



Title	D-タガトースの口腔プレバイオティクスへの応用に向けた基礎的研究
Author(s)	眞弓, 昌大
Citation	大阪大学, 2022, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/87967
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

学位論文

D-タガトースの口腔プレバイオティクスへの応用に向けた
基礎的研究

大阪大学大学院歯学研究科

口腔科学専攻 口腔分子免疫制御学講座

予防歯科学分野

眞弓 昌大

要約

近年の研究では、典型的な口腔内常在菌である *Streptococcus oralis*, う蝕の原因菌である *Streptococcus mutans*, 歯周病原性細菌叢形成時に“accessory pathogen”として機能する *Streptococcus gordonii* などの口腔レンサ球菌群の表現型や代謝における不均一性が報告されている。本研究では、口腔内の衛生状態が良好な人に特徴的な唾液中の代謝物として D-タガトースに注目し、上述 3 菌種の表現型、遺伝子発現、代謝プロファイルに及ぼす影響を調べた。

全身的に健康なボランティア 18 名の唾液メタボロームを測定した結果、唾液中の D-タガトース濃度は歯面のバイオフィルム量と逆相関していることを確認した後 (Spearman's 相関係数: $r = -0.603$, $p = 0.008$)、D-タガトースの口腔レンサ球菌への影響を *in vitro* で分析した。0.8% D-タガトースを唯一の糖質源とする化学成分既知培地では、*S. mutans* と *S. gordonii* はそれぞれごくわずかなバイオフィルムの形成しか示さなかったが、*S. oralis* の培養では有意なバイオフィルムが形成された。さらに、0.2% D-グルコースの存在下でも、*S. mutans* と *S. gordonii* は、D-タガトース濃度依存的に増殖抑制と最終生菌数の減少を示した一方で、*S. oralis* の増殖に対する D-タガトースの阻害効果は認められなかった。D-タガトースによる菌種特異的な阻害作用を調べるために、5% D-タガトースで処理した *S. mutans*, *S. gordonii*, *S. oralis* 菌体のトランスクリプトームおよびメタボローム解析を実施した。その結果、*S. mutans* と *S. gordonii* のみ、フルクトース特異的ホスホトランスフェラーゼを介した D-タガトースの取込みが示唆され、分岐鎖アミノ酸やアラニンといったピルビン酸由来のアミノ酸が D-タガトースの存在下で減少する傾向にあった。この現象は、D-タガトースの取込み機構の違いに端を発した、解糖系とその下流の代謝の攪乱により、これらの細菌の生育を阻害することを示唆している。

結論として、本研究は、D-タガトースが口腔内の衛生状態が良好な人の唾液に豊富に含まれていることを示し、さらに、D-タガトースは口腔内の病原菌である *S. mutans* や“accessory pathogen”である *S. gordonii* の生育を選択的に阻害することが実験的に示された。一方、口腔常在菌である *S. oralis* への影響は限定的であったことから、D-タガトースを口腔プレバイオティクスとして投与することで、対象となる口腔レンサ球菌の代謝を阻害する可能性が示された。

緒言

う蝕や歯周病は歯を失う主たる要因であるのみならず、全身的な健康状態にも影響を及ぼす日和見感染症的な疾患である^{1,2,3)}。これらの疾患はコッホの原則に従い単一の微生物により引き起こされるものではなく、歯質に付着したバイオフィルムが“symbiosis”から“dysbiosis”へと遷移することにより発症する⁴⁾。このような共生細菌叢の変化は細菌叢の経時的な成熟と関連している⁵⁾。歯周病原性細菌叢の形成過程では、歯質表面の唾液ペリクルに、口腔レンサ球菌に代表される初期定着菌が付着し、続いて中期定着菌である *Fusobacterium nucleatum* や歯周病原菌である *Porphyromonas gingivalis* などが順次参画する⁶⁾。初期定着菌である *Streptococcus gordonii* は歯周病原性を有さないものの、環境中に放出する代謝物を介した *F. nucleatum* や *P. gingivalis* との共生関係により歯周病の進行を扶助する“accessory pathogen”として注目されている^{7,8,9)}。一方、う蝕病原性細菌叢の形成時には、生活習慣や発酵性糖質を頻回に摂取する食習慣など複数の要因により、経時的に *Streptococcus mutans* に代表されるう蝕病原菌が数的優位になる^{10,11)}。上述のように、いずれの場合においても、初期定着菌である口腔レンサ球菌群が重要な役割を果たしている。

最近の研究では、典型的な口腔常在菌である *Streptococcus oralis*、う蝕病原菌である *S. mutans*、歯周病原性細菌叢形成時に“accessory pathogen”として機能する *S. gordonii* など、口腔レンサ球菌群での近縁種間においても表現型や代謝能の不均一性が報告されている^{12,13,14)}。また、これらの口腔レンサ球菌群の間には競合関係があることも報告されている。例えば、*S. mutans* はバクテリオシンである mutacin を産生して *S. gordonii* の成育を阻害し、*S. gordonii* はバクテリオシンである challisin を産生して mutacin の産生を阻害する¹⁵⁾。また、*S. mutans* は高い耐酸性能を有するため、他種の酸感受性を示す口腔レンサ球菌と比して、低い pH 環境において生存に有利である¹⁵⁾。その一方で、*S. mutans* は H_2O_2 には感受性を示し、高い H_2O_2 産生能を有す *S. oralis* によりその生育が阻害されることが報告されている^{16,17)}。

口腔の健康を維持するうえで、これらの菌を制御できることが望ましいと考えられるが、その方法は十分には確立されていない。口腔レンサ球菌群において、解糖系はエネルギー獲得のための重要な代謝経路であり、それに付随する有機酸の産生によりう蝕が生ずる。そのため、菌による解糖系を介した代謝を受けない糖アルコールであるキシリトールは、う蝕予防甘味料として広く利用されてきた^{18,19,20)}。しかし、キシリトールによる予防効果は同時に他の単糖類を含む場合に抑制され²¹⁾、また消化管障害を引き起こす副作用²²⁾から一回使用量が制限される。

キシリトールとともに、自然界におけるその希少性から希少糖と称される糖質のひとつとして、D-タガトースが知られている。D-タガトースは $C_6H_{12}O_6$ の化学式で表される六炭糖のケトースであり、D-フルクトースの4位エピマーである。そのD-フルクトースと

の空間的な構造の違いにより、小腸での吸収不良を起こしていると考えられており、カロリーおよび血糖上昇効果がスクロースと比して低く呈される^{23,24,25,26)}。また、ブタを用いた実験により、腸内細菌叢、特に盲腸及び大腸の細菌叢のメタボロームに影響を与え、酪酸や吉草酸といった短鎖脂肪酸の増加を引き起こすことが報告されている²⁷⁾。さらに他分野では、農作物への被害で広く知られている *Phytophthora* spp. において菌種選択的な抑制効果を示している^{28,29)}。これらの知見から、D-タガトースは、糖尿病の管理や農業、腸内細菌叢へのプレバイオティクスなど、さまざまな場面での応用が期待されている。一方で口腔領域においては、*S. mutans* への抑制効果は報告されている^{30,31)}ものの、他菌種への影響を検討した報告はほとんどない。さらに、メタボロミクスやトランスクリプトミクスを用いた、D-タガトースによって誘発される口腔内細菌の動的变化を網羅的に解析した研究は未だない。

本研究では、ヒトの唾液サンプルを用いたメタボロームデータの解析により、D-タガトースと口腔衛生状態との相関を明らかにし、さらに、口腔レンサ球菌群 *S. mutans*, *S. gordonii*, *S. oralis* を用いた *in vitro* 実験によって D-タガトースによる各細菌種の表現型およびトランスクリプトーム、メタボロームの変動を検討した。

材料および方法

1. 唾液メタボローム解析

本研究のデータは、以前に我々が採取したデータ³²⁾を MS-DIAL version 3.90³³⁾を用いて再解析することにより得られた。この臨床研究は大阪大学研究倫理審査委員会の承認を得て、2013 年から 2014 年にかけてヘルシンキ宣言の原則および STROBE ガイドラインに基づき、ヒトを対象として実施された。参加者 19 名から書面によるインフォームドコンセントを得た。各被験者には介入を受ける前の少なくとも 1 時間は飲食や口腔清掃を控えるよう求めた。その後、免許を有する 5 名の歯科医師が 1 歯につき 4 歯面（唇頬側面・口蓋舌側面・近心面・遠心面）のプラーク蓄積量を Silness & Loe のプラークインデックス (plaque index; PII) の評価基準に則りスコア 0, 1, 2, 3 の 4 段階で評価し、1 歯ごとの合計値を算出し、全歯の平均値を修正プラーク指数 (modified plaque index: mPII)³⁴⁾と定義した。被験者 1 名から mPII が得られなかったため、18 名の被験者から氷上に置かれた 50 mL 遠沈管 (Corning, Corning, NY, USA) に 10 分間かけて安静時唾液を採取した。その後、18 サンプルを液体窒素で凍結し、分析まで -80°C で保存した。メタボロームデータはガスクロマトグラフ質量分析計 [Gas Chromatography - Mass spectrometry (GC/MS), GCMS-QP2010 Ultra; 島津製作所, 京都) を用いて取得した。

2. 供試菌株と培養条件

本研究で使用した菌株を表 1 に示す. すべての菌株は 37°C 好気条件下で Brain Heart Infusion (BHI ; Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) もしくは, 化学成分既知培地 (chemically defined medium: CDM) ³⁵⁾を用いて静置培養した. CDM は 58 mM K₂HPO₄, 15 mM KH₂PO₄, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 35 mM NaCl, 0.2% カザミノ酸, 100 mM MnCl₂ · 4H₂O で構成された基礎培地にフィルター滅菌したビタミン群 (0.04 mM ニコチン酸, 0.1 mM ピリドキシン塩酸塩, 0.01 mM パントテン酸, 1 mM リボフラビン, 0.3 mM チアミン塩酸塩, 0.05 mM D-ビオチン) およびアミノ酸群 (4 mM L-グルタミン酸, 1 mM L-アルギニン塩酸塩, 1.3 mM L-システイン塩酸塩, 0.1 mM L-トリプトファン), 2 mM MgSO₄ · 7H₂O を添加して作製した.

3. バイオフィーム形成実験用無菌唾液の調製

バイオフィーム形成実験用無菌唾液は, Kuboniwa らの方法 ³⁶⁾に基づいて調製した. 6 名の健康なドナーから氷上の滅菌された遠沈管に唾液を採取後, 氷冷したビーカー中で混合した. 次に, ジチオスレイトール (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA) を最終濃度 2.5 mM となるように添加し, 氷上で 10 分間穏やかに攪拌した. その後, 4°C, 3,000×g の条件で 20 分間遠心分離を行い, デカンテーションにて回収した上清に 4 倍量になるよう蒸留水を加え, ポアサイズ 0.20 mm のフィルターで濾過し, -30°C で保存した. 使用する直前に 37°C で解凍後, 沈殿物が生じた場合, 遠心分離 (1,430×g, 4°C, 5 分) によりペレット化し, 上清成分を実験に使用した.

4. バイオフィーム形成実験

対数増殖期後期に達した *S. oralis* ATCC9811 株, *S. mutans* OMZ175 株 および UA159 株, *S. gordonii* Challis DL1 株を遠心分離 (7,670×g, 4°C, 7 分) にて集菌した. 回収した菌体 (10⁸ cfu) を 15 μg/ml ヘキシジウムイオダイド [hexidium iodide (HI) ; Molecular Probes, Carlsbad, CA, USA] 溶液で染色し, 0.8% D-グルコース, 0.8% スクロース, および 0.8% D-タガトースのいずれかを添加, もしくはいずれも含まない CDM で懸濁し, 各チャンバー内面に唾液コートを行った 8-well LAB-TEK Chamber Slide System (Nalge Nunc International, Naperville, IL, USA) 上に播種後, 37°C, 24 時間, 好気条件下で静置培養した. 各チャンバーの底面に形成されたバイオフィームは, 共焦点レーザー顕微鏡 [Confocal laser scanning microscopy (CLSM), SP8 ; Leica Microsystem, Wetzlar, Germany] を用いて, 励起波長 543 nm ヘリウムネオンレーザー, 40 倍油浸対物レンズの条件下で観察した. 各チャンバー内の無作為 10 視野を撮影し, Imaris Software Ver. 7.0.1 (Bitplane AG, Zurich, Switzerland) を用いて, 形成されたバイオフィームを定量した. 値は 3 回繰り返された実験の代表的な結果を示した.

5. 増殖実験

S. oralis ATCC9811 株, *S. mutans* OMZ175 株および UA159 株, *S. gordonii* Challis DL1 株を用いて, 0.1%, 0.5%, 1%, 5%, 10% の濃度で D-タガトースを添加した BHI もしくは D-タガトース非添加の BHI 中で 37°C 好気条件下にて静置培養した. 同様に, 0.2% D-グルコースを含む CDM に 1%, 5% の濃度で D-タガトースを添加もしくは非添加の培地を調製し, 培養を行った. いずれも, 培養開始から経時的に各培養液の光学密度 (optical density: OD) を紫外可視分光光度計 (UV-1600; 島津製作所, 京都) を用いて測定した.

次に, プラントニックな状態の *S. oralis*, *S. mutans*, *S. gordonii* が D-タガトースを増殖に利用できるか検討するため, 0.8% D-グルコース, 0.8% D-タガトースのいずれかもしくはいずれも含有しない CDM で 37°C, 好気条件下で静置培養を行った.

いずれも, 3 回の実験の平均値 $\pm$ S.D. として表した.

6. 生菌数評価実験

S. oralis ATCC9811 株, *S. mutans* OMZ175 株および UA159 株, *S. gordonii* Challis DL1 株を用い, 0.2% D-グルコースを含む CDM に 1%, 5% の濃度で D-タガトースを添加もしくは非添加で, 37°C, 好気条件下で 48 時間静置培養した. 培養後, LIVE/DEAD[®] BacLight[™] Bacterial Viability Kit (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) を用いて染色した. 染色後の菌体をマルチラベルカウンター (Wallac 1420 ARVO MX; Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) を用いて励起波長 485 nm で発光させ, 波長 535 nm で生菌数を測定した ($n = 4$). 生菌数は検量線に基づき算出した.

7. 菌体外多糖 (Extracellular Polysaccharide: EPS) 産生量評価実験

S. mutans OMZ175 株を 0.2% D-グルコースを含む CDM に 1%, 5% の濃度で D-タガトースを添加もしくは非添加で 37°C, 好気条件下で 48 時間静置培養した. その後, 遠心分離 (7,670 $\times$ g, 4°C, 7 分) にて集菌し, 0.15 M 塩化ナトリウムを含む 10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (phosphate-buffered saline: PBS) で洗浄後, コンカナバリニン A (concanavalin A: con A) および小麦胚芽凝集素 (wheat germ agglutinin: WGA) を用いて EPS を染色し, HI を用いて菌体を染色した. 染色後, 菌体を PBS で洗浄し, OD₆₀₀ = 4.0 となるように調整後, スライドガラスに 30 μ L 滴下し, CLSM にて観察した. 各サンプルにつき無作為で 10 視野撮影し, Imaris Software Ver. 7.0.1 を用いた 3D 画像解析により, 菌体および EPS の定量を行なった. 値は 3 回繰り返された実験の代表的な結果を示した.

8. 菌体内メタボローム解析

対数増殖期に達した *S. oralis* ATCC9811 株, *S. mutans* UA159 株, および *S. gordonii* Challis DL1 株の菌体を遠心分離 (7,670 $\times$ g, 4°C, 7 分) にてそれぞれ集菌し, PBS で洗

浄した。その後、5% D-タガトース添加もしくは非添加の 0.2% D-グルコースを含む CDM にて OD₆₀₀ が 0.8 となるように再懸濁し、37°C、3 時間、好気条件下にて静置培養を行った。培養後、遠心分離 (7,670×g, 4°C, 7 分) にて集菌し、1ml の超純水で洗浄後、直ちに液体窒素で凍結した。さらに凍結乾燥機で乾固させたサンプルに内部標準としてリビトールを加え、タンパク質除去のためにアセトニトリル 1.3 mL を添加し、十分に混合させた。その後、遠心分離 (20,630×g, 4°C, 3 分) を行い、上清成分 1.6 mL を回収し、遠心濃縮機 (440×g, 室温, 120 分) で蒸発させ、凍結乾燥機を用いて乾固させた。十分に乾固させたのち、20 mg/mL メトキシアミン塩酸塩を含むピリジンを 100 μL 添加し、よく混和させた。次に、誘導体化剤として N-メチル-N-トリメチルシリルトリフルオロアセトアミド [N-methyl-N-trimethylsilyltrifluoroacetamide (MSTFA), Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA] 50 μL を添加し、さらに十分混和させ、遠心操作 (15,490×g, 25°C, 3 分) により上清成分 50 μL をバイアルに回収し、測定に用いた。抽出された代謝物の測定はガスクロマトグラフ・タンデム質量分析計 (GC-MS/MS-TQ8040; 島津製作所, 京都) によって行い、得られたデータは ABF converter (<https://www.reifycs.com/AbfConverter/index.html>) および MS-DIAL ver. 4.60 (http://prime.psc.riken.jp/Metabolomics_Software/MSDIAL/index.html) を用いて解析を行った (n = 4)。

9. RNA 抽出およびシーケンス

対数増殖期に達した *S. oralis* ATCC9811 株, *S. mutans* UA159 株, および *S. gordonii* Challis DL1 株をメタボローム解析と同条件で 30 分間培養を行い、遠心分離 (7,670×g, 4°C, 7 分) にて集菌し、直ちに凍結させた。次に、サンプル内にジルコニアビーズを添加し、卓上型多検体細胞破碎装置 (ShakeMaster NEO; バイオメディカルサイエンス, 東京) を用いて 1,500 rpm, 4°C, 5 分間の条件下で細胞壁を破碎した。破碎後, TRIzol (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) および RNeasy kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて全 RNA を抽出した。得られた RNA サンプルは超微量分光光度計 (Nanodrop 1000; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用いた濃度測定, アガロースゲル電気泳動および BioAnalyzer の結果に基づき、分解の程度を判定した。分解が進んでいないことが確認された RNA サンプルは、株式会社 Rhelixa により、cDNA に逆転写後、シーケンスライブラリーの構築に使用され、Illumina NovaSeq 6000 を用いてシーケンシングが行われた (n = 3)。

10. 統計解析

対比較には両側 *t* 検定を用いた。多群比較は、一元配置分散分析を行った後、Dunnett の多重検定を用いて実施した。これらの統計解析は、SPSS ver. 26 (日本 IBM, 東京) を用いて行い、*p* 値 = 0.05 を有意水準とした。主成分分析には SIMCA ver. 17 (Umetrics,

Umeå, Sweden) を用いた。Metabolite set enrichment analysis (MSEA) は、Sakanaka らの方法³⁴⁾に準じて実施した。発現変動遺伝子 (Differentially expressed genes: DEGs) の抽出には R-Bioconductor package である edgeR を用いた。得られた DEGs に基づいた遺伝子オントロジー (Gene ontology: GO) 解析は the Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) を用いて行った。

結果

1. 唾液メタボローム再解析

我々の以前の臨床研究データ³²⁾を基に、新しい解析ソフト MS-DIAL を用いて再解析を行ったところ、D-タガトースを含めた 114 物質が唾液中の代謝物として同定された。さらに口腔衛生状態の指標である mPII が得られた 18 名の被験者のメタボロームデータから、mPII と D-タガトースとの相関性を評価した。その結果、D-タガトースは有意に mPII と負の相関を示した (Spearman's 相関係数; $r = -0.603$, $p = 0.008$; 図 1)。このことから、D-タガトースがプラークの菌質表面への蓄積を抑制し、良好な口腔衛生状態を維持する役割を果たしている可能性が示された。

2. D-タガトースによるプランクトニック増殖能への影響

唾液メタボローム再解析の結果から、プレバイオティクスとしての D-タガトースの可能性に注目し、代表的な口腔レンサ球菌の生理機能に及ぼす影響を検討した。まず、D-タガトースを含む BHI 培地中における、*S. mutans*, *S. gordonii*, *S. oralis* の増殖能を評価した。*S. mutans*, *S. gordonii* では 0.5% 以上の D-タガトース存在下で誘導期が延長し、対数増殖期における比増殖速度の低下を認めた (図 2A, 3A)。しかし、*S. mutans* においては、最終 OD₆₀₀ は上昇を示した。一方で、*S. oralis* は 1% 以下の D-タガトース濃度では増殖能に影響を認めなかった (図 4A)。また、5% 以上の D-タガトース存在下では、誘導期の延長および対数増殖期における比増殖速度の低下を認めるものの、他 2 菌種と比較してその影響は小さかった。

さらに、D-タガトースが各菌種の増殖能に及ぼす影響を検討するため、0.2% D-グルコースを含有する CDM 中での影響を観察した。*S. mutans* では OMZ175 株、UA159 株ともに D-タガトース濃度依存的な誘導期の延長を認め、それぞれの対数増殖期での比増殖速度が D-タガトース非添加群において 0.1489 h^{-1} および 0.1363 h^{-1} 、1% D-タガトース添加群で 0.1135 h^{-1} および 0.1068 h^{-1} 、5% D-タガトース添加群で 0.096 h^{-1} および 0.0971 h^{-1} となり、D-タガトース濃度依存的に低下した (表 2, 図 2B, 2C)。しかし、この培養条件下においても *S. mutans* の最終 OD₆₀₀ は D-タガトース添加により上昇を示した。*S.*

*gordonii*では、D-タガトース添加により、顕著な誘導期の延長および対数増殖期における比増殖速度の低下を示した（図 3B）。一方で、*S. oralis*ではD-タガトースによる増殖能の阻害は認めなかった（図 4B）。これらの結果から、個々の口腔レンサ球菌による D-タガトースへの反応性の差異が示され、*S. mutans* および *S. gordonii* が選択的に阻害されることが示唆された。

続いて、エネルギー源として D-タガトースのみ存在する条件下で、各菌の増殖能を検討した。いずれの菌株においても、0.8% D-グルコースの代替炭素源として 0.8% D-タガトースを添加した培地中における増殖を認めなかった（図 2D, 2E, 3C, 4C）。このことから、いずれの菌株も D-タガトースを資化できないことが示唆された。

3. D-タガトースが生菌数に及ぼす影響

上述の結果から、*S. mutans*, *S. gordonii*, *S. oralis* のいずれの菌も D-タガトースを利用した増殖はできないが、他の単糖類である D-グルコース存在下において、D-タガトースによる菌種選択的な増殖抑制を受けることが示された。しかし、D-タガトースによって *S. mutans* の対数増殖期の比増殖速度の抑制は観察されたが、最終 OD₆₀₀ の上昇が認められた。この現象の機序を理解するため、D-タガトースによる生菌数への影響を観察することとした。D-タガトース存在下において、濃度依存的に *S. mutans* および *S. gordonii* の生菌数が有意に減少した（図 5）。対照的に、*S. oralis* では、D-タガトース 1% 条件下において生菌数の有意な増加を認めた。また、5% D-タガトース存在下では、生菌数の有意な減少を示したものの、コントロールの 82% 程度に留まった。これらのことから、D-タガトースは *S. gordonii* と *S. mutans* の生存を選択的に阻害し、*S. oralis* には限定的な影響しか与えないことが示された。

4. D-タガトースが *S. mutans* の EPS 産生に及ぼす影響

D-タガトースの *S. mutans* および *S. gordonii* への選択的な増殖抑制効果が確認された。このことは D-タガトースを含む CDM を用いた増殖実験で確認された *S. mutans* における最終 OD₆₀₀ の上昇が生菌数の増加によるものではないことを示している。分光光度計の測定値は生細胞数のみでなく、細胞の形状や細胞外産物に影響を受けることが知られている³⁷⁾ことから、D-タガトース存在下での *S. mutans* が産生する EPS 量を測定した。CLSM 撮影した画像から、D-タガトース添加によって *S. mutans* による EPS の産生量に変化することが示された（図 6A）。得られた画像データから画像解析ソフト Imaris を用いて EPS/菌体比を算出したところ、D-タガトース濃度依存的な増加を示した（図 6B）。この結果は、*S. mutans* の増殖実験で見られた最終 OD₆₀₀ の変化を示唆するものであった。これらのことから、D-タガトースは *S. mutans* の増殖を抑制する一方で、EPS 産生を促進し、生菌数と OD₆₀₀ 値との乖離を生じさせたことが示唆された。

5. D-タガトースがバイオフィーム形成に及ぼす影響

これまでの結果から、プランクトニックな状況下での口腔レンサ球菌群に対する D-タガトースの菌種特異的な抑制効果が示された。続いて、D-タガトースが各供試菌株のバイオフィーム形成能に与える影響を検討するため、CDM 中に唯一の炭素源として、スクロース、D-グルコース、D-タガトースのいずれかを添加、もしくはいずれも非添加の条件下で培養後、CLSM を用いた観察を行った。D-タガトースを含む CDM で培養した場合、*S. mutans* と *S. gordonii* のバイオフィーム形成はそれぞれごくわずかであったが、D-グルコースを含む CDM で培養すると、バイオフィーム形成が著しく増加した (図 7, 8)。スクロースを添加すると、*S. mutans* は強固なバイオフィームを形成したが、*S. gordonii* のバイオフィームは比較的脆弱で、剥離した菌体も観察された。一方で、*S. oralis* は、D-グルコースを添加した場合だけでなく、D-タガトースで処理した場合にもバイオフィームの形成が有意に増加した (図 9)。この結果から、*S. mutans* や *S. gordonii* とは対照的に、*S. oralis* は D-タガトースを利用し、バイオフィーム形成を亢進させる能力を有していると考えられる。

6. RNA-seq 解析

これまでに観察された、D-タガトースによる菌種特異的な抑制効果の分子基盤を検討するため、D-タガトース存在下で培養した菌体由来の RNA を用いた RNA-seq 解析を行った。5% D-タガトースを含む CDM で *S. oralis* ATCC9811 株、*S. mutans* UA159 株および *S. gordonii* Challis DL1 株を 30 分間培養した後、各サンプルから全 RNA を抽出した。その結果、199 の *S. mutans* 遺伝子 (アップレギュレート遺伝子: 116, ダウンレギュレート遺伝子: 83), 38 の *S. gordonii* 遺伝子 (アップレギュレート遺伝子: 35, ダウンレギュレート遺伝子: 3), 12 の *S. oralis* 遺伝子 (アップレギュレート遺伝子: 4, ダウンレギュレート遺伝子: 8) が DEGs として抽出された ($FDR < 0.05$, $|\log_2(\text{Fold change})| > 1$)。DEGs によるボルケーノプロットからも、D-タガトースが供試菌株それぞれのトランスクリプトームプロファイルを変化させ、*S. oralis* ではその影響が他二菌種と比して小さいことが示された (図 10)。

S. mutans と *S. gordonii* を 5% D-タガトース存在下で培養したときの DEGs を基に、それぞれ GO 解析を実施した。*S. mutans* においては、ヒスチジン生合成やタガトース-6-リン酸を介したラクトース異化プロセスに関連する遺伝子の発現が上昇していた一方で、ホスホエノールピルビン酸依存的ホスホトランスフェラーゼシステム (phosphoenolpyruvate dependent phosphotransferase system: PTS) に関連する遺伝子の発現は減少していた ($p < 0.05$) (表 3)。続いて *S. gordonii* に関しては、ラクトース代謝、ガラクトース異化システム、PTS に関連する遺伝子の発現上昇を認めた (表 4)。両菌株で変動が確認された領域である PTS は前述したキシリトールによる抑制効果に関与する³⁸⁾ことから、この領域における遺伝子変動に着目し、Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) のデ

データベースを基にパスウェイ解析を実施した。その結果、*S. mutans* と *S. gordonii* で共通してフルクトース特異的 PTS (Fructose specific PTS: Fru-PTS) 遺伝子の発現上昇を認めた (図 11, 12)。これらの遺伝子発現の変化は、*S. mutans* と *S. gordonii* が Fru-PTS を介して D-タガトースを取り込むことを示唆している (図 14)。

一方で *S. oralis* においては、DAVID に遺伝子情報がアップロードされていないため GO 解析は行わなかった。*S. oralis* を 5% D-タガトースで処理した際の DEGs を表 5 に示す。*S. oralis* における Fru-PTS 遺伝子の発現については、5% D-タガトース存在下で明らかな変動は認めなかった (図 13)。このことから、*S. oralis* において D-タガトースの取込みに Fru-PTS の関与は小さいことが示唆された。その一方で、極性アミノ酸 ABC トランスポーター遺伝子 (SOR_1115) の発現上昇を認めた。そこで、*S. mutans* と *S. gordonii* における極性アミノ酸 ABC トランスポーター遺伝子の変動を調べるため、KEGG データベースに基づき、SOR_1115 のオーソログ遺伝子として SMU_1179c および SGO_1037 を同定し、それぞれの遺伝子の発現変動値を今回のシーケンスデータから算出した。その結果、それぞれのコントロールと比較して、SMU_1179c は $FDR = 2.04 \times 10^{-16}$ でおよそ 0.7 倍に、SGO_1037 は $FDR = 1.35 \times 10^{-27}$ でおよそ 0.6 倍に発現が低下した (図 14)。これらのことから、D-タガトースにより、*S. mutans* と *S. gordonii* では極性アミノ酸の取込みが抑制される傾向にある一方で、*S. oralis* では促進されることが示唆された。

7. 菌体内メタボロームの変化

続けて、D-タガトースによって生じた遺伝子プロファイルの変化が菌体内メタボロームに及ぼす影響を検討した。まず、各供試菌株におけるメタボロームの変化を俯瞰するために主成分分析を行ったところ、D-タガトース存在下での培養によりメタボロームが変化することが示された (図 15)。D-タガトース非存在下で培養を行なったコントロールでは、*S. gordonii* と *S. oralis* は近い位置にプロットされており菌体内代謝物プロファイルの類似性が読み取れるが、D-タガトース処理により、そのプロット位置が離れることから、D-タガトースによって誘発される代謝反応が大きく異なることが示唆された。また、D-タガトースによって影響を受けた代謝経路を調べるために MSEA を行い、コントロールと D-タガトース群の結果を比較したところ、ガラクトース代謝やアラニン代謝、分岐鎖アミノ酸 (branched-chain amino acids: BCAAs) 生合成経路に変化が見られた (表 6)。次に、これらの代謝経路に関連付ける点として、解糖系における代謝生成物に着目した。解糖系はグルコースに始まり、ピルビン酸を中心とした一連の酸化還元反応であり、口腔レンサ球菌が各種糖からエネルギーを獲得するうえで重要な代謝経路である。ピルビン酸から得られる生成物には、乳酸や酢酸といった有機酸、ロイシン、イソロイシン、バリンおよびアラニンといったアミノ酸などがある。今回の各供試菌株における菌体内代謝物の内、ピルビン酸から生成される代謝物として、乳酸、アラニン、ロイシン、イソロイシン、バリンの 5 物質が同定された (図 16)。D-タガトースにより、*S. mutans* において乳酸が有意に増

加し、*S. gordonii*でも乳酸が増加傾向を示した。一方で、*S. oralis*ではD-タガトースによる乳酸の増加は認めなかった。アラニンに関しては、*S. mutans*, *S. gordonii*ともに菌体内量が有意に減少し、*S. oralis*では有意に増加した。さらに、D-タガトースは*S. mutans*および*S. gordonii*のロイシン、イソロイシン、バリン量をも有意に減少させたが、*S. oralis*では有意な減少を認めなかった。これらの結果から、D-タガトースは、*S. mutans*および*S. gordonii*に対して選択的に解糖系の下流である乳酸発酵やアラニンおよびBCAAs生合成経路を攪乱することで、代謝の恒常性に影響を及ぼし、*S. oralis*はその影響を回避したことが示唆された。

また、今回供試したいずれの菌株においてもD-タガトース処理群でのみD-タガトースが検出された(図16)ことから、*S. mutans*, *S. gordonii*, *S. oralis*のいずれの菌種もD-タガトースの取込み能を有していることが示唆された。しかし、GC/MSによる糖リン酸の検出は極めて困難なため、今回はリン酸化されたD-タガトース、つまりFru-PTSを介したD-タガトースの取込みを裏付けるような代謝物は同定されなかった。

考察

本研究の結果、D-タガトースは、*S. mutans*, *S. gordonii*, *S. oralis*において、菌種特異的なトランスクリプトームおよびメタボロームの変化を引き起こし、それぞれの菌種の増殖に対して異なる効果を示した。D-タガトースは、*S. mutans*の増殖を抑制することが知られている非発酵性糖質である^{30,31)}が、その抑制効果が*S. mutans*を含む口腔レンサ球菌群において菌種選択性を示すことやそれによるトランスクリプトームおよびメタボロームの変動を捉えた報告は本研究以外には認められない。

D-タガトースの存在下では、D-タガトースが各菌種に取り込まれることが確認され、異なるトランスクリプトームの変化が各菌種で見られたことから、D-タガトースの取り込みのメカニズムの多様性が示唆された。*S. mutans*と*S. gordonii*においてD-タガトースによって遺伝子発現が亢進したFru-PTSはその取込み機構の一つと考えられる。Fru-PTSはホスホエノールピルビン酸の高エネルギーリン酸結合を利用することで、フルクトースをリン酸化し、フルクトース-1-リン酸に変換しながら細胞内へ輸送する。*S. mutans*は、Fru-PTSの構成要素をコードする2つのオペロン(*fruI*, *fruCD*)を有す³⁹⁾。D-タガトースは*fruI*, *fruCD*とともに発現を亢進させ、その増加率はそれぞれ約1.5倍と約33-34倍であった。一方、*S. gordonii*および*S. oralis*のFru-PTSをコードする遺伝子(*fruA*)は、D-タガトースにより、前者では約11倍に発現が亢進した一方で、後者ではほとんど発現が変動しなかった。*fruI*および*fruA*の転写は、DeoRファミリーの転写制御因子であるFruRによってアロステリックな制御を受けていることが知られており、その転写はインデューサーであるフルクトース-1-リン酸の存在下において、抑制が解除される⁴⁰⁾。本

研究では、PTS を介した D-タガトースの直接的な取り込み機構は確認できていないが、これらの報告を基に上述のトランスクリプトームの変化を鑑みるに、*S. mutans*, *S. gordonii* では D-タガトースを Fru-PTS を介して取込み、蓄積したタガトース-1-リン酸が FruR のインデューサーとして機能した可能性が考えられた。グラム陰性菌において、代謝されずに蓄積された糖リン酸は、菌にとって有害な作用として機能する糖リン酸ストレスを惹起することが知られている^{41,42)}。さらに *S. mutans* においても、フルクトース-1-リン酸の蓄積により、細胞の溶解とエンベロープ DNA の放出が増加することが報告されている⁴³⁾。これらの報告は、*S. mutans* および *S. gordonii* が Fru-PTS を介してタガトース-1-リン酸を蓄積させたことで生育阻害が生じたという可能性を裏付けるものである。また、Fru-PTS は前述したキシリトールの取込みにも関与することが知られている³⁹⁾。キシリトールによる *S. mutans* の阻害は、Fru-PTS を介したキシリトールの取込みにより、代謝活性のないキシリトール-5-リン酸が蓄積し、糖リン酸ストレスが誘発されるためと考えられている^{18,38)}。この Fru-PTS の基質に対する寛容性は、本研究の結果をさらに支持する報告である。

今回の GO 解析の結果では、ガラクトース代謝の下流の一つであるタガトース-6-リン酸代謝経路が、*S. mutans* および *S. gordonii* で共通して活性化していたことが示された (表 3, 4)。タガトース-6-リン酸代謝経路に関与する酵素をコードする一連の遺伝子群であるラクトースオペロン (*lacABCD*) は、Fru-PTS と同様にアロステリックな制御を受ける。この転写制御を担うリプレッサーである LacR は、FruR と同様に DeoR ファミリーの転写制御因子である。さらに、LacR はタガトース-6-リン酸の存在下において、不活化することが知られている⁴⁴⁾。したがって、これらの結果は *S. mutans* と *S. gordonii* が、D-タガトースをタガトース-1-リン酸のみならずタガトース-6-リン酸にも変換することを示唆している。しかし、KEGG データベースを参照すると、*S. mutans* および *S. gordonii* とともに解糖系へと合流するタガトース-6-リン酸代謝経路を有する、つまり、タガトース-6-リン酸からエネルギーを獲得する経路を有しているにも関わらず、D-タガトースによる増殖を認めなかった (図 2D,2E,3C)。そのため、*S. mutans* と *S. gordonii* が D-タガトースから ATP を獲得するかを評価するには、さらなる検討が必要であろう。また、LacR が制御する転写のインデューサーとしてタガトース-6-リン酸以外の分子、例えば、タガトース-1-リン酸の関与を考慮する必要があるかもしれない。

今回のメタボロミクスデータの解析結果から、D-タガトースの添加により生育に抑制を受けた菌種において、解糖系最終代謝物のプロファイルが大きく変化することが示された。解糖系は様々な要因により代謝リプログラミングを受けることで細胞内の恒常性維持に寄与するが、その代表的な例として、*S. mutans* における菌体内 pH ホメオスタシスのために乳酸発酵から BCAAs 産生へ、ピルビン酸より下流の代謝をシフトさせる機構が知られている⁴⁵⁾。今回得られたメタボロームデータでは、アラニンや BCAAs などのアミノ酸プールは *S. mutans* と *S. gordonii* では減少したが、*S. oralis* では減少を認めなかった (図

16). この結果を裏付けるように, *Phytophthora* spp. においても, D-タガトースによる菌種選択的な抑制を受ける *P. infestans* ではアラニンやロイシン, イソロイシンを含めたアミノ酸プール量が減少し, D-タガトースによる抑制効果を受けない *Phytophthora cinnamomi* ではアミノ酸プール量に大きな影響を受けないことが報告されている^{28,46)}. 前述したように, *S. oralis* では極性アミノ酸 ABC トランスポーター遺伝子の発現が亢進していた一方で, *S. mutans* と *S. gordonii* では発現が減少しており, アラニンや BCAAs の合成に要求されるグルタミン酸は極性アミノ酸であることから, この遺伝子発現の変化がアラニンや BCAAs のプール量に影響した可能性がある. アラニンとグルタミン酸は細胞壁を構成するペプチドグリカンの合成に利用され^{47,48)}, BCAAs は細胞膜を構成する分岐鎖脂肪酸の合成に利用される^{49,50,51)}. さらに, BCAAs はグローバルレギュレーターである CodY を活性化させ, 転写や代謝の調節に関与することが知られている^{51,52)}. そのため, BCAAs やアラニンは, 細胞の複製や環境変化への適応に必要不可欠である. 一方, 口腔レンサ球菌において有機酸を蓄積すると細胞内の pH が低下し, 解糖作用が抑制されるという既報がある⁵³⁾. 今回の供試菌株の中では, D-タガトースによる乳酸の明らかな増加を認めなかった *S. oralis* のみが乳酸オキシダーゼ遺伝子 (*lctO*) を持っているため, 好気的な条件下で H₂O₂ を産生しながら乳酸をピルビン酸に酸化することが可能である.

Streptococcus pneumoniae において, LctO とピルビン酸オキシダーゼ (SpxB) が協働して効率よく ATP を得る可能性が報告されている⁵⁴⁾. したがって, *S. pneumoniae* と同様に LctO と SpxB を有する *S. oralis* においても上述のような調和のとれた酵素の働きがみられ, 乳酸の蓄積を避けることにも貢献している可能性がある. さらに, *S. oralis* では D-タガトースによるアラニンの増加が認められていることを考えると, 乳酸が LctO を介してアラニン合成に再利用されている可能性がある. 畢竟するに, 今回の D-タガトースによる菌種間でのメタボロームプロファイルの変動の差異は菌種特異的な阻害効果を裏付けるものであることが示唆された.

また本研究において, D-タガトースは, 口腔内の衛生状態が良好な人を特徴づける物質であることが, 臨床唾液サンプルのメタボローム解析データから示された (図 1). この結果は, D-タガトースを含むチューインガムの使用が唾液中の好気性菌および嫌気性菌の数を減少させたという過去の知見⁵⁵⁾とも合致する. D-タガトースは自然界において, 極めて存在量が少ないため, 人工的な生産により供給がなされている. その製造方法として, 化学的な製造法だけでなく, L-アラビノースイソメラーゼや D-タガトース-4-エピメラーゼなどの酵素を用いた生物学的な製造法も知られている^{24,56,57)}. したがって, 唾液中の代謝物として検出された D-タガトースの起源は不明であるものの, 口腔内細菌の代謝物に由来する可能性は否定できず, 口腔内細菌叢のプロファイルが唾液中の D-タガトースの存在に関与している可能性がある.

口腔プレバイオティクスは, う蝕もしくは歯周病のいずれか一方のみに対する予防的観点から評価するのではなく, 双方の疾患に対して同時に予防効果が期待できる物質が求め

られる⁵⁸⁾。本研究にて使用した菌種である *S. gordonii* は健常者と比べ、歯周炎を有する者のプラークから顕著に検出されることが複数報告されている^{59,60)}。一方で、*S. oralis* ではその存在比率が健常者と比べ、歯周炎を有する者で減少することが報告されている⁵⁹⁾。当然、これらの報告は歯周炎を有するという結果に対して、細菌叢のプロファイルを評価したものであり、*S. gordonii* 及び *S. oralis* の存在比率の多寡が歯周炎の発症及び進行を扶助しうるかどうかについては今後の検討が必要であろうが、このような報告に加えて *S. mutans* が歯病病原菌であり^{10,11)}、前述したように特に *S. oralis* と競合関係にあること^{16,17)}を加味するに、本研究にて確認された D-タガトースの口腔レンサ球菌群 3 菌種に対する選択的な阻害効果は D-タガトースを口腔プレバイオティクスに応用できる可能性を示したと考えられる。いずれにしても、上述の今回の唾液メタボロームデータや過去の知見から、D-タガトースの口腔プレバイオティクスへの応用により口腔細菌叢が攪乱され、“dysbiosis”へシフトする可能性は低いと考えられるが、その将来的な有用性を論じるには菌種間および菌-宿主間の相互作用を加味した臨床研究を含め、さらなる検討が必要であろう。

結論

本研究では、D-タガトースが口腔内の衛生状態が良好な人の唾液に豊富に含まれていることを示す証拠が得られた。また、実験結果は口腔内病原菌である *S. mutans* や“accessory pathogen”である *S. gordonii* の生育を D-タガトースが選択的に阻害する一方で、口腔内常在菌である *S. oralis* はほとんど影響を受けないことを明らかにした。その背景には、FruPTS による細胞内へのタガトース-1-リン酸の蓄積を発端とした解糖系下流の代謝経路の攪乱による細胞内恒常性の破綻が示唆された。つまり、D-タガトースを経口プレバイオティクスとして使用することで、これらの口腔レンサ球菌の代謝を操作できる可能性が示された。

謝辞

稿を終えるにあたり，本研究の機会を与えて頂くとともに，終始にわたり御懇篤なるご指導とご教授を賜りました大阪大学大学院歯学研究科口腔分子免疫制御学講座予防歯科学 天野敦雄教授に深甚なる謝意を表します．また，本研究を遂行するにあたり，直接の御指導と御鞭撻を賜りました同口腔分子免疫制御学講座予防歯科学 久保庭雅恵准教授に深謝致します．またご指導と貴重な御助言を賜りました同口腔分子免疫制御学講座予防歯科学 坂中哲人助教に深く感謝いたします．最後に，本研究に際し，様々な御援助と御協力を頂きました予防歯科学の諸先生方に厚く御礼申し上げます．

文献

1. Lamont, R. J., and Hajishengallis, G. (2015). Polymicrobial Synergy and Dysbiosis in Inflammatory Disease. *Trends Mol. Med.*, 21 (3), 172–183. doi: 10.1016/j.molmed.2014.11.004
2. Johansson, I., Witkowska, E., Kaveh, B., Lif Holgersson, P., and Tanner, A. C. (2016). The Microbiome in Populations With a Low and High Prevalence of Caries. *J. Dent. Res.*, 95 (1), 80–86. doi: 10.1177/0022034515609554
3. Bernabe, E. , Marcenes, W., Hernandez, C. R., Bailey, J., Abreu, L. G., Alipour, V., et al. (2020). Global, Regional, and National Levels and Trends in Burden of Oral Conditions From 1990 to 2017: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease 2017 Study. *J. Dent. Res.*, 99 (4), 362–373. doi: 10.1177/0022034520908533
4. Lamont, R. J., Koo, H., and Hajishengallis, G. (2018). The Oral Microbiota: Dynamic Communities and Host Interactions. *Nat. Rev. Microbiol.*, 16 (12), 745–759. doi: 10.1038/s41579-018-0089-x
5. Mira, A., Simon-Soro, A., and Curtis, M. A. (2017). Role of Microbial Communities in the Pathogenesis of Periodontal Diseases and Caries. *J. Clin. Periodontol.*, 44 (Suppl 18), S23–S38. doi: 10.1111/jcpe.12671
6. Kuboniwa, M., and Lamont, R. J. (2010). Subgingival Biofilm Formation. *Periodontol.* 2000, 52 (1), 38–52. doi: 10.1111/j.1600-0757.2009.00311.x
7. Periasamy, S., and Kolenbrander, P. E. (2009). Mutualistic Biofilm Communities Develop With *Porphyromonas gingivalis* and Initial, Early, and Late Colonizers of Enamel. *J. Bacteriol.*, 191 (22), 6804–6811. doi: 10.1128/JB.01006-09
8. Kuboniwa, M., Hendrickson, E. L., Xia, Q., Wang, T., Xie, H., Hackett, M., et al. (2009b). Proteomics of *Porphyromonas gingivalis* Within a Model Oral Microbial Community. *BMC Microbiol.*, 9:98. doi: 10.1186/1471-2180-9-98
9. Sakanaka, A., Kuboniwa, M., Takeuchi, H., Hashino, E., and Amano, A. (2015). Arginine-Ornithine Antiporter ArcD Controls Arginine Metabolism and Interspecies Biofilm Development of *Streptococcus gordonii*. *J. Biol. Chem.*, 290 (35), 21185–21198. doi: 10.1074/jbc.M115.644401
10. Selwitz, R. H., Ismail, A. I., and Pitts, N. B. (2007). Dental Caries. *Lancet*, 369 (9555), 51–59. doi: 10.1016/s0140-6736(07)60031-2
11. Gross, E. L., Beall, C. J., Kutsch, S. R., Firestone, N. D., Leys, E. J., and Griffen, A. L. (2012). Beyond *Streptococcus mutans*: Dental Caries Onset Linked to Multiple Species by 16S rRNA Community Analysis. *PloS One*, 7 (10), e47722. doi: 10.1371/journal.pone.0047722

12. Periasamy, S., and Kolenbrander, P. E. (2010). Central Role of the Early Colonizer *Veillonella* sp. In Establishing Multispecies Biofilm Communities With Initial, Middle, and Late Colonizers of Enamel. *J. Bacteriol.*, 192 (12), 2965–2972. doi: 10.1128/JB.01631-09
13. Hajishengallis, G. (2015). Periodontitis: From Microbial Immune Subversion to Systemic Inflammation. *Nat. Rev. Immunol.*, 15 (1), 30–44. doi: 10.1038/nri3785
14. Thurnheer, T., and Belibasakis, G. N. (2018). *Streptococcus oralis* Maintains Homeostasis in Oral Biofilms by Antagonizing the Cariogenic Pathogen *Streptococcus mutans*. *Mol. Oral. Microbiol.*, 33 (3), 234–239. doi: 10.1111/omi.12216
15. Kreth, J., Merritt, J., and Qi, F. (2011). Antagonistic, Synergistic, and Counteroffensive Strategies for Streptococcal Interspecies Interactions. *Oral. Microbial Communities*, 22, 13. doi: 10.1128/9781555817107.ch22
16. Kreth, J., Zhang, Y., and Herzberg, M. C. (2008). Streptococcal Antagonism in Oral Biofilms: *Streptococcus sanguinis* and *Streptococcus gordonii* Interference With *Streptococcus mutans*. *J. Bacteriol.*, 190 (13), 4632–4640. doi: 10.1128/JB.00276-08
17. Redanz, S., Cheng, X., Giacaman, R. A., Pfeifer, C. S., Merritt, J., and Kreth, J. (2018). Live and Let Die: Hydrogen Peroxide Production by the Commensal Flora and its Role in Maintaining a Symbiotic Microbiome. *Mol. Oral. Microbiol.*, 33 (5), 337–352. doi: 10.1111/omi.12231
18. L, T. (1995). Xylitol: A Review of its Action on Mutans Streptococci and Dental Plaque – its Clinical Significance. *Int. Dental J.*, 45, 16.
19. Makinen, K. K. (2010). Sugar Alcohols, Caries Incidence, and Remineralization of Caries Lesions: A Literature Review. *Int. J. Dent.*, 2010:981072. doi: 10.1155/2010/981072
20. Milgrom, P., Soderling, E. M., Nelson, S., Chi, D. L., and Nakai, Y. (2012). Clinical Evidence for Polyol Efficacy. *Adv. Dent. Res.*, 24 (2), 112–116. doi: 10.1177/0022034512449467
21. Gauthier, L., Vadebonceur, C., and Mayrand, D. (1984). Loss of Sensitivity to Xylitol by *Streptococcus mutans* LG-1. *Caries Res.*, 18, 7. doi: 10.1159/000260779
22. Oku, T., and Nakamura, S. (2007). Threshold Transitory Diarrhea Induced by Ingestion of Xylitol and Lactitol in Young Male and Female Adults. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 53, 8. doi: 10.3177/jnsv.53.13
23. Donner, T. W., Wilber, J. F., and Ostrowski, D. (1999). D-Tagatose, a Novel Hexose: Acute Effects on Carbohydrate Tolerance in Subjects With and Without Type 2 Diabetes. *Diabetes Obes. Metab.*, 1, 7. doi: 10.1046/j.1463-1326.1999.00039.x
24. Oh, D. K. (2007). Tagatose: Properties, Applications, and Biotechnological Processes.

- Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 76 (1), 1–8. doi: 10.1007/s00253-007-0981-1
25. Guerrero-Wyss, M., Duran Aguero, S., and Angarita Davila, L. (2018). D-Tagatose Is a Promising Sweetener to Control Glycaemia: A New Functional Food. *BioMed. Res. Int.*, 2018:8718053. doi: 10.1155/2018/8718053
 26. Roy, S., Chikkerur, J., Roy, S. C., Dhali, A., Kolte, A. P., Sridhar, M., et al. (2018). Tagatose as a Potential Nutraceutical: Production, Properties, Biological Roles, and Applications. *J. Food Sci.*, 83 (11), 2699–2709. doi: 10.1111/1750-3841.14358
 27. Lærke, H. N., Jensen, B. B., and Højsgaard, S. (2000). In Vitro Fermentation Pattern of D-Tagatose Is Affected by Adaptation of the Microbiota From the Gastrointestinal Tract of Pigs. *Nutrient Metab.*, 130, 8. doi: 10.1093/jn/130.7.1772
 28. Chahed, A., Nesler, A., Navazio, L., Baldan, B., Busato, I., Ait Barka, E., et al. (2020). The Rare Sugar Tagatose Differentially Inhibits the Growth of *Phytophthora infestans* and *Phytophthora Cinnamomi* by Interfering With Mitochondrial Processes. *Front. Microbiol.*, 11, 128. doi: 10.3389/fmicb.2020.00128
 29. Corneo, P. E., Nesler, A., Lotti, C., Chahed, A., Vrhovsek, U., Pertot, I., et al. (2021). Interactions of Tagatose With the Sugar Metabolism are Responsible for *Phytophthora infestans* Growth Inhibition. *Microbiol. Res.*, 247:126724. doi: 10.1016/j.micres.2021.126724
 30. Sawada, D., Ogawa, T., Miyake, M., Hasui, Y., Yamaguchi, F., Izumori, K., et al. (2015). Potent Inhibitory Effects of D-Tagatose on the Acid Production and Water-Insoluble Glucan Synthesis of *Streptococcus mutans* GS5 in the Presence of Sucrose. *Acta Med. Okayama*, 69 (2), 7. doi: 10.18926/AMO/53339
 31. Hasibul, K., Nakayama-Imaohji, H., Hashimoto, M., Yamasaki, H., Ogawa, T., Waki, J., et al. (2018). D-Tagatose Inhibits the Growth and Biofilm Formation of *Streptococcus mutans*. *Mol. Med. Rep.*, 17 (1), 843–851. doi: 10.3892/mmr.2017.8017
 32. Kuboniwa, M., Sakanaka, A., Hashino, E., Bamba, T., Fukusaki, E., and Amano, A. (2016). Prediction of Periodontal Inflammation via Metabolic Profiling of Saliva. *J. Dent. Res.*, 95 (12), 1381–1386. doi: 10.1177/0022034516661142
 33. Tsugawa, H., Cajka, T., Kind, T., Ma, Y., Higgins, B., Ikeda, K., et al. (2015). MSDIAL: Data-Independent MS/MS Deconvolution for Comprehensive Metabolome Analysis. *Nat. Methods*, 12 (6), 523–526. doi: 10.1038/nmeth.3393
 34. Sakanaka, A., Kuboniwa, M., Hashino, E., Bamba, T., Fukusaki, E., and Amano, A. (2017). Distinct Signatures of Dental Plaque Metabolic Byproducts Dictated by Periodontal Inflammatory Status. *Sci. Rep.*, 7:42818. doi: 10.1038/srep42818
 35. Loo, C. Y., Corliss, D. A., and Ganeshkumar, N. (2000). *Streptococcus gordonii* Biofilm Formation: Identification of Genes That Code for Biofilm Phenotypes. *J. Bacteriol.*, 182

- (5), 9. doi: 10.1128/JB.182.5.1374-1382.2000
36. Kuboniwa, M., Amano, A., Hashino, E., Yamamoto, Y., Inaba, H., Hamada, N., et al. (2009a). Distinct Roles of Long/Short Fimbriae and Gingipains in Homotypic Biofilm Development by *Porphyromonas gingivalis*. *BMC Microbiol.*, 9:105. doi: 10.1186/1471-2180-9-105
 37. Takahashi, Y., Imazato, S., Russell, R. R. B., Noiri, Y., and Ebisu, S. (2004). Influence of Resin Monomers on Growth of Oral Streptococci. *J. Dent. Res.*, 83 (4), 5. doi: 10.1177/154405910408300406
 38. Kakuta, H., Iwami, Y., Mayanagi, H., and Takahashi, N. (2003). Xylitol Inhibition of Acid Production and Growth of Mutans Streptococci in the Presence of Various Dietary Sugars Under Strictly Anaerobic Conditions. *Caries Res.*, 37 (6), 404–409. doi: 10.1159/000073391
 39. Wen, Z. T., Browngardt, C., and Burne, R. A. (2001). Characterization of Two Operons That Encode Components of Fructose-Specific Enzyme II of the Sugar: Phosphotransferase System of *Streptococcus mutans*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 205 (2), 337–342. doi: 10.1111/j.1574-6968.2001.tb10969.x
 40. Yoon, C. K., Kang, D., Kim, M. K., and Seok, Y. J. (2021). *Vibrio cholerae* FruR Facilitates Binding of RNA Polymerase to the fru Promoter in the Presence of Fructose 1-Phosphate. *Nucleic Acids Res.*, 49 (3), 1397–1410. doi: 10.1093/nar/gkab013
 41. Vanderpool, C. K., and Gottesman, S. (2004). Involvement of a Novel Transcriptional Activator and Small RNA in Post-Transcriptional Regulation of the Glucose Phosphoenolpyruvate Phosphotransferase System. *Mol. Microbiol.*, 54 (4), 1076–1089. doi: 10.1111/j.1365-2958.2004.04348.x
 42. Maleki, S., Hrudikova, R., Zotchev, S. B., and Ertesvag, H. (2017). Identification of a New Phosphatase Enzyme Potentially Involved in the Sugar Phosphate Stress Response in *Pseudomonas fluorescens*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 83 (2), e02361–16. doi: 10.1128/AEM.02361-16
 43. Zeng, L., and Burne, R. A. (2019). Essential Roles of the *sppRA* Fructose-Phosphate Phosphohydrolase Operon in Carbohydrate Metabolism and Virulence Expression by *Streptococcus mutans*. *J. Bacteriol.*, 201 (2), e00586–18. doi: 10.1128/JB.00586-18
 44. Rooijen, R., Dechering, K. J., Niek, C., Wilmink, J., and Vos, W. (1993). Lysines 72, 80 and 213 and Aspartic Acid 210 of the *Lactococcus lactis* LacR Repressor are Involved in the Response to the Inducer Tagatose-6-Phosphate Leading to Induction of lac Operon Expression. *Protein Engineer Design Selection*, 6 (2), 6. doi: 10.1093/protein/6.2.201
 45. Santiago, B., Marek, M., Faustoferri, R. C., and Quivey, R. G. Jr. (2013). The *Streptococcus mutans* Aminotransferase Encoded by *ilvE* Is Regulated by CodY and

- CcpA. *J. Bacteriol.*, 195 (16), 3552-3562. doi:10.1128/JB.00394-13
46. Chahed, A., Lazazzara, V., Moretto, M., Nesler, A., Corneo, P. E., Barka, E. A., et al. (2021). The Differential Growth Inhibition of *Phytophthora* spp. Caused by the Rare Sugar Tagatose Is Associated With Species-Specific Metabolic and Transcriptional Changes. *Front. Microbiol.*, 12, 711545. doi: 10.3389/fmicb.2021.711545
 47. Chapot-Chartier, M.-P., and Kulakauskas, S. (2014). Cell Wall Structure and Function in Lactic Acid Bacteria. *Microbial Cell Factories.*, 13(Suppl 1), S9. doi: 10.1186/1475-2859-13-S1-S9
 48. Huang, C., Hernandez-Valdes, J. A., Kuipers, O. P., and Kok, J. (2020). Lysis of a *Lactococcus lactis* Dipeptidase Mutant and Rescue by Mutation in the Pleiotropic Regulator CodY. *Appl. Environ. Microbiol.*, 86 (8), e02937–19. doi: 10.1128/AEM.02937-19
 49. Kaneda, T. (1963). Valine as a Source of the Branched Short Chain Precursor in the Biosynthesis of Iso-C14, Iso-C15, Iso-C16 and Iso-C17 Fatty Acids by *Bacillus subtilis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 10 (3), 5. doi: 10.1016/0006-291x(63)90431-5
 50. Kaneda, T. (1977). Fatty Acids of the Genus *Bacillus*: An Example of Branched-Chain Preference. *Bacteriol. Rev.*, 41 (2), 28. doi: 10.1128/br.41.2.391-418.1977
 51. Santiago, B., MacGilvray, M., Faustoferri, R. C., and Quivey, R. G. Jr. (2012). The Branched-Chain Amino Acid Aminotransferase Encoded by *ilvE* is Involved in Acid Tolerance in *Streptococcus mutans*. *J. Bacteriol.*, 194 (8), 2010–2019. doi: 10.1128/JB.06737-11
 52. Sonenshein, A. L. (2007). Control of Key Metabolic Intersections in *Bacillus subtilis*. *Nat. Rev. Microbiol.*, 5 (12), 917–927. doi: 10.1038/nrmicro1772
 53. Dashper, S. G., and Reynolds, E. C. (2000). Effects of Organic Acid Anions on Growth, Glycolysis, and Intracellular pH of Oral Streptococci. *J. Dental Res.*, 79 (1), 7. doi: 10.1177/00220345000790011601
 54. Taniai, H., Iida, K., Seki, M., Saito, M., Shiota, S., Nakayama, H., et al. (2008). Concerted Action of Lactate Oxidase and Pyruvate Oxidase in Aerobic Growth of *Streptococcus pneumoniae*: Role of Lactate as an Energy Source. *J. Bacteriol.*, 190 (10), 3572–3579. doi: 10.1128/JB.01882-07
 55. Nagamine, Y., Hasibul, K., Ogawa, T., Tada, A., Kamitori, K., Hossain, A., et al. (2020). D-Tagatose Effectively Reduces the Number of *Streptococcus mutans* and Oral Bacteria in Healthy Adult Subjects: A Chewing Gum Pilot Study and Randomized Clinical Trial. *Acta Med. Okayama*, 74 (4), 11. doi: 10.18926/AMO/60369
 56. Kim, P. (2004). Current Studies on Biological Tagatose Production Using L-Arabinose Isomerase: A Review and Future Perspective. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 65 (3), 243–

249. doi: 10.1007/s00253-004-1665-8
57. Shin, K.-C., Lee, T.-E., Seo, M.-J., Kim, D. W., Kang, L.-W., and Oh, D.-K. (2020). Development of Tagaturonate 3-Epimerase Into Tagatose 4-Epimerase With a Biocatalytic Route From Fructose to Tagatose. *ACS Catalysis*, 10 (20), 12212–12222. doi: 10.1021/acscatal.0c02922
 58. Slomka, V., Herrero, E. R., Boon N., Bernaerts K., Trivedi, H. M., Daep, C., Quirynen, M., and Teughels, W. (2018). Oral prebiotics and the influence of environmental conditions in vitro. *J. Periodontol.*, 89 (6), 708–717. doi: 10.1002/JPER.17-0437.
 59. Abiko, Y., Sato, T., Mayanagi, G., and Takahashi, N. (2010). Profiling of subgingival plaque biofilm microflora from periodontally healthy subjects and from subjects with periodontitis using quantitative real-time PCR. *J. Periodont. Res.*, 45 (3), 389–395. doi: 10.1111/j.1600-0765.2009.01250.x.
 60. Socransky, S. S., Haffajee, A. D., Smith, C., Duff, G. W. (2000). Microbiological parameters associated with IL-1 gene polymorphisms in periodontitis patients. *J. Clin. Periodontol.*, 27 (11), 810–818. doi: 10.1034/j.1600-051x.2000.027011810.x.
 61. Pakula, R., and Walczak, W. (1963): On the nature of competence of transformable streptococci. *J. Gen. Microbiol.*, 31, 125-133. doi: 10.1099/00221287-31-1-125.

表 1 本研究で使⽤した菌株

菌株	詳細	情報源
<i>Streptococcus gordonii</i> DL1 Challis	Wild type	Pakura and Walczak (1963) ⁶¹⁾
<i>Streptococcus mutans</i> OMZ175	Wild type	B. Guggenheim
<i>Streptococcus mutans</i> UA159	Wild type	University of Alabama
<i>Streptococcus oralis</i> ATCC9811	Wild type	American Type Culture Collection

表 2 D-タガトースによる CDM 中の *S. mutans* の比増殖速度への影響

CDM 中の D-タガトース濃度	OMZ175 株の比増殖速度(h^{-1})	UA159 株の比増殖速度(h^{-1})
0%	0.1489	0.1363
1%	0.1135	0.1068
5%	0.096	0.0971

表3 *S. mutans* における GO 解析

アップレギュレートされた遺伝子

	Count	<i>p</i> 値	Fold Enrichment
ヒスチジン合成経路	9	5.18E-08	11.97413793
細胞質内における反応	17	0.03314	1.583424328
リアーゼ活性	3	0.04698	8.136263736
タガトース-6-リン酸を介したラクトース 異化プロセス	3	0.04759	7.982758621

ダウンレギュレートされた遺伝子

	Count	<i>p</i> 値	Fold Enrichment
触媒作用関連	7	6.21E-04	6.040559441
代謝過程関連	8	0.0015	4.287037037
リボソームの構造的構成要素	7	0.02478	2.96329331
PTS	6	0.03119	3.215277778
プロテイン-N(PI)-ホスホヒスチジン-シュガー ホスホトランスフェラーゼ活性	4	0.067716	4.079338843
転写活性関連	7	0.071478	2.288841808
リボソーム	5	0.095985	2.737483954

表4 *S. gordonii*におけるGO解析

アップレギュレートされた遺伝子

	Count	<i>p</i> 値	Fold Enrichment
ラクトース代謝	8	8.61E-12	49.42760943
タガトース-6-リン酸を介したラクトース異化プロセス	7	3.21E-08	24.73931624
タガトース-6-リン酸キナーゼ活性	5	6.72E-07	47.03846154
タガトース-6-リン酸異化プロセス	5	3.20E-06	31.80769231
グルコサミン PTS 活性	6	3.83E-05	13.43956044
プロテイン-N(PI)-ホスホヒスチジン-シュガー ホスホトランスフェラーゼ活性	5	0.0015	9.045857988
PTS	6	0.00222	5.783216783
ガラクトース-6-リン酸イソメラーゼ活性	3	0.00235	35.27884615
ガラクトース異化プロセス	3	0.00508	23.85576923
トランスフェラーゼ	12	0.00851	2.254299754
タガトース-1,6-リン酸アルドラーゼ活性	2	0.04048	47.03846154
アルギニン代謝	2	0.051437	37.07070707
アルギニンのオルニチンへの異化システム	2	0.088079	21.20512821

ダウンレギュレートされた遺伝子

	Count	<i>p</i> 値	Fold Enrichment
トランスメンブレンヘリックス	3	0.065778	3.89596603
トランスメンブレン	3	0.065778	3.89596603
メンブレン	3	0.072074	3.722109533

表 5 *S. oralis* における DEGs

KEGG 情報	機能	log ₂ (FC)	<i>p</i> 値	FDR
SOR_1016	デヒドロゲナーゼファミリー, サッカロピンデヒドロゲナーゼ	-2.60312	0.000133	0.001368
SOR_1899	ugpA ; 糖 ABC トランスポーター	-1.91877	2.07E-28	3.42E-26
SOR_1017	スベルミジン合成酵素	-1.44929	4.27E-19	3.14E-17
SOR_1609	enoyl-CoA ヒドラターゼ	-1.38538	1.30E-31	3.45E-29
SOR_1010	転写制御因子, MarR ファミリー	-1.29896	5.14E-06	7.45E-05
SOR_0121	malX ; マルトース ABC トランスポーター	-1.28032	1.13E-48	1.49E-45
SOR_1526	仮想タンパク質	-1.06086	0.008948	0.039996
SOR_1094	ガラクトース PTS システム	-1.01439	0.007048	0.033303
SOR_1115	極性アミノ酸 ABC トランスポーター	1.058314	2.78E-22	2.63E-20
SOR_0979	仮想タンパク質	1.267281	0.008085	0.037533
SOR_0926	仮想タンパク質	1.453668	1.47E-05	0.000191
SOR_0129	dapE ; ペプチダーゼファミリー, N-アセチル-L-ジアミノピメリン酸デアシラーゼ	1.459176	0.009435	0.04203

表 6 MSEA の結果

	PC1 に負の相関		PC1に正の相関		PC2 に負の相関		PC2 に正の相関	
	<i>p</i> 値	FDR	<i>p</i> 値	FDR	<i>p</i> 値	FDR	<i>p</i> 値	FDR
アラニン, アスバラギン酸, グルタミン酸代謝	0.000241	0.00507	0.23	1	0.0977	0.746	0.000141	0.00237
アミノアシルtRNA 合成	1.08E-09	9.07E-08	1	1	0.232	1	1.08E-12	9.09E-11
アミノ糖および糖スクレオチド代謝	0.56	1	0.0436	0.908	0.513	1	0.318	0.861
アルギニンおよびプロリン代謝	0.0468	0.327	1	1	0.162	1	0.0273	0.143
アルギニン合成	0.000158	0.00442	0.122	1	0.0277	0.529	0.00791	0.0776
β -アラニン代謝	0.0741	0.415	1	1	0.334	1	0.135	0.541
不飽和脂肪酸生成	1	1	0.286	1	1	1	0.306	0.857
ビオチン代謝	1	1	1	1	1	1	0.27	0.782
ブタン酸代謝	0.281	0.945	0.13	1	1	1	0.377	0.904
TCA 回路	0.357	1	0.0136	0.38	0.0539	0.566	0.468	1
システインおよびメチオニン代謝	4.73E-05	0.00199	1	1	1	1	3.95E-05	0.00107
D-グルタミンおよびD-グルタミン酸代謝	0.00648	0.068	0.054	0.908	1	1	1.15E-05	0.000482
脂肪酸生成	1	1	1	1	1	1	0.175	0.638
脂肪酸分解	1	1	1	1	1	1	0.71	1
脂肪酸伸長	1	1	1	1	1	1	0.71	1
フルクトースおよびマンノース代謝	0.0679	0.408	0.0136	0.38	1	1	0.125	0.524
ガラクトース代謝	1	1	2.14E-06	0.00018	0.0134	0.529	0.00832	0.0776
グルタチオン代謝	0.021	0.177	1	1	0.0977	0.746	0.0013	0.0183
グリセロ脂質代謝	0.00429	0.0515	1	1	1	1	0.0117	0.089
グリセロリン脂質代謝	0.55	1	1	1	1	1	0.681	1
グリシン, セリン, スレオニン代謝	0.0326	0.249	1	1	1	1	0.0169	0.102
解糖系/糖新生	0.107	0.501	1	1	1	1	0.19	0.664
グリオキシル酸およびジカルボン酸代謝	0.151	0.605	0.258	1	0.122	0.857	0.0152	0.0984
ヒスチジン代謝	0.00429	0.0515	1	1	1	1	0.0117	0.089
イノシトールリン酸代謝	0.485	1	1	1	1	1	0.613	1
リジン分解	1	1	1	1	1	1	0.546	1
ネオマイシン, カナマイシン, ゲンタマイシン生成	1	1	1	1	0.0378	0.529	1	1
ニコチン酸およびニコチンアミド代謝	0.281	0.945	1	1	0.0316	0.529	0.377	0.904
窒素代謝	0.123	0.546	1	1	1	1	0.0129	0.0906
パントテン酸およびCoA 生成	0.062	0.4	1	1	0.308	1	0.0022	0.0264
ペントースとグルクロン酸の相互変換	0.328	1	0.154	1	1	1	0.433	1
ペントースリン酸経路	0.0804	0.415	1	1	0.347	1	0.146	0.557
フェニルアラニン代謝	0.197	0.754	1	1	0.175	1	0.27	0.782
フェニルアラニン, チロシン, トリプトファン生成	0.084	0.415	1	1	0.0741	0.692	0.118	0.524
ボルフィリンおよびクロロフィル代謝	0.485	1	1	1	1	1	0.236	0.764
一次胆汁酸生成	1	1	1	1	1	1	0.769	1
プリン代謝	1	1	0.459	1	1.51E-05	0.00127	0.876	1
ピリミジン代謝	1	1	1	1	0.0359	0.529	0.341	0.895
ビルビン酸代謝	0.385	1	1	1	0.347	1	0.501	1
セレン化合物代謝	0.357	1	1	1	1	1	0.468	1
デンプンおよびスクロース代謝	0.328	1	0.154	1	0.0444	0.533	0.104	0.516
タウリンおよびヒポタウリン代謝	0.0118	0.11	1	1	1	1	0.0232	0.13
チアミン代謝	0.143	0.599	1	1	1	1	0.197	0.664
トリプトファン代謝	0.598	1	1	1	0.55	1	0.728	1
チロシン代謝	0.607	1	1	1	0.559	1	0.375	0.904
ユビキノンのテルペノイド・キノン生成	1	1	1	1	1	1	0.247	0.767
バリン, ロイシン, イソロイシン (BCAA s) 生成	0.000484	0.00812	1	1	1	1	5.12E-05	0.00107
バリン, ロイシン, イソロイシン (BCAA s) 分解	0.214	0.782	1	1	1	1	0.123	0.524

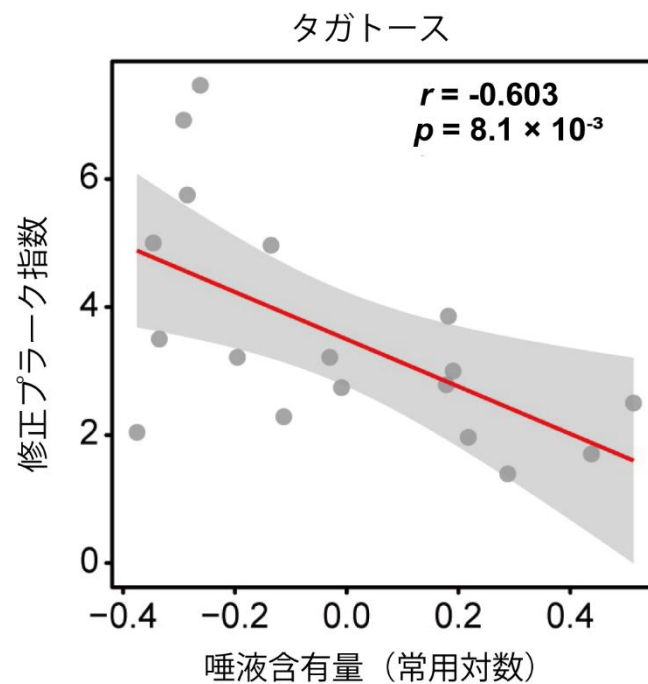


図1 唾液中のタガトースと修正プラーク指数 (mPII) との関係

口腔衛生状態の指標とされる mPII と D-タガトースとの相関関係を、mPII のデータが得られた 18 名の被験者で評価した。その結果、D-タガトースは mPII と有意な負の相関を示した (Spearman's 相関係数； $r = -0.603$, $p = 0.008$)。

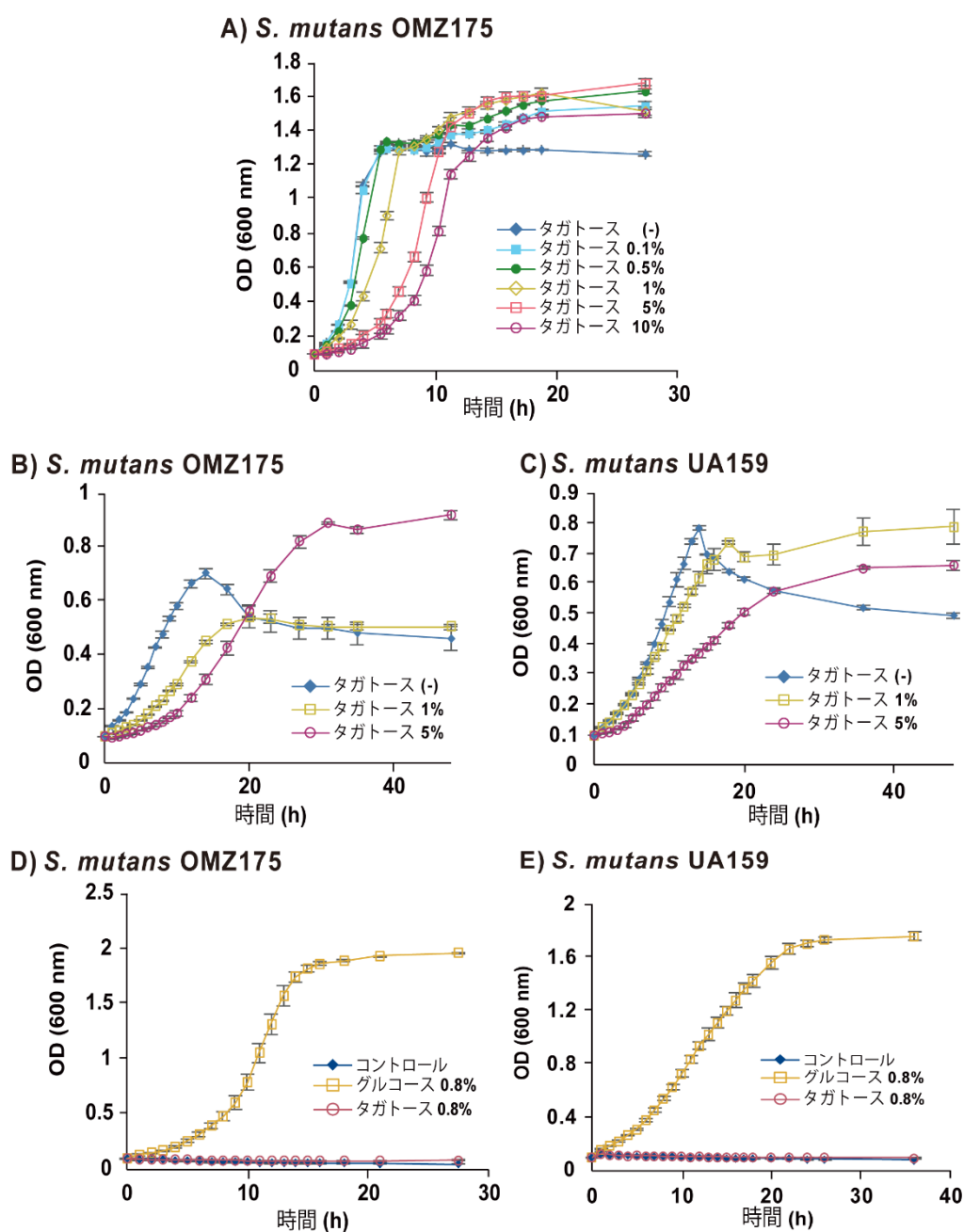


図2 *S. mutans* の増殖曲線

(A) 種々の濃度の D-タガトースを含む BHI 中における *S. mutans* OMZ175 株の増殖. (B, C) 0.2% D-グルコース含有 CDM に 0%, 1%, 5% の D-タガトースを添加し, D-タガトース処理を施した条件下における *S. mutans* OMZ175 株および UA159 株の増殖. (D, E) 0.8% D-グルコースもしくは, 0.8% D-タガトースを含む CDM での *S. mutans* OMZ175 株および UA159 株の増殖. 糖質が存在しない CDM 中での培養群をコントロールとした. すべてのデータを, 3 回の実験の平均値 $\pm$ S.D. として示す.

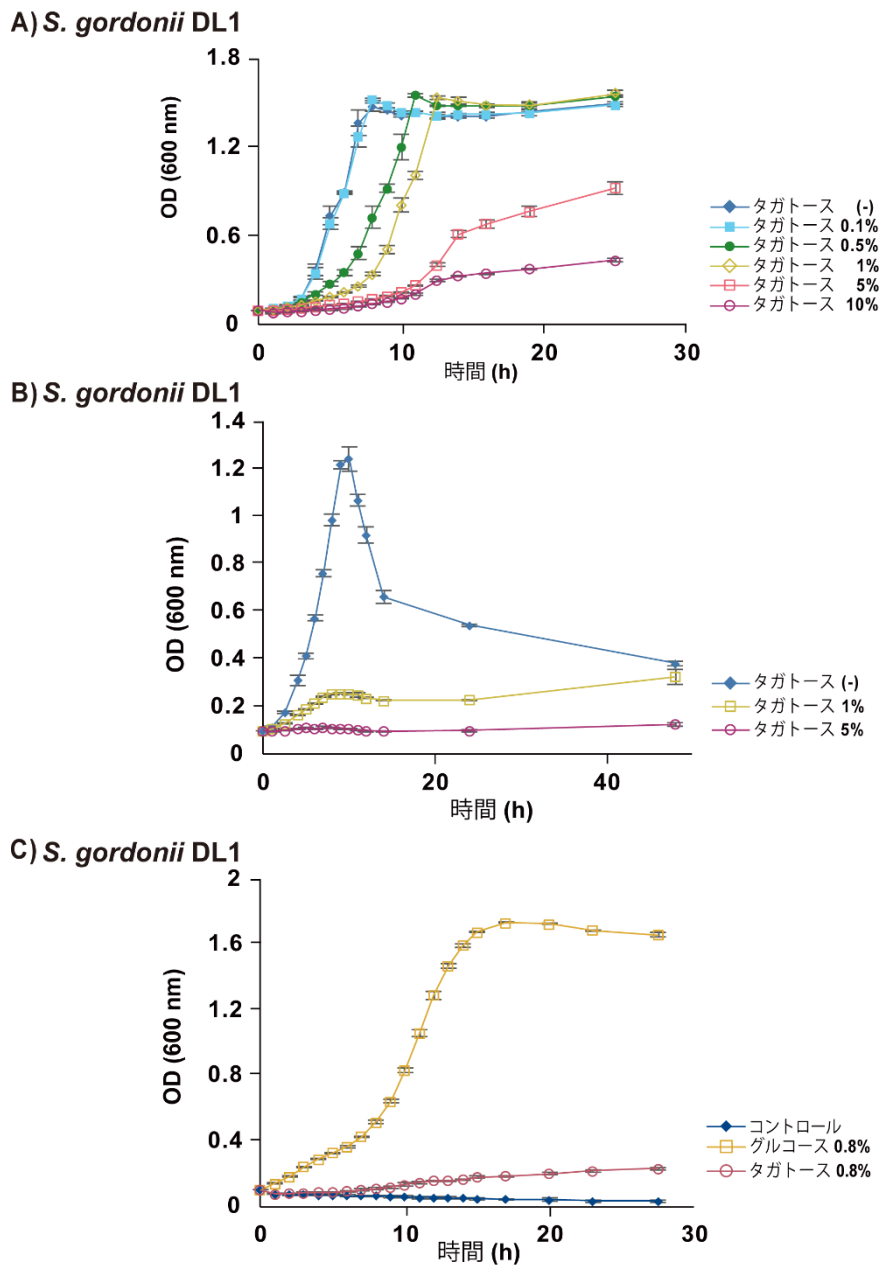


図3 *S. gordonii* DL1 株の増殖曲線

(A) 種々の濃度の D-タガトースを含む BHI 中における *S. gordonii* DL1 株の増殖. (B) 0.2% D-グルコース含有 CDM に 0%, 1%, 5% の D-タガトースを添加し, D-タガトース処理を施した条件下における *S. gordonii* DL1 株の増殖. (C) 0.8% D-グルコースもしくは, 0.8% D-タガトース含有 CDM での *S. gordonii* DL1 株の増殖. 糖質非含有 CDM 中での培養群をコントロールとした. すべてのデータを, 3 回の実験の平均値 $\pm$ S.D. として示す.

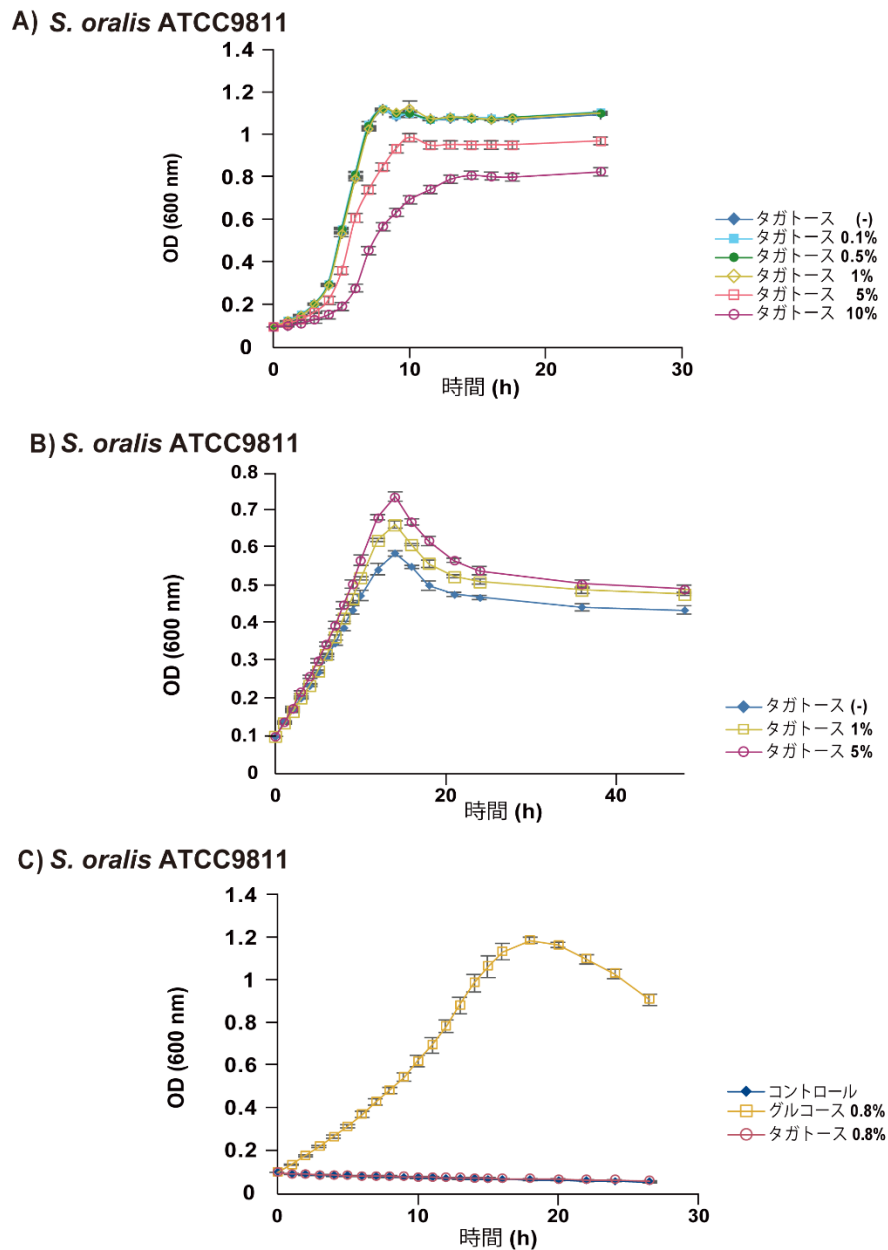
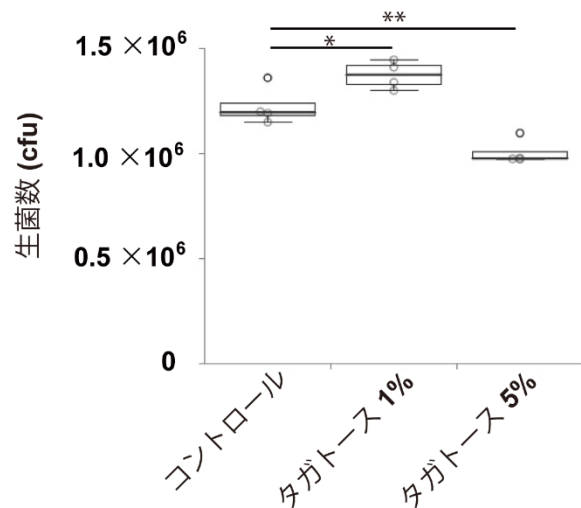


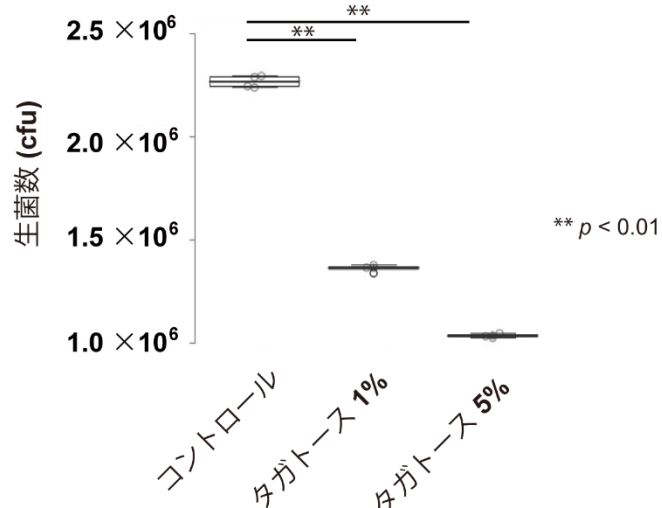
図4 *S. oralis* ATCC9811 株の増殖曲線

(A) 種々の濃度の D-タガトース含有 BHI 中における *S. oralis* ATCC9811 株の増殖. (B) 0.2% D-グルコースを含有する CDM に 0%, 1%, 5% の D-タガトースを添加し, タガトース処理を施した条件下における *S. oralis* ATCC9811 株の増殖. (C) 0.8% D-グルコースもしくは, 0.8% D-タガトース含有 CDM 中での *S. oralis* ATCC9811 株の増殖. 糖質非添加 CDM 中での培養群をコントロール群とした. すべてのデータを, 3 回の実験の平均値 $\pm$ S.D. として示す.

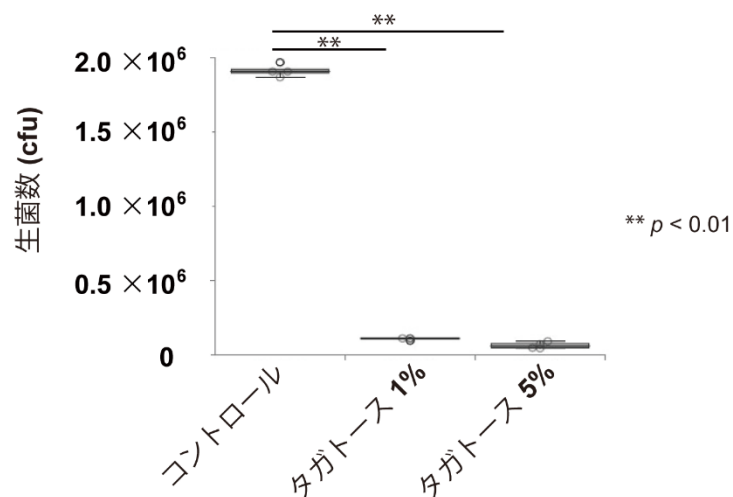
〈*S. oralis* ATCC9811〉



〈*S. gordonii* DL1〉



〈*S. mutans* OMZ175〉



〈*S. mutans* UA159〉

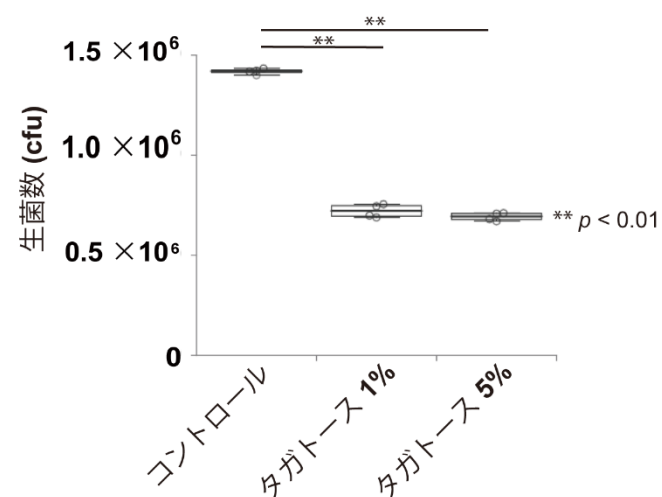


図5 D-タガトースが *S. mutans*, *S. gordonii* および *S. oralis* の生菌数に及ぼす影響

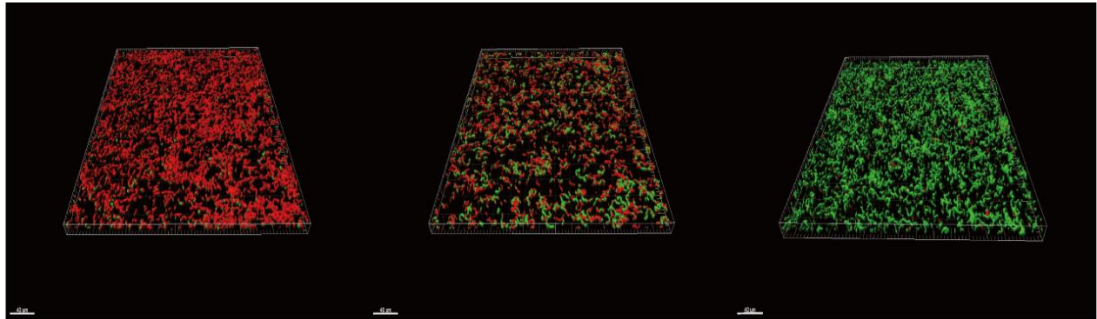
0.2% D-グルコース含有 CDM に 1% もしくは 5% の D-タガトースを添加し、48 時間培養した後の生菌数を示す (n=4)。D-タガトース非添加群をコントロールとした。統計的有意差は Dunnett の多重検定を用いて検定した。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 。

A) *S. mutans* OMZ175

コントロール

タガトース 1%

タガトース 5%



B) *S. mutans* OMZ175

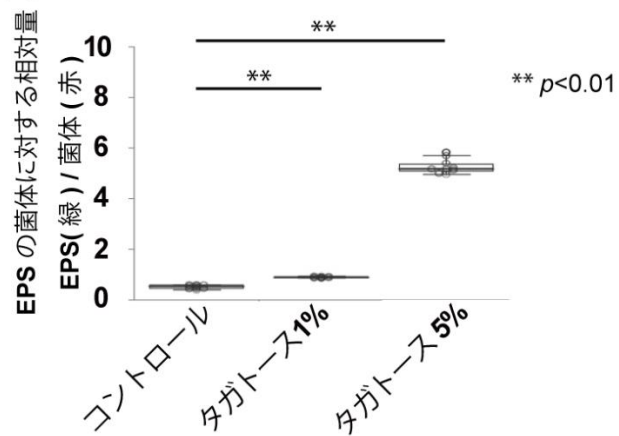
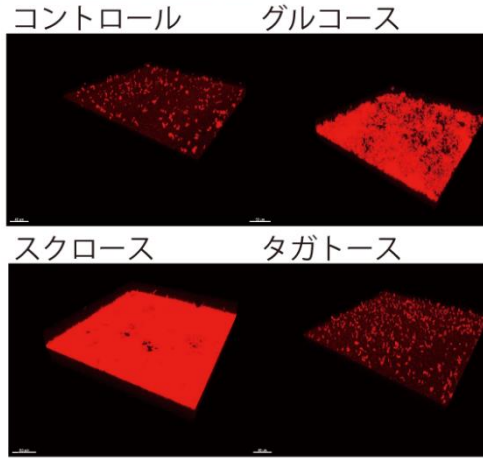


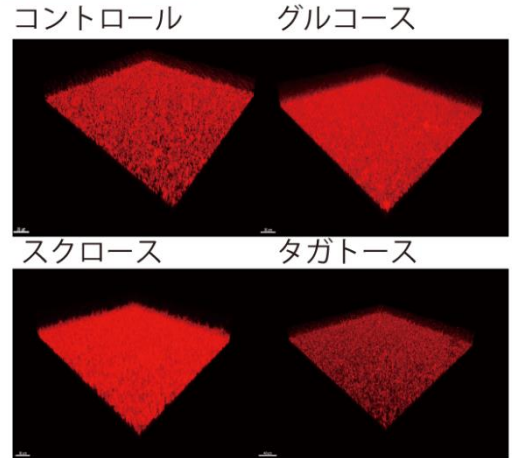
図6 D-タガトースが *S. mutans* OMZ175 株の EPS 産生に及ぼす影響

(A) プランクトニック状態の菌体 (赤) と EPS (緑) を示す CLSM 画像. 0.2% D-グルコース含有 CDM に 1% もしくは 5% の D-タガトースを添加し 48 時間培養した後, 菌体を HI で, EPS を con A および WGA を用いて染色し, CLSM で観察した. D-タガトース非添加群をコントロールとした. (B) 菌体に対する EPS の相対量. サンプルあたり 10 視野を CLSM でランダムに記録し, Imaris ソフトウェアを用いて EPS の相対量を算出した. ** $p < 0.01$.

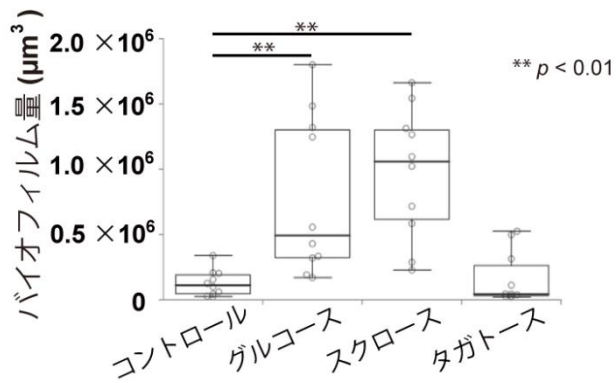
A) *S. mutans* OMZ175



C) *S. mutans* UA159



B) *S. mutans* OMZ175



D) *S. mutans* UA159

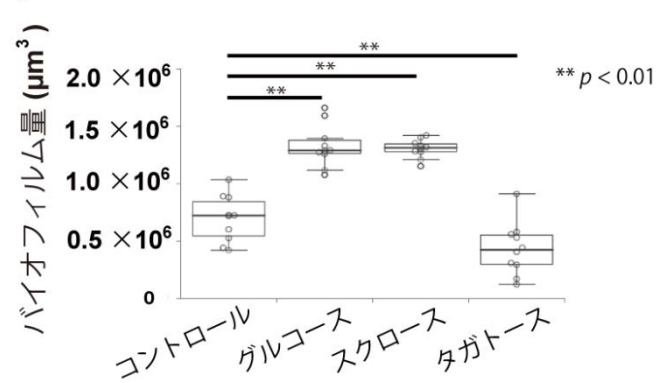
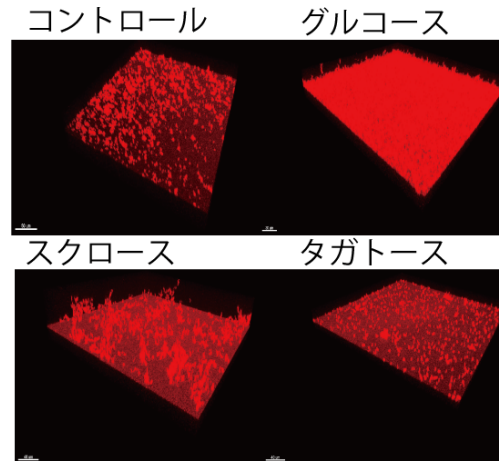


図7 D-タガトースが *S. mutans* のバイオフィーム形成に及ぼす影響

(A, C) 異なる糖質存在下での OMZ175 株および UA159 株のバイオフィーム像。HI で生染色された各菌株を、炭素源として、0.8% スクロース、0.8% D-グルコース、0.8% D-タガトースのいずれかを添加した CDM 中で 24 時間培養した後、CLSM でバイオフィームを観察した。糖質非添加 CDM 中での培養群をコントロールとした。(B, D) *S. mutans* のバイオフィーム定量値。サンプルあたり 10 視野を CLSM でランダムに記録し、Imaris ソフトウェアを用いて、バイオフィーム形成量を算出した。** $p < 0.01$ 。

A) *S. gordonii* DL1



B) *S. gordonii* DL1

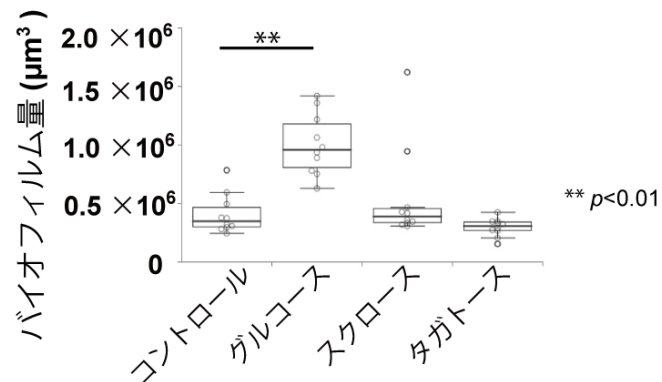
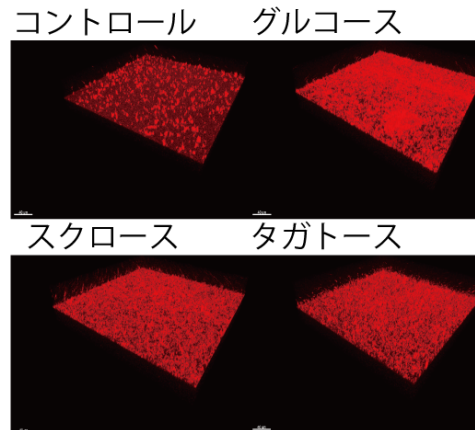


図8 D-タガトースが *S. gordonii*DL1 のバイオフィーム形成に及ぼす影響

(A) 異なる糖質存在下での *S. gordonii* DL1 のバイオフィーム像。HI で生染色された各菌株を、炭素源として、0.8% スクロース、0.8% D-グルコース、0.8% D-タガトースのいずれかを添加した CDM 中で 24 時間培養した後、CLSM でバイオフィームを観察した。糖質非添加 CDM 中での培養群をコントロールとした。(B) *S. gordonii*DL1 のバイオフィーム定量値。サンプルあたり 10 視野を CLSM でランダムに記録し、Imaris ソフトウェアを用いて、バイオフィーム形成量を算出した。 ** $p < 0.01$.

A) *S. oralis* ATCC9811



B) *S. oralis* ATCC9811

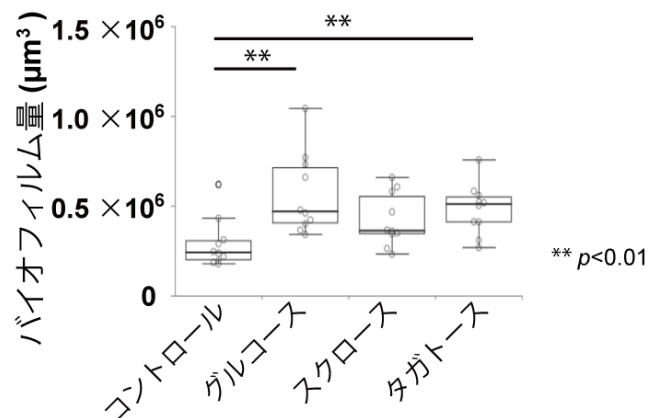


図9 D-タガトースが *S. oralis* ATCC9811 株のバイオフィルム形成に及ぼす影響

(A) 異なる糖質が存在下での *S. oralis* ATCC9811 株のバイオフィルム像. HI で生染色された各菌株を, 炭素源として, 0.8% スクロース, 0.8% D-グルコース, 0.8% D-タガトースのいずれかを添加した CDM 中で 24 時間培養した後, CLSM でバイオフィルムを観察した. 糖質非添加 CDM 中での培養群をコントロールとした. (B) *S. oralis* ATCC9811 のバイオフィルム定量値. サンプルあたり 10 視野を CLSM でランダムに記録し, Imaris ソフトウェアを用いて, バイオフィルム形成量を算出した. ** $p < 0.01$.

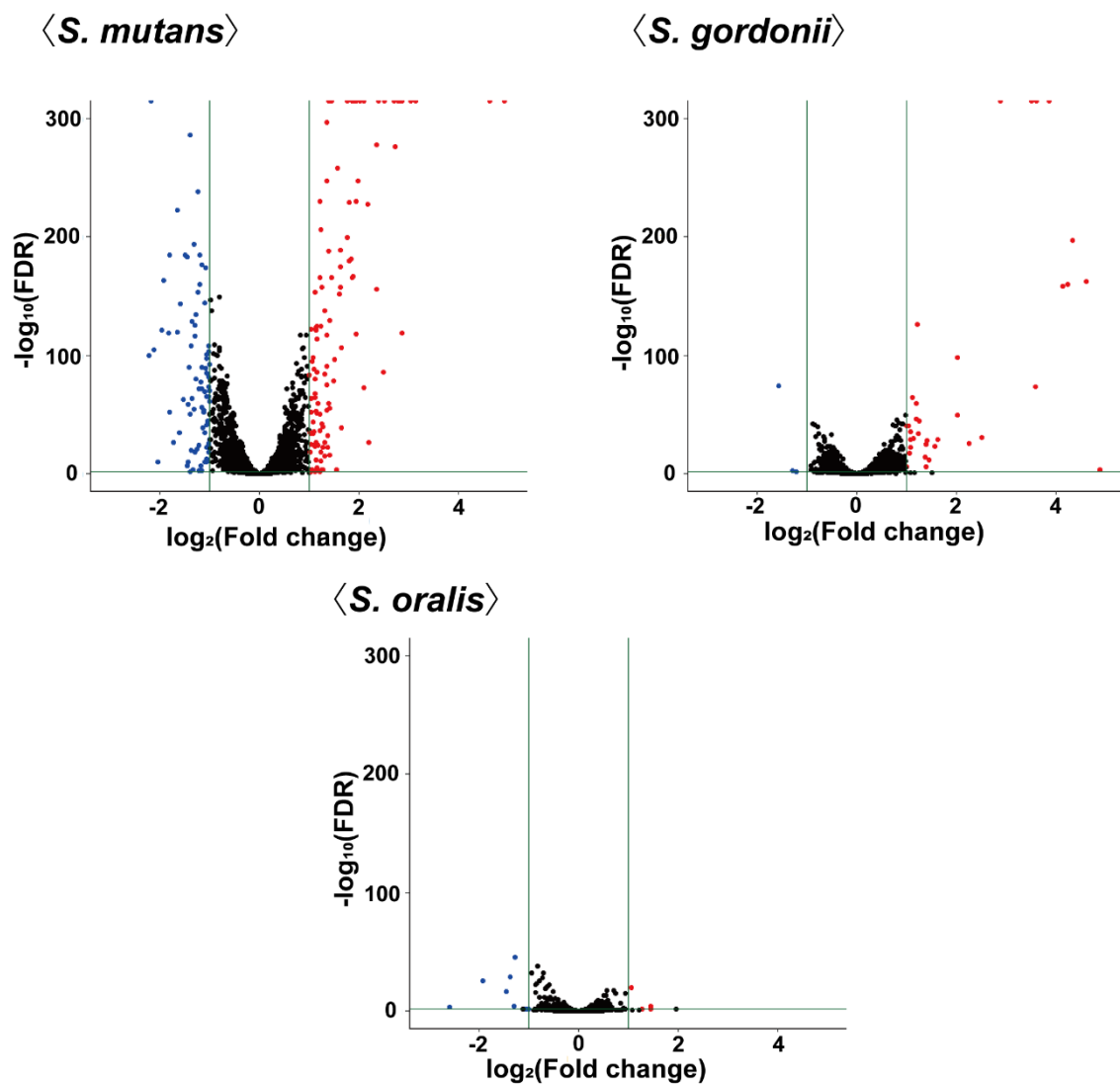


図 10 各菌における D-タガトースによる発現変動遺伝子の概要

S. mutans, *S. gordonii*, *S. oralis* の 5% D-タガトースによる遺伝子発現の変動をボルケーノプロットで示す。ボルケーノプロットでは、X 軸は $\log_2(\text{Fold change: FC})$ 、Y 軸は $-\log_{10}(\text{FDR})$ を表す。縦の緑線は $\log_2(\text{FC}) = 1$ 、横の緑線は $\text{FDR} = 0.05$ を示す。赤い点と青い点は、 $\text{FDR} < 0.05$ かつ $|\log_2(\text{FC})| > 1$ の DEGs を表す。

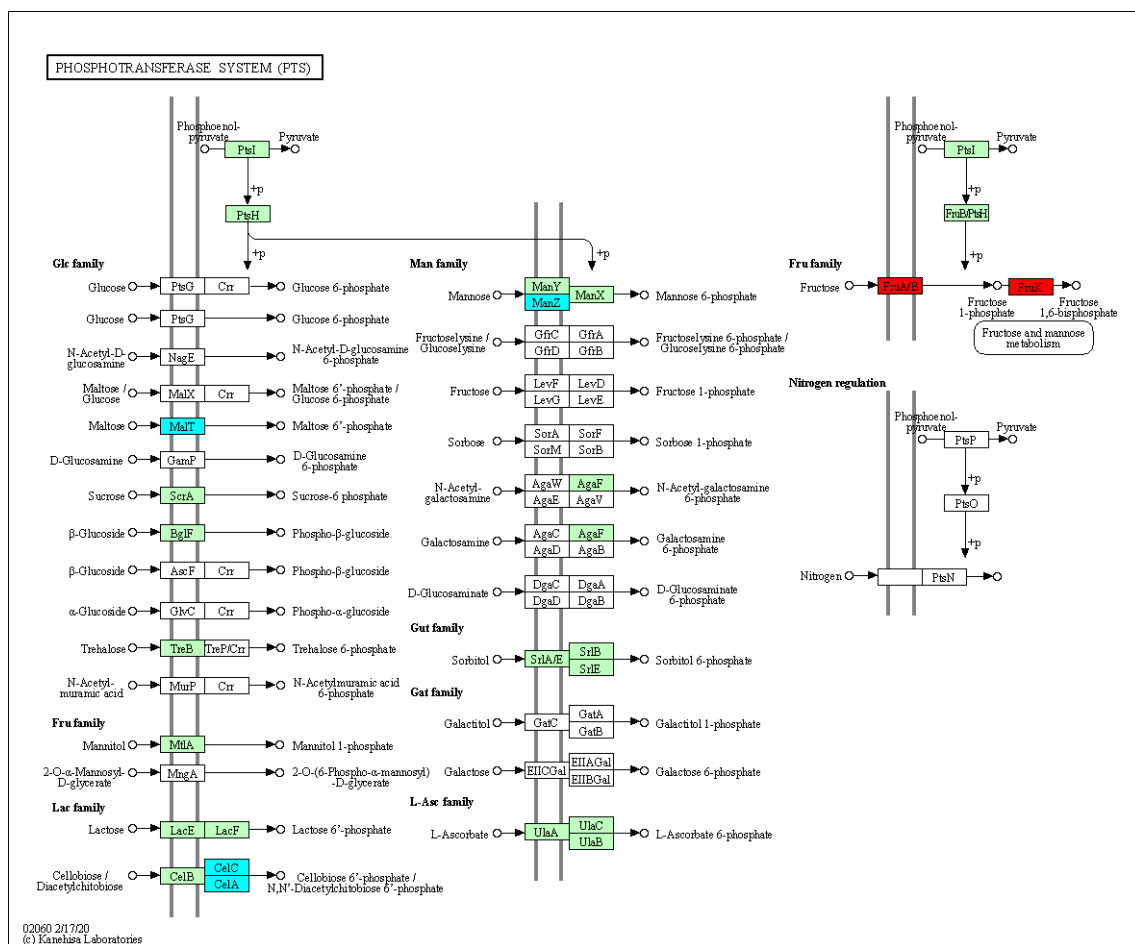


図 11 *S. mutans* の PTS 関連 パスウェイ解析

KEGG Mapper (<http://www.genome.jp/kegg/mapper.html>) を用いて、*S. mutans* の PTS 経路を示した図。カラーボックスはアノテーションされた遺伝子を表している。*S. mutans* 遺伝子のうち、DEGs として抽出された遺伝子を対象に解析を実施した。赤はアップレギュレートした遺伝子 ($FDR < 0.05$ かつ $\log_2(FC) > 1$) を、青はダウンレギュレートした遺伝子 ($FDR < 0.05$ かつ $\log_2(FC) < -1$) をそれぞれ表す。

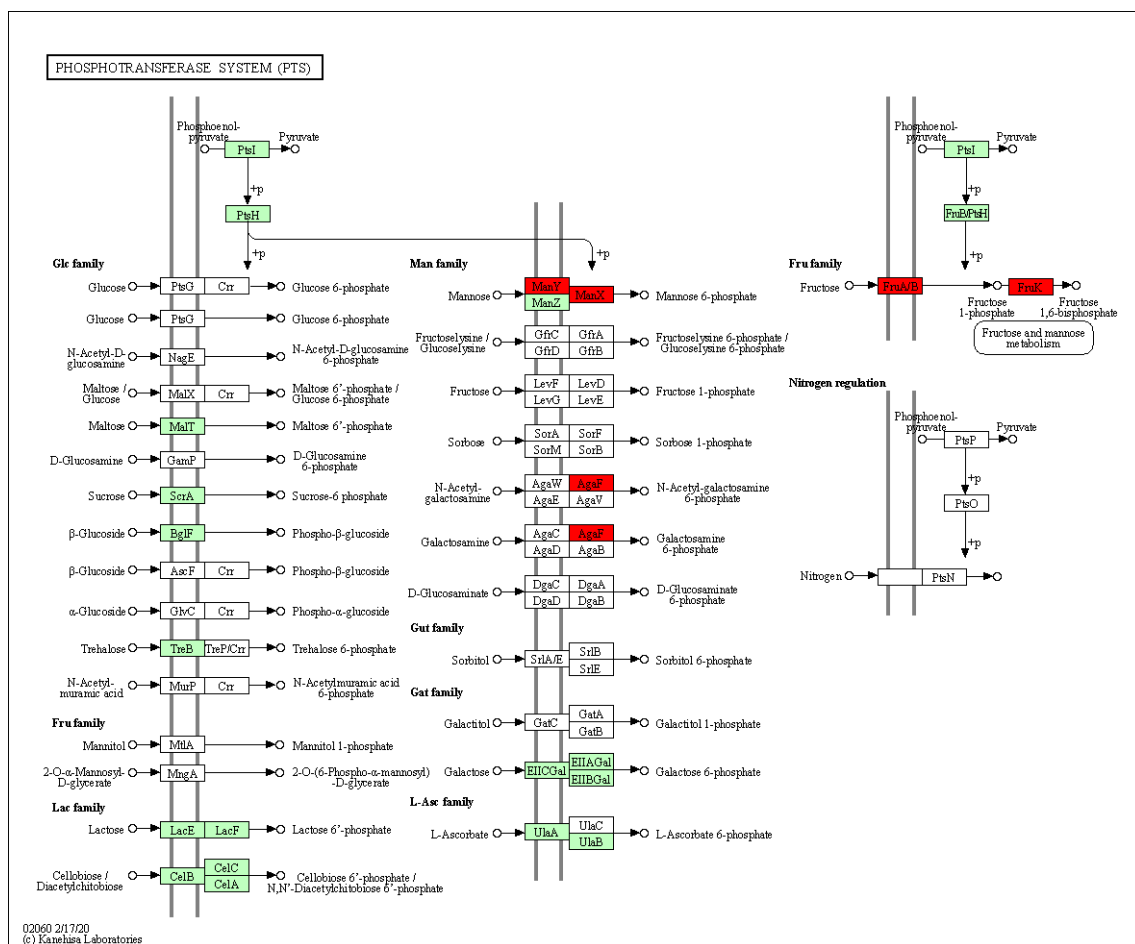


図 12 *S. gordonii* の PTS 関連パスウェイ解析

KEGG Mapper (<http://www.genome.jp/kegg/mapper.html>) を用いて, *S. gordonii* の PTS 経路を示した図. カラーボックスはアノテーションされた遺伝子を表している. *S. gordonii* 遺伝子のうち, DEGs として抽出された遺伝子を対象に解析を実施した. 赤はアップレギュレートした遺伝子 ($FDR < 0.05$ かつ $\log_2(FC) > 1$) を表す.

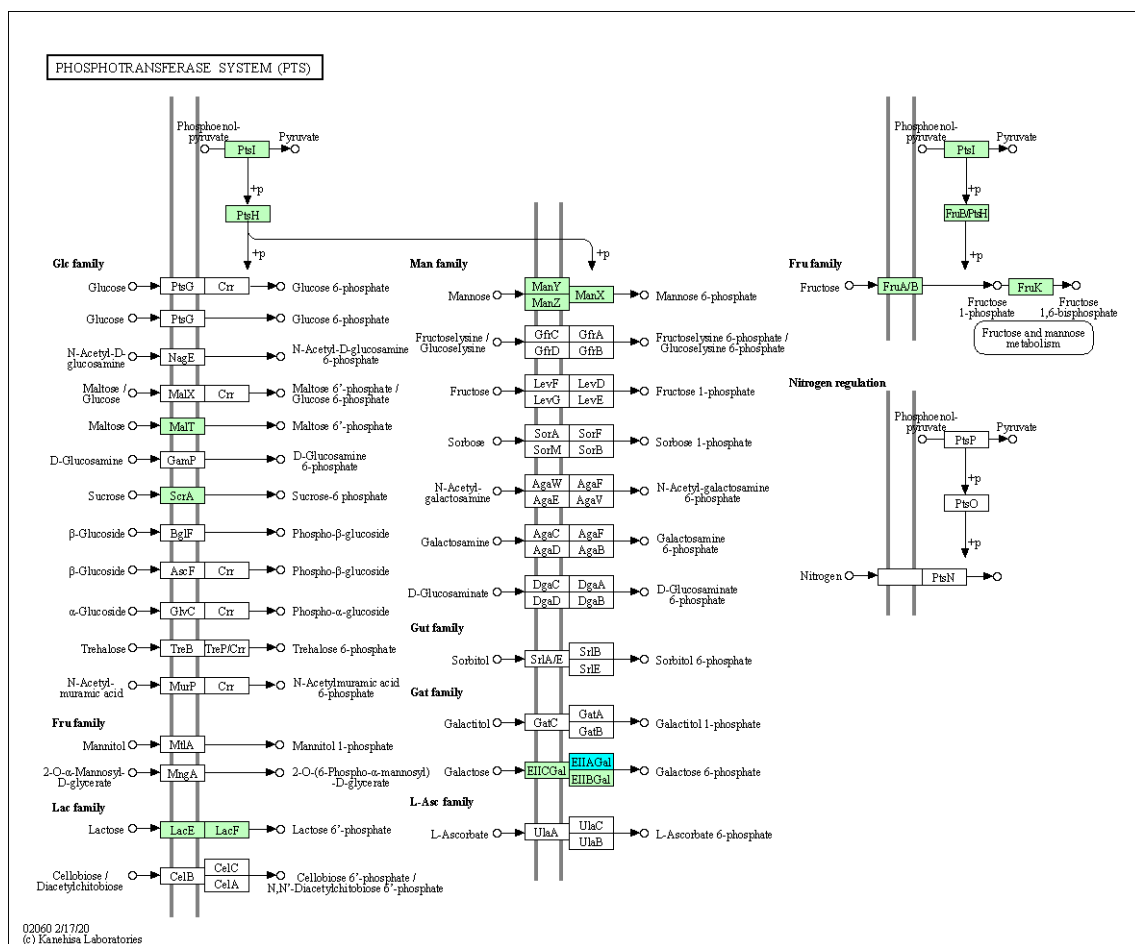


図 13 *S. oralis* の PTS 関連パスウェイ解析

KEGG Mapper (<http://www.genome.jp/kegg/mapper.html>) を用いて、*S. oralis* の PTS 経路を示した図。カラーボックスはアノテーションされた遺伝子を表している。*S. oralis* 遺伝子のうち、DEGs として抽出された遺伝子を対象に解析を実施した。青はダウンレギュレートした遺伝子 ($\text{FDR} < 0.05$ かつ $\log_2(\text{FC}) < -1$) を表す。

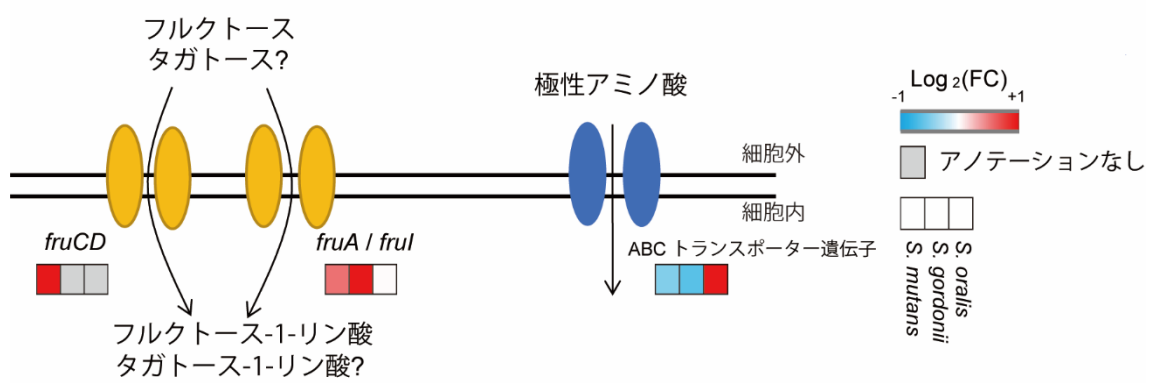


図 14 各菌のトランスポーター遺伝子の発現状態

各菌における Fru-PTS および極性アミノ酸 ABC トランスポーターの遺伝子発現量を示す。3つの四角は、*S. mutans* (左)、*S. gordonii* (中央)、*S. oralis* (右) の各遺伝子の D-タガトースによる発現変動量を色で表す。

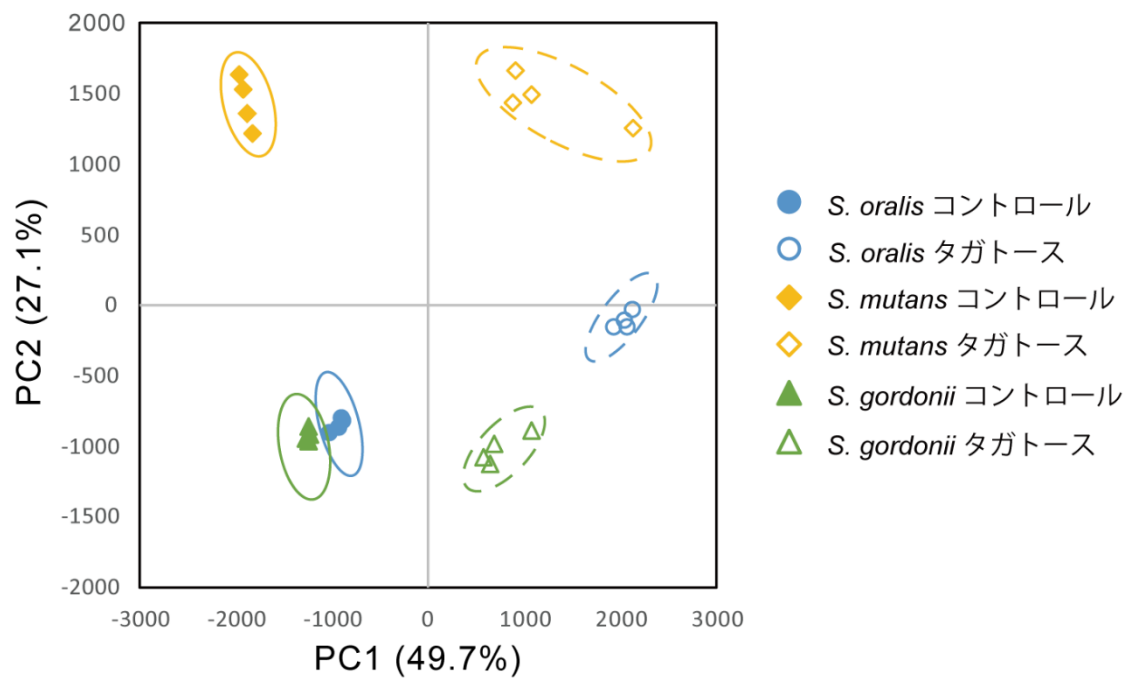


図 15 各菌における菌体内メタボロームの主成分分析

S. mutans, *S. gordonii*, *S. oralis* の 5% D-タガトースによるメタボロームの変化を主成分分析にて示す。第一主成分 (Principal component 1: PC1) 及び第二主成分 (Principal component 2: PC2) に関するプロットを示す。括弧内の数値はその主成分の寄与率を表す。

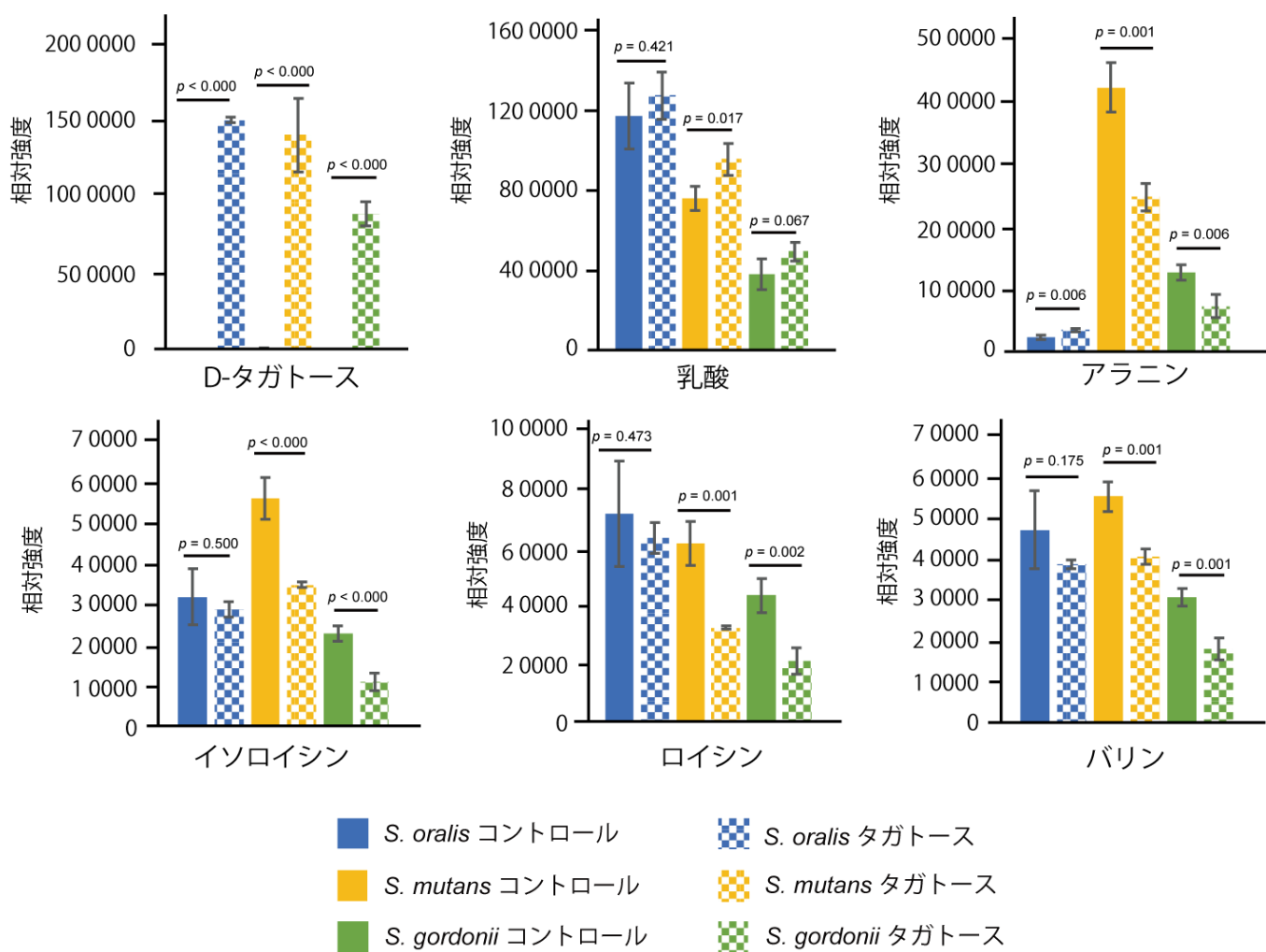


図 16 各菌における D-タガトースおよびピルビン酸下流代謝物の菌体内量

S. mutans, *S. gordonii*, *S. oralis* を、0.2% D-グルコース含有 CDM に 5% D-タガトースを添加した培地中で 3 時間培養した後、菌体より代謝物を抽出し、GC/MS で測定した。生育段階の違いによる影響を最小限に抑えるため 培養を開始する前に OD₆₀₀ 値を 0.8 に設定した。棒グラフは平均値±S.D.を表す (n = 4)。p 値は Student の t 検定で求めた。

