA TGT GAC TGG GGT GAG TGA AAG CAG CCA ACA AAG CAG CAG CTT GAA AGA TGA AGG 4620
 4621 GTA TAA AAG AGT ATG ACA GCA GTG CTG CCA TAC TTT CTA ATA TTA TCT TGA GGA GTA AAA 4680
 4681 CAG GTA TGA CTT CAT ATG TTG ATA AAC AAG AAA TTA CAG CAA GCT CAG AAA TTG ATG ATT 4740
 4741 TGA TTT TTT CGA GCG ATC CAT TAG TGT GGT CTT ACG ACG AGC AGG AAA AAA TCA GAA AGA 4800
 4801 AAC TTG TGC TTG ATG CAT TTC GTA ATC ATT ATA AAC ATT GTC GAG AAT ATC GTC ACT ACT 4860
 4861 GTC AGG CAC ACA AAG TAG ATG ACA ATA TTA CGG AAA TTG ATG ACA TAC CTG TAT TCC CAA 4920
 4921 CAT CGG TTT TTA AGT TTA CTC GCT TAT TAA CTT CTC AGG AAA ACG AGA TTG AAA GTT GGT 4980
 4981 TTA CCA GTA GCG GCA CGA ATG GTT TAA AAA GTC AGG TGG CGC GTG ACA GAT TAA GTA TTG 5040
 5041 AGA GAC TCT TAG GCT CTG TGA GTT ATG GCA TGA AAT ATG TTG GTA GTT GGT TTG ATC ATC 5100
 5101 AAA TAG AAT TAG TCA ATT TGG GAC CAG ATA GAT TTA ATG CTC ATA ATA TTT GGT TTA AAT 5160
 5161 ATG TTA TGA GTT TGG TGG AAT TGT TAT ATC CTA CGA CAT TTA CCG TAA CAG AAG AAC GAA 5220
 5221 TAG ATT TTG TTA AAA CAT TGA ATA GTC TTG AAC GAA TAA AAA ATC AAG GGA AAG ATC TTT 5280
 5281 GTC TTA TTG GTT CGC CAT ACT TTA TTT ATT TAC TCT GCC ATT ATA TGA AAG ATA AAA AAA 5340
 5341 TCT CAT TTT CTG GAG ATA AAA GCC TTT ATA TCA TAA CCG GAG GCG GCT GGA AAA GTT ACG 5400
 5401 AAA AAG AAT CTC TGA AAC GTG ATG ATT TCA ATC ATC TTT TAT TTG ATA CTT TCA ATC TCA 5460
 5461 GTG ATA TTA GTC AGA TCC GAG ATA TAT TTA ATC AAG TTG AAC TCA ACA CTT GTT TCT TTG 5520
 5521 AGG ATG AAA TGC AGC GTA AAC ATG TTC CGC CGT GGG TAT ATG CGC GAG CGC TTG ATC CTG 5580
 5581 AAA CGT TGA AAC CTG TAC CTG ATG GAA CGC CGG GGT TGA TGA GTT ATA TGG ATG CGT CAG 5640

5641 CAA CCA GTT ATC CAG CAT TTA TTG TTA CCG ATG ATG TCG GGA TAA TTA GCA GAG AAT ATG 5700
 5701 GTA AGT ATC CCG GCG TGC TCG TTG AAA TTT TAC GTC GCG TCA ATA CGA GGA CGC AGA AAG 5760
 5761 GGT GTG CTT TAA GCT TAA CCG AAG CGT TTG ATA GTT GA 5800

Ref) Brendan P. Cormack et al. (1996) FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP), *Gene*, 173, 33-38.

Ref) Michael K. Winson et al. (1998) Engineering the *luxCDABE* genes from *Photorhabdus luminescens* to provide a bioluminescent reporter for constitutive and promoter probe plasmid and mini-Tn5 constructs, *FEMS microbiology letters*, 163, 193-202.

1. 알려진 독소와의 상동성분석(분석자료중 E-value 1.0 인 protein들의 정보 기재함)

1.2. M2-GFP

accession	description	Max score	total score	query coverage	E-value	Max ident
YP_004796926.1	iron-dependent repressor [Halobaculum hispanica ATCC 33960]	22.3	22.3	13%	1.0	33%
ZP_06324853.1	enterotoxin [Staphylococcus aureus subsp. aureus D139] >ref ZP_06343805.1 enterotoxin [Staphylococcus aureus subsp. aureus H19]	22.7	22.7	15%	1.0	38%

1.2. Lux A

accession	description	Max score	total score	query coverage	E-value	Max ident
EHM65694.1	superantigen-like protein [Staphylococcus aureus subsp. aureus VCU006] >gb EHT93922.1 beta-grasp domain toxin protein [Staphylococcus aureus subsp. aureus CIGC93]	21.9	21.9	21%	1.0	29%

1.3. Lux B : E-value = 1.0 항목 없음

1.4. Lux C

accession	description	Max score	total score	query coverage	E-value	Max ident
AAG36957.1	SEGL29P [Staphylococcus aureus]	21.6	21.6	16%	1.0	18%

1.5. Lux D : E-value = 1.0 항목 없음

1.6. Lux E

accession	description	Max score	total score	query coverage	E-value	Max ident
BAF32910.1	type III effector HopAE1 [Pseudomonas syringae pv. phaseolicola]	23.1	23.1	5%	1.0	48%
YP_001693542.1	holin 1 [Streptococcus pneumoniae Hungary19A-6] >ref YP_006252292.1 putative holin 1 [>gb EHD56283.1 toxin secretion/phage lysis holin family protein [Streptococcus pneumoniae GA44500] >gb EHE17952.1 toxin secretion/phage lysis holin family protein [Streptococcus pneumoniae GA41277] >gb AFC93757.1 putative holin 1 [Streptococcus pneumoniae ST556] >gb EHZ01749.1 toxin secretion/phage lysis holin family protein [Streptococcus pneumoniae GA04175] >gb EHZ41726.1 toxin secretion/phage lysis holin family protein [Streptococcus pneumoniae GA40183] >gb EJG91829.1 putative holin 1 [Streptococcus pneumoniae GA04672]	22.3	22.3	6%	1.0	38%

2. 알려진 알러젠과의 상동성 분석 - AllergenOnline (8mer exact match)

M2-GFP, Lux A, Lux B, Lux C, Lux D, Lux E

: No sequences found with an exact 8mer match

3) 조절인자 및 유전자 기능에 영향을 주는 기타 인자



▶ 도입유전자의 발현을 조절하거나 기능에 영향을 주는 기타 인자에 대하여 기술합니다.

도입된 M2-GFP 유전자 및 Lux operon은 벡터에 함께 삽입된 GroEL 프로모터에 의해 발현되며, 이 외에 도입 유전자의 발현이나 기능에 영향을 주는 기타인자는 없음.

6. 안전관리에 관한 자료

가. 신청과제에 대한 기관 생물안전위원회의 생물안전심사 결과자료



- ▶ 전체 실험계획에 대한 기관 생물안전위원회 승인번호, 결과서 및 동물실험이 계획되어 있을 경우, 동물실험윤리위원회의 승인번호, 결과서 등을 첨부합니다.

본 실험에 대한 연구계획은 2013년 기관 생물안전위원회의(IBC) 승인을 받았음(승인번호 : ABCE-IBC-13-001). 또한, 본 연구수행에 필요한 동물실험은 기관 동물실험윤리위원회의 승인을 받았음(승인번호: ABCE-IACUC-13-001)

나. 유전자변형생물체 취급 · 보관 안전관리에 관한 자료

1) 개발 및 실험의 안전관리수칙 및 응급조치사항 포함



- ▶ LMO 개발 및 실험 과정을 간략히 기술하고, 각 실험 단계별 안전관리사항(안전관리 등급 포함)을 기술합니다.

Francisella tularensis Schu S4 및 Pohang주는 보건복지부고시 제2007-39호에 의거 제 3 위험군에 속하는 병원체로 분류됨. 따라서 생물안전 3등급(BL 3 및 ABL-3, 연구시설 허가번호 : ABCD-11-3-06호) 연구시설에서 취급 및 보관하도록 권장됨.

Francisella tularensis LVS은 약독화된 균주로서 사람에게 비병원성이므로 생물안전 2+등급(BL2+, 연구시설 신고번호 : ABCD-011-2-02호) 연구시설에서 취급 및 보관하도록 권장됨(WHO 가이드라인 p41-42).

Ref) World Health Organization (2007) WHO guidelines on tularaemia.

2) 연구시설 설치 · 운영 현황(연구시설 신고 및 허가 자료 포함)



- ▶ LMO를 개발하거나 이용하는 실험 시 사용되는 생물안전작업대(BSC), 고압증기 멸균기, 병원체 보관 장비 등을 기술하고, 유전자변형생물체법에 의거하여 기 신고 또는 허가된 연구시설 설치 · 운영 확인자료를 첨부합니다.

본 과에 갖추어져 있는 생물안전 2등급(BL 2) 연구시설(ABCD-011-2-02호) 및 생물안전 3등급 연구시설(ABCD-11-3-06호)은 기본적인 미생물실험을 위한 개인보호장구 및 BSC, 생물안전장비 등이 구비되어 있음.

pKK214-GFP-Lux 플라스미드 추출을 위한 실험($F. tularensis$ LV5의 배양(회당 5mL) 및 플라스미드 DNA 추출)은 기 승인된 심의결과에 따라 BL2 연구시설에서 수행되며, 이후 Schu S4 및 포항주를 이용한 모든 실험은 BL3 및 ABL3 연구시설에서 수행됨. 본 연구는 기관의 실험실생물안전지침에 의거하여 진행될 계획임.

3) 개발 및 실험의 안전관리수칙 및 응급조치사항 포함



- ▶ LMO를 이용하는 실험 중 비의도적 사고 등으로 인하여 시험 · 연구자가 LMO에 노출되거나 유전자변형생물체가 유출된 경우를 대비하기 위한 응급조치, LMO 취급에 대한 주의사항 및 위해 예방조치 등 안전관리수칙을 기술합니다.

1. '기관 실험실생물안전지침'에 수록된 실험실 생물안전사고 대응 및 응급조치 준수사항을 이행함(아래 3. 실험자에 대한 조치, 4. 사고 상황에 대한 조치 참조)
2. 미생물 및 감염성물질을 취급하던 중 실험종사자의 신체가 직접 노출되거나 흡입, 섭취 등의 사고, 병원체를 접촉한 감염성물질이 유출되는 등의 생물안전사고는 이러한 물질들을 취급하는 곳에서는 언제나 발생가능하다. 생물안전사고가 발생한 경우, 실험종사자는 응급조치 후 과장 및 과 생물안전관리자에게 즉시 보고하여 적절한 의료적 처치를 받을 수 있는 관련 절차 등이 신속하게 수행될 수 있도록 해야 함.
3. 실험자에 대한 조치
 - 3.1. 감염성물질 등이 안면부에 접촉되었을 때

- 3.1.1. 눈에 물질이 튀거나 들어간 경우, 즉시 Eye washer 또는 흐르는 깨끗한 물을 사용하여 15분 이상 세척한다.
- 3.1.2. 필요한 경우 샤워실을 이용하여 전신을 세척한다.
- 3.1.3. 발생 사고에 대해 과장에게 즉시 보고하고 필요한 조치를 받는다.
- 3.1.4. 과장은 기관생물안전관리책임자 또는 의료관리자에게 보고하고 취급하였던 감염성물질을 고려한 적절한 의학적 조치 등을 취한다.
- 3.2. 감염성 물질 등이 안면부를 제외한 신체에 접촉되었을 때
 - 3.2.1. 장갑 또는 실험복 등 착용하고 있던 개인보호구를 벗는다.
 - 3.2.2. 즉시 흐르는 물로 세척 또는 샤워한다.
 - 3.2.3. 오염 부위를 소독한다.
 - 3.2.4. 발생 사고에 대해 과장에게 즉시 보고하고 필요한 조치를 받는다.
 - 3.2.5. 과장은 기관생물안전관리책임자 또는 의료관리자에게 보고하고 취급하였던 감염성물질을 고려한 적절한 의학적 조치 등을 취한다.
- 3.3. 감염성물질 등을 섭취한 경우
 - 3.3.1. 즉시 실험복을 벗고 즉각적인 의료적 처치가 가능하도록 의료관리자에게 연락하여 조치에 따르고 의료기관으로 이송한다.
 - 3.3.2. 섭취한 물질과 사고 사항을 즉시 기록하여 치료에 도움이 될 수 있도록 관련자들에게 전달한다.
- 3.4. 기타 물질 또는 실험 중 부상을 당했을 경우
 - 3.4.1. 발생한 사태에 대하여 과장 및 의료관리자에게 즉시 보고하여 필요한 조치를 받는다.
 - 3.4.2. 과장은 기관생물안전관리책임자 또는 의료관리자에게 보고하고 취급하였던 감염성물질을 고려한 적절한 의학적 조치 등을 취한다.
4. 사고 상황에 대한 조치
 - 4.1. 미생물 및 감염성물질에 관련된 연구를 수행하는 각각의 실험실에는 생물학적 유출 처리 키트(biological spill kit)등을 비치하여 발생할 수 있는 유출사고에 대비하도록 한다. 키트는 유출사고에 빠르게 대처할 수 있도록 필요한 물품들로 구성되어 있다. 기본 물품으로 소독제, 멸균용 봉투, 종이타월, 소독제,

멸균용 봉투, 종이타월, 개인보호구(일회용 장갑, 보안경, 마스크 등) 및 깨진 유리조각을 집을 수 있는 핀셋, 빗자루 등의 도구도 필요하다. 또한 화학 유출 처리 키트(chemical spill kit) 또는 범용 유출 처리 키트(universal spill kit) 등을 함께 구비할 수 있다.

4.2. 실험구역 내에서 감염성물질 등이 유출된 경우

- 4.2.1. 종이타월이나 소독제가 포함된 흡수물질 등으로 유출물을 천천히 덮어 에어로졸 발생 및 유출 부위가 확산되는 것을 방지한다.
- 4.2.2. 유출 지역에 있는 사람들에게 사고사실을 알려 실험자들이 즉시 사고구역을 벗어나게 하고 과장 및 관리자에게 보고하고 지시에 따른다.
- 4.2.3. 사고 시 발생한 에어로졸이 가라앉도록 20-30분간 방치한 후, 개인보호구를 착용하고 사고 지역으로 돌아간다.
- 4.2.4. 장갑을 낀 손으로 핀셋을 사용하여 깨진 유리조각 등을 집고, 소형의 날카로운 기기(주사바늘 등)는 손상성폐기물 전용용기에 넣는다.
- 4.2.5. 유출된 모든 구역에 효과적으로 미생물을 비 활성화시킬 수 있는 소독제를 첨가하고 20분 이상 그대로 둔다.
- 4.2.6. 종이타월 및 흡수물질 등은 의료폐기물 전용용기에 넣는다.
- 4.2.7. 소독제를 사용하여 유출된 모든 구역을 닦는다.
- 4.2.8. 청소가 끝난 후 처리작업에 사용했던 기구 등은 의료폐기물 전용용기에 넣어 처리하거나 재사용할 경우 소독 및 세척한다.
- 4.2.9. 장갑, 작업복 등 오염된 개인보호구는 의료폐기물 전용용기에 넣어 처리하고, 노출된 신체부위를 비누와 물을 사용하여 세척하고, 필요한 경우 소독 및 샤워 등으로 오염을 제거한다.

4.3. 생물안전작업대 내에서 감염성물질 등이 유출된 경우

- 4.3.1. 생물안전작업대의 팬을 가동 시킨 후 유출 지역에 있는 사람들에게 사고 사실을 알리고 과장 및 관리자에게 보고한다.
- 4.3.2. 장갑, 호흡보호구 등 개인보호구를 착용하고 70% 에탄올 등의 효과적인 소독제를 사용하여 작업대 벽면, 작업 표면 및 이용한 장비들에 뿌리고 적정 시간 동안 방치해 둔다.
- 4.3.3. 종이타월을 사용하여 소독제와 유출 물질을 치우고 모든 실험대 표면을 닦아낸다.

- 4.3.4. 생물안전작업대에서 모든 물체들을 제거하기 전에 벽면에 붙어 있는 모든 물질을 살균처리 하고 UV램프를 작동시킨다.
- 4.3.5. 청소작업이 끝난 후 처리작업에 사용했던 기구 등은 의료폐기물 전용용기에 넣어 처리하거나 재사용할 경우 소독 및 세척한다.
- 4.3.6. 장갑, 작업복 등 오염된 개인보호구는 감염성폐기물 전용용기에 넣어 폐기 하고, 노출된 신체부위를 비누와 물을 사용하여 세척하며 필요한 경우 소독 및 샤워 등으로 오염을 제거한다.
- 4.3.7. 만일 유출된 감염성물질이 생물안전작업대 안으로 들어간 경우, 생물안전관리자에게 알리고 지시에 따른다.

4) 유전자변형생물체 보관 · 표시 및 폐기 방법



▶ LMO의 특성을 유지하고 안전하게 보관할 수 있도록 보관 방법 및 표시 사항을 기술합니다. 또한 LMO를 폐기하는 경우, LMO의 생존능력을 완전히 제거하고 불활성화 할 수 있는 폐기방법을 기술합니다.

1. 보관 및 폐기

실험에 사용되는 균주의 보관 및 폐기는 기관의 실험실생물안전지침에 의거하여 진행될 계획임.

2. 보관방법

개발된 LMO 보관 용기에는 LMO 명칭, 관리번호 등을 표시하고, 유전자변형생물체 법 시행규칙 별지 제44호 서식 [유전자변형생물체 보관 관리대장] 및 별지 제42호 서식[유전자변형생물체 개발관리대장]에 입고, 출고, 재고 수량 등을 기록하여 관리함. 간략한 내용은 다음과 같음.

3. 폐기방법

실험에 사용된 균주 및 관련 실험재료 등은 고압증기멸균 등의 방법으로 완전히 사멸시킨 후, [폐기물관리법]에 의거한 의료폐기물 처리방법에 따라 처리함.

5) 개발 및 실험 관여 전문인력 현황



- ▶ LMO 또는 LMO로부터 생산한 산물을 동·식물에 이용하여 실험할 경우, 동·식물의 명칭 및 분류학적 특성, 유사한 목적으로 이용된 사례 등에 대하여 기술합니다.

*Francisella tularensis*를 이용하는 실험에 참여하는 시험, 연구자 인력정보는 아래와 같음.

[표 3] 연구자 인력정보

소속	성명	직위	학력	연락처	실험 경력	생물안전교육 이수여부
00기관 0000과	홍길동*	과장	박사	043)719-0000	10년	이수
	김생물	책임연구원	박사	043)719-0001	5년	이수
	이안전	선임연구원	박사	043)719-0002	3년	이수
	박평가	연구원	석사	043)719-0003	1년	이수

* : 연구책임자

다. 유전자변형미생물의 동·식물 접종에 관한 자료(해당되는 경우)

1) 접종 대상 동식물의 명칭 및 분류학적 특성



▶ LMO를 개발하거나 이용하는 실험에 참여하여 LMO를 취급하고 보관하는 시험·연구자 및 관리책임자의 성명, 소속, 직위, 학력, 연락처, 실험경험 및 생물안전 교육이수 여부 등에 대하여 기술합니다.

1. 실험목적

Francisella tularensis 아종별, 감염경로별 감염기전의 효과적인 분석을 위해, 형광/발광표지 야토균을 mouse에 주입한 후, 형광/발광분석을 통해 감염이후 병원체의 증식, 분포 및 이동을 분석함으로써, 야토균의 각 아종별, 감염경로별 차이를 규명하고자 함. 또한, 생체분자영상 기술을 이용하여 각 감염상황에 따라 일어나는 면역반응을 *in vivo*에서 분석함으로써, 야토균의 치료 및 예방을 위한 생물학적 정보를 제시하고자 함.

2. 실험동물

4~8주령 BALB/c mouse

3. 유사연구사례

2010년, 미국 tennessee 대학의 연구그룹에서 luciferase를 발현하는 *Francisella tularensis* LVS 균주를 제작한 후, 이를 mouse에 감염시킨 후 병원체의 분포영상을 확인함.

Ref) Xiaowen R. Bina et al. (2010) Construction of a bioluminescence reporter plasmid for *Francisella tularensis*, *Plasmid*, 64, 156-161.

2) 실험 및 폐기 방법



▶ 유전자변형미생물을 접종하는 실험의 과정 및 방법, 안전준수수칙 등을 기술하고, 실험동물의 폐기방법을 기술합니다.

1. 형광/발광표지 야토균 아종 제작 및 배양
 - 1.1. 스웨덴의 Umea university (*tularensis* 아종, Schu S4) 및 국립보건연구원 인수공통감염과(*holarctica* 아종, 포항 분리주)로부터 균주 제작에 사용될 각 야토균의 아종을 분양받아 확보함.
 - 1.2. 선행연구를 통해 제작된 *F. tularensis* LVS-GFP-Lux 균주를 액체배양(회당 5mL)한 후, 플라스미드 DNA purification kit을 이용하여 pKK214-GFP-Lux DNA를 추출함(BL2 연구시설).
 - 1.3. 확보된 각 *tularensis* 아종에 형광인자 및 발광인자의 동시발현을 유도하는 pKK214-Lux-GFP 플라스미드를 도입하여 각 아종별 형광/발광인자 야토균주를 제작함(BL3 연구시설).
 - 1.4. 형질전환된 각 야토균 아종을 액체배양(5ml)하고, 해당 균체의 희석액을 각각 100 ul 씩 multi-plate에 분주하고 밀봉한 후(BL3 연구시설), fluorescence/luminescence reader 기기로 배양체에서 발현되는 형광 및 인광신호를 측정함으로써, 형질전환균주의 형광/발광표지 여부를 확인함 (BL2 연구시설).
 - 1.5. 형광 및 발광신호가 확인된 각 야토균 아종은 LB배지를 이용하여 72~96 hr동안 액체배양(회당 25m)한 후, 이후 mouse 감염실험에 이용함.
2. 야토균 아종별 감염기작 및 면역반응 분석
 - 2.1. 제작된 각 아종별 형광/발광표지 야토균주를 마우스(N=10)에 감염시킨 후 (BL3 연구시설), 생체분자영상기기(IVIS, PerkinElmer)를 이용하여 24 hr 간격으로 각 개체를 촬영함으로써, 시간에 따른 각 아종별 병원체 전파양상을 영상화함(ABL3 연구시설).
 - 2.2. 각 균주에 감염된 마우스에서 24 hr 간격으로 eye bleeding을 통해 혈액을 채취하고 serum을 분리한 후, ELISA 분석을 통해 INF-r, TNF-a, IL-2,

IL-4, IL-6, IL-12 등의 사이토카인 level을 측정함으로써 면역반응을 분석함 (ABL3, BL3 연구시설).

2.3. 각각의 야토균 아종 감염 96hr 이후 각 실험 set당 1마리씩의 마우스에서 간, 폐, 비장 등의 장기를 적출하여(ABSL3 실험실) 유세포분석(FACS)을 수행함으로써, 세포군별 야토균 감염양상을 분석함.

2.4. 감염 96 hr 이후 적출한 장기들의 일부분은 면역조직화학염색(IHC)용 조직절편슬라이드를 제작함. 제작된 조직절편슬라이드를 Alexa-568이 표시된 면역세포 특이적 marker(NK 1.1, B220, CD11b, CD3 등)로 염색한 후, 형광현미경을 통해 녹색형광(야토균)과 붉은색형광(면역세포)의 상호연관성을 분석함 (BL2 연구시설).

3. 감염루트별 야토균 감염기작 및 면역반응 분석

3.1. 형광/발광표지 야토 균주를 intranasal, intradermal, intraperitoneal injection을 통해 마우스에 감염(N=10)시킨 후, 생체분자영상기기를 이용하여 24 hr 간격으로 각 개체를 촬영함으로써, 시간에 따른 감염루트별 병원체 전파양상을 영상화함(ABL3 연구시설).

3.2. 위항의 2.2.~2.4.항에 기재된 방법과 동일한 과정을 통해 각 감염루트별 사이토카인 level, 감염세포분석 및 조직절편분석을 수행함.

4. 폐기방법

실험이 끝난 동물은 기관 ABL-3 연구시설 안전관리지침에 의거하여, 동물을 안락사 시키고 멸균용 비닐백에 담아, 121℃, 30분 이상 멸균한 후 배출하여 감염병폐기물 처리규정에 의거하여 처리함.

3) 관련 연구시설 안전관리등급 및 시설 안전관리사항



▶ 유전자변형미생물을 동·식물에 접종하는 실험의 생물안전을 위하여 결정한 연구시설 안전관리등급을 제시하고, 결정에 대한 근거 및 자료, 기관내 관련 지침 등을 기술합니다.

1. *Francisella tularensis* Schu S4-GFP-Lux 및 *Francisella tularensis* Pohang-GFP-Lux의 mouse 감염실험은 본 기관에 구축되어 있는 ABL-3 연구시설을 이용하며, 해당 시설의 '실험실 안전관리 지침'을 준수하여 수행할 예정입니다.

2. 실험시설 및 장비자원

- 2.1. 실험시 착용보호장구 : 방진복, 방진화, 방진마스크, 2중 장갑
- 2.2. 실험수행시 사용 생물안전작업대 : Class II Biological Safety Cabinet
(ABL-3 연구시설 내 위치)
- 2.3. 실험수행장소 : ABC연구원 ABL-3 사육, 실험실

3. 관련 지침

실험실 안전관리 지침, 의료폐기물 처리 매뉴얼, 실험실 안전사고 대응 매뉴얼, 감염성 물질 수송 지침, 생물안전 3등급 연구시설 안전관리 지침

[별표 9-7] 개발실험의 위해성 평가자료의 제출범위

1. 유전자변형생물체의 용도에 관한 자료

- 가. 개발실험의 배경 및 목적
- 나. 주요 용도
- 다. 사용이 승인된 국가 및 승인 용도

2. 유전자변형생물체에 관한 자료

- 가. 명칭
- 나. 도입유전자에 의하여 부여된 특성
- 다. 숙주 또는 근연종과의 생물학적 특성의 차이점
- 라. 병원성, 독소 생산성, 알레르기 유발성 및 기타 유해 생리활성물질 생산가능성
- 마. 유전자변형생물체 내 도입유전자의 위치 및 복제 수
- 바. 유전자변형에 사용된 벡터의 특성 및 존재여부
- 사. 유전자변형생물체 및 도입유전자의 검출 및 확인방법

3. 숙주에 관한 자료

- 가. 명칭, 유래 및 분류학적 특성
- 나. 개발실험하고자 하는 유전자변형생물체와 유사한 용도의 유전자변형생물체의 숙주로 이용된 사례
- 다. 숙주 및 근연종에서의 독소 생산성, 알레르기 유발성 및 기타 유해 생리활성물질 생산성 여부
- 라. 미생물인 경우, 병원성 존재 여부 및 알려진 병원체와의 관련성

4. 공여체에 관한 자료

- 가. 명칭, 유래 및 분류학적 특성
- 나. 개발실험하고자 하는 유전자변형생물체와 유사한 용도의 유전자변형생물체의 공여체로 이용된 사례

다. 공여체 및 근연종에서의 독소생산성, 알레르기 유발성 및 기타 유해 생리활성물질 생산성 여부

라. 미생물인 경우, 병원성 존재 여부 및 알려진 병원체와의 관련성

5. 유전자재조합 특성에 관한 자료

가. 유전자변형에 사용된 현대생명공학기술 상세 실험방법

나. 벡터에 관한 자료

- (1) 명칭, 기능 및 유래된 생물체
- (2) 구성요소 및 도입유전자를 포함한 지도
- (3) 병원성, 독소 등 위해염기서열의 존재여부
- (4) 다른 생물체로의 전달 가능성 및 숙주 범위
- (5) 선발표지유전자

다. 도입유전자에 관한 자료

- (1) 도입유전자의 기능 및 특성
 - (가) 병원성, 독성 등 위해 발현 가능성
 - (나) 독소 생산성 및 독력, 생산 독소의 생물학적 및 생화학적 특성
 - (다) 약제 내성 발현성 및 교차 내성 등 특성
 - (라) 병원성 및 병독성, 감염대상 범위의 변이성 등 생물학적 특성
- (2) 도입유전자의 크기, 명칭 및 염기서열(위해염기서열의 존재여부 포함)
- (3) 조절인자 및 유전자 기능에 영향을 주는 기타 인자

6. 안전관리에 관한 자료

가. 신청과제에 대한 기관 생물안전위원회의 생물안전심사 결과자료

나. 유전자변형생물체 취급·보관 안전관리에 관한 자료

- (1) 개발 및 실험에 대한 위해성평가 자료
- (2) 연구시설 설치·운영 현황 (연구시설 신고 및 허가 자료 포함)
- (3) 개발 및 실험의 안전관리수칙 및 응급조치사항 포함

(4) 유전자변형생물체 보관·표시 및 폐기 방법

(5) 개발 및 실험 관여 전문인력 현황

다. 유전자변형미생물의 동·식물 접종에 관한 자료(해당되는 경우)

(1) 접종 대상 동·식물의 명칭 및 생물학적 특성

(2) 실험내용 및 폐기 방법

(3) 관련 연구시설 안전관리등급 및 시설 안전관리사항

[참고 2] 보건의료용 LMO 위해성심사 신청을 위한 평가자료(작성예시)²⁾

1. 개발의 목적 및 용도에 관한 자료

가. 개발의 목적



- ▶ 인간 보건 및 삶의 질 향상을 위한 산물인지 또는 인간의 보편적 윤리와 건전성에 부합되는지에 대하여 기술합니다.

유전자변형모기 AAA(학명 : *Aedes aegypti*)는 Actin4 및 DsRed2 단백질 발현유전자를 유전체에 삽입함으로써, 유충(장구벌레)이 항생제인 테트라사이클린(Tetracycline)이 존재하는 환경에서만 생존할수 있도록 유전자변형된 Sterile Insect Technique (SIT) 기술을 이용한 개발품이다. 유전자변형모기 AAA는 자연상태에서 땡기열과 말라리아를 매개하는 모기인 *Aedes aegypti*와 교잡 후 유충이 사멸됨으로서, 모기의 군집수를 줄이려는 목적으로 개발되었다.

나. 개발의 유용성 및 용도



- ▶ 새롭게 부여된 유전자 발현산물의 특성 및 그 역할에 따른 유전자변형생물체의 용도를 명확히 기술합니다.

*Aedes aegypti*는 땡기열병 및 말라리아병을 매개하는 매개체로, 유전자변형모기 AAA는 목표환경에서 wild type *Aedes aegypti*와 교잡한 후 사멸함으로써 전체 모기의 군집수를 줄여 질병의 확산을 효과적으로 예방한다. 유전자변형모기 AAA는 모기를 방제하기 위해 사용되는 화학적 살충제의 사용량을 줄임으로서 경제적 효과를 높이고 화학물질로 인한 인체위해성을 사전예방한다.

2) 본 작성 예시는 일반에 공개된 Journal 등에서 제시된 유전자변형모기 개발내용 중 해당 항목에 적절한 자료만 발췌하여 신청서식(LMO 법률 통합고시 [별표 10-1]의 위해성 평가자료)에 맞추어 가상의 사례로 가공되었으므로 과학적 사실과 상이할 수 있습니다.

Dengue fever

A potentially lethal disease that affects 50 million people a year



Transmitted to humans through bites of female ***Aedes aegypti*** mosquitoes, which in turn acquires virus from feeding on infected person's blood

The virus

- Four distinct but related viruses cause dengue
- Recovery from one gives lifelong immunity to that strain but not to the other three

The infection

Further infection by different virus strains can lead to **dengue haemorrhagic fever (DHF)**, a potentially lethal complication of dengue



[그림 1] *Aedes aegypti*와 뎅기열병과의 관계

2. 숙주생물체 및 3. 공여생물체에 관한 자료

가. 분류학상 위치(학명, 일반명, 품종·계통명 등을 포함)



- ▶ 명칭, 유래 및 분류학적 특성은 종, 속, 과, 아종 및 계통번호를 포함한 최근의 분류법에 따라 기술합니다.
- ▶ 숙주 및 공여생물체의 생물학적 특성이 잘 알려져있으며, 유전자변형생물체의 생물학적 특성 또한 잘 알려져 있음을 기술합니다.

숙주 및 공여체로 사용된 모기는 *Aedes aegypti* 종이며 생물학적 분류체계는 다음과 같다.

Family	<i>Culicidae</i>	Genus	<i>Aedes</i> (Meigen, 1818)
Subfamily	<i>Culicinae</i>	Species	<i>Aedes aegypti</i> (Linnaeus, 1762)
Tribe	<i>Culicini</i>		

나. 자연생태계 또는 해양생태계에 있어서 분포 상황



- ▶ 숙주 및 공여생물체가 생태계에서 서식 및 분포하는 일반적인 상황에 대하여 기술합니다.

*Aedes aegypti*는 일반적으로 아에데스(*Aedes*) 모기, 황열모기, 이집트숲모기로 불린다. 아시아호랑이 모기 혹은 아디다스 모기로 알려진 흰줄숲모기(*Aedes albopictus*)와 함께 뎅기바이러스를 전파하는 매개체이다. *Aedes aegypti*는 황열병, 말라리아, 뎅기열을 전파하는 매개체로 해외에서 유입되어 2008년 제주도를 시작으로 국내에 토착화된 외래종이다.

■ Countries with established tiger mosquito populations (Asian tiger mosquito or Yellow fever mosquito or both)



[그림 2] *Aedes aegypti* 및 *Aedes albopictus* 분포상황

기록에 의하면 *Aedes aegypti*가 매개하는 질병인 말라리아는 고대 로마를 비롯해, 인도와 메소포타미아, 중국에 이르기까지 이미 5, 6세기부터 지구적인 풍토병으로 자리잡았다. 이집트의 많은 미라들은 말라리아 때문에 비장이 부풀어 있으며 이 질병을 *Aedes aegypti*가 전파한 것으로 추정된다. 이후 대륙 간 교류가 증가하면서 17세기 중반 노예선을 통해 아프리카에서 미국으로 *Aedes aegypti*가 전파되었다. 배 안에 저장된 식수통에 알을 낳아 증식한 노예선의 *Aedes aegypti*는 많은 선원들을 말라리아에 감염시켰고, *Aedes aegypti*가 미국에 정착한 이후 3년 동안 6천명이 말라리아에 의해 사망하였다.

다. 인류에 의한 이용 내력



- ▶ 숙주와 공여생물체 자체가 국내외에서 이용된 상황, 재배(배양) 또는 양식 및 품종 개량의 역사, 원산지 및 유전적 다양성의 중심지 등을 기술합니다.
- ▶ 숙주와 공여생물체 자체가 인류에게 안전하게 사용된 역사를 갖고 있었는지, 또는 일반적 환경에서 안전성에 이상이 없는지에 대하여 과학적 근거자료를 바탕으로 기술합니다.

역사적으로 질병을 매개하는 모기인 *Aedes aegypti*는 전세계적인 서식종으로 원산지는 이집트로 알려져 있다. 모기는 질병을 매개하는 매개체로서 인류에 의해 이용된 이력이 없는 생물체로, 인류를 위해 이용되기 위해 양식되거나 품종 개량이 성공한 것은 2003년 영국의 Oxitec에 의하여 살아있는 살충제로서 개발된 것이 시초다.

라. 생물학적 특성(자연환경 또는 해양수산환경과 이를 반영하는 시험 조건하의 생존 및 생식·번식 능력)

1) 자연생태계 또는 해양생태계에서 다른 생물과의 상호작용(천적, 병원성생물, 경쟁자, 포식자 등)

모기(Mosquito)는 파리목 모깃과에 속하는 벌레를 이르는 말이다. 몸은 두 쌍의 날개와 더듬이, 몸통, 긴 다리로 구성되어 있다. 크기는 다양하지만 보통 15mm 미만이고, 무게는 2~2.5 mg 가량으로 1.5~2.5km/h의 속력으로 비행한다. 낮에는 풀숲에서 잠을 자고 밤에 활동하는 야행성 동물로, 주로 하수구나 연못 같은 고인 물에 알을 낳으며, 유충인 장구벌레는 물 속에서 성장하여 번데기 과정을 거쳐 성충이 된다. 모기가 매개하는 질병은 뇌염·말라리아(학질)·필라리아(상피병)·일본뇌염·황열병 등이며 전 세계에 약 3,000종 가량이 알려져 있다.

*Aedes aegypti*는 60mm 크기로 흑백줄이 있으며 텅기열의 전파와 관련하여, 아시아호랑이 모기 혹은 아디다스 모기로 알려진 흰줄숲모기(*Aedes albopictus*)와 동일한 질병매개체로 취급되나, 생태적으로 경쟁관계에 있지 않다.

유충 시기에 물고기, 자라, 물방개, 가물치, 송사리, 미꾸라지에 의해 수가 조절되지만, 경제발전 시기에 무분별한 공업화로 생태계가 파괴되면서 상대적으로 천적이 사라져 모기가 크게 늘어났고, 매년 그 수가 급증하고 있다.

2) 생식양식 및 다른 품종 또는 근연종과의 생식 호환성



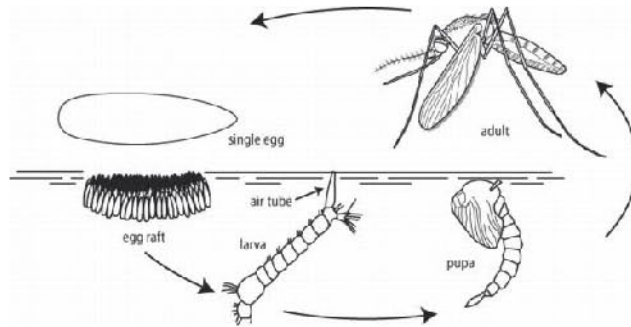
▶ 숙주 및 공여생물체의 생활사를 제시하고, 다른 종과 생식을 하거나 유전자를 교환할 가능성이 있는지에 대하여 기술합니다.

모기는 알·유충·번데기·성충의 순으로 일생을 보내는 완전변태성 곤충이다. 알의 대부분은 긴 타원형 또는 바나나형이지만, 학질모기류는 양쪽에 부낭을 갖고 있다. 유충인 장구벌레는 물 속에서 성장하여 번데기 과정을 거쳐 성충이 된다.

모기의 성충은 일반적으로 과즙이나 꽃의 꿀 같은 당분을 주된 칼로리원으로 하며, 흡혈은 암컷의 난소 발육을 위해서만 필요하고 수컷은 흡혈하지 않는다. 암컷 모기 또한 산란기가 아닌 평상시에는 꽃의 꿀을 빨아먹는다.

흡혈 대상이 되는 동물은 포유류 외에도 새·양서류·파충류 등이다. 흡혈량은 빈속일 때의 체중(5mg 정도)과 같거나 또는 그 이상의 피를 한꺼번에 빨아들이는데 보통 여름철 기온에서는 3~4일 간에 전부 소화하고, 그 사이에 난소를 발달시켜 300여 개의 알을

낳는다. 암컷은 성충이 된 후, 수차례에 걸쳐 흡혈과 산란을 되풀이한다. 채혈과정에서 말라리아, 뇌염 등의 전염병을 인간을 아울러 동물들에게 전파시키기도 한다.



[그림 3] 모기의 생활사

성충은 우화(羽化) 후 곧 교미한다. 암컷에는 교미 후 수컷의 정자를 일시적으로 저장하는 저장낭(貯精囊)이 있어서 정자를 보존하고 있다가 산란할 때 알을 한 개씩 수정한다. 집모기나 늪모기는 텅어리로 수면 위에 알을 낳아 수백 개의 알이 배 모양으로 떠 있는데, 이것을 난주(卵舟)라고 한다. 산란 장소는 논이나 넓은 늪, 길가의 물웅덩이, 대나무의 그루터기 등 다양하며 물 흐름의 유무·수질, 특히 유기물의 많고 적음 등의 조건이 종에 따라서 조금씩 다르다. 습지에 산란하는 것도 있고, 큰 비로 높은 수위가 높아졌을 때에 부화하는 종도 있다.

알은 낳은 지 3일 정도 되면 부화하여 유충이 된다. 피어 있는 개천, 하안이나 해안의 움푹 팬 바위에 끈 물, 무논·빈 깡통·세숫대야 등의 물을 국자로 건져 올리면 유충인 장구벌레를 채집할 수 있다. 장구벌레는 대개 잡식성으로 수면에서 먹이를 잡아 먹는 종, 물 속에 잠기어 들어가 잡아먹는 종이 있다. 1주일 정도 이내에 4회째의 탈피를 하면 번데기가 되어 먹이를 먹지 않아도 된다.

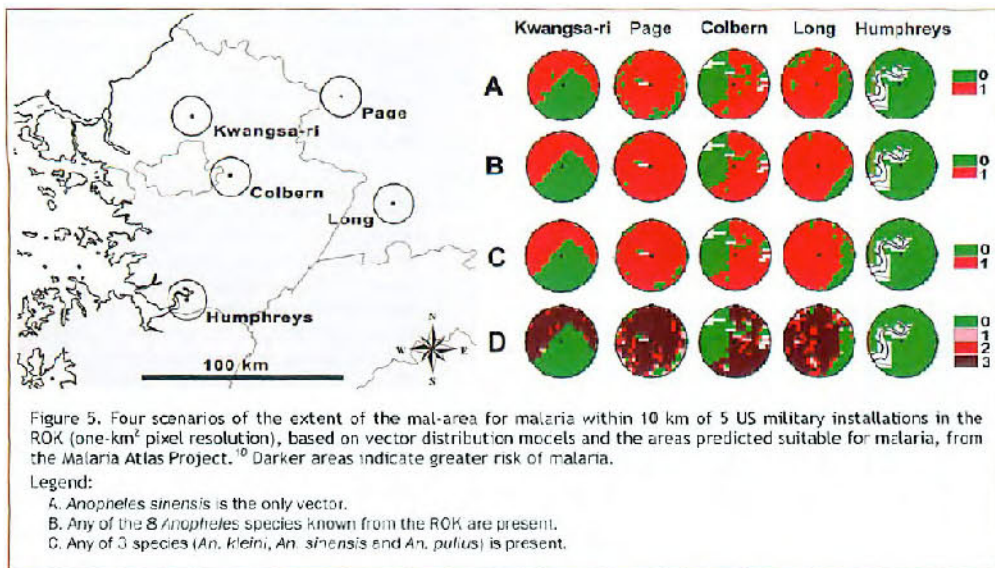
번데기는 머리·가슴부가 분리되지 않고 정수리에 한 쌍의 호흡관이 있으며, 그 끝부분을 수면 위에 내밀어서 호흡한다. 1~2일에 등이 갈라지고 성충이 우화해 나온다.

3) 확산가능성



▶ 숙주 및 공여생물체의 생식양식에 근거하여, 유전자변형생물체가 자연상태에서 확산되거나 변형될 가능성에 대하여 과학적 근거자료를 바탕으로 기술합니다.

열대지방의 모기는 일 년 내내 서식하고 산악지방과 온대·한대의 모기는 겨울을 알로 지내며, 눈이 녹은 물에서 유충기를 보내고 연 1회만 한여름에 성충으로 나타난다. 모기는 14℃에서 41℃ 사이에서만 활동이 활발한 것으로 알려져 있다.



[그림 4] 국내환경에서 모기의 확산가능성 시뮬레이션 결과

최근 도시화의 전국적인 확대와 환경파괴 등으로 인하여, 모기가 일 년 내내 서식하고 있다. 특히 아파트나 가옥 등 항상적인 온도를 유지하는 거주구가 다양해지면서, 최근 알의 형태가 아닌 성충으로 한겨울에 나타나는 형태가 지속적으로 보고되고 있다.

*Aedes aegypti*는 2008년 제주도에서 처음 발견된 이후, 지구온난화의 영향으로 국내 전체에 걸쳐 확산되고 있어 질병관리본부 등 관계기관에서는 예의 주시하고 있다.

Ref) Desmond H. Foley et al. (2008) Malaria risk assessment for the republic of korea based on models of mosquito distribution, *The army medical department journal*, April-june, 46-53.

마. 유해 물질의 생산 가능성(근연종의 유해물질 생산가능성 포함)



- ▶ 숙주, 공여체에서의 독소 생산성 및 알레르기 유발 가능성을 과학적 근거자료를 바탕으로 기술합니다.

유전자변형모기 AAA는 수컷의 경우 자체적으로 유해물질을 생산하지 않는다. 암컷모기의 경우, 흡혈시 혈액의 응고를 방지하기 위하여 히루딘이라는 타액을 주입하는데, 이 타액 주입이 사람들에게 가려움을 느끼게 하는 알레르기 유발 물질로 기능하며, 또한 이 때 바이러스나 말라리아원충 등이 함께 주입되어 질병을 전파한다.

바. 숙주 및 근연종에서의 독소 생산성 및 알레르기 유발성 보고 자료



- ▶ 숙주, 공여체와 관련된 근연종에서의 독소 생산성 및 알레르기 유발 가능성에 대해 과학적 근거자료를 바탕으로 기술합니다.

*Aedes aegypti*는 뎅기열, 황열병, 치쿤쿠니야를 매개하는 국제적인 매개체로, 암컷모기가 흡혈시 주입하는 히루딘이 알레르기 유발물질이다. 암컷 *Aedes aegypti*가 흡혈시 바이러스나 말라리아원충 등이 함께 주입되어, 해당 바이러스 및 원충이 병원성 독소를 생산하나, 이는 *Aedes aegypti*가 독소를 생산한다고 볼 수 없다.

사. 병원성 및 외래인자(바이러스 등)의 오염여부



- ▶ 숙주 및 공여체의 병원성 존재 여부 또는 알려진 병원체와의 관련성에 대한 과학적 근거자료를 바탕으로 기술합니다.
- ▶ 개발에 이용된 숙주 및 공여체가 병원체에 노출될 관련성에 대하여 과학적 근거자료를 바탕으로 기술합니다.

모기가 매개하는 질병은 뇌염·말라리아(학질)·필라리아(상피병)·일본뇌염·황열병 등으로, *Aedes aegypti*는 땡기열, 황열병, 치쿤구니야를 매개하는 매개체로 널리 알려져 있다.

*Aedes aegypti*가 매개하는 대표적인 질환인 땡기열의 경우, 인간에서 발생하는 가장 흔한 모기매개 전파 질환으로 *Flaviviridae*과 *Flavivirus* 속의 땡기바이러스를 가진 모기가 사람을 무는 과정에서 전파된다. 땡기열은 국내에서는 2000년 이후 법정전염병 4군으로 지정되어, 2001년 6예, 2004년 16예, 2007년 97예, 2009년 59예가 질병관리본부에 보고되었다.

유전자변형모기 AAA의 개발을 위해 사용된 *Aedes aegypti*는 메쉬(Mesh) 소재의 구획된 3중 차단된 생물안전 2등급 시설 내에서 순수분리되어 사육되었으므로 땡기열 바이러스에 의한 오염은 이루어지지 않는다.

아. 기생성 등 기타 주요한 생리학적 성질



- ▶ 숙주 및 공여생물체가 다른 종과 기생이나 공생할 가능성에 대하여 보고된 바가 있는지를 기술합니다.

모기의 성충은 일반적으로 과즙이나 꽃의 꿀 같은 당분을 주된 칼로리원으로 하며, 흡혈은 암컷의 난소 발육을 위해서만 필요하고 수컷은 흡혈하지 않는다는 점에서 기생체로 보기는 어렵다.

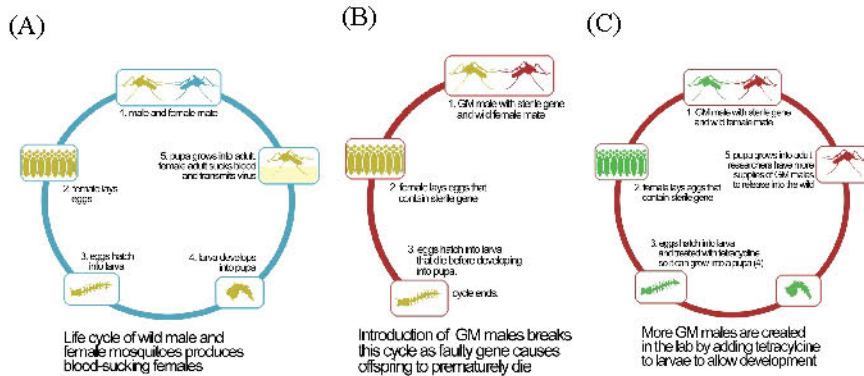
모기 자체의 기생성에 대해서 현재까지 보고된 바 없다. 그러나 말라리아원충 등 모기 체내에 세포간 기생하는 기생충으로 인하여 질병이 전파되며, 세균 및 바이러스 등 체내에 세포내 기생 병원성 미생물로 인하여 질병이 전파된다.

자. 야생형화 가능성



- ▶ 숙주 및 공여생물체로 이용된 기존 종이 자연생태계에서 서식하거나 번식할 가능성이 있는지를 기술합니다.
- ▶ 숙주 및 공여체의 야생형화 가능성 여부를 조사한 평가자료를 바탕으로 유전자변형 생물체의 야생형화 가능성을 기술합니다.

유전자변형모기 AAA는 자연생태계에서 야생종과 교잡함으로써, 모기의 군집수를 줄이기 위해 개발되었다. 자연환경에 방출되는 유전자변형모기 AAA는 수컷으로, 암컷은 방출되지 않아 야생화는 이루어지지 않는다.



[그림 5] *Aedes aegypti*의 생활사와 GM모기의 생식호환 (A) 일반 모기의 생활사 (B) GM모기의 방제기능 (C) GM모기 생산체계

비록 성별분리 및 이용절차 상의 오류로 인하여 암컷 유전자변형모기 AAA가 자연환경에 방출된다 하더라도, 항생제 테트라사이클린이 자연환경 중에 일반적으로 존재하지 않는 한, 암컷 유전자변형모기 AAA가 야생종과 비교하여 생존 및 서식에 있어 우위를 점할 가능성이 있다고 보기 어렵다. 따라서 유전자변형모기 AAA는 기존 종과 비교하여 야생형화 능력이 동일하다.

4. 유전자변형특성에 관한 자료(운반체(vector)에 관한 자료)

가. 명칭 및 유래



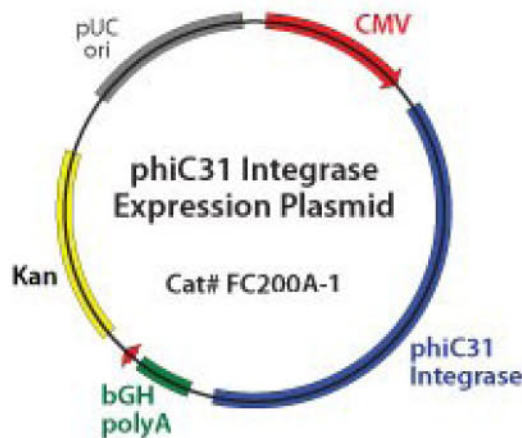
- ▶ 운반체의 명칭 및 유래와 골격을 이루는 각 유전요소 및 유전요소의 기원(source)에 대해 명확히 기술합니다.

나. DNA 분자량 및 운반체 구성요소 정보, 제한효소에 의한 절단지도



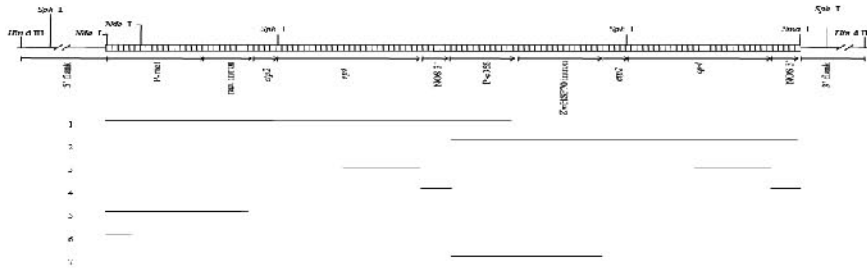
- ▶ 운반체의 유전지도 및 제한효소 절단위치를 기술합니다. 벡터의 염기서열을 분석하기 위하여 사용된 프라이머의 위치 및 서열과 벡터의 염기서열(또는 삽입유전자가 포함된 벡터 염기서열)을 기술합니다.
- ▶ 기업비밀 여부와 관계없이, 유전자변형생물체의 개발에 사용된 운반체를 명확히 기술하고 유전자지도 및 유전요소에 대하여 상세히 기술한 자료를 제출하여야 합니다.

유전자변형모기 AAA의 개발을 위해 사용된 운반체는 두 종류로, 도입유전자가 삽입된 pBac[3xP3-ECFPaf]-attP plasmid와 모기유전체로 유전자를 삽입하기 위한 Helper인 PhiC31 plasmid가 있다. 이러한 plasmid의 구조는…….



[그림 6] PhiC31 plasmid 지도

운반체에 삽입된 도입유전자 및 기타 유전요소에 대한 지도는…….



[그림 기] 도입유전자 지도 및 유전체 삽입위치

다. 유해 염기서열 등의 유무

- ▶ 운반체의 유전요소(삽입유전자가 포함)에 대하여, 모든 유전자의 구성 요소별 염기서열을 확인하고, 삽입유전자 이외의 외래전사해독프레임의 존재여부 및 안전성에 대하여 기술합니다.
- ▶ 염기서열로부터 코딩되는 발현산물과 알려진 독소 및 알레르겐과의 아미노산 상동성 분석 자료를 검토하여 발현 가능한 산물이 잠재적 독소 및 알레르겐과 어떠한 관계에 있는지를 기술합니다.
- ▶ 생물정보학적 검색결과에 의한 염기서열 및 구조적 상동성 비율에 따라, 추가적인 세부요구자료가 요청될수 있습니다.

유전자변형모기 AAA의 개발에 이용된 pTAR-ParA 및 pMC101-ParA plasmid 벡터의 염기서열 분석결과 유해 염기배열이 관련되어 있지 않으며(첨부# 염기서열 분석), 삽입유전자 외의 외래전사해독프레임의 존재는 없다. 삽입유전자의 발현산물에 대한 아미노산 서열은…….

A			
pNG101-ParA	+++ ++		
pTAR-ParA			
pNG101-ParA			
pTAR-ParA			
pNG101-ParA			
pTAR-ParA			
pNG101-ParA			
pTAR-ParA			

바. 필요 시, 중간숙주의 독소생산성, 알레르기성, 병원성 보고자료



- ▶ 유전자변형생물체의 개발을 위해 벡터를 대량 발현하는 중간숙주를 이용할 경우, 해당 중간숙주 자체의 인체 및 환경위해성과 세부적인 유전정보를 상세히 기술하여야 합니다.

E. coli K12는 일반적으로 이용되는 *Enterobacteria*로서, 병원성이 효과적으로 제거되어 상업화된 일반균주로 모든 열기서열이 알려져 있다. *E. coli* K12의 열기서열에는 알려진 병원성 및 알레르기성 요소가 보고된바 없다.

5. 유전자변형특성에 관한 자료(도입유전자에 관한 자료)

가. 도입된 유전자의 분자량, 기능 및 특성



- ▶ 도입유전자의 분자량, 기능 및 특성에 대하여 자세히 기술합니다.
- ▶ 다른 위해성평가항목에 이미 기술되어 있다 하더라도, 자세히 기술하는 것을 원칙으로 합니다.

나. 도입 유전자의 구성요소에 관한 정보(유래, 기능, 크기, 염기서열 등)



- ▶ 기업비밀 여부에 상관없이, 도입유전자, 조절인자, 선발표지유전자 등이 포함된 염기서열정보를 구체적으로 기술합니다.
- ▶ 운반체에 대한 평가자료에서 모든 삽입유전자가 포함되어 함께 제시되었다면, 벡터의 염기서열 확인으로 대신할 수 있습니다
- ▶ 염기서열 분석방법과 분석 시 사용된 프라이머에 대한 상세한 설명도 함께 제시합니다.

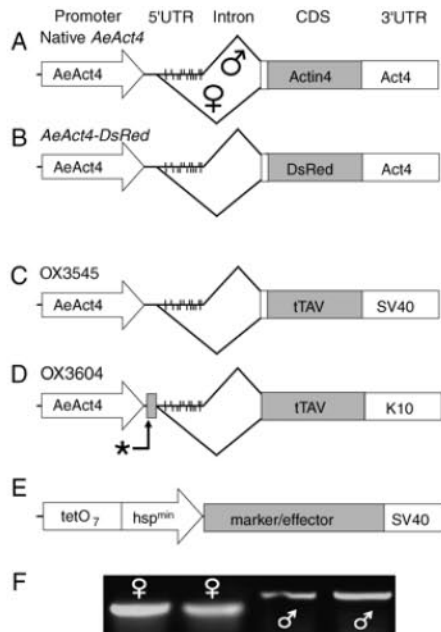
1) 도입유전자

2) 조절인자(전사개시인자 및 종결인자 등)

3) 선발표지유전자

4) 그 밖의 조절인자 및 DNA 기능에 영향을 주는 기타 인자이용을 위하여 유전자를 변형한 내용

유전체에 삽입된 유전자변형모기 AAA의 도입유전자는 [그림 9]와 같이 성별에 따라 다르게 설계되었다.



[그림 9] 유전자변형모기 AAA 도입유전자 종류

모든 도입유전자 염기서열은 Unique하며 TTAA site를 나타내고 있다.

유전자변형모기 AAA의 개발을 위한 유전자 발현 카세트는 Actin4 유전자 발현카세트, DsRed 유전자 발현카세트로서 세부적인 유전자 변형내용은 아래와 같다.

(1) Actin4 유전자 발현카세트

- *Agrobacterium* sp.에서 분리
- Actin4 단백질의 아미노산 서열은 단백질의 position 2에서 한개 아미노산이 치환된 것을 제외하고는 원종 서열과 동일

(2) DsRed2 유전자발현 카세트

- *Diabrotica virgifera virgifera* 유래 DsRed2 유전자의 부분적인 코딩서열이며, 변형되지 않았음

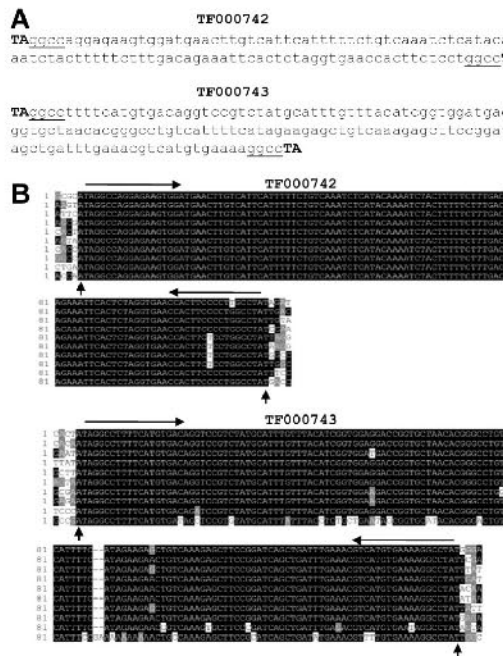
Ref Nimmo, D. D. et al. (2006) High efficiency site-specific genetic engineering of the mosquito genome, *Insect molecular biology*, 15(2), 129-136.

다. 위해염기서열의 존재 유무



- ▶ 도입유전자 유전요소 및 도입기원 생물체에 대한 독성 또는 알레르기성 유발 가능성을 과학적으로 기술합니다.
- ▶ 염기서열로부터 코딩되는 발현산물과 알려진 독소 및 알레르겐과의 아미노산 상동성 분석 자료를 검토하여 발현 가능한 산물이 잠재적 독소 및 알레르겐과 어떠한 관계에 있는지를 기술합니다.

유전자변형모기 AAA에 삽입된 Actin4 유전자 및 DsRed2 유전자는 염기서열 분석결과 유해 염기배열이 관련되어져 있지 않으며(첨부# 염기서열 분석, 그림 10), 삽입유전자 외의 외래전사해독프레임의 존재는 없다. 삽입유전자의 발현산물에 대한 아미노산 서열은…….



[그림 10] 유전자변형 모기의 삽입유전체에 대한 Bioinformatics 결과

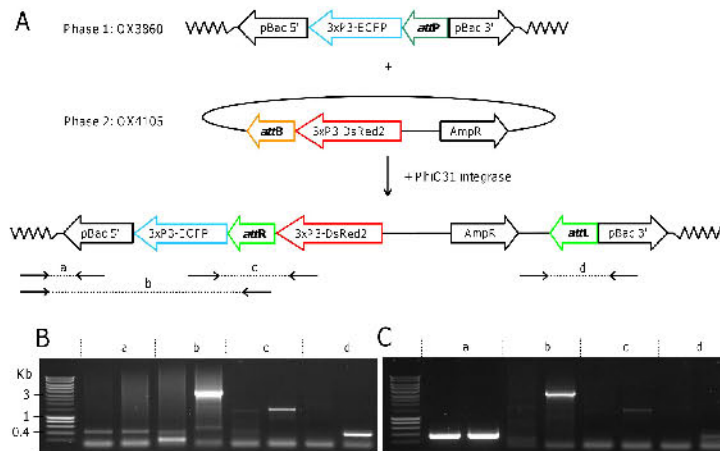
Ref) Guojun Yang et al. (2012) ATon, abundant novel nonautonomous mobile genetic elements in yellow fever mosquito (*Aedes aegypti*), *BMC Genomics*, 13(1), 283

라. 완성된 벡터 내에서의 도입유전자 염기서열 위치 및 방향성



- ▶ 개발이 완료된 운반체 내에서 도입유전자의 위치와 운반체 끝격 등에 대한 염기서열 위치 및 방향성을 자세히 기술합니다.
- ▶ 선발표지유전자의 크기, 명칭을 확인하고 선발표지유전자의 확인을 위해 사용된 실험방법에 대하여 자세히 기술합니다.
- ▶ 운반체에 대한 평가자료에서 모든 삽입유전자가 포함되어 함께 제시되었다면, 모든 삽입유전자가 포함된 벡터의 염기서열 확인으로 대신할 수 있습니다.

유전자변형모기 AAA는 pBac[3xP3-ECFPaf]-attP plasmid를 기반으로 attB site and a 3xP3-DsRed2 marker를 포함하도록 제작되었다(Nimmo et al.).(그림 11).



[그림 11] 유전자변형모기 AAA 제작을 위한 Plasmid 제작체계

유전자변형모기 AAA는 attB 염기서열에 기원하는 DsRed2 단백질의 핵산위치 시그널을 제거하는 pBattB[3xP3-DsRed2nls-SV40]lox66을 제거하여 구축되었는데…….

Ref) Genevieve M. C. Labbe et al. (2010) *piggybac*- and *PhiC31*-Mediated Genetic Transformation of the Asian Tiger Mosquito, *Aedes albopictus* (Skuse), *PLoS Neglected tropical disease*, 4(8), 788.

마. 외래전사해독 프레임의 유무와 그 전사 및 발현 가능성



- ▶ 도입유전자를 포함한 운반체 전체의 전사개시인자 및 종결인자 등을 포함한 조절인자의 크기 및 명칭을 확인하고 조절인자의 확인을 위하여 사용된 실험방법을 세부적으로 기술합니다.
- ▶ 기타 조절인자 및 목적하는 삽입유전자의 기능에 영향을 주는 인자가 있는 경우에는 그 명칭 및 구조적 특성을 상세히 기술하여야 합니다.

유전체에 삽입된 유전자변형모기 AAA의 도입유전자 *piggyBac*의 검출을 위한 Flanking sequence 서열은 [표 1]과 같다.

[표 1] 도입유전자 inverse PCR 염기서열

Strain	5' Flanking sequence		3' Flanking sequence
OX3860A	n.d.	TTAA	TCAACTCAACGTACATATGTA
OX3860B	GCGCACAAAGCTTAGAGGTACT	TTAA	TCCAAGCAGACAACCGAAATG
OX3860C	CCTGACGTGACTAGATAACCC	TTAA	GGAATGAGTAACTCTTGGTAG
OX3860D	TTTACTAACACAAAATTAGTA	TTAA	CGTCATTCGTTTTGCAGAAGA
OX3860F	CTCCATGTAGATTGTTTCGT	TTAA	ACGTCCGTGAAATAGTATCGC

Genomic sequences immediately flanking the *piggyBac* insertions of OX3860 lines were obtained by inverse PCR. All the insertion sites were unique and occurred at a TTAA site, the canonical recognition sequence for the *piggyBac* transposable element. n.d.: not determined. The 5' inverse PCR for the OX3860A line was not successful but the 3' flanking sequence is sufficient to prove the independence of the A insertion. Full flanking sequences are provided in Table S2.

doi:10.1371/journal.pntd.0000788.t001

모든 도입유전자 염기서열은 Unique하며 TTAA site를 나타내고 있으며 *piggyBac*의 기본적인 Transposon 염기서열을 포함하고 있다.

분자적 특성에 대한 자세한 실험방법 및 결과는 첨부#을 통하여 제시하였다.

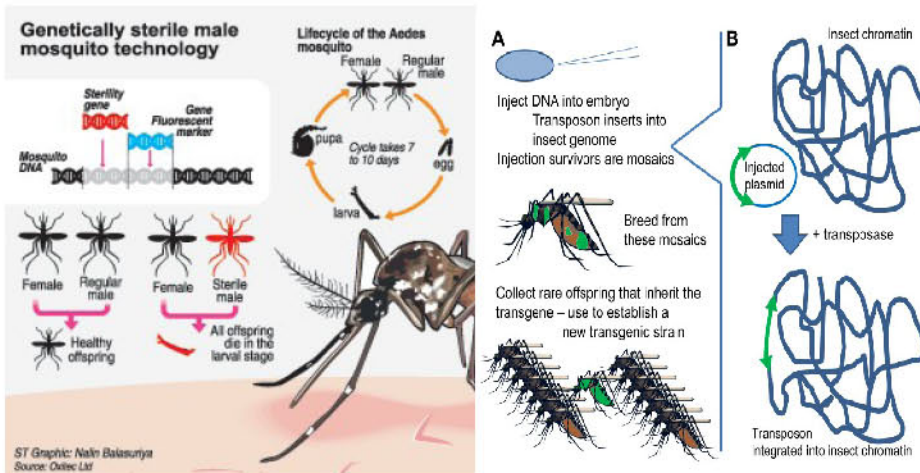
6. 유전자변형생물체의 개발에 관한 자료

가. 유전자변형방법 (배양, 재배, 육종 등 형질전환 방법)



- ▶ 유전자 전달방법에 대한 상세한 형질전환 프로토콜 및 형질전환 과정이 적절하고 안전하게 수행되었는지 여부를 상세히 기술합니다.
- ▶ 시험연구기관의 연구시설 개요, 주요설비, 연구 인력의 구성 및 경력, 연구책임자 정보 등이 포함되어야 합니다.

유전자변형모기 AAA는 Sterile Insect Technique (SIT)기술을 이용하여, 항생제 테트라사이클린이 없는 생존이 불가능하도록 조작한 Sterility gene과 함께 유충(장구벌레) 및 성체 LMO를 구별할수 있는 Marker인 형광유전자(Fluorescent marker) *gfp*가 삽입되었다. 도입유전자는 운반체 Plasmid의 형태로 모기의 알에 주입되며, 유전체 내 유전자(예., piggyBac, Minos, mariner, or Hermes) 삽입을 위하여 Transposase를 포함한 Helper plasmid를 함께 주입하여 형질전환한다(그림 12).



[그림 12] 유전자변형 모기 개발체계. Left : Framework, Right : Development

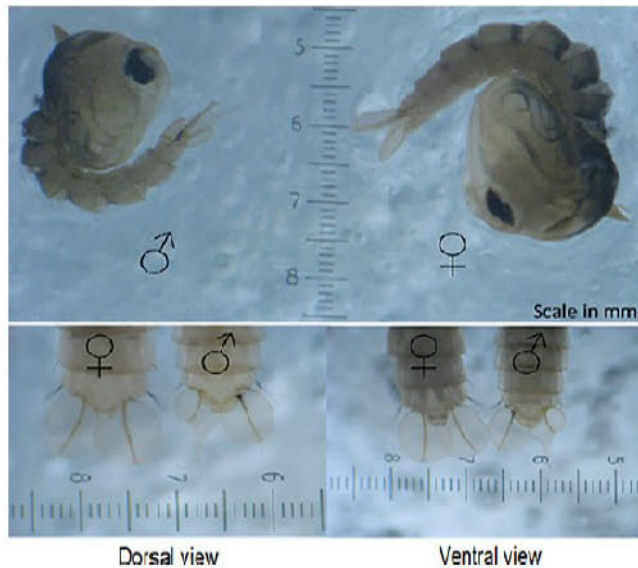
발아하여 유충(장구벌레)이 된 모기는 GFP 형광발현을 통해 형질전환 여부를 확인하고, 이후 테트라사이클린이 포함된 환경 속에서 육종하여 Wild female 모기와 Mating하여 Breeding한다. 최종적인 형질전환 여부는 1차 형광발현을 통해 Screening하고 2차로 유전자를 Sequencing하여 최종 확정한다.

나. 유전자변형생물체의 개발 과정에 대한 설명(번식, 배양, 육종법 등)



- ▶ 유전자변형생물체의 번식, 배양, 육종을 위해 사용된 방법과 육종 세대정보 등을 자세히 기술합니다.
- ▶ 시험·연구기관의 연구시설 개요, 주요설비, 연구 인력의 구성 및 경력, 연구책임자 정보 등이 포함되어야 합니다.

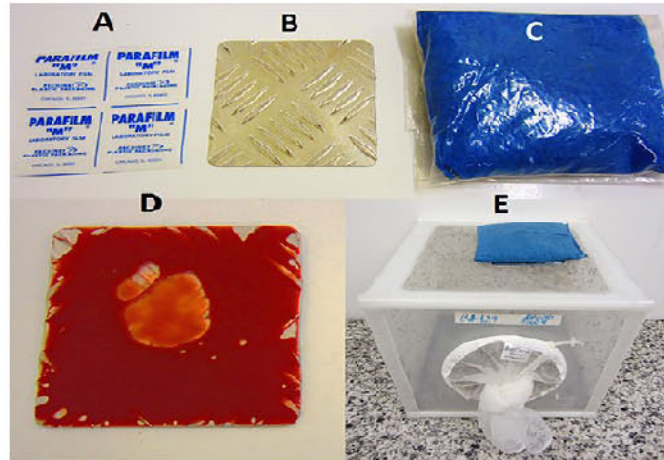
유전자변형모기 AAA는 메쉬(Mesh) 소재의 구획된 3중 차단된 생물안전 2등급 시설(BL2) 내에서 번식, 배양, 육종되었다(첨부# 연구시설 개요 및 설비등 자료 참고). 형질전환 과정을 통해 도입유전자가 주입된 알은 적정 배양시설에서 부화되고, 알에서 부화한 유전자변형모기의 장구벌레는 [그림 13]과 같이 성별을 구분하여 수컷과 암컷을 분리한 후, 수컷은 5L 규모의 정치배양조 내에서 사육하여 위해성평가실험에 사용하였고 암컷은 독립된 BL2 시설의 1L 규모의 정치배양조 내에서 사육하여 Breeding에 이용되었다.



[그림 13] 유전자변형 장구벌레 성별 구별기준

7일간 사육된 유충(장구벌레)는 이후 우화를 통해 성체로 거듭나므로, 이때 5L 규모의 정치배양조의 배양액을 방류하여 번데기(Pupa)를 수집하여 독립적으로 구획된 우화지대에서 사육하였다.

성체가 된 유전자변형모기의 Breeding을 위하여 구분된 암컷 모기를 위한 육종시스템을 [그림 14]와 같이 개발하여 사용하였다. 해당 모기사육장은 성체가 된 모기의 흡혈을 지원하기 위한 도구로서…….



[그림 14] 유전자변형 모기 육종시스템

유전자변형모기 AAA의 유전적 형질이 고정되었는지를 확인하기 위하여 총 10세대에 걸쳐 반복 사육하고, 도입유전자 및 유전형을 Sequencing하여 확인하였다.

7. 유전자변형생물체의 특성에 관한 자료

가. 유전자변형생물체 내 도입유전자에 관한 자료

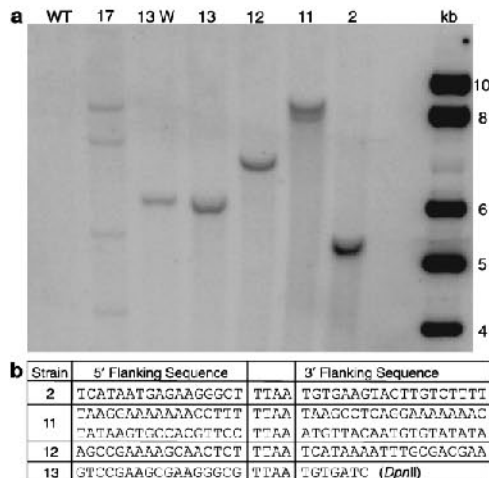
1) 유전자변형생물체 내 도입유전자 구성 요소 확인

2) 유전자의 도입 위치 (염색체 또는 세포 미소기관) 및 염기서열 (숙주 게놈 주변염기서열 포함)



- ▶ 완성된 유전자변형생물체 내에 도입유전자가 목적하는 위치에 적절히 삽입되었는지, 또한 의도적으로 삽입한 도입유전자 외 다른 염기서열이 삽입되었는지를 설명할 수 있는 과학적으로 기술합니다.
- ▶ 유전자변형생물체 게놈 염기서열 분석방법과 분석 시 사용된 프라이머에 대한 상세한 설명을 기술합니다. 이때 앞서 제시된 유전자재조합운반체 내 삽입유전자 염기서열과의 동일성 여부를 확인합니다.

유전자변형모기 AAA를 생산한 유전자재조합체의 특성을 다양한 방법으로 규명하였다. 여러 실험결과로부터, 도입유전자가 유전자변형모기 AAA에 안정되게 통합되고 복수세대에 걸쳐 멘델의 법칙에 따라 유전되는 Sterility gene의 단일 사본을 포함하는 것을 확인하였다. 또한 Plasmid backbone 서열이 유전자변형모기 AAA에서 발견되지 않음을 확인하였다.



[그림 15] 유전자변형 모기 도입유전자 확인결과

동 결론은 여러 가지 증거들에 의해 뒷받침된다: 1) Southern blot 분석으로 전체 계놈을 분석하였고, pBac[3xP3-ECFPafI-attP] plasmid에서 유래한 Backbone 서열의 부재를 확인하였으며, Sterility gene의 단일 사본이 단일 유전자좌에 삽입되었음을 증명하였고, 2) DNA 서열 분석으로 도입 DNA의 정확한 서열 및 삽입체의 5' 및 3' 말단에 인접한 DNA 서열을 결정하였고, 3) pBac[3xP3-ECFPafI-attP] plasmid 서열 비교를 통해 예상된 서열만이 통합되었는지를 확인하였으며, 4) 기존 종의 삽입부위 서열과 삽입체의 5' 및 3' 말단에 인접한 DNA 서열과의 서열 비교를 통해 형질전환 도중 삽입부위에서 재배열이 일어나지 않았음을 확인하였고, 5) Southern blot 분석으로 복수 세대에 걸친 삽입체 안정성을 확인하였으며, 6) 분리 분석을 통해 도입유전자가 단일 유전자좌에 존재하며 멘델의 유전 법칙에 따라 유전되는 것을 추가로 확인하였다.

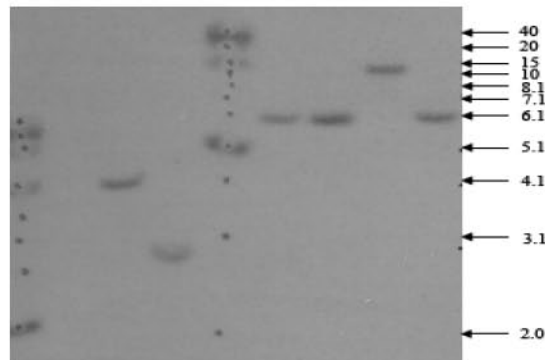
종합하면, 유전자재조합체의 특성화 연구결과는 도입유전자의 단일사본이 유전자변형모기 AAA 계놈의 단일 유전자좌에 삽입되었고, Plasmid backbone 서열은 유전자변형모기 AAA에 존재하지 않음을 확인하였다.

3) 도입 유전자의 복제수



▶ 유전자변형생물체 계놈에 삽입된 도입유전자의 복제수 확인을 위하여 수행한 실험방법 및 결과를 상세히 기술합니다.

유전자변형모기 AAA 계놈에서 도입유전자 서열의 사본수와 삽입부위는 P0 세대 및 적절한 대조군 계놈 DNA 시료를 2개의 제한효소군, Xmn I 와 Dra III의 제한효소 조합 및 Xba I 와 Swa I의 제한효소 조합으로 소화시켜 도입유전자 전장에 걸친 Probe들로 Southern blot을 Hybridize함으로써 평가하였다(그림 16).



[그림 16] 도입유전자 사본수 판단을 위한 Southern blot 결과

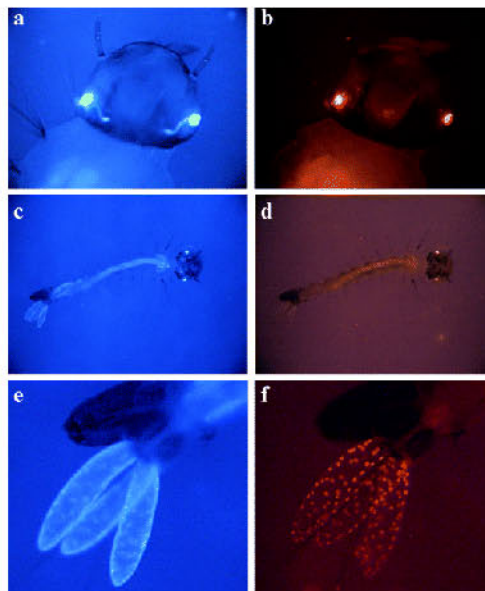
각각의 결과물은 Southern blot 상에서 특정한 밴드(Banding) 패턴을 생성할 것으로 예상된다. 만약 추가적인 사본수 및/또는 삽입부위가 있다면, 추가적인 밴드로 나타날 것이다.

4) 도입유전자의 검출 및 발현의 확인에 사용된 방법



▶ 도입유전자 및 그 발현산물을 확인하기 위하여 이용한 분자생화학적 방법(PCR, 웨스턴블롯, ELISA 등)과 사용된 분석기기의 민감도를 포함한 평가 결과를 세부적으로 기술합니다.

유전자변형모기 AAA의 도입유전자는 이미 설명된 바와 같이, Southern blot 분석으로 도입유전자의 단일사본이 유전자변형모기 AAA 게놈의 단일 부위에 삽입되었음을 확인하였다. 또한 장구벌레 및 성체의 도입유전자 발현여부를 확인하기 위하여 395nm의 UV Light에서 형광유전자(Fluorescent marker)에 의한 발색결과를 [그림 17]과 같이 확인하였다.



[그림 17] 유전자변형 모기에서의 gfp 발현 확인결과

5) 도입유전자 안정성에 대한 자료

가) 도입된 유전자의 복수 세대 동안 후대 안정성

나) 도입된 유전자의 발현부위, 발현시기, 발현량에 대한 복수 세대 동안의 변화



- ▶ 유전자변형생물체 내에 삽입된 모든 도입유전자에 대한 안정성은 복수세대(예시, R-series, R0-R5 또는 F-series, F1-F5 내외) 내에서 도입유전자의 변화가 없음을 실험결과로서 기술합니다.
- ▶ 유전자 안정성 확인을 위하여 수행한 염기서열 분석 또는 유전자 크기 분석 등의 실험(Sequencing, PCR, RFLP, Southern Blot 등)에 대한 상세한 방법 및 데이터를 기술합니다.

유전자변형모기 AAA의 후대에 대한 Southern blot 분석 및 PCR과 형광유전자 발현을 통해 도입유전자가 육종이력의 10세대동안 유지되었음을 증명하였고, 이에 따라 복수세대 걸친 삽입체의 안정성을 확인하였다.

6) 유전자변형생물체 게놈에 도입된 유전자가 독소, 알레르겐을 암호화하지 않음을 증명하는 자료



- ▶ 유전자변형생물체에 삽입된 도입유전자에 대한 위해염기서열 여부는 삽입유전자의 염기서열이 코딩하는 발현산물과 알려진 독소 및 알레르겐과의 아미노산 서열 상동성 분석 자료를 바탕으로 기술합니다.

유전자변형모기 AAA에는 Sterility gene 카세트가 포함되어 있다. Sterility gene 카세트는 모기가 항생제에 저항성을 가지도록 하는 단백질과, 장구벌레 및 성체를 선별하기 위한 *gfp* 단백질을 인코딩하고 있다. Sterility gene 카세트의 발현산물은 기지의 독소나 항영양소를 인코딩하는 알려진 유전인자는 없었다. 이는 앞서 설명한 바와 같이 삽입체 및 인접한 5' 및 3' DNA의 추정상 Polypeptide에 대한 생물정보학적 분석에 의해 확인되었다.

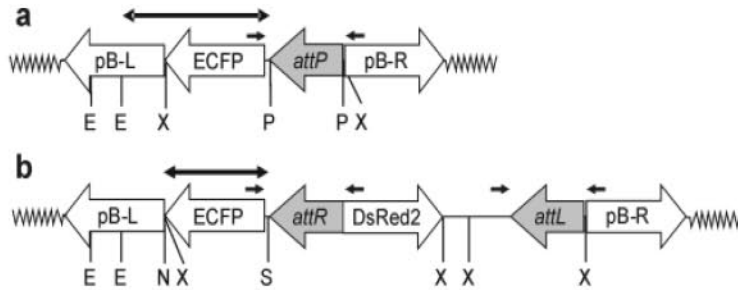
나. 도입유전자 발현산물에 관한 자료

1) 유전자산물의 기능 및 형질 특성(단백질, 비번역 RNA 등)



▶ 의도적으로 유전자변형생물체 내에 도입하여, 유전자로부터 발현되는 신규 발현산물에 대한 특성 및 기능을 기술합니다.

유전자변형모기 AAA에는 Sterility gene 카세트가 포함되어 있다. Sterility gene 카세트는 모기가 항생제에 저항성을 가지도록 하는 단백질과, 장구벌레 및 성체를 선별하기 위한 GFP 단백질을 인코딩하고 있다.



[그림 18] 유전자변형 모기의 도입유전자 지도 및 기능

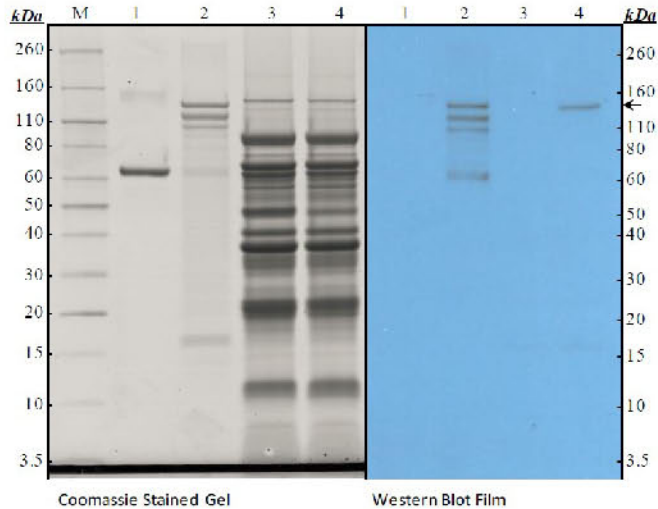
2) 유전자산물의 구조적 평가(단백질생성 후 변이 여부에 대한 평가자료)



- ▶ 유전자변형생물체 내에서 도입유전자로부터 발현되는 신규 발현산물이 의도하였던 생산물의 구조와 동일성 여부를 과학적 실험자료를 바탕으로 기술합니다.
- ▶ 생산물이 단백질인 경우 일반적으로 아미노산 서열 분석, 단백질 생성 후 변이 (post-translation modificatin)에 대한 평가자료(carbohydrate moiety, phosphorylation 등)를 통하여 유전자산물의 구조적 평가를 수행합니다.
- ▶ 유전자산물의 생산량이 적을 경우, 미생물을 통한 대체생산을 통하여 구조적평가를 수행할 수도 있습니다.

유전자변형모기 AAA에서 발현되는 DsRed2 단백질과 GFP에 대한 아미노산 서열의 변역 후 변이(Post-translation modification)는 없었고, 이는 'SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis), 'Western blot', 당단백질

검출(Glycoprotein detection) 및 'MALDI-TOF MS(Matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry)' 및 'MALDI-TOF MS/MS' 단백질의 아미노산 서열분석을 통하여 확인하였다. 안전성 평가를 위한 대량의 분리정제된 DsRed2 단백질은 기술적으로 유전자재조합모기에서 얻을 수 없기 때문에, 미생물 '*Pseudomonas fluorescens*'를 통해 생산하여 평가에 사용하였다.



[그림 19] DsRed2 단백질의 SDS-PAGE 및 Western Blot 분석결과

대부분 실험에서 유전자변형모기 AAA 유래 DsRed2 단백질과 '*P. fluorescens*' 유래 단백질의 비교분석을 통해 생화학적 동등성(Equivalency)을 확인하였다. 비교분석 결과, 유전자변형모기 AAA 및 미생물 '*P. fluorescens*' 유래 DsRed2 단백질은 생화학적으로 동등하다고 판단되었다.

3) 유전자산물의 복수세대 동안 발현부위, 발현시기, 발현량에 대한 평가 및 측정방법과 사용된 실험 및 기기에 대한 민감도



- ▶ 삽입유전자로부터 변화되는 신규 발현산물에 대한 발현부위, 발현시기, 발현양이 복수세대(예시. R-series, R0-R5 또는 F-series, F1-F5 내외) 동안 변화가 없음을 실험자료를 바탕으로 기술합니다.
- ▶ 유전자 발현산물의 안정성 확인을 위하여 수행한 실험(ELIAS, western blot, northern blot, reverse transcription-PCR, RT-PCR) 등에 대한 상세한 방법 및 결과 분석, 단백질 발현실험에 이용된 기기 및 방법에 따른 검출한계(LOD, LOQ)를 명확히 제시합니다.

도입된 각 유전자의 발현정도, 발현시기 및 발현위치는 정량(Quantitative) ELISA 방법으로 확인하였고, 측정방법의 민감도를 제시하였다.

4) 유전자산물이 대사경로에 미치는 영향



- ▶ 도입유전자에 의하여 새로이 발현된 유전자산물이 유전자변형생물체 내에서 의도하지 않은 대사경로에 영향을 미치지 않음을 실험자료를 바탕으로 기술합니다.

유전자변형모기 AAA의 발현산물인 DsRed2 단백질은 *Aedes aegypti* 고유의 특수 대사과정에 개입하여 항생제 테트라사이클린이 없는 생존하지 못하게 한다. 따라서 유전자변형모기 AAA는 방출 후 자연환경 중에서 사멸하며, 수컷 모기는 흡혈을 하지 않으므로 인체에 대한 위해성을 보이지 않는다. 유전자변형모기 AAA에서 발현되는 GFP 단백질은 자연환경 중에서 분해되며, 해당 단백질을 식물, 동물 등에서 섭취하거나 흡수한다 하더라도 특정한 기능을 발휘하는 효소로 작용하지 않는다. 따라서, DsRed2 단백질 및 GFP 단백질이 인체의 대사 경로에 영향을 미치거나 숙주가 함유한 고유의 성분을 기질로 하여 반응할 가능성은 낮으며 이에 대한 악영향에 대한 특정한 연구결과가 보고된 바 없다.

5) 선발표지유전자에 관한 구조와 기능, 저항성을 나타내는 기전 및 대사결과 생성되는 산물



- ▶ 선발표지유전자로부터 발현되는 산물에 대한 생물학적 활성(예, PAT 단백질에 대한 L-phosphinothricin에 대한 친화력, NPTII 효소활성, EPSPS 효소활성 등)을 분석한 평가 자료를 기술합니다.

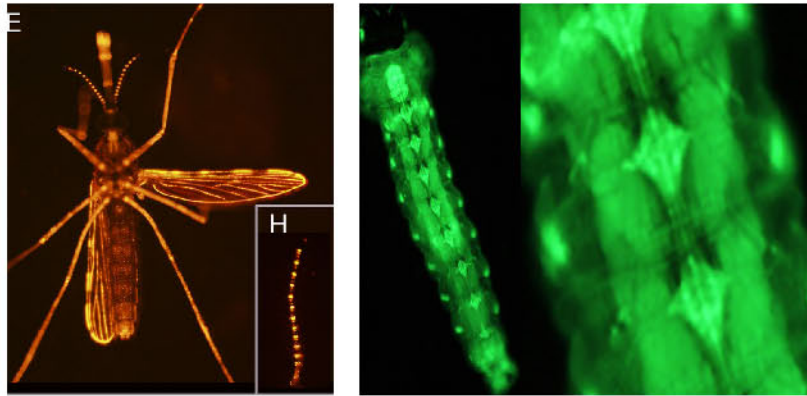
유전자변형모기 AAA에서는 *gfp*를 선발표지유전자로 이용하고 있다. GFP는 Shimomura 등에 의해 처음 Jellyfish *Aequorea victoria*에서 처음 발견되었으며 'Aequorin'이라 명명되었다. Aequorin의 발광스펙트럼과 녹색단백질의 형광 스펙트럼은 Johnson 등에 의해 처음으로 측정되었으며, 이 녹색단백질은 Hasting과 Morin에 의해 녹색형광단백질로 명명되어졌다. GFP는 다양한 강장동물에서 발견되는데, 이들 모두에 대하여 명확하게 밝혀져 있지는 않다. 본 연구에 사용된 GFP의 물리적인 특성은 *Aequorea victoria* GFP로, 27kDa의 분자량을 가지는 단량체로 Acidic, Compact, Globulr한 분자로 매우 안정하며 238개의 아미노산으로 구성되어 있다. GFP는 11개의 β -sheet가 중심에 있는 1개의 α -helical을 둘러싸고 있다. 또한 Neutral buffer에서 65°C까지 매우 안정하게 존재하며, pH 5.5에서 12사이에서 매우 안정하게 존재한다.

6) 유전자변형생물체 검출에 대한 확인 방법 및 결과



- ▶ 유전자변형생물체의 모니터링을 위한 상세한 실험방법(예, 정성 PCR 및 정량 PCR 등) 및 데이터를 기술합니다.

유전자변형모기 AAA는 자연환경 중에서의 성체와 유충(장구벌레)에서 GFP에 의한 형광발색을 통해 확인할 수 있다. 현재 Wild type 모기 중 자체적인 형광발색을 보이는 모기는 존재하지 않으며, *Aedes aegypt* wild type 모기 역시 형광발색을 하지 않으므로 손쉽게 구별이 가능하다.



[그림 20] 유전자변형모기 AAA의 GFP 형광발색 검출결과

다만 UV Light 없이 유전자변형 모기의 검출을 육안으로 확인하기는 어려우므로, Invert PCR에 의한 유전자검사를 통해 유전자변형모기 AAA를 최종 확정한다.

8. 유전자변형생물체와 비변형생물체의 비교자료



▶ 유전자변형생물체가 삽입유전자 발현을 제외하고 숙주와 생물학적 활성에 변화가 없이 동일함을 증명하고 생물학적 불활성화 과정이 동일함을 실험자료 및 과학적 근거자료를 바탕으로 기술합니다.

가. 변형 후의 개선된 특성 및 성질

유전자변형모기 AAA는 항생제 테트라사이클린 없이 생존이 불가능하며 GFP 형광 발색을 보이도록 변형되었으며, 해당 기능을 제외하고 모든 면에서 기존 종 모기와 동일한 특성을 보인다.

나. 숙주와 유전자변형생물체의 생존 및 증식 및 불활성화 방법의 차이 비교

유전자변형모기 AAA는 Wild type과 비교하였을 경우 [표 2]과 같이 수컷대비 암컷의 성비 분리비율이 9:1로 다르며, 이는 생존 및 증식에 있어 매우 불리한 형태이다.

[표 2] LM모기 및 기존 종 모기의 성비 분리비율 실험결과

Males:	322 (52%)	Fluorescent:	298 (93%)
		Wild Type:	24 (7%)
Females:	302 (48%)	Fluorescent:	29 (10%)
		Wild Type:	273 (90%)

유전자변형모기 AAA는 살충제, 트랩 등 통상적인 모기의 방제방법에 의해 구제되며, 도입된 유전적 기능에 의해 통상적인 방제방법에 대하여 어떠한 잇점도 가지고 있지 않다.

다. 숙주 또는 숙주가 속하는 생물종과의 차이점

- 1) 자연환경 또는 자연환경을 반영하는 시험 조건하의 생존 및 생식 · 번식 능력
- 2) 생식 · 번식양식 주기 및 교잡성

유전자변형모기 AAA의 생식 및 번식양식은 환경방출 실험 등을 통하여 기존 종과 비교실험한 결과(표 3), 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다.

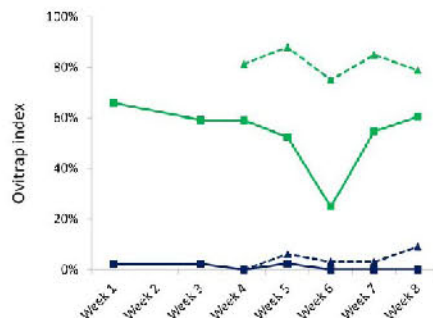
[표 3] LM모기 및 기존 종 모기의 성비 분리비율 실험결과

Strain	Construct	Eggs injected	Survival to pupae	G ₀ Adults	Integration events	Transformation efficiency (assuming 30-50% fertile adults)
WT	OX3860	~6000	1272 (~21%)	550	6	2.2-3.6%
OX3860A	OX4105	504	36 (6%)	32	±1	6.2-10.4%
OX3860B	OX4105	2052	303 (15%)	86	1	2.3-3.9%
OX3860C	OX4105	2165	477 (22%)	161	±2	2.5-4.1%

The "phase 1" *piggyBac* OX3860 construct, carrying an *attP* docking-site, was injected into a wild-type background together with *piggyBac* transposase mRNA. Five lines (OX3860A, B, C, D, E) were obtained including one with two integration events (OX3860C). Three of the resulting OX3860 lines were injected with the "phase 2" OX4105 construct, carrying an *attB* site, together with *PhiC31* integrase mRNA. All the wild type G₀ pupae were discarded since they did not carry an *attP* site. The OX3860B and C lines were kept heterozygous and about half of the G₀ pupae were wild-type. The OX3860A line was enriched and all the G₀ pupae out of those injections were transgenic: a mixture of heterozygote and homozygote individuals. This difference could explain the higher transformation efficiency observed in the OX3860A background.
doi:10.1371/journal.pntd.0000788.t003

(3) 자연생태계 또는 해양생태계에서 다른 생물과의 상호작용(천적, 병원성생물, 경쟁자, 포식자 등)

유전자변형모기 AAA는 자연환경 중에서 수행된 환경방출 실험 결과, 질병 매개체로 경쟁하는 아시아호랑모기 *Aedes albopictus*와의 생존경쟁 및 상호작용에서 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다.



[그림 21] 사람 거주구역(점선) 및 비거주구역(실선)에서의 장구벌레 환경방출 실험결과.

Blue : *Aedes aegypti*, Green : *Aedes albopictus*

4) 생식양식 및 다른 품종 또는 근연종과의 교차 생식성

모기는 알·유충·번데기·성충의 순으로 일생을 보내는 완전변태성 곤충으로, 자연환경 중에 매우 풍부하게 존재하기 때문에 상호 경쟁관계 및 대체관계에 있다고 판단할 만한 근거는 드물지만, 미국과 브라질의 사례에서 보듯이 *Aedes aegypti*가 감소됨에 따라 *Aedes albopictus*가 증가하는 양상이 보고되고 있다(Black et al, 1989).

다른 품종 또는 근연종과의 교차 생식성에 대하여, 뎅기열병의 주요 매개체인 *Aedes aegypti*와 *Aedes albopictus*는 종간 교잡(Interspecific mating)의 가능성을 인공적인 환경에서나 자연적인 환경에서 모두 수행한 결과, 부화율을 기준으로 판단하였을 경우 종간교잡 발생가능성은 없는 것으로 나타났다(표 4).

인위적인 교잡기법으로는 Ow Yang et al(1963)의 기법을 이용하였는데, 기존에 Mating을 하지 않은 10개체의 암컷과 수컷 모기를 플라스크 안에서 에테르 마취하고 침으로 Mating시켰다. 자연적인 교잡으로는 40마리의 수컷 모기가 존재하는 4개의 사육케이지와 면한 평면에 나일론으로 경계를 하여 암컷 모기와 접촉케 하였다.

[표 4] 모기의 종간 교잡 실험결과

Cross Female x Male	No. of replicates	Mean no. ± SD of eggs	Percentage hatched
Artificial mating^a			
Reciprocal mating			
<i>Ae. aegypti</i> x <i>Ae. albopictus</i>	10	81.50 ± 14.50	0
<i>Ae. albopictus</i> x <i>Ae. aegypti</i>	10	26.00 ± 0.00	0
Homologous mating			
<i>Ae. aegypti</i> x <i>Ae. aegypti</i>	10	121 ± 3.61	100
<i>Ae. albopictus</i> x <i>Ae. albopictus</i>	10	14.0 ± 1.14	100
Natural cage mating^b			
Reciprocal mating			
<i>Ae. aegypti</i> x <i>Ae. albopictus</i>	2	271.50 ± 21.50	0
<i>Ae. albopictus</i> x <i>Ae. aegypti</i>	2	123.50 ± 6.50	0
Homologous mating			
<i>Ae. aegypti</i> x <i>Ae. aegypti</i>	2	1,984 ± 6.00	100
<i>Ae. albopictus</i> x <i>Ae. albopictus</i>	2	201 ± 4.00	100

^at test; reciprocal mating: $p = 0.001$; homologous mating: $p = 0.000$.

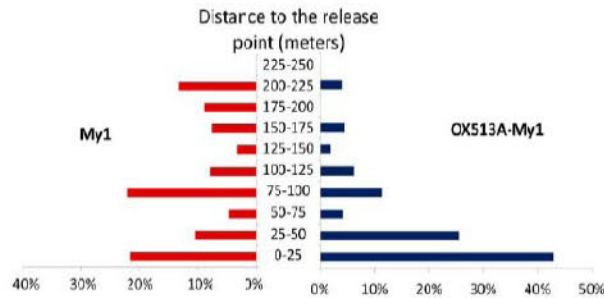
^bt-test; reciprocal mating: $p = 0.022$; homologous mating: $p = 0.000$.

실험과정을 통해 *Aedes aegypti*와 *Aedes albopictus*가 자연적인 환경에서 종간교미를 시도한 경우는 1개 사례가 확인되었으나, 생식력을 가진 알이 부화되지 않음으로서 종간교잡 가능성은 매우 낮은 것으로 확인되었다.

Ref) Nazni W.A. et al (2009) Cross-mating between malaysian strains of *aedes aegypti* and *aedes albopictus* in the laboratory, *Southeast asian journal of tropical medicine and public health*, 40(1), 40-46.

5) 확산 가능성

유전자변형모기 AAA의 자연생태계 확산가능성에 대하여 말레이시아 등지에서 환경방출 실험을 수행한 결과, [그림 22]에 나타나듯이 방출지에서 최대 250미터 내에서 서식함을 확인하였다.



[그림 22] 성체 모기의 환경방출을 통한 확산가능성 실험결과.

Red : Wild type, Blue : *Aedes albopictus*

이러한 실험결과는 유전자변형모기 AAA의 이동거리가 한정되어 있으며, 태풍 등 의도하지 않은 사고없이 확산될 가능성이 낮음을 나타내고 있다.

Ref) Renaud Lacroix et al. (2012) Open field release of genetically engineered sterile male *Aedes aegypti* in malaysia, *PLOS ONE*, 7(8), 1-9.

6) 유해물질 생산 및 생태계 잔류 영향

*Aedes aegypti*는 뎅기열, 황열병, 치쿤구니야를 매개하는 국제적인 매개체로, 암컷모기가 흡혈시 주입하는 히루딘이 알레르기 유발물질이다. 암컷 *Aedes aegypti*가 흡혈시 바이러스나 말라리아원충 등이 함께 주입되어, 해당 바이러스 및 원충이 병원성 독소를 생산하나, 이는 *Aedes aegypti*가 독소를 생산한다고 볼수 없다.

환경에 방출되는 *Aedes aegypti*는 수컷으로 Mating 이후 사멸하며, 비록 성별분리 및 이용절차 상의 오류로 인하여 암컷 유전자변형모기 AAA가 자연환경에 방출된다 하더라도, 항생제 테트라사이클린이 자연환경 중에 일반적으로 존재하지 않는 한, 해당 암컷 모기가 야생종과 비교하여 생존 및 서식에 있어 우위를 점할 가능성이 있다고 보기 어렵다. 따라서 유전자변형모기 AAA는 기존 종과 비교하여 야생형화 능력이 증가하였다고 보기 어렵다.

9. 세부 위해 영향 자료

가. 유독 물질의 생성과 관련된 정보(생물체가 분비하는 독성 물질의 여부 등)

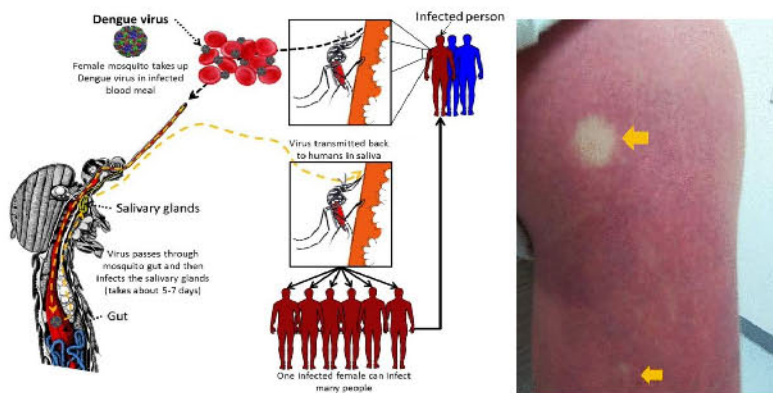


- ▶ 유전자변형생물체 자체가 유독물질을 생성하는지 혹은, 유독물질을 생산하는 생명체가 기생하는지를 구분하여 기술합니다.
- ▶ 유독물질을 생산하는 생명체가 기생하는 경우, 유전자변형생물체가 기존 종과 비교하여 기생성을 증가시키거나 독성 및 알레르기성 등을 강화하지 않음을 과학적 근거를 바탕으로 기술합니다.

*Aedes aegypti*는 땡기열, 황열병, 치쿤쿠니야를 매개하는 국제적인 매개체로, 암컷모기가 흡혈시 주입하는 히루딘이 알레르기 유발물질이다. 암컷 *Aedes aegypti*가 흡혈시 바이러스나 말라리아원충 등이 함께 주입되어, 해당 바이러스 및 원충이 병원성 독소를 생산하나, 이는 *Aedes aegypti*가 독소를 생산한다고 볼수 없다.

*Aedes aegypti*가 매개하는 대표적인 질환인 땡기열의 경우, 인간에서 발생하는 가장 흔한 모기매개 전파 질환으로 *Flaviviridae*과 *Flavivirus* 속의 땡기바이러스를 가진 모기가 사람을 무는 과정에서 전파된다. 땡기열은 국내에서는 2000년 이후 법정전염병 4군으로 지정되어, 2001년 6예, 2004년 16예, 2007년 97예, 2009년 59예가 질병관리본부에 보고되었다.

열대아시아에서는 15세 이하에서 주로 발생하며 단기여행과 해외 유학의 증가로 국내 소아에서의 땡기열사례도 증가되고 있다. 최근 보고되었던 소아 땡기열 4예는 모두 3개월 이하 단기체류자에서 발생하였고 발열, 점상출혈 등의 소견은 있었으나 자발적 출혈 및 혈장유출의 증상을 보인 땡기출혈열 증례는 없었다.



[그림 23] 모기를 매개로 하는 땡기열병 감염경로 및 국내 발병증례

뎅기열은 발열과 인플루엔자 유사증상, 피부발진으로 특징지어지며, 뎅기출혈열의 경우 발열과 출혈증상, 혈장삼출 등을 동반하며, 심한 경우 혈장삼출에 의한 저혈량성 쇼크가 발생할 수 있고, 이를 뎅기쇼크증후군이라 하며 적절한 치료가 없을 경우 사망까지 이를 수 있다. 국내에서는 뎅기열의 발생빈도가 낮아 접하기가 쉽지 않고, 따라서 감별진단으로 고려하기 어려운 점이 있다.

감염된 모기에 물리게 되면 평균 4-7일의 잠복기를 거쳐 평균 5-6일에 걸치는 증상기를 거쳐 회복된다. 이를 다시 발열기/입계기/회복기로 구분할 수 있다. 발열기는 2-7일간 지속되며 두통, 근육통, 관절통 등이 동반되며 식욕부진, 오심, 구토 등이 흔하게 나타난다. 초기 발열기에는 인플루엔자나 다른 바이러스성 열성질환과의 감별이 쉽지 않다.

뎅기바이러스는 초기 바이러스혈증 상태인 발열기 동안(평균 증상발생 5일까지) 혈액에서 분리할 수 있으며 항체 형성 전의 초기감염에는 RT-PCR이 유용하다. 초기 발열기가 지난 5일 후부터 2개월 사이에는 뎅기바이러스의 동정은 어렵지만, IgM 항체가 생성되어 IgM capture ELISA (MAC ELISA) 방법으로 진단할 수 있다. 발병초기에 시행한 IgM 검사에서 음성을 보이는 경우가 있으므로 의사환자의 경우, 초기에 음성이더라도 1주정도 후에 추적검사를 하여야 한다

Ref) 최현희 등 (2011) 자발성 출혈을 동반한 뎅기출혈열 1례, *Korean journal of pediatric infectious diseases*, 18(2), 207-211

나. 주변 생물 및 생태계에 미칠 수 있는 영향에 관한 정보



- ▶ 유전자변형생물체 자체가 주변 생물 또는 생태계에 미칠수 있는 영향에 관한 정보를 구분하여 세부적으로 기술합니다.
- ▶ 경쟁종이나 섭식·포식종이 존재하는 경우, 군집의 변화에 따른 환경 영향 등에 대하여 구체적으로 기술합니다.

모기는 알·유충·번데기·성충의 순으로 일생을 보내는 완전변태성 곤충으로, 자연환경 중에 매우 풍부하게 존재하기 때문에 상호 경쟁관계 및 대체관계에 있다고 판단할 만한 근거는 드물지만, 미국과 브라질의 사례에서 보듯이 *Aedes aegypti*가 감소됨에 따라 *Aedes albopictus*가 증가하는 양상이 보고되고 있다(Black et al, 1989).

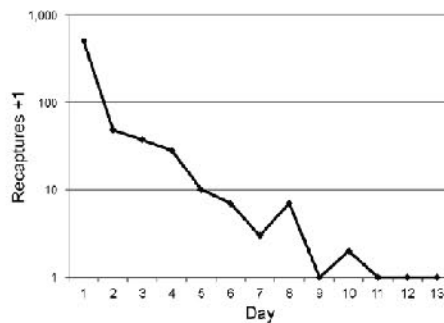
브라질의 유전자변형모기 AAA 환경방출에서 실험목적이었던 *Aedes aegypti*의 감소가 확인됨으로서 해당 모기에 대한 방제효과는 확인되었으나, 질병매개에 있어 경쟁관계에 있는 *Aedes albopictus*가 증가함으로써 뎅기열병의 발생이 증가함으로써 최종적인 목적을 이루지 못한 것으로 보고되었다.

다. 야생형화 가능성 관련 정보



- ▶ 유전자변형생물체 자체의 야생형화 가능성에 대하여, 기존 종과 비교하였을 경우 차이점을 과학적으로 기술합니다.

환경에 방출되는 유전자변형모기 AAA는 수컷으로 Mating 이후 사멸하며, 비록 성별분리 및 이용절차 상의 오류로 인하여 암컷이 자연환경에 방출된다 하더라도, 야생종과 비교하여 야생성이 증가하였다고 보기 어렵다.



[그림 24] 성체 GM모기 잔류비율에 대한 파나마 환경방출 실험결과

파나마에서 수행된 환경방출 실험결과, 유전자변형모기 AAA의 개체수는 방출 이후 급감하였고 11일이 경과하였을 경우 더이상 포획되지 않았다.

Ref) Marco Neira et al. (2014) Estimation of *Aedes aegypti*(Diptera: culicidae) population size and adult male survival in an urban area in Panama, *Memorias do instituto oswaldo cruz*, 1-8.

라. 유전자변형생물체를 도입하고자 하는 환경에 대한 정보

1) 유전자변형생물체 원산지와의 거리



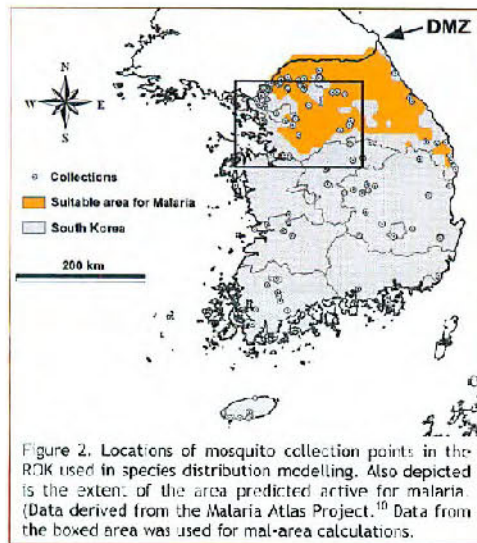
- ▶ 유전자변형생물체가 식물인 경우, 원산지와의 거리와 기존 종과의 이격거리에 대한 설명을 기술합니다.
- ▶ 밀폐환경에서 유전자변형생물체를 생산하는 경우, 상시적인 모니터링 및 안전관리 계획에 제출된다면 해당 기술을 대신할 수 있습니다.

2) 지리적, 기후, 주변 식물의 생태학적 특성에 관한 정보



- ▶ 유전자변형생물체가 도입되는 환경정보를 기술하여야 합니다.
- ▶ 기존 환경방출 실험자료 및 숙주와 공여체의 생태와 관련한 자료를 바탕으로 유전자변형 생물체의 확산에 따른 환경영향을 과학적으로 기술하여야 합니다.

유전자변형모기 AAA가 도입되는 지역은 DDD군으로, 말라리아 및 텡기열을 매개하는 *Aedes albopictus*가 주로 서식하며 산악 내 수풀이 우거진 분지로 반경 100km 내 도시 및 촌락이 존재하지 않는다.



[그림 25] *Aedes albopictus*의 국내 서식환경

*Aedes aegypti*는 먹이사슬의 하단을 차지하고 있는 생물로, 비표적 생물체(Non-target organism)인 근권미생물, 섭식포식 곤충 및 조류의 생활사에 영향을 미친다. 따라서 비표적 생물체에 대한 위해성평가 실험 수행결과…….

마. 유전자변형생물체의 독성에 관한 자료



- ▶ '도입유전자 발현산물에 관한 자료'로 일부분의 설명을 대체할 수 있습니다.
- ▶ 유전자변형생물체 자체의 독성과, 유전자 산물이 일으키는 직접적·간접적 영향에 대하여 기술합니다.

1) 조사자료

가) 유전자산물 또는 이의 대사산물이 일으킬 수 있는 잠재적 독성

나) 유전자산물 및 이의 대사산물 등과 이미 알려진 독성 단백질과의 구조적 상동성 유무

다) 작업자, 최종 이용자가 흡입, 섭취 등의 방법으로 유전자변형생물체에 노출되는 평균 노출량 산출



- ▶ 밀폐환경 및 자연환경에서 유전자변형생물체를 생산/취급하는 자의 노출가능성을 정량적으로 제시하고, 최대 노출가능치에 대한 독성 및 알레르기성을 분석하여 기술합니다.

라) 독성실험을 위하여 미생물 등에서 생산된 발현단백질을 이용하는 경우, 유전자 변형생물체 내 발현단백질과의 생물학적 동등성 평가 (SDS-PAGE, Immuno-cross reactivity, N-말단 아미노산 서열, 탄수화물일부분석, 효소특이적 활성 등 포함)



- ▶ 유전자변형생물체에서 생산되는 발현단백질이 매우 적거나, 분리가 가능하더라도 활성을 유지하지 못할 경우 미생물에 의해 생산된 단백질로 위해성평가 실험을 수행할 수 있습니다.
- ▶ 이러한 경우, 실질적 동등성의 완전한 확인을 위하여 장기 독성실험의 추가수행을 권고합니다.

2) 독성 실험자료

가) 단회투여독성

나) 필요시 기타 독성



- ▶ 단회투여 독성실험은 통상 마우스 등 동물실험으로 수행됩니다.
- ▶ 심사시, 단회투여 독성실험 결과로 유전자변형생물체의 독성이 충분히 설명되지 않을 경우 장기독성실험(3개월 이상) 자료를 요구할 수 있습니다.

바. 유전자변형생물체의 알레르기성에 관한 자료



- ▶ '도입유전자 발현산물에 관한 자료'로 일부분의 설명을 대체할 수 있습니다.
- ▶ 유전자변형생물체 자체의 알레르기성과, 유전자 산물이 일으키는 직접적·간접적 영향에 대하여 기술합니다.

1) 조사자료

가) 유전자산물의 잠재적 알레르기성

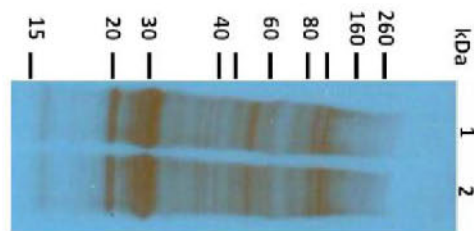
나) 유전자산물 및 이의 대사산물 등과 이미 알려진 알레르겐과의 구조적 상동성 유무

2) 숙주 또는 공여체가 알레르기 유발성이 있는 경우 또는 유전자산물이 알려진 알레르겐과의 구조적 유사성이 확인될 경우, 환자특이적 IgE 항체와의 교차반응 평가



- ▶ 유전자변형생물체 및 유전자변형생물체의 유전자산물이 알레르기 물질과 상당한 상동성이 발견될 경우, 알레르기 양성환자의 혈청을 이용한 실험을 수행하여 그 결과를 기술하여야 합니다.

유전자산물인 단백질이 알레르겐이라는 보고는 없고, 생물정보학적 분석에서도 이미 알려진 알레르겐과 유의한 수준에서 아미노산 서열의 상동성이 없었다.



[그림 26] 유전자변형산물에 대한 Immunoblot analysis 결과

다만, 암컷 유전자변형모기 AAA가 생산하는 히루딘은 대표적인 알레르기 물질로 알려져 있기에, 알레르기 유발성분에 대한 숙주와의 차이를 비교분석하여 제시하였다.

10. 유전자변형생물체의 환경방출·모니터링·폐기에 관한 자료



- ▶ 유전자변형생물체의 환경위해성에 대하여 실제로 환경에 방출된 사례에 대하여, 실험계획 및 절차와 결과에 대하여 세부적으로 기술하여야 합니다.
- ▶ 심사시 유전자변형생물체의 환경영향에 대하여 환경조건 등을 고려하여 종합적으로 판단됩니다.

가. 원형상태의 식용사료용가공용 유전자변형생물체의 경우(해당 유전자변형 생물체 생산국 자료)

1) 환경방출 기간 및 일시

유전자변형모기 AAA는 환경방출용으로 이용되는 살아있는 살충제로, 폭풍 등 자연 재해로 인하여 이동성이 증가할 가능성이 있으므로 이에 대한 영향에 대하여 [그림 27]과 같이 다양한 시기에 다양한 환경조건에서 방출 시험을 수행하였다.

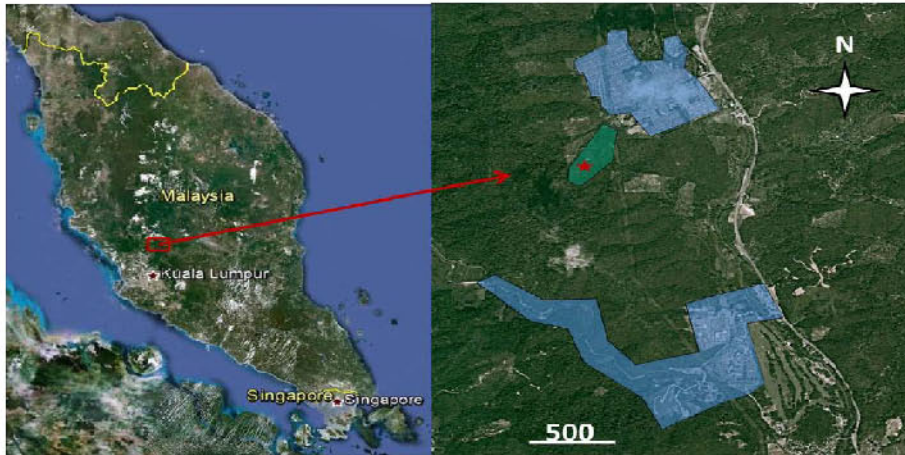
Target	Year	Location	Sterility	No. released	Objective	Outcome	Refs
<i>Aedes aegypti</i>	1960-1961	Pensacola, FL, USA	Ga	4.6 million over 43 wks	Population reduction	Despite extremely overwhelming ratios of release to wild material, no effect could be concluded.	[35]
	1967	Meridian, MS, USA	Me	17 000 fertile males over 2 wks	Morphological allele introgression	Out of 1064 eggs, two matings were to marked individuals.	[36]
	1971	Mirdal Basti, India	Tr	30 000 translocation males over 4 wks	Persistence of translocation in wild population	Males were competitive and persistence of translocation was observed.	[37]
	1971	Shastri Nagar, India	Me	50 000 marked males over 4 wks	Allele introgression in wild population	Males were competitive and introgression of marker allele was observed.	[37]
	1974	Delhi, India	Ch, Tr or Sg	40 500 in 3 experiments of 6 days each	Male mating competitiveness	Males were competitive.	[38]
	1974	Mombasa, Kenya	Tr	57 000 over 10 wks	Population reduction and semi-sterility	Semi sterility, but there was no long-term persistence of translocations nor a great effect on pupa and adult populations.	[39]
	1975	Mombasa, Kenya	Tr	31 500 over 9 wks	Population reduction and dynamics	Released males mated wild females, but eggs from these were not deposited in ovitraps, and hybrid progeny did	[40]

[그림 27] 유전자변형 모기 환경방출시험 현황

Ref) Mark Q. Benedict et al. (2003) The first releases of transgenic mosquitoes: an argument for the sterile insect technique, *Trends in parasitology*, 19(8), 349-355.

2) 환경방출 장소(지리학적 특성, 지질학적 특성, 자연환경 보전지역 등 생물학적 중요 보호구역과의 관계)

유전자변형모기 AAA의 방출실험이 수행된 장소는 말레이시아 Pahang의 Bentong 지역으로 Hutan Tanah Kerajaan(정부 보유 산지 아님)라는 곳이다.



[그림 28] 말레이시아 환경방출 실험지역

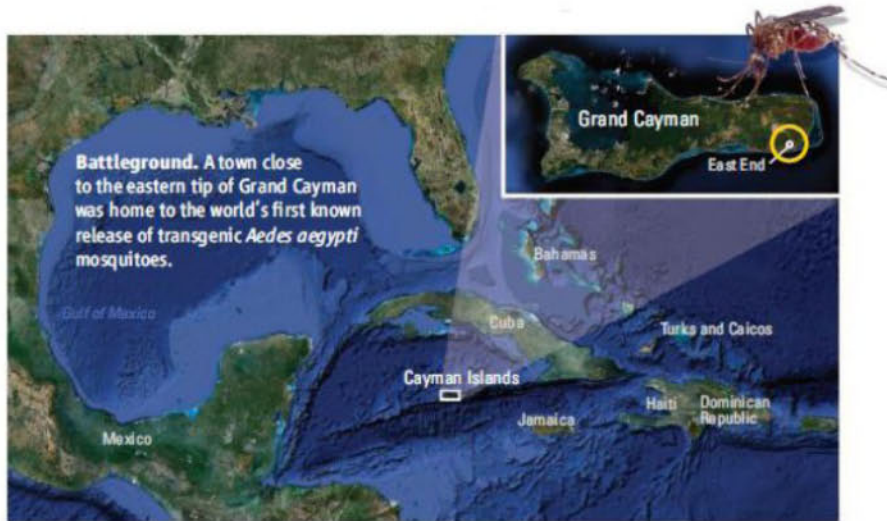
해당 지역은 사람이 거주하지 않는 구역으로 정부 보유산지인 정글지역 언덕의 옆에 자리하고 있으며, 근접지역에는 사유지인 어린 고무나무 농장이 자리하고 있다. 이들 포장시험은 별도로 설정된 자연환경 보전지역 등 생물학적 중요 보호구역과의 관계는 없다.

3) 방출 생태계(방출지역의 근연종 등 생물체 종류 및 분포)

- ▶ 유전자변형생물체를 환경에 방출하여 이용할 경우, 방출지역의 토착생물종이나 근연종과의 상호관계가 매우 중요하므로 이를 상세히 기술하여야 합니다.
- ▶ 방출지역이 통상적으로 이용되는 농지거나 밀폐지역인 경우, 해당 조건 등에 대하여 상세히 기술합니다.

유전자변형 모기 AAA와의 근연종 및 방출 생태계에서 관찰되는 포장시험 지역별 해충 및 생물체의 종류와 분포사항은 첨부 ##에 제시하였다.

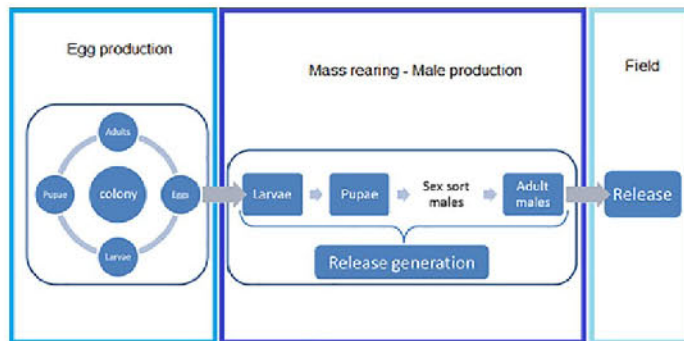
방출지역은 영국령 섬인 케이먼 군도의 동부 끝단으로, 해당 지역은 사람이 거주하지 않으며 태풍 등 자연재해로 인한 사고로 유전자변형 모기가 유실되거나 소실되었다 하더라도 인체 및 환경에 대한 문제를 일으키지 않는 지역이다.



[그림 29] 케이먼군도 환경방출 실험지역 정보

4) 방출 방법 및 방출 양

환경방출시험은 유전자변형모기 AAA, 기존 종 모기(*Aedes aegypti*) 및 질병매개에 있어 경쟁상태인 비변형 참조군(Non-transgenic reference lines) *Aedes albopictus* 3 품종으로 구성되었다. 각 시험에는 3개 품종 중 임의적으로 선정된 100개 그룹이 사용되었다. 10개 지역은 모두 난괴법(Randomized complete block) 4 반복으로 설계되었다.



[그림 30] RIDL/SIT 프로그램에 의한 GM모기 환경방출 실험단계

방출실험을 위한 모기 종은 각각 알 단계에서 시작하여, 동일한 생육조건에서 성체 까지 성장시킨 종으로, 기존 종 *Aedes aegypti*와 유전자변형모기 AAA는 총 40개(= 10 지역 x 4 반복) 실험구(Plot)로 구성되었다.

- 5) 실시 결과 및 데이터
- 6) 기존 방출인가 정보(인가국가, 인가일시, 인가번호)
- 7) 모니터링 시행 계획(방법, 기간, 빈도)
- 8) 유전자변형생물체의 불활성화 방법
- 9) 긴급 상황 대응 계획(확산방지)
- 10) 폐기물의 처리 방안

나. 번식용(배양용) 유전자변형생물체에 해당하는 경우



- ▶ 번식용 유전자변형생물체는 일반적으로 밀폐환경에서 취급되므로, 환경방출 실험은 사고 등 재난상황에 대응하기 위한 생산시설의 안전관리 수준과 계획을 제출하여야 합니다.
- ▶ 미생물의 경우 생산공정이용시설에서의 취급상황을 제출하여야 하며, 미생물이 아닌 경우 번식시설에 대한 구체적인 시설 및 취급기준 등을 제출하여야 합니다.

- 1) 실시시간
- 2) 실시방법
- 3) 실시규모

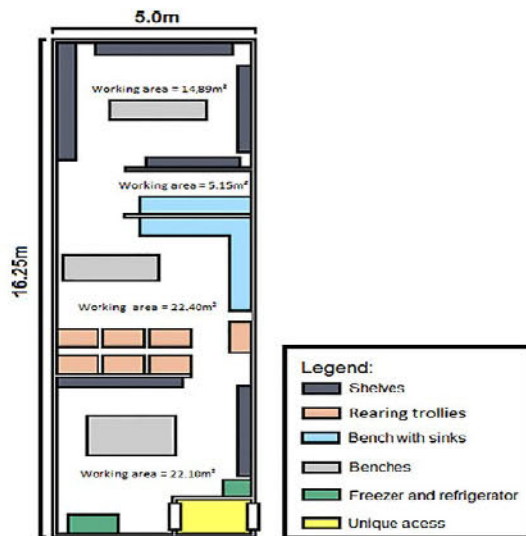
4) 종료 시의 처리방법

유전자변형모기 AAA는 통기가 완비된 2500m² 규모의 메쉬 소재의 3중격리시설에서 시험생산되었다. 모기의 생산은 81.25m² 규모의 격벽 내 BL2 실험실에서 이루어지며, 기타 구역은 취급자 및 사용자의 이동 및 작업을 위해 구획되었다.



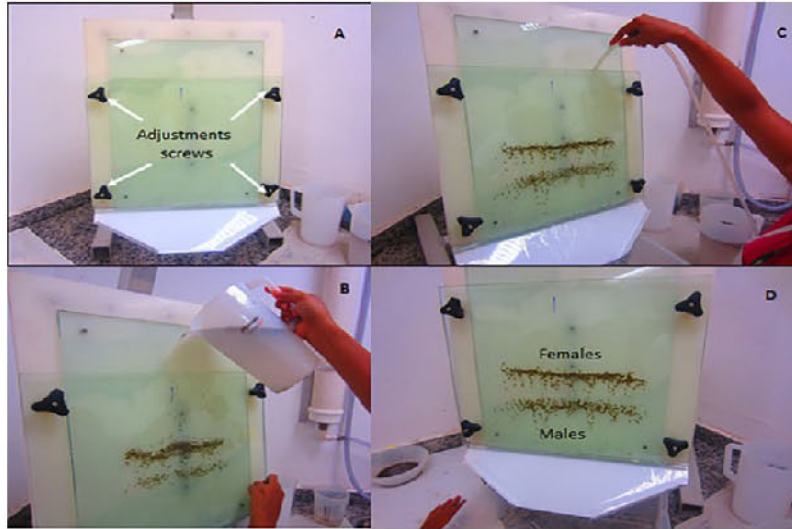
[그림 31] 유전자변형 모기 생산시설 전경

모기의 생산시설은 크게 4개 구획으로 구분되어 있으며, 유전자변형모기 AAA가 생산되는 구역은 Shelves 및 Working area로, 앞에서 부화한 유충(장구벌레)은 수컷과 암컷을 분리한 후, 수컷은 5L 규모의 정치배양조 내에서 사육하고 암컷은 독립된 BL2 시설의 1L 규모의 정치배양조 내에서 사육하였다.



[그림 32] GM모기 생산 Sector 모식도

장구벌레의 성별 구분기법은 Danilo 등의 방법(그림 33)에 의하여 대량선별 분리 하였으며…….



[그림 33] GM 장구벌레 성별 분리기법

Ref) Danilo O. Carvalho et al. (2014) Mass production of genetically modified *Aedes aegypti* for field releases in Brazil, *Journal of visualized experiments*, 83, 1-10.

5) 실시 결과 및 데이터

6) 모니터링 시행 계획(방법, 기간, 빈도)

번식 및 배양환경 내에서 유전자변형모기 AAA가 탈출하거나 유출되었을 경우를 산정하여, 기존 종 *Aedes aegypti* 100그룹을 대상으로 생산시설 거점을 기준으로 방출을 수행하였다. 기존 종 *Aedes aegypti*의 재채집은 거점소 외부에 설치된 Automatic mosquito recapture system에 의하여 수행되었으며, 모니터링 실험 수행기간은 방출 이후 24시간 내 재채집되는 기존 종 *Aedes aegypti*의 개체수로 판별하였다.



[그림 34] Automatic mosquito recapture system

7) 유전자변형생물체의 불활성화 방법

8) 긴급 상황 대응 계획(확산방지)

9) 폐기물의 처리 방안



- ▶ 국내의 경우 「폐기물관리법」등 법률에 의한 기준을 준수하여야 하므로, 배출 폐기물의 종류 및 형태와 이의 처리방법에 대하여 기술합니다.
- ▶ 전문 폐기업체와의 계약하에 폐기할 경우, 계약서로 설명을 대신할 수 있습니다.

11. 해외 인가 및 이용 상황



- ▶ 용도에 따른 허가사용 현황에 대하여 검토하고 제외국의 승인 내역 자료를 확인합니다.
- ▶ 국가명, 기관명, 위해성평가기관, 인가번호, 인가자료, 이용 상황 등을 필수로 제출하여야 합니다.

현재 유전자변형 모기 AAA의 외국 승인을 위해 심사가 진행중인 국가 및 제출기관은 [표 5]와 같고, 아직 승인된 국가는 없다.

[표 5] 유전자변형 모기 AAA의 해외인가 상황

제출국가	제출기관	제출일자	비고
미국	USDA	201×년 ×월 ×일	심사중
	EPA	201×년 ×월 ×일	심사중
캐나다	Health Canada	201×년 ×월 ×일	심사중
	CFIA	201×년 ×월 ×일	심사중
브라질	CTNBio	201×년 ×월 ×일	승인 (201×년 ×월 ×일)
영국	DEFRA	201×년 ×월 ×일	심사중

12. 표준품제출



- ▶ 유전자변형생물체 정성 및 정량 검정을 위한 유전자 염기서열 정보 및 표준시료(표준시료는 국가의 검역, 유통 감시업무에 활용할 수 있도록 원재료 상태로 제출)를 함께 제출합니다.

가. 해당 유전자변형생물체와 숙주 생물체의 불활성 개체 각각 50개체 또는 혼합시료

나. 해당 숙주 생물체에 특이적이며, 게놈(genome)에 존재하는 내재유전자의 염기서열(sequence) 정보

다. 해당 유전자변형생물체의 특이적 검출을 위한, 숙주 생물체의 게놈(genome) 유전자와 외래도입 유전자의 5' 및 3' 말단 부분과의 양 연결부위에 대한 염기서열(sequence) 정보

라. 기타 분석방법 개발에 필요한 유전정보 등

[별표 10-1] 유전자변형생물체의 위해성평가자료

유전자변형생물체 (미생물 제외) 위해성평가 자료	유전자변형 동물의 위해성 평가자료	유전자변형 곤충의 위해성 평가자료	유전자변형미생물 ³⁾ 의 위해성평가자료
1. 개발의 목적 및 용도에 관한 자료 가. 개발의 목적 나. 개발의 유용성 및 용도	좌동	좌동	좌동
			다. 사용방법 라. 품종등록 정보(유전자은행 등)
2. 숙주생물체에 관한 자료 가. 분류학적 위치(학명, 일반명, 품종계통명 등을 포함) 나. 자연생태계 또는 해양생태계에 있어서 분포 상황 다. 인류에 의한 이용 내역(국내외에서의 이용 상황, 재배(배양) 또는 양식 및 품종 개량의 역사, 원산지 및 유전적 다양성의 중심지 등 포함) 라. 생물학적 특성(자연환경 또는 해양수산환경과 이를 반영하는 시험 조건하의 생존 및 생식변식 능력) (1) 자연생태계 또는 해양생태계에서 다른 생물과의 상호작용(천적, 병원성생물, 경쟁자, 포식자 등) (2) 생식양식 및 다른 품종 또는 근연종과의 생식 호환성 (3) 산포(화분·종자의 산포 특성, 산포에 영향을 주는 환경요인) (4) 이동(해양수산생물의 경우) 마. 유해 물질의 생산 가능성(근연종의 유해물질 생산가능성 포함) 바. 숙주 및 근연종에서의 독소 생산성 및 알레르기 유발성 보고 자료 사. 병원성 및 외래인자(바이러스 등)의 오염여부 아. 기생성 등 기타 주요한 생리학적 성질	좌동	좌동	
	(3) 확산가능성		2. 숙주에 관한 자료 가. 분류학적 특성(학명, 일반명, 근주은행 등록번호 등) 나. 자연생태계 분포 현황 다. 생물학적 특성(형태, 생태특성, 생식 및 유전적 특성 등) 라. 생물학적 위험군 분류 현황 (1) 생물체의 병원성 및 기생성 (2) 생물체의 전파방식 및 숙주범위 (3) 인체에 대한 감염량 등 병독성 (4) 질병에 대한 효과적인 예방과 치료조치 유무
		좌동	
	좌동	좌동	마. 최적의 성장(배양) 조건 및 환경에서의 안정성 바. 항생제 저항성 확인 사. 유해물질 생산성 아. 병원성 인자 (virulence factors) 포함 유무

유전자변형생물체 (미생물 제외) 위해성평가 자료	유전자변형 동물의 위해성 평가자료	유전자변형 곤충의 위해성 평가자료	유전자변형미생물 ³⁾ 의 위해성평가자료
자. 미생물인 경우, 병원성 존재 여부 또는 알려진 병원체와의 관련성에 관한 조사자료 자. 잡초화(또는 야생형화) 가능성 및 해양수산생물일 경우, 국내 생태계 도착화 가능성	자. 야생형화 가능성	작동	자. 자연 상태에서의 유전자교환 양식 및 관련 종에 대한 정보 차. 인류에 의한 이용 내역(국내외 이용 상황)
3. 공여생물체에 관한 자료 가. 분류학상 위치(학명, 일반명, 품종계통명 등을 포함) 나. 자연생태계 또는 해양생태계에 있어서 분포 상황 다. 인류에 의한 이용 내역 라. 생물학적 특성 마. 유독 물질의 생산 가능성 바. 공여생물체 및 근연종에서의 독소 생산성 및 알레르기 유발 가능성 사. 미생물인 경우, 병원성 존재 여부 또는 알려진 병원체와의 관련성	작동	작동	작동 사. 공여체가 미생물인 경우 (1) 생물학적 위험군 분류 현황 (2) 최적의 성장(배양)조건 및 환경에서의 안정성 (3) 자연 상태에서의 유전자 교환 양식 및 관련 종에 대한 정보 (4) 항생제 저항성 확인 (5) 병원성 인자 포함 유무
4. 운반체(vector)에 관한 자료 가. 명칭 및 유래(GenBank Accession No. 등) 나. DNA분자량 다. 운반체 구성요소에 관한 정보(유래, 기능, 크기, 염기서열 등) 라. 제한효소에 의한 절단지도(벡터 내 유전적 요소, 위치, 방향성, 염기서열 등 포함) 마. 유해 염기배열 등의 유무 바. 벡터가 다른 세포로 전달될 가능성 및 해양수산생물일 경우, 국내 생태계 도착화 가능성 또는 숙주 의존성	작동	작동	4. 유전자변형미생물 개발에 관한 자료 가. 균주제조 방법 나. 제조용 균주의 배양, 보존 및 관리 방법 (Master seed / Working seed 포함)

유전자변형생물체 (미생물 제외) 위해성평가 자료	유전자변형 동물의 위해성 평가자료	유전자변형 곤충의 위해성 평가자료	유전자변형미생물 ³⁾ 의 위해성평가자료
사. 운반체 대량발현을 위한 중간 숙주 이용 시 중간숙주 내 유전 요소의 확인 및 기능			
아. 필요 시, 중간숙주의 독소생산 성, 알레르기성, 병원성 보고자 료	아. 중간숙주의 독소생산성, 알 레르기성, 병원성 보고자료		
<p>5. 도입유전자에 관한 자료</p> <p>가. 도입된 유전자의 분자량, 기능 및 특성</p> <p>나. 도입 유전자의 구성요소에 관한 정보(유래, 기능, 크기, 염기서열 등)</p> <p>(1) 도입유전자</p> <p>(2) 프로모터 및 조절인자(전사개 시인자 및 종결인자 등)</p> <p>(3) 선발표지유전자</p> <p>(4) 그 밖의 조절인자 및 DNA 기 능에 영향을 주는 기타 인자이 용을 위하여 유전자를 변형한 내용</p> <p>다. 위해염기서열의 존재 유무</p> <p>라. 완성된 벡터 내에서의 도입유전 자 염기서열 위치 및 방향성</p> <p>마. 외래전사해독 프레임의 유무와 그 전사 및 발현 가능성</p>	<p>좌동</p>	<p>좌동</p>	<p>5. 유전자재변형특성에 관한 자료</p> <p>가. 유전자운반체(벡터)에 관한 자 료</p> <p>(1) 명칭 및 유래</p> <p>(2) DNA 분자량</p> <p>(3) 운반체 구성요소에 관한 정보 (유래, 기능, 크기, 제한효소 부위, 염기서열 등)</p> <p>(4) 제한효소에 의한 절단지도 (벡터 내 유전요소, 위치, 방 향성, 염기서열 등 포함)</p> <p>(5) 인정 숙주-벡터계 확인</p> <p>(6) 유해염기배열 등의 유무 확인</p> <p>(7) 벡터가 다른 생물체로 전달될 가능성 또는 숙주 의존성</p> <p>나. 도입유전자에 관한 정보</p> <p>(1) 도입유전자의 특성</p> <p>가) 도입유전자의 분자량, 기 능 및 특성</p> <p>나) 도입 유전자 구성요소에 관한 정보 (유래, 기능, 크기, 염기서열 등)</p> <p>〈1〉 도입유전자</p> <p>〈2〉 조절인자</p> <p>〈3〉 선발표지 유전자</p> <p>〈4〉 기타 조절인자 및 DNA 기능에 영향을 줄 수 있는 요소</p> <p>(2) 이용을 위하여 도입유전자 변 형 내용</p> <p>(3) 위해염기서열의 존재 유무</p> <p>(4) 완성된 벡터 내에서의 도입유 전자 염기서열 위치, 방향성 등 완전성 확인</p>

유전자변형생물체 (미생물 제외) 위해성평가 자료	유전자변형 동물의 위해성 평가자료	유전자변형 곤충의 위해성 평가자료	유전자변형미생물 ³⁾ 의 위해성평가자료
<p>6. 유전자변형생물체의 개발에 관한 자료</p> <p>가. 유전자변형 방법(형질전환 방법)</p> <p>나. 유전자변형생물체의 개발 과정에 대한 설명(재배, 배양, 육종법 등)</p>	<p>좌동</p>	<p>좌동</p>	<p>(5) 외래전사해독프레임의 유무와 그 전사 및 발현 가능성</p> <p>6. 유전자변형미생물 특성에 관한 자료</p> <p>가. 유전자변형미생물 내 도입유전자에 관한 자료</p> <p>(1) 도입유전자 구성 요소 확인(구성요소의 완전성, 부가, 삽입, 결실, 재조합 등 확인)</p> <p>(2) 도입유전자 도입 위치 및 염기서열(숙주 게놈 주변 염기서열 포함)</p> <p>(3) 도입유전자의 복제수</p> <p>(4) 도입유전자 및 인접 숙주 게놈 유전자의 외래전사해독프레임 유무와 그 전사, 발현 가능성</p> <p>(5) 위해염기서열의 존재 유무</p> <p>(6) 도입유전자 검출 및 발현의 확인에 사용된 방법</p> <p>(7) 도입유전자의 계대별 안정성 확인</p> <p>나. 유전자변형미생물 내 발현산물에 관한 자료</p> <p>(1) 유전자산물의 기능 및 형질 특성(단백질, 비번역 RNA 등)</p> <p>(2) 유전자산물의 구조적(물리화학적/생물학적) 평가</p> <p>(가) 물리화학적 특성(전기영동, 분자량, 크로마토그래피 등)</p> <p>(나) 면역학적 특성(ELISA 등)</p> <p>(다) 생물학적 특성(생물학적 활성, 함양 및 순도 등)</p> <p>(3) 유전자산물의 복수 계대 동안의 발현부위, 발현시기, 발현량에 대한 평가</p> <p>(4) 발현단백질의 아미노산 서열 변이 여부</p> <p>(5) 발현단백질의 번역 후 구조적</p>

유전자변형생물체 (미생물 제외) 위해성평가 자료	유전자변형 동물의 위해성 평가자료	유전자변형 곤충의 위해성 평가자료	유전자변형미생물 ³⁾ 의 위해성평가자료
			<p>변화 및 신규 융합단백질의 생성 유무</p> <p>다. 발현산물의 생산, 분리 및 정제에 관한 자료</p> <p>(1) 제조방법 및 공정의 흐름도</p> <p>(2) 배양, 분리, 정제 등에 관한 방법 및 검증 자료</p> <p>(3) 미생물 무독화 과정 (병원성 미생물 사용의 경우)</p> <p>라. 유전자변형생물체와 비변형생물체와의 생존, 증식의 차이</p> <p>(1) 유전자변형후의 개선된 특성</p> <p>(2) 항생제 저항성 비교 (검증자료 포함)</p> <p>(3) 숙주와 유전자변형생물체의 생존, 증식 및 불활성화 방법 및 비교 (검증자료 포함)</p>
<p>7. 유전자변형생물체 특성에 관한 자료</p> <p>가. 유전자변형생물체 내 도입유전자에 관한 자료</p> <p>(1) 유전자변형생물체 내 도입유전자 구성 요소 확인</p> <p>(2) 유전자의 도입 위치 (염색체 또는 세포 미소기관) 및 염기서열 (숙주 게놈 주변염기서열 포함)</p> <p>(3) 도입 유전자의 복제수</p> <p>(4) 도입유전자의 검출 및 발현의 확인에 사용된 방법</p> <p>(5) 도입유전자 안정성에 대한 자료</p> <p>(가) 도입된 유전자의 복수 세대 동안 후대 안정성</p> <p>(나) 도입된 유전자의 성장시기 (Growth Stage)별, 성장 부위(Growth Site)별 복수세대 동안 유전자 수준 변화 확인</p> <p>(6) 유전자변형생물체 게놈에 도입된 유전자가 독소, 알레르겐을 암호화하지 않음을 증명</p>	<p>7. 유전자변형생물체의 특성에 관한 자료</p> <p>가. 유전자변형생물체 내 도입유전자에 관한 자료</p> <p>(1) 유전자변형생물체 내 도입유전자 구성 요소 확인</p> <p>(2) 유전자의 도입 위치 (염색체 또는 세포 미소기관) 및 염기서열 (숙주 게놈 주변염기서열 포함)</p> <p>(3) 도입 유전자의 복제수</p> <p>(4) 도입유전자의 검출 및 발현의 확인에 사용된 방법</p> <p>(5) 도입유전자 안정성에 대한 자료</p> <p>(가) 도입된 유전자의 복수 세대 동안 후대 안정성</p> <p>(나) 도입된 유전자의 발현 부위, 발현시기, 발현량에 대한 복수 세대 동인의 변화</p> <p>(6) 유전자변형생물체 게놈에 도입된 유전자가 독소, 알레르겐을 암호화하지 않음을 증명하는 자료</p>	<p>좌동</p>	<p>7. 세부 위해 영향 평가 자료</p> <p>가. 병독성 평가 자료</p> <p>(1) 조사 자료</p> <p>(가) 유전자산물 및 이의 대사산물 등과 이미 알려진 독소, 병원성인자 (virulence factors)와의 구조적 상동성 유무</p> <p>(나) 작업자, 최종 이용자가 흡입, 섭취 등의 노출방법으로 유전자변형생물체에 노출 가능한 평균 노출량 산출</p> <p>(다) 실험을 위하여 숙주가 아닌 다른 미생물에서 생산된 발현단백질을 이용하는 경우, 유전자변형생물체 내 발현 단백질과의 생화학적, 구조적 기능적 생물학적 동등성 평가</p> <p>(2) 실험자료</p> <p>(가) 발현산물에 대한 단회투여 독성 (독성매개 변수로 체중변화, 사료섭취량, 50% 치사량, 임상증</p>

01
02
03
참 고

유전자변형생물체 (미생물 제외) 위해성평가 자료	유전자변형 동물의 위해성 평가자료	유전자변형 곤충의 위해성 평가자료	유전자변형미생물 ³⁾ 의 위해성평가자료
<p>하는 자료</p> <p>나. 도입유전자 발현산물에 관한 자료</p> <p>(1) 유전자산물의 기능 및 형질 특성(단백질, 비번역 RNA 등)</p> <p>(2) 유전자산물의 구조적 평가(단백질생성 후 변이 여부에 대한 평가자료)</p> <p>(3) 유전자산물의 복수세대 동안 발현부위, 발현시기, 발현량에 대한 평가 및 측정방법과 사용된 실험 및 기기에 대한 민감도</p> <p>(4) 유전자산물이 대사경로에 미치는 영향</p> <p>(5) 선발표지유전자 도입 시, 이에 대한 발현산물에 관한 자료 [(1)-(4)]</p> <p>(6) 유전자변형생물체 발현산물의 검출에 대한 확인 방법 및 결과</p>	<p>나. 도입유전자 발현산물에 관한 자료</p> <p>(1) 유전자산물의 기능 및 형질 특성(단백질, 비번역 RNA 등)</p> <p>(2) 유전자산물의 구조적 평가(단백질생성 후 변이 여부에 대한 평가자료)</p> <p>(3) 유전자산물의 복수세대 동안 발현부위, 발현시기, 발현량에 대한 평가 및 측정방법과 사용된 실험 및 기기에 대한 민감도</p> <p>(4) 유전자산물이 대사경로에 미치는 영향</p> <p>(5) 선발표지유전자 도입 시, 이에 대한 발현산물에 관한 자료[(1)-(4)]</p> <p>(6) 유전자변형생물체 발현산물의 검출에 대한 확인 방법 및 결과</p>		<p>상 및 폐사율 등 검토)</p> <p>(나) 유전자변형미생물, 비변형미생물 및 안전성이 확인된 균주에 대한 LD50 평가</p> <p>(다) 필요시 기타 독성</p> <p>나. 알레르기성 평가 자료</p> <p>(1) 조사자료</p> <p>(가) 유전자산물의 잠재적 알레르기성 평가</p> <p>(나) 유전자산물 및 이의 대사산물 등과 이미 알려진 알레르겐과의 구조적 상동성 유무</p> <p>(다) 실험을 위하여 숙주가 아닌 다른 미생물에서 생산된 발현단백질을 이용하는 경우, 유전자변형생물체 내 발현 단백질과의 생화학적, 구조적 기능적 생물학적 동등성 평가</p> <p>(2) 유전자산물의 물리화학적 처리에 대한 감수성</p> <p>(3) 공여체 또는 숙주가 알레르기 유발성이 있는 경우, 또는 유전자 산물이 알려진 알레르겐과의 구조적 상동성이 확인될 경우, 환자특이적 IgE 항체와의 교차반응 평가</p> <p>다. 환경위해성평가자료</p> <p>(1) 토양 이화학성에 미치는 영향</p> <p>(가) 토양 pH</p> <p>(나) 유기물 용탈 등</p> <p>(2) 토양 또는 수계에서의 생존능력</p> <p>(3) 포자생성여부</p> <p>(4) 토양 유용미생물에 미치는 영향(Rhizobium 등 근권 미생물)</p> <p>(5) 주변 곤충, 식물, 동물에 미치는 영향</p> <p>(6) 알려진 식물병원균과의 유전물질 교환 가능성 여부</p>

유전자변형생물체 (미생물 제외) 위해성평가 자료	유전자변형 동물의 위해성 평가자료	유전자변형 곤충의 위해성 평가자료	유전자변형미생물 ³⁾ 의 위해성평가자료
<p>8. 유전자변형생물체와 비변형생물체의 비교자료</p> <p>가. 유전자변형 후의 개선된 특성 및 성질</p> <p>나. 숙주와 유전자변형생물체의 생존, 증식 및 불활성화 방법의 차이 비교</p> <p>다. 숙주 또는 숙주가 속하는 생물종과의 차이점</p> <p>(1) 자연환경 또는 자연환경을 반영하는 시험 조건하의 생존 및 생식·번식 능력</p> <p>(2) 생식·번식양식 주기 및 교잡성</p> <p>(3) 자연생태계 또는 해양생태계에서 다른 생물과의 상호작용(천적, 병원성생물, 경쟁자, 포식자 등)</p> <p>(4) 생식양식 및 다른 품종 또는 근연종과의 생식 호환성</p> <p>(5) 산모(화분·종자의 산모 특성, 산모에 영향을 주는 환경요인)</p> <p>(6) 이동(해양수산생물의 경우)</p> <p>(7) 유해물질 생산 및 생태계 잔류 영향</p> <p>(8) 체조성성분 비교자료</p>	<p>8. 유전자변형생물체와 비변형생물체의 비교자료</p> <p>가. 유전자변형 후의 개선된 특성 및 성질</p> <p>나. 숙주와 유전자변형생물체의 생존, 증식 및 불활성화 방법의 차이 비교</p> <p>다. 숙주 또는 숙주가 속하는 생물종과의 차이점</p> <p>(1) 자연환경 또는 자연환경을 반영하는 시험 조건하의 생존 및 생식·번식 능력</p> <p>(2) 생식·번식양식 주기 및 교잡성</p> <p>(3) 자연생태계 또는 해양생태계에서 다른 생물과의 상호작용(천적, 병원성생물, 경쟁자, 포식자 등)</p> <p>(4) 생식양식 및 다른 품종 또는 근연종과의 교차 생식성</p> <p>(5) 확산 가능성</p> <p>(6) 유해물질 생산 및 생태계 잔류 영향</p>	<p>작동</p>	<p>8. 해의 인가 및 이용 상황</p> <p>가. 국가명</p> <p>나. 기관명</p> <p>다. 위해성평가기관</p> <p>라. 인가번호</p> <p>마. 인가자료</p>
<p>9. 세부 위해 영향 자료</p> <p>가. 유독 물질의 생성과 관련된 정보(생물체가 분비하는 독성 물질의 여부 등)</p> <p>나. 주변 생물 및 생태계에 미칠 수 있는 영향에 관한 정보</p> <p>다. 잡초(야생)화 및 토착화 가능성 관련 정보</p> <p>라. 유전자변형생물체를 도입하고자 하는 환경에 대한 정보</p> <p>(1) 유전자변형생물체 원산지와의 거리</p> <p>(2) 지리적, 기후, 주변 동식물의 생태학적 특성에 관한 정보</p> <p>마. 유전자변형생물체의 독성에 관</p>	<p>9. 세부 위해 영향 자료</p> <p>가. 유독 물질의 생성과 관련된 정보(생물체가 분비하는 독성 물질의 여부 등)</p> <p>나. 주변 생물 및 생태계에 미칠 수 있는 영향에 관한 정보</p> <p>다. 야생형화 가능성 관련 정보</p> <p>라. 유전자변형생물체를 도입하고자 하는 환경에 대한 정보</p> <p>(1) 유전자변형생물체 원산지와의 거리</p> <p>(2) 지리적, 기후, 주변 식물의 생태학적 특성에 관한 정보</p>	<p>작동</p>	<p>9. 일반적인 유전자오염 및 그 방지 방법</p>

유전자변형생물체 (미생물 제외) 위해성평가 자료	유전자변형 동물의 위해성 평가자료	유전자변형 곤충의 위해성 평가자료	유전자변형미생물 ³⁾ 의 위해성평가자료
<p>한 자료</p> <p>(1) 조사자료</p> <p>(가) 유전자산물 또는 이의 대사산물이 일으킬 수 있는 잠재적 독성</p> <p>(나) 유전자산물 및 이의 대사산물 등과 이미 알려진 독성 단백질과의 구조적 상동성 유무</p> <p>(다) 작업자, 최종 이용자가 흡입, 섭취 등의 방법으로 유전자변형생물체에 노출되는 평균 노출량 산출</p> <p>(라) 미생물 등에서 대체 생산된 발현단백질을 이용하여 독성실험 등을 하는 경우, 유전자변형생물체 내 발현단백질과의 생물학적 동등성 평가</p> <p>(2) 독성 실험자료</p> <p>(가) 단회투여독성</p> <p>(나) 필요시 기타 독성</p> <p>바. 유전자변형생물체의 알레르기성에 관한 자료</p> <p>(1) 조사자료</p> <p>(가) 유전자산물의 잠재적 알레르기성</p> <p>(나) 유전자산물 및 이의 대사산물 등과 이미 알려진 알레르겐과의 구조적 상동성 유무</p> <p>(2) 숙주 또는 공여체가 알레르기 유발성이 있는 경우 또는 유전자 산물이 알려진 알레르겐과의 구조적 유사성이 확인될 경우, 환자특이적 IgE 항체와의 교차반응 평가</p>	<p>마. 유전자변형생물체의 독성에 관한 자료</p> <p>(1) 조사자료</p> <p>(가) 유전자산물 또는 이의 대사산물이 일으킬 수 있는 잠재적 독성</p> <p>(나) 유전자산물 및 이의 대사산물 등과 이미 알려진 독성 단백질과의 구조적 상동성 유무</p> <p>(다) 작업자, 최종 이용자가 흡입, 섭취 등의 방법으로 유전자변형생물체에 노출되는 평균 노출량 산출</p> <p>(라) 독성실험을 위하여 미생물 등에서 생산된 발현단백질을 이용하는 경우, 유전자변형생물체 내 발현단백질과의 생물학적 동등성 평가 (SDS-PAGE, Immuni-cross reactivity, N-말단 아미노산 서열, 탄수화물일부분분석, 효소특이적 활성 등 포함)</p> <p>(2) 독성 실험자료</p> <p>(가) 단회투여독성</p> <p>(나) 필요시 기타 독성</p> <p>바. 유전자변형생물체의 알레르기성에 관한 자료</p> <p>(1) 조사자료</p> <p>(가) 유전자산물의 잠재적 알레르기성</p> <p>(나) 유전자산물 및 이의 대사산물 등과 이미 알려진 알레르겐과의 구조적 유사성 유무</p> <p>(2) 숙주 또는 공여체가 알레르기 유발성이 있는 경우 또는 유전자산물이 알려진 알레르겐과의 구조적 유사</p>		

유전자변형생물체 (미생물 제외) 위해성평가 자료	유전자변형 동물의 위해성 평가자료	유전자변형 곤충의 위해성 평가자료	유전자변형미생물 ³⁾ 의 위해성평가자료
	성이 확인될 경우, 환자특이적 IgE 항체와의 교차반응 평가		
<p>10. 유전자변형생물체의 환경방출·모니터링·폐기에 관한 자료</p> <p>가. 원형상태의 식용·사료용 가공용 유전자변형 생물체의 경우(해당 유전자변형 생물체 생산국 자료)</p> <p>(1) 환경방출 기간 및 일시</p> <p>(2) 환경방출 장소(지리학적 특성, 지질학적 특성, 해양수산 환경 특성, 자연환경 보전지역 등 생물학적 중요 보호구역과의 관계)</p> <p>(3) 방출 생태계(방출지역의 근연종 등 생물체 종류 및 분포)</p> <p>(4) 방출 방법 및 방출 양</p> <p>(5) 실시 결과 및 데이터</p> <p>(6) 기존 방출인가 정보(인가국가, 인가일시, 인가번호)</p> <p>(7) 모니터링 시행 계획(방법, 기간, 빈도)</p> <p>(8) 유전자변형생물체의 불활성화 방법</p> <p>(9) 긴급 상황 대응 계획(확산방지)</p> <p>(10) 폐기물의 처리 방안</p> <p>나. 재배용(이식용) 유전자변형생물체에 해당하는 경우(국내 포장 및 격리 시험정보)</p> <p>(1) 실시시간</p> <p>(2) 실시방법</p> <p>(3) 실시규모</p> <p>(4) 종료 시의 처리방법</p> <p>(5) 실시 결과 및 데이터</p> <p>(6) 모니터링 시행 계획(방법, 기간, 빈도)</p> <p>(7) 유전자변형생물체의 불활성화 방법</p>	<p>10. 유전자변형생물체의 환경방출·모니터링·폐기에 관한 자료</p> <p>가. 원형상태의 식용·사료용·가공용 유전자변형생물체의 경우(해당 유전자변형 생물체 생산국 자료)</p> <p>(1) 환경방출 기간 및 일시</p> <p>(2) 환경방출 장소(지리학적 특성, 지질학적 특성, 자연환경 보전지역 등 생물학적 중요 보호구역과의 관계)</p> <p>(3) 방출 생태계(방출지역의 근연종 등 생물체 종류 및 분포)</p> <p>(4) 방출 방법 및 방출 양</p> <p>(5) 실시 결과 및 데이터</p> <p>(6) 기존 방출인가 정보(인가국가, 인가일시, 인가번호)</p> <p>(7) 모니터링 시행 계획(방법, 기간, 빈도)</p> <p>(8) 유전자변형생물체의 불활성화 방법</p> <p>(9) 긴급 상황 대응 계획(확산방지)</p> <p>(10) 폐기물의 처리 방안</p> <p>나. 번식용(배양용) 유전자변형 생물체에 해당하는 경우</p> <p>(1) 실시시간</p> <p>(2) 실시방법</p> <p>(3) 실시규모</p> <p>(4) 종료 시의 처리방법</p> <p>(5) 실시 결과 및 데이터</p> <p>(6) 모니터링 시행 계획(방법, 기간, 빈도)</p> <p>(7) 유전자변형생물체의 불활</p>	<p>좌동</p>	<p>10. 기타 (모니터링 시행계획 및 방법, 유전자변형 실험결과 또는 유전자변형 미생물의 육성 등의 과정에서 얻어진 정보로 상기 이외에 위해성평가에 영향을 미치는 것으로 판단되는 내용, 불의의 사고, 긴급 시에 대한 처리 방법 등)</p>

유전자변형생물체 (미생물 제외) 위해성평가 자료	유전자변형 동물의 위해성 평가자료	유전자변형 곤충의 위해성 평가자료	유전자변형미생물 ³⁾ 의 위해성평가자료
(8) 긴급 상황 대응 계획(확산방지) (9) 폐기물의 처리 방안	성화 방법 (8) 긴급 상황 대응 계획(확산방지) (9) 폐기물의 처리 방안		
11. 해외 인가 및 이용 상황 가. 국가명 나. 기관명 다. 위해성평가기관 라. 인가번호 마. 인가자료 바. 이용 상황 등	좌동	좌동	11. 표준품 제출(유전자변형미생물 정성 및 정량 감정을 위한 유전자 염기서열 정보 및 표준시료 제출) 가. 비변형 숙주 및 유전자변형미생물 (각 2 vial: 10 ⁶ cfu/ml) 나. 증식 세부 방법 다. 숙주 계통 유전자와 신규 도입 유전자의 5' 및 3' 말단에 대한 염기서열 정보 라. 유전자변형미생물 확인 방법
12. 표준품 제출 유전자변형생물체 정성 및 정량 감정을 위한 유전자 염기서열 정보 및 표준시료 (표준 시료는 국가의 검역, 유통 감시업무에 활용할 수 있도록 종자당 등 원재료 상태로 제출) 가. 해당 유전자변형생물체와 숙주 생물체의 불활성 종자(또는 개체) 각각 50종자(또는 개체) 및 혼합시료 1kg 나. 영양채시 해당 유전자변형생물체와 숙주 생물체의 불활성 영양채 각각 50영양채 다. 미생물일 경우 불활성 시린 유전자변형생물체 일정량 제출 라. 불활성화 해양수산용 유전자변형생물체의 경우, (1) 어류는 치어 50개체 (2) 패류, 갑각류 및 기타 부착성생물의 경우, 유생 1g (3) 미세조류 및 먹이생물은 0.5g (4) 해조류는 50영양채(각 영양채당 1g 이상 시료) (5) 해양미생물은 (3)과 같음	12. 표준품제출 GM 동물 생산에 이용하였던 유전자변형생물체의 체세포 또는 조직 제출 가. 의의사항 : 벡터 또는 Plasmid 염기서열 나. 선택사항 : 형질전환 동물 유래 세포주, 생식세포 또는 숙주 생물체와 동일한 일반 동물의 동일부위 제출 다. 해당 숙주 생물체에 특이적이며, 게놈(genome)에 존재하는 내재유전자의 염기서열(sequence) 정보 라. 외래도입 유전자의 특이적 감출을 위해서는 형질전환 동물 생산에 이용하였던 PCR primer 서열, 각 말단 부분의 연결부위 유전자 염기서열 정보 제공 마. 각 개체의 외래 유전자 염색체 삽입 좌위 확인 결과 (FISH 결과 등)	12. 표준품제출 유전자변형생물체 정성 및 정량 감정을 위한 유전자 염기서열 정보 및 표준시료 (표준 시료는 국가의 검역, 유통 감시업무에 활용할 수 있도록 원재료 상태로 제출) 가. 해당 유전자변형생물체와 숙주 생물체의 불활성 개체 각각 50개체 또는 혼합시료 나. 해당 숙주 생물체에 특이적이며, 게놈(genome)에 존재하는 내재유전자의 염기서열(sequence) 정보 다. 해당 유전자변형생물체의 특이적 감출을 위한, 숙주 생물체의 게놈(genome) 유전자와 외래도입 유전자의 5' 및 3' 말단 부분과의 양 연결부위에 대한 염기서열(sequence) 정보 라. 기타 분석방법 개발에 필요한 유전정보 등	12. 자연환경위해성평가에 대한 자료(환경방출 목적 유전자변형 미생물인 경우) 가. 수용예상 환경과 유사한 환경에서의 적용사례 나. 대상이 되는 특정 표적물질에 관한 정보 다. 표적물질이 숙주에 미치는 영향 라. 표적물질에 대한 유전자변형미생물의 작용 마. 숙주와 유전자변형미생물의 물질대사를 통하여 표적물질 이외 물질이 변화할 가능성 바. 주변생태계(대기, 토양 및 수계)의 이화학적 특성에 대한 영향 사. 유전자변형미생물의 대사산물이 먹이사슬에서 농축됨으로 인해 다른 생물체에 미칠 수 있는 영향

유전자변형생물체 (미생물 제외) 위해성평가 자료	유전자변형 동물의 위해성 평가자료	유전자변형 곤충의 위해성 평가자료	유전자변형미생물 ³⁾ 의 위해성평가자료
<p>마. 해당 숙주 생물체에 특이적이 며, 게놈(genome)에 존재하는 내재유전자의 염기서열 (sequence) 정보</p> <p>바. 해당 유전자변형생물체의 특이 적 감출을 위한, 숙주 생물체의 게놈(genome) 유전자와 외래 도입 유전자의 5' 및 3' 말단 부분과의 양 연결부위에 대한 염기서열(sequence) 정보</p> <p>사. 기타 분석방법 개발에 필요한 유전정보 등</p>			
			<p>13. 환경방출에 대한 자료(환경방출 목적 유전자변형미생물인 경 우)</p> <p>가. 방출 기간 및 일시</p> <p>나. 방출 장소(지리학적 특성, 지질 학적 특성, 자연환경 보전지역 등 생물학적 중요 보호구역과의 거리)</p> <p>다. 방출 생태계(방출지역의 생물체 종류 및 분포)</p> <p>라. 방출 방법 및 종료 시 처리</p> <p>마. 방출 량</p> <p>바. 기존 방출인가 정보(인가국가, 인가일시, 인가번호 등)</p> <p>사. 포장시험의 관련 정보(실험구의 배치, 각 시험구의 면적 등 실험 설계서 및 종료 시 처리</p>

3) "미생물"이란 세균, 바이러스 및 바이로이드, 진균, 원생동물, 조류 등을 의미하며, "유전자변형미생물"이란 현대생 명공학기술을 이용하여 얻어진 새롭게 조합된 유전물질물 포함하는 미생물을 말한다. 유전자변형미생물이라 할지라도 건강한 성인(동물, 식물)에게 질병을 일으키지 아니하는 것으로 알려진 미생물인 생물학적 제 1위험군에 해당하는 미생물 중 동종 또는 자연적으로 발생하는 생리적 과정에 의해 유전물질의 교환이 가능한 계통적으로 밀접한 종을 유전자재조합하여 만든 셸프-클로닝 미생물을 밀폐 이용하는 경우에는 심사대상에 해당되지 않는다. 다만, 셸 프-클로닝에 사용되는 유전자재조합벡터는 통상적으로 미생물에 안전하게 사용된 경험이 있어야 하며, 제 1위험군 에 해당하는 미생물의 셸프-클로닝 중 항생제저항성유전자에 대한 유전자재조합의 경우에는 유전자변형미생물로서 심사 대상에 포함된다.

[참고 3] 타 부처 소관 LMO 인체위해성 협의심사자료(작성예시)

1. 유전자변형생물체 개발의 목적 및 용도에 관한 평가

가. 개발 목적



- ▶ 인간 보건 및 삶의 질 향상을 위한 산물인지 또는 인간의 보편적 윤리와 건전성에 부합되는지에 대하여 기술합니다.

제초제내성 유전자변형잔디 BBB는 *Agrobacterium tumefaciens* strain CP4에서 유래한 CP4 EPSPS 효소 유전자를 잔디에 삽입하여 글라이포세이트 제초제에 내성을 갖도록 변형하였다. CCC사는 선택성 제초제의 무분별한 사용을 억제할 수 있는 환경친화적 특성의 잔디를 개발함으로써 제초제 사용량과 사용횟수의 감소로 인한 경제적 효과와 인체위해관리에 효과적인…….

나. 개발의 유용성 및 용도



- ▶ 새롭게 부여된 유전자 발현산물의 특성 및 그 역할에 따른 유전자변형생물체의 용도를 명확히 기술합니다.

제초제내성 유전자변형잔디 BBB는 제초제 사용량과 사용횟수의 감소로 인한 경제적 효과와 인체위해관리에 효과적이며…….

Agrobacterium tumefaciens strain CP4에서 유래한 CP4 EPSPS 효소 유전자를 아그로박테리움법을 이용하여 잔디에 삽입하여 제조한 유전자변형잔디○○○은 글라이포세이트 제초제에 내성을 갖으며, 유전자변형잔디 품종은 글라이포세이트 제초제 살포를 통하여 선발되었다.

2. 숙주 및 공여생물체에 대한 평가

가. 분류학상 위치(학명, 일반명, 품종계통명 등을 포함)



- ▶ 명칭, 유래 및 분류학적 특성은 종, 속, 과, 이종 및 계통번호를 포함한 최근의 분류법에 따라 기술합니다.
- ▶ 숙주 및 공여생물체의 생물학적 특성이 잘 알려져있으며, 유전자변형생물체의 생물학적 특성 또한 잘 알려져 있음을 기술합니다.

숙주로 사용된 잔디는 *Agrostis* 종이며 그 생물학적 분류체계는 다음과 같다.

Family: *Poaceae*, Subfamily: *Pooideae*, Tribe: *Poeae*, Subtribe: *Agrostidinae*,
Genus: *Agrosits* (Soreng et al., 2001).

개화기 때의 잔디 길이는 약 30cm에 이르고 그 일반적인 특징은 …….

일반적으로 페잔디로 불리우는 ○○잔디는 ○○, ○○ 등과 생물학적으로 유연성이 있으며……. 관련 참조문은 첨부#에서 제시합니다.

나. 자연계 분포사항, 재배 및 품종개량 역사



- ▶ 숙주 및 공여생물체가 생태계에서 서식 및 분포하는 일반적인 상황에 대하여 기술합니다.

Agrostis 종의 잔디는 *Agrostis tenuis* Sibth와 *A. canina* L, *A. alba* L과 교배되었으며, 우점종인 *A. stolonifera*는 개량되어 1917년부터 품종이 생산되기 시작하였다(Holt et al., 1951). 첫 번째 상업적 이용을 허가받은 품종은 'Seaside'라는 이름으로 1920년대에 시판되었다(Hitchcock, 1950' Hurley et al., 1950)…….

다. 인류에 의한 이용 내역(안전하게 이용된 경험)



- ▶ 숙주와 공여생물체 자체가 국내외에서 이용된 상황, 재배(배양) 또는 양식 및 품종 개량의 역사, 원산지 및 유전적 다양성의 중심지 등을 기술합니다.
- ▶ 숙주와 공여생물체 자체가 인류에게 안전하게 사용된 역사를 갖고 있었는지, 또는 일반적인 환경에서 안전성에 이상이 없는지에 대하여 과학적 근거자료를 바탕으로 기술합니다.

*Agrosits*종의 잔디는 북미의 골프코스에 사용되어져 왔으며 (Duich, 1985; Meyer, 1989) 19세기 말에 유럽으로부터 수입되어 지금까지 사용되어지고 있고 …….

라. 숙주(공여체) 및 근연종에서의 독소 생산성 및 알레르기 유발성 보고자료



- ▶ 숙주, 공여체에서의 독소 생산성 및 알레르기 유발 가능성을 과학적 근거자료를 바탕으로 기술합니다.

숙주인 *Agrosits*종의 잔디는 접촉에 의한 알레르기 반응성이 알려져 있다. 잔디에 대한 5%의 호흡기 알레르기 환자가 화분에 잠작되어 알레르기 반응성을 나타내며 화분이 주요 알레르겐으로 보고되고 있다(○○○, 1987). 기타의 독소생산성은 보고된 바 없다.

근연종으로서

*A. capillaris*에 대한 알레르겐 또는 독소 생산은 …….

*A. canina*에 대한 알레르겐 또는 독소 생산은 …….

*A. gigantes*에 대한 알레르겐 또는 독소 생산은 …….

*A. castellana*에 대한 알레르겐 또는 독소 생산은 …….

공여체로서의 *Agrobacterium tumefaciens* strain은 …….

마. 미생물인 경우, 병원성 존재 여부 또는 알려진 병원체와의 연관성 조사자료



- ▶ 숙주, 공여체와 관련된 근연종에서의 독소 생산성 및 알레르기 유발 기능성에 대해 과학적 근거자료를 바탕으로 기술합니다.

숙주인 *Agrosits*종의 잔디가 병원성을 일으킨다는 보고는 없다.

숙주인 *Agrosits*종의 잔디로부터 매개되어 병을 일으키는 병원소는 알려진 바 없으며…….

공여체인 *Agrobacterium tumefaciens* strain가 인체 병원성을 야기한다는…….

3. 벡터(운반체)에 관한 평가

가. 명칭 및 유래



▶ 운반체의 명칭 및 유래와 골격을 이루는 각 유전요소 및 유전요소의 기원(source)에 대해 명확히 기술합니다.

명칭: PV-○○

Genetic Element	Position in PV-ASGT08	Function
P-ract1/ract1 intron	199-1592	The 5' region of rice (<i>Oryza sativa</i>) actin1 gene containing the promoter, transcription start site and first intron. (McElroy <i>et al.</i> , 1990)
<i>ctp2</i>	1609-1836	The DNA sequence for chloroplast transit peptide, isolated from <i>Arabidopsis thaliana</i> EPSPS; transit peptide directs the CP4 EPSPS protein to the chloroplast, the site of aromatic amino acid biosynthesis.
<i>cp4 epsps</i>	1837-3704	The coding sequence for the native 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase from <i>Agrobacterium sp.</i> strain CP4.
NOS 3'	3217-3472	The 3' nontranslated region of the nopaline synthase (NOS) coding sequence from

Genetic Element	Position in PV-ASGT08	Function
<i>cp4 epsps</i>	5187-6554	The coding sequence for the native 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase from <i>Agrobacterium sp.</i> Strain CP4.
NOS 3'	6567-6822	The 3' nontranslated region of the nopaline synthase (NOS) coding sequence from <i>Agrobacterium tumefaciens</i> , which terminates transcription and directs polyadenylation (Fraley <i>et al.</i> , 1983).
ORI	7251-7905	The minimum pBR322 sequence required for plasmid replication. Sequence downstream of this region is known to affect copy number.
<i>NPTII</i>	7986-8969	The gene for the enzyme neomycin phosphotransferase type II from Tn5, a transposon isolated from <i>Escherichia coli</i> (Beck <i>et al.</i> , 1982). The <i>nptII</i> gene also contains a 0.153 kb portion of the 0.378 kb <i>ble</i> gene from Tn5.

[그림 1] 운반체 및 도입유전자 유전요소

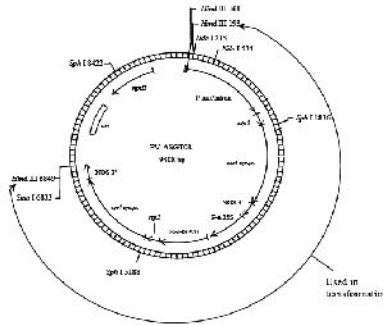
각 유전요소의 origine에 대한 독성, 알레르기성, 병원성 유발은 아직까지 보고된 바.....

나. DNA 분자량 및 제한효소에 의한 절단지도



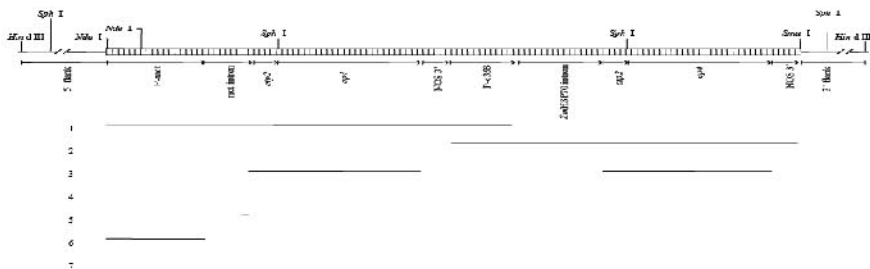
- ▶ 운반체의 유전자도 및 제한효소 절단위치를 기술합니다. 벡터의 염기서열을 분석하기 위하여 사용된 프라이머의 위치 및 서열과 벡터의 염기서열(또는 삽입유전자가 포함된 벡터 염기서열)을 기술합니다.
- ▶ 기업비밀 여부와 관계없이, 유전자변형생물체의 개발에 사용된 운반체를 명확히 기술하고 유전자지도 및 유전요소에 대하여 상세히 기술한 자료를 제출하여야 합니다.

PV-○○ 벡터의 구조는…….



[그림 2] PV-○○ 벡터 유전자지도

벡터에 삽입된 도입유전자 및 기타 유전요소에 대한 지도는…….



[그림 3] 도입유전자 및 유전요소 지도

실험에 사용된 Probe의 위치 및 유전자 확인은…….

Probe Number	Probe Name	Start Position	End Position	Total Length (bp)
1	Insert Probe #1	180	4062	3883
2	Insert Probe #2	3446	6874	3409
3	<i>cp2-cp4 epcps</i>	1608, 4958	3167, 6517	1560
4	NOS 3'	3217, 6567	3472, 6822	256
5	P-ract + ract1 intron	266	1582	1317
6	P-ract	175	1150	976
7	P-e35S+ Zm HSP70 intron	3474	4936	1463

[그림 4] Probe 정보 및 확인대상 유전자 정보

삽입유전자에 대한 염기서열은 …….

분자적 특성에 대한 자세한 실험방법 및 결과는 첨부#을 통하여 제시합니다.

다. 유해 염기서열 등의 유무



- ▶ 운반체의 유전요소(삽입유전자가 포함)에 대하여, 모든 유전자의 구성 요소별 염기서열을 확인하고, 삽입유전자 이외의 외래전사해독프레임의 존재여부 및 안전성에 대하여 기술합니다.
- ▶ 염기서열로부터 코딩되는 발현산물과 알려진 독소 및 알레르겐과의 아미노산 상동성 분석 자료를 검토하여 발현 가능한 산물이 잠재적 독소 및 알레르겐과 어떠한 관계에 있는지를 기술합니다.
- ▶ 생물정보학적 검색결과에 의한 염기서열 및 구조적 상동성 비율에 따라, 추가적인 세부요구자료가 요청될수 있습니다.

PV-○○ 벡터 내에는 염기서열 분석 결과 유해 염기배열이 관련되어 있지 않으며 (첨부# 염기서열분석), 삽입유전자는 BPSPS 단백질을 암호화 하는 것 이외의 외래전사해독프레임의 존재는 없다.

삽입유전자의 발현산물인 BPSPS에 대한 아미노산 서열은…….

Deduced amino acid sequence of the CP4 EPSPS protein
 includes the CTP2 transit peptide (amino acids 1-76 are the transit peptide).

```

1  MAQVGRICNG VQNPQLISNL SKSSQRKQFL SVSLKQQHP RAYPISSWG
51  LKKSGMTLIG SELRFLKVMK SVSTACMLHG ASSRPATARK SSGLSGTVRI
101  PGDKSISHRS FMFGGLASGE TRITGLLEGE DVINIGKAMQ AMGARIRKEG
151  DTWIIDGVGN GLLAPEAPL DFGNAATGCR LIMGLVGVYD FDOTFIGDAS
201  LTKRDMCRVL NDLREMCVQV KSEDCDRLEP TLROPKTPTP IYRVDMASA
251  QVKSAVLLAS LNTFGITTVI EPIMIKDHE KMLQGFGANL IVETDALGVR
301  TIRLEGRGKI TGQVIDVPGD PASTAFPLVA ALLVPGSDVT IINVLMPTR
351  TGLLITLQEM GADIEVINFR LAGGEDVADL RVRSGTLKGV TVPEDRAFDM
401  LDEYFILAVA AAFREGATVM NGLLELRVKE SDRLSAVANG LKLVGVDCDE
451  GFTSLVVRGR PDKGGLGNAS GARVATHLDH RTAMSFVVMR IYSENPTVTD
501  DAIMIATSPF EFMDLMAGLG AKIELSDTKA A
  
```

[그림 5] epsps 유전자 발현 아미노산 서열

epsps 유전자가 코딩하는 발현산물의 아미노산 서열과 알려진 독소와의 아미노산 상동성 분석 및 그 결과는 첨부#(독소와의 아미노산 상동성 분석)에서 제시하였습니다.

epsps 유전자가 코딩하는 발현산물의 아미노산 서열과 알려진 알레르겐과의 아미노산 상동성 분석 및 그 결과는 첨부#(알레르겐과의 아미노산 상동성 분석)에서 제시하였습니다.

nptII 유전자가 코딩하는…….

라. 벡터가 다른 세포로 전달될 가능성 또는 숙주 의존성



- ▶ 유전자재조합은반체가 자발적, 혹은 비자발적으로 다른 세포로 전달될 가능성에 대하여 과학적 근거자료를 바탕으로 기술합니다.

마. 중간 숙주 내 유전요소 확인 및 기능



- ▶ 유전자변형생물체의 개발을 위해 벡터를 대량 발현하는 중간숙주를 이용할 경우, 해당 중간숙주 유전체로 도입유전자가 전이되지 않았음을 실험을 통해 상세히 기술하여야 합니다.

중간숙주 또는 제초제내성 유전자변형잔디○○○품종에서의 유전자 확인은 각 유전요소의 nucleotide Probe을 이용하여 PCR을 수행하였다. *cp4-epsps* 유전자 (*ctp2*가 포함) 및 각 유전자에 사용된 프라이머와 실험 결과는 아래와 같으며…….

분자적 특성에 대한 자세한 실험방법 및 결과는 첨부#을 통하여 제시합니다.

바. 중간숙주에 대한 자료



- ▶ 유전자변형생물체의 개발을 위해 운반체를 대량 발현하거나 필수적으로 매개하는 중간숙주를 이용할 경우, 해당 중간숙주 자체의 인체 및 환경위해성과 세부적인 유전정보를 상세히 기술하여야 합니다.

유전자변형잔디 BBB 품종을 생산하기 위하여 도입된 중간숙주인 *Agrobacterium tumefaciens* EH○○ 에 대한 독성, 알레르기성, 병원성 유발에 관한 보고는…….

4. 도입유전자에 관한 평가

가. 명칭 및 유래



- ▶ 도입유전자의 분자량, 기능 및 특성에 대하여 자세히 기술합니다.
- ▶ 다른 위해성평가항목에 이미 기술되어 있다 하더라도, 자세히 기술하는 것을 원칙으로 합니다.

나. 도입 유전자의 구성요소별 유래 및 염기서열



- ▶ 기업비밀 여부에 상관없이, 도입유전자, 조절인자, 선발표지유전자 등이 포함된 염기서열정보를 구체적으로 기술합니다.
- ▶ 운반체에 대한 평가자료에서 모든 삽입유전자가 포함되어 함께 제시되었다면, 벡터의 염기서열 확인으로 대신할 수 있습니다
- ▶ 염기서열 분석방법과 분석 시 사용된 프라이머에 대한 상세한 설명도 함께 제시합니다.

- 1) 도입유전자의 크기, 명칭, 기능
- 2) 조절인자(전자개시인자 및 종결인자)
- 3) 선발표지유전자
- 4) 그 밖의 조절인자 및 DNA 기능에 영향을 주는 기타 인자

다. 이용을 위하여 유전자를 변형한 내용

라. 위해염기서열의 존재



- ▶ 도입유전자 유전요소 및 도입기원 생물체에 대한 독성 또는 알레르기성 유발 가능성을 과학적으로 기술합니다.
- ▶ 염기서열로부터 코딩되는 발현산물과 알려진 독소 및 알레르겐과의 아미노산 상동성 분석 자료를 검토하여 발현 가능한 산물이 잠재적 독소 및 알레르겐과 어떠한 관계에 있는지를 기술합니다.

마. 완성된 벡터내의 유전자염기서열 위치 및 방향성



- ▶ 개발이 완료된 운반체 내에서 도입유전자의 위치와 운반체 골격 등에 대한 염기서열 위치 및 방향성을 자세히 기술합니다.
- ▶ 선발표지유전자의 크기, 명칭을 확인하고 선발표지유전자의 확인을 위해 사용된 실험방법에 대하여 자세히 기술합니다.
- ▶ 운반체에 대한 평가자료에서 모든 삽입유전자가 포함되어 함께 제시되었다면, 모든 삽입유전자가 포함된 벡터의 염기서열 확인으로 대신할 수 있습니다.

바. 외래전사해독프레임의 유무와 그 전사 및 발현 가능성



- ▶ 도입유전자를 포함한 운반체 전체의 전사개시인자 및 종결인자 등을 포함한 조절인자의 크기 및 명칭을 확인하고 조절인자의 확인을 위하여 사용된 실험방법을 세부적으로 기술합니다.
- ▶ 기타 조절인자 및 목적하는 삽입유전자의 기능에 영향을 주는 인자가 있는 경우에는 그 명칭 및 구조적 특성을 상세히 기술하여야 합니다.

5. 유전자변형생물체의 개발 방법에 관한 평가

가. 유전자변형방법 (배양, 재배, 육종 등 형질전환 방법)



- ▶ 유전자 전달방법에 대한 상세한 형질전환 프로토콜 및 형질전환 과정이 적절하고 안전하게 수행되었는지 여부를 상세히 기술합니다.
- ▶ 시험연구기관의 연구시설 개요, 주요설비, 연구 인력의 구성 및 경력, 연구책임자 정보 등이 포함되어야 합니다.

유전자변형잔디 BBB 품종을 생산하기 위한 형질전환방법은 아그로박테리움법을 사용하였으며(Toyama,2003), CP4 EPSPS 유전자는 PV-○○발현벡터에 삽입하였다. 중간숙주(*Agrobacterium tumefaciens* ○○)에 삽입된 플라스미드 벡터의 선별은 선택적마커 nptII를 이용하여…….

형질전환 과정에 대한 프로토콜 방법 및 결과는 다음과 같으며…….

형질전환 과정에 대한 자세한 실험은 첨부#를 통하여 제시합니다.

6. 유전자변형생물체의 분자생물학적 특성에 관한 평가

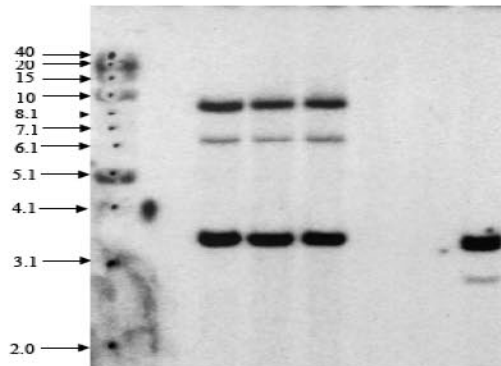
가. 유전자변형생물체의 도입유전자 확인 결과

나. 유전자의 도입 위치 및 주변염기서열 분석



- ▶ 완성된 유전자변형생물체 내에 도입유전자가 목적하는 위치에 적절히 삽입되었는지, 또한 의도적으로 삽입한 도입유전자 외 다른 염기서열이 삽입되었는지를 설명할수 있는 과학적으로 기술합니다.
- ▶ 유전자변형생물체 게놈 염기서열 분석방법과 분석 시 사용된 프라이머에 대한 상세한 설명을 기술합니다. 이때 앞서 제시된 유전자재조합운반체 내 삽입유전자 염기서열과의 동일성 여부를 확인합니다.

유전자변형잔디 BBB에서의 유전자 확인은 각 유전요소의 nucleotide Probe을 이용하여 PCR 또는 Southern blot을 이용하여 확인하였다. CP4 EPSPS 유전자의 삽입확인은 Sph I 제한효소와 ctp2-cp4 epsps Probe을 이용하여 Southern blot 을 수행하여 조직별로 유전자의 삽입위치 및 유무를 확인하였으며, …….



[그림 6] Southern blot 실험결과

유전자변형생물체 내의 도입유전자 발현 양태는 …….

유전자변형생물체 내 도입유전자의 분자적 특성에 관한 자세한 실험방법 및 결과는 첨부#을 통하여 제시합니다.

삽입유전자에 대한 염기서열은…….

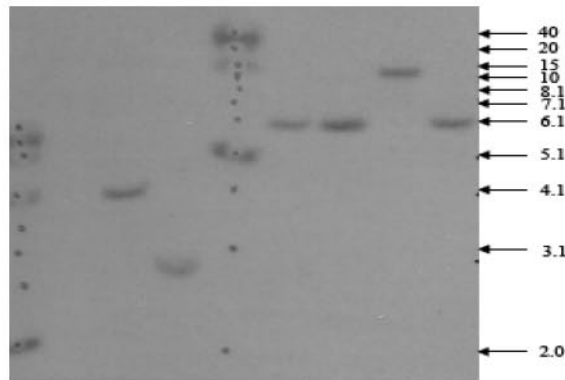
분자적 특성에 대한 자세한 실험방법 및 결과는 첨부#을 통하여 제시합니다.

다. 도입 유전자의 복제수



- ▶ 유전자변형생물체 게놈에 삽입된 도입유전자의 복제수 확인을 위하여 수행한 실험방법 및 결과를 상세히 기술합니다.

제초제내성 유전자변형잔디 BBB의 genomic DNA를 Nde I/Sma I 제한효소를 이용하고, Probe으로써 ○○을 사용하여 Southern blot을 통하여 복제수를 확인한 결과 1 copy의…….



[그림 7] Southern blot 실험결과

유전자변형생물체 내 도입유전자의 분자적 특성에 관한 자세한 실험방법 및 결과는 첨부#을 통하여 제시합니다.

라. 도입유전자의 검출 및 발현의 확인에 사용된 방법



- ▶ 도입유전자 및 그 발현산물을 확인하기 위하여 이용한 분자생화학적 방법(PCR, 웨스턴블롯, ELISA 등)과 사용된 분석기기의 민감도를 포함한 평가 결과를 세부적으로 기술합니다.

마. 안정성에 대한 자료



- ▶ 유전자변형생물체 내에 삽입된 모든 도입유전자에 대한 안정성은 복수세대(예시. R-series, R0-R5 또는 F-series, F1-F5 내외) 내에서 도입유전자의 변화가 없음을 실험결과로서 기술합니다.
- ▶ 유전자 안정성 확인을 위하여 수행한 염기서열 분석 또는 유전자 크기 분석 등의 실험(Sequencing, PCR, RFLP, Southern Blot 등)에 대한 상세한 방법 및 데이터를 기술합니다.

1) 도입된 유전자서열 및 복수세대 동안의 변화

2) 도입된 유전자의 발현부위, 발현시기, 발현량에 대한 복수 세대 동안의 변화

유전자변형잔디 BBB에서의 도입유전자 확인은 각 도입유전자의 nucleotide Probe를 이용하여 PCR 또는 Southern blot을 이용하여 확인하였다.

결과는 유전자변형잔디 BBB에서의 CP4 EPSPS 유전자의 삽입확인은 Sph I 제한효소와 ctp2-cp4 epsps Probe를 이용하여 Southern blot을 수행하여 확인한…….

제초제내성 유전자변형잔디 BBB에 도입된 유전자인 epsps 와 nptII 유전자는 6세대의 교배와 3세대의 자가교배를 통하여 안정적으로 발현되었으며, 이는 뿌리, 잎, 화분 등에서 Southern blot 과 멘델의 유전법clr에 근거한 분리 비 검정을 이용하여 확인하였고…….

유전자변형생물체의 세대별 도입유전자의 안정성평가에 대한 자세한 실험방법 및 결과는 첨부#에서 제시합니다.

바. 유전자변형생물체 계통에 도입된 유전자가 독소, 알레르겐을 암호화하지 않음을 증명하는 자료



- ▶ 유전자변형생물체에 삽입된 도입유전자에 대한 위해염기서열은 삽입유전자의 염기서열이 코딩하는 발현산물과 알려진 독소 및 알레르겐과의 아미노산 서열 상동성 분석 자료를 바탕으로 기술합니다.

사. 유전자산물에 관한 자료

1) 유전자산물의 형질 특성



- ▶ 의도적으로 유전자변형생물체 내에 도입하여, 유전자로부터 발현되는 신규 발현 산물에 대한 특성 및 기능을 기술합니다.

2) 도입된 유전자의 단백질생성후변이 여부



- ▶ 유전자변형생물체 내에서 도입유전자로부터 발현되는 신규 발현산물이 의도하였던 생산물의 구조와 동일성 여부를 과학적 실험자료를 바탕으로 기술합니다.
- ▶ 생산물이 단백질인 경우 일반적으로 아미노산 서열 분석, 단백질 생성 후 변이(post-translation modificatin)에 대한 대한 평가자료(carbohydrate moiety, phosphorylation 등)를 통하여 유전자산물의 구조적 평가를 수행합니다.
- ▶ 유전자산물의 생산량이 적을 경우, 미생물을 통한 대체생산을 통하여 구조적평가를 수행할 수도 있습니다.

3) 유전자산물의 기능

4) 도입된 유전자 또는 도입결과 변화되는 표적단백질의 발현정도, 발현시기, 발현위치 및 측정방법과 이의 민감도



- ▶ 삽입유전자로부터 변화되는 신규 발현산물에 대한 발현부위, 발현시기, 발현양이 복수세대(예시. R-series, R0-R5 또는 F-series, F1-F5 내외) 동안 변화가 없음을 실험자료를 바탕으로 기술합니다.
- ▶ 유전자 발현산물의 안정성 확인을 위하여 수행한 실험(ELIAS, western blot, northern blot, reverse transcription-PCR, RT-PCR) 등에 대한 상세한 방법 및 결과 분석, 단백질 발현실험에 이용된 기기 및 방법에 따른 검출한계(LOD, LOQ)를 명확히 제시합니다.

5) 유전자산물이 대사경로에 미치는 영향



- ▶ 도입유전자에 의하여 새로이 발현된 유전자산물이 유전자변형생물체 내에서 의도하지 않은 대사경로에 영향을 미치지 않음을 실험자료를 바탕으로 기술합니다.

유전자변형잔디 BBB 내 CP4 EPSPS 단백질은 방향족 아미노산의 합성 경로인 shikimate(시킴산) 경로를 촉매하며, 이 경로에서 DAHP (3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate) 합성효소의 활성화에 의하여 조절을 받고 제어됨이 증명되고 있으나, DAHP로부터 chorismate가 생성될 때까지의 단계동안 중간 대사산물 또는 최종 생성물에 의해 저해되거나 억제되는 경우가 거의 없는 것으로 알려져 있기 때문에 CP4 EPSPS 단백질이 이 경로에서 반응 조절효소가 아닌 것을 알 수 있으며…….

6) 선발표지유전자에 관한 구조와 기능, 저항성을 나타내는 기전 및 대사결과 생성되는 산물



- ▶ 선발표지유전자로부터 발현되는 산물에 대한 생물학적 활성(예, PAT 단백질에 대한 L-phosphinothricin에 대한 친화력, NPTII 효소활성, EPSPS 효소활성 등)을 분석한 평가 자료를 기술합니다.

7) 유전자변형생물체 검출 및 확인 방법



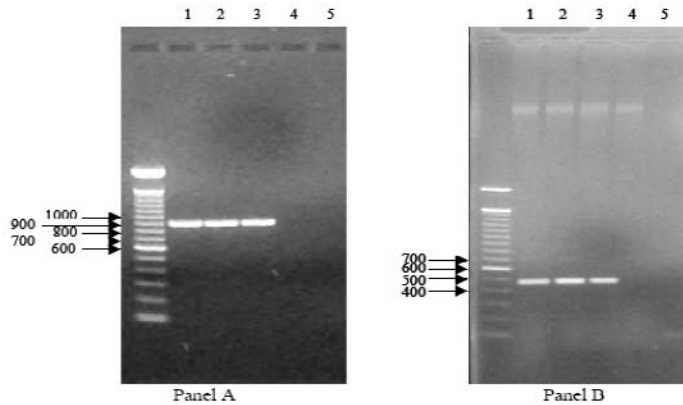
- ▶ 유전자변형생물체의 모니터링을 위한 상세한 실험방법(예, 정성 PCR 및 정량 PCR 등) 및 데이터를 기술합니다.

유전자변형잔디 BBB의 검출 또는 모니터링은 숙주 계통과 삽입유전자의 border sequence가 포함되는 부위 확인을 통하여 수행한다. Panel A는 5'-border 부위에서의 Probe를 이용한 PCR 결과이며, Panel B는 3'-border 부위에서의 Probe를 이용한 PCR 결과이다.

PCR 결과는 유전자변형잔디 BBB 검출을 위한…….

Probe에 대한 염기서열은 다음과 같으며…….

유전자변형잔디 BBB에 대한 검출방법 및 상세결과는 첨부#에서 제시합니다.



[그림 8] PCR을 이용한 유전자변형잔디 BBB 확인

7. 유전자변형생물체와 비변형생물체의 비교 평가



- ▶ 유전자변형생물체가 삽입유전자 발현을 제외하고 숙주와 생물학적 활성에 변화가 없이 동일함을 증명하고 생물학적 불활성화 과정이 동일함을 실험자료 및 과학적 근거자료를 바탕으로 기술합니다.

가. 변형 후의 개선된 특성 및 성질

나. 숙주와 유전자변형생물체의 생존 및 증식의 차이 비교

8. 세부 위해 영향 평가

가. 유전자변형생물체의 병원성 평가



- ▶ 유전자변형생물체 자체가 유독물질을 생성하는지 혹은, 유독물질을 생산하는 생명체가 기생하는지를 구분하여 기술합니다.
- ▶ 유독물질을 생산하는 생명체가 기생하는 경우, 유전자변형생물체가 기존 종과 비교하여 기생성을 증가시키거나 독성 및 알레르기성 등을 강화하지 않음을 과학적 근거를 바탕으로 기술합니다.

나. 유전자변형생물체의 독성 평가



- ▶ '도입유전자 발현산물에 관한 자료'로 일부분의 설명을 대체할 수 있습니다.
- ▶ 유전자변형생물체 자체의 독성과, 유전자 산물이 일으키는 직접적·간접적 영향에 대하여 기술합니다.

1) 유전자산물 또는 이의 대사산물이 일으킬 수 있는 잠재적 독성 평가

2) 유전자산물 및 이의 대사산물 등과 이미 알려진 독성 단백질과의 구조적 상동성 분석



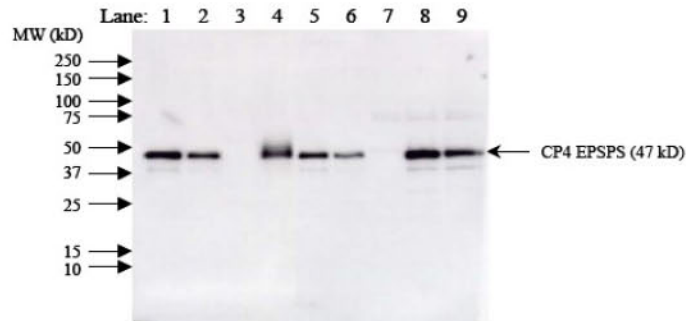
- ▶ 새로이 발현된 산물과 기존에 알려진 모든 독소와의 아미노산 서열에 대한 상동성 분석 자료를 바탕으로 발현산물의 잠재적 독소가능성을 기술합니다.
- ▶ 아미노산 서열에 대한 상동성 분석은 PIR, SWISS-PROT, EMBL, Protein DATA Bank 등을 이용하며, 독성 유발이 낮을 것으로 판단하는 기준은 1×10^{-5} 이하의 E score, 35% 이하의 동일성을 최소 기준으로 정하고 있습니다.

3) 독성 실험 평가



- ▶ 유전자변형생물체의 신규 발현산물에 대한 독성실험 평가가 권고되며, 독성실험을 수행하기 위하여 *E. coli* 등에서 생산된 목적하는 신규단백질 (독성실험을 위한 목적대체산물)에 대하여 유전자변형생물체 내에서 발현되는 단백질과의 생물학적 동등성을 확인하기 위하여 수행된 실험방법 (SDS-PAGE, Immuno-cross reactivity, N-terminal amino sequence, Carbohydrate moiety analysis, Enzyme specific activity 등) 및 데이터를 상세히 기술합니다.
- ▶ 가장 일반적인 독성실험인 단회투여독성실험의 경우에는 독성매개변수 (체중변화, 사료섭취량, 50% 치사량, 임상증상, 폐사율, 장기의 조직학적 검사, 혈액화학 검사, 혈구검사, 장기무게 변화, 요 및 배설물 조성, 간 효소활성도 등) 에 대한 데이터를 확인하여 독성 여부를 검토합니다. 독성매개변수 중 체중변화, 사료섭취량, 50% 치사량, 임상증상, 폐사율은 필수 검토 항목으로 정하고 있습니다.

유전자변형잔디 BBB의 독성실험 평가를 위하여 실제 발현산물에 대한 대체산물을 *E. coli*에서 발현하여 수행하였다. 유전자변형잔디 BBB에서 발현되는 CP4-EPSPS와의 단백질 동질성을 확인하기 위하여 western blot을 이용하여 발현단백질의 Mw을 비교 확인하였으며…….



[그림 9] western blot 실험결과

또한 N-terminal 아미노산 서열 분석 및 EPSPS 효소활성도 측정을 통하여 CP4-EPSPS 단백질에 대한 대체산물에 대한 상동성을 분석하였고, 결과는…….

유전자변형잔디 BBB에 대한 독성실험을 위하여 *E. coli*에서 생산한 CP4-EPSPS에 대한 단백질 동질성에 대한 실험 및 그 결과는 첨부#에서 제시합니다…….

마우스를 이용한 CP4-EPSPS 단백질에 대한 단회투여독성 결과, 본 단백질에 기인한 독성증상은 관찰되지 않았으며, 실험 복용량 중 구강독성효과를 나타나지 않는 가장 높은 수치(NOEL) 값은 572mg/kg 이었다.

독성매개변수에 의한 확인은 다음과 같으며 …….

독성학적 실험에 대한 실험 및 그 결과는 첨부#에서 제시합니다.

다. 유전자변형생물체의 알레르기성 평가

1) 유전자산물 또는 이의 대사산물이 일으킬 수 있는 잠재적 알레르기성 평가



- ▶ 피부, 인점막 접촉 및 비강 등을 통한 알레르기 유발 가능성에 대한 평가자료 및 유전자산물 또는 관련 대사산물의 알레르기 유발성에 대해 과학적 근거자료를 바탕으로 기술합니다.
- ▶ 작업자 및 이용자가 접촉, 흡입 등의 방법으로 유전자변형생물체 노출에 따른 알레르기 유발 빈도를 기존 종과의 비교학적 정보를 통하여 기술합니다.

2) 유전자산물 및 이의 대사산물 등과 이미 알려진 알레르겐과의 구조적 상동성 분석



- ▶ 새로이 발현된 산물과 기존에 알려진 모든 알레르겐과의 아미노산 서열에 대한 상동성 분석 자료를 바탕으로 발현산물의 알레르기성에 대하여 기술합니다.
- ▶ 아미노산 서열에 대한 상동성 분석은 PIR, SWISS-PROT, EMBL, Protein DATA Bank 등을 이용하며, 알레르기성 유발이 낮을 것으로 판단하는 기준은 1×10^{-5} 이하의 E score, 35% 이하의 동일성을 최소 기준으로 정하고 있습니다. 또한 8개의 연속 아미노산 서열에 대한 일치 여부를 검토하여 알레르기 유발 가능성을 평가 합니다.

CP4 EPSPS 아미노산 서열과 이미 알려진 알레르겐 아미노산 서열과의 상동성 분석은 SwissProt(March 2004), trEMBL(March 2004), GeneSeq-Prot(August 2006), PIR (May 2004), PDB(April 2003), DAD(June 2003), GenePept (August 2004)의 데이터베이스에서 EPSPS 코딩 단백질을 BLASTP2.2.2 알고리즘과 매치한 결과, EPSPS 단백질에서 35% 이하의 상동성(80 이상의 아미노산 서열)이 나타나 아미노산 서열상의 상동성은 없었고, 연속한 8개의 아미노산 서열(allergen epitope)에 일치하지 않았다.

epsps 유전자가 코딩하는 발현산물의 아미노산 서열과 알려진 알레르겐과의 아미노산 상동성 분석은 첨부#(알레르겐과의 아미노산 상동성분석)에서 제시하였습니다.

발현산물인 CP4 EPSPS에 대한 아미노산 서열은 …….

Deduced amino acid sequence of the CP4 EPSPS protein
includes the CTP2 transit peptide (amino acids 1-76 are the transit peptide).

```

1  MAQVSRICNG VQNPSLISNL SKSSQRKSPL SVSLKTQQHP RAYPISSSWG
51  LKKSGMTLIG SELRPLKVMS SVSTACMLHG ASSRPATARK SSGLSGTVRI
101 PGDKSISHRS FMFGGLASGE TRITGLLEGE DVINTGKAMQ AMGARIRKEG
151 DTWIIDGVGN GLLAPEAPL DFGNAATGCR LTMGLVGVYD FDSFIGDAS
201 LTKRPMGRVL NPLREMGVQV KSEDGDRLPV TLRGPKTPTP IYRVPMASA
251 QVKSAVLLAG LNTPGITTVI EPIMTRDHT E KMLQGFGANL TVETDADGVR
301 TIRLEGRGKL TGQVIDVPGD PSSTAFFLVA ALLVPGSDVT ILNVLMNPTR
351 TGLILTLQEM GADIEVINPR LAGGEDVADL RVRSSILKGV TVPEDRAPSM
401 IDEYPILAVA AAFAEGATVM NGLLELRVKE SDRLSAVANG LKLVGVCDE
451 GETSLVVRGR PDGKGLGNAS GAAVATHLDH RIAMSFLVMG LVSENPVTVD
501 DAIMIATSF EFMDLMAGLG AKIELSDTKA A
  
```

[그림 10] EPSPS 아미노산 서열정보

nptII 유전자가 코딩하는 발현산물의 아미노산 서열과 알려진 알레르겐과의 서열 상동성은 …….

3) 필요시 다음의 알레르기성 실험자료



- ▶ 숙주 또는 공여체가 알레르기성이 존재하는 경우, 또는 발현산물이 알려진 알레르겐과의 구조 유사성이 확인되었을 경우에는 구조유사성이 있는 알레르겐 환자 혈청의 IgE 항체와의 교차반응 또는 주요 알레르겐 환자 혈청의 IgE 항체와의 교차반응 실험자료를 기술합니다.
- ▶ 식용 이외의 유전자변형생물체가 위장관계에 노출될 가능성은 거의 없으므로 인공 위액과 장액에 의한 발현단백질의 분해여부 평가는 고려하지 않을 수도 있습니다.

9. 해외 인가 및 이용 현황



- ▶ 용도에 따른 허가사용 현황에 대하여 검토하고 제외국의 승인 내역 자료를 확인합니다.
- ▶ 국가명, 기관명, 위해성평가기관, 인가번호, 인가자료, 이용 상황 등을 필수로 제출하여야 합니다.

[참고 4] 유전자변형 모기 환경방출 위해성평가 결과(사례 보고서)

이집트 숲모기(*Aedes aegypti*)는 뎅기 바이러스, 치쿤쿠니아 바이러스 및 지카 바이러스를 전파하여 질병을 일으킨다. 이러한 감염병은 심각한 보건문제를 일으키므로 모기를 통제하는 방법이 받아들여지고 있다. 본 보고서는 네덜란드령 카리브군도에 있는 사바(Saba)섬의 환경위해성평가 사례이다.

감염병과 싸우기 위해 영국의 회사가 지역의 모기개체군을 감소시키는 방식의 유전자 변형모기를 만들어냈다. 이 유전자변형은 모기의 번데기가 사멸하도록 유도한다. 평가결과, 이러한 모기가 사바섬에 잠재적으로 방출되면 인체 보건 및 환경에 무시할만한(negligible) 위해성을 보이는 것으로 검토되었다. 이러한 기술적 평가는 사바섬 집행위원회에 위임을 받아 RIVM의 GMO 사무국에서 수행하였다.

특히 이 평가는 만일 지역의 모기개체군이 제거되었을 경우, 중요한 식량 원천도 사라지는지 여부를 측정하기 위해 먹이사슬에 대한 영향도 조사하였다. 또한 사람이 우발적인 사고로 GM모기를 삼켰을 경우, 인체에 위해하지 않은지도 고려하였다. 또 다른 평가요소는 유전자재조합 모기가 질병을 확산시키는 능력의 효율성을 증가시킬 가능성에 대한 여부였다.

다만 GM모기의 적용효능평가, GM모기 이용이 바람직한 것(desirability)인지, GM모기를 이용할 경우 미치는 사회경제적 효과는 본 기술적 평가의 사항이 아니다.

□ 개요서(Executive summary)

기술적 평가의 요청

네덜란드 국립환경보건연구원(RIVM) GMO 사무국은 (주)Oxitec이 제출한 사바 섬에서의 이집트 숲모기 방출을 위한 환경위해성평가(ERA)의 기술적 심사를 제공하여야 하는 사바 위원회의 요청을 받았다. 이 평가는 사바 섬 내 GM 이집트 숲모기 OX513A 종의 잠재적 방출의 결과적 중요성에 초점을 맞추었다. 이 방출의 목적은 지역내 이집트 숲모기의 개체군을 줄이는 것으로, 이는 뎅기 바이러스, 치쿤쿠니아 바이러스 및 지카 바이러스와 같은 인체감염병의 매개체로 알려져 있다. 이집트 숲모기는 여러 지역에서 침입성 종으로 간주되고 있으며, 사바 섬 내에서 매개체 방제를 받고 있다.

이 기술적 평가는 사바 섬내 OX513A의 방출로 인한 미래의 인체보건 및 환경에의 잠재적 악영향을 숙고하고 있다. 잠재적 악영향은 기존 종과의 비교 및 지역의 매개체 방제수단의 맥락에서 고려되었다. 다만 GM모기의 적용효능평가, GM모기 이용이 바람직한 것 (desirability)인지, GM모기를 이용할 경우 미치는 사회경제적 효과는 본 기술적 평가의 사항이 아니다.

제출된 방출계획

제출된 활동은 사바 섬내 서식지에서 수컷(물지 않음) OX513A 이집트 숲모기의 반복적인 방출을 포함하고 있다. 이 종은 케이맨 군도와 파나마, 브라질에서 이미 방출된 전력이 있다. OX513A 모기는 역압적 치사유전시스템이 도입되어, 성체로 성장하기 전에 자손을 사멸시키도록 유전자변형되어 있다. 이 OX513A 수컷모기가 환경에서 야생종 암모기와 교미하면, 자손의 생산률이 95%까지 감소한다. 이 특성은 항생제 tetracycline이 존재하지 않는 환경에서 장구벌레 단계의 폐사를 일으킨다. OX513A는 해당 조의 방출 후 모니터링과 가시성 확인을 위해 형광마커 유전자인 DsRed2를 포함하고 있다. 지역의 이집트 숲모기 개체군의 모니터링은 제출된 계획의 일부이다. 케이맨군도와 파나마, 브라질에서 OX513A 모기 초기방출 사례는 이집트 숲모기 개체군의 명확한 감소를 보여주고 있다.

환경위해성평가

환경위해성평가는 유럽연합법 2001/18/EC의 부속서 II에 따라 이루어졌다. EFSA의 GM 곤충의 환경위해성평가에 대한 가이드문서는 인체보건 및 환경에의 잠재적 위해성을 평가하는데 이용되었다. 관련이 있는 경우, 다른 관련 GM 곤충이 미치는 영향에 대한 가이드문서들도 참고 되었다.

이 EFSA 가이드는 GM곤충의 ERA에 있어 고려되어야 하는 7가지 '관심 영역(areas of concern)'⁴⁾을 설명하고 있다. 이 영역들은 기존 종과 비교하여 사바 섬에서의 OX513A 방출이 인체 보건 및 환경에의 악영향을 이끌어내는지 여부를 판단하는데 고려되었다. 효과는 현재 진행 중인 매개체 방제전략 프로그램의 맥락에서 고려되었다.

4) 1. 수직적 유전자 전이를 포함한 GM 곤충의 지속성 및 침입성; 2. 수평적 유전자 전이; 3. 병원성, 감염성 및 질병; 4. GM 곤충과 목적 생물체와의 상호작용; 5. GM 곤충과 비목적 생물체와의 상호작용; 6. GM 곤충의 관리에 이용된 특정 기술의 환경적 영향; 7. 인체 및 동물 보건에 GM 곤충이 미치는 영향

표현형과 행동특성과 함께 OX513A의 분자적 특성은 유전자재조합으로 인한, 인체 보건 및 환경에의 잠재적 악영향을 이끌어낼 수 있는 의도적/비의도적 변화여부가 고려되었다. 비교학적 안전성평가의 결과, tTAV 및 DsRed2의 도입된 특성 발현 외의 차이는 나타나지 않았다. 또한 ERA는 OX513A의 기존 종의 효능과 비교하여 새로운 특성의 잠재적 악영향에 초점을 맞추어 진행되었다.

모든 관심영역에서, 인체보건 및 환경에 대한 악영향이 일어나지 않을 것으로 보이는 결과를 도출하는 충분한 정보가 확인되었다. GM 이집트 숲모기의 사육, 방출 이전 동안 OX513A의 비의도적인 환경방출을 예방하기 위한 적절한 수단과 통제가 갖추어졌다. 게다가 OX513A가 환경에 방출된다 하더라도 위해성평가에서 확인된 변수들이 일관된 결과를 보일 것이며, 기대하지 않은 결과 또는 비의도적인 영향이 관찰되지 않을 것이다.

GMO 사무국은 사바 섬에 OX513A 유전자변형모기의 잠재적 방출결과로 인한 인체 보건 및 환경에의 악영향이, Oxitec의 문서에 기술된 조건과 기존의 표준 매개체 통제 조건에서, 기존 종의 영향과 비교했을 때 무시할만한 수준인 것으로 결론 내렸다. 이는 브라질⁵⁾과 미국 FDA⁶⁾와 같은 최근의 환경위해성평가와 동일한 계통주(line)이다.

GMO 사무국은 WHO의 자문에 따라, OX513A의 개체군이 월평균으로 검출수준 미만으로 떨어질 때까지 독립된 기구에 의한 방출 후 모니터링을 권고한다.

5) Technical opinion no. 3964/2014 (2014). Brasilia: National Technical Biosafety Commission

Paul paes de Andrade et al. (2016). Use of transgenic Aedes aegypti in Brazil: risk perception and assessment.

6) FDA (2016). Final Environmental Assessment for Genetically Engineered Mosquito.

서론

사바 섬의 요청

네덜란드 국립환경보건연구원(RIVM)의 GMO 사무국은 사바 섬 의회로부터 유한회사 (Ltd) Oxitec이 제출한 유전자변형(GM) 수컷 OX513A *Aedes aegypti* 모기에 대한 사바 섬에서의 방출계획 문서를 평가하도록 요청받았다. *Aedes aegypti*는 땡기 바이러스, 치쿤쿠냐 바이러스 및 지카 바이러스와 같은 인간 질병의 매개체로 알려져 있다.

이 기술 평가 요청은 2016년 2월 29일 GMO 사무국에 접수되었다. 2016년 4월 28일 GMO 사무국은 원시 데이터 및 계획된 방출에 대한 환경위해성평가를 포함하여 사바 섬에서의 잠재적 방출과 관련하여 Oxitec으로부터 모든 문서를 요청했다. 이러한 Oxitec의 문서는 9월 28일(2016)에 접수되었다. 추가 정보는 GMO 사무국이 10월 24일(2016), 1월 19일(2017)에 요청했으며 이 정보는 11월 30일(2016), 1월 11일(2017) 및 3월 13일(2017)에 각각 접수되었다. 모든 문서 및 추가 정보는 RIVM, Wageningen 대학 & 연구소 및 사바의 전문가가 평가했다. 그 후 기술 평가 결과는 다시 RIVM, Wageningen 대학 & 연구소의 다른 전문가들과 벨기에 및 영국의 국제 전문가들에 의해 검토되었다.

환경위해성평가(ERA)의 범위

이 기술 평가는 OX513A *Aedes aegypti*의 방출로 인한 인체 보건과 사바 섬의 환경에 대한 잠재적인 위해성에 대한 평가와 관련이 있다. 그러므로 주된 질문은 사바의 식물군과 동물 군에 대한 잠재적 악영향과 사바 주민의 건강에 초점을 맞추어 비변형 야생종인 *Aedes aegypti*이 미치는 영향과 상호 비교된다. 이러한 효과는 사바 섬에서 *Aedes aegypti*의 지역 매개체 방제 프로그램의 맥락에서 고려된다. 이 환경위해성평가에서 사바 섬의 광범위한 환경에 대한 방출의 잠재적 영향도 고려된다.

이 평가는 야생형 *Aedes aegypti*와 그들이 전염시키는 질병의 지역 개체군을 억압하는 사바 섬에서의 OX513A의 효능을 고려하지 않았으며, 이 평가는 이 잠재적인 방출의 사회경제적 측면을 고려하지 않았다.

사바 섬에 제출된 문서 및 GMO 사무국 평가

Oxitec의 문서는 생물다양성협약에 대한 생물안전성에 관한 카르타헤나 의정서 Annex III(CBD, 2000)⁷을 따른다. GMO 사무국(RIVM)의 평가는 Oxitec의 문서에 포함 된 데이터 및 정보를 기반으로 하지만, 다른 국가의 OX513A *Aedes aegypti*와 유사한 자료의 과학 문헌 및 발표된 위해성평가와 같은 기타 관련 데이터도 고려한다. 이 문서에 반영된 대로 GMO 사무국의 평가는 Oxitec의 문서에 제공된 구조를 따르며 GMO 사무국의 결론은 굵은 글자로 표시된다.

Oxitec의 문서를 평가하기 위해 유럽식품안전청(European Food Safety Authority, EFSA, 2013)²의 GM 곤충에 대한 환경위해성평가에 관한 지침서가 사용되었다. 카르타헤나 의정서(유전자변형 모기에 대한 Part II)(CBD, 2000)⁷, 유전자변형모기의 시험을 위한 WHO 지침체계와 같은 GM 곤충의 ERA에 관한 기타 가능한 지침(WHO, 2014)⁸ 또한 관련성이 있는 경우 고려되었다.

GM 곤충의 ERA에 대한 EFSA 지침에 설명된 '관심 영역'이 ERA를 구성하는 데 사용되었다. 이 '관심 영역'은 대부분의 국가에서 GMO의 ERA에서 일반적으로 고려되는 요소들을 다루며 사례별로 유전자변형의 결과로서 인체 건강 및 환경에 대한 잠재적인 악영향을 평가한다.

GM 곤충에 대한 관심 분야는 다음과 같다:

- 수직적 유전자 전이를 포함한 GM 곤충의 지속성 및 침입성
- 수평적 유전자 전이
- 병원체, 감염 및 질병
- GM 곤충과 표적 생물체의 상호작용
- GM 곤충과 비표적 미생물의 상호작용
- GM 곤충 관리에 사용된 특정 기술의 환경적 영향
- 인간과 동물의 보전에 미치는 GM 곤충의 영향

Oxitec 문서의 평가 및 평가의 검토는 네덜란드 RIVM, Wageningen 대학&연구소의 전문가, 벨기에 WIV-ISP의 생물안전 및 생명공학유닛(Biosafety and Biotechnology Unit, SBB), 영국의 농림축산식품부(Department for Environment, Food and Rural Affairs, DEFRA)와 사바 섬(Saba)의 사바 보전재단에서 수행하였다(부록 1).

계획된 방출

계획된 방출은 수컷(사람을 물지 않음) *Aedes aegypti* 모기(OX513A 계통)의 반복된 방출을 포함한다. 이 계통은 12년 이상 연구되어 왔다. 수컷 OX513A 모기는 오직 동종의 야생형 암컷과만 짝을 지어 *Aedes aegypti*의 현지 개체군을 감소시킨다. 모기는 자손이 성체가 되기 전에 사멸하도록 유전적으로 변형된다(제4기 유생령(larval instar) 또는 번데기). 이것은 *Aedes aegypti*에 광범위하게 사용되는 tetracycline 전사 활성화자(tTAV)를 기반으로 하는 억압가능한 치사성 유전 시스템의 도입으로 야기되는 것이며, tetracycline이 없는 경우(환경에서) OX513A 수컷과 야생형 암컷의 자손의 치사를 초래한다. GM 수컷 *Aedes aegypti* 모기가 현장에서 야생 암컷과 짝짓기 할 때, 자손은 tetracycline이 없는 경우 95% 이상의 치사성을 나타낸다. 또한 GM *Aedes aegypti*는 형광마커 유전자 DsRed2를 포함하고 있어 이를 확인하고 모니터링할 수 있다.

제안된 반복적 방출은 사바 섬의 모든 거주 지역에서 일어날 것으로 예상되며, *Aedes aegypti*의 지역 개체군을 매우 낮게 억제하고 그 이후 1년 동안 계속해서 제거하는 데 따른 잠재적인 제거를 목표로 한다. 지속적인 제거를 입증하기 위해 *Aedes aegypti*의 현지 개체군을 모니터링하는 것은 출시가 이루어진 후 1년이 될 때까지 실시될 것이다. 이전에 수행된 OX513A 모기의 방출은 프로그램 동안에 지역 *Aedes aegypti* 모기 개체군의 명확한 감소를 나타내었다. 다른 모니터링은 예정되어 있지 않다.

환경위해성평가의 특정 측면 (Figure 1 참조)

- (1) 수컷 (사람을 물지 않음) OX513A *Aedes aegypti*만 환경에 방출될 것이다. 수컷 번데기는 분류(sorting)되어 선택된다. 그러나 번데기를 분류하면 번데기의 0.2%가 암컷일 수 있다. 따라서 ERA에서는 OX513A 개체군의 0.2%가 암컷이라고 간주한다.
- (2) 형질 침투도(Trait penetrance, 유전자 또는 유전적 형질이 발현될 확률)은 95%이다. 야생형 *Aedes aegypti*와 OX513A의 교배 후 자손의 대다수(95%)는 치사 특성을 나타낼 것이며 죽을 것이다. 자손의 약 5%(수컷과 암컷)는 tetracycline이 없는 경우에도 생존할 것이다. 이 측면은 ERA에서 고려된다.

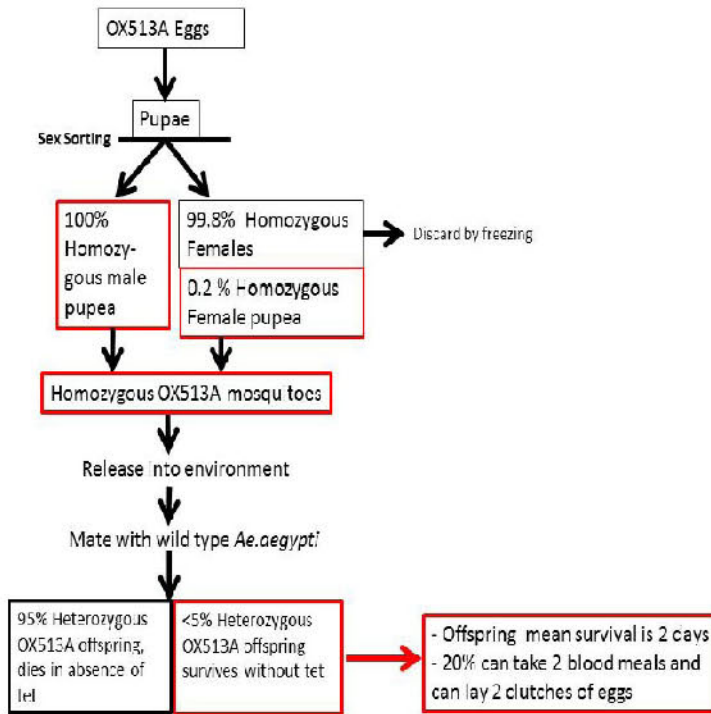


Figure 1. 수컷과 암컷 OX513A *Aedes aegypti*의 선별, 환경방출 및 생존 과정 도식화 (GMO 사무국 초안 작성).

Oxitec 문서의 기술적 평가

이 기술 평가는 Oxitec 문서의 관련 부분을 요약하고 이 문서에서 사용된 동일한 번호를 따른다. GMO 사무국의 결론은 상자 형태로 표시된다. 자세한 내용, 보고서 및 참고 자료는 아래 링크를 통해 접근할 수 있는 Oxitec에서 제공하는 전체 문서 및 추가 정보를 참조하라(원문 링크 참조).

Part A. OX513A의 특성화

분자 특성화

1. 수용생물체 정보 : 이집트 숲모기(*Aedes aegypti*)

수용생물체는 Culicidae 과, Aedes 속 : Diptera 속인 *Aedes (Stegomyia) aegypti* (L.) 모기이다. *Aedes aegypti*는 아프리카와 남아메리카의 일부 지역 내 15oN과 15oS 사이에 발견된 전형적인 열대성 모기의 종으로, 40oN와 40oS 위도로 넓어지는 국제적인 서식지를 가진 것으로 알려지지 않는 않았다. 여러 지역에서 침입종으로 간주된다.

아프리카에서 유래된 *Aedes aegypti*는 현재 모든 열대 및 아열대 서식지에서 전 세계적으로 분포하고 있다.

*Aedes aegypti*는 인간의 거주지와 밀접하게 관련되어 있다. 번식은 비온 뒤의 물웅덩이와 같은 일시적인 저장고는 물론 화분 받침대, 물탱크, 타이어, 음료수캔, 배수구 및 지붕 홈통과 같은 폐기 플라스틱 및 금속 용기와 같은 인공적인 물이 담긴 용기와 결부되어 있다. 일단 우화(eclosion)하면, 성체 *Aedes aegypti* 모기는 암컷이 알 발달에 필요한 혈액 섭취를 위해 쉽게 접근 할 수 있는 가정집과 그 주변에 산다. 모기 알은 물을 저장할 수 있는 자연 및 인공적 용기의 축축한 벽에 암컷이 개별적으로 낳는다. 알은 이러한 모기의 장기 생존 구조로서 평균 6개월까지 생존한다. 유충 및 번데기는 물 저장 용기, 화분 및 타이어, 캔 및 병과 같은 폐기물에 통상적으로 사용되는 비교적 깨끗한 물을 선호한다. 열대 국가에서 폐기물 용기는 1년 내내 모기가 발생하는 근원이다. 유생 단계의 지속 기간은 약 7~9일이며 번데기는 2~3일이지만 발달 속도는 온도에 따라 다르다. 성체가 선호하는 장소는 주택/아파트 내의 비바람이 들이지 않는 어두운 공간이 있는 국내 도시 환경이다.

*Aedes aegypti*는 하루 중에 두 번 사람을 가장 많이 무는 주기가 있는데, 하나는 오전나절(mid-morning, 9~10시 전후)이며 다른 하나는 오후중반(mid-afternoon, 3~4시 전후)이다. *Aedes aegypti*는 인간과 조류를 문다. 자연 상태의 모기(실험실 외부)의 평균 성체 수명은 8~15일로 추정된다.

성체의 자발적인 비행은 번식지의 이용가능성과 혈액을 섭취하려는 숙주에 따라 약 200m 내로 제한된다. 그러나 좋은 보트, 기차 및 장거리 운송방식의 수동적 수송으로 인해 분산될 수 있다. 국제위생규칙(International Sanitary Regulations)에 따르면 항구와 공항 주변 400m 내에서 *Aedes aegypti*가 없어야 한다.

기후와 번식지의 이용가능성은 도시 환경에서 *Aedes aegypti*의 개체군을 규제하는 두 가지 주요 요인이다.

*Aedes aegypti*의 애벌레 발달에 대한 온도의 영향은 잘 연구되었으며, 유생 발달은 온도의 함수로서 14~30°C의 생태 온도 범위를 갖는다. 온도는 또한 성체의 크기, 전체량 및 난소수에 영향을 미치며, 모두 온도가 상승함에 따라 떨어진다. 다른 고도의 기온은 분포에 영향을 미칠 것으로 생각되며, 1800~2400m의 고도는 종에 제한적일 것이며 온대 위도에서는 더 낮은 수준일 것으로 예상된다.

2. 공여체 및 도입유전요소의 일반적인 설명

OX513A에 삽입된 재조합 DNA 구조의 유전요소와 DNA 서열의 기원은 문서의 Table 1에 자세히 나와 있다. DNA 염기서열이 유래된 각 요소와 생물체에 대한 자세한 정보는 다음과 같다.

2.1 *Trichoplusia ni*(양배추 자벌레나방)

*Aedes aegypti*에 목적 유전자를 도입하기 위한 운반체로 사용되는 전이요소 piggyBac을 양배추 자벌레나방(*Trichoplusia ni*)의 세포 배양물로부터 분리하였다. 양배추 자벌레나방은 십자화과 식물의 잎을 먹는 해충이지만 알려진 독성이나 병원성은 없다.

piggyBac transposon은 Diptera, Lepidoptera, Coleoptera 및 Hymenoptera의 다양한 분류군에서 곤충을 형질 환시키는 데 잘 연구되고 사용된 비-자율적인 transposon이다.

2.2 *Drosophila melanogaster*(초파리)

도입된 DNA의 여러 조절요소는 *Drosophila melanogaster*에서 파생되었다. *D. melanogaster*는 독성 또는 알레르기성 특징이 알려져 있지 않다. 짧은 세대 시간으로 인해 그들은 발달 생물학 및 기타 학문을 위한 훌륭한 모델 생물체가 되었고, 100년 이상 실험실에서 잘 연구된 종이다.

2.3 *Discosoma* spp.

DsRed 마커 유전자는 *Discosoma* spp.에서 유래하였다. *Discosoma* 종은 일반명 버섯산호로도 알려져 있으며 많은 해양환경에서 발견된다. *Discosoma* spp.에는 녹색형광단백질(GFP) 계열의 단백질과 유사한 특정 형광단백질이 있다. DsRed의 돌연변이는 마커로서의 사용을 지원하는 용도로 발현 및 용해도가 개선된 DsRed2의 생성을 가능하게 하였다. 형광 DsRed2는 바이러스, 곰팡이 종 및 포유류에 이르기까지 다양한 생물체의 마커로 광범위하게 사용되어 왔다.

2.4 *Escherichia coli*(대장균)⁷⁾

tTAV 유전자(치사성 암호화) 및 tTAV 단백질의 비-암호화 결합 부위는 대장균에서 유래한다. 이것은 광범위한 분야에 걸쳐 모델 생물체 역할을 하는 집중적으로 연구된 세균이다. tetracycline 억제가능 시스템의 생성에 사용된 대장균 계통은 병원성이 없는 모든 실험실 계통이다.

2.5 단순포진(Herpes simplex) 바이러스 type 1*

t16V 유전자의 전사 활성제로 사용되는 VP16은 단순포진 바이러스 type 1에서 유래한다. 단순포진 바이러스 type 1(HSV-1)은 보통 입술, 입, 얼굴의 감염과 관련된 인간 바이러스이다. 이것은 가장 흔한 단순포진 바이러스로 많은 사람들이 어린 시절에 발달하는 편이다. VP16은 HSV의 비리온 인단백질(virion phosphoprotein)이며 바이러스성 급초기(immediate-early, IE) 유전자의 전사 활성인자이며 산성 전사 도메인을 필요로 한다. 이것이 없으면 VP16은 전염성주기를 지탱할 수 있는 능력이 손상된다.

2.6 작은 합성 연결 염색체

합성 연결 서열은 구조 내 유전요소를 연결하는 데 사용된다. 이것들은 어떤 기능도 없다.

7) OX513A VP16는 *E. coli* 유래 도메인의 결합단백질로 이용되었으며, tTAV로 알려져 있다. tet-억제 제어시스템으로 널리 이용되는 tTA 조건부 치사성 tetracycline-억제성 전사촉진요인으로 개발되기 위해 HSV-1 유래 활성 부위가 *E. coli* 유래 제어요소와 연결되었다.

3. OX513A의 형질전환에 이용된 플라스미드

사용된 플라스미드는 piggyBac 전이요소를 함유한 pOX513이다. 이 전이요소는 반전말단반복부(inverted terminal repeats, ITRs)가 손상되지 않은 상태에서 요소 내의 ORF(open reading frame)가 있는 DNA에 통합될 수 있다. 형질전환을 위해 사용된 구조물에서, piggyBac 요소의 transposase 유전자는 그 유전자부의 결실에 의해 비가역적으로 파괴되었다. 형질전환은 piggyBac transposase 활성을 제공하는 보조-플라스미드를 사용하여 이루어지지만 그 자체로는 다른 DNA로 전이할 수 없다. 야생형 piggyBac transposase의 측면에 있는 ITR 중 하나가 보조-플라스미드에서 제거되어 보조-플라스미드 자체가 통합 될 수 없게 되었다.

OX513A를 얻기 위한 *Aedes aegypti*의 형질전환은 Rockefeller 배경 계통 각각의 알에 미세주입법(microinjection)을 통해 달성되었다. 미세주입법은 piggyBac transposase의 근원으로 piggyBac '보조-플라스미드'와 함께 주입된 매개체 플라스미드, pOX513(Figure 2)로 구성된다. 실험실에서 사육된 *Aedes aegypti*의 안정적인 형질전환 계통주가 확인되었을 때, 동형접합체(homozygous)로 확인되었다. OX513A 계통은 2002년 이후 지속적으로 유지되어 왔으며 115세대를 넘은 상태이다.

형질전환 후, OX513A 계통에서 삽입된 DNA를 서열 분석하여 플라스미드 pOX513A에 존재하는 서열과 동일함이 입증되었다.

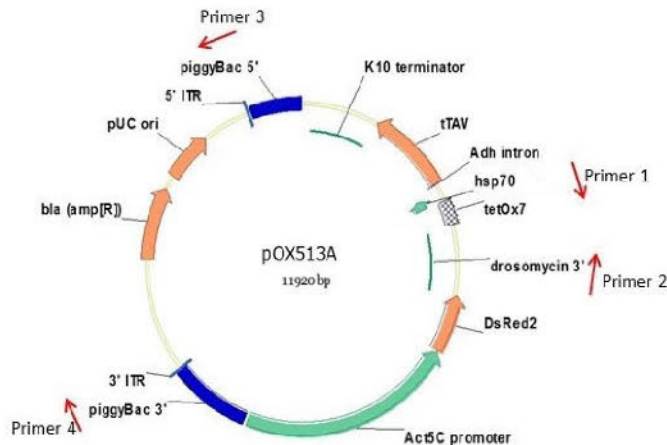


Figure 2. OX513A의 형질전환에 사용된 플라스미드 지도. 프라이머 위치는 part A의 section 4.1에 기술된 바와 같이 증폭된 플라스미드의 일반적인 영역을 나타내는 도식적 표현이다.

4. rDNA 도입 및 재조합 특성화

4.1 형질전환 계통주 내 플라스미드 근간구조(backbone) 부재 진단

매개체 근간구조(*bla* 유전자와 pUC 복제기점 포함)의 부재를 확인하기 위해 프라이머 3과 4를 사용하여 완전한 매개체 근간구조(Figure 2)이 포함된 4045bp의 단편을 증폭시켰다. 시그널은 OX513A의 유전체 DNA에서 발견되지 않았고, 양성 신호는 계통을 구현하는데 사용된 pOX513A 플라스미드에서 발견되었다. OX513A 계통의 유전체 DNA가 PCR을 하기에 충분한 품질인지를 확인하기 위해 적절한 대조군을 사용하였다. 또한, 도입부 인접서열의 분석은 매개체 근간구조의 부재를 나타내었다.

OX513A 계통에서의 *bla* 유전자 부재는 *bla* 유전자를 탐침으로 사용하여 Southern analysis에 의해 입증되었다(추가 정보, 2017년 3월 13일). OX513A 계통에서는 시그널이 검출되지 않았고, pOX513A 플라스미드 DNA에서 *bla* 유전자가 검출되었고, 매개체 근간구조를 함유하는 것으로 알려진 *Aedes aegypti* 계통에서 얻어진 DNA가 검출되었다. tTAV 유전자는 야생형 시료를 제외한 모든 시료에서 검출되어 분석에 사용된 DNA의 존재 및 완전성을 입증하였다. 이러한 결과는 OX513A에서 매개체 근간구조의 부재를 보여준다.

4.2 도입유전자 복제수 및 안정성

OX513A 계통에 존재하는 삽입물에서 한 번 절단한 세 가지 제한효소(AgeI, BglII 및 SalI)를 사용하여 OX513A의 유전체 DNA를 절단시켰다. AC5/DsRed와 tetR을 탐침으로 사용하여 Southern analysis를 수행하면 하나의 단일 삽입물이 존재함이 입증되었다. 더욱이, 비형광 자손에 대한 형광 자손의 수의 비율분석은 단일 삽입에 대해 예상된 멘델 비율을 확인했다.

OX513A는 유전적 또는 표현형의 불안정성에 대한 관찰 없이 2002년 이래로(115 세대 상당) 실험실에서 지속적으로 유지되어왔다.

4.3 도입유전자 위치 확인 및 유전자 인접영역의 염기서열

역(Inverse)-PCR이 OX513A의 삽입부위에 인접한 유전체 서열을 확인하는데 사용되었다. 삽입부위 양쪽에 307bp 및 315bp의 DNA 인접서열이 얻어졌다. *Aedes aegypti* 유전체는 알려진 유전자, EST 및 전사체와 관련하여 완전히 염기서열이 밝혀지고 조립 및 주석이 달렸다. Vectorbase 웹사이트(www.vectorbase.org)의 BLAST 도구를 사용하여 622bp의 결합된 인접서열을 *Aedes aegypti* 유전체 서열, 전사체 및 EST 데이터베이스와 비교하였다. Blastn 및 Blastx 기능 모두를 사용하여 누적된 아미노산 서열 (Blastx)에 대한 모든 6개의 판독 프레임에서 뉴클레오타이드 수준(Blastn) 및 번역된 서열 수준의 양방향에서 서열을 비교하였다. 인접서열은 *Aedes aegypti* 유전체 서열에서 이 contig와 명확한 일치율을 보여주는 단일 유전체 서열 contig (1.859)로 전장에 걸쳐 94.6%의 동일성을 나타내었다.

알려진 ORF와의 상동성은 확인되지 않았으므로 삽입에 의해 *Aedes aegypti*에서 어떤 유전자도 파괴된 것으로 보이지 않았다. 또한 결과는 가장 가까운 유전자/EST가 30.5kb 떨어져 있다는 것을 나타내므로 삽입의 영향을 받지 않았다.

4.4 도입된 특질의 특성

Aedes aegypti OX513A는 두 가지 특질의 도입을 제외하고 *Aedes aegypti*의 비변형 개체군과의 생활사 특성과 관련하여 생물학적으로 유사하다.

4.4.1 형광마커 DsRed2

형광마커단백질(DsRed2)은 현장에서 OX513A의 검출을 가능하게하고, OX513A 수컷의 방출로 인한 OX513A *Aedes aegypti* 및 그 유전자의 전파를 평가할 수 있게 한다. DsRed2는 Clontech Laboratories의 것으로 형광을 높이고 용해도를 높이기 위해 DsRed를 인위적으로 개발하여 감도를 높였다. OX513A에는 cloning linker sequence로부터 유래된 N-말단부에 3개의 추가 아미노산 (MAR)이 있다. DsRed2 단백질은 OX513A 모기의 발달 단계(유충 단계)에서 구성적으로 발현되며 진단장비로 볼 때 형광표현형을 발현한다(Figure 3).

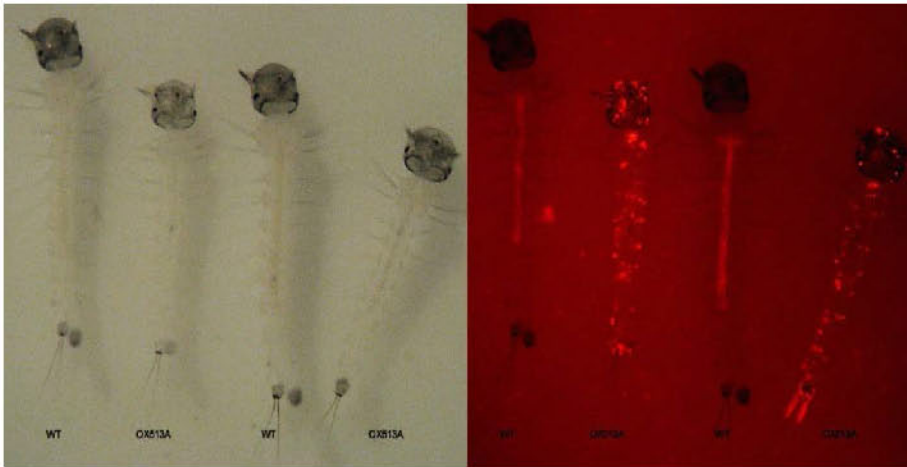


Figure 3. 진단형광현미경에서 OX513A *Aedes aegypti* 형광마커(DsRed2) 발현. 형광마커는 OX513A 개체를 쉽게 확인할 수 있도록 특징적인 점선으로 강하게 발현된다.

4.4.2 자기제한 특질 tTAV

곤충-최적화된 tetracycline 억제성 전사촉진자 단백질(tTAV)은 OX513A에 통합되어 교배 후 자손이 사망률을 증가시키는 표현형을 생성한다. tTAV는 tetracycline-조절 스위치(Figure 4)로 작동하여 조건적 세포 사멸을 일으켜 tetracycline이 공급될 때 실험실에서 모기의 대량 사육을 가능하게 한다.

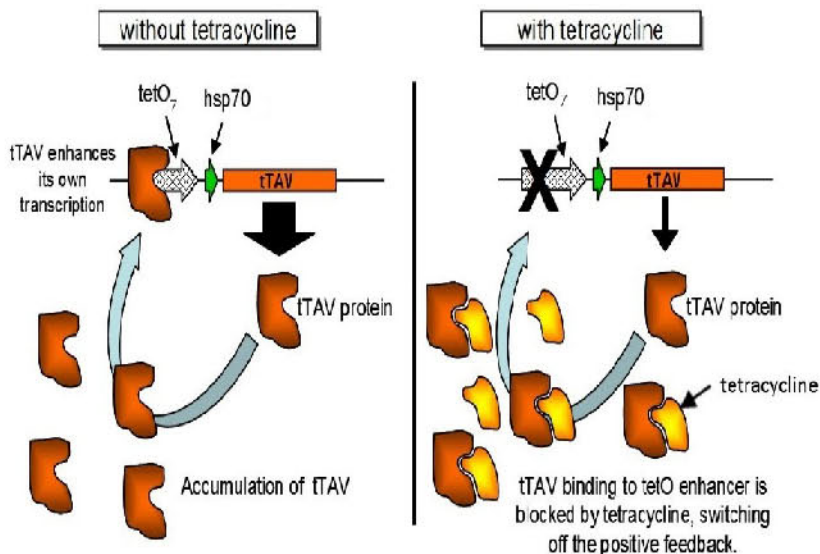


Figure 4. tTAV 시스템의 체계도. tetracycline이 없는 경우(왼쪽 패널), hsp70 프로모터(hsp70)의 효과에 의해 생성된 소량의 tTAV 단백질이 tetO 결합부위(tetO7)에 결합하여 tTAV의 발현을 증가시키는 양성 피드백 순환고리를 생성한다. tTAV 단백질이 충분한 양으로 축적되면 세포 기능에 영향을 주어 발달중인 유충에서 세포 사멸을 초래한다. tetracycline이 있는 경우(오른쪽 패널), tTAV는 tetO 부위에 결합하는 것이 방지되고, 따라서 hsp70 프로모터로부터의 발현을 증진시킬 수 없다. 이것은 tTAV의 축적을 방지한다.

OX513A의 자기제한 형질은 세포 사멸을 유도하는 tTAV 시스템(tTA의 변형)을 통해 작용한다. tTA의 높은 수준의 발현은 정상적인 전사를 억제할 수 있기 때문에 세포에 유해하다. tTAV는 *D. melanogaster* 및 다른 곤충에서 발현에 최적화된 tTA 변이체 서열이다. tTA 및 tTAV와 같은 그 변이체는 곰팡이, 설치류, 식물 및 포유동물의 배양물에서 사용되어왔다.

4.5 도입된 단백질의 잠재적 독성 및 알레르기성

OX513A에 의해 생산된 tTAV 또는 DsRed2 단백질이 유전자변형 암컷이 사람을 물거나 (사고로) 섭취한 후의 결과로 인체 및 동물에 독성 및 알레르기성을 나타내는 서열을 포함하는지 평가하기 위해, 생물정보학 분석이 수행되었다. 결과는 알려진 독소 및 알레르겐에 대한 tTAV 및 DsRed2 단백질 서열의 유의한 상동성을 나타내지 않았다. 또한, 삽입된 단백질 tTAV 및 DsRed2의 잠재적인 독성 및 알레르기성은 과학적 문헌 및 이들 단백질에 대한 다른 관련 연구의 검토에 기초하여 연구되었다. 또한, OX513A rDNA 구조물의 추가 요소에 대한 문헌 검색이 수행되었다. 이 연구들 중 어느 것도 OX513A에서 새로 발현된 단백질로 인한 인간 및 동물 건강에 중대한 위해성을 나타내지 않았다.

4.6 OX513A 내 도입된 분자적 특성과 관련한 결론

GMO 사무국은 *Aedes aegypti* OX513A의 분자 특성화가 인체 보건, 동물 보건 및 환경에 대한 어떠한 안전 문제도 나타내지 않는다고 결론 내렸다.

이는 다음의 관찰된 사항을 기반으로 한다:

- 도입된 플라스미드와 OX513A의 도입체 사이의 서열 유사성에 기초하여, OX513A의 도입서열은 pOX513A의 서열과 유사하다.
- PCR과 Southern analysis에 근거하여, OX513A는 형질전환에 사용된 플라스미드로부터의 매개체 근간구조 서열을 포함하지 않는다.
- 삽입은 인접 영역의 염기서열분석 및 *Aedes aegypti* 유전체 서열과의 후속 서열 비교에 의해 입증된 바와 같이 OX513A에서 내인성 유전자 기능을 방해하지 않는다.
- 도입체는 Southern analysis와 멘델유전법칙에 의해 입증된 그대로의 단일 복사본으로 구성된다.
- 도입된 서열은 여러 세대 동안 안정한 것으로 나타났다.
- 생물정보학 분석 및 문헌 검색에 의해 입증된 바와 같이, 독소 또는 알레르겐을 암호화한 서열은 삽입되지 않았다.

5. OX513A의 향상된 특성

5.1 생명표 변수(life table parameters)

OX513A 계통의 실험실에서 비변형 *Aedes aegypti* 비교측정자 계통과 비교하여 몇 가지 생명표 변수가 시험되었다: 유충 사망률, 발달률(i.e., 변태기화 시간), 성체 크기, 수명. 유충은 tetracycline 존재 하에서 사육되었다. OX513A의 유생 생존율은 비변형 계통의 생존율보다 5% 낮았으며 OX513A의 수명은 감소하였다.

OX513A는 또한 인도의 두 지역에서 발생한 야생 기원종(야생 포획)이 실험실 사육된 *Aedes aegypti*와 비교되었다. 그들은 실험실 조건 하에서 다음의 변수들에 대해 현저하게 다르지 않았다: 암컷 당 혈액섭취량; 암컷 당 산란 이벤트; 암컷 당 낳는 알의 수; 부화율; 출산을 및 성체 출현. 이 시험에서 OX513A의 첫 번째 발아에서부터 성체 발현까지의 발달 기간은 야생형보다 약간 더 길었다.

5.1.1 재생산능(reproductive capacity)

2개의 독립적인 실험실 연구에서 비변형 및 OX513A 계통 모두에 대해 생식능력에 관한 몇 가지 지표가 측정되었다. 이 연구는 OX513A와 야생형 *Aedes aegypti* 개체군 간에 생물학적 관련성이 적은 사소한 생명표 차이만 존재함을 나타낸다.

5.1.2 수정능(insemination capacity)

말레이시아 기원의 비변형 계통 및 OX513A의 수컷(i.e., 수컷이 그의 생애동안 씨를 부릴 수 있는 암컷 수)의 수정 능력을 평가하였다. 이 결과는 OX513A 수컷이 야생형 수컷에 비해 평생 동안 암컷의 절반 이상을 많이 씨를 부렸으며, 비변형 계통에 비해 OX513A이 약간의 적합도 불이익을 나타냈다.

5.1.3 교미 경쟁력(Mating competitiveness)

광범위 환경에서 교미 경쟁력을 갖춘 OX513A strain에 대한 광범위한 시험이 수행되었다. 여기에는 케이맨 군도와 브라질의 실험실 사육장 및 규제된 환경방출에 대한 연구가 포함된다. 결과 요약은 다음과 같다.

5.1.3.1 실험실에서의 교미 경쟁력

전세계의 야생형 계통에 대한 OX513A의 교미 경쟁력 연구는 다양한 국제 실험실에서 수행되었다. OX513A 계통은 유전적 배경에 관계없이 시험된 모든 *Aedes aegypti* 야생형 계통에 대해 성공적으로 수행되었다.

5.1.3.2 준-포장조건에서의 교미 경쟁력

쿠알라룸푸르(말레이시아)에 위치한 전용 현장실험장에서 교미 경쟁력을 입증 한 결과, OX513A 수컷의 약 50%가 짝을 찾았다. 이것은 경쟁계통과 완전히 동일하다.

5.1.3.3 규제된 환경방출에서의 교미 경쟁력

교미 경쟁력에 있어 규제된 환경방출로 인해 0.56(케이맨 군도)의 0.0004에서 0.059(브라질)로 추정되었으며, 이는 교미 경쟁력이 환경 요인, 방출시기 및 야생 *Aedes aegypti*의 이주와 같은 많은 요소에 따라 달라짐을 나타낸다.

5.2 비생물학적(abiotic) 요인에 대한 반응

5.2.1 OX513A의 온도반응

이형접합성(heterozygotes) OX513A의 온도 반응은 다음을 결정하기 위해 실험실에서 평가되었다.

- OX513A 이형접합체의 표현형 침투는 실험실 표준과 다른 온도에서 사육될 때 달라지는지 여부(침투성은 유전자 또는 유전적 특성이 발현될 확률이다)
- OX513A가 *Aedes aegypti*의 자연 범위를 벗어나는 온도에서 생존하도록 변형되었는지 여부

tetracycline이 없는 실험에서는 표현형의 침투가 온도와 무관하며 OX513A와 야생형 계통의 생존율은 *Aedes aegypti*의 자연 온도 범위를 벗어난 다른 온도에서도 비슷하다는 것을 보여 주었다.

5.2.2 tetracycline 및 유사물질의 용량반응

tetracycline이나 chlortetracycline, oxytetracycline, doxycycline의 다른 용량에 대한 OX513A 이형접합성 유충의 반응은 tetracycline 또는 그 유사체 (analogue)가 없는 경우에 사육 된 유충에 비해 이형접합성 OX513A의 더 큰 생존을 허용하는 최저 농도를 확인하기 위해 평가되었다.

상기 실험은 3 ng/mL tetracycline, 1 ng/mL chlortetracycline, 10 ng/mL oxytetracycline 및 0.1 ng/mL doxycycline 이하의 농도에서 OX513A 유충의 생존을 증가시키지 않는다는 것을 나타내며, 즉 기능적 성체의 비율을 증가시키지 않음을 보여준다. 이 수준은 환경의 수역에서 발견되는 각 유사체의 평균 농도보다 높다.

5.2.3 화학적 살충제에 대한 민감도

OX513A와 그 비변형 야생형 계통은 일반적으로 사용되는 4가지 살충제(temephos, permethrin, deltamethrin 및 malathion)에 똑같이 영향을 받고 bendiocarb에 비슷한 유의한 생존력을 보였다. pyrethroid와 DDT 저항성과 관련된 두 가지 kdr 돌연변이는 OX513A 계통에서는 발견되지 않았다.

5.2.4 살충제에 대한 OX513A의 행동반응

OX513A 수컷 모기의 행동 반응은 pyrethroid에 대한 상당한 접촉 자극성 및 DDT에 대한 상당한 공간적 반발성을 포함하여 야생형 계통에 의해 나타나는 것과 유사했다.

5.2.5 tetracycline이 투여된 혈액 연구

암컷 *Aedes aegypti*의 반접합성(hemizygous) 자손에서 OX513A 표현형 침투가 혈액 내 tetracycline의 존재에 의해 영향을 받지 않는다는 것이 증명되었다. 이것은 예를 들어 항생제 치료의 결과로서 인간 또는 동물 혈액에 존재하는 tetracycline이 조건부 치사성을 나타내는 OX513A 자손의 백분율에 영향을 미치지 않는다는 것을 나타낸다.

5.2.6 침투(penetrance) 특성

침투는 유전자 또는 유전적 특성이 발현될 확률이다. 실험실 조건에서 관찰된 OX513A의 자기제한 형질의 침투는 항상 95% 이상인 것으로 밝혀졌다. 즉, OX513A 수컷과 야생형 *Aedes aegypti* 암컷 간 자손의 5% 미만이 사육 환경이나 환경에서 tetracycline 없이 키우면 생존할 것이다.

5.2.7 비-침투적 OX513A 자손 : 지속성(longevity) 및 생식력(fecundity)

살아남은 이형접합성 OX513A 자손의 관찰된 작은 비율(5% 미만)의 생존력과 번식력이 실험실에서 조사되었다.

tetracycline이 없는 OX513A 수컷과 암컷 모두의 평균 생존기간은 실험실 조건에서 생존율이 훨씬 높은 비변형 수컷과 암컷과 비교하여 2일이었다. 야생형과는 달리 생존한 OX513A 자손에서 상당한 사망이 관찰되었다. 작은 부분(~20%)은 2회의 알집(clutches of eggs)을 만드는데 필요한 두 번의 혈액섭취를 할 수 있을 만큼 오래 살아남았다. OX513A 계통은 야생형(54,8)에 비해 첫 번째 생식소성숙주기(gonotrophic cycle)동안 통계적으로 유의한 큰 알집(69,9)을 낳았다. 부화율은 OX513A 알에 대해서는 다소 높지만 통계적으로 유의하지 않다.

5.2.8 현장(field) 침투

현장의 특성 침투는 케이맨 군도(East End)와 브라질(Itaberaba 및 Mandacaru) 두 곳에서 연구되었다. 불완전 침투의 전체적인 추정치는 0~4.28%로 실험실 연구에서 보고된 5% 미만이었다.

5.3 폐기 및 지속성 - OX513A의 규제된 환경방출

브라질의 전형적인 *Aedes aegypti* 도시 서식지에서 OX513A 유전자의 평균 확산(ovitraps 내 알의 숫자로 결정)은 평가된 두 기간 동안 모기가 풀린 장소에서 64m와 79m로 추정되었으며 이는 동일한 장소에서 관찰된 OX513A 수컷 및 야생형 비교측정자 계통의 분산과 일치한다.

말레이시아에서는 사람이 살지 않는 산림지역에서 OX513A와 야생형 비교측정자 계통의 최대 확산거리는 220m 이었지만 OX513A 계통이 이동한 평균 거리는 더 짧았다(52m vs 100m). 말레이시아의 이 연구에서 OX513A 수컷과 야생형 비교측정자 계통의 기대 수명은 비슷했다(2.0일 vs 2.2일).

케이맨 군도에서 OX513A의 평균 수명은 0.1일에서 1.6일 사이로 나타났다. 이 연구에서는 야생형 비교측정자가 방출되지 않았다.

이는 OX513A의 분산 속도와 수명이 야생형보다 크지 않음을 나타낸다.

5.4 잠재적 독성 - 구강 노출 연구

5.4.1 *Toxorhynchites* spp(포식성 모기⁸⁾)

Toxorhynchites 유생은 작은 수생 생물을 먹는다. OX513A 유충과 야생형 *Aedes aegypti* 유충을 먹인 *Toxorhynchites* 종(*Tx.amboinensis* 및 *splendes*) 사이의 발달, 생존 및 수명에 유의한 영향은 발견되지 않았다. 이러한 결과는 유전적 변형의 결과로서 독성을 나타내지 않음을 나타낸다.

5.4.2 *Poecilia reticulata* (구피 어류)

구피 어류 *Poecilia reticulata*에 OX513A가 미치는 영향을 알아보기 위해 14일간의 사료 급여 연구가 수행되었다. OX513A를 먹인 어류와 야생형 *Aedes aegypti*를 먹인 어류 사이의 사망률, 어류의 길이, 체중, 모양 및 행동에 관해서 유의한 차이는 관찰되지 않았다. 이러한 결과는 유전적 변형의 결과로서 독성을 나타내지 않음을 나타낸다.

5.5 OX513A 형태학

곤충의 형태를 변화시키려는 수컷 모기에 도입된 유전자는 없으며 OX513A 수컷과 야생형 수컷 사이의 형태학적 차이는 관찰되지 않았다.

5.6 암모기 타액 내 도입된 단백질의 발현 분석

Western blot 분석을 사용하여 OX513A 암모기 타액에서 tTAV 및 DsRed2 단백질의 존재를 검출하기 위한 분석이 수행되었다. 적절한 대조군을 사용한 결과, tTAV와 DsRed2 단백질은 암컷 OX513A 타액에서 검출되지 않았다.

8) 광릉왕모기 : 장구벌레 시기에 다른 모기의 장구벌레를 포식하는, 세계 유일의 인체에 해가 없는 모기. 생물학적 방제를 위해 연구 및 발달되고 있다.

5.7 OX513A 내 땡기 바이러스 및 치쿤쿠니아 바이러스의 수직적 전이(vertical transmission)

감염된 암컷에서 병원균을 질병 유발인자 또는 병원체가 통과하여 그 자손에게 전달되는 것을 수직적 전이라고 한다. OX513A 암컷이 야생형의 암컷에 비해 땡기 바이러스와 치쿤쿠니아 바이러스의 수직적 전이에 더 우성인지 여부를 평가하기 위해 OX513A 암컷과 야생형 비교측정자에 있는 땡기 바이러스(serotypes 1-4)와 치쿤쿠니아 바이러스의 수직적 전이가 평가되었다.

동형접합성 OX513A 계통과 비변형 비교측정자 계통 사이에는 차이가 없었으며, 발생 빈도에 유의한 차이는 없었다.

5.8 OX513A 내 도입체 안정성 : Part A의 section 4.2 참조

5.8.1 OX513A 품질관리

정규 계통 무결성 품질관리 분석은 OX513A 군집에서 다음과 관련하여 수행된다.

- 군집 유전형 분석
- 침투성, 안정성 및 tetracycline 용량반응
- 교미 경쟁력

5.9 OX513A의 표현형 특성과 관련된 결론

GMO 사무국은 유전자 변형의 결과로서 다음의 비의도적인 영향에 대해 OX513A과 비교측정자 간 표현형 변화가 발견되지 않았다는 Oxitec의 결론을 확인하였다 :

- 교미 경쟁력을 포함한 생명표 변수
- 온도와 살충제를 포함한 비생물학적 요인에 대한 반응
- 성체의 분산 및 수명
- 경구 노출 연구에 의한 잠재적 독성
또한, GMO 사무국은 데이터가 다음을 입증한다고 결론지었다.:
- 물에서 tetracycline 및 그 유사체 농도의 보고된 평균값이 OX513A의 표현형 구제(rescue)를 가능하게 하는 필요농도를 하회한다.

- 수컷 OX513A 및 야생형 암컷에 의해 생성된 자손에서의 형질 침투는 현장 조건 및 실험실 조건 하에서 약 95% 이상으로 관찰된다. 즉, 자손의 5% 미만이 tetracycline이 없는 환경에서 생존할 것이다.
- 살아남은 자손의 약 20%는 2일간 생존할 수 있다. 이는 암컷이 2번의 혈액 섭취를 하고 알집 2개를 생산할 만큼 충분히 길다.
- DENV 및 CHIKV의 수직적 전이는 OX513A를 변화시키지 않는다.
- 암컷 OX513A는 타액에 tTAV와 DsRed2 단백질을 포함하지 않는다.

6. OX513A의 탐지 및 확인

6.1 환경에서 OX513A 탐지방법 및 민감도

다음의 두 가지 주요 탐지방법이 있다 : 형광기반 탐지와 DNA 염기서열기반 탐지.

형광기반 탐지는 OX513A에서 DsRed2 단백질 생산의 결과로 형광성 유충 및 번데기를 현미경으로 탐지함으로써 가능하다. 이 마커는 2002년 이래로 115세대에 걸쳐 안정적이었음을 입증하였다. 이 마커는 *Aedes aegypti* OX513A의 알 및 성체에서는 보이지 않는다. 따라서 OX513A의 알은 DsRed2 마커유전자 발현의 시각화를 위해 통제된 실험실 조건 하에서 부화되어야한다(2016년 11월 30일 추가 정보).

DNA 서열기반 탐지는 OX513A 내에서 PCR 증폭된 독특한 유전자 단편을 삽입부위의 측면에 위치한 유전체 부위를 기반으로 시각화한다. 성체는 유전자변형 여부를 감지하기 위해 PCR로 분자적 분석을 해야 한다.

6.2 환경에서 OX513A 개체군 모니터링

Aedes 모기를 모니터링하기 위해 OX513A 프로그램에 사용된 트랩을 놓는 방법은 잘 정립되어 있다. 프로그램의 단계와 모니터링 의도에 따라 두 가지 기본적인 트랩을 놓는 방법을 조합하여 사용하거나 분리 사용한다.

Ovitrap(알 포획) 조사는 암컷이 알을 낳는 자연 번식지를 모방하는 방식으로 채택된 단순한 모니터링 도구로, *Aedes aegypti* 개체군에 대한 표준 모니터링 도구로 채택되어왔다. 세계보건기구(WHO)는 *Aedes aegypti* 감시에 대해 ovitraps 사용을 권장하고 있다.

모기성체 채집도구(BG-Sentinel adult trap)은 *Aedes (aegypti* 및 *albopictus)* 모기를 대상으로 개발되었다. 이 채집도구는 시각 및 숙주모방 후각신호를 조합하여 흡입형 트랩에 포획되는 성체(수컷 및 암컷) *Aedes* 모기를 유인한다.

7. OX513A의 규제된 환경방출

7.1 이전의 OX513A 이용 이집트 숲모기 방제전략

OX513A 수컷의 규제된 환경방출은 매개체 방제 프로그램 및 학제와 동반자관계로서 공동으로 2009년 후반에 실시되었다.

2009년 그랜드 케이먼에서 방출된 OX513A 수컷은 OX513 재조합 DNA (rDNA) 구조물의 삽입으로 손상되지 않았으며, 자연적인 도시 환경과 교미에서 야생 수컷과 성공적으로 경쟁할 수 있음을 입증했다. 또한, 말레이시아의 2010년 방출에서는 rDNA 구조물의 삽입이 OX513A 계통의 확산 범위를 변경시키지 않았다는 것을 입증하기도 하였다. 케이맨 군도, 브라질 및 파나마에서 지금까지 수행된 OX513A의 후속 방출은 매개체 방제 프로그램의 맥락에서 OX513A 계통의 방출 효능을 입증했다.

도입된 OX513A의 수와 지역의 *Aedes aegypti* 개체군 억압 수준을 포함한 케이맨 군도, 브라질 및 파나마에서의 자료가 Oxitec 설명문서 part A의 section 7.1.1에서 7.1.5까지에 대한 설명에서 제공된다. 여기에 보고되지 않은 것은 환경위해성평가와 관련이 없는 것으로 간주되기 때문이다.

7.1.5.1 환경적 지속성(persistence)

파나마에서 환경 내 OX513 유전자 구조의 지속성을 평가하기 위한 사후 환경 모니터링 조사가 수행되었다. OX513A의 최종 방출은 2014년 10월 31일에 실시되었다. 대조군 및 방출지역의 환경 모니터링은 DsRed2 마커에 대한 60개 ovitrap 및 유충의 형광 스크리닝 네트워크를 통해 방출 후 138일 동안 계속되었다. 20,000마리 이상의 *Aedes aegypti* 유충이 개별적으로 스크리닝 되었다. 최종 방출 이전에 OX513A 형광 유충은 처치된 지역에서 포획된 유충의 100%였으며, 방출 후 25일은 5%이었고 방출 후 84일에는 0%였다. OX513A 유전자의 부재는 데이터 수집의 중단으로 인해 방출 후 12주 후에만 확인될 수 있었지만, 이용 가능한 데이터는 OX513A 유전자가 방출 후 6~8주의 환경에서 발생할 가능성이 없다는 것을 시사한다.

7.1.1 이전의 OX513A 이용 이집트 숲모기 방제전략의 결론

GMO 사무국은 다음에 대한 2009년부터 수행된 케이맨 군도, 말레이시아, 브라질 및 파나마의 환경방출 자료를 존중한 Oxitec의 결론을 확인한다.

- 교미 경쟁력
- 성체의 분산과 장수성
- 환경으로의 OX513A 유전자 확산 및 지속성

또한 GMO 사무국은 인간 및 동물 보건과 환경에 대한 비의도적 영향이 어떠한 방출에서도 관찰되지 않았음에 주목하였다. 그러나 이 방출 동안에 환경에 대한 모니터링은 없었다.

Part B. 사바 섬에 OX153A의 의도적 이용(intended use)

1. 제출된 방출계획 세부사항

일반 개요

알은 사바 섬 근처의 방출지에 있는 시설까지 프로그램 과정을 통해 정기적으로 선적된다. 이 시설에서 알은 번데기를 얻기 위해 사육되고, 수컷 번데기를 선별하기 위해 성적으로 분류되며 이 수컷은 방출용 성체로 성숙된다. 성적으로 성숙한 OX513A 수컷은 특별한 방출장치에서 미리 정의된 방출 지점의 격자무늬(grid)와 같은 패턴으로 방출되어 이 구역을 균일하게 덮는다.

라틴-아메리카 야생형에 통합된 OX513A는 사바 섬에서 방출될 예정이다. 사용된 라틴-아메리카 계통은 표준운영절차서(SOP)에 설명된 대로 정기적 품질검사 대상이 되는 우세 계통(lead strain)이며 전 세계의 현장 프로그램에 사용된다. 이 특정 배경 계통 및 교미 경쟁력에 있어 삽입체의 유전적 완전성(integrity)에 대한 높은 수준의 확신이 있다 (추가 정보, 2016년 11월 30일).

OX513A 프로그램은 (1) 준비단계, (2) 조정단계 (3) 유지관리 단계의 세 단계로 나눌 수 있다. 방출률은 다양한 지표들에 대한 지속적인 모니터링 및 평가를 통해 알 수 있다.

1.1 예상 결과

제안된 OX513A *Aedes aegypti* 억제 프로그램은 *Aedes aegypti*의 지역 개체수를 매우 낮게 억제하고 이후 1년 동안 지속된 제거를 시연함으로써 잠재적으로 제거하는 것을 목표로 한다. *Aedes aegypti*는 사바 섬의 침입성 해충으로 간주된다.

사바 섬에서의 OX513A의 지속적인 방출은 야생 *Aedes aegypti* 개체군에 대해 다음의 시간적인 몇 가지 측정 가능한 효과를 목표로 한다. :

1. *Aedes aegypti*에 대한 전체 수컷 대 암컷 비율의 증가.
2. 야생형 *Aedes aegypti* 암컷과 OX513A 수컷 교배;
3. 섬의 잠재적인 *Aedes aegypti* 제거로 이끌어내기 위한 표적 *Aedes aegypti* 개체군의 억제;
4. 1년 동안 *Aedes aegypti*의 지속적인 제거.

OX513A 프로그램은 야생 *Aedes aegypti* 군집의 개체군 동태에 대한 지속적인 평가를 진행하고, 방출률은 방제/제거가 달성될 때의 방출 기간 전반에 걸친 모니터링을 기반으로 조정된다. 일단 방제가 이루어지고 섬에 야생 *Aedes aegypti*가 없으면, 이 상태를 유지하기 위해 잠재적인 재도입 위해성이 있는 지점에서 OX513A의 지속적인 모니터링과 낮은 수준의 방출이 필요하다.

1.2 방출 위치

사바 섬에 대한 제안된 방출은 The Bottom, Windward side, Zion's Hill 및 St. Johns 및 그 사이의 작은 서식지역에 있는 4개의 원칙적인 인간집락지가 있는 지역 전체에 걸쳐 섬 전체에 적용된다(Figure 5). 또한 방출은 Fort Bay Harbor의 항구 및 Juancho E. Yrausquin 공항 지역에서 이루어질 것이다. 수컷 OX513A의 방출은 일반적으로 방출 지역의 범위를 보장하기 위해 일반적으로 100m 이상 떨어져있는 미리 정해진 지리적-참조위치에서 일주일에 3번 행해진다.

이 섬은 서식지의 이질성과 그에 따른 *Aedes aegypti*의 침투에 따라 다른 방출률을 가진 지역으로 세분될 수 있지만 넓은 방출 지역은 사바 섬에 있는 *Aedes aegypti*의 예상 서식지에서 도로 패턴과 일치(i.e. 사람의 거주지)할 것이다(아래 Figure 5 참조).



Figure 5. 사바 섬에서의 *Aedes aegypti* 서식지는 인간 거주지와 거의 100m(빨간색으로 표시)인 도시지역으로 나타난다. 전체 음영 지역은 약 3.7 km²에 해당한다.

1.3 방출률 결정 - 단계적 접근

앞에서 설명한 것처럼 OX513A 방출은 단계적 프로그램으로 관리되며 방출 속도는 다양한 지표들의 지속적인 모니터링 및 평가를 통해 알 수 있다.

1.3.1 준비 단계

이 단계는 처치 지역에서 *Aedes aegypti* 모기 개체군의 초기 밀도를 평가하고 OX513A 사육 방법을 사바 섬의 지역 조건에 맞게 최적화하는데 사용된다. 초기 밀도는 ovitraps과 성체포획법(trapping method)으로 모니터링 할 수 있을 뿐만 아니라 과거의 감시 데이터, 계절성, 역학 기록, 기존 모기 퇴치 및 주택 유형 및 번식지의 급증과 같은 질적 요인을 포함하여 가능한 가장 유용한 정보를 사용한다.

야생 *Aedes aegypti*의 밀도에 따라 OX513A 수컷의 초기 방출률이 결정된다. 초기 방출률(initial release rate, IRR)은 현재까지 대부분의 프로젝트에서 주(week)에 1인당 OX513A 수컷 100~300마리가 일반적이다.

1.3.2 조정 단계

1.3.2.1 모기 방출 및 폐기

조정 단계 동안, OX513A는 규칙적인 시간 간격으로 방출 지점의 미리 정해진 지리 기준의 격자 형태로 체계적으로 방출되어 처치 영역을 균일하고 일정하게 포괄한다. 방출 지점은 100m 이상 간격을 두고 방출되며, 방출은 주당 최대 3회 이루어질 것이다. 과거의 프로젝트에서는 방출 개시 후 4~6개월에 상당한 역압이 관찰되었지만, 지역 조건과 모기 밀도에 따라 최대 12개월이 될 수 있다.

*Aedes aegypti*의 개체수 감소율을 좌우하는 핵심 요소는 OX513A를 풀어 놓은 지역 야생 *Aedes aegypti* 암컷의 비율이다. 이 짝짓기는 지역의 야생 *Aedes aegypti* 수컷보다 OX513A가 더 큰 비중을 차지한다.

주어진 교배율(mating fraction)을 달성하는 데 필요한 방출 속도는 지역 *Aedes aegypti* 개체군에 비례한다. OX513A 수컷 : 지역 *Aedes aegypti* 수컷 비율이 높을수록, 교배율과 지역 *Aedes aegypti* 개체군에 영향을 줄 가능성이 커진다.

1.3.2 방출률의 조정적(adaptive) 관리

방출률은 조정 기간 동안 떨어질 것으로 예상되는 지역 *Aedes aegypti* 개체군에 따라 동적으로 조정된다. OX513A 수컷 방출은 지역 *Aedes aegypti* 개체군이 억제되면서 계속될 것이지만, 교배율을 >0.5로 유지하기 위해 선택된 감소 수준에서 계속될 것이다. 방출 속도는 억제 단계 동안 매 6~8주마다 평가되고 교배율에 따라 조정된다.

지역 *Aedes aegypti* 개체군의 강력한 억압은 전형적으로 방출 개시 후 4~6개월 내로 예상된다. 그러나 사바 섬에서 *Aedes aegypti*를 효과적으로 제거하기 위해서는 오래 걸릴 것으로 예상되며 12개월이 걸릴 수도 있다.

1.3.3 유지관리 단계

지역 *Aedes aegypti* 개체군이 설득력 있는 억제 또는 제거를 입증할 만큼 충분히 떨어지면 프로그램은 유지 및 보수가 계속되는 반면 교미율은 추정하지 않고 유지 단계로 진입한다. 지역 *Aedes aegypti* 개체군의 재등장은 ovitraps에 의해 모니터링 되어 방출률의 증가를 촉발할 것이다.

재등장(Resurgence)은 ovitrap 지수가 >10%인 4주 연속일 경우로 분류된다. ovitrap 지수는 하나 이상의 *Aedes aegypti*로 확인된 알의 숫자를 트랩에서 발견된 모든 총량으로 나눈 값이다. 야생 *Aedes aegypti* 개체군이 효과적으로 억제(<10% ovitrap 지수)되면 *Aedes aegypti* 개체군의 재등장을 막고 달성된 목표를 유지하기 위해 고안된 유지관리 단계로 들어간다. 이 접근법은 프로그램 내에서 연속적인 하위 영역에 적용될 수 있다. 다른 영역은 조정 단계에 머물러 있어도 잘 제어된다. 재등장은 *Aedes aegypti* 개체군 잔여물, 알집 및/또는 이주된 알집 등의 작은 구멍(pockets)으로부터 발생할 수 있다.

유지관리 단계 프로토콜은 모니터링 데이터를 기반으로 다른 매개체 관리 도구의 방출 및/또는 사용계획 및 대상지정 등, 조정 단계에서 사용되는 것과 유사하다. 고위해지역과 재-침략(re-infestation)의 장소는 주로 Port Bay Harbor와 Juancho E. Yrausquin Airport의 항구로 수송 허브가 될 것이며, 조정 단계에서 모니터링을 통해 더 특성화될 것이다. 이 영역은 사바 섬 공중보건사무소, 적절한 정부 및 기타 이해관계자와 상의하여 프로그램 목표를 매년 평가하여 지속적으로 방출할 수 있도록 최소한으로 제안되었다.

나머지 지역에서는 *Aedes aegypti* 개체군이 제거되면서 처치가 중단되고 재등장이 탐지되면 OX513A를 대상으로 지속적인 모니터링을 받게된다.

사바 섬에 방출될 OX513A *Aedes aegypti*의 예상 수치

제안된 사바 섬 프로젝트와 관련하여 방출 숫자에 대한 견적은 현재까지 억압 프로젝트 경험을 토대로 상당히 높은 수준의 확신을 가지고 작성될 수 있다(2016년 11월 30일 추가 정보).

처음 12개월 동안 평균치를 얻은 결과, 방출량은 OX513A 수컷/사람/주 평균 160명으로 예상된다. 사바 섬에서 약 1800마리의 개체군의 경우, 이것은 약 15백만 마리의 OX513A 수컷이 초기 12개월 동안 방출될 것임을 의미한다. 첫 12개월 후에는, 전체 섬에 대해 평균 50의 OX513A 수컷/사람/주를 초과하지 않을 것으로 예상된다. 이는 향후 12개월 동안 약 470만 마리의 OX513A 수컷(2016년 11월 30일 추가 정보)과 동일하다.

1.4 방출 이전의 밀폐수단

OX513A의 알은 'the Genetically Modified Organisms (Contained Use) Regulation 2014'에 따라 영국에서 생산되며, 생산은 CL1(밀폐 수준 1) 조건하에 취급된다. 사바 섬에 수출시 OX513A 알(별개의 사전통보서에 표기된 양)은 비산방지밀폐(shatter-proof containment)가 된 3중포장용기로 포장되며, St. Maarten 을 통과하는 상업용 택배 서비스로 항공 운송된다.

1.4.1 이동형 사육동(rearing unit) 개요

OX513A는 지역에 설치된 MRU(이동형 사육동)로 가져올 수 있다. MRUs는 컨테이너 운송을 위한 관련 ISO(국제표준화기구) 표준을 준수하는 표준 선적 컨테이너 내에서 제조된 곤충 생산 실험실이며 ACL2(절지동물 밀폐수준 2)까지 준수하는 이동형 곤충 실험실이다. 밀폐와 관련된 모든 조치를 자세하게 설명하는 표준운영절차(SOP)가 제공된다.

사바 섬 용 MRU는 담수화 플랜트의 전기 및 담수 공급에 매우 근접한 Port Bay Harbor 항구 지역에 설치하도록 제안되었다.

MRU의 폐수 처리는 Port Bay Harbor 지역의 다른 상업용 건물의 폐수 처리와 동일하다.

1.4.1.1 설계 및 건설

MRU는 다양한 프로젝트 지역 및 요구 사항에 따라 선적되기 전에 맞춤 설계된 일반 디자인으로 영국에서 사전 제작된다. 사바 섬에 MRU 건설 프로세스를 알리기 위해 모든 관련 건물 코드 및 설치 요구사항에 대한 평가가 완료된다. 안전한 작업 환경을 보장하기 위해 Oxitec MRU는 구조, 기계, 배관, 전기, 화재 안전 및 상해 접근에 대한 존중 코드를 준수하는 최소 사양을 갖추고 있다. Oxitec은 해당 코드 요구사항을 평가하기 위해 사바 섬의 현지 계획 담당자와 협력한다.

1.5 알에서 성체 모기로의 OX513A 사육

OX513A 알을 성체로 사육하는 과정은 SOPs에 잘 정립되어 있다.

모든 SOPs가 제공되고 이로서 충분함이 입증된다. 그러나 SOP는 아직 사바 섬에서 사용하도록 조정되지 않았다. 이것은 기존의 SOP에 대한 최종 조정과 사바 섬에 대한 최종 프로젝트 별 SOP의 개발은 Oxitec과 사바 섬 정부간 계약상 동의를 통해 프로젝트 확인이 확정되면 우선적으로 수행될 것임을 나타낸다(추가 정보, 2017년 3월 13일).

Oxitec 프로젝트가 진행되는 동안 SOP의 일치성, 훈련 및 감독은 책임 있는 지역 프로젝트 매니저를 사바 섬에 거주하도록 보낼 것이며, 초기 커뮤니티 참여 및 현지 설치 단계에 더해 모기 방출기간 전체(12개월 예상)에 걸쳐 이행을 감독하게 할 것이다. 또한 Oxitec은 필요한 경우 즉시 다음에 오는 유지관리를 위한 12개월 내에 누군가를 체류하게 할 것이다.

SOP의 불일치 사항은 기록되어 영국 중앙 작전본부에 보고되며 Oxitec 품질보증 관리자의 지시에 따라 시정 조치가 취해질 것이다. 사바 농업위생&매개체 방제부(Saba Department of Agriculture, Hygiene & Vector Control)의 지역담당자를 위한 활동들이 필요하다. 준비 및 조정 단계에서, 첫 해에 4명의 현지 직원이 필요하며 유지관리 및 모니터링을 위해 다음 해에는 직원 2명이 필요하다. 모든 참가자가 자신의 기능과 관련된 표준운영절차에 대해 교육을 받도록 하기 위해, 사바 농업위생&매개체 방제부와 긴밀한 파트너십을 유지할 Oxitec이 철저한 교육과 감독을 담당한다. 훈련 기록은 표준 절차의 일부로 보관된다. 초기 제안된 2년 프로젝트가 완료된 후 (설치 후 제거를 위해 1년, 유지관리를 위해 1년) OX513A 알의 지속적인 공급과 계약상 동의에 위한 기술 지원 방문과 같은 지역 *Aedes aegypti* 개체군을 관리하기 위한 활동이 가능할 것이다(추가 정보, 2016년 11월 30일).

1.5.1 tetracycline 이용

조건부 치사성은 항생제 tetracycline 또는 그 유사체의 존재 하에서 억제 가능하다. 최종 농도 30mg/L의 최종 농도의 Chlortetracycline은 유생 사육용 쟁반의 물에서 사용된다. 사바 섬의 개체군(약 2000마리)에 필요한 유충의 수는, 유충 사육에 총 36g의 chlortetracycline/week가 필요하다.

수생 단계에서 사육수(rearing water) 및 모기에 tetracycline 농도가 어떻게 변하는지 분석하기 위한 연구가 수행되었다. 이 연구는 사육 시설에서 방출되는 폐수에서 예상되는 chlortetracycline의 양이 투입량보다 21배 낮을 것으로 추정했다. 사바 섬에 기대되는 양은 배출되는 폐수에서 36g을 21로 나눈 $\sim 1.7\text{g/week}$ 이다.

1.6 운송 및 성체 방출

OX513A 성체 수컷은 개조된 밴 또는 개방형 트럭을 사용하여 일반적으로 500 또는 1000마리의 수컷을 방출하는 장치로 운반된다. 이용되었던 대규모 프로젝트에서는 여러 가지 방출 방법이 사용되었지만(예. 브라질), 소규모 프로젝트인 사바 섬 프로젝트는 개방형 트럭이나 밴에서 방출될 수 있다.

1.7 OX513A 프로그램 모니터링

Aedes aegypti 모니터링은 *Aedes aegypti* 개체군의 변화를 평가하여 방출률 및 프로그램 의사결정의 적응도 관리를 알기위해 필요하다. Ovitrap는 *Aedes aegypti* 부하량의 변화를 모니터링하고 교배율을 평가하기 위한 기본 도구이며 성체 트랩은 야생 *Aedes aegypti* 개체군의 평가를 위한 추가 통계를 제공하는 데 사용할 수 있다. 또한 OX513A와 야생 수컷 *Aedes aegypti*의 비율을 추정할 수 있다.

모니터링의 주요 초점은 *Aedes aegypti*일 것이다. *Aedes albopictus*와 밀접한 관련 성질 및 행동으로 인해 동일한 모니터링 도구가 *Aedes albopictus* (ovitrap 및 성체 트랩)에 적용된다. 운영 프로그램의 경우, 일상적인 ovitrap 모니터링은 *Aedes aegypti*와 *Aedes albopictus* 개체군 모두에 대해 수행된다. *Aedes albopictus*는 아직 사바 섬에서 관찰되지 않았다. 트랩 유형에 따라 프로젝트와 관련이 있다고 판단되면 다른 모기 종을 포획하고 데이터를 기록 할 수 있다.

1.7.1 Ovitrap 모니터링

Ovitrap은 *Aedes aegypti* 개체군과 야생 *Aedes aegypti*의 교배 비율을 OX513A 수컷으로 측정한다.

1.7.1.1 밀도, 위치 및 정비

상업 건물이나 산업 건물과 같은 비-주거지가 포함될 수 있지만, ovitrap은 가정의 거주지에 주로 위치해야 한다. 최소 30개의 트랩이 최소 30/km² 밀도로 각 평가 영역에 배치될 것이다.

1.7.1.2 종의 확인

Ovitrap은 깨끗한 물통에서 번식하는 모기에 대해 선택된다. 일부 지역에서는 *Aedes aegypti*에만 국한되는 반면 *Aedes aegypti* (예. *Aedes albopictus*)와는 쉽게 구분할 수 없는 알을 낳는 다른 종들이 존재할 수 있다. 알 단계에서 다른 종의 확인은 가능하지 않다. 따라서 ovitrap에서 수집된 알은 적절한 분류학적 실마리를 사용하여 유충 및/또는 성체기에 종 식별을 위해 부화될 것이다. DsRed2 형광 마커가 발현된 유충은 분류학에 의한 추가 사육 및 동정을 필요로 하지 않고 *Aedes aegypti*로 기록된다.

1.7.1.3 종들의 구성

모든 장소의 Ovitrap 수집품은 처음에는 *Aedes aegypti* 종이 아닌 존재를 가정하고, 100의 양성이 평가될 때까지 종 수준의 확인을 받아 처리된다. 그 후 *Aedes aegypti*가 아닌 종의 출현은 첫해에 4개월마다 점검되고 적어도 그 이후의 해에는 예상대로 매년 계속된다.

1.7.2 Ovitrap 분석

알 성숙과 부화 후, section 1.7.1.3에서 기술된 종 확인을 포함하는 ovitrap 포획량이 분석될 것이다.

1.7.3 교미빈도 측정

알의 성숙과 부화 후, 유충을 육안으로 검사하고 형광 마커가 있는 유충의 부분을 숙련된 직원이 채점한다. 교배율은 형광 유충의 수를 *Aedes aegypti* 유충(형광 및 비-형광)의 총 수로 나눈 값으로 계산된다.

1.7.4 성체 포획

성체의 직접적인 시료채취는 성체가 종과 성별을 쉽게 식별할 수 있다는 이점을 가진다. 압컷 *Aedes aegypti*의 수는 *Aedes aegypti*의 현지 개체군을 평가하는 척도로 사용될 수 있다. 수컷 OX513A와 야생형 수컷 *Aedes aegypti*를 구별하기 위한 분자적 도구가 필요하다.

트랩은 주로 주거지에 위치하지만 학교 및 상점과 같은 대체 장소도 포함될 수 있다. 사바 섬에서 성체 모니터링을 하기 위해서는 최소 15개의 BG Sentinel 트랩이 필요하다. 이 트랩은 보통 조정 단계 동안 설치되며 매주 점검된다.

2. 수용환경

2015년 1월 현재 사바 섬의 인구는 1811명이었으며, 2015년까지 5년 연속으로 1811명에서 1991명 사이였다.

2.1 지정학적 특성 및 기후

2.1.1 지리적 특성

사바 섬은 네덜란드 카리브해의 Windward Islands 제도에 속한다. Windward 제도는 버진 아일랜드에서 북동쪽으로 약 900킬로미터 떨어져 있으며, St. Martin 섬(이 중 절반은 프랑스 영토, 네덜란드 부분은 St. Maarten), St. Eustatius 및 사바 섬으로 구성되어 있다. 사바 섬은 St. Maarten에서 남쪽으로 약 50km 떨어져 있으며 바다에서 가파르게 솟아올라 있다. 사바 섬은 Windward 제도의 가장 어린 섬으로 사화산이 아닌 활화산으로 여겨진다.

가장 높은 지점인 Mount Scenery는 해발 840m 높이에 있다.

사바 섬은 자연 항구가 없다. 몇 군데에만 작은 보트를 댈 수 있다. Fort Bay와 Ladder Bay는 각각 남쪽과 서쪽 해안에 위치하며 섬의 유일한 자연적 착륙장소다. 대형 선박은 수백 미터 앞바다에 남아 있어야 한다.

사바 섬의 초목은 주로 양치류와 습기가 있는 토양으로 이루어진 삼림 지대 숲으로 이루어져 있으며, 망고(*Mangifera indica*)와 같은 과일 나무를 많이 도입되었다. 사바 섬의 육지 공원은 북동부 해안선의 Great Hole과 북서쪽의 Pirate Cliffs에서부터 산의 정상에 있는 구름 숲까지 펼쳐져 있다. 이 공원에는 건조한 해안 식물에서부터 풍부한 구름 숲, 섬의 유황 광산의 문화적으로 중요한 장소까지 모든 것이 있다.

2.1.2 기후

사바 섬은 적도 몬순 기후로 1년 중 평균 기온 18℃ 이상이며 우기와 건기로 나뉜다. 기후는 쪽에서 북동쪽으로 바뀌는 것이 특징인 비교적 건기(1월~4월)과 우기(8월 ~ 12월)의 특성을 보인다.

1971년부터 2000년까지 *Aedes aegypti*의 생존을 위한 중요한 비생물학적 요인인 사바 섬의 월간 강수량과 기온이 서류에 기록되어 있다.

평균 일일 최고기온은 27℃이며, 8월은 가장 따뜻한 월이다. 더 시원한 조건은 섬의 더 높은 고도에서 일반적이다.

2.1.2.1 날씨 조건

사바 섬, St. Eustatius 및 St. Maarten(SSS)은 허리케인 벨트에 위치하고 있으며 거의 매년 열대성 저기압이 SSS 섬의 100마일 범위 내에서 발생하며 평균적으로 매년 4~5년은 허리케인 상태를 경험한다.

2016년 1월 1일부터 네덜란드 왕립 기상연구소(KNMI)는 Bonaire의 항공 및 해양 부문에 대한 서비스뿐만 아니라 일반 대중에 대한 일기 예보 및 경고를 준비하기 위해 Bonaire, St. Eustatius 및 사바 섬을 책임지고 있다. 악천후가 예상되는 경우, 사바 섬에 대한 현장별 허리케인 대비 정책에 설명된 대로 조치가 취해질 것이다(SOP 제공).

2.2 사바 섬의 이집트 숲모기

2.2.1 사바 섬의 이집트 숲모기 서식지

*Aedes aegypti*는 인간의 거주지와 밀접한 관련이 있는 peri-domestic 종이다.

번식은 화분 받침대, 수조, 타이어, 버려진 플라스틱 및 음료수캔, 배수구 및 지붕 홈통과 같은 금속 용기와 같은 인공적 용기에만 국한되지는 않는다. 일단 탈피한 (eclosed) 성체 *Aedes aegypti* 모기는 암컷이 알 발달에 필요한 혈액 섭취를 쉽게 할 수 있는 집 주변에 산다.

사바 섬에서는 고품질의 음용수가 Fort Bay의 담수화 시설에서 공급되며 비용이 많이 든다고 간주된다. 도시 지역의 빗물 수집은 개인 가정과 더 넓은 공유 공용 영역을 제공하는 많은 양의 수조가 있음을 의미한다. 지역 매개체 방제 서비스는 물탱크 (cisterns)를 일차적인 *Aedes aegypti* 번식지로 확인하고 매개체 방제 활동은 다른 수조들 사이의 물탱크를 표적으로 삼았다. 따라서 사바 섬(및 다른 작은 카리브 섬)의 *Aedes aegypti* 서식지에는 비용이 많이 드는 도시수도 공급이 있는 다른 도시 지역과 달리, 일반적으로 많지 않은 물탱크의 독창적으로 추가된다.

2.2.2 사바 섬의 생태계 내 이집트 숲모기의 기능

*Aedes aegypti*는 사바 섬의 침입종으로 밝혀졌으며 방제와 연구 모두에 최우선 순위를 두고 있다. *Aedes aegypti*는 사바 섬의 원산이 아니며 기존의 간섭은 *Bacillus thuringiensis*에 기초한 제품의 응용뿐만 아니라 곰팡이가 있는 어류와 같은 번식지에서 유충의 사용과 관련된 생물학적 방제 방법을 통해 *Aedes aegypti* 집단을 통제하려고 시도하였다. 야생 *Aedes aegypti* 개체수의 억제 또는 제거는 현재 매개체 방제에 대한 현재 보호 목표와 일치하므로 지역 먹이 사슬의 핵심 종으로 간주되지 않기 때문에 지표적 생물체의 개체 역학을 변경할 것으로 예상되지 않는다.

2.3 동식물상

농업 및 목축

현재 사바 섬에는 섬의 지질학적 특성으로 인해 소규모 농업만이 존재한다. 1300 헥타르 중 약 216 헥타르만이 농업과 목축에 사용될 수 있다.

자연 동식물상

- 식물 : 사바 섬에서 520종의 식물이 확인되었다.
- 조류 : 사바 섬의 동물상은 상대적으로 소수의 종이 주목할 만하다. 척추동물 중에서는 조류가 26종으로 가장 큰 그룹을 형성한다. 5종의 바닷새가 사바 섬에 동지를 튼 것으로 보고되고 있으며, 36종의 이주 종들이 매년 임시로 존재한다고 보고된다.
- 포유류 : 박쥐는 사바 섬의 유일한 포유류로 인간에 의해 도입되지 않았다. 5 종이 보고되었다.
- 파충류와 양서류 : 파충류와 양서류는 사바 섬의 척추동물 중 두 번째로 큰 그룹으로, 파충류 10종과 양서류 1종(척추 개구리, *Eleutherodactylus Johnstonei*)이 있다. 척추동물 중에 하나의 섬 고유종인 도마뱀인 *Anolis sabanus*가 있다. 사바 섬에서 OX513A의 잠재적 방출지역에서 발생할 수 있는 보호되고 카리스마가 넘치며 가치가 있는 두 종은 붉은배가죽 뱀(Red-bellied Racer, *Alsophis rufiventris*)과 사바도마뱀(Saban Anole, *Anolis sabanus*)이다.
- 곤충 : 사바 섬에서 관찰된 나비 및 다른 곤충 종에 대한 언급은 Oxitec의 문서에 나와 있다.

- 다른 생물체 : 사바 섬에 서식하는 높은 종의 부하량이 나타난 것은 거미로, 18과(family) 76종이었다.

2.4 사바 섬 환경에서의 tetracycline

환경에서 tetracycline 노출의 주요 경로는 농업과 폐수이다.

농업 환경에서 가장 가능성 있는 tetracycline 공급원은 예방 또는 치료용 수의학적 용도(예. 소)에 사용되는 tetracycline으로 오염된 분뇨의 적용 또는 여러 관할 구역에서 서양배나무(pear trees)와 같은 특정 과일에 대한 적용이 승인된 tetracycline 함유 살충제의 적용에 있다. 그러나 앞서 언급한 바와 같이 현재 사바 섬에 있는 소규모 농업은 주로 섬의 지질학 특성 때문에 이루어지므로, 사바 섬에 tetracycline을 농업에 사용하는 경우는 거의 없다. 또 다른 출처는 항생제를 투여한지 2일 이내에 항생제의 최대 72%가 똥과 오줌으로 배설되는 등, 소변과 대변을 통해 흘러보내지는 인간에 의해 유지 관리되는 애완동물 및 다른 동물에서 tetracycline이 이용될 수 있다는 것이다.

또 다른 가능성은 수의학 또는 인간 치료용 tetracycline으로 오염된 폐수(예. 관개, 하수)의 존재이다. 환경적 항생제 분해에 대한 검토는 일반적으로 환경 tetracyclines ($\mu\text{g/L}$ 범위)의 가장 높은 출처가 병원 및 도시 폐수에서 발생한 반면 표층수, 해수 및 지하수는 ng/L 범위였음을 나타낸다. Tetracyclines은 햇빛 아래에서 급속히 분해되는 것으로 잘 알려져 있다.

브라질에서 *Aedes aegypti* 번식지에서 수질시료를 수집하는 연구가 수행되었다. 결과는 tetracycline의 농도가 각 현장 샘플에 대한 정량한계 이하임을 나타냈다.

사바 섬의 폐기물 처리 시스템은 본질적으로 주거 지역의 개인 간접시설을 통해 이루어진다. 개인적으로 치료용 항생제를 투여하는 개인이 고립된 개별 주거 간병 환자 오물통에서의 tetracycline의 농도에 기여할 가능성이 있다. The Bottom 내 사바 A.M. Edwards Medical Center 병원은 개인 주택보다 고농도의 tetracycline을 함유한 폐기물을 발생시킬 것으로 예상되지만, 폐기물 오물통은 *Aedes aegypti*의 선호 서식지가 아니며 인간 거주구 내 주변의 깨끗한 정수를 선호하는 특성이 있다.

보고서에 따르면 *Aedes aegypti*는 정화조에서 번식할 수 있지만 균열이나 파손이 있는 곳에서는 일반적으로 탱크 상부에서 맑은 물에 서식하는 경향이 있는 반면 tetracyclines는 바닥에 모이는 퇴적물에 결합하는 경향이 있다(따라서 tetracycline은 물의 맑은 표면층에서 쉽게 접근할 수 없게 만든다). 손상 또는 균열이 생긴 오수정화조 또는 금이 간 뚜껑이 덮인 오물통에 존재한다.

Part C. OX513A의 환경위해성평가

개론

이 환경위해성평가(ERA)는 유전자변형생물체의 환경으로의 의도적 방출에 관한 Directive 2001/18/EC의 Annex II에 설명된 일반 원칙 및 방법에 따라 수행되었다(EC, 2000)¹. Directive 2001/18/EC에 대한 Annex II를 보완하는 추가적인 지침이 2002년 7월 24일 Commission Decision에서 수립되었다(EC, 2002)⁹. 유전자변형 곤충에 대한 해석은 유전적으로 변형된 동물의 환경위해성평가에 관한 EFSA 지침서(EFSA, 2010)²와 유전자 변형식물의 환경위해성평가에 관한 EFSA 지침서(EFSA, 2010)¹⁰에서 이루어져다.

이 ERA의 범위는 네덜란드의 특별 지방자치단체인 사바 섬의 *Aedes aegypti*에 대한 매개체 방제 프로젝트와 관련하여 OX513A의 의도적인 환경 방출에 대한 것이다.

1. 환경위해성평가의 접근법

이 환경위해성평가(ERA)는 사바 섬의 수용환경에서 OX513A의 환경으로 의도적으로 방출되는 것에 관한 정보에 입각한 결정을 내리기 위해 전반적인 위해성분석 프로세스의 일부를 구성한다. ERA는 실험실 및 규제된 환경방출을 통해 평가된 모든 데이터, 연구보고서 및 기타 데이터를 사용하여 수행된다. 또한 전반적인 위해성에 대해 과학적으로 건전한 평가를 발달하기 위해 과학적 문헌 리뷰 및 독립적 전문가 분석이 고려되었다. OX513A 환경으로 의도적 방출할 경우의 잠재적 영향에 대한 개별적인 사례 평가를 가능하게하기 위해 Directive 2001/18 EC에 설명된 ERA의 6단계에 따라 체계적이고 체계적인 접근법이 취해졌다. ERA의 6단계는 Figure 6에 나와 있다.

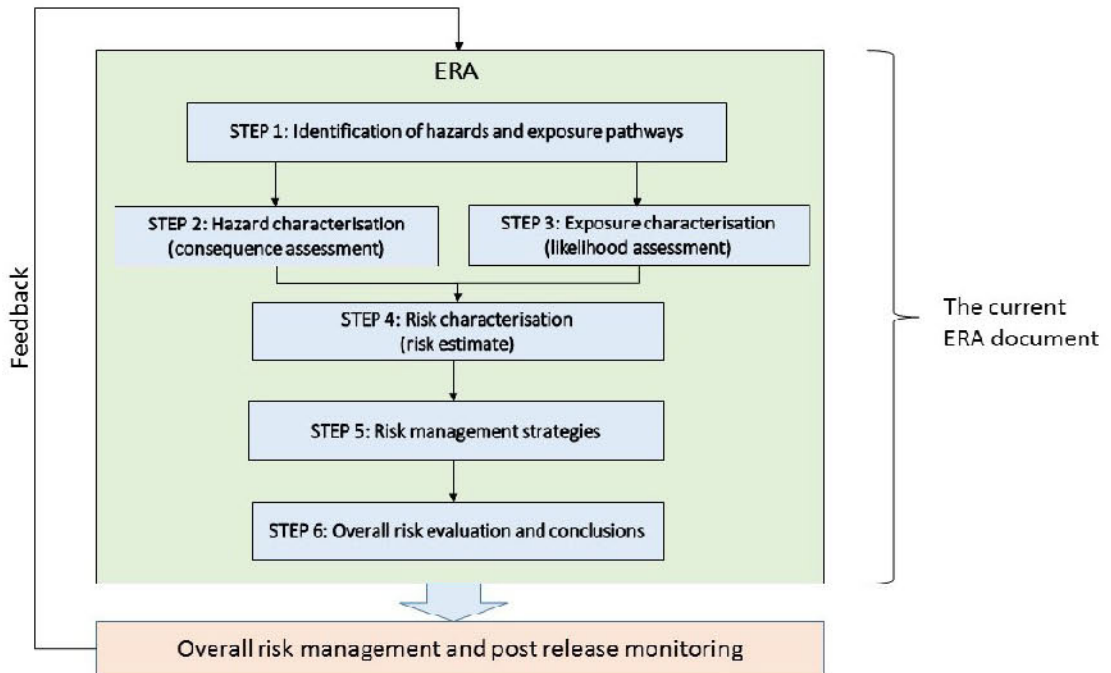


Figure 6. (EFSA, 2013)²에서 제시되고 Directive 2001/18/EC (2001)¹에서 해석된 환경위해성평가(ERA)의 6단계

ERA의 6단계를 사용하여 Directive 2001/18/EC Annex II D1 (EC, 2001)¹에서 확인된 잠재적인 환경 영향이 7가지 관심 영역을 통해 GM 곤충에 대한 EFSA 지침 (EFSA, 2013)²에서 해석된 OX513A에 대해 평가되었다.

1. 수직적 유전자 전이를 포함한 GM 곤충의 지속성 및 침입성
2. 수평적 유전자 전이
3. 병원체, 감염 및 질병
4. GM 곤충과 표적 생물체의 상호작용
5. GM 곤충과 비표적 생물체의 상호작용
6. GM 곤충 관리에 사용된 특정 기술의 환경적 영향
7. 인간과 동물의 보전에 미치는 GM 곤충의 영향

비교측정자 선택

EFSA 지침은 Non-GM 동물(예. 방사선조사 불임유발 곤충, 야생형의 표적 방출 재포획 (mark release recapture, MRR))과 유사한 GM 및 Non-GM 형질과 GM 이벤트에 대한 이전의 응용으로부터 이전 지식과 경험을 끌어내는 것이 적절하다고 간주한다.

따라서 OX513A의 의도적 방출에 대한 이 ERA는 평가 중인 특정 위해성 영역과 관련된 적절한 비교측정자를 사용하여 수행되었다. 비교측정자에는 다음 중 하나 또는 여러 가지가 포함될 수 있다.

- a) 야생형 *Aedes aegypti*(변형된 계통과 유사한 유전적 배경을 가진 비변형 실험실 계통)
- b) 야생 *Aedes aegypti*(야생 지역 개체군)
- c) *Aedes aegypti*에 대한 기존 방제 수단

1.2 분자 특성화 및 표현형 특성화

OX513A의 유전적 형질전환은 자기제한 형질(tTAV 유전자의 발현에 의해 부여되는 것)과 형광성마커 형질(DsRed2 유전자의 발현에 의해 부여되는 것)과 같은 두 가지 의도된 형질을 암호화하는 두 유전자의 안정적인 통합을 포함하고 있다.

이 평가의 part A의 section 4.6 및 5.9에서 OX513A의 분자적 특성화 및 표현형 특성화 모두 유전자 변형의 결과로서 비의도적 효과를 나타내지 않는다고 결론지었다.

2. 관심 영역

OX513A의 의도적 방출과 관련된 7가지 특정 관심 영역은 Directive 2001/18/EC(EC, 2001)¹에서 채택된 6단계에 따라 평가되었다.

2.1 수직적 유전자 전이를 포함한 지속성(persistence) 및 침입성(invasiveness)

시험한 가설은 OX513A 또는 그 자손이 기존의 야생형 개체군보다 준-자연적 또는 자연 서식지에서 지속적이거나 침입적이지 않다는 것이다.

이 관심 영역에 대한 주요 고려 사항(EFSA 2013 기준)²:

1. OX513A가 수용환경에 지속되거나 침입할 가능성;
2. OX513A에 도입된 형질이 야생 *Aedes aegypti*보다 지속되거나 침투할 수 있는 결과 개체군에 대한 적합성을 증가시키는지 여부.
3. OX513A 또는 교잡종 개체수의 서식지 및/또는 지리적 범위를 변경하기 위해 도입된 형질에 대한 잠재력;
4. OX513A를 수용하는 환경에서 생존가능하고 우량한 자손을 생산할 수 있는 조건 하에서 동종 또는 다른 종의 non-GM 곤충을 번식시키고 잡종화할 수 있는 정도.

이러한 고려 사항을 다루면서, GM 곤충 자체 또는 그 잡종 자손의 유전자 변형과 관련된 적합성 효과는 비변형 비교측정자와 비교하여 평가된다.

이러한 맥락에서 다음의 두 가지 고려 사항을 주목해야 한다.

- a) OX513A의 자기제한 형질의 목적은 OX513A 수컷이 풀려나 야생의 암컷과 교배하고 그들의 자손이 성체기에 이르기 전에 죽는 기능적 유전적 '살균'이다. 이 효과는 야생 *Aedes aegypti*의 표적 개체군을 줄이기 위한 것이고, OX513A 또는 OX513 유전자를 가진 자손이 환경에서 정착할 수 없다는 것을 보증한다.
- b) *Aedes aegypti*는 이미 사바 섬에서의 매개체 방제 조치의 대상이 되는 질병 매개체이다. 매개체 방제는 매개체 매개 질병의 발병률을 효과적으로 감소시키는 것을 목표로 한다. *Aedes aegypti*는 사바 섬에서 침입종으로 간주된다.

Ad 1) 수용환경에 지속되거나 침입할 가능성이 있는 OX513A의 잠재력**Ad 2) OX513A에 대한 증가된 적합성을 부여하기 위해 도입된 형질의 잠재력**

이러한 첫 번째 두 가지 주요 고려사항을 다루기 위해, 유전적 변형의 결과로 바뀌거나 그로 인해 증가된 적합성에 기여할 수 있거나 사바 섬에 OX513의 지속성 또는 침입성에 기여할 수 있는 몇 가지 측면을 연구했다. OX513A와 비변형 비교측정자/야생형 계통은 다음과 같은 측면에 대해 비교되었다 : 분산 범위, 온도 반응, 생명표 변수, 교배 경쟁력 및 잠재적 확산성. OX513A에서의 치사성 발현은 환경에서의 tetracycline의 존재에 의존하기 때문에, 이 측면 또한 사바 섬에서 연구되었다. 형질 침투 및 비침투성 이형 접합체의 수명도 평가하였다.

분산 범위

성체 *Aedes aegypti*의 자발적 비행은 번식지 및 혈액 섭취장소 및 숙주가 있는지에 따라 약 200m로 제한된다. 현장 조건 하에서 OX513A의 분산은 *Aedes aegypti*에 전형적인 도시 서식지(브라질)와 말레이시아의 비전형적인 *Aedes aegypti* 서식지를 대표하는 사람이 살지 않는 산림지역에서 평가되었다. 두 실험에서, 야생형 *Aedes aegypti*와 비교하여 OX513A 수컷에 대해 유사한 분산 범위가 관찰되었다.

이 결과는 OX513A가 현장 조건에서 비변형 비교측정자와 비교하여 확장된 분산 범위를 가지지 않음을 나타낸다.

온도 응답성

이형접합성 OX513A의 온도 반응은 다양한 온도에서 OX513A를 사육하고 tetracycline의 부재하에 비변형 대조군과 비교하여 생존력을 평가함으로써 실험실에서 평가되었다. 이것은 다음을 입증하였다.

- OX513A는 통제된 실험실 조건(9°C 및 37°C) 하에서 정상적으로 보고된 범위를 벗어나는 온도에서는 생존하지 않는다.
- 온도는 특성 침투에 영향을 미치지 않는다.

이 결과는 OX513A가 비변형 비교측정자와 비교하여 확장된 온도 응답성을 가지지 않고 형질의 침투가 온도에 영향을 받지 않는다는 것을 시사한다.

생명표 변수

- (1) 실험실에서 사육한 야생형 계통(i.e. 실험실에서 사용하기 위해 설정된 계통) 및
 (2) 실험실에서 자란 야생포획 *Aedes aegypti*를 포함한 다양한 유전적 배경의 *Aedes aegypti*와 비교하여 다양한 생명표 변수가 OX513A에 대해 검사되었다. 유충은 tetracycline의 존재 하에서 자란다. 결과는 다음과 같다.
- (a) 변형되지 않은 *Aedes aegypti* 실험실 계통과 비교하여 OX513A 계통은 OX513A 유체의 생존율을 5% 낮추고 성체 수명을 감소시키는 것으로 나타났다.
- (b) OX513A와 비교하여 OX513A는 인도의 두 지역에서 기원한 야생 기원(야생에서 잡힌)의 *Aedes aegypti*를 제외하고는 OX513A의 첫 수령에서부터 성체까지의 약간 긴 발달 시간을 제외하고는 차이가 없다.

특정 생명표 변수를 검사한 결과 OX513A는 비변형 비교측정자에 비해 증가된 적합성을 갖지 못했다.

교미 경쟁력

야생형 *Aedes aegypti*와 OX513A의 성공적인 교미 경쟁력은 다양한 유전적 배경이 실험실 조건에서 증명되었지만 통계적으로 유의한 차이는 관찰되지 않았다. 또한 준-현장 연구가 말레이시아의 현장실험장(field house)과 케이먼 군도와 브라질의 환경 방출에서 수행되었다. 후자의 방출은 다른 가구 밀도와 장소 격리를 가진 도시 지역에서 수행되었으며 비변형 *Aedes aegypti*와 비교하였을 때 OX513A가 더 높은 교미 경쟁력을 나타내지는 않았다.

이 결과는 비변형 *Aedes aegypti*에 비해 OX513A의 교미 경쟁력에 차이가 없음을 나타낸다.

자기제한 특성의 침투

Tetracycline이 없는 경우, OX513A와 야생형 사이의 짝짓기로 탄생한 반접합성 자손의 95% 이상이 tTAV 형질의 발현을 통해 사망한다는 것이 일관되게 관찰되어왔다. 케이맨 군도의 현장과 브라질에서는 2개의 방출 지역에서 95% 이상의 특성 침투가 확인되었다. 파나마에서 2014년 방출된 환경방출 자료에 따르면 OX513A는 방출 후 6~8주 이상 환경에서 지속될 가능성이 거의 없다.

이 결과는 형질이 현장 조건에서 예상대로이며 환경에서 OX513A의 지속성을 방지하기에 충분하다고 여겨진다.

실험실 조건에서 비-침투성 OX513A의 수명

비-침투성 OX513A의 실험실 평가는 이러한 비-침투성 OX513A 반접합체의 수명이 야생형 비교측정자에 비해 현저하게 감소한 것으로 나타났다. 일부분(~20%)은 암컷이 두 번의 혈액 섭취를 하고 두 개의 알집을 생산할만큼 충분히 오래 살아남았다. 그러나 이것은 야생형 비교측정자보다 더 긴 수명을 초래하지는 않는다.

이러한 결과는 비-침투성 OX513A의 수명이 비변형 야생형과 비교하여 감소하였음을 나타낸다.

Tetracycline 및 그 유사체에 대한 용량 반응

자기제한 형질의 침투함수로서, 반접합성 OX513A 자손의 생존은 tetracycline이 없는 경우 크게 감소한다(< 5%). 따라서 환경 내 tetracycline 또는 그 유사체에 대한 반응은 생존가능성에 영향을 줄 수 있으며 따라서 수용환경에서 OX513A의 지속성에 영향을 미칠 수 있다. 과학 문헌에서 보고된 바와 같이, 수공간에 tetracycline과 그 유사물이 평균으로 보고된 농도가 표현형 구조를 가능하게 하는데 필요한 농도 이하로 잘 나타났다.

사바 섬에서 환경 내 tetracycline 발생의 주요 경로는 농업이나 폐수를 통한 것이다. 그러나 사바 섬에는 소규모 농업만이 존재하며 *Aedes aegypti*는 인간 거주 구역 근처의 빗물로 채워진 용기와 같이 깨끗한 물을 선호하기 때문에 폐수는 선호하는 번식 서식지가 아니다.

이러한 데이터는 OX513A 유충이 환경에서 OX513A의 생존을 증가시킬 만큼 충분히 높은 농도의 tetracycline을 조우하지 않을 것이라는 점을 나타낸다.

Tetracycline이 가득한 혈액

암컷 OX513A의 소수가 방출 후 환경에 존재할 가능성이 있다 (Figure 1).

성체 암컷 *Aedes aegypti*(예. 혈액 내)이 tetracycline이 포함된 혈액을 과량 섭취해도 반접합성 자손에서 OX513A 표현형의 침투에 아무런 영향을 미치지 않는다는 가설을 시험하기 위한 연구가 수행되었다. 대조군과 실험군간에 tetracycline 처치한 사람에서 발견된 가장 높은 용량보다 약 10배 높은 tetracycline의 농도와 tetracycline 처치한 동물의 혈액에서 발견되는 최고 용량의 5배 이상의 높은 tetracycline의 농도 간에서 유의한 차이가 관찰되지 않았다.

이 결과는 혈액(인간 또는 동물)에 tetracycline이 존재하기 때문에 OX513A 자손에서 특성 침투가 현저히 변화하지 않을 것이라는 점을 시사한다.

사바 섬에서 능동적/수동적으로 확산될 가능성

*Aedes aegypti*는 약 35g/l 염분 수준의 바닷물에서 생존하지 못한다고 보고되었다. 사바 섬은 바다로 둘러싸인 섬이므로, 방출 지점은 *Aedes aegypti*의 산란 범위 내에서 다른 모든 대륙과 효과적으로 격리된다. 유전적 변형은 *Aedes aegypti*의 분산 범위에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 보트, 기차 또는 자동차 등 수동적 수송과 같은 인간의 활동에 의한 분산이 가능하다. 현재 사바 섬 항구 및 공항에 입항하는 항구 주변에서 *Aedes aegypti*의 매개체 방제 노력에 사용된 방법은 섬 전체에서 사용된 방법과 일치한다. 여기에 정기적인 감시 및 번식지 통제에 추가하여, 치사성 ovitraps(<http://www.in2care.org>) 사용, 번식지에서의 장구벌레를 먹는 어류 이용 및 *Bacillus thuringiensis* 기반 유충제거제 사용과 같은 생물학적 방제 방법이 포함한다. 때문에 사바 섬에 상대적으로 낮은 *Aedes aegypti* 개체군 때문에, 성체 *Aedes aegypti*에 대한 살충제분무가 필요하다고 판단되지 않았다. 현재 사바 농업위생&매개체 방제부의 지시 하에 발생하는 항공기 또는 페리 내부 분무나 성체 *Aedes aegypti*에 대한 분무는 이루어지지 않고 있다(추가 정보, 2016년 11월 30일).

이 데이터는 OX513A의 분산이 사바 섬에서 야생형 *Aedes aegypti*와 같은 것으로 나타났다. 수동적인 수송이 일어날 경우, OX513A 수컷 또는 교잡종 자손은 생존 기간이 제한적일 것이다.

Ad 3) OX513A 또는 잡종 개체군의 서식지 및/또는 지리적 범위를 변경하기 위해 도입된 형질의 잠재력

이 주요 고려사항을 위해 OX513A의 서식지 및/또는 지리적 범위를 변형시킬 수 있는 측면이나 유전자 변형의 결과로서의 교잡종 개체군을 연구했다. 고려된 측면은 OX513A의 온도 반응, 특성 침투 및 분산 범위에 대한 온도의 영향 등이다. 결과는 위에 설명되어 있다.

Ad 4) OX513A가 생존가능하고 우수한 자손을 생산하기 위한 수용환경 조건 하에서 동종 또는 다른 종의 non-GM 곤충과 번식 및 교잡할 수 있는 범위

*Aedes albopictus*는 *Aedes aegypti*와 가장 밀접한 관계가 있는 종으로, 수용환경에서 만날 수 있다. 교배에 대한 여러 장벽이 있음에도 불구하고, *Aedes aegypti*와 *Aedes albopictus* 사이의 중간 교배는 케이지(caged) 조건 하에서 그리고 현장에서 매우 낮은 빈도로 관찰되었지만 살아있는 자손을 초래한다고 보고되지는 않았다.

실험실 조건에서 말레이시아 배경의 OX513A가 야생형 *Aedes albopictus*가 성공적으로 중간 교잡되었다는 증거는 발견되지 않았다.

이러한 결과는 OX513A가 *Aedes albopictus*와 이종교배하는 변형된 능력을 가지고 있지 않음을 나타낸다.

결론

위에서 다음의 결론을 얻을 수 있다:

1. OX513A는 수용환경에 침투하거나 침입할 가능성이 없다.
2. OX513A 동형접합 성체와 OX513A 반접합성 자손은 야생 *Aedes aegypti*보다 더 오래 지속되거나 침투할 수 있는 증가된 적합성을 갖지 못한다.
3. OX513A는 OX513A 모기 또는 잡종 개체군의 서식지 및/또는 지리적 범위를 변경시킬 가능성이 있는 특성을 도입하지 않았다.
4. OX513A는 수용환경에서 다른 종의 모기로 성공적으로 번식 할 수 없다.

GMO 사무국은 야생형 *Aedes aegypti*와 비교하여 OX513A의 지속성 또는 침습성이 증가할 가능성이 낮다고 상기 결론을 확인한다. 이는 다음과 관련한 OX513A의 데이터를 기반으로 한다 :

- 생존
- 분산
- 온도 응답성
- 생명표 변수
- 밀접한 관련성이 있는 *Aedes albopictus*와 성공적인 교배가 이루어지지 않음
- OX513A의 교미 효율

GMO 사무국은 사바 섬 *Aedes aegypti* 번식지에 tetracycline이 존재하지 않을 것으로 보이며 인간 또는 동물 혈액에서 tetracycline 농도가 OX513A의 생존을 지지하지 않을 것이라고 확인했다.

2.2 수평적 유전자 전이

시험한 가설은 OX513A에 새로 도입된 유전자(tTAV, DsRed2)가 수평적 유전자 전이(HGT)라는 과정을 통해 다른 생물체로 옮겨진다는 것이다. 이러한 생물체는 이러한 획득된 유전자의 결과로서 준-자연 또는 자연 서식지에 악영향을 미치지 않는다.

수평적 유전자 전이(HGT)는 EFSA(2013)²에서 “생물체가 다른 생물체의 유전체 물질을 그 생물체의 자손이 아닌 유전체로 통합하는 모든 과정”으로 정의하였으며, 그렇지 않으면 하나의 생물체에서 또 다른 생물체로 교미 없이 기능적 유전자요인이 유전적 전이되는 것이라 할 수 있다.

(EFSA 2013 기준)²에 따른 관심 영역에 대한 고려사항은 다음과 같다 :

1. HGT의 확률과 빈도, 잠재적 수용생물체에서 곤충 DNA의 유전성.
 - 다양한 수용생물체에 노출된 곤충 DNA의 양과 크기;
 - 다세포 생물에서의 생식 세포의 존재 또는 직접적 DNA 또는 DNA 매개체 노출에 영향을 받는 단세포 생물체;
 - 그러한 세포가 재조합 곤충 DNA를 흡수할 수 있는 메커니즘의 존재;
 - 전위된 DNA가 생식세포 또는 복제 단위에서 통합되고 유전체적으로 안정화 될 수 있는 유전자재조합/통합 과정의 존재.

2. 낮은 빈도로 발생할 수 있는 HGT 이벤트의 생물학적 관련성은 다음을 고려한 추가적 수직적 전이의 가능성에 직접적으로 좌우된다.
- 형질이 개체군 내에 전파될 수 있도록 HGT 사건 수용자의 양성선택으로 이어지는 조건;
 - 유전자재조합 DNA의 gene drive systems의 존재로 인해 HGT 이벤트가 후속의 수직적 전이 과정에서 빈번히 발생할 가능성

Ad 1) HGT의 확률

문헌적 검토

HGT 확률을 연구하기 위해 수용환경에서 HGT에 의한 잠재적인 노출 경로에 관련한 문헌적 검토가 수행되었다. 식물 또는 곤충과 같은 다세포 생물체(진핵생물)에서 다른 생물체로의 HGT는 매우 드문 경우이며 최적화된 실험실 조건에서 때때로 탐지된다. 현재의 과학 지식은 관련이 없는 생물체(곤충에서 미생물로)와 같은 비 이동성 DNA 단편의 비-성적 유전자 전달이 자연조건 하에서 일어날 가능성이 극히 낮으며, 일어난다면 진화론적 시간대에 발생한다는 의견을 지지한다. 경구섭취 생물체에서 *Aedes aegypti*의 포식자 또는 기생충과 같은 인간, 동물 및 기타 생물체의 장내 세균에 이르기까지 HGT를 설명한다.

문헌적 검토는 곤충과 다른 비관련 생물체 사이의 HGT의 확률이 자연 조건에서 발생할 가능성이 매우 낮다는 것을 나타낸다.

위의 결론은 미국 농무부(USDA)가 유전자재조합 초파리로부터 수평적 유전자 전이의 가능성을 검토한 결과 확인되었다(https://www.aphis.usda.gov/plant_health/ea/downloads/eis-gen-pbw-ff.pdf)(2016년 9월 2일 확인함).

Transposon의 재동원(Remobilization)

새롭게 삽입된 유전자는 다양한 조건 하에서 외인성 전이효소에 노출되어도 *Aedes* 유전체에서 매우 안정한 transposon인 piggyBac 벡터에 위치하고 있다 (추가 정보, 2016년 11월 30일). 형질전환된 계통주 OX513A의 불안정성은 115 세대 이상에서 현재까지 관찰되지 않았다.

데이터는 OX513A 매개체가 *Aedes aegypti*에서 매우 안정하다는 것을 나타낸다.

Ad 2) HGT의 생물학적 적절성

곤충과 다른 생물체 사이에 HGT가 발생할 확률은 극히 낮지만 완전히 배제될 수는 없다. A이것이 일어날 경우, 이것은 tTAV 및 DsRed2 유전자의 전달을 유도할 것이다. 이 유전자에 의해 암호화된 단백질은 사료 분석 및 생물정보학적 분석에 근거한 독성 또는 알레르기성이 아니므로 악영향을 유발하지는 않는다. 더욱이 tTAV와 DsRed2 형질은 곤충에 대한 선택적인 이점을 주지 못하며 다른 생물체의 경우에는 그렇게 될 것 같지 않다. tTAV는 실제로 설체에 의한 선택적 불이익(i.e. 자기제한 형질)을 부여하기 위한 것이고 잠재적인 HGT 후에는 수용생물체의 적합성 감소로 이어진다.

HGT가 발생하더라도 이것이 악영향을 유발하지 않는다.

결론

문헌 조사 및 OX513A에서 삽입체의 안정성에 대한 자료에 근거하여, GMO 사무국은 OX513A에서 다른 생물체로의 HGT 확률이 매우 낮다고 결론지었다. 그러한 HGT가 발생할 수 있다고 해도, 준-자연 또는 자연 서식지에 악영향을 주는 것으로 간주되지 않는다.

2.3 병원성, 감염성 및 질병

시험한 가설은 OX513A 또는 그 자손이 Non-GM 비교측정자보다 질병 전파에 더 효과적이지 않을 것이라는 점이다.

EFSA(2013)²에 근거한 관심 영역의 주요 고려사항은 다음과 같다 :

1. OX513A의 사육 및 방출이 병원체 전파의 전파 범위 또는 빈도를 변화시킬 수 있는지 여부;
2. OX513A의 사육 및 방출이 병독성이 증가된 새로운 병원체 또는 병원체 계통의 도입/출현/선택을 유도할 수 있는지 여부;
3. OX513A가 병원체 개체군을 변화시키는 대사산물을 방출할 가능성;
4. 야생 *Aedes aegypti*가 존재하지 않고 새로운 질병원이 되는 환경에 OX513A가 병원체를 도입할 가능성;
5. 병원체의 전염을 증가시키는 결과로 OX513A의 표현형이 바뀌도록 병원체와의 상호작용이 변화하는지.

이러한 고려 사항을 다루기 위해 조사된 특정 영역은 다음과 같다 : 수직적 전이, 매개체 용량, 동형접합성 암컷의 잠재적 방출, 비표적 매개체 종의 출현, 화학살충제에 대한 감수성 및 살충제에 대한 OX513A의 행동 반응. 온도 반응으로 인해 지리적 범위가 확장될 수 있는 가능성은 이 위해성 영역에 영향을 미칠 수 있으며 part C의 Section 2.1에서 다루어졌다.

Ad 1) OX513A의 사육 및 방출로 인한 병원체 전염의 전파 범위 또는 빈도 변화

OX513A의 사육과 동형접합성 암컷의 잠재적 방출

암수를 분리하고 수컷 번데기를 모으기 위해서, 암컷 번데기가 수컷보다 크기 때문에 기계적 크기 분리법이 사용된다. 이전 OX513A 규제된 환경방출 데이터는 운영적 규모 프로젝트에서 >99.9%의 분별정확도가 일상적으로 달성된다는 것을 입증한다. SOP는 0.2% 이하의 분별 효율을 요구한다. 이는 방출된 OX513A의 ≤0.2%가 암컷이 됨을 의미한다. 역압 프로그램 중, ~300 OX513A 수컷/사람/주만큼 높은 방출율이 예상되며, 이는 최대 (최악의 경우) 약 1 OX513A 암컷/사람/주($0.2\% \times 300 = 0.6$)가 될 것이다. OX513A 암컷은 야생형 *Aedes aegypti*보다 바이러스의 수직적 전이에 대한 수명과 온도 범위가 더 큰 매개체 능력을 갖지 않으며(아래 참조) 바이러스 전파의 증가가 기대되지 않는다.

환경에서의 OX513A 모기 수컷의 우발적인 공동 방출은 수용환경에서 발생하는 조건 하에서 바이러스 전염을 증가시키지 않을 것으로 예상된다.

방출된 동형접합성 암컷의 잠재적 수직적 전이

감염된 암컷에서 병원균을 질병 유발인자 또는 병원체가 통과하여 그 자손에게 전달하는 것을 수직적 전이라고 한다. OX513A 및 야생형 비교측정자인 *Aedes aegypti* 암컷에 대해 땀기 바이러스(DENV) 1,2,3,4 및 치쿤쿠니아(CHIKV) 바이러스의 수직적 전이 능력을 조사하였다. OX513A 및 야생형 모두 DENV 1, 3 및 4에서는 양성의 수직적 전이가 관찰되었지만 DENV 2 및 CHIKV에서는 양성의 수직적 전이가 관찰되지 않았다. OX513A와 야생형 사이에는 유의한 차이가 관찰되지 않았다.

연구에서 지카 바이러스의 수직적 전이 여부는 포함되지 않았지만, 지카 바이러스(ZIKV)의 수직적 전이 용량이 다른 Flavivirus(i.e. DENV)의 용량과 다르다는 증거는 없다(추가정보, 2016년 11월 30 일).

데이터에 따르면 OX513A는 야생형과 비교하여 시험한 바이러스의 수직적 전이용량이 증가하지 않았음을 나타낸다.

이형접합성(heterozygous) 암컷의 매개체적 용량

수직적 전이 외에도 질병을 전파시키는 능력(매개체 용량, vector capacity)은 모기에 대한 매개체-사람을 무는 빈도, 매개체 밀도, 매개체 생존 및 바이러스 외인성 배양기간(extrinsic incubation period, EIP)을 포함하는 다른 곤충학적 요소를 포함한다. 따라서 모기의 수명은 수명이 짧을수록 질병의 전파 가능성이 적어지므로 매개체 용량의 중요한 구성요소이다. 질병을 전파시키기 위해서는 암컷 모기가 혈액 섭취를 통해 바이러스를 집어내고, 외래 잠복기 동안 생존한 후 후속 혈액 섭취 중에 바이러스를 전파해야 한다. 결과적으로, 암컷의 수명이 길수록 병원균을 전달할 확률이 높다. 평균 EIP는 온도에 따라 달라지며 25°C에서 15일, 30°C에서 6.5일로 추정된다. OX513A 암컷 자손이 자기제한 형질의 불완전한 침투로 인해 생존할 가능성이 있다. 그러나 비-침투성 암컷의 평균 생존율은 현저하게 감소한다(2일 vs 68 일). 이 암컷의 약 20%는 2회 혈액섭취를 할 수 있을 정도로 오래 살아남았으며 일부는 2개의 알집을 낳았다. 비침투성 OX513A 반접합체 암컷의 생존은 야생형 *Aedes aegypti* 대조군의 생존율보다 적다. 따라서 야생형 모기에 비해 질병 전파 능력이 저하될 것으로 예상된다.

tTAV 형질의 불완전한 침투로 인해 환경에서 살아남은 암컷 이형접합체의 수명 및 질병 전달 능력은 야생형과 비교하여 증가하지 않는다.

Ad 2) 사육 및 방출로 인한 병독성이 증가된 새로운 병원체 또는 병원체 계통의 도입/출현/선발

OX513A 사육 및 사육관리기법

알 생산을 위한 혈액접취 암컷을 포함한 사육 관리절차와 방출절차는 SOPs에 잘 기술되어 있으며, 수용환경 내 병원체를 도입하는 데 거의 기여하지 않거나 변경된 전파율로 이어질 수 있다. 억제 프로그램에 사용하기 위해 OX513A 품질을 보장하는 품질 관리절차가 있으며, 제품 사양에 부합하도록 일상적인 품질관리 테스트가 수행된다.

사육 절차는 수용환경에 병원체를 도입하는데 기여하지 않을 것이다.

Ad 3) OX513A가 병원체 개체군을 변화시키는 대사산물을 방출할 가능성

유전자변형의 결과로 OX513A에서 발현되는 유일한 새로운 단백질은 tTav 및 DsRed2 단백질이다. 이 단백질들은 OX513A 암컷의 타액에서 탐지되지 않았다.

병원체 개체군을 변화시킬 수 있는 대사산물이 없다.

Ad 4) OX513A 사육 및 방출 프로그램의 잠재적 실패로부터 파생되는 질병 전파와 관련된 유해 가능성

사육 및 방출 프로그램의 잠재적인 실패로 인해 많은 수의 암컷 OX513A가 환경에 도입될 수 있다. OX513A 암컷은 야생형 *Aedes aegypti*보다 수명 및 온도 범위, 바이러스의 수직적 전이 능력이 더 크지 않기 때문에, 질병 전파와 관련된 유해를 초래할 가능성은 거의 없다.

OX513A 사육 및 방출 프로그램의 잠재적인 실패로 인해 질병 전파와 관련된 유해가 발생할 가능성은 희박하다.

Ad 5) 야생 *Aedes aegypti*가 존재하지 않고 새로운 질병원이 되는 환경에 OX513A가 병원체를 도입할 가능성

비표적 매개체 종의 출현

*Aedes albopictus*는 아직 사바 섬에 보고되지 않았지만 사바 섬에 잠재적인 공중위생 위협으로 확인되었으며 Leeward 및 Windward 네덜란드 제도에 대한 예비 경고 목록에 포함되었다. *Aedes albopictus*가 사바 섬에 도착하면, *Aedes albopictus*가 OX513A 프로그램을 통해 수용환경에서 기존 *Aedes aegypti*를 대체하거나 제거 목표가 달성된 후에 정착하여, 사바 섬에 뎅기 바이러스, 치쿤쿠니아 바이러스 및 황열과 같은 Arbovirus의 전파 위험이 증가할 가능성이 있다. 이것은 다음을 평가하여 검사한 것이다:

- Aedes albopictus*가 *Aedes aegypti* 생태학적 틈새를 차지할 가능성이 있다면 *Aedes aegypti* 숫자는 OX513A 프로그램을 통해 기존의 통제 조치에 비해 감소된다. 그리고
- Aedes albopictus*가 *Aedes aegypti*보다 arbovirus 전송에 더 큰 위협이 되는지 여부

Ad a) *Aedes albopictus*에 의한 틈새 대체가능성은 사바 섬에 있는가?

*Aedes aegypti*의 생태학적 틈새가 *Aedes albopictus*와 구별되는 경우가 종종 있는데, *Aedes aegypti*는 주로 도시의 매개체로 유지되고 인공적 용기에서 번식하며 거의 사람의 혈액만을 먹이로 섭취한다. *Aedes albopictus*는 도시 주변 및 농촌 환경과 주로 관련되어 있으며 인간뿐만 아니라 다양한 포유류 및 조류 종의 혈액을 섭취한다. 그러나 이 서식지 분리는 두 종 모두 같은 지역에서 공동 거주할 때 애벌레 경쟁으로 인한 것일 수 있다. *Aedes aegypti*가 없으면, *Aedes albopictus*는 도시 지역으로 쉽게 침입하는 것으로 나타났다.

*Aedes aegypti*와 *Aedes albopictus*는 모두 사람 숙주의 혈액을 섭취하는 컨테이너-번식(container-breeding) 종이므로 인간 거주지에 근접한 곳에서 상당한 서식지 겹침이 예상될 수 있으며 두 종의 애벌레 동거가 빈번하게 관찰된다. 사바 섬의 맥락에서 *Aedes albopictus*가 *Aedes aegypti* 생태계를 차지할 가능성은 *Aedes aegypti* 수가 줄어들면 배제할 수 없다. 이것은 *Aedes albopictus*가 아직 사바 섬에 보고되지 않았기 때문에, 현재가 아닌 미래와 관련이 있는 이야기일 수 있다.

Aedes aegypti 개체군이 억압된 경우, 사바 섬에서 *Aedes albopictus*에 의한 *Aedes aegypti* 대체에 대한 불확실성

Ad b) *Aedes albopictus*에 의한 바이러스의 전이 증가 가능성이 사바 섬에 있는가?

*Aedes aegypti*와 *Aedes albopictus*는 모두 arboviruses인 뎅기 바이러스와 치쿤쿠니아 바이러스를 전파할 수 있다. WHO는 일반적으로 *Aedes albopictus*는 지카 바이러스를 포함하여 arbovirus를 전염시키는 *Aedes aegypti*보다 낮은 매개체 능력을 가진 것으로 여겨지지만 *Aedes aegypti*와 *Aedes albopictus*의 매개체 능력은 유사하다고 하였다. 매개체로서의 능력은 실험적으로 평가되었다. *Aedes aegypti*와 *Aedes albopictus*가 지카 바이러스에 대한 유사한 전파가능성을 보이는 것으로 결론지을 때, *Aedes albopictus*의 존재는 지카 바이러스 전염에 대한 증가된 위협을 나타내지 않을 것이다. *Aedes albopictus*가 현재 사바 섬에 현재 보고된 바는 없지만, *Aedes albopictus*가 *Aedes aegypti*보다 뎅기 바이러스, 치쿤쿠니아 바이러스 및 지카 바이러스에 대한 유능한 매개체라는 증거가 없는 것으로 나타났다.

사바 섬에서 *Aedes albopictus*에 의한 *Aedes aegypti* 대체가 OX513A 방출의 결과로 발생한다면, 뎅기 바이러스, 치쿤쿠니아 바이러스 및 지카 바이러스에 의한 인간 질병 부하가 *Aedes aegypti*에 비해 증가할 것 같지는 않은 것으로 고려된다.

GMO 사무국은 *Aedes aegypti*가 일광 시간에 거의 독점적으로 사람을 물어 혈액을 섭취하며, 일반적으로 실내에서 휴식을 취한다고 지적한다. 대조적으로, *Aedes albopictus*는 일반적으로 exophagic(숙주 외부에서 공급되는 기생충)이며 기회주의적으로 인간과 동물을 물어뜯는다. *Aedes albopictus*는 또한 특정 맥락에서 *Aedes aegypti*와 유사한 강한 인간기호성(anthropophilic) 행동을 보인다. *Aedes aegypti*와는 대조적으로 *Aedes albopictus*를 통해 인체에 인수공통감염병을 전파시키는 것은 인간의 혈액만을 섭취하기 때문에 배제할 수 없다. 그러나 이것이 사바 섬에서 일어날 가능성은 적다고 여겨진다.

사바 섬에서 *Aedes albopictus*에 의한 *Aedes aegypti*의 대체가 OX513A 방출의 결과로 발생한다면 동물 보균자에서 사람으로 바이러스가 전파될 수 있는 인수공통감염병 위해성이 증가한다. 그러나 이것이 사바 섬에서 일어날 가능성은 낮을 것으로 여겨진다.

5)에서 기술된 문제는 OX513A의 유전적 변형과 관련이 없지만 사바 섬에서의 야생형 *Aedes aegypti*의 효과적인 억제 결과라는 점에 유의해야 한다. 이와 같이 사바 섬에서 *Aedes albopictus*에 의한 *Aedes aegypti*의 대체는 *Aedes aegypti*를 효과적으로 억제하는 모든 매개체 방제 방법에서 발생할 수 있다.

Ad 6) OX513A에서 표현형이 변화되어 병원균의 전파가 증가하는 병원체와의 상호 작용 변화

표현형의 변화를 초래할 수 있는 차이는 발견되지 않았고, 잠재적으로 OX513A에 의한 병원체의 전파를 증가시킨다

기타 연구된 측면들

화학살충제에 대한 민감성

화학살충제는 OX513A 계통을 환경에서 제거하려는 위해성관리전략의 일환으로 사용될 수 있기 때문에 화학살충제에 대한 민감성은 OX513A의 중요한 특징이다. OX513A와 민감한 야생형 계통(대조군)은 일반적으로 사용되는 4가지 살충제 (temephos, permethrin, deltamethrin 및 malathion)에 똑같이 영향을 받고 bendiocarb에 대해서도 유의한 생존율을 보였다. pyrethroid와 DDT 내성과 관련된 두 가지 kdr 돌연변이는 OX513A 계통에서는 발견되지 않았다.

데이터에 따르면 OX513A는 가장 흔하게 사용되는 살충제에 대해 비변형 비교측정자 계통과 똑같이 민감하다.

살충제에 대한 OX513A의 행동 반응

OX513A 수컷 모기의 행동 반응은 pyrethroids에 대한 상당한 접촉 자극성 및 DDT에 대한 상당한 공간적 반발성을 포함하여 야생형 계통에 의해 나타나는 것과 유사했다.

야생형 비교측정자와 비교하여 OX513A의 특정 화학살충제에 대한 행동 반응의 변화는 관찰되지 않았다.

결론

GMO 사무국은 OX513A 또는 그 자손이 각각 Non-GM 비교측정자 계통에 비해 뎅기 바이러스, 치쿤쿠니아 바이러스 및 지카 바이러스와 같은 인체 보건의 중요한 의미의 arboviruses를 전염시키는데 더 효과적이지 않을 것이라는 Oxitec의 결론을 확인한다. 이는 다음과 같은 결론을 기반으로 한다.

1. OX513A는 비변형 기존 종과 비교하여 뎅기 바이러스, 치쿤쿠니아 바이러스 및 지카 바이러스와 같은 arbovirus의 수직적 전이에 대한 증가된 용량을 가지고 있지 않다.
2. 환경에서 OX513A 모기 압력의 우발적인 공동방출로 인해 증가된 바이러스 전파는 기대되지 않는다.
3. 사육 절차는 병원체 도입에 기여하지 않을 것이다.

또한 GMO는 OX513A 방출의 결과로 사바 섬에서 *Aedes albopictus*에 의한 *Aedes aegypti*의 대체가 발생할 때 뎅기 바이러스, 치쿤쿠니아 바이러스 및 지카 바이러스에 의한 인간의 질병 부하량이 변하지 않을 것이라고 결론지었다.

또한, GMO 사무국은 OX513A 방출의 결과로 사바 섬에서 *Aedes albopictus*에 의한 *Aedes aegypti*의 대체가 일어날 경우, 동물 보균자에서 사람으로 인수공통감염병 바이러스가 전이될 위해성이 증가한다고 결론지었다. 그러나 이것이 사바 섬에서 일어날 발생가능성은 낮다고 여겨진다.

위에서 언급했듯이, GMO 사무국은 사바 섬에서 *Aedes albopictus*에 의한 *Aedes aegypti*의 인체 보건과 환경의 잠재적인 결과가 OX513A의 유전적 변형과 관련이 없지만, 사바 섬에 야생형 *Aedes aegypti*의 효과적인 억제 결과라고 지적했다. 이와 같이 사바 섬에서 *Aedes albopictus*에 의한 *Aedes aegypti*의 대체는 *Aedes aegypti*를 효과적으로 억제하는 모든 매개체 방제 방법에서 발생할 수 있다.

GMO 사무국은 또한 야생형 *Aedes aegypti*의 방제를 위해 가장 일반적으로 사용되는 화학 살충제가 OX513A의 위해성관리전략의 일부로 사용될 수 있다고 언급했다.

2.4 표적 생물체와의 상호작용

시험한 가설은 OX513A가 의도한대로 표적 생물체(*Aedes aegypti*)와 의도적으로 상호작용하고, 표적 생물체와의 상호작용이 현재 매개체 방제 프로그램과 비교하여 준-자연 또는 자연환경에 악영향을 미치지 않는다는 것이다.

EFSA(2013)² 근거의 이러한 가설을 시험하기 위한 주요 고려 사항은 다음과 같다 :

1. 조건부 곤충 방제 특성에 대한 관찰된 저항성;
2. GM 곤충 매개효과에 대한 표적 생물체의 효능 또는 저항성 발달 감소;
3. 악영향을 일으킬 수 있는 사육된 GM 곤충 개체군의 유전적 다양성 변경으로 인한 표적 생물체와의 상호작용 변화;
4. 악영향을 초래할 수 있는 저품질 GM 곤충 또는 Non-GM 곤충의 방출로 인한 표적 생물체에 대한 영향

Ad 1) 조건부 곤충 제어 특성에 대해 관찰된 저항성

현재까지 OX513A 자기제한 형질에 대한 내성은 2002년 이후 115세대 이상에 걸쳐서 확인되지 않았다. 또한 OX513A가 방출된 지역의 매개체 통제 조직은 통합 매개체 관리(IVM) 프로그램의 일부로서 기존의 간섭기법을 사용하여 야생 *Aedes aegypti* 개체군을 계속 모니터링하고 통제하고 있으나, 아직 자기제한 형질에 대한 저항성은 보고되지 않았다.

야생형 *Aedes aegypti*의 OX513A 형질에 대한 저항성은 관찰되지 않았다

Ad 2) GM 곤충 매개 효과에 대한 표적 생물체의 효능 또는 저항성 발달 감소

OX513A의 의도적 방출은 매개체 방제 프로그램 및 학계의 파트너와 협력하여 2009년 후반부터 실시되었으며, 매개체 방제 프로젝트에서 개체군 억제(알 개수 기준 >90%)가 지속적으로 관찰되어왔다.

OX513A의 효능 감소는 관찰되지 않았다.

Ad 3) 악영향을 초래할 수도 있는 사육된 GM 곤충 개체군이 유전적 다양성의 변화를 일으키는 표적 생물체와의 상호작용 변화

기존 방제 프로그램은 *Aedes aegypti*를 제어하려고 시도하므로 개체군 억제는 모든 방제 프로그램의 허용되고 의도된 결과이다. *Aedes aegypti*는 방출 지역의 토착종이 아니므로 개체군 규모의 감소는 비-토착 해충의 정착 이전의 환경으로 환경을 복원하는데 도움이 될 수 있다(EFSA, 2013).

의도적 효과는 야생형 *Aedes aegypti* 개체군의 억제이다.

실험실에서 사육한 OX513A와 야생형 모기 계통의 변동성

야생 개체군에 즉각적인 영향을 미칠 수 있는 주요 변수는 OX513A가 지역 *Aedes aegypti*와 교배하여 자손을 생산할 수 있는 능력이다. 다른 재생산성 지표의 증가된 교미 경쟁력 또는 변동성은 관찰되지 않았다.

실험실에서 사육한 OX513A와 야생형 모기 계통 간의 악영향을 일으키는 변동성은 관찰되지 않았다.

Ad 4) 악영향을 초래할 수 있는 저품질 GM 곤충 또는 Non-GM 곤충의 방출로 인한 표적 생물체에 대한 영향

실험실 사육계통의 품질과 암컷 모기 방출의 잠재적 심각성

EFSA(2013)는 표적 생물체에 미치는 영향이 비변형 생식능력이 있는 사육된 개체(i.e. 수컷만을 의도적으로 방출한 암컷의 상당 비율) 또는 기생충이나 병원균으로 오염된 곤충의 비의도적 방출로 인해 발생할 수 있다고 제안한다.

OX513A 콜로니는 품질관리 프로그램에 따라 고도로 통제된 환경에서 사육되어 수컷이 야생 암컷과 교미하기에 최적의 건강과 품질을 유지하도록 한다. 콜로니는 지속적으로 모니터링 되고 일상적으로 여러 지표에 대한 품질관리 테스트를 거친다.

OX513A 방출 프로그램에는 소량의 두 종류의 암컷 모기가 환경에 존재할 가능성이 있다(Figure 1). 첫 번째는 (a) 동형접합성 수컷을 가진 동형접합성 (OX513A) 암컷의 우발적인 공동 방출이며, 두 번째는 (b) 자기제한 형질의 불완전한 침투의 결과로서 야생 암컷과 교미하고 살아남은 방출된 수컷과의 반접합성 OX513A 자손이다.

a) 동형접합성 수컷과 동형접합성 암컷(OX513A)의 부주의한 공동방출

수컷과 암컷의 *Aedes aegypti* OX513A의 대량생산에서 분류효율은, 99.9% 이상의 효율로 수컷과 암컷의 번데기를 물리적으로 분리한다. 동형접합성 OX513A 암컷의 출현은 OX513A 암컷과 야생 수컷 *Aedes aegypti*로부터의 반접합성 OX513A 자손의 생성을 잠재적으로 일으킴으로써 *Aedes aegypti* 표적에 영향을 미칠 수있다. 이 시나리오는 야생 암컷 *Aedes aegypti*와 교미하는 OX513A 수컷과 동일한 개체군 집단에 대한 의도된 효과를 나타낸다.

b) 반접합성 암컷 OX513A의 생존

자기제한 특성의 불완전한 침투의 결과로 현장에서 생존하는 반접합성 암컷들이 현장에서 살아남을 잠재력이 있다. OX513A 수컷과 암컷 모두의 수명은 야생형의 수명보다 유의하게 낮았다. 자세한 내용은 part C의 section 2.3에서 논의된다.

결론

OX513A와 표적 생물체의 상호작용과 관련하여 GMO 사무국은 다음과 같이 결론을 내린다.

1. 조건적 곤충 방제 형질에 대한 저항성은 전에 관찰되지 않았다.
2. GM 곤충매개 효과에 대한 표적 생물체의 효능 또는 저항성 발달의 감소는 제안된 환경방출 기간 또는 IVM 프로그램의 맥락에서 장기적으로 발생하지 않을 것이다.
3. 악영향이 관찰되거나 예상될 수 있는 사육된 GM 곤충 개체군에 의해 유전적 다양성이 변경됨에 따른 표적 생물체와의 상호작용에 변화가 없다.

악영향을 초래할 수 있는 저품질 GM 곤충 또는 Non-GM 곤충의 방출로 인한 표적 생물체에 대한 영향은 기대되지 않는다.

2.5 비표적 생물체와의 상호작용

시험한 가설은 야생형 *Aedes aegypti*와 비교하여 OX513A가 현재 매개체 방제를 고려한 준-자연 및 자연 지역의 비표적 생물에 악영향이 없는지 여부이다.

EFSA(2013)²에 근거한 주요 고려사항은 다음과 같다 :

1. 부하량 또는 종 구성에 미치는 영향:
 - a) 천적/포식자 및 그들이 제공하는 해충 규제 서비스;
 - b) GM 곤충과 그들이 제공하는 생태 기능의 경쟁자;
 - c) 수분자 및 이들이 제공하는 수분 서비스;
2. 보전가치종(희귀종 또는 멸종위기종), 또는 문화적 가치(미학적 가치) 및 먹이사슬 효과에 관한 생물다양성에 대한 영향;
3. *Aedes aegypti*를 분해자 및 분해자원, 영양물질 순환, 수질 조절 및 정화를 위한 자원으로 포함하는 다른 생태계 서비스에 대한 영향;
4. 숙주 식물 또는 숙주 동물 및 그들이 제공하는 생태계 서비스의 부하량 또는 종 구성에 미치는 영향;
5. GM 곤충과 관련된 독소 또는 알레르겐이 식충식물에 미치는 영향.

Ad 1) 천적/포식자, 경쟁자 및 수분자와 같은 종의 부하량 또는 구성에 미치는 영향

이 section에서는 사바 섬에 OX513A 수컷의 도입에 의한 지역 *Aedes aegypti* 개체군의 억압이 *Aedes aegypti*를 먹이로 삼거나 또는 그들이 제공하는 생태 기능의 개체군에 부정적인 영향을 줄 수 있는지를 평가한다.

*Aedes aegypti*는 사바 섬의 침입종으로, 따라서 수용환경에서 다른 생물체와 공동 진화하지 않았으며 다른 생물체가 먹이로 삼는 핵심종을 대표하지는 않는다.

*Aedes aegypti*가 세포 내 세균인 *Wolbachia*를 운반하기 위해 수행된 최근의 위해성 평가에서, *Aedes aegypti*는 자연생태계와의 상호작용을 일으키지 않을 것이고, 다른 종들은 먹이 품목 또는 생태계 서비스 제공자로서 *Aedes aegypti*에 대해 강력하거나 적절하게 의존할 가능성이 없다고 결론지었다.

*Aedes aegypti*의 포식자

비표적 포식자 생물체는 *Toxorhynchites* spp., 잠자리, 거미, Mesocyclops와 같은 수인성 갑각류, 도마뱀 및 게코도마뱀과 같은 양서류, 어류, 곤충을 먹이로 삼는 새 및 박쥐와 같은 무척추동물 종을 포함할 수 있다. 과학 문헌은 종종 모기 포식자가 일반화된 포식자로 간주됨을 나타낸다. *Aedes aegypti*는 사바 섬의 침입종이므로, *Aedes aegypti*만 먹이로 하는 핵심종이 있을 것으로 보이지는 않는다.

포유류(박쥐)

성체 모기가 실내에 남아있기 때문에 일반적으로 옥외에서 발견되는 모든 종의 먹이의 많은 부분을 형성하지는 않을 것이다. 박쥐가 새벽과 해질녘에 주로 활동하는 반면 *Aedes aegypti* 모기는 대낮에 활동적이다.

미국 모기방제협회(American Mosquito Control Association, AMCA)는 모기 방제를 위한 박쥐의 역할을 검토했는데, 박쥐가 모기를 먹지만 박쥐에 의한 모기의 소비는 검토된 연구에서 야생에서 포획한 박쥐의 내용물의 1% 미만으로 구성되었으며, 나방과 같은 다른 곤충들은 더 나은 영양가를 제공한다고 지적했다. 위장의 내용물 분석이나 분변 펠렛 분석을 통한 먹이분석을 통해 박쥐는 기회주의적으로 먹이를 먹는 종(opportunistic feeders)으로 나타났다. 따라서 OX513A가 포유류에 악영향을 미치지 않을 것이다.

조류

잠재적으로 모기를 먹이로 삼는 참새류의 식충성 조류, 특히 얼룩무늬지빠귀(scaly-breasted thrasher), 진주눈지빠귀(pearly-eyed thrasher), 명금류(trembler), 레서안틸레스 멧쟁이새(the lesser Antillean bullfinch) 및 푸른왕관 풍금조(blue-crowned Euphonia)가 사바 섬의 방출 지역 내 야외에서 발견될 수 있다. 아마도 모기의 소비와 관련하여 가장 자주 일화적으로 인용된 새는 암청색 큰제비(*Progne subis*)로 북아메리카에서 가장 큰 종인 큰제비이다. 그러나 미국 모기방제협회와 암청색 큰제비 보존협회(Purple Martin Conservation Association, PMCA)는 이것이 잘못된 것이며 증거에 의해 뒷받침되지 않는다고 선언하였다. 암청색 큰제비와 모기 활동 패턴 사이에는 일시적으로 고립되어 있으며 조류와 모기는 같은 시간이나 고도에서 날지 않는다. 모기는 조류의 전반적인 먹이의 일부 중 작은 부분만을 형성한다. 따라서 OX513A가 포식 조류에게 악영향을 미치지 않을 것이다.

양서류

사바 섬에 보고된 유일한 양서류는 개구리(*Eleutherodactylus Johnstonei*)이다.

그러나 모기에 대한 생물학적 방제제로 잠재적인 이용의 맥락에서, 개구리와 파충류와 같은 양서류 포식자는 모기 방제에 충분한 수의 모기의 소비자로 인정되지 않는다. 또한 *Aedes aegypti*가 인간의 주거지와 더 관련이 있고, 개구리가 기본적으로 숲에서 발생하는 것으로 사바 섬에 보고되었기 때문에 *Aedes aegypti*와 같은 번식 장소에서 개구리와 함께 유의한 서식지가 겹치지 않을 것이다. 따라서 OX513A가 양서류에 악영향을 미치지 않을 것이다.

무척추동물

잠자리목, 딱정벌레목, 쌍시류 및 반시류의 모든 곤충은 환경에 우연히 마주친 성체 모기 또는 유충을 기회주의적으로 먹을 수 있다. 이들은 식량 원천에 대해 단일 종의 모기에 의존하지 않는 일반주의적인 포식자이다. 실내, 집거미는 *Aedes aegypti* 성체 모기를 먹을 가능성이 가장 높다. 해충 방제를 위한 *Aedes aegypti* 포식자의 효능을 조사한 연구에서는 *Aedes aegypti*를 먹는 가정용 거미의 숫자를 기록했다. 말레이시아의 왕거미(*Araneus*) 속과 각시어리 왕거미(*Neoscona*) 속의 거미는 위장에 *Aedes aegypti*가 함유되었음을 나타내는 양성반응을 보임으로서, *Aedes aegypti*의 천적임을 나타내었다. 태국과 인도의 보고에 따르면 지하저장거미(*Crossopriza lyoni*)는 *Aedes aegypti*의 포식자이기도하다. 이 거미는 모두 전세계적으로 광범위하게 분포한다. 그러나 OX513A에서 새로 생산된 단백질은 독성 또는 알레르기성을 나타내지 않아 OX513A가 거미와 같은 육식성 무척추동물에 부정적인 영향을 줄 가능성은 거의 없다.

Aedes aegypti 애벌레는 모기 애벌레의 생물학적 방제를 위해 평가된 광릉왕모기(*Toxorhynchites*)와 같은 육식성 모기종 먹이의 일부를 구성하는 것으로 알려져 있다.

이 모기들은 대부분 세계의 열대 지방에 서식하는 것으로 보고되어 있으며, 나무 구멍, 파인애플과 식물 및 기타 임시 컨테이너에서 흔히 발견된다. 포식성 무척추동물인 *Toxorhynchites* spp.의 OX513A에 대한 구강노출은 실험적으로 평가되었으며, 비변형 야생형 유충으로 구성된 먹이와 비교하여 OX513A 유충을 독점적으로 공급하였을 때, 두 종의 포식성 *Toxorhynchites* 종(*Tx. amboinensis* 및 *splendes*)의 발달, 생존 및 수명에 유의한 영향은 없었다. 그러므로 OX513A가 육식성 무척추 동물에 나쁜 영향을 미치지 않을 것이다.

어류

특정 어류 종은 모기 번식 서식지를 공유할 때 모기의 포식자로 인식되어 잠재적인 모기 방제요인으로 평가된다. *Poecilia reticulata*는 *Aedes aegypti*의 매개체 방제 프로그램의 일부로 사바 섬에서 사용된다. OX513A의 애벌레와 번데기의 섭취가 포식성 어종 *Poecilia reticulata*에 미치는 영향을 알아보기 위해 14일간의 먹이급이 연구가 수행되었다. OX513A 및 비변형 야생형 대조군을 먹인 어류의 사망률, 어류의 길이, 체중, 외형 및 행동에 유의한 차이는 없었다.

*Aedes aegypti*의 기생충

특정 기생충이 *Aedes aegypti*와 관련이 있다고 알려져 있지 않는다. 선충류 *Romanomermis culicivorax* 및 *Strelkovimermis spiculatus*는 많은 모기 종을 감염시키는 일반적인 기생충이다. 이 종은 실험실에서 *Aedes aegypti*에 감염되는 것으로 알려져 있지만 자연 개체군에의 감염은 확인된바 없다.

수분에 미치는 *Aedes aegypti*의 역할

암컷 *Aedes aegypti* 모기가 난소 발달을 위한 단백질을 얻기 위해 사람에게서 혈액을 섭취하기는 하지만, 모기는 본래 식물 체액을 에너지원으로 한다. 꽃의 꿀은 가장 잘 알려진 출처이지만 모기는 여분의 꽃가루 꿀샘, 손상된 과일, 손상되었거나 온전한 식물 조직 및 단물에서 당을 얻는 것으로 알려져 있다. 그러나 *Aedes aegypti*가 식물 종의 수분 매개자라는 보고는 없다.

자료에 따르면 사바 섬에 생태적 기능의 대표자의 부하량 또는 종 조성은 지역 *Aedes aegypti* 개체군의 역압을 유도하는 OX513A에 의한 영향을 받을 것으로 보이지 않음을 나타낸다.

Ad 2) 보존가치종(희귀종 또는 멸종위기종), 또는 문화적 가치(미적 가치) 및 먹이사슬 효과와 관련하여 생물다양성에 미치는 영향

사바 섬의 방출 지역에서 발생할 수 있는 보호되고 카리스마 있고 가치 있는 종의 분석은 국제자연보전연맹(IUCN) 레드리스트(Red List)와 같은 출처의 상세한 온라인 검색을 사용하여 수행되었다. 다른 출처는 카리브의 생물다양성연구 및 관리재단과 네덜란드 카리브 자연연합(Dutch Caribbean Nature Alliance)의 생물학적 인벤토리 보고서였다.

붉은뱀가죽 뱀(*Alsophis rufiventris*)은 사바 섬에서 위기종으로 기록되어 있지만 서식지가 겹치지 않아 OX513A에 노출될 가능성은 거의 없으며, 곤충을 먹이로 하지 않는다. 사바도마뱀(*Anolis sabanus*)의 서식지는 겹치기 때문에 노출 가능성은 보통으로 간주될 수 있다.

다른 *Anoles* 종은 일차적으로 개미는 먹기는 하지만, 주로 나비목 유충 및 메뚜기목을 주로 먹이로 삼는다. 따라서 사바도마뱀이 OX513A에 의해 악영향을 받을 가능성은 거의 없다.

사바 섬의 보호되고 카리스마 있고 가치 있는 종에 대한 OX513A의 악영향이 있을 것 같지 않음을 나타내는 자료가 있다.

Ad 3) 분해자 및 분해자원, 영양소 순환, 수질 조절 및 정화자로서 *Aedes aegypti*를 포함하는 다른 생태계 서비스에 대한 영향

분해자로서의 *Aedes aegypti*

*Aedes aegypti*의 유충 발달은 주로 수생 환경에서 이루어지며, 주로 미생물 군집에 의한 대사산 유물이 들어있는 인공 번식 장소에서 발생한다.

이 영역에 대한 연구는 비록 제한적이지만, *Aedes aegypti*는 폐기물을 파괴하는 미생물에 살아남을 것으로 생각되며, 번식지에서 *Aedes aegypti*의 상대적 부하량에 영향을 미치는 것은 질소, 인 및 탄소 이용가능성이다.

*Aedes aegypti*가 부서진 식물과 동물의 폐기물을 담은 인위적 또는 인공적인 용기를 차지한다 하더라도, 물질의 직접 분해에 모기 자체가 기여하지는 않을 것이다. 모기는 주로 분해자가 아닌 다른 생물체에 의한 찌꺼기의 파손에서부터 요소의 소비자로서 작용할 가능성이 더 크다.

분해자를 위한 자원으로의 *Aedes aegypti*

토양에서 발견되는 잘 알려진 곤충 병원성 균류인 *Metarhizium anisopliae*와 같은 곰팡이는 *Aedes aegypti*의 알을 감염시킬 수 있다. 곰팡이 *Beauveria bassiana*는 최근 *Aedes aegypti*에 대한 잠재적인 생물학적 방제제로 평가되었다. 그러나 *Aedes aegypti*는 사바 섬의 분해자에 대한 특정 자원으로 알려져 있지 않다.

데이터에 따르면 사바 섬에서 OX513A 방출결과에 따라 분해에 악영향을 미칠 가능성은 희박하다.

Ad 4) 숙주 식물/동물의 부하량 또는 종 조성 및 그들이 제공하는 생태계 서비스에 대한 영향

위에 기술된 데이터를 감안할 때, 숙주 식물이나 숙주 동물의 부하량 또는 종 조성과 그들이 제공하는 생태계 서비스가 OX513A의 영향을 받는 것은 거의 없다.

Ad 5) 식충식물에 대한 GM 곤충과 관련된 독소 또는 알레르겐의 영향

위의 데이터와 OX513A에서 새로 생성된 단백질이 독성 또는 알레르기성이 없다는 사실을 감안할 때, 식충식물에 대한 어떠한 악영향도 기대되지 않는다.

결론

GMO 사무국은 비변형 *Aedes aegypti*와 비교하여 OX513A가 준-자연 및 자연 지역의 비표적 생물체에 부정적인 영향을 미치지 않으며 현재의 매개체 방제도 고려한다는 점에서 Oxitec의 결론을 확인한다.

이것은 다음 정보를 기반으로 한다 :

1. 침입종으로서, *Aedes aegypti*는 사바 섬에서 핵심종으로 간주되지 않는다.
2. OX513A는 다음의 데이터에 근거하여 천적/포식자에게 악영향을 끼치지 않는다.
 - *Aedes aegypti*/OX513A와 포식자 사이의 서식지가 겹치거나 중첩되지 않는다.
 - *Aedes aegypti*는 포식자의 먹이 중 작거나 무시할만한 부분만을 형성한다.
 - 포식자는 일반적인 것들뿐이다.
 - 유일한 먹이로 OX513A를 사용한 독성 연구는 포식자에게 아무런 악영향이 없음을 보여준다.
 - OX513A에서 새로 발견된 단백질은 독성이 없다.
3. *Aedes aegypti*는 분해자, 영양소 순환 또는 수분자의 역할을 하지 않기 때문에 OX513A는 다른 생태계 서비스에 악영향을 미치지 않을 것이다.
4. OX513A는 보호종 및 카리스마가 넘치는(charismatic) 종에 해를 끼치지 않는다. 그 이유는 사바 섬에서 서식지가 겹치거나 이러한 종의 먹이에 속하지 않기 때문이다.

2.6 관리에 이용된 특정 기술의 환경적 영향

시험한 가설은 OX513A와 관련하여 사용된 특정 관리기법이 수용환경에 악영향을 미치지 않는다는 것이다.

EFSA(2013)² 지침에 기반한 주요 고려 사항은 다음과 같다 :

1. OX513A의 생산 및 후속 방출과 관련된 (현재) 매개체 관리 절차의 변화;
2. 관리 절차의 변화로 인한 환경에 대한 잠재적 부정적 영향;
3. OX513A의 생산 및 방출 관리 및 환경 영향에 따른 전반적인 위해성.

Ad 1) OX513A의 생산 및 후속 방출과 관련된 (현재) 매개체 관리 절차의 변경

OX513A가 방출될 때 현재의 매개체 방제 조치, 생물학적 방제 제제의 사용은 적용 가능할 것이다. OX513A는 *Aedes aegypti*를 방제하기 위한 추가적 도구로 간주된다. 사바 섬에 Oxitec의 현장 방문은 2016년 초였으며, 생물학적 방제 요인인 유충식이 구피어류(*Poecilia reticulata*)와 *Bacillus thuringiensis* var. israelensis SH14(Bti) 등과 같은 방제의 원칙적인 수단이라는 것임을 매개체 방제 관리자와의 논의가 확인하였다. 또한 살충제가 매개체 방제로 적용된다. 사바 섬에서 매개체 방제 방법을 바꾸려면 OX513A 방출이 일어나는 것과 동일한 날에 살충제 적용을 피하는 것이 좋다.

OX513A의 사육 및 방출을 위한 위해성관리전략

사육 시설의 무결성에 대한 피해를 통해 우발적인 유출을 야기할 수 있는 상황을 다루는 비상절차를 위한 SOP가 마련되어있다. 여기에는 악천후, 장기 정전, 화재 및 기물 파손과 같은 자연 재해가 포함된다. 또한 OX513A의 부주의한 방출을 막기 위해 청소 및 폐기물 처리절차와 출입을 포함한 SOP가 마련되어 있다. 또한 SOPs는 알 생산, 이송, 성체 생산, 운송, 방출, ovitrap 처리 및 분석의 결과로 부주의한 방출을 방지하기 위해 현장에 비치되어 있다.

tetracycline의 환경 방출 가능성

이동형 사육 단위에서 OX513A를 사육하는 동안, OX513A는 tetracycline의 존재 하에서 자란다. 폐수는 주거용 쓰레기처리 시스템을 통해 처리된다. OX513A 수컷에 대한 사육 실행 결과로 버려지는 tetracycline의 최대량은 1.7g/주로 추산된다. 사육 시설에 의해 생성된 tetracycline의 양은 인간의 의학적 응용에 의해 생성된

tetracycline의 양에 비해 무시할 수 있다. 따라서 주거용 쓰레기처리 시스템의 방식과 일치하는 방식으로 사육 단위에서 폐수를 처리하면 사바 섬의 환경에서 tetracycline에 대한 기여도는 무시할 만하다.

Tetracycline 저항성 세균이 환경으로 방출될 가능성

tetracycline이 있는 환경에서 OX513A가 사육되기 때문에 곤충 장내세균이 tetracycline 내성 유전자를 획득 할 수 있는 잠재성이 있으며 방출시 환경 내의 다른 생물체에 이들 유전자를 퍼뜨릴 수 있는 가능성이 고려되었다. 유생에서 성체로의 모기 변태 동안 장내세균이 제거됨에 따라 이러한 현상이 일어날 가능성은 미미한 것으로 간주되었다. 변태기와 성체는 사육 과정에서 tetracycline으로 처리되지 않으며 변태기는 선별 과정에서 담수로 여러 번 세척된다.

결론

OX513A 방출 프로그램의 결과로 방출 지역에서의 통상적인 매개체 방제 조치는 변경되지 않을 것으로 예상되므로, 매개체 방제 프로그램의 효과와 비교하여 관리의 변화로 인한 인체 보건 및 환경에 대한 악영향은 예측되지 않는다.

GMO 사무국은 위의 결론을 확인한다.

2.7 인체 및 동물 보건에 미치는 영향

시험한 가설은 OX513A의 환경방출이 Non-GM 비교측정자와 비교하여 인간과 동물의 보건에 나쁜 영향을 미치지 않는다는 것이다.

EFSA(2013)²를 기반으로 하는 주요 고려 사항은 다음과 같다 :

1. 새로운 화합물(들), 그 유래 대사부산물 및/또는 GM 곤충이 인체 및 동물에 미치는 잠재적인 독성 영향. 예를 들어, Non-GM 비교측정자와 비교했을 때 GM 곤충에 의한 독소 생산의 질적 또는 양적 변화;
2. 새로운 화합물(들), 그들의 유래 대사부산물 및/또는 GM 곤충의 인체에 대한 잠재적인 알레르기성 영향;
3. 인류의 면역력 저하 및 매개체 억제 또는 교체 전략의 장기간 긍정적인 효과에 대한 의존.

사람과 방출된 수컷 OX513A 사이의 상호작용은 우발적인 피부 접촉 또는 눈 접촉 또는 우발적인 흡입으로 제한될 것으로 예상된다. 인간 노출의 가장 그럴듯한 경로는 OX513A 암컷이 사람을 무는 것이다.

Ad 1) 새로운 화합물(들) 및 유도된 대사산물 및/또는 GM 곤충이 인체 및 동물에 대한 잠재적인 독성 영향(Non-GM 비교측정자와 비교했을 때, GM 곤충에 의한 독성산물의 정성적 또는 정량적 변화)

Ad 2) 새로운 화합물(들) 및 유도된 대사성 부산물 및/또는 GM 곤충의 인체에 대한 잠재적인 알레르기 유발 효과

노출 특성화

OX513A는 2002년부터 (115세대 이상) 밀폐이용 및 규제된 환경방출에서 사육되고 사용되었으며, 계통을 취급하는 작업자에게 미치는 악영향이 보고되지 않았다.

OX513A 타액을 통한 노출 : 성체 암컷의 사람물기

소량의 OX513A 암컷은 선별 과정을 거쳐 OX513A 및 야생형 암컷의 자손에서 형질이 불완전하게 침투된 결과로 환경에 도입될 것이다. 이러한 암컷은 사람을 물어뜯을 수는 있지만 잠재적으로 타액에 존재하는 tTAV 및 DsRed2 단백질에 사람을 노출시킬 수 있다. tTAV와 DsRed2 단백질은 OX513A 암컷의 타액에서 탐지되지 않아 사람을 무는 방식으로는 이들 단백질에 노출되지 않는다.

OX513A 형질의 독성 및 알레르기성

tTAV 또는 DsRed2 단백질로 수행된 독립적인 생물정보학적 검색은 잠재적 알레르기성, 알레르기성 교차 반응성 또는 잠재적 독성과 관련된 어떠한 우려도 확인할 수 없었다. 업데이트된 (2017) 생물정보학 분석 결과에서 이러한 결과를 확인하였다(추가 정보, 2017년 1월). 또한 tTAV 및 DsRed2 또는 OX513 구조체의 다른 유전요소에 대한 PubMed (NCBI) 데이터베이스의 과학문헌 검색에서 안전 문제가 나타나지 않았다.

이것은 다른 유전자변형생물체 (식물, 곤충)의 tTAV 또는 DsRed2 형질의 안전성에 대한 독립적인 검토에서의 USDA와 FDA의 결과와 일치하며 전문가 의견에 의해 확인된다.

인간과 동물이 tetracycline 저항성 유전자에 노출될 가능성.

Tetracycline 저항성유전자는 OX513A의 구축에 사용되지 않았다. 그러나 tetracycline 내성 세균은 MRU 내에서 사육 과정의 통제된 조건 내에서 발생할 수 있다. 유충에서 성체로의 모기 변태 동안 장내세균이 방출되기 때문에 이것은 거의 없는 것으로 간주된다. 또한 사육 용수에서 세균에서 발생하는 항생제 내성과 이 특성을 식품이나 수인성 질병을 일으킬 수 있는 다른 세균으로 옮기는 것은 모기 수명주기가 짧기 때문에 거의 일어나지 않을 것이다.

Ad 3) 인간 집단 내 면역성 상실 및 매개체 억제 또는 대체 전략의 장기간에 걸친 긍정적 효과에 대한 의존도

역설적으로, 매개체 방제는 사람들이 덜 노출됨에 따라 인체 개체군의 면역 감소를 통해 증가된 뎅기 바이러스 전파를 유도할 수 있다고 제안되었다. 뎅기 바이러스의 전파성 역치에 대한 매개체 집단 밀도의 감소 영향은 1인당 변태기(성체 모기 개체군의 대용물로서), 주위 온도 및 집단면역(herd immunity)과 관련하여 추정되었다. 1인당 평균 변태기는 처치 지역에서, 전처리 0.7에서 처치 후 0.04로 감소했는데, 이는 이러한

조건 하에서 전염병 전파를 예방하기에 충분할 것으로 예상되었거나, 혈청학적 유병률 (sero-prevalence) 0%의 순수한(naive) 인간집단을 위해 만들어진 가장 불리한 조건하에 실제로 일어난 것으로 추정된다. 이것은 OX513A에 의한 매개체 방제가 증가한 땡기 바이러스 전파를 일으키지 않는다는 것을 나타낸다.

결론

1. 새로운 화합물(들), 그들의 유래 대사산물 및/또는 GM 곤충이 사람과 동물에게 미칠 수 있는 잠재적인 독성 영향은 확인되지 않았다.
2. 새로운 화합물(들), 그 유래 대사산물 및/또는 GM 곤충의 인간에 대한 잠재적인 알레르기 유발효과는 밝혀지지 않았다.
3. 매개체 억제 또는 대체 전략의 장기간 긍정적인 효과에 대한 의존과 인간 집단에서의 변역성 상실은 기존 또는 의도된 개입과 관련하여 추가적인 위해성을 제기하지 않는다.

GMO 사무국은 위의 결론을 확인한다.

3. 총체적인 위해성 평가 및 결론

3.1 환경위해성평가의 불확실성

ERA의 불확실성은 측정된 매개 변수의 다양성, 가정과 외삽법 및 현재 과학문헌의 한계와 같은 다양한 출처에서 발생할 수 있다. 사바 섬에서의 OX513A의 의도적인 환경 방출에 대한 ERA는 본질적으로 질적이며, 종종 결론을 도출하기 위해 양적 측정 종말점에 의존한다. 질적 위해성평가에서 현장 전문가의 판단은 불확도의 정도를 알려주는 기초이다.

이 ERA를 통해 확인된 불확실성의 핵심 영역은 다음과 같다.

- 사바 섬을 넘어서서 OX513A와 그들의 자손이 확산될 발생가능성은 어느 정도인가?

사바 섬을 넘어서 OX513A와 자손의 확산 가능성에 대해서는 불확실성이 있지만, 방출된 OX513A 수컷은 사바 섬의 지리적 고립 때문에 제한된 분산을 보였으므로 불확실성 수준은 낮다. 이것은 이전 다른 나라에서의 시험 결과, 출판된 문헌의 정보 및 사바 섬의 위치와 특징을 기반으로 한다.

항공기 또는 보트로 OX513A를 수송하여 수동적인 분산에 대한 불확실성이 더 높다. 그러나 수동적인 분산이 일어날지라도 OX513A 수컷이 짧은 시간 동안만 살 수 있다는 이전의 현장 방출에 대한 충분한 정보가 있다. 이 OX513A 수컷이 야생형 암컷과 짝짓기를 할 수 있다면 그들의 자손은 치사 특성의 결과로 죽을 것이다.

- 사바 섬에 OX513A가 정착할 발생가능성은?

사바 섬에 OX513A가 정착할 가능성에 대해서는 불확실성이 적다. 이것은 OX513A의 이전 현장 방출의 정보를 기반으로 방출된 곤충의 수명이 약 1~3일이며 성체가 되기 전에 자손의 95% 이상이 사망함을 나타낸다. 또한 이것은 잠재적인 tetracycline 원천에 대한 과학 문헌의 증거를 바탕으로 한다.

지역 모기 개체수에 대한 지속적인 모니터링은 OX513A 프로그램에 필수적이며 일반적으로 매개체 방제 활동의 기본이다. 사후 억제 단계 모니터링은 사바 섬에 OX513A가 정착하지 않는다는 점에 대한 지속적인 평가를 허용할 것이다.

• 부주의하게 OX513A를 방출할 가능성이 있는가?

OX513A의 부주의한 방출 가능성과 관련된 불확실성은 ERA 전반에 걸쳐 언급된 MRU의 밀폐조치 및 위해성관리전략에 따라 감소한다. 사육은 ACL2 밀폐 수준에 따라 수행된다. MRU에서 일하는 직원은 밀폐조건에서 OX513A 및 기타 GM 곤충을 다루는데 있어 높은 수준의 경험을 가진 Oxitec 현장 관리자의 감독 하에 있을 것이다. MRU에서 근무하는 현지 채용 직원은 ERA 전체에서 언급된 OX513A 프로그램의 표준운영절차(SOP)로 훈련을 받게 된다.

악천후의 경우 부주의로 인한 방출에 대한 불확실성이 존재한다. 이 불확실성은 허리케인 대비정책(Hurricane Preparedness Policy)에 의해 최소화되며, 성체 및 애벌레 곤충의 생명 단계가 정해진 강도의 악천후 경고가 있기 전에 적절한 시간 내에 사망하게 된다. 일부 OX513A가 밀폐를 피할지라도 자기제한 특성의 의도된 효과는 환경에서의 정착을 방해한다.

3.2 결론

이 환경위해성평가는 유전자변형동물의 환경위해성평가에 관한 EFSA 지침(EFSA, 2013)에 설명된 방법론 및 지침에 따라 수행되었다. Directive 2001/18/EC의 해석으로 이 지침에서 권고된 6가지 단계에 따라 7가지 관심 영역이 평가되었다.

위해성평가는 다음 비교측정자 중 하나를 고려하여 수행되었다.

- a) 야생형 *Aedes aegypti* (비변형 실험실 계통)
- b) 야생 *Aedes aegypti* (토착 야생 지역 개체군)
- c) *Aedes aegypti*에 대한 기존 방제 수단

비교학적 안전성 평가는 OX513A의 분자적 특성을 표현형 및 행동 특성과 함께 고려한 가중치 접근법을 사용하여 수행되었다. 이 비교학적 안전성 평가의 결과는 생물학적 관련성의 유일한 차이점은 두 가지 도입된 형질(자기제한 형질(tTAV) 및 형광성 형질(DsRed2))의 발현임을 입증했다. 환경위해성평가의 중요한 초점은 인체 보건 및 환경에 대한 잠재적 악영향과 관련하여 tTAV 및 DsRed2를 특성화하는 것이었다.

모든 관심 영역에 대해 사바 섬에서 유전적으로 변형된 OX513A가 의도적으로 방출된 결과로서 인체 보건 및 환경에 잠재적으로 악영향을 미칠 수 있다고 결론지을 수 있으나, 표준 매개체 방제의 맥락에서 비변형 *Aedes aegypti*의 영향과 비교하여 무시할만한 수준임이 고려되었다는 적절한 정보가 있다. OX513A의 비의도적 환경방출을 막기 위한

물리적인 밀폐 및 절차적 통제에 대한 조치가 우수실행절차 및 규제 준수를 위한 공통 조건에 부합하는 것으로 설명되었다. 설명된 조치는 위해성관리 조치로 특성화될 수 있지만, 사바 섬의 OX513A에 대한 이 ERA에서 확인된 위해성에 대응하지는 않는다.

지금까지의 모든 규제된 환경방출에서 OX513A는 위해성평가 제출물에서 확인된 지표와 관련하여 일관되게 수행되었으며 예기치 않은 결과가 발생하거나 의도하지 않은 영향이 관찰되거나 규제보고가 필요하다는 요구는 없었다.

GMO 사무국은 Oxitec의 문서 및 표준 매개체 방제의 맥락에서 설명한 조건 하에, 사바 섬에서 유전자변형 OX513A의 잠재적 방출로 인한 인체 보건 및 환경에 잠재적으로 악영향을 미친다고 결론지었으나, 비변형 *Aedes aegypti*의 영향과 비교하여 무시할 수 있는 것으로 간주하였다. 이것은 브라질^{3,4}과 미국 식품의약품안전청⁵과 같은 최근 관련 환경위해성평가와 동일한 계통주이다.

GMO 사무국은 WHO⁶의 권고에 따라 OX513A의 개체군이 탐지수준 이하가 될 때까지 월 1회씩 독립적인 방출 후 모니터링을 권고한다.

References

1. EU (2001). Directive 2001/18/EC on the deliberate release into the environment of genetically modified organisms. <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/NL/TXT/?uri=CELEX%3A32001L0018>
2. EFSA (2013). Guidance on the environmental risk assessment of genetically modified animals. <https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/3200>
3. Technical opinion no. 3964/2014 (2014). Brasília: National Technical Bio safety Commission. <http://bch.cbd.int/database/attachment/?id=14514>
4. Paul Paes de Andrade et al. (2016). Use of transgenic *Aedes aegypti* in Brazil: risk perception and assessment. <http://www.who.int/bulletin/volumes/94/10/16-173377.pdf?ua=1>
5. FDA (2016). Final Environmental Assessment for Genetically Engineered Mosquito. <http://www.fda.gov/AnimalVeterinary/DevelopmentApprovalProcess/GeneticEngineering/GeneticallyEngineeredAnimals/ucm446529.htm>
6. WHO (2016). Vector Control Operations Framework for Zika Virus. <http://www.who.int/csr/resources/publications/zika/en/>
7. CBD (2000). Cartagena Protocol on Biosafety to the Convention on Biological Diversity. <https://bch.cbd.int/protocol/>
8. WHO (2014). Guidance framework for testing of genetically modified mosquitoes http://www.who.int/tdr/publications/year/2014/Guidance_framework_mosquitoes.pdf
9. EU (2002) Commission Decision 2002/623/EC establishing guidance notes supplementing Annex II to Directive 2001/18/EC <https://www.ecolex.org/details/legislation/commission-decision-2002623ec-establishing-guidance-notes-supplementing-annex-ii-to-directive-200118ec-of-the-european-parliament-and-of-the-council-on-the-deliberate-release-into-the-environment-of-genetically-modified-organisms-and-repealing-council-directive-90220eec-lex-faoc037457/>
10. EFSA (2010). Guidance on the environmental risk assessment of genetically modified Plants <https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/1879>

유전자변형생물체 위해성 평가·심사 가이드

인 쇄	2019년 12월
발 행	2019년 12월
발 행 인	질병관리본부장 정은경
편 집 인	생물안전평가과
발 행 처	질병관리본부 국립보건연구원 생물안전평가과 (28159) 충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명2로 187 Tel. 043)719-8041, 8042 Fax. 043)719-8059

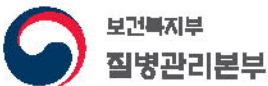
정부간행물발간등록번호 : 11-1352159-001366-01

ISBN : 978-89-6838-750-0 (PDF)

2019

Ministry of Health & Welfare
Korea Centers for Disease Control & Prevention

유전자 변형생물체 위해성 평가심사가이드



생물안전평가과 <http://biosafety.cdc.go.kr>
충북 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명2로 187

