

接着性バクテリオナノファイバーによる微生物プロセスの革新

Innovation of Microbial Processes by an Adhesive Bacterionanofiber

堀 克敏*

KATSUTOSHI HORI*

名古屋大学大学院工学研究科生命分子工学専攻 〒464-8603 名古屋市千種区不老町

* TEL: 052-789-3339 FAX: 052-789-3218

* E-mail: khori@chembio.nagoya-u.ac.jp

Department of Biomolecular Engineering, Graduate School of Engineering, Nagoya University,
Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya 464-8603, Japan

キーワード：接着，バクテリオナノファイバー，微生物固定化，固定化触媒，表層提示

Key words: adhesion, bacterionanofiber, microbial immobilization, immobilized enzyme, surface display

(原稿受付 2019年3月24日 / 原稿受理 2019年3月29日)

1. はじめに

細胞には様々な種類の酵素が含まれ、生きるための無数の化学反応の触媒として働いている。細胞から分離精製された各種酵素は、医薬品、食品、化成品などの生産や、洗剤や柔軟剤などの日用品、バイオセンサーまで様々な分野で利用されている。しかし、酵素の分離精製には手間やコストがかかり、また多くの精製酵素は不安定で失活しやすいため、その利用は比較的付加価値の高い分野に限られる。一方、細胞はいわば酵素の詰まった袋のようなものである。そこで、酵素を取り出さずに細胞そのものを触媒として利用する場合も多く、全細胞触媒 (whole cell catalyst) と呼ばれる。通常は、動物や植物の細胞に比べて扱いやすく、適用できる遺伝子工学技術も発達している微生物細胞を用いる。酵素のように高度な分離精製をする必要もなく、また多くの場合、精製酵素よりは細胞内に含有されている酵素の方が安定である。そのため、微生物細胞は酵素と比べ生産コストがずっと低く、排水・廃棄物処理や安価な化学物質の生産のような、低コストでないと市場に受け入れられない分野にも適用しやすい。

微生物細胞は酵素より安価とは言え、培養には培地や基質などの化学品、エネルギーを投入せねばならず、それなりの生産コストはかかる。そこで全細胞触媒の利用効率を高めるため、微生物細胞の固定化は古くから研究、実用されてきた。精製酵素の固定化が広く研究され普及しているのと同様であるが、全細胞触媒は酵素を内包・固定化した袋とも考えられるため、微生物細胞固定化技術は、袋ごと触媒を固定する技術ともいえる。袋と言っても微生物細胞は1 μm程度と小さく、生産物の分離の際には、遠心分離やフィルターろ過などによる細胞の分離回収操作が必要である。微生物細胞を固定化すれば、分離回収を省略でき、また触媒の反復使用や連続使

用が容易になる。さらに、触媒濃度を上げることも容易になる。したがって、微生物細胞の固定化は、微生物反応プロセスの効率化には欠かせない。

全細胞触媒には、脂質二重膜が反応物や生成物の移動障壁となるという問題点がある。この問題を解決するために、微生物細胞の表層に酵素などを提示する細胞表層提示技術が検討されてきた¹⁾。微生物の固定化と細胞表層提示技術が、全細胞触媒による生物プロセスを効率化し、実用的プロセスを構築する鍵を握っている。

2. 従来の微生物細胞固定化技術と問題点

微生物細胞固定化技術の多くは酵素の固定化技術と共通するが、酵素よりはずっと大きいので、その特性を活かした微生物特有の技術もある。従来の主要な微生物固定化技術は、①細胞表層分子の活性化による共有結合、②物理吸着、③包括法、④クロスリンキングによる細胞の凝集塊化である。これらの固定化法には様々な問題点がある。例えば、①では微生物細胞や表層タンパク質の失活や活性低下を招くことが多い。また、活性化に必要な化学品や工程などで、コストが嵩む。②については、一般に物理吸着力は弱く、固定化には不十分である。固定化に利用可能なほど強い物理吸着を示すのは、これまでのところ、一部の糸状菌に限られている。包括法は、アルギン酸などの高分子ゲルに細胞を閉じ込める方法であり、微生物の固定化に最もよく使われてきた方法である。しかし、ゲル内部における物質移動律速の問題は大きく、物質変換速度の大きな低下をもたらす。また、脆弱なゲルは攪拌などによって破壊されやすいし、キレート作用をもつ物質があると崩壊するゲルもある。一般に耐久性も高いとは言えず、ゲルからの細胞の漏出も時間とともに増大する。④には①と同じような問題がある。

近年、物理吸着の一方法として、バイオフィーム法が

注目されている。バイオフィームは、微生物が固体表面に付着し、EPSと呼ばれる細胞外高分子を分泌しながら形成するもので、身近な例では“ぬめり”とか“水垢”と呼ばれるものがある。医療現場や公衆衛生の分野では、薬剤耐性などを示す病原菌のバイオフィームが問題になっているが、水処理の分野では生物膜法として古くから利用されてきた。近年は、水処理だけでなく、特定の微生物のバイオフィームをつくらせ、化学物質の生産に利用しようという研究も行われている。自然固定化法、受動的固定化法などと呼ばれることもある^{2,4)}。しかし、通常のバイオフィームは幾種類もの微生物種で構成される微生物コミュニティであるのに対し、物質生産で利用されるバイオフィームについては、反応に関わる微生物を一種類のみ含む純粋培養系、または一連の反応に関わるせいぜい3, 4種ぐらゐまでの数種からなる混合培養系である。よって、微生物生態学者が取り上げる一般的なバイオフィームとは、だいぶ、趣も異なる。実際、一つの化学反応にバイオフィームを利用するには、特定の反応を触媒する能力とバイオフィーム形成能力を併せ持つ微生物種をスクリーニングせねばならず、かなりの時間と労力を要する^{3,5)}。また、バイオフィーム形成に長期間を有すること²⁾、細胞濃度と物質輸送律速のバランスをとって高活性を発揮する適切な厚みのバイオフィームを維持することが非常に難しいことなど、現状のバイオフィームリアクターにも、実用化に向けた課題は多い^{3,6,7)}。

3. 接着性バクテリオナノファイバー AtaA

筆者らは、排ガス処理用バイオフィームから単離されたベンゼン/トルエン分解能力を有する高付着性細菌 *Acinetobacter* sp. Tol 5 株⁸⁾ について研究を進めてきた。Tol 5 の付着が他の微生物のそれと特に異なる点は、①様々な表面へ付着できるという非特異性と②その強さ・親和性の高さと、③増殖を伴わなくても休止菌体細胞自体の付着能力が高いことなどである⁹⁾。緑膿菌 *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 のようなバイオフィーム形成細菌は、増殖を伴ってバイオフィームを形成しながら表面に付着するが、休止菌体状態ではほとんど付着しない。Tol 5 の休止菌体細胞は、疎水性のプラスチックから親水性のガラス、さらには金属表面まで様々な種類の材料表面に付着することができる。Tol 5 は細胞凝集力も高く、最近の解析では、この凝集力の高さが付着性に大きく寄与していることが明らかとなってきた。筆者らは、他の微生物では報告例のないこのような付着特性をもたらし因子として、細菌細胞表層に存在する新規のバクテリオナノファイバーを発見し、それを構成する新しいタンパク質を同定した(図1)。このタンパク質は三量体型オートトランスポーターアドヘシン(TAA)ファミリーに属しており、筆者らはこれを *AtaA* と名付けた¹⁰⁾。TAA はグラム陰性病原性細菌の接着因子として知られ、宿主細胞の表層分子やコラーゲン、フィブロネクチンなどのECMに接着する¹¹⁾。また、バイオフィーム形成にも関与する。しかし、TAAの中で *AtaA* のみが様々な表面に対し非特異的で高い接着性を示す。

TAA のファイバー構造はピリなど代表的な細胞表層の線毛様タンパク質とは異なる構造で、一種類のポリペ

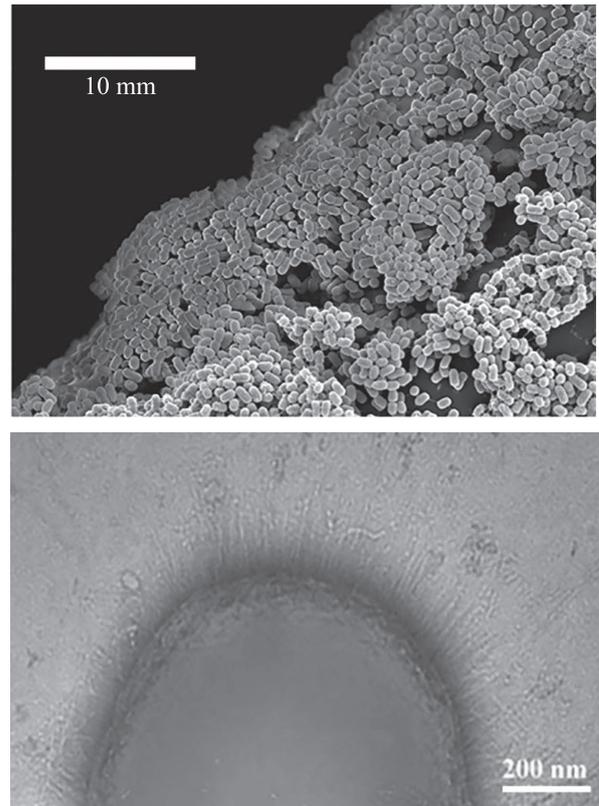


図1. 高付着性 *Acinetobacter* 属細菌 Tol 5 株と接着ナノファイバータンパク質 *AtaA* の電子顕微鏡写真。(A) ポリウレタンの表面に付着する Tol 5 の細胞凝集塊。(B) Tol 5 細胞の表層から生える周毛状の *AtaA* ナノファイバー。このファイバーで固体表面に接着したり細胞凝集塊を形成したりする。

プチド鎖のアミノ(N)末端側がファイバーの先端を、カルボキシル(C)末端側が外膜結合部位をそれぞれ構成する。また、名称が示すように、ホモ三量体を形成する。分泌においては、グラム陰性細菌の細胞表層構造である内膜を Sec システムで通過後、ポリペプチド鎖の C 末端側が外膜中に β バレル構造を形成し、さらに、3つのポリペプチド鎖の β バレルが三量体を形成し外膜に孔を形成する。その孔を通して、パッセンジャードメイン(PSD)と言われる N 末端側の残りの部分が外膜を通過し細胞外に出る。近年、 β バレル構造の形成に Bam 複合体と呼ばれる一連のタンパク質群や、ペリプラズムでのペプチド鎖の外膜への輸送やアンフォールディング状態の維持に関して、分子シャペロンが関与することが明らかになり、オートトランスポーターという名称は実体を表さなくなっている。*AtaA* に関して言えば、筆者らはその分泌をアシストする新規のタンパク質 *TpgA* を発見している¹²⁾。

膜結合部位と異なり、PSD は細菌の種類や株によって多様である。PSD は多くの TAA で保存されている様々な種類のドメイン構造が並んでおり、含まれるドメインの種類や数は TAA によって様々である。そのため、TAA を構成するポリペプチド鎖の長さも、数百から数千アミノ酸まで多様であり、その違いは、細胞表層に提示されるファイバー構造に反映される。*AtaA* のポリペプチド鎖は 3630 残基からなり、TAA の中では最も巨大なグ

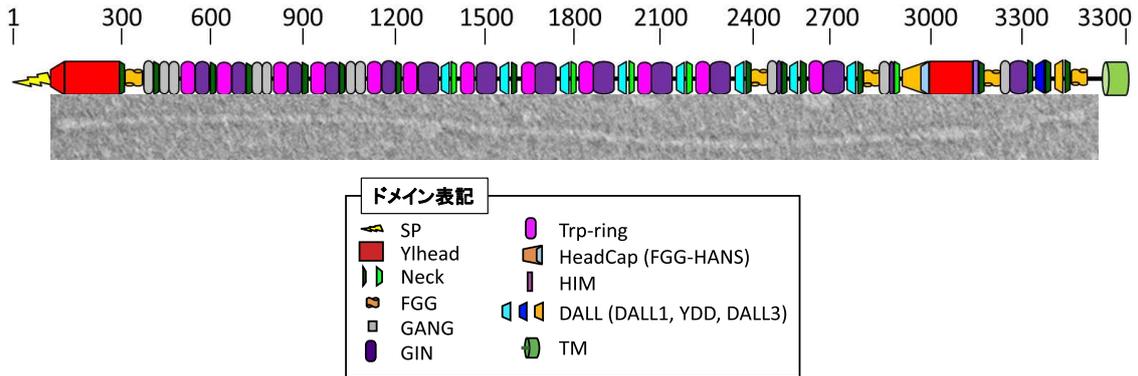


図2. AtaA の一次構造模式図と酵素刈取り法により細胞から切り取られた AtaA ファイバーの電子顕微鏡写真。AtaA は様々なドメインで構成されるマルチドメインタンパク質である。(出典元：参考文献 13)

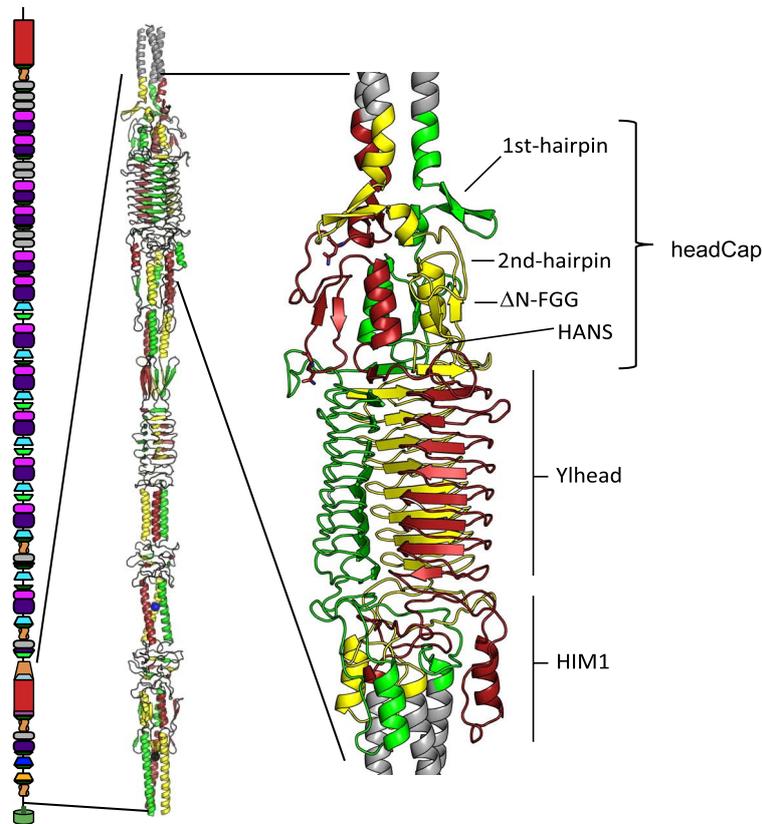


図3. CheadCstalk 部分の結晶構造。Chead (拡大図) はベータプリズム構造をもつ Ylhead と呼ばれるドメインが三つのパイザーでキャップされているような構造となっており、ファイバーの安定化と強靱さに貢献している。

ループに入る。AtaA の一次構造の模式図を図2に示す。巨大な膜タンパク質である天然 AtaA を Tol 5 株から分離精製することは容易ではない。そこで筆者らは、プロテアーゼ切断箇所を AtaA ファイバーに遺伝子レベルで導入する新しい分離精製法(酵素刈取り法)を考案した¹³⁾。天然の AtaA の PSD ファイバーを、酵素消化により刈り取って分離した。得られたファイバーを電子顕微鏡で観察すると、直径 4 nm、長さ 225 nm、タンパク質の N 末となるファイバー先端と C 末の根元寄りに存在する二つの head ドメインが膨らんだ形状をしていることがわかる(図2)。

AtaA ファイバーを熱処理や酸・アルカリに曝し、CD スペクトルと電子顕微鏡により高次構造への影響を、水

晶振動子マイクロバランスにより接着性を評価した。その結果、pH が 1 の酸や 12 のアルカリ中でも AtaA の高次構造は全く壊れず、接着性も損なわれなかった。熱処理に対しても、80°C 以上 5 分間の処理で変性が顕著になったが、それ以下の温度では構造を安定に維持していた。興味深いことに、AtaA は高次構造が崩れるにつれ接着特性を失った。巨大分子である AtaA は一部が天然変性状態であり、そこが非特異的で高い接着性を示すのではないかという仮説もあったが、これは完全に否定された。筆者らは、AtaA ファイバーの根元に近い CheadCstalk と名付けたドメイン領域の結晶構造を決定した(図3)¹⁴⁾。この部分は直接の接着部位ではないが、AtaA ファイバーが強靱性と柔軟性を兼ね備えた構造を

有していることが明らかとなり、これが **AtaA** の高い接着性に重要であると考えられる。上述のとおり変性しにくい特性も、結晶構造を見ると頷ける。

4. **AtaA** による *Acinetobacter* sp. Tol 5 の 付着・凝集過程

筆者らはフローセルを自作し、層流中における Tol 5 細胞の挙動と付着の様子を詳細に解析した。解析を容易にするため、実験は休止菌体を用いて行うことで、増殖の影響を排除した。その結果、Tol 5 の付着は、一つ一つの細胞が表面に付着するというよりは、まず凝集塊を形成し、それらが付着する方が主流であることがわかった¹⁵⁾。付着した凝集塊の後方には双子渦が生じ、それに

よって小さな凝集塊がここに運ばれて凝集付着することにより、表面上の凝集塊は後方に向かって成長する(図4)。剪断応力により、凝集塊の形状は線状に発達し、バイオフィーム様構造を形成する。なお、この付着には重力が関与し、フローセルの上面には凝集塊の付着はほとんど観察されなかった。また、*ataA* 遺伝子欠損株は凝集が見られなくなり、表面に細胞が単層付着することがわかった。すなわち、**AtaA** による凝集塊形成能力こそ、Tol 5 細胞の付着とバイオフィーム様構造形成の主因であることが明確になった。

5. 唯一無二の着脱可能な微生物固定化技術

筆者らは、*ataA* 遺伝子を Tol 5 とは異種の細菌に導入・

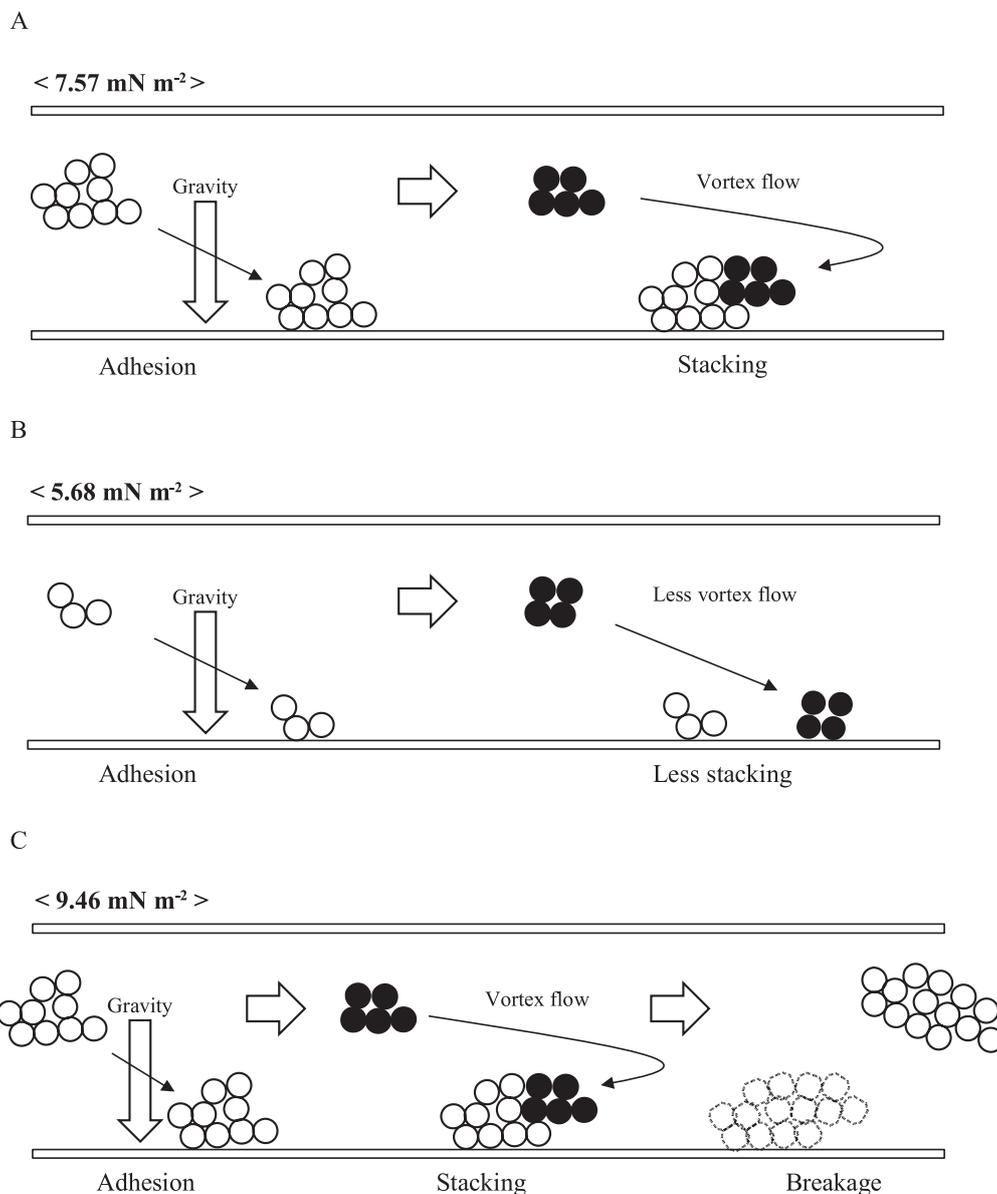


図4. 層流条件下での Tol 5 細胞塊の挙動。(A) 7.57 mN m^{-2} のような適切な剪断応力下で、細胞塊は重力の影響を受けて底面に付着し、固定され、そして双子渦によって後方へ運ばれる細胞塊が積み重なることによって、発達する。(B) 低い剪断応力下では、流動下の細胞は小さな細胞塊を形成するが、双子渦が存在しないために、細胞塊が発達することはほとんどない。(C) 高い剪断応力下では、固定化された細胞塊は適切な剪断応力下で成長するが、細胞塊は最終的には高い剪断応力によって破壊される。(出典元：参考文献 15)

発現させ、AtaA ナノファイバーを細胞表層に形成させることで、有用なグラム陰性細菌を任意の担体の表面に直接固定化する、迅速で簡便な微生物固定化技術を創出することに成功した¹⁶⁾。細菌は、休止菌体状態でも増殖させながらも固定化することができる。AtaA の非特異的接着性により、好みの担体を使用可能である。ポリウレタン製スポンジ、ガラスウール、スチールウール、セルロース繊維（ヘチマ）などで実証済みである（図5）¹⁷⁾。固定化により単位体積当たりの細胞濃度を高めることができ（図6）、それは担体の比表面積とパッキング効率で決まる。例えば、ガラスウールを使って、乾燥菌体重量で 100 g/L 以上の細胞濃度を達成している。

具体的な応用事例を示すため、筆者らは同じ *Acinetobacter* 属細菌ではあるが、青色色素インディゴを生産する能力を有するフェノール分解菌 ST-550 に *ataA* 遺伝子を導入、発現させ、ポリウレタン製スポンジに固定した¹⁸⁾。基質インドールを含むリン酸緩衝液にこのスポンジを入れるだけで色素が生産された。さらに、この新規で有効な固定化は、プロセス操作の簡便化に加えて、毒性基質に対する耐性の向上効果をもたらした。バイオフィーム中の微生物細胞は、懸濁状態に比べて、抗生物質やストレスに対して高い耐性を示すことが知られている。基質に対する耐性が向上したことで、基質の濃度を上げることができるようになったため、反応効率が飛躍的に向上した。AtaA による新規微生物固定化法は、これまで主流であった包括固定法の欠点である物質輸送・ゲルの脆弱性・細胞の漏出・固定化操作の煩雑性といった諸問題を一気に解決した。AtaA によって固定化した細胞は連続反応や反復反応に使用可能である。筆者らは、水素生産菌である *Enterobacter aerogenes* に *ataA* 遺伝子を導入、発現させ、バイオ水素を連続生産させることにも成功している¹⁹⁾。これは、*ataA* 遺伝子を *Acinetobacter* 属以外の細菌にも適用した初めての事例ともなった。

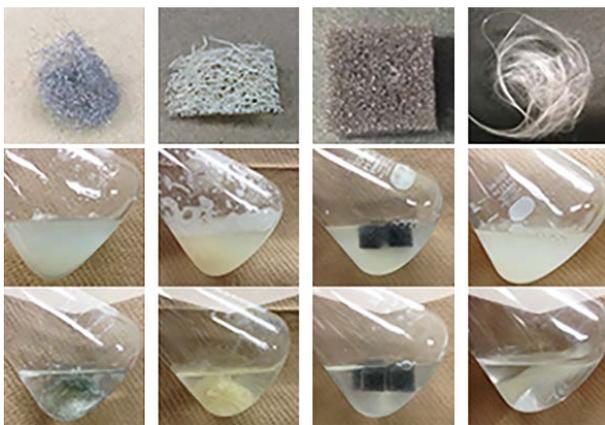


図5. *ataA* 遺伝子の導入発現による *Acinetobacter baylii* ADP1 の固定化。左からスチールウール、ヘチマ、ポリウレタンフォーム、ガラスウール担体に、休止菌体状態の ADP1 形質転換体を固定した。写真上段：バージン担体、中段：ADP1 株ベクターコントロール、下段：*ataA* 遺伝子を誘導発現させた ADP1 形質転換体の培養液は懸濁細胞で濁っている。*ataA* 遺伝子を誘導発現させると微生物は担体に固定され、細胞懸濁液が透明になり、担体も鮮明に見えるようになる。

上述の酵素刈取り法により分離した AtaA の PSD を使い、筆者らは、AtaA 分子の接着性がイオン強度の極度の低下（10 mM 以下）により急激に低下し、純水中では付着性を完全に失うという事実を発見した²⁰⁾。同様な現象は、Tol 5 細胞など AtaA により付着する微生物細胞にも見られた。さらに、一度、AtaA により材料表面に固定した微生物細胞を、純水で洗浄すると剥離可能であること、剥離した細胞は、塩溶液中で再固定可能であることも見出した。この現象を利用して、筆者らは世界で初めて、着脱可能な微生物固定化技術の発明に至った²¹⁾。これにより、担体と微生物細胞の両方の再利用が可能である。既に我々は、その具体的な実施モデルを発表している（図7）。従来の固定化法では、着脱可能な微生物固定は不可能である。

6. オン・ファイバーディスプレイ

細胞表層提示技術は、提示したいペプチドやタンパク質を、細胞表層への輸送と固定を担うアンカータンパク質に遺伝子レベルで融合することで、プラットフォームとなる微生物細胞の表層に機能分子を提示するものである。アーミング酵母とも呼ばれる真核細胞の酵母を使ったシステム²²⁾ から原核細胞のバクテリアを使ったシステムまで、提示に使われる細胞は幅広いが、基本的な方法論は同じである。細胞表層提示においては、提示分子の細胞表層からの距離は、LPS やピリなどの固有の細胞表層構造や表面電位などから受ける干渉のため、その機能に影響すると考えられる。しかし、その影響を明確に示す報告はなかった。筆者らは、AtaA のナノファイバー上に機能性分子を提示する“オン・ファイバーディスプレイ”

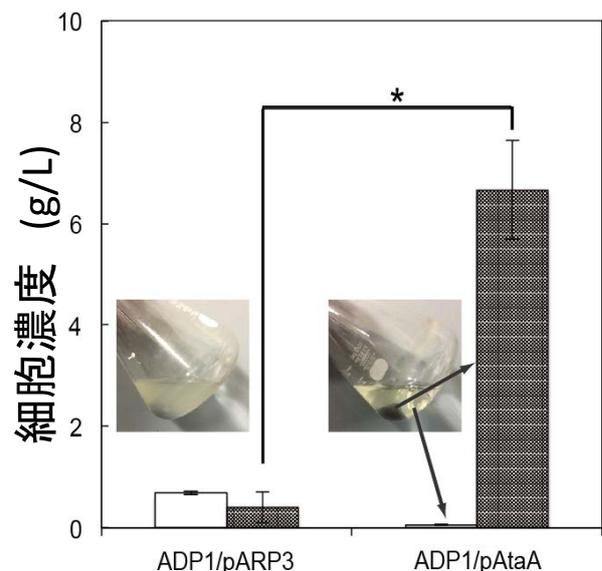


図6. 増殖菌体状態の *Acinetobacter baylii* ADP1 形質転換体の固定化。20 mL の培地を含む三角フラスコに 1 cm 角のポリウレタンフォーム担体一つ投入し、ADP1 形質転換体を植菌した。24 時間、*ataA* の発現を誘導しながら培養し、菌体を増殖させながら固定を行った。培養後、固定化菌体と懸濁菌体の細胞濃度を乾燥菌体重量測定により求めた。グラフには 3 回の独立した培養により得られたデータの平均値と標準誤差が示してある。*P<0.01（出典元：参考文献 17）

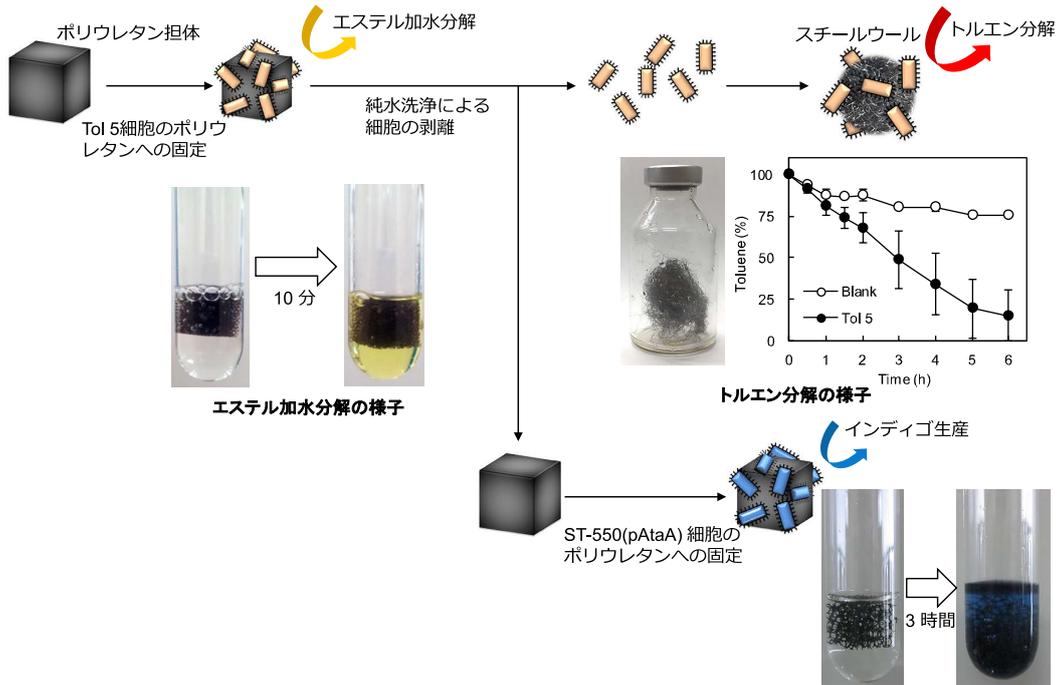


図7. 着脱可能固定化技術による担体と微生物の再利用。

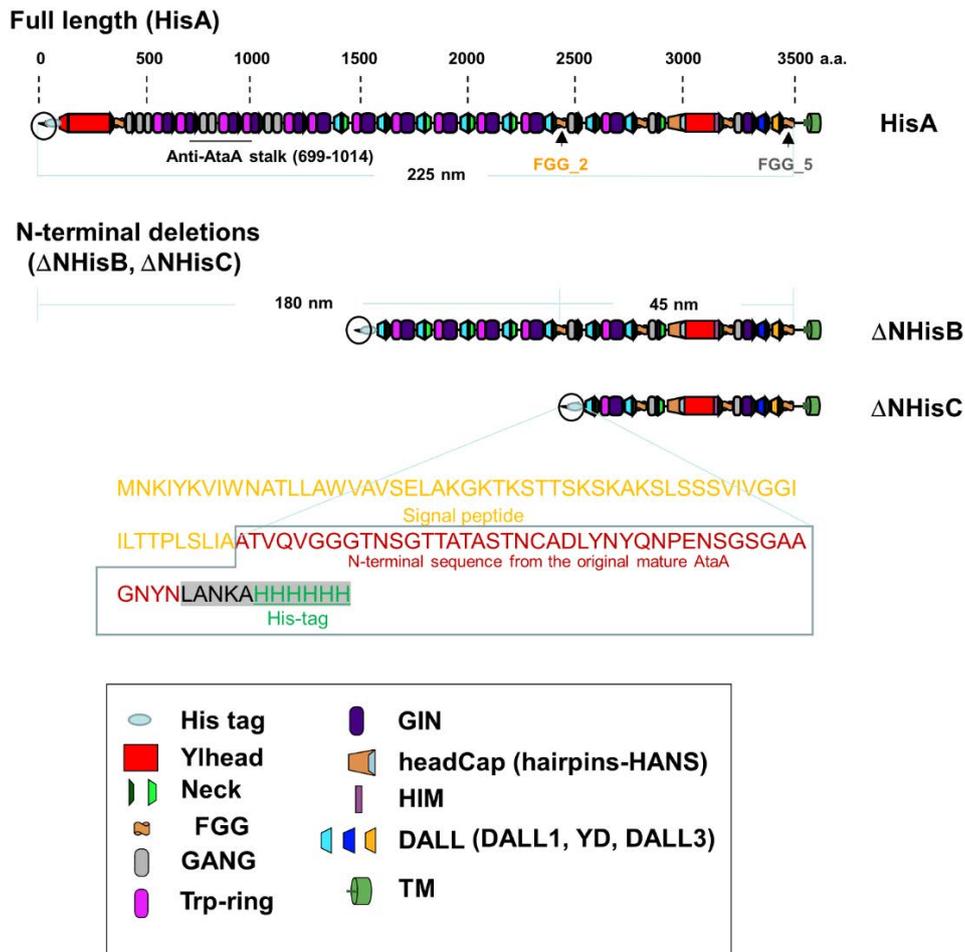


図8. His タグ融合 AtaA ファイバーの設計。His タグ融合 AtaA 全長 (HisA) および 2 つの His タグ融合 N 末端欠失 AtaA 誘導体 (ΔNHisB および ΔNHisC) の模式図。未成熟 AtaA のシグナルペプチド, 成熟 AtaA の N 末端領域, および挿入した SfiI/His タグの アミノ酸を含む融合タンパク質先端のアミノ酸配列も記載した。抗 AtaA ストック抗体のエピトープはバーで示されている。2 番目と 5 番目の FGG モチーフは, それぞれ「FGG_2」と「FGG_5」として表示されている。(出典元: 参考文献 23)

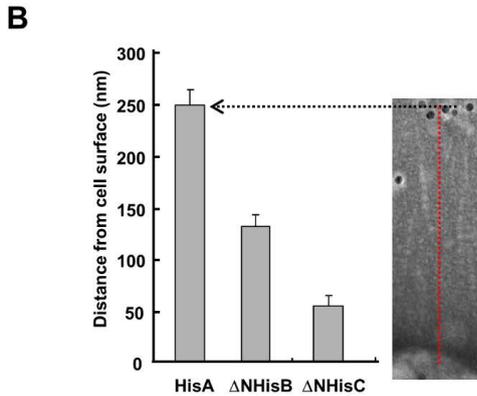
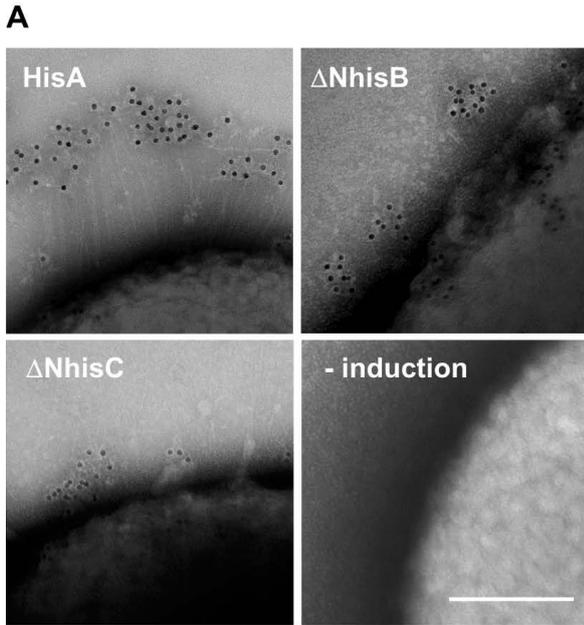


図9. His タグ融合 AtaA 誘導体を発現する *Acinetobacter* sp. Tol 5 形質転換体の免疫電子顕微鏡写真。(A) HisA, ΔNHisB および ΔNHisC を発現する形質転換体のネガティブ染色 TEM 画像。His タグをモノクローナル一次抗体および金コロイド結合二次抗体で標識した。写真中のバー: 200 nm (B) 細胞表面と金コロイドとの間の距離を画像から測定し、棒グラフで表した。データは 20 本の繊維の平均長±標準誤差。(出典元: 参考文献 23)

レイ”と名付けた方法を開発した^{23,24)}。これは、機能分子と細胞表層との距離が可変な世界初の細胞表層提示システムである。

AtaA のドメイン構造に基づき、N 末端側から削った短縮 AtaA ファイバーを設計し、タンパク質ファイバー先端付近にモデル機能分子として His タグを挿入した(図 8)。その結果、Tol 5 細胞上と大腸菌細胞上に His タグを、表層から約 50~250 nm の異なる距離で提示することに成功した(図 9)。His タグによるニッケルセファロースビーズへの結合能は細胞表層からの距離に依存し、微生物細胞によって異なるが、ある距離以上離れたと機能が有意に高まることが明らかとなった(図 10)。細胞から離れた位置に分子を提示することで、微生物細胞の種類によって異なる表層構造などによる障害を回避することができる。

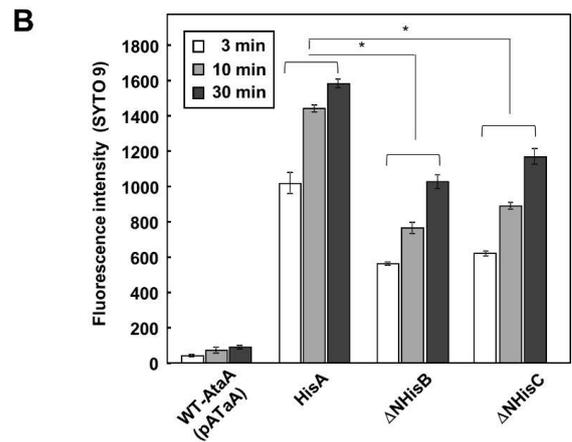
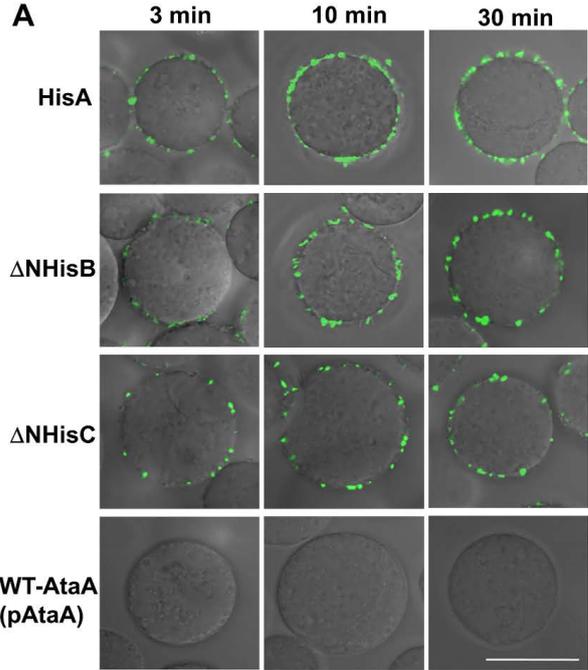


図 10. His タグ融合 AtaA 誘導体を発現する大腸菌形質転換体の Ni-セファロースビーズへの結合。大腸菌細胞を SYTO 9 で染色し、LB 培地中で Ni-セファロースビーズと共に 3, 10, および 30 分間インキュベートした。(A) 細胞と会合したビーズの CLSM。バー: 30 μm (B) マイクロプレートリーダーを用いて測定した細胞結合ビーズの蛍光強度。データは、3 回の独立した測定から得られた平均値±標準誤差を示す。(出典元: 参考文献 23)

7. おわりに

AtaA を利用する微生物固定化法は、2 項で述べた従来の微生物固定化法の欠点を全て克服する画期的な新規固定化法である。しかも、世界唯一の反復着脱可能な固定化法であり、夢の微生物固定化法といっても過言ではない。固定化プロセスも迅速で簡便であり、微生物プロセスに革新をもたらすであろう。今後、様々な微生物に適用され、微生物細胞を使った化学反応プロセスの普及に大きく貢献することを、新固定化法の発明者として願っている。また、AtaA をアンカーとして利用するオン・ファイバーディスプレイも、機能性分子の細胞からの提示距離を可変的に設計可能とする画期的な技術であ

り、より効果的な細胞表面提示技術として様々なバイオプロセスへの応用が期待される。どちらも、微生物細胞の表面に AtaA ファイバーを生やすという意味では同じであり、AtaA ファイバーあるいはその短縮体をそのまま表面に分泌提示するか、機能性分子と融合して提示するかの違いである。しかし、後者には、精密な融合タンパク質の設計が必要であり、融合分子がファイバーの分泌を妨げる可能性もある。また、どちらも、いかに有効に細胞表面に輸送させフォールディングさせるかがポイントであり、グラム陰性細菌の外膜タンパク質の分泌メカニズムについてのさらなる知見の蓄積が、AtaA 利用技術の汎用化には欠かせない。

文 献

- 1) Nakatani, H. and K. Hori. 2017. Cell surface protein engineering for high-performance whole-cell catalysts. *Front. Chem. Sci. Eng.* 11: 46–57.
- 2) Junter, G.A. and T. Jouenne. 2004. Immobilized viable microbial cells: From the process to the proteome—or the cart before the horse. *Biotechnol. Adv.* 22: 633–658.
- 3) Gross, R., B. Hauer, K. Otto, and A. Schmid. 2007. Microbial biofilms: New catalysts for maximizing productivity of long term biotransformations. *Biotechnol. Bioeng.* 98: 1123–1134.
- 4) Cheng, K.-C., A. Demirci, and J.M. Catchmark. 2011. Continuous pullulan fermentation in a biofilm reactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 90: 921–927.
- 5) Li, X.Z., B. Hauer, and B. Rosche. 2007. Single-species microbial biofilm screening for industrial applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76: 1255–1262.
- 6) Rosche, B., X.Z. Li, B. Hauer, A. Schmid, and K. Buehler. 2009. Microbial biofilms: A concept for industrial catalysis? *Trends Biotechnol.* 27: 636–643.
- 7) Halan, B., K. Buehler, and A. Schmid. 2012. Biofilms as living catalysts in continuous chemical syntheses. *Trends Biotechnol.* 30: 453–465.
- 8) 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.
- 9) Ishikawa, M., K. Shigemori, A. Suzuki, and K. Hori. 2012. Evaluation of adhesiveness of *Acinetobacter* sp. Tol5 to abiotic surfaces. *J. Biosci. Bioeng.* 113: 719–725.
- 10) Ishikawa, M., H. Nakatani, and K. Hori. 2012. AtaA, a new member of the trimeric autotransporter adhesins from *Acinetobacter* sp. Tol 5 mediating high adhesiveness to various abiotic surfaces. *PLoS ONE.* 7: e48830.
- 11) Linke, D., T. Riess, I.B. Autenrieth, A. Lupas, and V.A. Kempf. 2006. Trimeric autotransporter adhesins: Variable structure, common function. *Trends Microbiol.* 14: 264–270.
- 12) Ishikawa, M., S. Yoshimoto, A. Hayashi, J. Kanie, and K. Hori. 2016. Discovery of a novel periplasmic protein that forms a complex with a trimeric autotransporter adhesin and peptidoglycan. *Mol. Microbiol.* 101(3): 394–410.
- 13) Yoshimoto, S., H. Nakatani, K. Iwasaki, and K. Hori. 2016. An *Acinetobacter* trimeric autotransporter adhesin reaped from cells exhibits its nonspecific stickiness via a highly stable 3D structure. *Sci. Rep.* 6: 28020.
- 14) Koiwai, K., M.D. Hartmann, D. Linke, A.N. Lupas, and K. Hori. 2016. Structural basis for toughness and flexibility in the C-terminal passenger domain of an *Acinetobacter* trimeric autotransporter adhesin. *J. Biol. Chem.* 291: 3705–3724.
- 15) Furuichi, Y., K. Iwasaki, and K. Hori. 2018. Cell behavior of the highly sticky bacterium *Acinetobacter* sp. Tol 5 during adhesion in laminar flows. *Sci. Rep.* 8: 8285.
- 16) 微生物に対して非特異的付着性及び凝集性を付与または増強する方法及び遺伝子, 特許第 5261775 号.
- 17) Hori, K., Y. Ohara, M. Ishikawa, and H. Nakatani. 2015. Effectiveness of direct immobilization of bacterial cells onto material surfaces using the bacterionanofiber protein AtaA. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99: 5025–5032.
- 18) Ishikawa, M., K. Shigemori, and K. Hori. 2014. Application of the adhesive bacterionanofiber AtaA to a novel microbial immobilization method for the production of indigo as a model chemical. *Biotechnol. Bioeng.* 111: 16–24.
- 19) Nakatani, H., N. Ding, Y. Ohara, and K. Hori. 2018. Immobilization of *Enterobacter aerogenes* by a trimeric autotransporter adhesin, AtaA, and its application to biohydrogen production. *Catalysts.* 8: 159.
- 20) Yoshimoto, S., Y. Ohara, H. Nakatani, and K. Hori. 2017. Reversible bacterial immobilization based on the salt-dependent adhesion of the bacterionanofiber protein AtaA. *Microb. Cell Factories.* 16: 123.
- 21) 微生物の固定化及び脱離方法, 特願 2015-508308.
- 22) Ueda, M. and A. Tanaka. 2000. Cell surface engineering of yeast: Construction of arming yeast with biocatalyst. *J. Biosci. Bioeng.* 90(2): 125–136.
- 23) Nakatani, H., J. Kanie, and K. Hori. 2019. On-fiber display of a functional peptide at sites distant from the cell surface using a long bacterionanofiber of a trimeric autotransporter adhesin. *Biotechnol. Bioeng.* 116: 239–249.
- 24) 被毛微生物, 特願 2015-534325.