

# Measurement of and Changes in L-carnitine Levels in Developing Cucumber Cotyledon

Hyeon Jeong Cha<sup>1,2</sup> and Dae-Jae Kim<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Science Education, Graduate School, Chungbuk National University, Chungbuk 28644, Korea

<sup>2</sup>Chungbuk Science High School, Cheongju 28189, Korea

<sup>3</sup>Department of Biology Education, College of Education, Chungbuk National University, Chungbuk 28644, Korea

Received February 15, 2019 / Revised March 15, 2019 / Accepted March 15, 2019

Mobilization of storage lipids is critical for the germination of oil seeds, as they supply carbon and energy until photosynthesis commences in cotyledons. In this study, we determined the levels of plant carnitine and associated changes in these levels from seed germination to cotyledon senescence. We also examined changes in the content of unsaturated fatty acids throughout seedling development. Carnitine levels peaked on day 3 at 14.5 nM in cotyledons and decreased sharply to 7.2 nM on day 4. On development day 3 carnitine levels were maintained at around 3 nM until day 7. The unsaturated fatty acid content dropped by half at the same time as carnitine peaked (day-3), and storage lipids were almost depleted by day 5. Thereafter, carnitine was hardly detected until the second stage of cotyledon senescence, at which stage the carnitine content was 6.8 nM, similar to that on day 4 at the time of fatty acid depletion in the cotyledons. Unsaturated fatty acids levels remained constant in green cotyledons but slightly increased in the senescing cotyledons. The latter can be explained by intracellular breakdown of membrane lipids. This is the first such discovery in developing cotyledons and may offer clues regarding other roles of the acetyl unit transport system in plants. The expression of *BOU* was closely associated with carnitine metabolism during seed germination and cotyledon development. The results provide support for the possibility of carbon re-routing during the glyoxylate cycle in the supply of energy for early germination and development.

**Key words** : Cotyledon, cucumber, germination, L-carnitine, lipid mobilization

## 서 론

종자에 다량의 저장 지방을 포함하는 식물들의 발아는 저장 지방의 대사로부터 새로운 생명활동의 시작이며 여러 대사과정이 관련되어 있다[4, 8, 12]. 저장 지방은 주로 중성 지방(triacylglycerol, TAG)의 형태로 건조한 종자가 과종을 위한 침윤 과정을 거치는 단계에서부터 발아가 시작됨과 동시에 사용이 가능한 단당류 형태의 탄수화물로 전환되어 발아 과정에 필수적인 에너지와 유기물 합성에 필요한 탄소원을 제공한다[9, 10, 16, 22]. 발아 후에 떡잎이 지상으로 솟아오르는 상배축성(epigeous) 식물인 박과 식물(*Cucurbitaceous*)들은 발아의 성립 후 떡잎은 첫 번째 잎의 출현에 앞서 광합성을 시작하고 제한적이거나 일정 기간 동안 발달과 성장을 유지한다[12, 17, 18]. 떡잎은 6~7주 동안의 생명활동을 끝으로 노쇠화 단계에 이

게 된다.

발아 시 종자에 있는 저장 지방의 대사는 지방체(lipid body)에 저장된 TAG가 지방산으로 분해되며 시작된다[22]. 지방산은 미소체의 하나인 과옥시좀(peroxisome)으로 이동하여 베타 산화( $\beta$ -oxidation)를 거치며 활성화되고 아세틸화 되어 아세틸 코엔자임 에이(acetyl CoA)로 전환된다[1]. 이 아세틸 코엔자임 에이는 저장 지방 대사의 핵심 회로로 알려진 글라이옥실산 회로(glyoxylate cycle)를 통해 대사되며 다양한 대사물질을 생성한다[1, 3, 20, 27]. 글라이옥실산 회로를 통해 생성된 대사물질들은 말산(malate), 이소시트르산(isocitrate) 및 시트르산(citrate) 등이다. 이들은 직접 경로나 간접 운송 경로를 통해 미토콘드리아로 운반되어 단축된 시트르산 회로(citric acid cycle)를 통해 세포호흡의 에너지원 생성의 과정을 따른다[1, 24]. 특히 말산은 대사경로를 따라 다시 세포질로 나와 당 신생 과정(gluconeogenesis)을 거쳐 포도당을 생성하며 지방의 탄수화물로의 유동이 이루어진다[1, 10]. 이와 같은 저장 지방의 포도당으로의 유동에는 지방체, 과옥시좀, 미토콘드리아 및 세포질 등 세포 내 여러 소기관들이 참여한다. 각각의 세포 내 소기관에서는 베타 산화, 글라이옥실산 회로 및 시트르산 회로와 당 신생 과정이 참여하며 각 단계마다 일어나는 생화학 반응을 촉매 하는 효소의 참여와 그에 대응하는 유전

### \*Corresponding author

Tel : +82-43-261-3260, Fax : +82-43-260-3361

E-mail : [djkim@chungbuk.ac.kr](mailto:djkim@chungbuk.ac.kr)

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

자 19가지 이상이 관련되어 있다[1]. 그 동안의 연구는 글라이 옥실산 회로를 중심으로 일어나는 지방의 대사에 연구의 초점이 맞춰져 이루어져 왔다,

그러나 앞선 연구의 역전사 중합효소연쇄반응(RT-PCR)을 통한 유전자 발현 연구에서는 유전자 수준에서 활동으로 또 다른 지방 유동 경로의 가능성이 재확인된 바 있다[1, 13]. 즉, 발아 시 저장 지방 유동과 탄소원의 이동과 관련하여 그 과정에 핵심적 역할을 하는 중간 대사 물질로써 카니틴(carnitine)의 실존 가능성과 함께 피옥시즘에서 베타 산화에 의해 생성된 acetyl CoA와 카니틴이 반응하여 미토콘드리아로 이동하는 또 다른 경로의 존재 가능성이 제안된 바 있다[1, 5, 13, 15]. 식물 이외의 생물계에서는 널리 알려져 있으며 특히 동물이나 효모에서 관찰되는 아세틸카니틴(acetylcarnitine)의 대사활동과 이동 경로가 식물에도 존재할 것이라는 주장은 있었으나 연구를 통한 증거의 제시는 매우 제한적이었다[5, 23]. 사람에게 있어서 카니틴은 육류와 우유 등에서 공급되어야 하는 필수 영양소로써 두 가지 아미노산 라이신(lysine)과 메티오닌(methionine)으로부터 생합성 된다. 또한 포유동물의 경우 여러 조직에서 발견되며 미토콘드리아에 특화된 아실전이효소(acyltransferases)의 작용을 통하여 긴 사슬 형태의 지방산 산화에 필수적인 역할을 담당한다[11]. 또한 지방산의 산화와 대사 관련 일부 인체의 질환들은 카니틴의 결핍과 밀접한 관련이 있다[11, 13].

따라서 본 연구에서는 오이의 발아과정에서 수행된 RT-PCR을 적용한 유전자 활성 연구의 결과를 바탕으로 떡잎의 발달 과정 중 식물에서 카니틴 대사의 존재를 탐색하고자 하였다. 앞선 연구 보고에서 확인된 acylcarnitine carrier-like enzyme system (A BOUT DE SOUFFLE [BOU])에 의한 카니틴 운반 시스템[13, 15] 관련 유전자 발현을 통해 확인된 연구의 결과에 따라 유전자 활성의 최적의 시기를 결정하였고, 발아와 노쇠화를 포함하는 발달중인 떡잎에서 카니틴의 존재를 생화학적 분석 기법을 통하여 확인하고자 하였다. 또한 발달 중인 오이 종자의 전체 지방 중 약 90%를 차지하는 불포화 지방산[6, 21]의 변화를 측정하는 연구를 통하여 저장 지방의 양적인 변화를 함께 조사하였고, 동일한 떡잎의 발달과정에서 카니틴 변화와의 연관성을 알아보려고 하였다. 이로부터 확인된 오이 떡잎에서 카니틴 탐색 결과는 박과 식물의 발아과정에서 진행되는 탄소원의 유동 과정에 대한 또 다른 경로의 존재 가능성을 뒷받침할 것으로 사료된다.

## 재료 및 방법

### 파종 및 떡잎 시료의 준비

본 연구에 사용할 오이(*Cucumis sativus* L.) 종자는 멸균 증류수에 담가 4°C에서 12시간 동안 불린 후, 젖은 질석에 파종하여 식물 배양기(Jeio Tech, Korea)에 넣어 발아를 유도하고

재배하였다. 배양기에서는 24시간 연속해서 빛을 주었고, 25°C의 온도와 70%의 습도를 유지하여 환경 변인들을 통제하였다. 카니틴 검출을 위하여 떡잎 시료는 파종 후 3일째부터 10일째까지의 떡잎을 24시간 간격을 두고 절취한 후 즉시 본 연구의 실험 재료로 사용하였다. 불포화 지방산의 함량을 조사하기 위한 시료는 카니틴의 검출에서와 같이 파종 후 3일째부터 10일째까지의 떡잎을 24시간 간격을 두고 절취한 떡잎과 더불어 마른 종자와 파종 전 12시간 물에 불린 종자 및 파종 후 1일째와 2일째 발아 전 씨앗으로부터 총지방을 추출하여 이것을 검출의 시료로 사용하였다. 노쇠화 단계에서의 실험은 떡잎의 노쇠화를 중기(50% 노쇠화)에서 카니틴과 불포화 지방산의 검출을 실시하였다.

### 떡잎의 발달에 따른 생체질량의 변화 관찰

오이 종자의 파종 후 떡잎이 지상으로 출현하는 3일째부터 오이 유식물의 발달에 따른 떡잎의 생체질량(fresh weight)의 변화를 관찰하여 저장 지방의 대사와 떡잎의 생장에 따른 각각의 변화와 추이를 관찰하고자 하였다. 마른 종자와 파종 전 12시간 물에 불린 종자를 포함하여 파종 후 24시간 간격을 두고 5쌍의 떡잎을 취하여 각각의 생체질량을 측정하였으며 그 평균값으로 결과를 산출하였다. 또한 여기에서 얻어진 생체질량은 지방 추출 시 사용된 떡잎 시료의 질량을 대입하여 떡잎 한 장 당 지방의 함량을 환산하는데 활용되었다.

### 떡잎의 발달과 불포화 지방산의 검출 및 검출 결과의 처리

건조된 종자를 기준으로 대부분 오이 종자의 껍질을 제외한 씨앗의 42%는 지방 성분이며, 지방과 동등한 양인 42%가 단백질로 구성되어 있다[6]. 또한 저장 지방의 대부분을 차지하는 90% 정도가 불포화 지방산(linoleic acid 및 oleic acid)으로 구성되어 있어[6, 21] 일반적으로 불포화 지방산의 검출을 통해 정량하여 조직 내 총지방의 함유량을 추정하게 된다. 따라서 본 연구에서도 불포화 지방산의 검출을 통하여 오이의 발달에 따른 떡잎 내 지방의 변화량을 추정하고자 하였다. 불포화 지방산의 검출에 앞서 총지방의 추출은 Liquid Extraction Kit (Cell BioLabs, USA)을 사용하여 준비하였다. 먼저 종자와 떡잎의 생체질량을 측정 후, 각 발달 시기에 따른 추출 가능한 만큼의 생체시료(10~25 mg)를 잘게 쪼개어 50 ml 코니칼 튜브에 넣고 phosphate buffered saline (PBS)를 시료 2 mg 당 1 ml을 첨가하여 4°C에서 파쇄하고 1차 추출물을 확보하였다. 여기서 얻어진 추출 현탁액(crude extract suspension)을 사용하여 이후 총 지방의 추출은 맞춤형 시약의 절차와 방법에 따라 진행하였다. 또한 실험의 효율성을 위하여 불포화 지방산의 검출은 sulfo-phospho-vanillin (SPV) 방법을 적용한 맞춤형 시약인 Liquid Quantification Kit (Cell BioLabs, USA)을 사용하였다. 흡광도계를 활용하는 비색탐지(colorimetric detection)는 540 nm의 파장에서 실시하였다. 시약제조회사가 제공하는

실험의 절차와 방법에 따라 Lipid Standards 반응과 동시에 검출용 시료로부터 불포화 지방산의 탐색을 위한 assay 반응을 37 °C에서 15분 처리한 후 곧 바로 검출을 시행하였다. 이에 앞서 본 연구실에서는 오이 떡잎에서의 assay 과정은 사전 실험을 통해 최적의 적정 조건을 확립하였다. 모든 비색탐지의 과정은 맞춤형 검출 시약제조사(Cell BioLabs, USA)가 제공하는 표준화된 실험 방법에 따라 수행되었다. 오이 떡잎에서의 불포화 지방산의 검출은 3차례의 예비 실험과 5차례의 실제 측정 실험 중 최대치의 검출 값과 최소치의 검출 값을 제외한 개별 실험으로 측정된 3회의 측정값에 대한 평균값으로 결과를 도출하였다. 검출의 신뢰도를 높이기 위하여 두 대의 서로 다른 제조사(Effendorf 와 WTW)의 흡광도계 장비를 사용하여 중복 측정하였다.

**떡잎으로부터 L-carnitine 검출과 Carnitine Assay 결과의 처리**

계획에 따라 정해진 일정에 맞추어 채취된 떡잎 한 장을 곧 바로 carnitine 검출을 위한 시료로 사용하였다. 한 장의 오이 떡잎 시료로부터 carnitine 검출 시료의 준비와 carnitine assay 는 L-Carnitine Assay Kit (Sigma-Aldrich, USA)를 사용하여 수행하였다. 먼저 떡잎 시료 한 장에 Carnitine Assay Buffer 300 µl를 넣고 파쇄하여 균질화 하고, 4°C에서 원심분리(13,000 g, 30분) 하여 불용성 물질들을 침전시킨 후 제거하였다. 필요에 따라 잔류할 수 있는 효소들은 10 kDa MWCO spin filter를 사용하여 추가로 제거하였다. 검출용 시료 150 µl를 수거한 후 50 µl를 최종 검출용 시료로 사용하였다.

흡광도계를 활용하는 비색탐지(colorimetric detection)는 570 nm의 파장에서 실시하였다. Protocol에 따라 Carnitine Standards 반응과 동시에 검출용 시료로부터 carnitine 탐색을 위한 assay 반응을 상온(20°C)에서 30분 처리한 후 검출을 시도하였다. 오이 떡잎에서의 assay 과정은 반복 실험을 통해 최적의 적정 조건을 확립하였다. 모든 비색탐지의 과정은 맞춤형 검출 시약제조사(Sigma-Aldrich, USA)가 제공하는 표준화된 실험 방법에 따라 수행되었다. 발아중인 오이 떡잎에서의 카니틴 검출은 3차례 이상의 예비 실험과 5차례의 측정 실험 중 최대치의 검출 값과 최소치의 검출 값을 제외한 개별 실험으로 측정된 3회의 측정값에 대한 평균값으로 결과를 도출하였다. 검출의 신뢰도를 높이기 위하여 두 개의 서로 다른 제조사(Effendorf 와 WTW)의 흡광도계 장비를 사용하여 중복 측정하였다.

**결과 및 고찰**

**떡잎의 발달과 생체중량의 변화 및 저장 지방의 변화**

오이를 파종한 후 3일이 경과하면서 지상으로 떡잎의 출현 (epigeous seedling)이 관찰되며(Fig. 1), 지방 유동의 측면에서

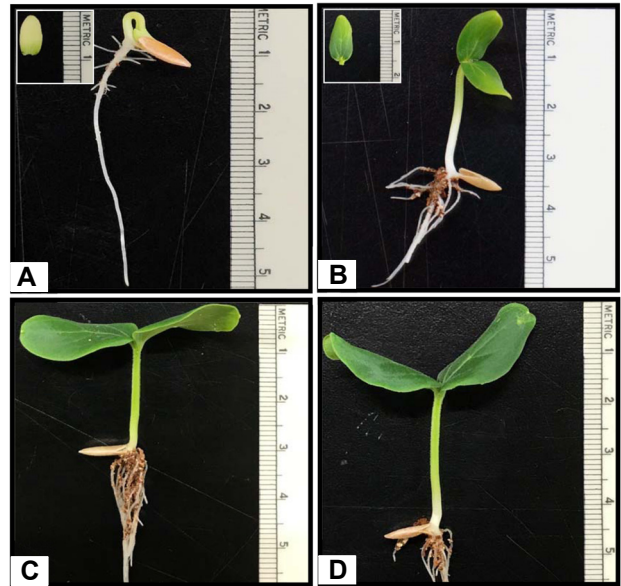


Fig. 1. Epigeous growth of cucumber seedlings from day 3 to day 6 after seeds were sown in wet vermiculite. Seeds were imbibed in sterile double distilled water (DDW) for 12 hr at 4°C prior to sowing. Seedlings were maintained in a growth chamber (Jeio Tech, Korea) at 25°C and 70% humidity under continuous illumination. The cotyledons of cucumber seedlings develop to a leaf-like photosynthetic organ until the seedling establishes as a young plantlet 40 days after sowing, after which they undergo senescence. A, day-3; B, day-4; C, day-5; and D, day-6.

나 지방의 대사에 필요한 효소의 합성에 관여하는 유전자들의 활성은 최고조에 달한다[1, 12, 16, 20, 27]. 마른 씨앗이 물에 불려진 이후 2 배 가까이 생체중량이 증가하는 것은 종자의 침윤 과정에서 흡수된 수분 때문이다(Fig. 2). 그리고 파종 4일을 전후로 저장 지방이 고갈되면서 오이의 떡잎은 광합성과 함께 급속한 성장과 발달을 통하여 한시적으로 잎의 기능을 수행한다(Fig. 1). 파종 이후 오이 떡잎의 급속한 생체중량의 증가가 보여주듯 발달의 마지막 단계인 노쇠화에 이르기까지 떡잎은 파종 전 물에 불린 종자의 생체중량 대비 20배 이상 성장하지만, 본질적으로 광합성이 가능한 잎이 발달하면서 그 역할을 제한적으로 수행하고 파종 후 40일을 전후한 기점으로 노쇠화 과정을 거치며 발달을 마치게 된다(Fig. 2).

오이 종자는 파종 후 발아 3일째까지도 떡잎에 많은 양의 지방이 잔류함을 육안으로 확인할 수 있었지만(Fig. 1A), 발아 4일째부터 그 이후의 떡잎에서는 Sudan III를 이용한 간단한 지방 검출의 방법으로는 색깔의 변화를 육안으로 구별하기는 어려웠다. 따라서 보다 정밀한 검출을 위한 방법으로 떡잎의 발달에 따른 지방의 함량 변화를 탐색하고자 일반적으로 사용되는 추출 가능한 불포화 지방산을 검출하는 방법을 사용하였다[7, 19]. 식물성 지방의 대부분은 불포화 지방산이기도 하며

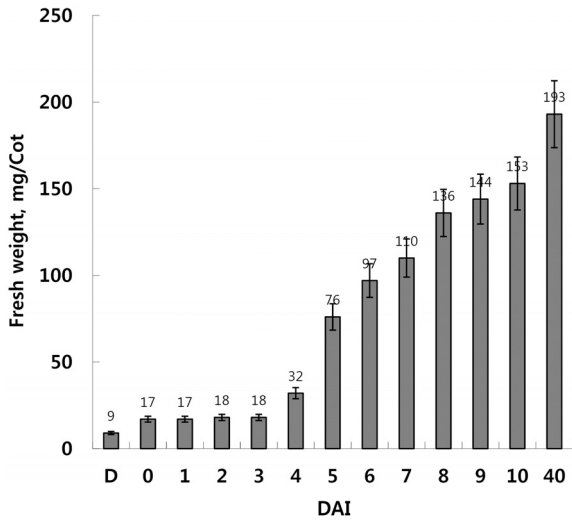


Fig. 2. Changes in the fresh weight of developing cucumber cotyledon. An epigeous cucumber cotyledon develops to 6~7 weeks before it senesces. Five pairs of dry seed (kernel only) or cotyledon samples were used to measure fresh weight of cotyledons at each stage of development. The data expressed are mean  $\pm$  SD of ten individual cotyledons ( $p < 0.1$ ). Mean values are presented for a single cotyledon. DAI, days after seed imbibition; D, dry seeds; 0, imbibed seeds for 12 hr in sterile DDW at 4°C.

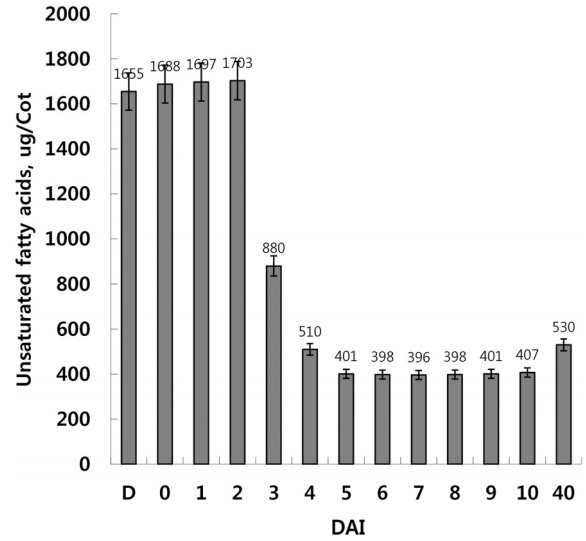


Fig. 3. Changes in unsaturated fatty acid content in cucumber cotyledons from dry seed to day 40, the second stage of cotyledon senescence. After measuring fresh weight from a seed kernel or a cotyledon, lipids were extracted from 10~25 mg of whole seeds (kernel only) or slices of a cotyledon in independent experiments. The seed coat was removed from dry seeds (D) and the seeds were then crushed in extraction solution. Changes in detectable unsaturated fatty acid content from dry seeds, and from early germination to senescence, were evaluated for a single cotyledon via colorimetric detection (at 540 nm). Unsaturated fatty acid content shown is the mean  $\pm$  SD of three independent experiments ( $p < 0.05$ ). DAI, days after seed imbibition; D, dry seed (kernel only).

특히 지방 저장 종자의 배유인 떡잎에 저장된 지방의 90% 내외가 불포화 지방산이기 때문이다[6, 14].

지방의 검출 결과(Fig. 3)에서 보는 바와 같이 마른 씨앗이 12시간 동안 물에 침윤된 후(Day 0) 수분의 흡수로 인하여 생체질량이 2배 가까이 증가하였지만(Fig. 2), 파종 후 2일째까지 불포화 지방산의 함량은 발아에 따른 대사활동의 시작과 함께 약간의 증가가 관찰될 뿐 큰 변화는 관찰되지 않았다(Fig. 3). 즉, 본격적인 저장 지방의 유통과 대사는 파종 후 3일째부터 급격하게 일어남을 확인할 수 있다(Fig. 3). 전통적으로 파종 후 3일째 떡잎에서는 글라이옥실산 회로의 가동이 최고조에 달하는 시기로서 이것이 저장 지방의 유통을 대부분 담당하며, 이는 이전의 연구 결과들과 다르지 않다[1, 8, 12, 20, 27]. 파종 후 4일째에 이르면 떡잎의 저장 지방은 파종 직전(Day 0)의 1/3 이하로 떨어져 대부분 고갈되며(Fig. 3), 이후에는 떡잎이 광합성과 물질대사를 통해 생합성을 수행하여 기관의 생체구조와 생명활동을 지탱하는 수준을 유지한다(Fig. 3). 노쇠화 떡잎에서 약간의 증가를 보이는 것은 저장 지방의 유통이 아닌 노쇠화에 따른 엽록체 등 세포내막 체계의 구조 및 기능의 점진적이며 일시적인 상실로 인한 지방산의 유출로 볼 수 있다[26].

**오이의 발아와 떡잎의 발달에 따른 carnitine의 검출과 변화**

Carnitine 검출의 전과정은 검출용 시약을 제조 판매하는 Sigma-Aldrich (USA)의 측정 원안에 따라 수행하였으며, 기본

적으로 carnitine이 존재하지 않는 블랭크(0)를 기준으로 하지만 일반적으로 나타나는 background value가 유의미하게 얻어질 경우 그 값을 확인하고, 시료에서 얻어진 측정값에서 감산하여 측정값은 조정 환산하였다. 측정은 예비 실험의 결과는 제외하고 별도로 진행된 5차례의 본실험에서 얻어진 측정값 중 최상위 값과 최하위 값을 제외한 3차례 실시한 측정 실험의 평균값으로 결과를 제시하였다(Fig. 4). 카니틴의 존재를 확인하기 위한 첫 번째 예비 연구의 발아 초기 떡잎에서도 카니틴의 함량은 유사한 경향성을 나타냈으나 7일째의 떡잎과 노쇠화 단계에서의 검출 결과는 다소 상이함을 나타냈다[2]. 그러나 보다 구체화한 실험설계를 통한 반복된 측정 실험과 떡잎의 생체 질량의 변화 및 포화지방산의 변화량 등을 통합적으로 조사한 본 연구에서 기술적 미흡함과 결과 처리의 오류를 해소하고 명확한 결론에 도달할 수 있었다.

파종 후 3일(72시간)이 경과하고 떡잎이 지상으로 출현하기 시작하는 상태를 시점으로 24시간을 간격을 두고 검출을 실시하여 발아하거나 발달중인 떡잎을 대상으로 nano mole (nM) 수준에서의 카니틴 존재를 확인하였다(Fig. 4). 카니틴의 검출 시약을 제공한 Sigma-Aldrich (USA)의 공인된 검출 데이터에



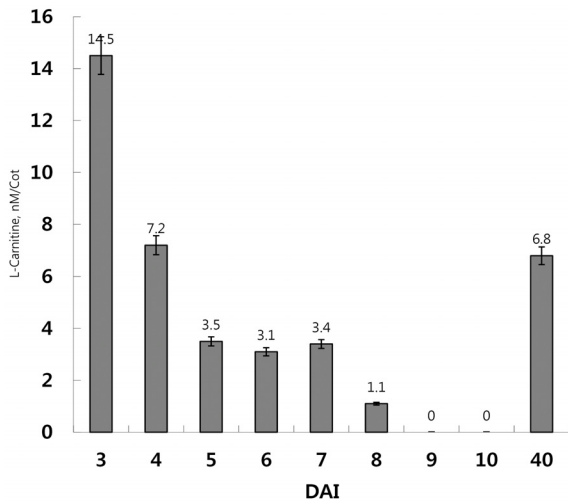


Fig. 4. Changes in carnitine content during the development of cucumber cotyledons from the early stage of germination on day 3 to fully grown green cotyledon at day-10, as a photosynthetic leaf-like organ, and in the second stage of cotyledon senescence at day-40. Carnitine content is shown for a single cotyledon at each stage of development. DAI, days after seed imbibition. Colorimetric detection was performed at 570 nm. The carnitine content shown is the mean  $\pm$  SD of three independent experiments ( $p < 0.05$ ) with five repetitions excluding both the highest and lowest amounts based on the mean of three independent experiments.

제시된 사람의 혈장이나 혈청의 카니틴 농도가 10~70  $\mu$ M 수준임을 감안하면 ~10 nM 수준의 매우 낮은 함량을 나타냈다 [11]. 파종 직전 12시간 동안 물에 불린 종자나 파종 후 1일째 및 2일째의 떡잎에서는 많은 저장 지방의 간섭 등 기술적 한계로 인하여 카니틴 검출을 위한 시료 추출물을 얻기 힘들었다. 따라서 본 연구에서는 발아가 본격적으로 진행되는 3일 이후의 떡잎으로부터 검출이 가능하였다(Fig. 4). 검출 가능한 시료로부터 측정된 떡잎 한 장 당 카니틴의 함량은 발아 3일째에 최고조에 달하는 14.5 nM 정도로 나타났다. 이 시기는 또한 오이의 발아 초기 글라이옥살산 회로의 핵심 효소인 말산 합성효소(malate synthase, MS)와 이소시트르산 분해효소(isocitrate lyase, ICL)의 활성과 이들을 암호화하는 유전자의 활성이 최대에 이르는 3~4일째와 일치한다[12, 20]. 발아 5일째부터 검출 가능한 카니틴의 함량은 3일째의 1/4 수준으로 급격히 감소하여 7일째까지 유지되었고, 8일째에는 3일째의 1/14 수준으로 급감하였으며, 9일째 이후에는 검출되지 않았다. 그러나 탐침 실험의 형태로 수행된 노쇠화 2단계(50% 노쇠화) 떡잎에서도 발아 4일째 수준의 카니틴이( $\leq 6.8$  nM) 검출되어(Fig. 4) 노쇠화 과정에서 카니틴의 역할과 대사과정에서의 기능 등 보다 정확한 판단을 위한 후속 연구가 필요하다.

선행 연구 보고와 본 연구의 결과를 바탕으로 한 지방 저장 식물의 발아 초기 지방 유동에 관한 대사 경로는 Fig 5에 통합

하여 간략하게 제시하였다[1, 18]. 글라이옥살산 회로를 중심으로 하는 저장 지방 유동 및 대사의 1차 주요 경로는 이미 잘 알려진 과정이며(직선 화살표), 추가 경로로 제안된 2차 통로(점선 화살표)는 carnitine을 매개로 하는 물질대사 과정에서 탄소원을 제공하는 acetyl CoA의 이동 경로를 나타냈다(Fig. 5).

앞선 연구에서 오이 종자의 발아 시 저장 지방의 유동에 있어 acetyl unit 통로의 실존 가능성을 예측할 수 있었던 것은 acetylcarnitine 운반 체계와 직접 연관되어 있는 오이 BOU 유전자들의 발현을 확인한 것으로부터 출발하였다[1]. 본 연구에서는 발아 초기와 노쇠화 떡잎에서 미토콘드리아 내막의 BOU를 통로로 이동하는 carnitine의 존재와 변화를 처음으로 확인한 것이다. BOU 시스템은 carnitine을 매개로 하여 미토콘드리아 외막과 내막 단백질인 carnitine palmitoyl transferase I과 II(CPT I and CPT II)를 사용하여 acetyl unit을 세포질로부터 미토콘드리아로 운반하는 수송체계의 하나로 알려져 있으며, 이러한 수송 체계는 균계와 동물체에 더욱 잘 발달되어 있다[25]. 또한 애기장대의 bou 돌연변이체는 빛이 있는 조건에서 발아시킬 경우 정상적인 발아가 불가능하였으나, 암소에서 발아를 유도할 경우 발아와 발달의 유도가 가능하여

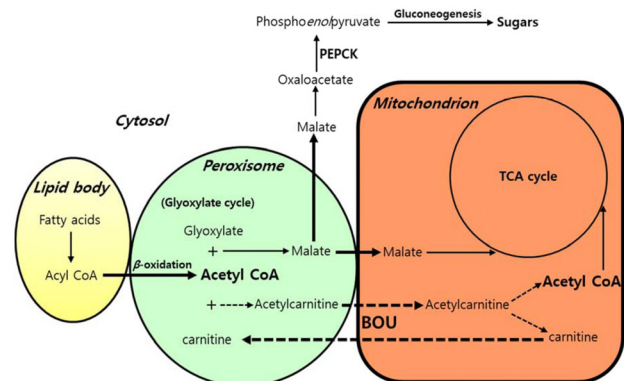


Fig. 5. A proposed model of lipid mobilization pathways [1, 18]. The triacylglycerol (TAG) form of seed storage lipid undergoes catabolic degradation to fatty acids through acyl CoA within the lipid body. This metabolite undergoes  $\beta$ -oxidation in specialized peroxisomes (also known as glyoxysomes). The glyoxylate cycle produces several important metabolic intermediates—malate, oxaloacetate, citrate, isocitrate, and glyoxylate—by supplying carbon to form acetyl CoA from the seed storage lipid. The role of the glyoxylate cycle is to be the primary route of lipid mobilization for carbon energy supply in oil-seed plant germination. An additional possible carbon transport route through BOU between peroxisomes and mitochondria using carnitine molecules is presented. Solid arrows indicate conventional primary transport route and broken arrows represent the proposed secondary transport route of carbon sources during cucumber cotyledon development.

식물에서는 빛에 의한 완전한 내막체계의 구성이 BOU 시스템 형성에 필수조건임 보고한 바 있으며, 또한 BOU통로가 글라이옥실산 회로를 일부 대체할 것이라는 주장을 제기한 바 있다[13, 15]. 특정 대사물질을 집중적으로 대사 할 수 있는 기관계가 발달된 고등동물과 달리 조직계로 구성된 고등식물의 경우 세포내 카니틴의 농도는 매우 낮아 본 연구에서도 사람의 혈장과 비교하여 ~1/1,000 이하의 수준에 불과함을 확인하였다[11]. 그럼에도 불구하고 지방 저장 종자의 발아 또는 노쇠화 발달 등과 관련된 특정 발달 과정에서의 역할은 어느 정도 중요하게 작용할 것으로 추정된다[15].

본 연구의 결과는 오이의 발아 초기와 떡잎의 발달 및 노쇠화 과정에서 저장 지방의 유동과 지방의 대사 과정에 직간접으로 관여하는 주요 대사물질의 하나일 것으로 알려진 carnitine을 발달중인 오이의 떡잎에서 변화를 처음으로 확인한 것으로써, 전통적으로 알려진 글라이옥실산 회로 중심의 지방의 유동 및 대사에 대한 부가적인 기능을 부여한 것으로 사료된다. 나아가 카니틴이 식물의 발달과정에서 여러 대사과정에 관여할 것이라는 추정은 후속 연구를 통하여 보다 명확히 규정되어야 할 것으로 판단된다.

## References

1. Cha, H. J. and Kim, D. J. 2014. Metabolic genes expression for lipid metabolism in cucumber cotyledon development and possibility of secondary route of acetyl units. *J. Life Sci.* **24**, 1055-1062.
2. Cha, H. J. and Kim, D. J. 2017. Assay of L-carnitine in developing cucumber cotyledon. *Bull. Sci. Ed.* **33**, 43-50.
3. Chen, Z. H., Walker, R. P., Acheson, R. M., Técsi, L. I., Wingler, A., Lea, P. J. and Leegood, R. C. 2000. Are isocitrate lyase and phosphoenolpyruvate carboxykinase involved in gluconeogenesis during senescence of barley leaves and cucumber cotyledons? *Plant Cell Physiol.* **41**, 960-967.
4. Eastmond, P. J. and Graham, I. A. 2001. Re-examining the role of the glyoxylate cycle in oilseeds. *Trends Plant Sci.* **6**, 72-78.
5. Eisenhut, M., Planchais, S., Cabassa, C., Guivarc'h, A., Justin, A. M., Taconnat, L., Renou, J. P., Linka, M., Gagneul, D., Timm, S., Bauwe, H., Carol, P. and Weber, A. P. 2013. Arabidopsis A BOUT DE SOUFFLE is a putative mitochondrial transporter involved in photorespiratory metabolism and is required for meristem growth at ambient CO<sub>2</sub> levels. *Plant J.* **73**, 836-849.
6. Fiume, M. M. 2012. Tentative safety assessment; *Cucumis sativus* (Cucumber) -Derived ingredients as used in cosmetics. *Cosmetic Ingredient Review*, NW, USA.
7. Folch, J., Lees, M. and Slone Stanley, G. H. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* **226**, 497-509.
8. Footitt, S., Slocombe, S. P., Lerner, V., Kurup, S., Wu, Y., Larson, T., Graham, I., Baker, A. and Holdsworth, M. 2002. Control of germination and lipid mobilization by COM-ATOSE, the Arabidopsis homologue of human ALDP. *EMBO J.* **21**, 2912-2922.
9. Graham, I. A., Smith, L. M., Leaver, C. J. and Smith, S. M. 1990. Developmental regulation of expression of the malate synthase gene in transgenic plants. *Plant Mol. Biol.* **15**, 539-549.
10. Graham, I. A., Leaver, C. J. and Smith, S. M. 1992. Induction of malate synthase gene expression in senescent and detached organs of cucumber. *Plant Cell* **4**, 349-357.
11. Hoppel, C. 2003. The role of carnitine in normal and altered fatty acid metabolism. *Am. J. Kidney Dis.* **41**(4 Suppl 4), S4-12.
12. Kim, D. J. and Smith, S. M. 1994. Molecular cloning of cucumber phosphoenolpyruvate carboxykinase and developmental regulation of gene expression. *Plant Mol. Biol.* **26**, 423-434.
13. Lawand, S., Dorne, A. J., Long, D., Coupland, G., Mache, R. and Carol, P. 2002. Arabidopsis A BOUT DE SOUFFLE, which is homologous with mammalian carnitine acyl carrier, is required for postembryonic growth in the light. *Plant Cell* **14**, 2161-2173.
14. Munshi, S. K., Sandhu, S. and Sharma, S. 2007. Lipid composition in fast and slow germination sunflower (*Helianthus annuus* L.) seeds. *Gen. Appl. Plant Physiol.* **33**, 235-246.
15. Nguyen, P. J., Rippa S., Rossez, Y. and Perrin, Y. 2016. Acylcarnitines participate in developmental processes associated to lipid metabolism in plants. *Planta* **243**, 1011-1022.
16. Penfield, S., Penfield-Wells, H. M. and Graham, I. A. 2006. Storage reserve mobilization and seedling establishment in *Arabidopsis*. *Arabidopsis Book* **4**, 1-17.
17. Pinfield-Wells, H., Rylott, E. L., Gilday, A. D., Graham, S., Job, K., Larson, T. R. and Graham, I. A. 2005. Sucrose rescues seedling establishment but not germination of Arabidopsis mutants disrupted in peroxisomal fatty acid catabolism. *Plant J.* **43**, 861-872.
18. Pracharoenwattana, I., Cornah, J. E. and Smith, S. M. 2005. Arabidopsis peroxisomal citrate synthase is required for fatty acid respiration and seed germination. *Plant Cell* **17**, 2037-2048.
19. Reis, A., Rudnitskaya, A., Blackburn, G. J., Mohd Fauzi, N., Pitt, A. R. and Spickett, C. M. 2013. A comparison of five lipid extraction solvent systems for lipidomic studies of human LDL. *J. Lipid Res.* **54**, 1812-1824.
20. Reynolds, S. J. and Smith, S. M. 1995. The isocitrate lyase gene of cucumber: Isolation, characterization and expression in cotyledons following seed germination. *Plant Mol. Biol.* **27**, 487-497.
21. Robinson, R. W. and Deckers-Waters, D. S. 1997. *Cucurbits*, pp 34-38, 1<sup>st</sup> ed, CAB International: Oxford, UK.
22. Rylott, E. L., Hooks, M. A. and Graham, I. A. 2001. Co-ordinate regulation of genes involved in storage lipid mobilization in *Arabidopsis thaliana*. *Biochem. Soc. Trans.* **29**, 283-287.
23. Schwadbedissen-Gerbling, H. and Gerhardt, B. 1995. Purification and characterization of carnitine acyltransferase from higher plant mitochondria. *Phytochemistry* **39**, 39-44.

24. Smith, S. M. 2002. Does the glyoxylate cycle have an anaplerotic function in plants? *Trends Plant Sci.* **7**, 12-13.
25. Strijbis, K. and Distel, B. 2010. Intracellular acetyl unit transport in fungal carbon metabolism. *Eukaryot. Cell* **9**, 1809-1815.
26. Watanabe, M., Balazadeh, S., Tohge, T., Erban, A., Giavalisco, P., Kopka, J., Mueller-Roeber, B., Fernie, A. R. and Hoefgen, R. 2013. Comprehensive dissection of spatiotemporal metabolic shifts in primary, secondary, and lipid metabolism during developmental senescence in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **162**, 1290-1310.
27. Weir, E. M., Riezman, H., Grienenberger, J. M., Becker, W. M. and Leaver, C. J. 1980. Regulation of glyoxysomal enzymes during germination of cucumber. Temporal changes in translatable mRNAs for isocitrate lyase and malate synthase. *Eur. J. Biochem.* **112**, 469-477.

### 초록 : 오이 떡잎의 발달 과정에서 carnitine의 검출과 변화

차현정<sup>1,2</sup> · 김대재<sup>3\*</sup>

(<sup>1</sup>충북대학교 대학원, <sup>2</sup>충북과학고등학교, <sup>3</sup>충북대학교 사범대학 생물교육과)

지방 저장 종자의 발아 시 저장 지방의 유동은 떡잎이 스스로 광합성을 하기 전까지 탄소 에너지를 공급하기 위한 핵심적인 대사과정이다. 본 연구에서는 오이 종자의 발아와 유식물의 발달 및 노쇠화 과정의 떡잎에서 식물성 카니틴의 검출과 변화를 처음으로 보고하고자 한다. 또한 오이 떡잎의 전 발달과정에서 불포화 지방산의 변화를 조사하였다. 카니틴은 오이 종자의 파종 후 3일째 떡잎에서 14.5 nM 수준으로 최고조에 달하며, 4일째에는 그 절반 수준인 7.2 nM 수준으로 급격하게 감소하였다. 이후 이어지는 3일 동안 7일째까지 카니틴은 ~3.0 nM 수준을 유지하였다. 같은 시기 불포화 지방산의 함량은 카니틴이 최고조에 달하는 파종 후 3일째 급격히 떨어지고, 5일째 저장 지방은 완전히 고갈되는 것으로 보인다. 파종 9일째부터 카니틴은 검출되지 않았으나 떡잎이 절반 노랗게 변한 노쇠화 중기의 떡잎에서 6.8 nM 수준으로 검출되었는데, 이 검출량은 오이 종자의 파종 후 저장 지방이 고갈되어가는 4일째 떡잎에서 검출된 카니틴의 양과 비슷한 수준이다. 파종 5일 이후 광합성 기능을 완전히 확보한 녹색 떡잎에서 불포화 지방산은 일정한 수준을 유지하며, 노쇠화 단계에 접어든 떡잎에서는 세포의 내막 구조물들이 파괴되며 또다시 불포화 지방산의 함량이 다소 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. 이러한 카니틴과 불포화 지방산의 검출과 변화의 관찰은 오이 떡잎의 발달과정에서 밝혀진 최초의 발견이다. 이것은 오이 종자의 발아와 떡잎의 발달과정에 카니틴 대사와 관련 BOU 유전자 발현이 밀접하게 공조함을 확인한 것이다. 또한 오이 종자의 발아과정에 에너지를 공급하기 위한 글라이옥실산 회로와 더불어 부가적인 탄소원 이동의 경로의 가능성을 뒷받침한다.