

助成番号 9916

## 分子生物学的手法を用いたマングローブ植物の耐塩性機構の解明と応用

助成研究者：山田 晃世 (東京農工大学 工学部 生命工学科)

共同研究者：三村 徹郎 (一橋大学 商学部 生物学教室)

小関 良宏 (東京農工大学 工学部 生命工学科)

マングローブとは、熱帯、亜熱帯の沿岸域に生息する樹木類の総称であり、その最大の特徴は汽水域で生育できる点にある。このことからマングローブは進化の過程で他の高等植物とは異なる特殊な耐塩性機構を獲得したものと考えられる。マングローブの耐塩性機構を遺伝子レベルで解析した例はこれまでにほとんどなく、その原因として植物体からの mRNA 抽出が困難であることが挙げられる。近年、三村博士らがマングローブの一種である *Bruguiera sexangula* の培養細胞系を確立した。本研究ではこの培養細胞系を用いて、cDNA ライブラリーを構築し、この中からマングローブの耐塩性に関与する遺伝子を獲得することを目指した。cDNA ライブラリーは、150 mM NaCl 存在下で培養したマングローブ懸濁培養細胞から抽出した mRNA を基に、 $\lambda$ ZapII を用いて作製した。マングローブの耐塩性に関与する cDNA のスクリーニングには、大腸菌の遺伝子発現系を利用し、形質転換大腸菌の耐塩性を指標とした選抜を行った。その結果、大腸菌の耐塩性を強化する機能を有する長さ約 1.0 kb の cDNA の単離に成功した。この cDNA の全塩基配列を解析した結果、141 アミノ酸からなるタンパク質をコードしていることが明らかになった。また、このタンパク質のアミノ酸組成は、19.86% がセリンという極めて珍しい特徴を有していた。現在、このアミノ酸配列と相同性を有するタンパク質が、データベース (PIR, SwissProt) 上に登録されていないことから、このタンパク質は新規のものであると考えられた。そこで、我々はこの cDNA がコードするタンパク質を「マン格林 (mangrin)」と命名した。さらに本研究ではマン格林 cDNA を酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、及びタバコ培養細胞に導入し、それぞれの形質転換体の細胞レベルでの耐塩性を評価した。タバコ培養細胞への mangrin cDNA の導入には、ベクターとして 35S プロモーターを有する pBI121 を使い、アグロバクテリウム法を利用して形質転換体を得た。比較実験に mangrin cDNA の代わりに GUS 遺伝子を導入したものをを用いた。NaCl を添加していない培地で、7 日間培養した場合、どちらの形質転換体もほぼ同様、または、mangrin cDNA を導入した一部の形質転換体においてわずかに生育促進効果が見られた。これに対し、150 mM の NaCl を含む培地で 13 日間培養した場合、mangrin cDNA を導入した全ての形質転換体は、コントロールと比べ顕著な生育促進効果が見られた。同様な効果は、mangrin cDNA を導入した酵母においても観察された。以上の結果から、マン格林は、原核生物から酵母、高等植物に至る、幅広い生物群の耐塩性を強化する機能を有するものと考えられた。マン格林の利用は、将来、有用農産物植物の耐塩性を強化するための 1 つの有効な手段になりうると考えられた。



助成番号 9916

## 分子生物学的手法を用いたマングローブ植物の耐塩性機構の解明と応用

助成研究者：山田 晃世 (東京農工大学 工学部 生命工学科)

共同研究者：三村 徹郎 (一橋大学 商学部 生物学教室)

小関 良宏 (東京農工大学 工学部 生命工学科)

## 1. 研究目的

一般に高等植物は NaClにより生育阻害が生じる。これは、植物細胞外の Na<sup>+</sup> 濃度の上昇により細胞外液の浸透圧が上昇し、細胞内への Na<sup>+</sup> の浸透が生じるため (Epstein 1998) と考えられている。細胞内 Na<sup>+</sup> 濃度の上昇は、酵素活性の変化や、生育に必要な他のイオンの吸収の阻害を引き起こし、多くの代謝反応に多くの不都合をもたらす (Serrano 1996)。植物の塩に対する適応機構としては、適合溶質の合成による浸透圧の調節 や、塩誘導性タンパク質による浸透圧の調節及び代謝系の保護 (Moons et al. 1997)、K<sup>+</sup> トランスポーターによる細胞内への Na<sup>+</sup> の流入抑制 (Zhu et al. 1998)、Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> アンチporterによる Na<sup>+</sup> の局在化 (Fukuhara et al. 1996)、カルシニューリンによる各種遺伝子の発現制御 (Liu et al. 1998) などが知られている。近年、これらの機構に関わる酵素とその遺伝子が明らかにされ、それをイネ (Xu et al. 1996)、タバコ (Kishor et al. 1995; Pardo et al. 1998; Sakamoto et al. 1998; Tarczynski et al. 1993)、シロイヌナズナ (Hayashi et al. 1997) 等に導入する事で、耐塩性を強化する試みが進められている。しかしながら、得られた形質転換体は、野生株より高い耐塩性が認められるが、それは、塩の影響がわずかに軽減された程度に過ぎない。塩濃度の高い環境で安定に生育できる遺伝子組み換え植物を作出するには、複数の耐塩性機構を形質転換植物で作用させる必要があり、そのためには、新規の多様な「耐塩性に関与する遺伝子」の探索が不可欠であると考えられる。そしてその探索には塩濃度の高い環境で生育できる植物 (塩生植物) 由来の遺伝子ライブラリーが適当であると思われる。一方、沿岸及び河口近くの高濃度の塩分を含む土壤に生息する樹木類にマングローブ植物があるが、この耐塩性機構を遺伝子レベルで解析した例はない。その理由はマングローブ植物を実験室内で扱う事が極めて困難であったためと考えられる。近年、一橋大学の三村徹郎博士らがマングローブ植物の一種である *Bruguiera sexangula* から培養細胞系を確立した (Mimura et al. 1997a)。この培養細胞は懸濁培養が可能であり、また 200 mM 以上の塩存在下でも生育可能であるといった、他の植物培養細胞とは異なる極めて珍しい性質を有している (Mimura et al. 1997b)。本研究は塩生植物としてマングローブ植物に着目し、その耐塩性に関与する遺伝子群を機能スクリーニング法で獲得する事を目的とした。本研究はマングローブ植物の耐塩性機構を遺伝子レベルで解明する初の試みであると

同時に、陸上植物の耐塩性強化を目指すものである。本研究により得られる遺伝子組み換え植物は、将来、「海水を用いた農業」や「砂漠の緑化」等への応用が期待できる。

## 2. 研究方法

### 2.1 材料

マングローブ懸濁培養細胞は、一橋大学の三村徹郎博士らが確立した *Bruguiera sexangula* の懸濁培養細胞系 (Mimura et al. 1997a)を用いた。この培養細胞は AA 培地を用い、500 ml フラスコに 120 ml の分量で、26 °C、暗所で往復振とう培養 (70 rpm) した。2 週間ごとに新しい AA 培地 100 ml に対し 20 ml の割合で植え継ぎ、株を維持した。マングローブの cDNA ライブラリーは、100 mM の NaCl を含む AA 固体培地で培養したマングローブ培養細胞から抽出した poly (A<sup>+</sup>) RNA から  $\lambda$  Zap IIベクターを用いて構築した。

### 2.2 大腸菌を用いたマングローブの耐塩性に関する遺伝子の探索

大腸菌にマングローブ cDNA ライブラリーを導入し発現させ、400 mM の NaCl を含む 2YT 寒天培地で生育可能になったクローンをマングローブの耐塩性に関する遺伝子が導入されたものとして選抜した。具体的にはマングローブ cDNA ライブラリーを Strategene 社の in vivo excision system により、pBluescript SK (以下 SK) に組み込んだ形で大腸菌に導入し、発現させた。一次スクリーニングは、マングローブ cDNA が導入された大腸菌を 400 mM NaCl、50  $\mu$ g/ml カナマイシン (Km)、50  $\mu$ g/ml アンピシリン (Amp) を含む 2YT 培地にプレートし、約 20 時間、37 °C で培養後、得られたコロニーを二次スクリーニングに用いた。一次スクリーニングでプレートした形質転換大腸菌の数は、 $10^6$  以上であり (塩濃度 86 mM に調整した 2YT (Amp, Km, IPTG) 寒天培地に形質転換大腸菌懸濁液の一部をプレートアウトする事で確認)、これは、マングローブ cDNA ライブラリーに含まれる独立クローン数  $10^6$  を十分にカバーするものである。二次スクリーニングは、得られたコロニーを再度一次スクリーニングで用いた選択培地にプレートし、約 20 時間、37 °C で培養後、明らかに耐塩性が向上していることが確認できたクローンのみを選抜した。ここで得られた全クローンは、プラスミドを抽出した後、Thermo Sequenase Cycle Sequencing Kit (Amersham)、及び DNA シーケンサー LIC-4000L (LI-COR社) を用いて塩基配列を決定した。塩基配列の解析は国立遺伝学研究所生命情報研究センター (DDBJ) の BLAST 相同性検索プログラムを用いた。

## 2.3 形質転換大腸菌の耐塩性の評価

二次スクリーニングの結果得られたプラスミドを大腸菌に再導入し、50 µg/ml Km、50 µg/ml Amp、0.05 mM IPTG を含む 2YT 液体培地で吸光度 1.0 (OD<sub>600</sub>)まで培養した。この菌体懸濁液を 10<sup>5</sup>、10<sup>4</sup>、10<sup>3</sup>、10<sup>2</sup> cells/25 µl になるように 2YT 培地で希釈した後、50 µg/ml Km、50 µg/ml Amp、0.05 mM IPTG を含む 2YT 寒天プレート及び 50 µg/ml Km、50 µg/ml Amp、0.05 mM IPTG、400 mM NaCl を含む 2YT 寒天プレートにそれぞれ 25 µl ずつスポットし、液体が乾くまで風乾した後、37 °Cで一晩培養した。

## 2.4 形質転換酵母の作成

酵母 (*Saccharomyces cerevisiae* YM4271: Clonetech) への遺伝子導入には、ベクターとして *GAL1* プロモーターを有する pYES2 (Invitrogen) を用い、これに cDNA を組み込んだ。作成したプラスミドはエレクトロポレーション法により酵母に導入した。形質転換酵母の選抜にはウラシル要求性を指標とした。

## 2.5 形質転換タバコ培養細胞、及び植物体の作成

タバコ培養細胞 (*Nicotiana tabacum* L. cv. Blight Yellow2 (BY-2)、及び植物体 (SR-1) への遺伝子導入には、ベクターとして 35S プロモーターを有する PAB35S を用い、これに cDNA を組み込んだ。作成したプラスミドはアグロバクテリウム法により、タバコ培養細胞、及び植物体に導入した。形質転換体の選抜にはカナマイシンを用いた。

## 2.6 サザンブロットハイブリダイゼーション解析

マングローブゲノムDNAにおける、スクリーニングで得た遺伝子 (cDNA) のコピー数、並びに高等植物におけるスクリーニングで得た遺伝子の分布を確認するためにサザンハイブリダイゼーションを行った。植え継ぎ後 2 週間のマングローブ細胞を回収し、ゲノム DNA を抽出した。制限酵素 (*Xho*I, *Xba*I, *Bam*HI, *Eco*RI, *Pst*I, *Hind*III, *Sa*II) で切断したゲノム DNA を 1 レーン当たり 3 µg 用いた。シートの洗浄は 65 °C、0.1×SSC、0.1% SDS、30 分を 2 回行う前に、42 °C、1×SSC、0.1% SDS、30 分を 2 回の穏やかな条件で洗浄した後、露光し、その後、再洗浄を行い再度露光した。その他の植物からのDNAの抽出については、上記と同様に行った。

## 3. 研究結果

### 3.1 機能スクリーニング法によるマングローブの耐塩性に関与するcDNAの単離

1次スクリーニングの結果、耐塩性を獲得したと考えられるコロニーが約 300 個得られ

た。2次スクリーニングを行った結果、29コロニーは明らかに耐塩性が向上していることが確認された。各コロニーを培養し、プラスミド抽出し、それらを再度、大腸菌に導入してその耐塩性を再検討した結果、得られた形質転換体全てに耐塩性の向上が認められた。このことから、29コロニーから抽出したプラスミドには、塩存在下において、大腸菌の耐塩性を向上させる何らかの因子が挿入されているものと考えられた。そこで、29クローンから得られた全てのプラスミドに組み込まれたcDNAの制限酵素による切断パターン、及びその部分的な配列を解析した。その結果、23クローンは同一のタンパク質をコードしているものと考えられた。そこで、本研究では、この大部分を占めたcDNA（#A27）の機能解析に焦点をしぼり、以降の実験を進めた。

### 3.2 形質転換大腸菌の耐塩性

86 mM NaCl 2YT 寒天培地上（normal 2YT 培地）において、ベクターであるSKのみを導入した大腸菌と3.1で得られたcDNA（#A27）を導入した大腸菌の生育にほとんど差は見られなかった。これに対し、400 mM NaClを含む2YT寒天培地上ではSKのみを導入した大腸菌は生育できないのに対し、#A27を導入した大腸菌はNaClにより生育が阻害されながらも生育がみられた（Fig. 1）。これにより#A27が大腸菌の耐塩性を強化する機能を有する事が確認できた。

### 3.3 #A27の全塩基配列

#A27の全塩基配列を決定し、それから推定されるアミノ酸配列を決定した（EMBL/GenBank/DDBJ accession number: AB037929）。#A27は全長1018 bpであり、そこから推定されるアミノ酸の組成はセリンに富んだものであった。セリンは側鎖に水酸基を持つアミノ酸であり、その他の水酸基を持つアミノ酸としてはトレオニンやチロシンがある。この3種のアミノ酸が#A27において占める割合は約3割と高い（Table 1）。各種タンパク質データベースを用い、このタンパク質と相同性を有するタンパク質を検索した結果、このタンパク質と相同性を有するタンパク質は見られなかった。そこで、我々はこのタンパク質を新規のものと考え、「マングリリン（mangrin）」と命名した。

### 3.4 酵母におけるマングリリンの効果

マングリリンcDNA、及びベクターのみを導入した酵母の耐塩性を評価した。NaClを含まない最小培地（SC培地）で培養した場合、マングリリンcDNAを導入した酵母は、ベクターのみを導入した酵母に比べ、高い生育能を有した（Fig. 2）。特にこの傾向はNaClを1.2 M添加した場合に顕著にあらわれ、培養開始後9日目のマングリリン導入酵母の細胞濃度は、NaCl非

存在下において、コントロールの 1.5 倍であるのに対し、NaCl 1.2 M の条件下では、コントロールの約 2 倍に達している (Fig. 2)。このことから、マンダリンは原核生物である大腸菌のみに耐塩性強化因子として機能するだけでなく、真核生物である酵母においても機能することが明らかになった。

### 3.5 タバコ培養細胞におけるマンダリンの効果

マンダリン cDNA を導入したタバコ培養細胞の耐塩性を評価した。比較実験にマンダリン cDNA の代わりに GUS 遺伝子を導入したものをを用いた。NaCl を添加していない培地で、7 日間培養した場合、どちらの形質転換体もほぼ同様、または、マンダリン cDNA を導入した一部の形質転換体においてわずかに生育促進効果が見られた (Fig. 3)。これに対し、150 mM の NaCl を含む培地で 13 日間培養した細胞は、マンダリン cDNA を導入した全ての形質転換体において、顕著な生育促進効果が見られた (Fig. 3)。このことから、マンダリンは植物培養細胞においても耐塩性強化因子として機能するものと考えられた。

### 3.6 タバコ植物体におけるマンダリンの効果

3.5 においてマンダリンはタバコ培養細胞の耐塩性を強化する機能を有することが細胞レベルで確認されたが、植物体レベルではどのように作用するか不明である。そこで、マンダリン cDNA を導入したタバコの耐塩性を植物体レベルで評価した。比較実験にマンダリン cDNA の代わりに GUS 遺伝子を導入したものをを用いた。マンダリン cDNA、及び GUS 遺伝子が導入された植物体をそれぞれ 4 株ずつ選択し、150 mM の NaCl 存在下における各形質転換体の生育を評価した。その結果、GUS 遺伝子が導入された全ての形質転換体は 150 mM の NaCl 存在下でほとんど生育できないのに対し、マンダリンを導入した形質転換体は 4 株中 2 株において顕著な生育が観察された (Fig. 4)。マンダリンが導入されているにもかかわらず、耐塩性の強化がほとんど見られない形質転換体については、タバコのゲノム DNA へのマンダリン cDNA の挿入位置がマンダリンの発現量、発現部位に重大な影響を与えているためと考えられた。

### 3.7 サザンブロットハイブリダイゼーション解析

マンダリン cDNA をプローブとしたサザンブロット解析により、マンダリンゲノム中にマンダリン遺伝子は少なくとも 2 コピー存在することが確認された (Fig. 5)。洗浄の条件を変えて検出した結果、*Xba*I の 5 Kbp、*Pst*I の 15 Kbp 及び *Hind*III の 1.5 Kbp のバンドが消失していることから、2 コピーのうちの 1 つは マンダリンと相同性を有する別の遺伝子であると考えられた。

次に、高等植物におけるマンダリン遺伝子の分布を調べるために、*Bruguiera sexangula* とは別の属のマンダロブ植物である *Rhizophora apiculata* やその他の陸上植物 (ポプラ、タバコ、ニンジン、カーネーション) のゲノム DNA を用い、マンダリン cDNA をプローブとしたサザンハイブリダイゼーションを試みた (Fig. 6)。その結果、マンダリン遺伝子は高等植物に普遍的に存在するものではなく、マンダロブ植物 (特にRhizophoraceae科) に特異的に存在するものと考えられた。つまり、マンダリン遺伝子はマンダロブ植物が汽水域で生育するための進化の過程で獲得した遺伝子の1つであることが考えられた。

#### 4. 考察

マンダリンは原核生物から植物細胞、そして植物体の耐塩性を強化する機能を有することは確認されているが、そのメカニズムについては不明である。近年、浸透圧ストレスに応答し、細胞内に蓄積して浸透圧調節を行うと考えられている LEA と呼ばれる親水性の高いタンパク質が報告されている。マンダリンはタンパク質としては親水性と考えられ、LEA と同様に細胞内に蓄積され、浸透圧調節等に関与している可能性が考えられた。

#### 5. 今後の課題

本研究では、申請者らが確立した耐塩性強化因子の機能スクリーニング法により、マンダロブ cDNA ライブラリーから耐塩性に関与すると思われる cDNA を獲得することに成功した。その中の1つであるマンダリンは、マンダロブ植物に特異的に存在するものと考えられ、各種生物の耐塩性を強化する機能を有することが本研究で確認されている。今後は、マンダリンの機能領域の決定、及びマンダリンを導入した形質転換体の生理学的なキャラクター化を行うことで、マンダリンによる耐塩性強化のメカニズムを解明する必要がある。また、このメカニズムの解明により、現在確認されているマンダリンの機能をさらに強化できるものと期待できる。今年度は形質転換植物として遺伝子導入実験の比較的容易なタバコを用いたが、今後はイネ等の有用植物を用いた実験をする必要があると思われる。

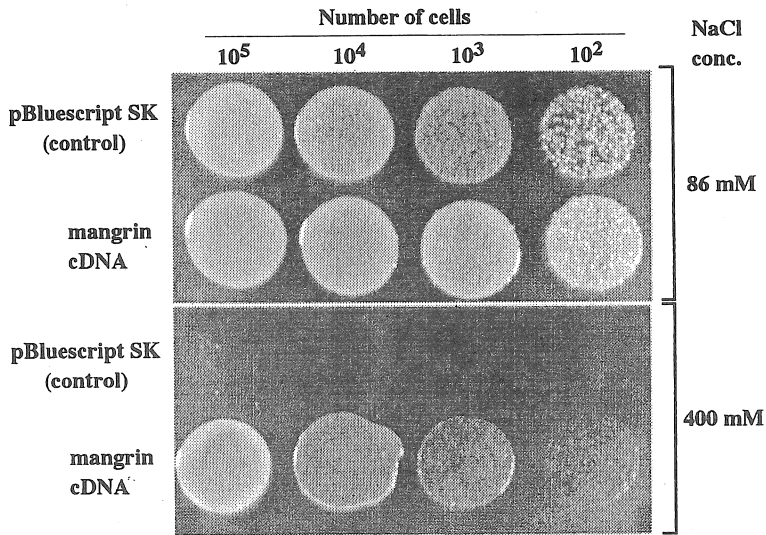
さらに、スクリーニングの結果得られたマンダリン以外の遺伝子群についてもその詳細な機能解析を行う必要がある。

#### 6. 参考文献

- Epstein E (1998) How calcium enhances plant salt tolerance [comment]. *Science* 280:1906-7  
Fukuhara T, Pak JY, Ohwaki Y, Tsujimura H, Nitta T (1996) Tissue-specific expression of the gene for a putative plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in a seagrass. *Plant Physiol* 110:35-42  
Hayashi H, Alia, Mustardy L, Deshniem P, Ida M, Murata N (1997) Transformation of *Arabidopsis thaliana* with the *codA* gene for choline oxidase; accumulation of



- glycinebetaine and enhanced tolerance to salt and cold stress. *Plant J* 12:133-42
- Kishor PBK, Hong Z, Miao G-H, Hu C-AA, Verma DPS (1995) Overexpression of  $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. *Plant Physiol* 108:1387-94
- Liu J, Zhu JK (1998) A calcium sensor homolog required for plant salt tolerance. *Science* 280:1943-5
- Mimura T, Mimura M, Washitani-Nemoto S, Sakano K, Teruo S, Somkid S (1997a) Efficient callus initiation from leaf of mangrove plant *Bruguiera sexangula* in amino acid medium: Effect of NaCl on callus initiation. *J Plant Res* 110:25-29
- Mimura T, Mimura M, Washitani-nemoto S, Somkid S (1997b) NaCl-dependent growth, Ion content and regeneration of calluses initiated from the mangrove plant, *Bruguiera sexangula*. *J Plant Res* 110:31-36
- Moons A, Prinsen E, Bauw G, Van Montagu M (1997) Antagonistic effects of abscisic acid and jasmonates on salt stress- inducible transcripts in rice roots. *Plant Cell* 9:2243-59
- Pardo JM, Reddy MP, Yang S, Maggio A, Huh GH, Matsumoto T, Coca MA, Paino-D'Urzo M, Koiwa H, Yun DJ, Watad AA, Bressan RA, Hasegawa PM (1998) Stress signaling through Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein phosphatase calcineurin mediates salt adaptation in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:9681-6
- Sakamoto A, Murata A, Murata N (1998) Metabolic engineering of rice leading to biosynthesis of glycinebetaine and tolerance to salt and cold. *Plant Mol Biol* 38:1011-9
- Serrano R (1996) Salt tolerance in plants and microorganisms: toxicity targets and defense responses. *Int Rev Cytol* 165:1-52
- Tarczynski MC, Jensen RG, Bohnert HJ (1993) Stress protection of transgenic tobacco by production of the osmolyte mannitol. *Science* 259:508-10
- Xu D, Duan X, Wang B, Hong B, Ho T-HD, Wu R (1996) Expression of a late embryogenesis abundant protein gene, HVA1, from barley confers tolerance to water deficit and salt stress in transgenic rice. *Plant Physiol* 110:249-57
- Zhu JK, Liu J, Xiong L (1998) Genetic analysis of salt tolerance in *Arabidopsis*. Evidence for a critical role of potassium nutrition. *Plant Cell* 10:1181-91



**Figure 1** Salt-tolerance effect of mangrin expressed in *E. coli*. Spot test was performed to confirm the function of mangrin in *E. coli*. Mangrin and the vector (pBluescript SK) transformants were grown up to exponential phase in liquid 2YT medium containing 0.05 mM IPTG, 50  $\mu$ g/ml ampicillin, and 50  $\mu$ g/ml kanamycin. Cell density was adjusted to  $1 \times 10^5$  cells / 25  $\mu$ l cell suspension. Serial dilutions, 1:10, were made and 25  $\mu$ l of each dilution was spotted on 2YT agar plates supplemented with 86 mM (control) or 400 mM NaCl, 50  $\mu$ g/ml kanamycin, 50  $\mu$ g/ml ampicillin, and 0.05 mM IPTG. Plates were photographed after incubation at 37  $^{\circ}$ C for 12 h (86 mM-NaCl plate) or 18 h (400 mM-NaCl plate).

**Table 1** Amino acid composition of the mangrin

<b>[hydrophobic residues] 61 (43.26%)</b>		
Gly(G) 6(4.26%)	Ala(A) 9(6.38%)	Val(V) 14(9.93%)
Leu(L) 12(8.51%)	Ile(I) 1(0.71%)	Met(M) 2(1.42%)
Phe(F) 7(4.96%)	Trp(W) 0(0.00%)	Pro(P) 10(7.09%)
<b>[neutral residues] 48 (34.04%)</b>		
Ser(S) 28(19.86%)	Thr(T) 9(6.38%)	Asn(N) 4(2.84%)
Gln(Q) 5(3.55%)	Cys(C) 2(1.42%)	
<b>[hydrophilic residues] 32 (22.70%)</b>		
Asp(D) 6(4.26%)	Glu(E) 4(2.84%)	Lys(K) 9(6.38%)
His(H) 0(0.00%)	Arg(R) 10(7.09%)	Tyr(Y) 3(2.13%)

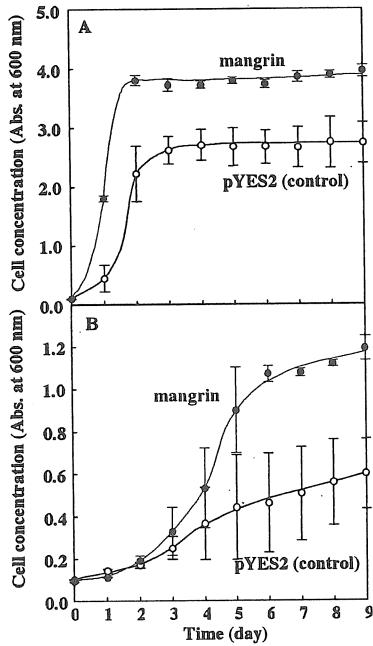


Figure 2 Growth curves of *S. cerevisiae* expressing mangrin in normal medium (A) or medium containing 1.2 M NaCl (B).

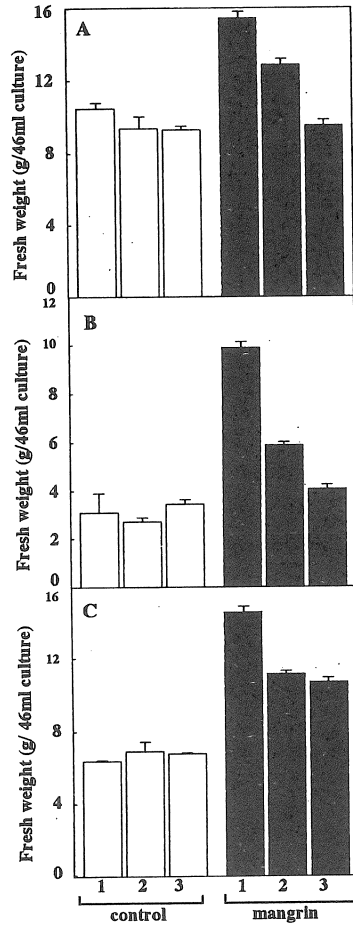


Figure 3 Salt-tolerance effect of mangrin expressing tobacco BY-2 suspension cultured cells. Mangrin and control transformants were grown in Linsmaier medium supplemented with 0 mM NaCl for 7 days (A), 100 mM NaCl for 7 days (B), and 150 mM NaCl for 13 days (C). Initial cell concentrations were about 0.1 g/ml culture. All BY-2 transformants were grown at 26 °C and agitated at 95 rpm.

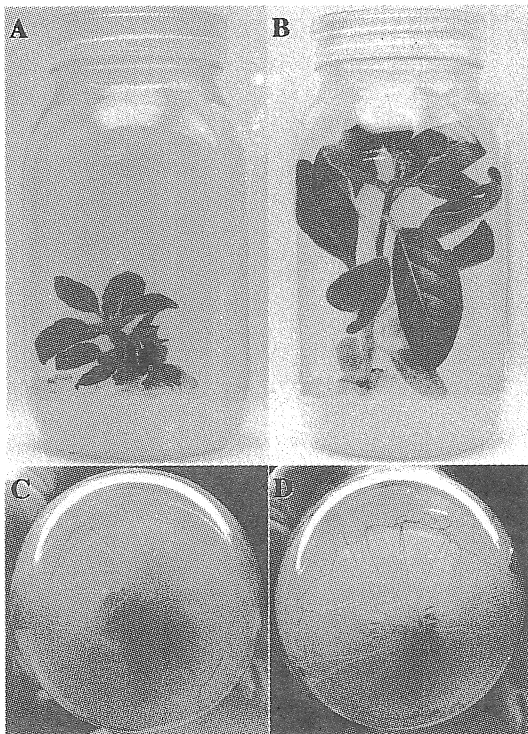
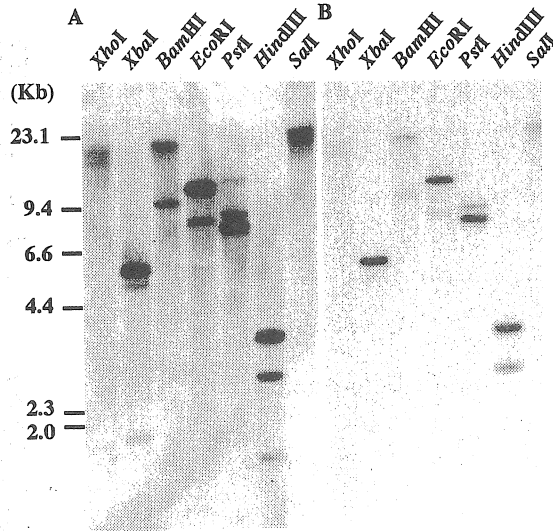
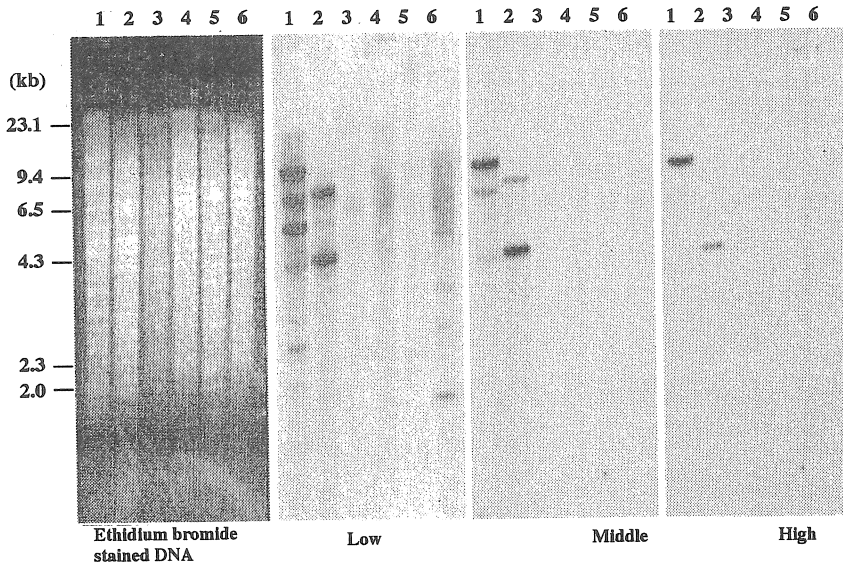


Figure 4 Phenotype of the transgenic tobacco expressing mangrin under salt-stress conditions. Transgenic tobacco plants were grown on MS agar medium in the presence of 150 mM NaCl at 25 °C. Mangrin (B, D) and control (A, C) transformant spears, which start to developing roots, were selected from leaf disks and each 4 spear was transferred to MS agar medium containing 150 mM NaCl and cultured for 3 weeks, respectively.



**Figure 5** Southern blot hybridization analysis of the genomic DNA from *Bruguiera sexangula* with mangrin cDNA as a probe. The membrane was washed in 1×SSC, 0.1% SDS at 42 °C (A), and in 0.1×SSC, 0.1% SDS at 65 °C (B).



**Figure 6** Southern blot hybridization of genomic DNA from various plants with mangrin cDNA probe. Genomic DNA from *Rhizophora apiculata* (mangrove; lane 1), *Bruguiera sexangula* (mangrove; lane 2), *Populus kitakamiensis* (popula; lane 3), *Nicotiana tobacum* (tobacco; lane 4), *Daucus carota* (carrot; lane 5), *Dianthus caryophyllus* (carnation; lane 6) were digested with EcoRI. Filters were washed in 1 x SSC (1 x SSC is 0.15 M NaCl and 0.015 M sodium citrate) and 0.5 % SDS at 42 °C (low stringency; Low) or 0.1 x SSC and 0.1% SDS at 55 °C (middle stringency; Middle), or 0.1 x SSC and 0.1% SDS at 65 °C (high stringency; High).

## Screening of salt-resistant factors from a mangrove plant

Akiyo Yamada, <sup>1</sup>Tetsuro Mimura and Yoshihiro Ozeki

Department of Biotechnology, Tokyo University of Agriculture and Technology.

<sup>1</sup>Biological Laboratory, Hitotsubashi University

### Summary

Mangrove is a general term for salt-tolerant woody plants growing along the seashore in tropical and subtropical areas. The reason why mangrove plants can grow in such habitats is not investigated at molecular levels. We postulate that mangrove plants have got specific proteins essential for the salt tolerance in its evolutionary process. Based on this hypothesis, functional screening of mangrove cDNAs encoding such proteins was performed using *Escherichia coli* as a host organism. Twenty-nine *E. coli* transformants, which showed remarkable growth under salt-stress conditions, were obtained from  $1 \times 10^6$  *E. coli* transformants. Analysis on the fragment patterns by restriction endonuclease digestion and on determination of their partial nucleotide sequences showed that twenty-three clones have an identical nucleotide sequence. A full-length cDNA is 1018 bp and the ORF encodes a protein of 141 amino acids including 28 serines (19.86%). It is revealed that there are no similar proteins of all other entries in databases. We designated this protein to "mangrin". In order to test the effect of mangrin expression on salt-tolerance in eucaryotic cells, mangrin cDNA ligated with *GAL1* and 35S promoter were introduced to yeast and tobacco cell culture, respectively. As well as *E. coli* experiment, the growth rates of these cultures expressing mangrin were enhanced as compared to the control strains. It is possible that mangrin may function to give salt-tolerance to diverse organisms at cellular level. In order to test the effect of mangrin expression on the salt-tolerance in higher plant at organ level, mangrin cDNA driven by 35S promoter was introduced to tobacco plants. Growth of control transformants was strongly inhibited by addition of 150 mM NaCl to the medium. In contrast, transformants expressing mangrin showed remarkable well growth as compared to the controls in medium containing 150 mM NaCl. Southern blot analysis on various plant species using a mangrin cDNA probe indicated that other plant species have not mangrin or its homologue. Mangrin may specially exist in mangrove plants.

Discovery of mangrin will contribute to elucidate salt-tolerance mechanisms in mangrove plants at molecular biological level. Biosynthesis of mangrin will open a new window to enhance salt-tolerance of higher plants, including crop plants.