

## 細菌ナノファイバーによる微生物の表面付着

### Microbial Adhesion to Surfaces Mediated by Bacterial Nanofibers

堀 克 敏<sup>1,2,3</sup>, 石 川 聖 人<sup>1</sup>

KATSUTOSHI HORI, MASAHIITO ISHIKAWA

<sup>1</sup> 名古屋工業大学工学研究科物質工学専攻 〒466-8555 愛知県名古屋市昭和区御器所町

<sup>2</sup> 名古屋工業大学プロジェクト研究所界面微生物工学研究所

<sup>3</sup> 科学技術振興機構さきがけ

TEL & FAX: 052-735-5214

E-mail: hori.katsutoshi@nitech.ac.jp

<sup>1</sup> Department Materials Science and Engineering, Graduate School of Engineering, Nagoya Institute of Technology, Gokiso-cho, Showa-ku, Nagoya, Aichi 466-8555, Japan

<sup>2</sup> Project Research Center for Interfacial Microbiology

<sup>3</sup> PRESTO, JST

キーワード: 細菌付着, 接着ナノファイバー, DLVO 理論, ピリ, オートトランスポートアドヘン

Key words: bacterial adhesion, adhesive nanofiber, DLVO theory, pili, autotransporter adhesin

(原稿受付 2010 年 3 月 1 日 / 原稿受理 2010 年 4 月 22 日)

#### 1. はじめに

細菌付着は、細胞とそれらが分泌する細胞外ポリマー (EPS) から成るバイオフィームや細菌コロニーの形成の第一段階であり、微生物汚染や感染症、虫歯、冷却管などの産業設備へのスライム形成、金属腐食の促進、船底への生物付着などを引き起こして、我々の健康や産業活動を脅かす。しかしその一方で、バイオフィームによる環境浄化、産業用微生物の固定化、根粒細菌の農業利用、バクテリアリーチングなど種々の分野で、細菌付着は利用可能である。フィラメント状細胞付属器官や EPS などの高分子は、細菌細胞と表面とをブリッジする働きを有し、細菌付着にとって重要な因子である。EPS はむしろ付着の強化やバイオフィームの発達段階で重要であるが、細胞付属器官は初期付着にとって不可欠な場合があり、接着因子として知られている。筆者は、細胞接着因子であるフィラメント状細胞付属器官を、“細菌接着ナノファイバー”と称し、それらの構造、機能、発現調節機構、接着メカニズムの解明はもちろん、界面制御技術、ナノマテリアルへの応用まで目指して研究に取り組んでいる。以下、その研究成果も織り交ぜながら、細菌の付着機構<sup>1)</sup>について説明する。

#### 2. 細菌の表面構造と付着機構

細菌細胞の表面は、中性付近の通常の水環境中では、表面に露出している分子のカルボキシル基やリン酸基などが解離して負に帯電していることが多い。一方、付着

表面も水中では負に帯電していることが多い。よって、細菌が負に帯電した表面に近づく際には、ファンデルワールス引力と静電反発力の両方が働き、全エネルギーはそれらの和として表すことができる (DLVO 理論)<sup>2,3)</sup>。静電反発力はイオン強度が低下するほど強まり、あるイオン強度以下では、細菌のブラウン運動やべん毛運動などによるエネルギーでは越えられないほどの高いエネルギー障壁が生じ、細菌細胞は表面に到達できなくなる (図 1)。しかし、細菌をはじめとする微生物は、このような条件でも強固な付着を達成できるためのメカニズムを有する。典型的なイオン強度の条件下では、エネルギー障壁の外側に浅いエネルギー極小が生じる。表面からこのエネルギー極小までの距離はイオン強度によって変わるが、通常数ナノメートルのオーダーである。細菌細胞はブラウン運動や細胞器官による運動によってこの位置までやってきて、表面との弱い相互作用により可逆的に付着する。次いで、EPS や細胞表層の細菌接着ナノファイバーがエネルギー障壁を通り抜けて、ファンデルワー

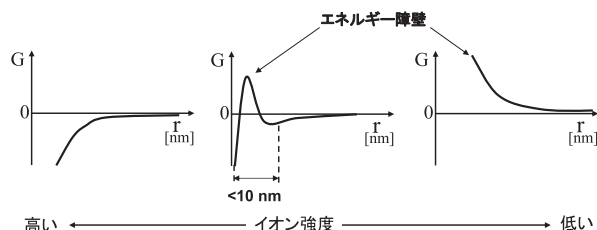


図 1. コロイド粒子と表面との相互作用のエネルギー

ルス引力により離れることができなくなる表面まで到達する。エネルギー障壁の大きさは、平板とみなせる（細菌よりもずっと曲率半径が大きい）吸着表面に接近する粒子の半径に比例する。したがって細胞よりもずっと曲率半径の小さい細胞付属器官や EPS の場合、越えられないほどのエネルギー障壁は存在しない。“通り抜ける”と表現したのは、このことを意味している。よって細菌は、細胞本体はエネルギー障壁の外側の浅いエネルギー極小にとどまったまま、ナノファイバーや EPS が表面との間数ナノメートルをブリッジングすることで、不可逆的な付着を達成する（二段階付着機構）（図 2A）。

ただし、この機構はイオン強度がある範囲内にあるときについてのみ言える。この範囲よりイオン強度が高い場合は、エネルギー障壁は消失し、表面に近づいてきた細菌は一段階で不可逆的な付着を達成する。反対にイオン強度が低い場合には、ファイバーやポリマーが届かないほどエネルギー障壁が表面より遠ざかり、浅いエネルギー極小も消失し、細菌の付着は妨げられる。

エネルギー障壁の高さを見積もるため、電気泳動度 (EPM) から Smoluchowski の式を使ってゼータ電位が求められてきた。しかし、多くの細菌について、イオン強度を増大させていった際に EPM が零以外の値に漸近するということが森崎らによって示された<sup>4,5)</sup>。このことは、ゼータ電位は細菌細胞の表面電位を正確に表してはいないことを意味する。大島らは、Smoluchowski の式は剛球にのみしか適用できないことを指摘し、表層がポリマーの層で覆われた柔らかい粒子の EPM を記述するモデルを構築した<sup>6-10)</sup>。表層のポリマー層は、電気二重層中のイオンと水分子が自由に出入りできる。森崎らはこのモデルを真の細菌細胞の表面電位を正確に見積もるために使用した<sup>4,5)</sup>。大島モデルでは、EPM ( $\mu$ ) は次式で記され、イオン強度の増大により零以外の値に漸近することが説明される。

$$\mu = \left( \frac{\epsilon_r \epsilon_0}{\eta} \right) \left( \frac{\Psi_0 / \kappa_m + \Psi_{\text{DON}} / \lambda}{1 / \kappa_m + 1 / \lambda} \right) + \frac{zeN}{\eta \lambda^2}$$

ここで、 $\epsilon_r$  は細胞の懸濁している培地の比誘電率、 $\epsilon_0$  真空の誘電率、 $\eta$  は培地の粘度、 $\Psi_0$  は粒子の表面電位、 $\Psi_{\text{DON}}$  はポリマー層のドナン電位、 $\kappa_m$  はポリマー層の Debye-Hückel パラメータ、 $z$  はポリマーの荷電基の価数、 $e$  は電荷、 $N$  電荷密度、 $\lambda$  は柔らかさを表すパラメータである。細胞は表層が多糖や蛋白質などの高分子で覆われた柔らかい粒子であると考えられることは理にかなっている。

大島モデルを細菌細胞に適用することによって、実際の細胞の表面電位は Smoluchowski の式から計算されるゼータ電位よりもずっと小さいことが明らかとなった。そのため、ゼータ電位を DLVO 理論に適用すると細菌細胞と表面との直接接触が妨げられるような高いエネルギー障壁が存在するような低イオン強度においても、そのようなエネルギー障壁が消滅するか細菌細胞が乗り越えられるほどの高さしかないことが明らかとなった<sup>9)</sup>。しかしながら、たとえ柔らかい粒子を仮定しても、細胞の不可逆的な付着を妨げるようなエネルギー障壁は、あるイオン強度以下では生じ得る。

細菌の付着機構を記述する手段としては、上記の DLVO 理論とは別に表面自由エネルギー変化を考慮する熱力学的アプローチがある。このアプローチは DLVO 理論とは矛盾する面もあるが、疎水的な表面には疎水性の細菌が付着しやすく、親水的な表面には親水性の細菌が付着しやすいという経験的な事実<sup>11)</sup> をうまく説明する。Oss らは疎水 / 親水性相互作用を組み込んだ拡張 DLVO 理論を提唱した<sup>12,13)</sup>。

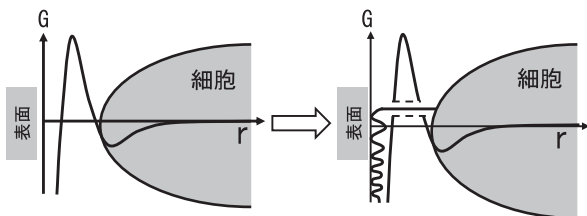
以上のように細菌付着の理論は進化してきており、細菌の付着現象を理解する上では非常に重要であるが、現実の細菌の付着過程は非常に複雑で、上記の付着モデルには従わないことも多い。たとえば、通常の固体表面が裸のまま剥き出しになっていることはなく、微生物が付着する以前に、さまざまな有機物や無機物が吸着している。これをコンディショニングフィルムという<sup>14-17)</sup>。コンディショニングフィルムと裸の表面では物理化学的性質が全く異なり、したがって細菌などの微生物との相互作用も異なってくると考えてよい。

### 3. ナノファイバーによる表面付着

ナノファイバーによる接着は細菌の専売特許ではなく、細菌以外の微生物はもちろん、高等生物にも見られる。身近で有名な例がヤモリである。ヤモリの足指には  $1 \text{ mm}^2$  あたり 5 千本の剛毛（直径  $10 \mu\text{m}$ ）が生えており、さらに剛毛の先端は無数のナノファイバーに分かれている<sup>18)</sup>。各ナノファイバーの先端はファンデルワールス引力により表面と相互作用する。一本のナノファイバーによるファンデルワールス引力は弱いものであるが、それらが無数に集まるとその積は強大となり、生物界最高レベルの接着力 ( $0.1 \text{ N/mm}^2$ ) を発揮する。この接着力で、つるつるのガラス壁面に難なく張り付くことができるが、一方で、弱い相互作用であるファンデルワールス引力を利用しているため、接着力を発揮しながらも素早く

#### A. 二段階付着

1. 一段目(可逆的付着段階)      2. 二段目(不可逆的付着段階)



#### B. 一段階付着

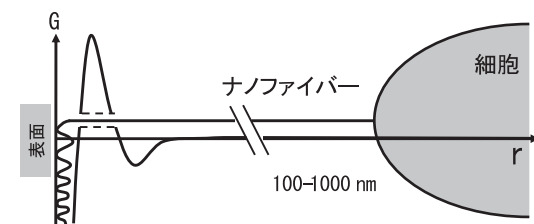


図 2. 通常の細菌 (A) と長いナノファイバーを持つ *Acinetobacter* 属細菌 Tol 5 株 (B) の付着機構

剥がすことも可能で、したがって垂直なガラス壁面でも敏捷に動くことができるのである。最近、これよりずっと強力な接着力を示す細菌ナノファイバーが報告され、注目を集めている<sup>19)</sup>。Tsang らが報告したこのナノファイバーはグラム陰性細菌 *Caulobacter crescentus* が有するもので、細胞壁が伸びたものである。細胞はその極に一本のナノファイバーを持ち、N-アセチルグルコサミンから成る多糖類でできたファイバー先端の接着根は  $68 \text{ N/mm}^2$  以上もの接着力を発揮する。これは自然界最強であり、既存の人工接着剤の2倍以上の接着力である。

#### 4. 蛋白質性の細菌接着ナノファイバー

蛋白質性の細菌接着ナノファイバーはアドヘンシと呼ばれ、非生物由来の固体表面に非特異的に接着してバイオフィーム形成に関わるものもあるが、病原性細菌が宿主に感染する際の接着因子として働くものも多く、これらは宿主の細胞や組織の他、コラーゲンやフィブロネクチンなどの細胞外マトリックス (ECM) に特異的に接着する。アドヘンシの中でもよく知られているのが、ピリとかフィンブリエなどと呼ばれる髪の毛様の細胞付属器官である<sup>20)</sup>。ピリもフィンブリエも日本語では線毛と訳される細胞付属器官の同義語である。フィンブリエは複数種の蛋白質から成る複合体で、ファイバーの本体は、メジャーピリンと呼ばれる一種の粒状蛋白質サブユニットが、螺旋状に配置しながら積み上がることで、長い線状構造をとる (図3A)。その先端には、通常、接着性の蛋白質サブユニットが局在する。フィンブリエには、細胞外への輸送機構や機能、構造、局在性などの異なるさまざまなものがある。一つの細菌が複数種類のフィンブリエを有していることも少なくない。

近年、非フィンブリエ性接着ナノファイバーとして、グラム陰性細菌が有するオートトランスポーターアドヘンシ (ATAD) が注目されている<sup>21)</sup>。オートトランスポーター (AT) システムによる蛋白質の外膜輸送機構は、タイプV分泌システムとも言われるもので、他の蛋白質の介在を必要としないで自身を外膜の外へ輸送する。構造もフィンブリエとは違ってサブユニットの積み上げ構造ではなく、ポリペプチド鎖のアミノ酸配列の並びの方向に伸びた繊維構造をとる。これまでのところ、単量体のタイプとホモ三量体のタイプが知られているが、ともにカルボキシル末端側が  $\beta$  バレル構造を形成して外膜にトンネル構造を作り、アミノ末端側を外へ分泌する (図3B)。外に分泌されるアミノ末端側をパッセンジャードメイン、トンネル構造を形成して輸送通路となる部分をトランスロケーションユニットとそれぞれ呼ぶ。既報の限りでは、パッセンジャードメインは、単量体タイプでは外膜の外に出た後、自己消化により切り離されることが多いが、三量体タイプでは繋がったままのものがほとんどで、この場合、トランスロケーションユニットはそのまま膜結合部位になる。トランスロケーションユニットは、12本の  $\beta$  ストランドが逆平行  $\beta$  構造をとりながら親水基を内側に、疎水基を外側に向けた  $\beta$  バレルを形成して外膜を貫通する。三量体タイプの場合は、一つのポリペプチド鎖のカルボキシル末端が4本の  $\beta$  ストランドを形成し、3本集まって12ストランドとなる。パッ

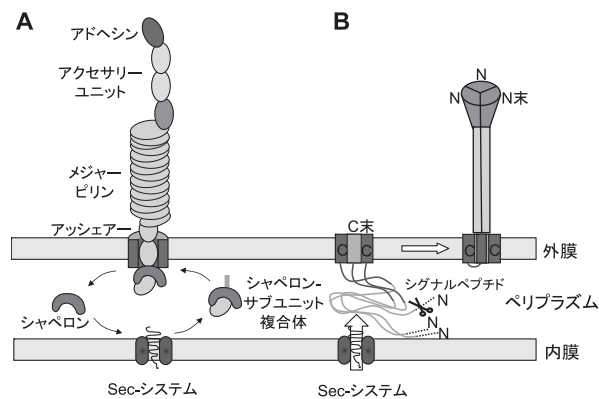


図3. 細菌接着ナノファイバーのアッセムリー模式図。  
(A) タイプ1フィンブリエ (B) TAA

センジャードメインがどの段階でフォールディングされるかについては明らかとなっていないが、フォールディングの自由エネルギー差により ATP のエネルギー非依存的に起こる輸送機構であることが、AT の特徴の一つである<sup>22)</sup>。三量体タイプは TAA (Trimeric Autotransporter Adhesin) と Oca (Oligomeric coiled coils adhesin) ファミリーとも呼ばれ、最近、その詳細が多少なりともわかってきた。TAA は大きさが 300 アミノ酸程度のものから 3000 アミノ酸を超えるものまで多様であるが、典型的な構造は、アミノ末端からカルボキシル末端に向かって、頭部、首、柄、外膜結合部位という順番に並び、“ペロペロキャンディ”様である<sup>23,24)</sup>。よって、ファイバーの長さはペプチドの長さで規定され、TAA によってさまざまである。X 線構造解析などから高次構造の詳細がわかっているものは、*Yersinia enterocolitica* の YadA と *Haemophilus influenzae* の Hia だけである。一次構造からは、外膜結合部位の基本的構造は共通であると考えられているが、それ以外のドメイン構造は多様性に富んでいる。YadA の柄部は3本の  $\alpha$  ヘリックスが超らせんを形成するコイルドコイル構造をとっており、一次構造からは、他の多くの TAA もコイルドコイルに富んだ繊維を形成していると推定される。Oca ファミリーと言われるゆえんである<sup>25)</sup>。頭部は、YadA も Hia も  $\beta$  ストランドに富んだ二次構造をとるが、三次、四次構造は両者で大異なる。ATAD は病原性細菌の宿主への感染に直接的に関与しており、ECM への特異的結合部位が頭部に存在することが報告されている<sup>23,24)</sup>。

#### 5. 高付着性の *Acinetobacter* 属細菌 Tol 5 株の ナノファイバーによる付着

芳香族分解能力をもつグラム陰性の高付着性細菌 *Acinetobacter* 属細菌 Tol 5 株は、培養液をプラスチック製のピペットで採取するだけで、ピペット内壁が細胞で瞬時にコーティングされるほど付着性が高い<sup>26)</sup>。筆者らは、初め、Tol 5 株の細胞表面に二種類の細胞付属器官を発見し、これらによってこの細菌が表面に付着することを示した<sup>27)</sup>。一方はフィンブリエに似た周毛性繊維、他方は長さ数百 nm の枝分かれのない直線状繊維で、末端で表面と相互作用する。このような細菌ナノファイ

パーはこれまでに報告がなく、筆者らは“アンカー”と名付けた。ところが電子顕微鏡技術の進歩により、Tol 5 細胞が少なくとも 3 種類の周毛性ナノファイバーを有していることが、最近明らかとなった<sup>28)</sup>。分子生物学的解析の結果、これらはタイプ 1 ピリ、TAA、Fil であると推定される。ただし Fil については一部の *Acinetobacter* 属細菌のもつナノファイバー蛋白質であるとの情報しかなく、機能や構造については未知の蛋白質である。また、Tol 5 株の TAA (AtaA) はこれまでに知られている中で最も大きい (300 kDa 以上) だけでなく、非常に長い繰り返し構造が複雑に配置したり、アミノ末端側に加えカルボキシル末端側の外膜結合部寄りにも二つ目の頭部が存在するなど、既報の TAA には見られない一次構造上の特徴を有している。

Tol 5 株の接着機構を調べるため、トランスポゾン挿入により AtaA の遺伝子が破壊され、付着性が 10 分の 1 ほどに低下した変異株 T1 を取得した<sup>29)</sup>。この AtaA を欠損した T1 株では、Fil の発現レベルは野生株と同程度であるが、何故かタイプ 1 ピリの発現量も低下していた (極性効果ではないことは確認されている)。また、T1 株はイオン強度の低下とともに付着量が減少し、0.015 mM で完全にポリウレタンスポンジに付着できなくなるのに対し、野生株の高付着性はイオン強度が低下しても変わらない (図 4)。前術のとおり DLVO 理論によれば、イオン強度が低下すると細菌は付着しにくくなる。したがって、T1 株の付着は DLVO 理論に従う一方で、野生株は DLVO 理論では記述できない付着機構をもっていると言える。さらに、剥離試験により、野生株はポリウレタンスポンジに接触させて 30 秒以内に不可逆的な付着を達成することが示された。同じ接触時間では、T1 株の付着は可逆的である。また野生株でも、培養条件によってはナノファイバーを発現していない“禿げ細胞”を得ることができるが、これはナノファイバー欠損株と同様な付着特性を示す<sup>30)</sup>。すなわち、野生株でも長い接着性ナノファイバーを発現していなければ、細胞付着はイオン強度に依存するとともに、短い接触時間では可逆的である。

以上より、直線状の長いナノファイバーであるタイプ 1 ピリや AtaA は、数百 nm 以上離れた距離から表面に相互作用でき、そのため Tol 5 株の細胞は、通常の細菌細胞ならばエネルギー障壁のために付着ができなくなってしまう低イオン強度の水溶液中でも、付着することができると考えられる。また、浅いエネルギー極小までやってきて、いったん可逆的に付着する必要もなく、遠くか

らこれらナノファイバーにより一段で不可逆的な付着を達成できる。これは、表面極近傍における相互作用と考えられていた細菌付着の概念の変更を迫るものである (図 2B)。

AtaA の属する TAA は、これまで、病原性細菌が宿主に感染するときに働く接着蛋白質として報告されており、コラーゲンやフィブロネクチンへ特異的に結合するとされている。また、細菌細胞同士の自己凝集にも関与していることが示されている<sup>31)</sup>。しかし、非生物表面への非特異的付着に関与しているという報告はない。Tol 5 株の非生物表面への非特異的で高い付着性が AtaA によるものかどうか調べるため、先の変異株 T1 に *ataA* 遺伝子をプラスミドに載せて再導入することにより、復帰変異株を得た。この復帰変異株は、T1 株に見られたタイプ 1 ピリの発現低下を回復することはなかったが、非生物表面への非特異的付着性は野生株と同レベルまで回復した。このことは、AtaA が Tol 5 株の非生物表面への非特異的付着を引き起こしていることを示唆するものである。

## 6. おわりに

最近、硫黄冷泉に生息するアーキアが特異な超ナノ構造を有する周毛性毛状ファイバーを有していることが報告された<sup>32)</sup>。“hami”と名付けられたこのナノファイバーは、直径 7~8 nm、長さ 1~3 μm で、先端の“フック領域”と中心部の“棘領域”から成る。フック領域の先端は 3 本に分かれて、それぞれが返しのある釣り針様構造を形成する。全体としては船の錨のように見える。また“棘領域”では、一定のピッチで短い棘が出ており、有刺鉄線さながらである。主軸は、らせん構造を形成しており、先端が 3 本に分かれることから、3 本のファイバーが超らせんを形成しているものと思われる。その主構成成分は 120 kDa の蛋白質であると報告されているが、より詳細な分子情報に関する知見はまだ明らかにされていない。この特殊なアーキアは、hami によって多種の細菌を含む“真珠の数珠”のような凝集体を形成する。すなわち hami は他の細菌細胞を絡み取るような機能を担っていると考えられる。この驚異の形態のナノファイバーを見ると、自然が機能にあった合理的な形を進化させてきた結果を見ているようであり、人類は知らずのうちにそれを模倣しているにすぎないことを認識させられる。

微生物は多種類の接着ナノファイバーを環境条件に合わせて発現し、宿主への付着、非生物表面上でのコロニーやバイオフィルムの形成、凝集体やフロックの形成を達成している。凝集体やバイオフィルムの形成に関してはこれまでは EPS の方が注目されてきたが、ナノファイバーが重要な働きを担っていることが明らかになりつつある。微生物の付着を自由に操る技術や新規ナノマテリアルの開発を目指し、細菌接着ナノファイバーの研究が発展することを願っている。

## 文 献

- 1) Hori, K., and S. Matsumoto. 2010. Bacterial adhesion: From

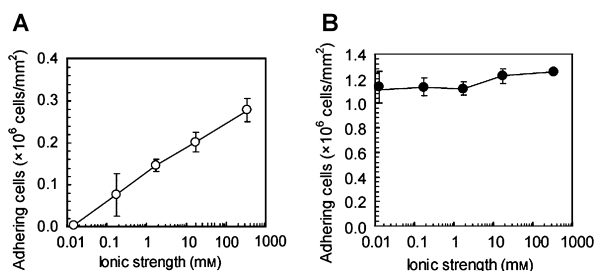


図 4. *Acinetobacter* 属細菌 Tol 5 株のポリウレタンスポンジ担体への付着のイオン強度依存性。(A) T1 株; (B) 野生株

- mechanism to control. *Biochem. Eng. J.* 48: 424–434.
- 2) Marshall, K.C., R. Stout, and R. Mitchell. 1971. Mechanism of the initial events in the sorption of marine bacteria to surfaces. *J. Gen. Microbiol.* 68: 337–348.
  - 3) 森崎久雄, 服部黎子. 1986. 界面と細菌. 学会出版センター.
  - 4) Morisaki, H., S. Nagai, H. Ohshima, E. Ikemoto, and K. Kogure. 1999. The effect of motility and cell-surface polymers on bacterial attachment. *Microbiology* 145: 2797–2802.
  - 5) Takashima, S., and H. Morisaki. 1997. Surface characteristics of the microbial cell of *Pseudomonas syringae* and its relevance to cell attachment. *Colloids Surf. B* 9: 205–212.
  - 6) Ohshima, H. 1995. Electrophoretic mobility of soft particles. *Colloids Surf. A* 103: 249–255.
  - 7) Ohshima, H., and T. Kondo. 1991. On the electrophoretic mobility of biological cells. *Biophys. Chem.* 39: 191–198.
  - 8) Ohshima, H. 1994. Electrophoretic mobility of soft particles. *J. Colloid Interface Sci.* 163: 474–483.
  - 9) Ohshima, H., K. Makino, T. Kato, K. Fujimoto, T. Kondo, and H. Kawaguchi. 1993. Electrophoretic mobility of latex particles covered with temperature-sensitive hydrogel layers. *J. Colloid Interface Sci.* 159: 512–514.
  - 10) Ohshima, H. 1995. Electrophoresis of soft particles. *Adv. Colloid Interface Sci.* 62: 189–235.
  - 11) An, Y.H., and R.J. Friedman. 1998. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial surfaces. *J. Biomed. Mater. Res.* 43: 338–348.
  - 12) Van Oss, C.J. 1989. Energetics of cell-cell and cell-biopolymer interactions. *Cell Biochem. Biophys.* 14: 1–16.
  - 13) Van Oss, C.J. 1993. Acid-base interfacial interactions in aqueous media. *Colloids Surf. A* 78: 1–49.
  - 14) Gristina, A.G. 1987. Biomaterial-centered infection: microbial adhesion versus tissue integration. *Science* 237: 1588–1595.
  - 15) Bos, R., H.C. van der Mei, and H.J. Busscher. 1999. Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions-its mechanisms and methods for study. *FEMS Microbiol. Rev.* 23: 179–230.
  - 16) Schneider, R.P., and K.C. Marshall. 1994. Retention of the Gram-negative marine bacterium SW 8 on surfaces-effects of microbial physiology, substratum nature and conditioning films. *Colloids Surf. B* 2: 387–396.
  - 17) Brading, M.G., J. Jass, and H.M. Lappin-Scott. 1995. Dynamics of bacterial biofilm formation, pp. 46–63. In H.M. Lappin-Scott, J.W. Costerton (ed.), *Microbial Biofilms*. Cambridge University Press, Cambridge.
  - 18) Autumn, K., Y.A. Liang, S.T. Hsieh, W. Zesch, W.P. Chan, T.W. Kenny, R. Fearing, and R.J. Full. 2000. Adhesive force of a single gecko foot-hair. *Nature* 405: 681–685.
  - 19) Tsang, P.H., G. Li, Y.V. Brun, L.B. Freund, and J.X. Tang. 2006. Adhesion of single bacterial cells in the micronewton range. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103: 5764–5768.
  - 20) Soto, G.E., and S.J. Hultgren. 1999. Bacterial adhesins: common themes and variations in architecture and assembly. *J. Bacteriol.* 181: 1059–1071.
  - 21) Giratd, V., and M. Mourez. 2006. Adhesion mediated by autotransporters of Gram-negative bacteria: Structural and functional features. *Res. Microbiol.* 157: 407–416.
  - 22) Thanassi, D.G., C. Stathopoulos, A. Karkal, and H. Li. 2005. Protein secretion in the absence of ATP: The autotransporter, two-partner secretion and chaperone/usher pathways of Gram-negative bacteria. *Mol. Membr. Biol.* 22: 63–72.
  - 23) Linke, D., T. Riess, I.B. Autenrieth, A. Lupas, and V.A.J. Kempf. 2006. Trimeric autotransporter adhesins: variable structure, common function. *Trends Microbiol.* 14: 264–270.
  - 24) Hoiczuk, E., A. Roggenkamp, M. Reichenbecher, A. Lupas, and J. Heesemann. 2000. Structure and sequence analysis of *Yersinia* YadA and *Moraxella* UspAs reveal a novel class of adhesins. *EMBO J.* 19: 5989–5999.
  - 25) Roggenkamp, A., N. Ackermann, C.A. Jacobi, K. Truelzsch, H. Hoffmann, and J. Heesemann. 2003. Molecular analysis of transport and oligomerization of the *Yersinia enterocolitica* adhesin YadA. *J. Bacteriol.* 185: 3735–3744.
  - 26) Hori, K., S. Yamashita, S. Ishii, M. Kitagawa, Y. Tanji, and H. Unno. 2001. Isolation, characterization and application to off-gas treatment of toluene degrading bacteria. *J. Chem. Eng. Japan* 34: 1120–1126.
  - 27) Ishii, S., J. Koki, H. Unno, and K. Hori, 2004. Two morphological types of cell appendages on a strongly adhesive bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 5026–5029.
  - 28) 樋口愛介, 堀田康明, 山本宏治, 堀 克敏. 2009. 改良ネガティブ染色法による *Acinetobacter* 属細菌 Tol5 株細胞上の 3 種粘着性ナノファイバーの識別. *医学生物学電子顕微鏡技術学会誌.* 23: 9–14.
  - 29) Ishii, S., H. Unno, S. Miyata, and K. Hori. 2006. Effect of cell appendages on the adhesion property of a highly adhesive bacterium, *Acinetobacter* sp. Tol 5. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70: 2635–2640.
  - 30) Ishii, S., S. Miyata, Y. Hotta, K. Yamamoto, H. Unno, and K. Hori. 2008. Formation of filamentous appendages by *Acinetobacter* sp. Tol 5 to adhere to solid surfaces. *J. Biosci. Bioeng.* 105: 20–25.
  - 31) Serruto, D., T. Spadafina, M. Scarselli, S. Bambini, M. Comanducci, S. Höhle, M. Kilian, E. Veiga, P. Cossart, M.R. Oggioni, S. Savino, I. Ferlenghi, A.R. Taddei, R. Rappuoli, M. Pizza, V. Massignani, and B. Aricò. 2009. HadA is an atypical new multifunctional trimeric coiled-coil adhesin of *Haemophilus influenzae* biogroup aegyptius, which promotes entry into host cells. *Cell. Microbiol.* 11: 1044–1063.
  - 32) Moissl, C., R. Rachel, A. Briegel, H. Engelhardt, and R. Huber. 2005. The unique structure of archaeal ‘hami’, highly complex cell appendages with nano-grappling hooks. *Mol. Microbiol.* 56: 361–371.