

35

助成番号 0135

マングローブから単離された新規耐塩性因子「マンダリン」の機能強化

山田晃世、小関良宏

東京農工大学工学部生命工学科

高等植物の耐塩性向上を目指し、マングローブの一種である *Bruguiera sexangula* に着目してその cDNA ライブラリーの中から耐塩性に関与する cDNA の探索を進めてきた。その結果、新規耐塩性因子「マンダリン」をコードする cDNA の単離に成功している。マンダリンは 256 のアミノ酸からなるタンパク質で、大腸菌、酵母、タバコ培養細胞の耐塩性を強化する機能を有する事が確認されている(平成11年度ソルト・サイエンス研究財団助成研究成果報告書)。しかしながら、どのような機構でマンダリンが幅広い生物種の耐塩性を強化するかは全くわかっていない。一方、昨年アラビドプシスのゲノムプロジェクトが終了し、その全配列がデータベース上に公開された。ホモロジー解析を行った結果、アラビドプシスにもマンダリン相同タンパク質が存在することが確認された他、トマトにも類似したタンパク質が存在することが明らかになった。本研究では、マンダリン相同タンパク質も同様な耐塩性強化機能を有するか、また、どの領域がマンダリンの有する耐塩性強化機能に不可欠であるかどうかを明らかにした後に、得られた「マンダリン機能領域」に対し、「ランダム変異の導入」と「淘汰」を繰り返すことで、いわゆる「分子進化」を施し、マンダリンの有する耐塩性強化機能の向上を試みた。図にマンダリン及びその相同タンパク質のアミノ酸配列を比較した結果とそれらを発現した大腸菌の耐塩性を示す。マンダリン及びその相同タンパク質のアミノ酸配列は後半部分で高い相同性が見られるのに対し、前半部分は、生物種によりその配列が大きく異なっていた。また、耐塩性強化機能は、マンダリンのみにみられ、その他の相同タンパク質には同様な効果は認められなかった。更に、本研究ではマンダリン機能領域に対し、分子進化を行い耐塩性強化機能が更に向上した11クローンを得た。本研究で確立した手法は、耐塩性植物を作出するための一つの有効な手段になると考えられる。

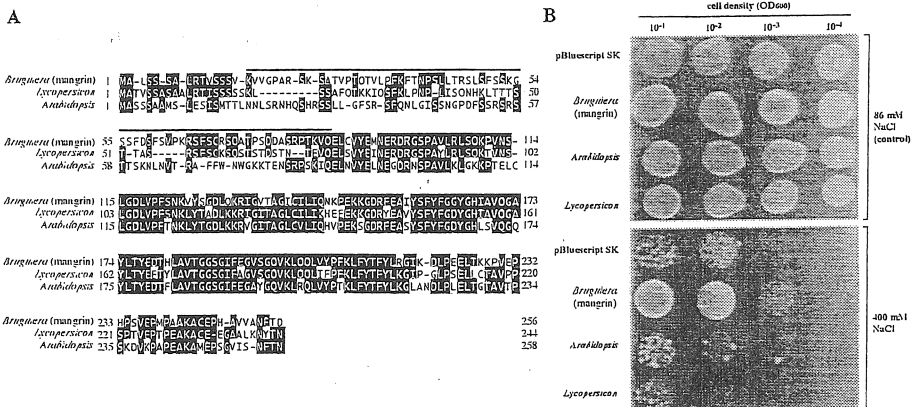


図 マンダリン及びその相同タンパク質のアミノ酸配列 (A) とその耐塩性強化機能 (B)



35

助成番号 0135

## マングローブから単離された新規耐塩性因子「マングリン」の機能強化

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:小関 良宏(東京農工大学 工学部生命工学科)

### ①研究目的

遺伝子組み替えによる高等植物の耐塩性の向上を目指し、マングローブの一種である *Bruguiera sexangula* に着目してその cDNA ライブラリーの中から耐塩性に関与する cDNA の探索を進めてきた。構築された cDNA ライブラリーを大腸菌に導入し、得られた形質転換体の耐塩性を指標として耐塩性因子をコードすると期待できる cDNA のスクリーニング(特許願第 235910 号)を行った結果、新規耐塩性因子「マングリン」をコードする cDNA の単離に成功している。マングリンは 256 のアミノ酸からなるタンパク質で、大腸菌、酵母、タバコ培養栽培の耐塩性を強化する機能を有する事が確認されている(平成11年度ソルト・サイエンス研究財団助成研究成果報告書)。しかしながら、どのような機構でマングリンが幅広い生物種の耐塩性を強化するかは全くわかっていない。

一方、昨年アラビドプシスのゲノムプロジェクトが終了し、その全配列がデータベース上に公開された。ホモロジー解析を行った結果、アラビドプシスにもマングリン相同タンパク質が存在することが確認された他、トマトにも類似したタンパク質が存在することが明らかになった。本研究では、マングリン相同タンパク質も同様な耐塩性強化機能を有するか、また、どの領域がマングリンの有する耐塩性強化機能に不可欠であるかどうかを明らかにした後に、得られた「マングリン機能領域」に対し、「ランダム変異の導入」と「淘汰」を繰り返すことで、いわゆる「分子進化」を施し、マングリンの有する耐塩性強化機能の向上を試みた。

さらに、マングリンが持つ耐塩性強化機能のメカニズムを解明する上で必要になる抗マングリン抗体の作成やマングリン形質転換体の様々なキャラクタリゼーションを行い、得られた結果からマングリンの機能を考察した。

### ②研究方法

#### 1., マングリン相同タンパク質をコードする cDNA クローニング

アラビドプシス cDNA ライブラリーは葉、茎、根から抽出された mRNA から、またトマト cDNA ライブラリーは葉から抽出した mRNA から Gene Racer Kit (Invitrogen) を用いて合成した。得られた cDNA ライブラリーからのマングリン相同タンパク質をコードする cDNA クローニングは (nest) PCR を用いて行った。用いたプライマーは以下の通りである。

tomatoF1, 5'-TAGAACCAACAAATTGTTGAGCAATG-3' ;  
 tomatoF2, 5'-ACAAATTGTTTCAGCAATGGCCACTG-3' ;  
 tomatoR1, 5'-AGTTGTGATTTGCACATCAACACC-3' ;  
 tomatoR2, 5'-CACTTAATTAGTGTAATTTTCAGTGC-3' .

arbF, 5'-TCACTGCAGTTAAACTCTTCTTGATCAATG-3' ;  
arbR, 5'-GCTGAATTCTTAATTAGTAAAGTTACTTAT-3' .

## 2., マングリン機能領域の決定

PCRにより、マングリンの様々な領域を増幅した。Forward Primerには Xba I サイト、ストップコドンの直後に開始コドンが入るプライマーをデザインし、Reverse primer には2つのストップコドン、及び Xho I サイトを導入した。用いたプライマーは以下の通りである。

Mang 16 (F) 5'-CTTCTAGATGAAGGTGGTCGGCCCTGCAAG ;  
Mang 35 (F) 5'-AAATCTAGATGCCTTTC AAGTTCACAAACCC ;  
Mang 50 (F) 5'-GATTCTAGATGTTTT CATAAAAGTTCAAG ;  
Mang 15 (R) 5'-AGGCTCGAGTTACTACACAGAAGAAGAGACGGTTG ;  
Mang 41 (R) 5'-TCGCTCGAGTTACTACGGGTTTGTGAACTTGAAAGG ;  
Mang 64 (R) 5'-GCACTCGAGTTATCATTGGGTACAGAGAAGCTGTC ;  
Mang 86 (R) 5'-ATACTCGAGTTACTATTGAACTTTGGTGGGTCTTGA ;  
Mang 108 (R) 5'-GCTCTCGAGTTACTACTGGCTCAACCGGAGAACAGC ;  
Mang 141 (R) 5'-GCTCTCGAGTTATCAGGATGCATATTCCTGCGGTTAC .

これらのプライマーを用いて増幅した PCR 産物は Xba I / Xho I で処理した後、pBluescript SK の Xba I / Xho I サイトに導入することで、マングリン cDNA のデリーションクローンを作成した。

## 3., 形質転換大腸菌の耐塩性の評価 (スポットテスト)

2YT 培地を用い、0.05mM IPTG 存在下で対数増殖期の形質転換大腸菌 (SOLR) を吸光度 0.1 ( $A_{600}$ ) に希釈し、これをさらに培地で 10 倍ずつ希釈したものを 350mM NaCl を含む寒天培地上に滴下し、その後の生育で評価した。

## 4., マングリン機能領域の分子進化

助成研究者らが確立した環境ストレス耐性遺伝子を単離する方法は、分子進化学における「淘汰」のプロセスに適応できるものと考えられる。そこで、マングリン機能領域に対し、ランダムな変異を導入することと、「淘汰」を繰り返すことで、その分子進化を試みた。ランダム変異の導入には error-prone PCR と DNA shuffling を用いた。

### 4. 1 error-prone PCR

マングリン全長 cDNA がクローニングされたプラスミド溶液 (20ng/ $\mu$ l) : 2  $\mu$ l、機能領域複製用プライマー (2pmol/ $\mu$ l) : 2  $\mu$ l、10 $\times$ PCR buffer (Takara) ( $Mg^{2+}$  free) : 2  $\mu$ l、5mM  $MgCl_2$  : 4  $\mu$ l、5mM  $MnCl_2$  : 2  $\mu$ l、2.5mM dNTP mixture : 2  $\mu$ l、Takara Taq : 1U (Takara) を含む 20  $\mu$ l の反応で PCR を行った。反応サイクルは 92 $^{\circ}$ C でホットスタートし、変性 : 92 $^{\circ}$ C、30sec、アニーリング : 50 $^{\circ}$ C、30sec、相補鎖合成 : 72 $^{\circ}$ C、90sec を 1 サイクルとし計 30 サイクル行った。得られた PCR 産物を spin column (Qiagen) を用いて精製し、これを Xba I、Xho I で切断し、熱

処理 (65°C、10min)、エタノール沈殿後、1.5%アガロースゲルで電気泳動し、得られたバンドをガラスミルク法により精製した。これを Xba I、Xho I で切断、熱処理 (65°C、10min)、エタノール沈殿、0.7%アガロースゲルで電気泳動し TsAP (Thermosensitive Alkaline Phosphatase) (GIBCO BRL) 処理した pBluescript SK にクローニングした。ここで得られたコロニーからプラスミド DNA をボイル法で抽出し、一次変異 cDNA ライブラリーとした。

#### 4. 2 淘汰

機能領域を導入し発現した大腸菌 (SOLR) は 1.0M の NaCl を含む LB 液体培地で約 1 時間振とう培養での生存率が約 10%であることが予備実験で確認できている。そこで、SOLR に一次変異 cDNA ライブラリーを発現させ、1.0M の NaCl を含む培地で 1 時間生存可能なクローンを耐塩性強化機能が向上または維持ができたものとして選抜した。NaCl 処理後の菌体懸濁液を LB 寒天培地上にプレートアウトした。ここで得られたプレート上の全てのコロニーをかき集め、プラスミドを抽出し、二次変異 cDNA ライブラリーとした。

#### 4. 3 シャプリングによる第三次変異ライブラリー作成

第二次変異ライブラリーをテンプレートに前述のプライマーを用いて PCR を行い、変異機能領域 cDNA を増幅した。この PCR 産物をフェノール抽出、エタノール沈殿で精製し、得られた DNA 1 $\mu$ g を DNase I (Wako) で 1mM MgCl<sub>2</sub> の存在下 37°C 15min 消化した。その後、50mM になるように EDTA を加えた後、熱処理 (65°C、15min) を行った。これを 1.5%アガロースゲルで電気泳動し、100bp 以下の DNA 断片を切り出した。切り出したアガロースゲルを賽の目状に切り刻み 18G のシリンジで穴をあけた 1.5ml マイクロチューブに入れ、その下にマイクロチューブを重ね、2つ重ねのマイクロチューブを 9000rpm 20min 遠心した。そして、下のマイクロチューブにできたアガロースゲルのゲル片に等量の平衡化中性フェノールを加えて vortex 5min し、できたフェノールエマルジョンを 60min—80°Cにて完全に凍結させ、室温にて融解させた。その後、15000rpm 15min 遠心し上澄みの水層を抽出し、そこから DNA を回収した。得られた DNA 断片を PCR で再構築した。PCR 反応液は回収した DNA 断片 (200ng/ $\mu$ l) : 1 $\mu$ l、10 $\times$ PCR buffer (Takara) 1 $\mu$ l、2.5mM dNTP mixture (each 2.5mM) : 1 $\mu$ l、Takara Taq : 0.5U (Takara) を含む 10 $\mu$ l 反応で行った (プライマーレス PCR)。反応サイクルは 94°Cでホットスタートし、変性 : 94°C、30sec、アニーリング : 50°C、30sec、相補鎖合成 : 72°C、30sec を 1 サイクルとし計 40 サイクル行った。ここで得られた PCR 産物を 1 $\mu$ l とり 10 倍に希釈したものをテンプレートに、再び PCR を行った。上記の PCR 産物 1 $\mu$ l、10 $\times$ PCR buffer (Takara) 1 $\mu$ l、2.5mM dNTP mixture (each 2.5mM) : 1 $\mu$ l、各プライマー (2 $\mu$ mol/ $\mu$ l) : 1 $\mu$ l、Takara Taq : 0.5U (Takara) を含む 10 $\mu$ l 反応で行った。反応サイクルは 94°Cでホットスタートし、変性 : 94°C、30sec、アニーリング : 50°C、30sec、相補鎖合成 : 72°C、30sec を 1 サイクルとし計 20 サイクル行った。得られた PCR 産物を pBluescript SK にクローニングし、三次変異 cDNA ライブラリーとした。これらの cDNA が導入された大腸菌の耐塩性をスポットテストで評価した。

## 5., 抗マングリン抗体の作成

pET system (Novagen) 及び pMAL protein fusion and purification system (NEB) を用いて、即ち、6 x ヒスチジン、及びマルトースバイディングプロテインの2つのタグを用いて、マングリンを導入した形質転換大腸菌からマングリンタンパク質を精製した。タンパク質の精製は、それぞれのキットに記載の方法に従った。抗体の作成にはウサギ (日本白色種、雄、2kg) を二羽使用した。マングリンタンパク質 140  $\mu$ g 及び 200  $\mu$ g の入ったアクリルアミドゲル破碎液 850  $\mu$ l 及び 1250  $\mu$ l をそれぞれ等量のアジュバンド (Wako) と混ぜ、ウサギの背中皮下に約 30  $\mu$ l ずつ全量を投与した。これを毎週繰り返し、十分抗体価が高まったウサギから全採血し、その血清を分離した。

## 6., マングリン形質転換体のキャラクタリゼーション

マングリン、及びその機能領域のみを導入した形質転換大腸菌のキャラクタリゼーションを行った。具体的には、耐塩性その他、ソルビトール耐性、熱耐性、凍結耐性、顕微鏡観察、細胞内イオン組成である。細胞内イオン組成の測定にはイオンクロマトグラフィーを用いた。

## ③研究結果

### 1., マングリン及び相同タンパク質の耐塩性強化機能

Fig. 1 にマングリン及びその相同タンパク質のアミノ酸配列を比較した結果とそれらを発現した大腸菌の耐塩性を示す。マングリン及びその相同タンパク質のアミノ酸配列は後半部分で高い相同性が見られるのに対し、前半部分は、生物種によりその配列が大きく異なった。また、耐塩性強化機能は、マングリンのみにみられ、その他の相同タンパク質には同様な効果は認められなかった。

### 2., マングリン機能領域の決定

PCR で作成したマングリンデリーション cDNA をそれぞれ大腸菌に導入し、それらの耐塩性を評価した結果を Fig. 2 に示す。Fig. 1 で示された、マングリン特有の配列を含む部分をコードする cDNA を導入した大腸菌に耐塩性の向上が認められた。つまり、マングリンが耐塩性強化因子として機能する上で、16-86 までのわずか 70 アミノ酸のみが必要である事が明らかになった。

### 3., マングリン機能領域の分子進化

予備実験を繰り返し行った結果、本報告書の方法で示した手順、即ち、error prone PCR と DNA shuffling を組み合わせた方法が、多種の変異マングリンを獲得する上で有効であった。Fig. 3 にマングリン機能領域の分子進化させるための概略をまとめた。この方法で、マングリンの分子進化を続けた結果、11 クローンの変異マングリン機能領域 cDNA を導入した大腸菌に、マングリン機能領域を導入した大腸菌よりも更に高い耐塩性を獲得していることが明らかになった。Fig. 4 にマングリン機能領域、変異マングリン機能領域、ベクター (pBluescript SK) のみを導入した形質転換体の耐塩性を評価した結果を示す。これらの変異 cDNA の耐塩性向上効果は、少な

くとも3回以上の再導入実験を繰り返して確認されたものである。

次に、これらの形質転換体に導入された変異 cDNA の全塩基配列を決定し、それらがコードするタンパク質のアミノ酸配列を比較した結果を示す (Fig. 5)。各変異 cDNA には数カ所の塩基置換が生じ、これにより 1 から 3 箇所のアミノ酸配列に変化が生じていた。アミノ酸配列の変異場所は人工的に付加したファーストメチオニンから数えて 28 番目から 36 番目、及び 69、70 番目のアミノ酸に集中しており、この部位がマングリンの耐塩性機能を向上させる上で重要な配列であると考えられた。

#### 4.、抗マングリン抗体

免疫前のウサギの血清と免疫後二週間、及び四週間の血清を用いてウェスタンブロットを行った結果、免疫後四週間の血清を一次抗体として 16000 倍希釈して用いてもバンドが検出できるまで抗体価が上昇していることが確認できた (Fig. 6)。検出されたバンドは 1 本であり、バックグラウンドはほとんど見られなかった事からマングリンに対し、きわめて特異性の高い抗体ができたものと考えられた。マングローブ培養細胞から抽出されたバンドは、マングリンの全長タンパク質のアミノ酸数から推定される 29KDa よりも小さい位置 (23KDa) に出ていることが確認された。マングリンタンパク質はマングローブ培養細胞内で何らかの因子により切断されている可能性が考えられた。

#### 5.、マングリン形質転換体のキャラクタリゼーション

マングリンの有する耐塩性強化機能を解析する上で形質転換体のキャラクタリゼーションが不可欠である。そこで、マングリン、マングリン機能領域、マングリン相同タンパク質を発現した大腸菌のキャラクタリゼーションを試みた。その結果、マングリン、マングリン機能領域を発現した大腸菌においてのみ、耐塩性、浸透圧耐性 (Fig. 1) の他、耐熱性 (Fig. 7)、凍結耐性 (Fig. 8) の向上が確認された。これらの結果からマングリン機能領域は複数のストレス耐性を向上させる機能を有するものと考えられた。また、これらの形質転換体の顕微鏡観察、細胞内イオン量を評価した結果、ほとんどマングリン導入による変化は認められなかった。

#### ④考察

マングリン (機能領域) は、マングローブ植物が汽水域で生き残るための進化の過程で獲得されたマングローブ特有のタンパク質の 1 つであると考えられた。恐らく、長い進化の過程で様々なミューテーションやエクソンシャッフリング等が繰り返し生じ、現在の配列に至ったものと考えられる。本研究では、人工的にこれらの領域に変異を導入することで、マングリン機能領域の更なる機能向上を目指した。本実験では Fig. 3 に示した分子進化サイクルをわずか 1 回行うことで、耐塩性強化機能が更に向上した変異 cDNA を獲得するに至っている。さらに、この分子進化サイクルを続けることで、より高い耐塩性強化機能をもつ進化型マングリンを合成できると思われる。

マングリンを導入した大腸菌は複数のストレスに対し、抵抗性を獲得したものであった。本報告書では掲載しきれなかったが、我々はマングリンをスクリーニングする過程で CCT $\alpha$  など、様々な遺伝子のクローニングに成功している (詳細は参考文献

に掲載)が類似した機能をもつものは他に見られない。マンダリンは、細胞内イオン環境を安定化する機能があるとは考えられず、細胞内で生じた様々なストレスの影響低下させる、あるいは細胞内タンパク質をストレスから保護するような何らかの機能を有するものと考えられた。

今回作成された抗マンダリン抗体は、今後、様々なマンダリンからマンダリンタンパク質の検出、精製を行う上で重要なツールになると思われる。また、マンダリン形質転換植物を作出する際に、必ず問題になる「導入遺伝子の発現量」を評価する上で極めて重要な価値があると考えられる(アグロバクテリウムを用いて植物に導入された遺伝子はランダムに植物ゲノムに挿入される。このため、遺伝子は挿入されても導入遺伝子が発現しない、もしくは発現量の少ない形質転換体が多数存在する可能性が考えられる)。

### ⑤今後の課題

マンダリンの更なる分子進化を進め、耐塩性向上活性の高い変異 cDNA を獲得する必要がある。さらにここから変異マンダリンタンパク質を精製し、その立体構造が明らかになれば、マンダリンが持つ多彩な機能の解明に役立つものと思われる。

また、形質転換植物の作出し、その耐塩性を評価することで、よい成果が得られれば、農作物生産、砂漠の緑化への応用が期待できると考えられる。現在、変異マンダリンを導入したタバコを作出中であるが、耐塩性を評価するほど十分な成長をしていない。今後これらの塩存在下における生育を評価していく予定である。

### ⑥文献等研究結果

本報告書に関する論文

Detection of Differences in mRNA Expression Regulated by Salt-Stress in Mangrove Cultured Cells

Akiyo Yamada, Takeo Saitoh, Tetsuro Mimura and Yoshihiro Ozeki

Plant Biotechnology 19 (2), 145-148 (2002)

Expression of mangrove allene oxide cyclase enhances salt tolerance in *Escherichia coli*, yeast, and tobacco cells

Akiyo Yamada, Takeo Saitoh, Tetsuro Mimura and Yoshihiro Ozeki

(Plant Cell Physiol- accepted (2002))

Expression of Plant CCT $\alpha$  Enhances Salt-tolerance in *Escherichia coli* and Yeast

Akiyo Yamada, Mikiko Sekiguchi, Tetsuro Mimura and Yoshihiro Ozeki

(Plant Biotechnology- accepted (2002))



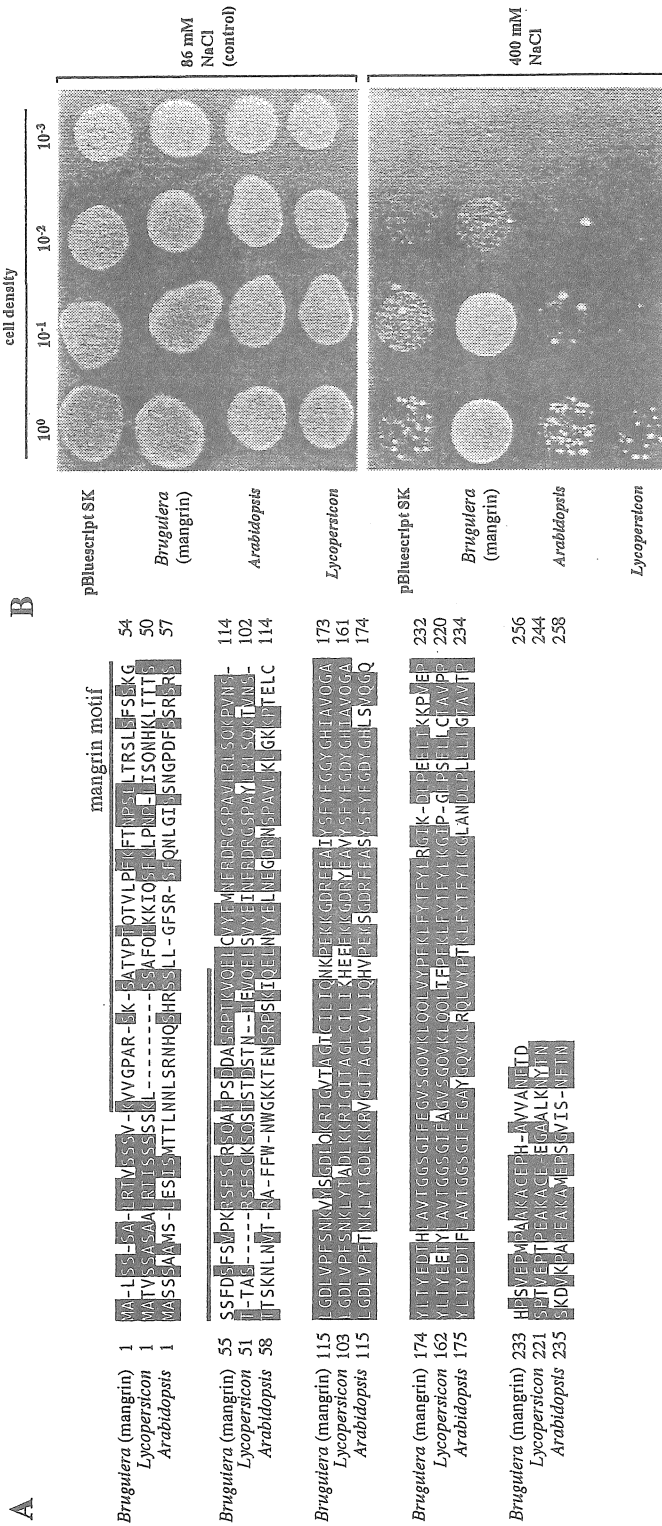
The role of plant CCT $\alpha$  in salt- and osmotic- stress tolerance  
Akiyo Yamada, Mikiko Sekiguchi, Tetsuro Mimura and Yoshihiro Ozeki  
(Plant Cell Physiol- accepted (2002))

本報告書に関する特許

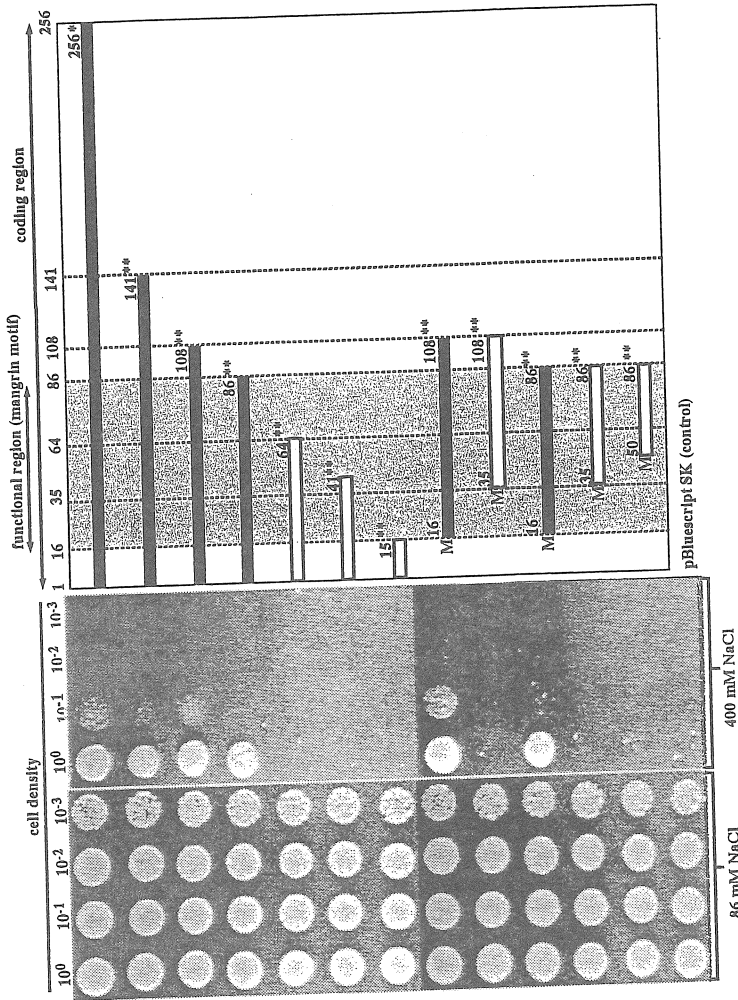
「環境ストレス耐性遺伝子」 PCT/JP00/04862

発明者 山田晃世、斉藤丈夫、小関良宏

出願人 科学技術振興事業団



**Fig. 1** Comparison of the deduced amino acid sequence of mangrin with those of *Lycopersicon* AOC and its *Arabidopsis* homolog (A). Gaps were introduced to optimize the amino acid sequence alignment. The bar indicates the functional region (amino acids 16–86). Functional comparison of each protein in *E. coli* (B). Plates were photographed after incubation at 37 °C for 12 h (86 mM NaCl) or 18 h (400 mM NaCl).



**Fig. 2** Functional region analysis of mangrin. Numbers shown on the columns represent amino acid sites in mangrin. "M" designates an artificially included initiating methionine. \* represents an artificially included stop codon. The deletion clones shown in the black columns enhanced salt tolerance in *E. coli*. Deletion clones shown in the white columns did not. pBluescript SK was used as the control. The gray region (amino acids 16-86) represents the functional region in mangrin. Plates were photographed after incubation at 37 °C for 12 h (86 mM NaCl) or 18 h (400 mM NaCl).

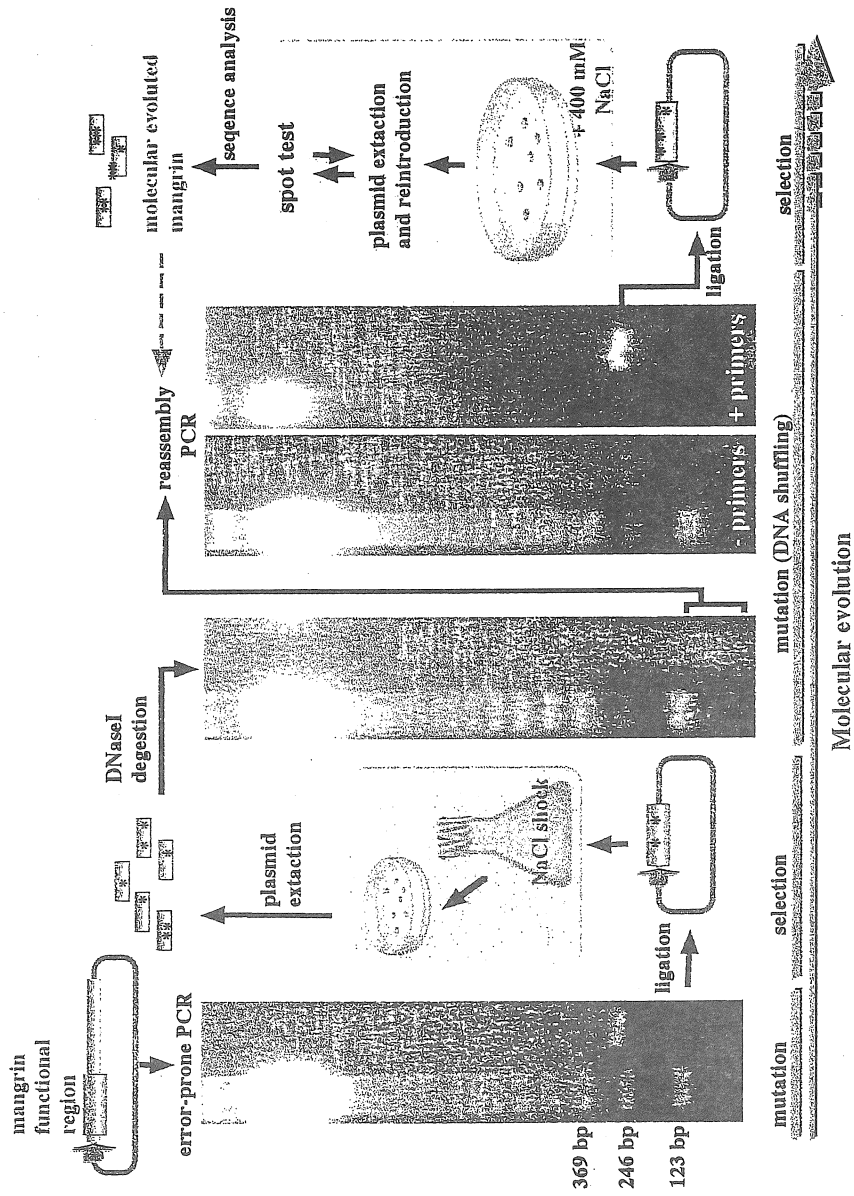


Fig. 3 Strategy for molecular evolution of mangrin

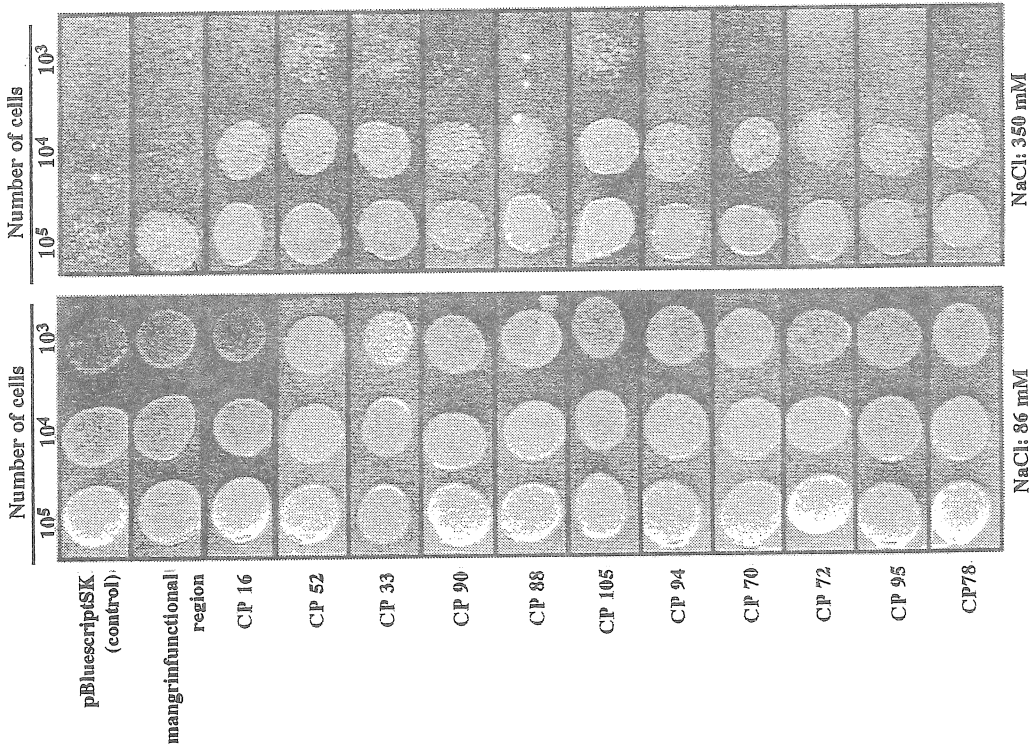
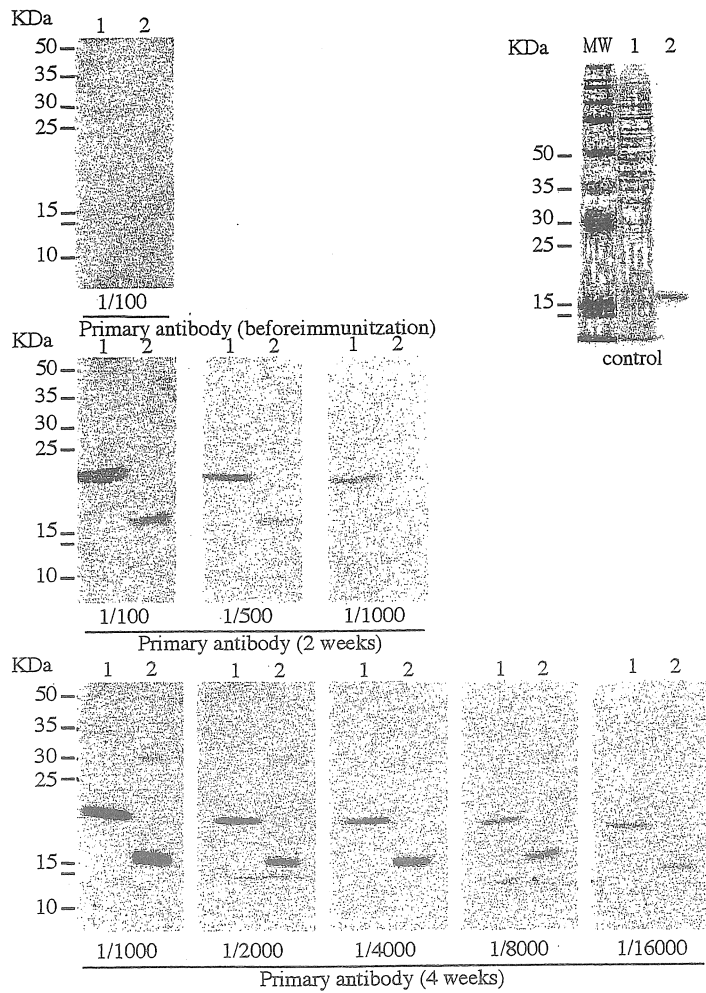


Fig. 4 Effect of the mangrin functional region and the molecular evolved proteins on the salt tolerance in *E. coli*

mangrin functional region  
 MKVGFARSKSATVPTQVLPFKFTNPSLLTRLSLFSKSGSDFSEVYKRSFCRSGQATPDDDAERFKVQ  
 CP 16  
 CP 52  
 CP 33  
 CP 90  
 CP 108  
 CP 88  
 CP 105  
 CP 94  
 CP 70  
 CP 72  
 CP 95  
 CP 78

Fig. 5 Amino acid sequences of mangrin functional region and the molecular evolved proteins  
 -: Amino acid residues that are same with mangrin functional region  
 +: silence mutations



**Fig. 6** Primary antibody titer were checked by western blot analysis.  
 control shows CBB stained gel.  
 lane 1 : crude total protein isolated from mangrove cultured cells  
 lane 2 : mangrin protein purified from *E. coli* transformant (1-144 aa)

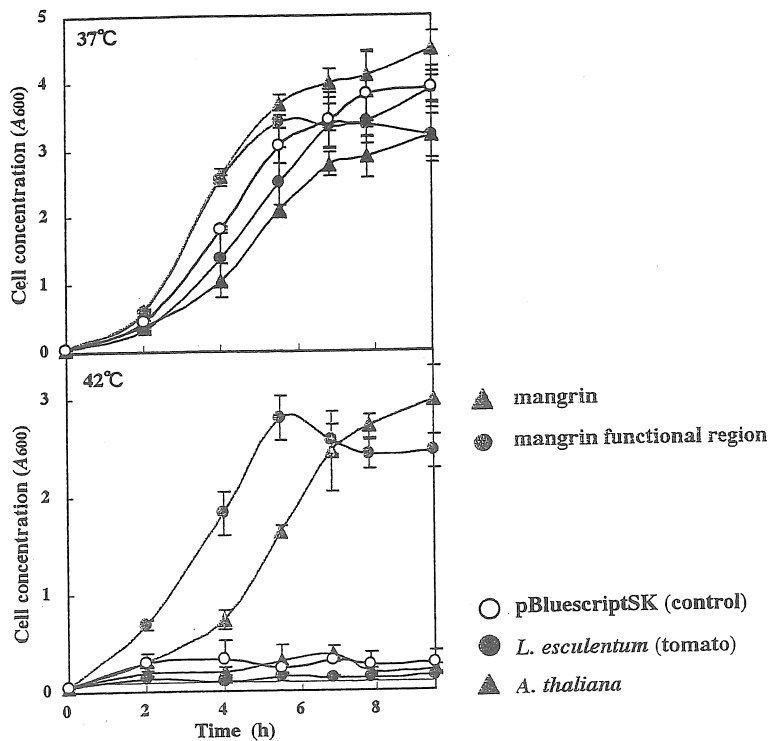


Fig. 7 Effect of the mangrin cDNA expression on the thermotolerance of *E. coli*.

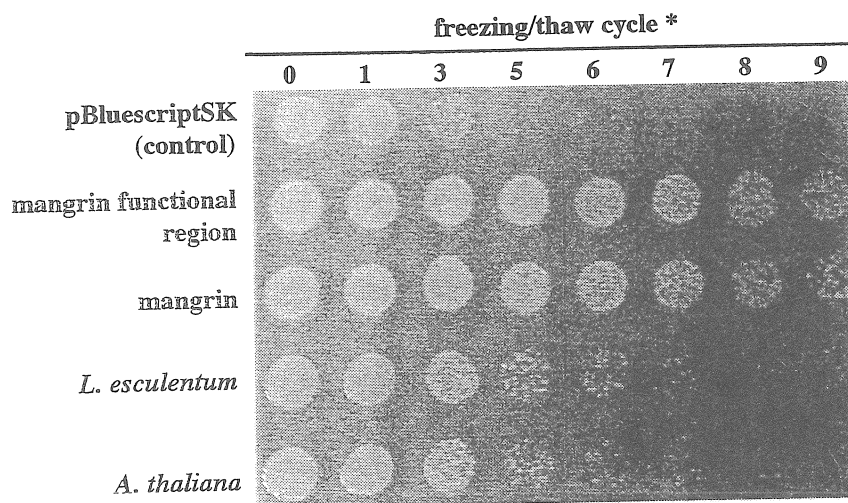


Fig. 8 Effect of the mangrin expression on the freezing tolerance of *E. coli*.

\* freezing : 3 min in liquid nitrogen  
thaw : 10 min in water bath (37°C)

## Molecular evolution of mangrin

Akiyo Yamada and Yoshihiro Ozeki

Department of Biotechnology, Faculty of Technology, Tokyo University of Agriculture and Technology, Naka-cho 2-24-16, Koganei, Tokyo 184-8588, Japan

### Summary

To analyze the mechanisms of salt tolerance in the mangrove plant, *Bruguiera sexangula*, functional screening for cDNAs encoding proteins essential for salt tolerance was performed using *Escherichia coli* as the host organism. A transformant expressing a protein homologous to *Lycopersicon* (tomato) allene oxide cyclase (AOC) displayed enhanced salt tolerance. However, this unusual trait is not conferred by *Lycopersicon* AOC or its *Arabidopsis* homolog. Analysis of the functional region revealed a sequence of only 70 amino acids, which contains an unusual sequence that is essential for the salt-tolerant phenotype. On the basis of its unusual function, the mangrove AOC homolog is designated "mangrin". Furthermore, expression of mangrin driven by the *GALI* promoter and the 35S cauliflower mosaic virus (CaMV) promoter in *Saccharomyces cerevisiae* and tobacco cell lines, respectively, also gave rise to enhanced salt tolerance. Mangrin transcripts increased in cultured *B. sexangula* cells in response to salt stress. Furthermore, molecular evolution of mangrin was done by error prone PCR and DNA shuffling. 11 clones of mutated mangrin showed enhanced activity.

We propose that mangrin plays an important role in the salt-tolerance mechanism of *B. sexangula*, and that the biosynthesis of mangrin might be an effective means of enhancing salt tolerance in higher plants.