

共生工学によるファイトレメディエーション

Phytoremediation by Symbiotic Engineering

室 岡 義 勝
YOSHIKATSU MUROKA

広島工業大学健康情報学科 〒 731-5193 広島市佐伯区三宅二丁目 1-1

TEL: 082-921-4513

E-mail: y.murohka.ks@it-hiroshima.ac.jp

Department of Health Science, Hiroshima Institute of Technology, 1-1 Miyake-2, Saeki-ku, Hiroshima 731-5193, Japan

キーワード: 共生, 根粒菌, 菌根菌, 重金属, レンゲソウ

Key words: symbiosis, Rhizobia, mycorrhizal fungi, heavy metal, *Astragalus sinicus*

(原稿受付 2008年10月18日/原稿受理 2008年10月22日)

1. はじめに

共生は、生物種間で互いに補い合って生きていくためのコンソーシアムの形成である。例えば、微生物種間のコンソーシアムはバイオフィームにより培われていることが最近の研究で明らかにされつつある。一生物種であるヒトは、他の生物種との共存を無視して、自己の種の保存に努め、他の生物種を利用することにより栄華を極めた。現在、この優生種により創造された文化と技術により深刻な地球環境破壊が行われている。この知能を持った種が考え出した科学・技術は、自らが住む地球環境保全にどのように対処しようとしているのだろうか？

筆者らは、生物種が互いに共存するために獲得してきた優れた形態としての共生系を分子遺伝学レベルで研究し、工学として利用できる共生系技術を開発し、地球生態系を乱さない「新機能を付与した新しい種の創造」による「共生工学」の新学問領域の確立に取り組んできた。共生には、植物と微生物、昆虫と微生物、シロアリやゴキブリと腸内微生物・べん毛虫、反芻動物とルーメン細菌、海綿と細菌類、ヒトと腸内細菌の友好関係などに広く見られる。最近、菌根菌などのカビ類と植物との共生が植物の多様性を拡大し維持するのに重要な役割を担っていることが明らかとなった¹⁰⁾。共生関係種が多くなるに従い、種の多様性が増加してくる。このことは、持続的環境保全を考える上で重要と思われる。筆者らは、その中で古くから農業や林業に実際に役立ってきた、マメ科植物と窒素固定根粒菌および植物と菌根菌(マイコライザ)の共生系を共生工学構築のモデルとして研究してきた。ここでは、最近明らかになりつつある共生分子機構を紹介し、共生工学による重金属浄化の研究開発について解説する。

2. 植物と微生物との共生分子遺伝機構

植物と微生物の共生機構の研究には、主としてマメ科植物と根粒菌あるいは樹木と菌根菌が用いられている。中でも、根粒形成は最も効率的な内部共生のモデルとして研究されてきた。この共生機構は、分子遺伝レベルで以下のように説明されるに至っている。まず、植物の根からフラボノイドが分泌される。これが根粒菌内の NodD タンパク質を活性化して、根粒形成遺伝子 (*nod*) 群の発現を誘導し、その結果根粒形成因子類 (*nod factors*)¹⁰⁾ と呼ばれるリポオリゴ糖誘導体を生合成して細胞外に分泌する(図1)。この *nod factors* は根粒菌の種によって修飾基が異なり宿主植物の違いを見分ける。この因子が宿主植物を認識して根毛表皮に結合すると、根毛の先端がカーリングして根粒菌を取り込みやすくする。取りこまれた根粒菌は、増殖しながら感染糸 (*infected thread*) を形成して根毛組織に入って行き、バクテロイド (*bacteroids*) を形成する。その結果、根毛組織の細胞分化が起こり、根粒 (*nodules*) を形成する。植物側はエネルギー源としての糖や有機酸をバクテロイドに供給し、バクテロイドはこのエネルギーを利用して自己増殖するとともに、空気中の窒素を固定して、植物に窒素化合物を供給することにより共生関係が成立している。

バクテロイドは根粒菌がびっしりと詰まったものであるが、土壌中や試験管で培養している根粒菌とは形態も遺伝子発現も異なっている。環境的に最も違っているのは、根粒菌は好気条件下で増殖できるにもかかわらず、根粒バクテロイド内は、極端な嫌気条件に保たれていることである。これは、窒素固定に関与するニトロゲナーゼが、酸素により不活性化されるからである。窒素固定に関与する遺伝子群は、制御遺伝子も含めて *nifA* から *nifX* までと *fixA* から *fixX* までの 40 近い遺伝子が知ら

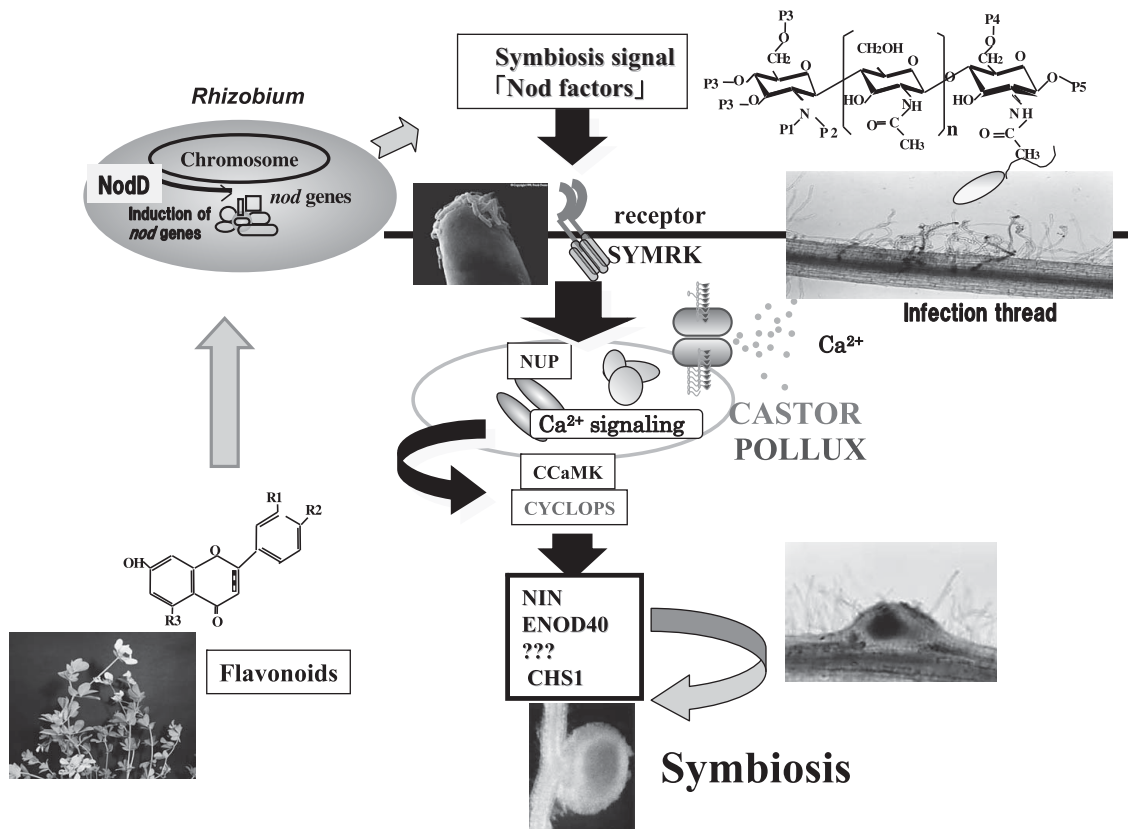


図1. マメ科植物と根粒菌の共生形態としての根粒形成に至るシグナル伝達分子機構。

れている。これら遺伝子産物（酵素）によって、空気中の窒素（N）は NH_3 に変換される。植物から供給される炭水化物代謝により生成する、 $8e^- + 8\text{H}^+$ および 16ATP の自由エネルギーを利用して、窒素ガスを取り込んで2モル NH_3 と1モル H_2 を生成する。

日本の共生関連研究者は、日本産のミヤコグサ (*Lotus japonicus*) をマメ科植物のモデルに選び、研究コンソーシアムを結成して精力的に研究を進めてきた。その結果、ミヤコグサ共生根粒菌 (*Mesorhizobium loti*) ゲノムの全塩基配列を決定し、マクロアレーにより遊離菌状態（土壤中）と共生状態（根粒内）における全遺伝子の発現状況を比較した²¹⁾。その結果、共生状態の根粒菌遺伝子発現はある一定の位置の遺伝子群を特に強く発現していることを明らかにした。この特定遺伝子群は、シンビオティックアイランドと呼ばれ、他の窒素固定微生物から水平移動して根粒菌に移ってきたと考えられている。

一方、植物側の根粒形成に関与する遺伝子は、根粒内で特異的に発現する遺伝子の分離および根粒形成能を欠いたマメ科植物の変異株のポジショナルクローニング法により同定するのが一般的である。前者の遺伝子は種々分離されたが、すでに機能の分かった遺伝子との相似性で根粒形成に関与する機能を推測するしかない。後者は、変異株の形質（どの状態で共生過程が止まっているか）は分かるが、遺伝子を特定するには3世代の株間かけ合わせによる遺伝型質の違いを指標にして染色体上にマッピングし、100 kb 塩基以内に絞られた後に、野生型と変異型のこの領域の遺伝子をクローニングして塩基配列を比較して変異遺伝子を特定すると言う大変な労力を

必要とする。このようにして、根より Nod factors の受容体と思われる、LRR-receptor kinase SYMRK が分離された³⁾。これら受容体に Nod factors が結合すると、このシグナルが G タンパク質の活性化、カルシウムイオン流動、NIN, ENOD40, CHS1 などのシグナル伝達を誘導して最終的に窒素固定根粒形成に至る。このシグナル伝達に伴って、根毛の変形（カーリング）、根粒菌の付着、感染糸形成、根粒菌の進入とバクテロイドの形成などが次々に誘起される（図1）。筆者らの研究室の武田、林らは、根粒形成シグナル伝達中のカルシウム流動に関わる CASTOR/POLLUX 因子⁹⁾ を、矢野らは CYCLOPS を明らかにした（投稿中）。Sym73, Sym74, Clinkle²⁰⁾ なども同定している。興味深いことに菌根菌（マイコライザ）の植物への共生も SYMRK¹⁹⁾ や CASTOR/POLLUX,³⁾ CYCLOPS など根粒菌の共生シグナル伝達機構の一部を共有していた。

こうした共生分子遺伝機構解明によって、将来、根粒を形成しないイネや小麦等の穀物種に根粒形成窒素固定遺伝子群を導入して、効率の良い共生系を作り、化学肥料の使用を最小限にとどめることが期待できる。

3. 共生工学の基盤技術開発

生物種間の共生機構を解明し、有効と思われる共生系をデザインし、それを構築する技術、すなわち共生を工学にすることを「共生工学」と名付けた。意図したものをデザイン（設計）して、それを構築する技術開発がなければ、工学とは呼べない。

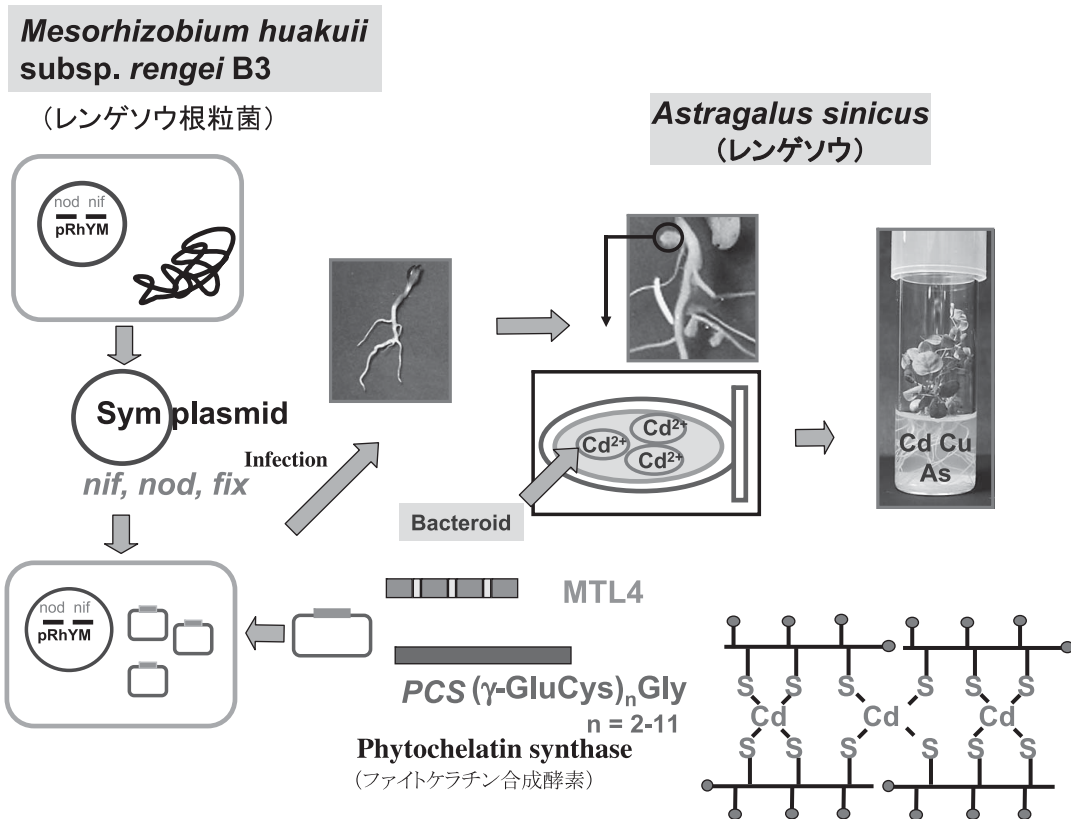


図2. 重金属バイオレメディエーションを例とした共生工学技術開発スキーム。重金属結合タンパク質、メタロチオネイン遺伝子を全化学合成し、さらにタンパク質工学により多重体を構築して金属結合能を高めた。またファイトケラチンタンパク質を合成する遺伝子も導入した。これらタンパク質は、根粒内で発現し、重金属蓄積を高めた。

共生工学の特徴は、共生系を利用することにより、2種類の種の特徴、例えば細菌と植物の共生の場合、以下のように両者の利点を生かすことができる。これは他の共生系でもいえることである。

a) 細菌の利点：根粒菌は、大腸菌と同じグラム陰性菌であることから、原理的には大腸菌で複製できるベクターを利用できる。また、大腸菌で発現する高等動植物の遺伝子を発現させることができる。最も重要なのは、細菌は複数の遺伝子をポリシストロニック（遺伝子が連なったもの）に発現できることである。特に、根粒菌は根粒バクテロイドの中で、複数の *nif* オペロン遺伝子をポリシストロニックに読んでいることから、多重遺伝子発現は可能と考えられる。

b) 植物の利点：光エネルギーを利用して空気中の CO_2 を固定し、種子や果実、根塊に炭水化物、タンパク質、脂質、アミノ酸、有機酸、ビタミンなどを蓄積できる。土壌から栄養分、無機物、水を吸収できる。

共生工学のために、開発すべき技術の全体スキームをバイオレメディエーションを例にとって説明しよう（図2）。この目的のために、中国と日本で古くから稲田の富沃化に用いられてきた緑肥としてのレンゲソウを材料として選んだ。レンゲソウ根粒菌は中国の研究者により新種として、*Rhizobium huakuii* と命名された¹⁾。筆者らは中国と日本で生息するレンゲソウ根粒菌の化学分析と 15SrDNA の RFLP や塩基配列の比較および ERIC-PCR などの遺伝子比較を詳細に行い、中国のレンゲソウ

ウ根粒菌と日本の根粒菌は系統学的に違うことを見だし、日本のレンゲソウ根粒菌を *Mesorhizobium huakuii* subsp. *regei* と改名した¹⁴⁾。ちなみに、中国の根粒菌は *Mesorhizobium huakuii* subsp. *huakuii* と呼ぶのが正しい。

この根粒細菌がレンゲソウの根毛に感染して根粒バクテロイドを作り、窒素固定して植物に窒素源を供給する。従って、レンゲソウを鋤込んだ田圃には化学窒素肥料を必要としなかった。筆者らと広島大の山田らのグループは、このレンゲソウ共生系の分子遺伝機構の研究も行ってきた。

3.1. 根粒菌の宿主-ベクター系の開発

根粒菌に有用遺伝子を導入するには、根粒菌の形質転換系の開発が必要であった。そこで筆者らは、根粒菌用の広宿主ベクターを作成し、レンゲソウ根粒菌 *M. huakuii* subsp. *regei* の形質転換系を開発した⁵⁾。この系を用いて、*Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium* 属など幾つかの種において形質転換が可能となった⁹⁾。

3.2. 試験管内根粒形成技術

クローバーなどで一般に使用されている方法を使って、試験管内でレンゲソウの根粒形成を試みたが、試験管内で根粒形成はできなかった。すべての条件検討を行って、最適条件を求めた結局分かったことは、レンゲソウの場合、pH が弱アルカリ性で、比較的低温で培養させる必要があったことである¹²⁾。

3.3. 根粒バクテロイド内での遺伝子発現

根粒バクテロイド内における遺伝子発現は、広宿主根粒菌 *Rhizobium* sp. NGR234 の巨大プラスミド上に乗っている遺伝子群についての研究が進んでいた⁴⁾。この共生プラスミド (symbiotic plasmid) は 536 kb の大きさで、416 のオープンリーディングフレーム (ORF) と 24 の転写制御領域が発見された。その内、16 の *NifA*- σ^{54} 制御保存領域が見つかった。一方、レンゲソウ根粒菌の *nif* や *nod* 遺伝子群も巨大プラスミド上に乗っていた²²⁾。少なくとも、*nif*, *fix* 遺伝子群は根粒バクテロイド内で発現していると予想される。*nifA* プロモーターを利用することにより、根粒内で目的遺伝子の発現が可能となり、根粒内で初めてヒトメタロチオネインなどの異種遺伝子発現に成功した¹⁷⁾。

3.4. 根粒バクテロイドへの物質の取り込みと植物組織への物質輸送

バクテロイドは、バクテロイド膜に包まれている。窒素固定によるアンモニウムイオンおよびアラニン等のアミノ酸がバクテロイド膜を透過して、植物細胞に移行する。これ以外の物質透過に関しては分かっていない。最近、筆者らはアラビドプシスの金属トランスポーター遺伝子を根粒バクテロイド内で発現させることに成功した⁸⁾。芽、種子、塊茎等に植物は、脂肪、デンプン、貯蔵タンパク質などを蓄積する。こうした貯蔵物質は発達が終わる頃には分解され、植物の成長を促進する。工業植物を育種する際には、こうした貯蔵組織への物質の貯蔵が重要となる。根粒で蓄積したアミノ酸を、種子などに輸送する技術開発が必要となる。

3.5. 菌根菌および内外部共生菌の利用

菌根菌は、植物の根に入り込んで *arbuscules* という組織を作り植物からのエネルギーで増殖する。菌根菌の *Arbuscules* から菌糸を伸ばし、土壌中のリンや水を吸収して宿主植物の根に与えることで共生を保っている。現在のところ菌根菌のほとんどが宿主植物と離しては純粋培養ができないため、共生工学には至らないが、苗木に接種することにより貧土壌での生育を早めることができるので東南アジアなどで植林に利用されている。一方、窒素固定菌の多くが、土壌や水田、池、沼中で遊離菌 (*free-living nitrogen-fixing prokaryotes*) として生息している。植物と内部共生している、あるいは植物に外部共生している窒素固定微生物が多く存在している。イネの根圏には、*Achromobacter*, *Azospirillum*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Acetobacter* などが生息することが知られている。これらは窒素固定能を持ち内外部共生菌としてイネに窒素源を供給している²⁾。この様な微生物や根粒菌のような内部共生菌も、土壌中では外部共生菌として利用することができる。

3.6. 共生工学の応用

生態系の情報ネットワークの仕組みは、地球環境保全・環境浄化に役立てることができる。筆者らの研究室では、耐塩性菌の耐塩機構の遺伝生化学的解明を行ってきた^{15,16)}。この耐塩性遺伝子群と他の耐寒性・耐乾燥遺

伝子群を組み合わせ、塩害に耐え、砂漠で育つ植物種の創造を目指した共同研究を奈良先端大学院大学の新名研究室と行ってきた¹³⁾。また、硫黄やアミン化合物の代謝遺伝子調節機構の解明と分子間ネットワークを理解する分子生物学研究¹¹⁾、硫黄酸化物の固定の研究、およびカドミウム、銅、水銀などの重金属を特異的に結合するタンパク質の工学的変換^{6,23)} や細菌表面への吸着²⁴⁾、さらに植物によるバイオレメディエーションをとおして、地球環境浄化の一部に役立てるべく研究してきた。

4. 植物レメディエーション

以前、筆者らの研究室において、Cd, Zn, Cu, Hg 等の重金属を結合するヒトのメタロチオネインを大腸菌で発現させ、タンパク質工学により重金属の結合能を4倍に高めた4量体メタロチオネインタンパク質 (図2) をデザインした⁶⁾。この4量体メタロチオネイン遺伝子 (*MTL4*) をレンゲソウ根粒菌に導入し、根粒形成させた¹⁷⁾。この改良メタロチオネイン遺伝子を持った根粒菌は、土壌中に拡散している重金属を集め、レンゲソウの根に付着してその一部は根粒に入り、残った大部分は根圏で自己消化して、重金属を遊離する。植物は動くことなく、遊離された重金属を根から吸収する。

さらに、酵母や植物で発見された金属結合タンパク質、ファイトケラチン (図2) を生合成する *Arabidopsis thaliana* のファイトケラチン合成酵素遺伝子 (*AtPCS*) を、*MTL4* と同様に根粒菌に組換え、この組換え根粒菌をレンゲソウに感染させて根粒を形成させた。この酵素はCdによって著しく活性化される。*AtPCS* を発現した組換え根粒菌は野性株の10-20倍のCd取り込みを示したが、形質転換根粒は1.5-1.8倍のCd蓄積であった¹⁸⁾。このことは、Cdのバクテロイドへの取り込みに制限があると考えられた。そこで、Cdの膜輸送にも関係していると思われた鉄輸送たんぱく質の遺伝子 (*IRT1*) を *A. thaliana* からクローニングして、根粒菌に導入し、この組み換え根粒菌をレンゲソウに接種して、根粒を形成させた⁸⁾。その結果、根粒菌へのCd取り込みは増加したが、根粒内へのCdの取り込みは変わらなかった。CuやAsの取り込みは若干促進した。そこで、植物組織へのCdの取り込み量を測定したところ、根へのCd量が増加していた (図3)。このことは、*IRT1* 鉄輸送タンパク質が根粒から根にCdを輸送すると考えられるが、実際は *IRT1* はCdの根への直接取り込みあるいは吸着を促すのかもしれない。*MTL4* と *AtPCS* の両遺伝子を導入することにより重金属取り込みに相乗効果が現れた⁷⁾。実用的には、植物側にも直接これら金属結合タンパク質を大量に生産させて、さらに重金属を蓄積させる必要があるだろう。植物に蓄積した重金属は、レンゲソウであれば田に水を張って耕耘機で根粒ごと抜き取り乾燥、焼却して灰を保管するか、貴重金属は抽出して再利用すればよい (図4)。年に数回栽培し、数年これを繰り返せば汚染土壌は浄化される計算となる。汚染土壌を掘り起こして、運搬し、処理場で洗い流すより経済的である。ここでは、稲田に最適なレンゲソウを材料としたが、それぞれの土地に適した植物を利用すればよい。

この様に、共生菌は植物と共同して、カドミウムなど

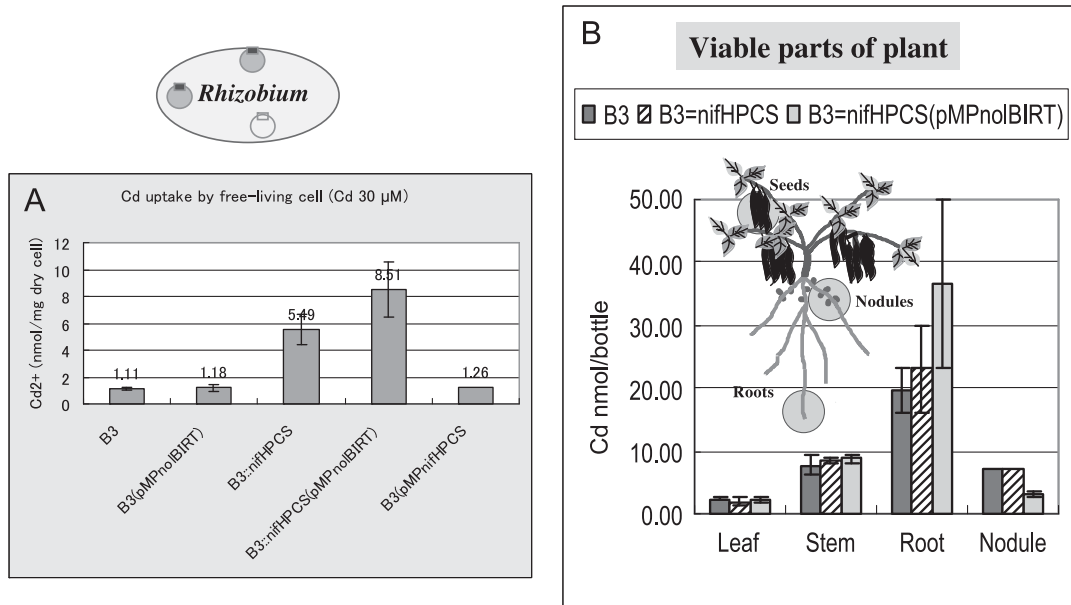


図3. 組換え根粒菌 (A) とその接種により形成したレンゲソウ根粒およびレンゲソウ組織への Cd²⁺ 蓄積 (B)。B3, レンゲソウ根粒菌 B3 株; B3::nifHPCS, *nifH* プロモーター下流に挿入した *PCS* (ファイトケラチン合成酵素) 遺伝子を B3 株の染色体に組み込んだ; B3::nifHPCS (pMPnoIBIRT), *nodB* プロモーターに *IRT* (鉄輸送タンパク質) 遺伝子を結合した遺伝子をベクター pMP に入れ, 前記組換え B3 株に導入した組換え体。

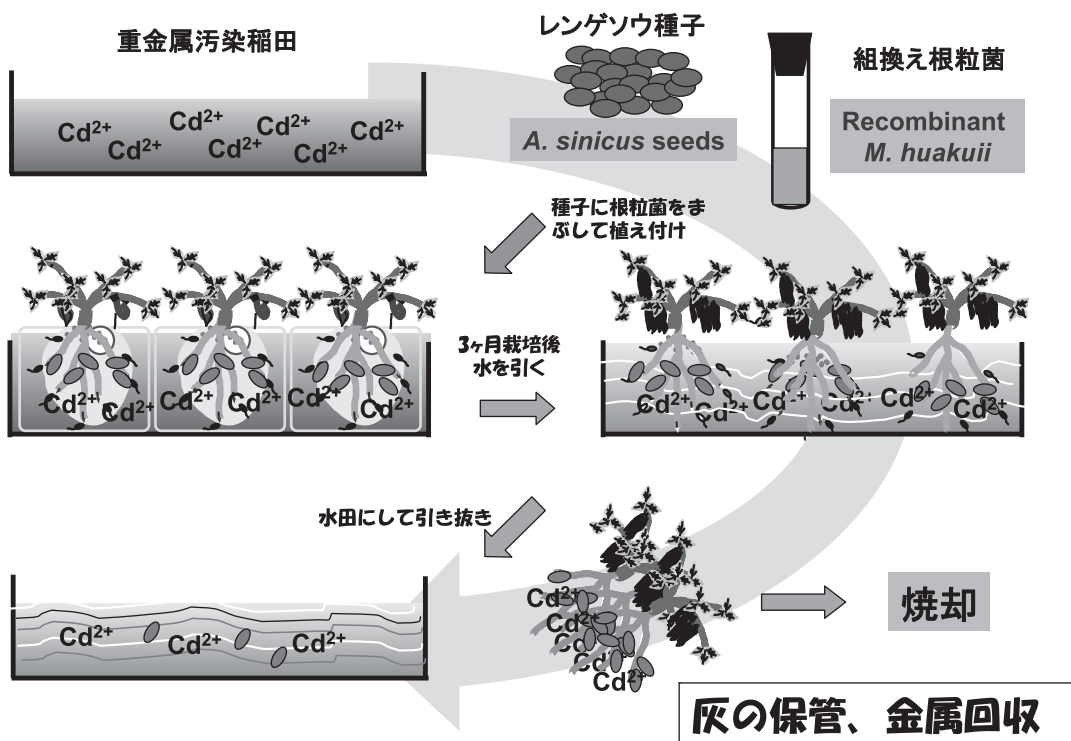


図4. 組換えレンゲソウによるカドミウム汚染稲田の浄化法。

で汚染された水田の浄化, 環境修復を行うファイトレメディエーションとして役立つ。根粒菌は, 簡単に遺伝子導入ができること, 宿主植物根粒内での遺伝子発現ができるようになったことから, その応用範囲は広がるだろう。根圏細菌, 例えばアゾトバクターなどの外部共生菌に NO_x や SO_x 等を捕捉し NO₃ や SO₄ に変換する酵素系の遺伝子を導入することにより, 排気ガス汚染を植物

と微生物の作用により浄化することも考えられる。この系は土壤中の必須元素の循環・保持にも有効であろう。

5. 共生工学の将来

生物種間の共生機構を明らかにし, 工学的に共生系をデザインし, それを構築する技術開発により, この「共

生工学」は学際を越えた新たな科学分野を創生するであろう。多種多様な生物種間の共生系を明らかにし、さらに人工的に共生系を構築することにより、エネルギー循環効率を高め、環境低負荷型の共生技術を開発できるに違いない。

地球上の多くを占める酸性土壌や砂漠地帯の乾燥・高塩土壌に適したマメ科植物や樹木およびそれに根粒を作る細菌の育種、菌根菌の利用、植物寄生菌・病原菌の共生と病原性のメカニズムの解明あるいは無農薬、バイオロジカルコントロールとしての害虫耐性トランスジェニック植物の創造などの研究がこれにあたる。「共生工学」はそのうち、工学を進化させて、生物が共存するための「共生社会科学」の学問分野を拓くかもしれない。

文 献

- Chen, W.X., G.S. Li, Y.L. Qi, E.T. Wang, H.L. Yuan, and L. Li. 1991. *Rhizobium huakuii* sp. nov. isolated from the root nodules of *Astragalus sinicus*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41: 275–280.
- Elbertagy, A., K. Nishioka, T. Sato, H. Suzuki, B. Ye, T. Hamada, T. Isawa, H. Mitsui, and K. Minamisawa. 2001. Endophytic colonization and in planta nitrogen fixation by *Herbaspirillum* sp. isolated from wild rice species. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 5285–5293.
- Endre, G., A. Kereszt, Z. Kevei, S. Mihacea, P. Kalo, et al. 2002. A receptor kinase gene regulating symbiotic nodule development. *Nature* 417: 962–966.
- Freiberg, C., R. Fellay, A. Bairoch, W.J. Broughton, A. Rosenthal, and X. Perret. 1997. Molecular basis of symbiosis between *Rhizobium* and legumes. *Nature* 387: 394–401.
- Hayashi, M., Y. Maeda, Y. Hashimoto, and Y. Murooka. 2000. Efficient transformation of *Mesorhizobium huakuii* subsp. *rengei* and *Rhizobium* species. *J. Biosci. Bioeng.* 89: 550–553.
- Hong, S.-H., M. Ghoya, H. Ono, H. Murakami, M. Yamashita, and Y. Murooka. 2000. Molecular design of novel metal-binding oligomeric human metallothioneins. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54: 84–89.
- Ike, A., R. Sriprang, H. Ono, Y. Murooka, and M. Yamashita. 2007. Bioremediation of cadmium contaminated soil using symbiosis between leguminous plant and recombinant rhizobium with the *MTL4* and the *PCS* genes. *Chemosphere* 66: 1670–1676.
- Ike, A., R. Sriprang, H. Ono, Y. Murooka, and M. Yamashita. 2008. Promotion of metal accumulation in nodules of *Astragalus sinicus* by the expression of the iron-regulated transporter gene in *Mesorhizobium huakuii* subsp. *rengei* B3. *J. Biosci. Bioeng.* 105: 642–648.
- Imaizumi-Anraku H.*, N. Takeda*, M. Charpentier, J. Perry, H. Miwa, Y. Umehara, H. Kouchi, Y. Murakami, L. Mulder, K. Vickers, J. Pike, A. Downie, T. Wang, S. Sato, E. Asamizu, S. Tabata, M. Yoshikawa, Y. Murooka, G.-J. Wu, M. Kawaguchi, S. Kawasaki, M. Parniske, and M. Hayashi (*These authors contributed equally to this work). 2005. Plastid proteins crucial for symbiotic fungal and bacterial entry into plant roots. *Nature* 433: 1364–1367.
- Leurouge, P., P. Roche, C. Faucher, F. Maillet, G. Truchet, J.C. Prome, and J. Denarie. 1990. Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. *Nature* 344: 781–784.
- Murooka, Y., H. Azakami, and M. Yamashita. 1996. The monoamine regulon including synthesis of arylsulfatase and monoamine oxidase in bacteria. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 60: 935–941.
- Murooka, Y., Y. Xu, K. Sanada, M. Araki, T. Morinaga, and A. Yokota. 1993. Formation of root nodules by *Rhizobium huakuii* biovar *rengei* bv. nov. on *Astragalus sinicus* cv. Japan. *J. Ferment. Bioeng.* 76: 38–44.
- Nakayama, H., K. Yoshida, H. Ono, Y. Murooka, and A. Shinmyo. 2000. Ectoine, the compatible solute of *Halomonas elongate*, confer hyperosmotic tolerance in cultured tobacco cells. *Plant Cell Physiol.* 122: 1239–1247.
- Nuswantara, S., M. Fujie, T. Yamada, W. Malek, M. Inaba, K. Kaneko, and Y. Murooka. 1999. Phylogenetic position of *Mesorhizobium huakuii* subsp. *rengei*, a symbiont of *Astragalus sinicus* cv. Japan. *J. Biosci. Bioeng.* 87: 49–55.
- Ono, H., M. Okuda, S. Tongpim, K. Imai, A. Shinmyo, S. Sakuda, Y. Kaneko, Y. Murooka, and M. Takano. 1998. Accumulation of compatible solutes, ectoine and hydroxyectoine, in a moderate halophile, *Halomonas elongate* KS3 isolated from dry salty land in Thailand. *J. Ferment. Bioeng.* 85: 365–368.
- Ono, H., K. Sawada, N. Khunajakr, T. Tao, M. Yamamoto, M. Hiramoto, A. Shinmyo, M. Takano, and Y. Murooka. 1999. Characterization of biosynthetic enzymes for ectoine as a compatible solute in a moderately halophilic eubacterium, *Halomonas elongata*. *J. Bacteriol.* 181: 91–99.
- Sriprang, R., M. Hayashi, M. Yamashita, H. Ono, K. Saeki, and Y. Murooka. 2002. A novel bioremediation system for heavy metals using the symbiosis between leguminous plant and genetically engineered rhizobia. *J. Biotechnol.* 99: 279–293.
- Sriprang, R., M. Hayashi, H. Ono, M. Takagi, K. Hirata, and Y. Murooka. 2003. Enhanced accumulation of Cd²⁺ by a *Mesorhizobium* sp. transformed with a gene from *Arabidopsis thaliana* coding for phytochelatin synthase. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 1791–1796.
- Stacke, S., C. Kistner, S. Yoshida, L. Mulder, S. Sato, et al. 2002. A plant receptor-like kinase required for both bacterial and fungal symbiosis. *Nature* 417: 959–962.
- Tansengco, M., M. Hayashi, M. Kawaguchi, H. Imaizumi, and Y. Murooka. 2003. *Crinkle*, a novel symbiotic mutant that affects the infection thread growth and alters the root hair, trichome, and seed development in *Lotus japonicus*. *Plant Physiol.* 131: 1054–1063.
- Uchiumi, T., T. Ohwada, M. Itakura, H. Mitsui, N. Nukui, P. Dawadi, T. Kaneko, S. Tabata, T. Yokoyama, T. Tejima, K. Saeki, H. Omori, M. Hayashi, T. Maekawa, R. Sriprang, Y. Murooka, S. Tajima, K. Simomura, M. Nomura, A. Suzuki, Y. Shimoda, K. Sioya, M. Abe, and K. Minamisawa. 2004. Expression islands clustered on the symbiotic island of the *Mesorhizobium loti* genome. *J. Bacteriol.* 186: 2439–2448.
- Xu, Y., and Y. Murooka. 1995. A large plasmid isolated from *Rhizobium huakuii* bv. *rengei* that includes genes for both nodulation of *Astragalus sinicus* cv. Japan and nitrogen fixation. *J. Ferment. Bioeng.* 80: 276–279.
- Yamashita, M., H. Kuwata, H. Murakami, and Y. Murooka. 1994. Genetic design of a gene for human metallothionein II and its expression as an active fusion protein in *Escherichia coli*. *J. Ferment. Bioeng.* 77: 113–118.
- Yoshida, M., and Y. Murooka. 1994. Adsorption of bacterial cells to crystal particles of heavy metals: role of electrostatic interactions. *J. Ferment. Bioeng.* 77: 636–641.