

19

助成番号 0019

## マングローブ植物の耐塩性の代謝レベルでの解明

助成研究者：芦原 坦 (お茶の水女子大学 理学部)  
 共同研究者：若原 さよ (お茶の水女子大学 理学部)

酸性土壌による砂漠化は植物の生育を妨げるため、植物への耐塩性付与が望まれている。われわれは、海水中に成育しているマングローブ植物に注目して、これらの耐塩性植物が持つ耐塩性(あるいは好塩性)のしくみが何であるのかを代謝レベルで明らかにして、これらの性質をメタボリックエンジニアリングの手法でバイオマス植物に付与して地球環境修復のために役立てたいと考えている。マングローブの代謝研究はほとんど行われておらず、多くの未解決の問題が残されている。今回は、エネルギー代謝と関連して呼吸代謝やアデニンヌクレオチド代謝の研究をおこなったが、マングローブにおけるアデノシンの代謝に関して興味深い結果が得られたので、ここではマングローブ植物のアデノシン代謝について述べる。

海岸に生育するマングローブ植物は、塩を細胞から排出したり液胞に輸送したりするのに、多量の ATP を消費している。また、液胞と細胞質との間の浸透圧を調節するために、特殊な適合溶質(compatible solutes)を合成する。ATP の合成は、プリンヌクレオチドの de novo 合成によりなされる。この経路は生物に普遍的にある。一方、プリン塩基であるアデニンやヌクレオチドであるアデノシンを再利用してヌクレオチドを合成するサルベージ経路があるが、この活性は生物により異なり、動物のガン細胞など増殖の速い細胞では高いサルベージ活性がみられる。沖縄西表島に生育するマングローブ植物の葉でアデノシンのサルベージ能を調べた結果、ヒルギ科のヤエヤマヒルギ、オヒルギ、メヒルギ、ハマザクロ科のマヤブシキでは、投与したアデノシンが 90%に至るまでヌクレオチドに変換され、極めて高いサルベージ活性がみられた。これらのマングローブの適合溶質は、マンニトールなどの糖アルコールであるが、グリシンベタインを適合溶質とするクマツヅラ科のヒルギダマシでは、特徴的なアデノシンの代謝が見られた。この植物では、塩ストレスにより、エタノールアミンからのグリシンベタインの合成の増加がみられるが、この際にベタイン 1 分子に対して 3 分子の S-アデノシルメチオニン(SAM)がつかわれる。SAM はこの反応のあと S-アデノシルホモシステインとなり、さらにアデノシンとホモシステインができ、メチオニンの再生がおこる (SAM サイクル)。このサイクルがうまく機能するためにはアデノシンの除去が必要であり、この植物では、高いアデノシンヌクレオシダーゼ活性により、アデニンへの変換がおこる。典型的マングローブとみなされないシクシン科のヒルギモドキやミソハギ科のミズガンピでは、アデノシンからヌクレオチドへのサルベージ能は低く、10-20%程度であった。マングローブにみられる高いアデノシンのサルベージはアデノシンキナーゼ活性によるものとみられ、この酵素の塩による発現機構を検討している。



## 1 9

助成番号 0019

## マングローブ植物の耐塩性の代謝レベルでの解明

助成研究者：芦原 坦 (お茶の水女子大学 理学部)

共同研究者：若原 さよ (お茶の水女子大学 理学部)

## 1. 研究目的

酸性土壌による砂漠化は植物の生育を妨げるため、植物への耐塩性付与が望まれている。われわれは、海水中に生育しているマングローブ植物に注目して、これらの耐塩性植物が持つ耐塩性 (あるいは好塩性) のしくみが何であるのかを代謝レベルで明らかにして、これらの性質をメタボリックエンジニアリングの手法でバイオマス植物に付与して地球環境修復のために役立てたいと考えている。マングローブの代謝研究はほとんど行われておらず、多くの未解決の問題が残されている。今回は、エネルギー代謝と関連して呼吸代謝やアデニンヌクレオチド代謝の研究をおこなった。マングローブの酵素は耐塩性をもつ塩生バクテリアの酵素とは異なり、塩によりその活性が阻害されるので (Ashihara et al, 1997) 高濃度の NaCl は代謝を阻害する。そこで、NaCl を酵素反応の場である細胞質から液胞中や細胞外へと輸送する機構が働いていると思われる。その輸送には ATP のエネルギーが費やされると思われる。次に、適合溶質 (Compatible solutes) の合成と蓄積である。NaCl が液胞中へと輸送されると液胞は高張に、細胞質は低張になってしまうので、細胞質に適合溶質が蓄積されて液胞と細胞質間の浸透圧を保っている。マングローブ植物は種によって様々な物質を適合溶質として蓄積している。例えばヒルギ科のマングローブは糖アルコールであるピニトールを、マヤブシキはマンニトールを適合溶質としている (Popp, 1984 b, Yasumoto et al, 1999)。適合溶質の合成にもまた ATP のエネルギーが使われている。このようにマングローブ植物は耐塩性を維持するために、一般植物よりも多くの ATP を消費していると考えられる。このことから、マングローブ植物には効率の良い ATP 合成あるいは再生経路が存在する可能性がある。生体内におけるアデニンヌクレオチド合成経路にはプリンの *de novo* 合成経路の他にアデノシンやアデニンのサルベージ経路がある (図 1)。プリンの *de novo* 合成経路はプリン環の合成のために多くの ATP を消費する複雑な経路で、ATP の供給系としては効率が悪い。それに対してアデノシンサルベージ経路は AMP の分解によって生じたアデノシンを、プリン骨格を壊さずにヌクレオチドへと再利用する経路である。これは効率の良い ATP 再生系であると言える。増殖の早い動物のガン細胞などでこのようなサルベージ経路の活性が高いことが知られている。そこで、各種のマングローブ葉にみられるアデノシン代謝を調べ、マングローブ植物の耐塩性との関連を考察した。

## 2. 研究方法

## 2.1 実験材料

沖縄県西表島で採集された次の 7 種のマングローブの葉を実験に用いた。マングローブ植物と採集場所は、以下の通り：ヤエヤマヒルギ *Rhizophora stylosa* (後良川)、オヒルギ *Bruguiera gymnorhiza* (後良川)、メヒルギ *Kandelia candel* (浦内)、マヤブシキ *Sonneratia alba* (後良川)、ヒルギダマシ *Avicennia marina* (後良川)、ヒルギモドキ *Lumnitzera racemosa* (船内)、ミズガンビ *Pemphis acidula* (船浦)。比較のために、耐塩性を持たないバイオマス植物としてポプラ (ギンドロ) *Populus alba* を実験に使用した。ポプラのポット苗は、農林水産省森林総合研究所から提供を受けた。

2.2 *In situ* でのアデノシンサルベージ活性の測定

*In situ* におけるアデノシンの代謝は、Ashihara ら (2001) の方法を一部変えて行なった。マングローブの若い葉の切片 (4 mm x 4 mm, 160 mg) を 10 mM スクロースを含む 20 mM リン酸緩衝液 (pH 5.6) 2 mL が入ったにセンターウェル付きフラスコにいれ、9.6  $\mu$ M [8-<sup>14</sup>C]アデノシン (比活性、1.9 GBq/mmol; Möravek Biochemicals, Inc.) を 10  $\mu$ L (370 kBq) 添加し、アデノシ

ンの代謝を調べた。センターウェルには、CO<sub>2</sub>吸収剤として0.1 mLの20%KOHを染みこませた濾紙片を入れたガラスチューブを置いた。葉の切片は蒸留水でよく洗った後、液体窒素で凍結した。葉からの標識代謝物の抽出は、冷6%過塩素酸 (PCA) 溶液、エタノール-エチルエーテル溶液 (1:1, v/v)、熱PCA溶液 (100°C、20分) により、それぞれ、ヌクレオチドなどの低分子化合物、脂質、核酸を分画した。冷PCA可溶性分画は、KOHで中和後、濃縮して、TLCにより分析した。

### 2.3 酵素活性の測定

マングローブ葉 (生重量、約500 mg) に2mM MgCl<sub>2</sub>、1mM EDTA、0.1%(v/v) 2-メルカプトエタノール、0.5%アスコルビン酸ナトリウム、4% (w/v) PVPを含む50mM トリス塩酸緩衝液 (pH7.5) 5mLを加えて氷の上で冷やしながらか乳鉢と乳棒ですりつぶした。この時必要に応じて石英砂を加えた。ナイロン布でこし、濾液を20,000 x g、2~4°Cで20分間遠心分離にかけた。得られた上清に細かくすりつぶした(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を80%飽和の濃度になるまで加え、氷で冷やしながらか攪拌してタンパクを沈殿させた。20000g、2~4°Cで20分間遠心分離を行ない得た沈殿を2.5 mLの抽出用緩衝液に溶かした。脱塩のため、抽出用緩衝液で平衡化したSephadex G25カラムにのせ3.5 mLの同緩衝液で溶出した。得られた3.5 mLの粗酵素液を酵素活性の測定に用いた。酵素活性の測定は、放射性同位体の基質を与えて反応を行ない、反応液に粗酵素液を加えて反応を開始し、28°Cで5分間反応を行なった。5分後、60%PCA (10 μL)を加えて反応を停止した。コントロールでは粗酵素液を添加する前に60%PCA 10 μLを反応液に加えた。反応停止後、14,000 x g、2°Cで10分間遠心分離を行なった。上清を20%KOHで中和し、14,000 x g、2°Cで10分間遠心分離した。得られた上清をコンセンレーターで乾燥させ、50%エタノール55 μLに溶解した。基質と生成物を含むその溶液を薄層クロマトグラフィーで分離した。薄層クロマトグラフィーにはセルロースプレートをを用い、展開液はアデノシンキナーゼとアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼの場合にはブタノール-酢酸-水、4:1:2、アデノシンヌクレオシダーゼには蒸留水を用いた。反応液の組成を次に示す。

アデノシンヌクレオシダーゼ: (全量100 μL) 150mM HEPES-NaOH緩衝液(pH 7.6) 40 μL、65 mM MgCl<sub>2</sub> 10 μL、20mM DTT 5 μL、450 μM アデノシン 10 μL、[8-<sup>14</sup>C]アデノシン (代謝実験に使用した試薬と同じ) 0.5 μL (1.85 kBq)、粗酵素液 5, 15 又は 30 μL。

アデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ: (全量100 μL) 150mM HEPES-NaOH緩衝液 (pH7.6) 40 μL、65mM MgCl<sub>2</sub> 10 μL、20mM DTT 5 μL、450 μM アデニン 10 μL、[8-<sup>14</sup>C]アデニン 0.5 μL (1.85 kBq)、7.5mM PRPP 10 μL、粗酵素液 5, 15 又は 24.5 μL。

アデノシンキナーゼ: (全量100 μL) 150mM HEPES-NaOH緩衝液 (pH7.6) 40 μL、65mM MgCl<sub>2</sub> 10 μL、20 mM DTT 5 μL、450 μM アデノシン 10 μL、[8-<sup>14</sup>C]アデノシン (代謝実験に使用した試薬と同じ) 0.5 μL (1.85 kBq)、12.5mM ATP 10 μL、粗酵素液 5, 15 又は 24.5 μL

### 2.4 ヌクレオチド量の測定

葉の切片 (約160 mg) を20 mM ナトリウムリン酸緩衝液 (pH 5.6) に浸し、27°Cで3時間振とうした。一部のサンプルには250 mMのNaClを与えた。3時間後、緩衝液を捨てて切片の水気を拭いてから液体窒素で凍結した。凍結した葉の切片に6%PCA 4mlを加えて、氷の上で冷やしながらか乳鉢と乳棒ですりつぶした。20,000 x g、4°Cで15分間遠心分離を行ない、得られた上清のうち0.5 mlを0.4 M PCAで平衡化したフェニル(C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>)speカラム(J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, USA)にのせ、6%PCA 4mlで溶出した。この操作を3回繰り返して得られた溶出液を合わせ、液体窒素で凍結してから凍結乾燥機で乾燥させた。この操作により、定量の障害となるフェノール性物質をかなり除去できた。少量の20mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-NaHPO<sub>4</sub>緩衝液 (pH 7.0)に溶かし、HPLC用試料とした。ヌクレオチドの測定は陰イオン交換Shimpack WAX-1カラムをとりつけたHPLCで行なった。測定はAshihara et al. (1987)の方法に従って行なった。

## 2.5 グリシンベタインの定量

マングローブの葉 (約 600mg) を 80%メタノール (8ml) で抽出し、メタノールをエバポレータで除いたものを試料とし、NMR で測定した (Ashihara et al., 1997)。

## 3. 結果と考察

### 3.1 *In situ* でのアデノシンサルベージ活性の比較

全てのマングローブの葉の切片で、 $[8-^{14}\text{C}]$ アデノシンは、アデニンヌクレオチドと RNA に変換された。一方、 $\text{CO}_2$ 、アデニンアラントイン、アラントイン酸などにも放射活性の取りこみが見られた。メヒルギ葉のデータを Table 1 に示す。サルベージ経路の産物であるヌクレオチドに放射活性の取りこみが見られたことからマングローブ植物にサルベージ経路が存在していることが明らかになった。また、アデニンヌクレオチドの分解産物にも放射活性が取り込まれたことから、植物に一般的なアデニンヌクレオチドの分解経路がこれらのマングローブでも機能していることが確認できた。

ここでは、植物が $[8-^{14}\text{C}]$ アデノシンをアデニンヌクレオチドに変換する能力をサルベージ能と呼び、葉の切片による放射活性の総取り込み量に対する、アデニンヌクレオチド (遊離および核酸の構成成分) への放射活性の取り込みの割合で表した。ヒルギ科のヤエヤマヒルギ、オヒルギ、メヒルギ、およびハマザクロ科のマヤブシキ葉のサルベージ能は高く、50~90%の $[8-^{14}\text{C}]$ アデノシンがサルベージ産物に変換された (図 1)。この典型的な 4 種のマングローブの中でも特にヤエヤマヒルギとオヒルギは非常に高いサルベージ能を持つことが明らかになった。これらのマングローブでは、250mM NaCl で塩ストレスを与えた時にアデノシンからのアデニンヌクレオチド、特に ATP+ADP の合成が増加した。このことからこれらのマングローブでは、NaCl の存在下でサルベージ経路がより活発に働き、NaCl の除去や適合溶質の合成に必要な ATP を供給していることが示唆される。アデノシンの葉への取り込みも NaCl によって上昇した。一方、ヒルギダマシではアデノシンからアデニンの変換される割合が非常に大きいことが特徴的だった。ヒルギモドキとミズガンピにみられるアデノシンサルベージ能は一般植物であるポプラに比べても低く、サルベージ産物のうちアデニンヌクレオチドに限るとその生成量は葉にとりこまれたアデノシンの 20%以下であった。このうち最もサルベージ能が低かったミズガンピはふつうはマングローブに分類されない種である。マングローブと非マングローブ植物の分類には明確な境界線が存在しないが、ヒルギモドキもヒルギ科の植物のような典型的マングローブではない。以上の結果から、典型的なマングローブ植物であるヤエヤマヒルギ、オヒルギ、メヒルギ、マヤブシキではサルベージ能が極めて高く、NaCl 存在下ではさらにこれの活性化がみられた。アデノシンサルベージ活性の低いヒルギモドキとミズガンピではアデノシンサルベージ経路とは別の何らかの ATP 生産機構が耐塩性の維持に機能している可能性がある。

### 3.2 ヒルギダマシにおけるアデノシン代謝の特殊性

ヒルギダマシは典型的なマングローブの一種であるにも関わらず、*in situ* でしらべられた $[8-^{14}\text{C}]$ アデノシンのサルベージ能は見かけ上低かった。また、ヒルギダマシにアデノシンを投与したところ、ただちにアデニンが生成されることが明らかになった (図 1)。ヒルギダマシ葉の適合溶質はグリシンベタインであり (Ashihara, 1997)、他のマングローブ植物の適合溶質が糖アルコールであるのとはことなる。ヒルギダマシに見られたこのような特異的なアデノシン代謝は、この植物のグリシンベタインの合成経路との関連による可能性がある。まず、アデニンヌクレオチドの割合が低かった理由として、一度生産されたサルベージ産物がアデニンヌクレオチド以外の物質に変換された可能性が考えられる。ヒルギダマシが蓄積するグリシンベタインの合成経路では、グリシンベタイン 1 分子あたり 3 分子の ATP 由来の物質が消費されることがわかっている。それは ATP とメチオニンから合成される S-アデノシルメチオニン (SAM) である (図 3)。SAM はエタノールアミンからグリシンベタインが合成される際の 3 回のメチ

ル化反応におけるメチル基供与体であり、グリシンベタイン合成に欠くことが出来ない重要な物質である(図2)。ヒルギダマシでは、投与されたアデノシンはサルベージ経路を通過してATPになった後、速やかにSAMの合成に用いられたために、見かけ上のサルベージ能が低くなってしまったと推測することができる。ヒルギダマシでアデニンが大量に蓄積し、アデノシンはほとんどみられなかったこともグリシンベタイン合成と関連していると考えられる。ATPから合成されたSAMはメチル化を行なってS-アデノシルホモシステイン(SAH)になる。ところがSAHはSAMによるメチル化反応の強い阻害剤でグリシンベタイン合成の前駆体であるコリンの合成を妨げるので、速やかに除去されなければならない。SAHは分解されてアデノシンを生じるが、この反応はSAH生成の方向に平衡が大きく傾いているので反応をSAH分解方向に進めるにはアデノシンの除去が必要がある。ヒルギダマシに[8-<sup>14</sup>C]アデノシンを投与した時、アデニンが大量に蓄積したのはグリシンベタイン合成を阻害するアデノシンが活発に分解除去されたからだと考えることができる。ヒルギダマシで著しく高いアデノシンヌクレオシダーゼ活性が見られた事実はこの推論とよく一致している。また、図1より250mM NaClを与えた時サルベージ産物の割合は減少し、アデニンの割合は増加している。このことは、塩ストレス下でヒルギダマシの葉に含まれるグリシンベタイン濃度が増加するという報告と矛盾しない(Ashihara et al, 1997)。最近、Weretilnykら(2001)は、種々のグリシンベタイン生成植物で、SAHから生じるアデノシンがアデノシンキナーゼで除去されるという仮説を提出している。しかし、ヒルギダマシでは、*in situ*の実験でアデノシンからアデニンが生じること、さらに*in vitro*で測定されたアデノシンヌクレオシダーゼ活性は、アデノシンキナーゼ活性の100倍以上高いことから、アデノシンヌクレオシダーゼの関与が強く示唆される。アデノシンキナーゼよりもアデノシンヌクレオシダーゼがSAHの分解に寄与することは、カフェイン生合成との関連でチャでも最近報告されている(Koshiishi et al., 2001)。

### 3.2 まとめ

マングローブ植物のうち、糖アルコールを適合溶質とするヤエヤマヒルギ、オヒルギ、メヒルギ、マヤブシキはサルベージ能が極めて高かった。これらのマングローブでは250mM NaClを与えた時にサルベージ経路がさらに活発に働いた。サルベージ経路の活性化によりマングローブは耐塩性の維持に必用なATPを供給していると考えられる。一方、ベタインを適合溶質とするヒルギダマシでは、[8-<sup>14</sup>C]アデノシンを投与するとアデニンが大量に蓄積するという特徴的なアデノシン代謝がみられた。これは、ヒルギダマシの塩ストレスにตอบสนองして、SAMサイクルを活性化させ、グリシンベタインの合成を円滑に進めるためであることが示唆された。ヒルギモドキとミズガンピー一般のバイオマス植物であるポプラよりもサルベージ能が低かった。これらの塩生の植物は、アデノシンサルベージとは異なる機構によって、効率よいATP生成をしているかあるいは別の機構で耐塩性を維持していると考えられる。アデノシンのサルベージ酵素であるアデノシンキナーゼやSAMサイクルの活性化に関与するアデノシンヌクレオシダーゼの活性を遺伝子組換えで補強することにより耐塩性バイオマス植物を作出し、地球環境の修復などへの応用が可能かもしれない。

### 文献

- Akatsu, M., Hosoi, Y., Sasamoto, H. and Ashihara, H. : Purine metabolism in cells of a mangrove plant, *Sonneratia alba*, in tissue culture. *J. Plant Physiol.* 149, 133-137 (1996)
- Ashihara, H., Mitsui, K. and Ukaji, T.: A simple analysis of purine and pyrimidine nucleotides in plant cells by high-performance liquid chromatography. *Z. Naturforsch.* 42c, 297-290 (1987)
- Ashihara, H., Adachi, K., Otawa, M., Yasumoto, E., Fukushima, Y., Kato, M., Sano, H., Sasamoto, H., Baba, S. : Compatible solutes and inorganic ions in the mangrove plant *Avicennia marina* and their effects on the activities of enzymes. *Z. Naturforsch.* 53c, 433-440 (1997)
- Ashihara, H., Stasolla, C., Loukanina, N. and Thorpe, T.A. : Purine and pyrimidine metabolism in

- suspension-cultured white spruce (*Picea glauca*) cells. *Physiol. Plant.* 108, 25-33 (2000) .
- Koshiishi, C., Kato, A., Yama, S. Crozier, A. and Ashihara, H. : A new caffeine biosynthetic pathway in tea leaves: utilization of adenosine released from the S-adenosyl-L-methionine cycle. *FEBS Lett.* in press (2001).
- Popp M.: Chemical composition of Australian mangroves I .Inorganic ions and organic acids. *Z. Pflanzenphysiol.* 113, 395-409 (1984 a)
- Popp, M.: Chemical composition of Australian mangroves II .Low molecular weight carbohydrates. *Z. Pflanzenphysiol.* 113, 411-421 (1984 b)
- Weretilnyk, E.A., Alexander, K.J., Drebenstedt, M., Snider, J.D., Summers, P.S. and Moffatt, B.A.: Maintaining methylation activities during salt stress. The involvement of adenosine kinase. *Plant Physiol.* 125, 856-865 (2001)
- Yasumoto, E., Adachi, K., Kato, M., Sano, H., Sasamoto, H., Baba, S. and Ashihara, H. Uptake of inorganic ions and compatible solutes in cultured mangrove cells during salt stress. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 35, 82-85 (1999)

**Table 1. Metabolism of [8-<sup>14</sup>C]adenosine by leaf segments of a mangrove plant, *Kandelia candel* in 0 and 250 mM NaCl.**

Samples were incubated with 9.6  $\mu$  M [8-<sup>14</sup>C]adenosine (specific activity 1.9 GBq/ mmol) for 3 hrs. The values are expressed as % of total radioactivity taken up by the leaves.

Metabolites	0 mM NaCl	250 mM NaCl
ATP plus ADP	47.1 $\pm$ 5.5	60.3 $\pm$ 3.1
AMP	3.8 $\pm$ 0.2	4.5 $\pm$ 0.2
RNA	11.4 $\pm$ 0.3	11.0 $\pm$ 0.3
Adenine	8.3 $\pm$ 1.1	5.6 $\pm$ 0.6
Inosine	1.5 $\pm$ 0.4	0.7 $\pm$ 0.0
Allantoin	1.3 $\pm$ 0.4	1.0 $\pm$ 0.3
Allantoic acid	0.9 $\pm$ 0.0	1.2 $\pm$ 0.0
CO <sub>2</sub>	0.7 $\pm$ 0.1	0.6 $\pm$ 0.1
Total salvage	(62.3%)	(75.8%)
Total uptake (kBq/g Fr. wt.)	20.4 $\pm$ 0.1	23.1 $\pm$ 2.0

**Table 2 Activities of enzymes related to adenosine metabolism in leaf extracts from *Avicennia marina* plants**

Enzyme name	(EC number)	Activity (pkat/mg protein)
Adenosine kinase	(2.7.1.20)	2.3
Adenosine nucleosidase	(3.2.2.7)	260.5
Adenosine deaminase	(3.5.4.4)	nd
Adenine phosphoribosyltransferase	(2.4.2.7)	12.9
Adenine deaminase	(3.5.4.2)	nd

nd: not detected.



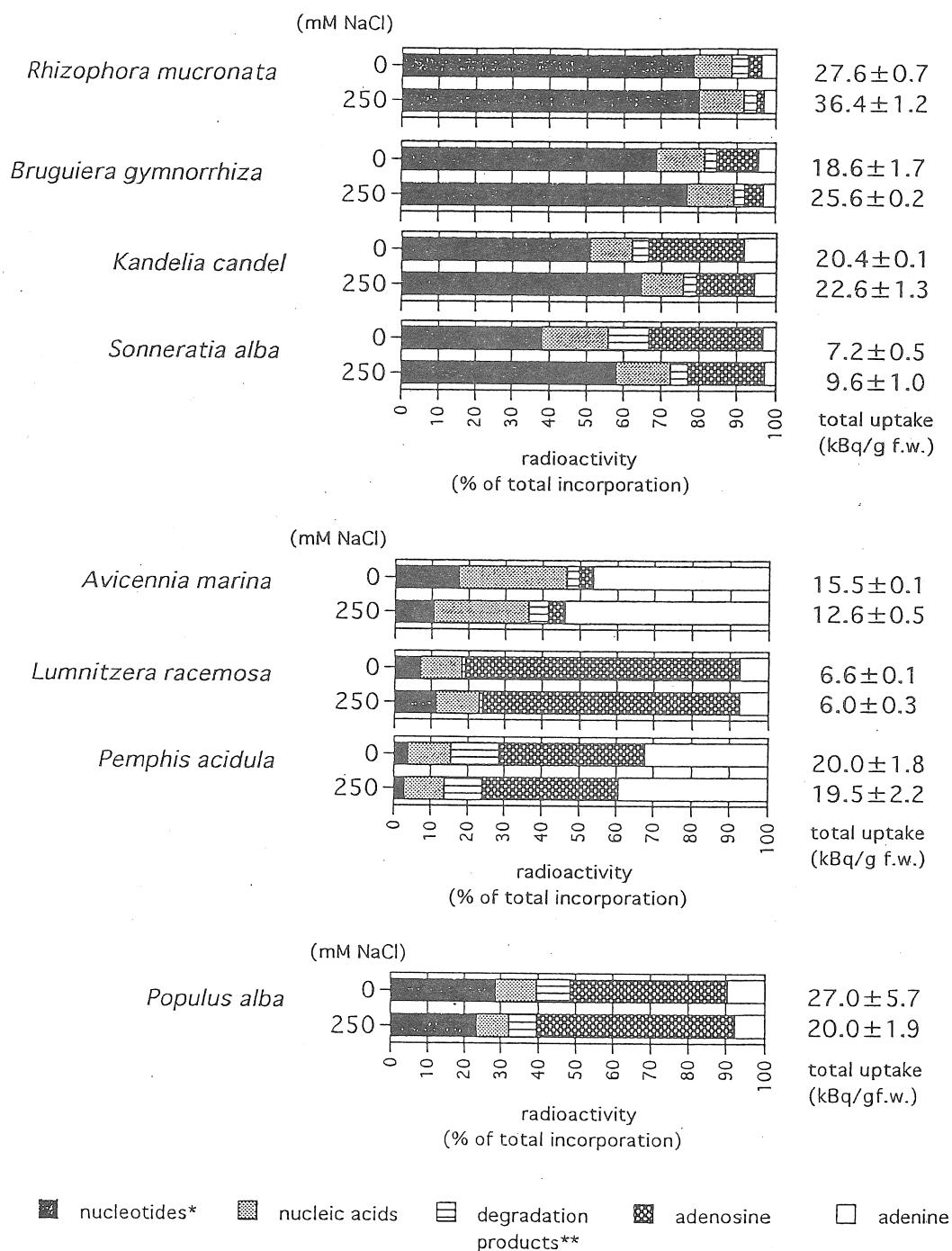


Fig. 1 Incorporation of radioactivity from [8-<sup>14</sup>C]adenosine into various metabolites of leaves of some mangrove plants and poplar.

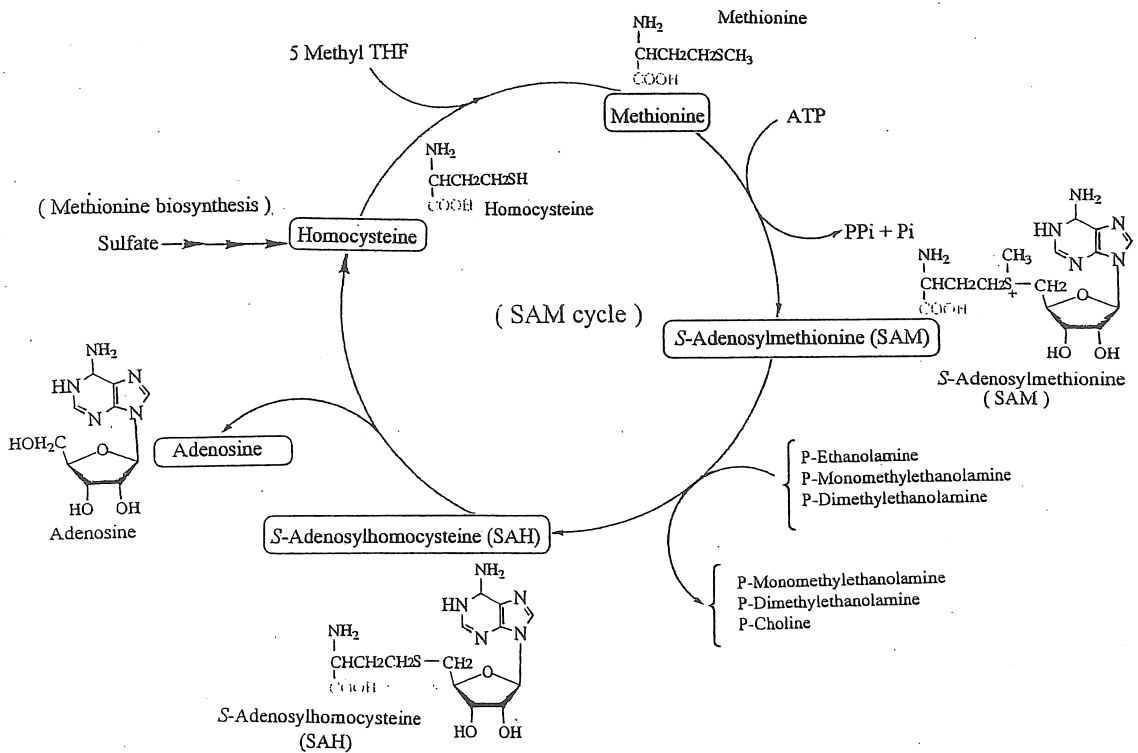


Fig. 2 *S*-Adenosylmethionine (SAM) cycle and glycine betaine biosynthesis. In *Avicennia marina* leaves, salt stress stimulates the synthesis of glycine betaine from ethanolamine, via P-choline. Maintaining methylation activities for betaine biosynthesis by the SAM cycle seems to be important.

**Metabolic Studies on Salt Tolerance of Various Mangrove Plants**  
**Hiroshi Ashihara and Sayo Wakahara**  
**Department of Biology, Faculty of Science, Ochanomizu University,**  
**Tokyo, 112-8610, Japan**

Mangrove plants may produce large amounts of adenosine triphosphate (ATP) to facilitate the removal and/or transport of salts into vacuoles and to synthesize compounds that function as compatible solutes to lower the osmotic potential of their tissues. In the present study, we examined adenosine metabolism in leaves of various mangrove plants grown in the Iriomote Island, Okinawa. The activity of adenosine salvage, i.e., synthesis of adenine nucleotides from adenosine, was extremely high in the typical mangrove plants, *Rhizophora mucronata*, *Burugiera gymnorhiza*, *Kandelia candel* and *Sonneratia alba*. In these mangrove plants, up to 90% of [8-<sup>14</sup>C]adenosine taken up by leaf segments were converted to adenine nucleotides. This adenosine salvage seems to be catalyzed by adenosine kinase. In contrast to mangrove plants which contain high levels of sugar alcohol compatible solutes, *Avicennia marina* which produces glycine betaine as a compatible solute showed a different pattern of adenosine metabolism. The glycine betaine biosynthetic pathway from ethanolamine in *A. marina*, includes three methylation steps that utilize *S*-adenosylmethionine (SAM) as the methyl donor. In this process SAM is converted to *S*-adenosylhomocysteine (SAH) which in turn is hydrolyzed to homocysteine and adenosine. SAH hydrolase catalyzes both the synthesis and hydrolysis of SAH. As SAH is a potent inhibitor of the *N*-methyltransferase reactions, removal of SAH is essential to maintain the biosynthesis of the compatible solute. Probably for this reason, very active adenosine nucleosidase is present in *A. marina*, and 50-60% of exogenously supplied [8-<sup>14</sup>C]adenosine was recovered as adenine. Compared to ordinary biomass plants, such as poplar, activity of adenosine salvage is extremely high in most mangrove plants where may act as a very efficient ATP regenerating system. Furthermore, high adenosine nucleosidase activity in glycine betaine producing mangrove plants may be related to the continuous supply of methyl donors for biosynthesis of the compatible solute. These results obtained in this study open up novel strategies for using genetic engineering to produce transgenic salt-tolerant biomass plants which can be grown in desert to assist in their restoration to a terrestrial environment.