

【原 著】

2型糖尿病マウスの肝臓における霊芝菌糸体培養培地抽出物 (WER) の糖質代謝に与える影響

Influence of a Water-Soluble Extract from Culture Medium of *Ganoderma lucidum* Mycelia (WER) on Carbohydrate Metabolism in the Liver of Type 2 Diabetic Mice

神内伸也¹, 新藤由梨¹, 内海有香¹, 岩田直洋¹, 岡崎真理¹,
鈴木史子², 飯塚 博², 浅野 哲³, 松崎広和¹, 日比野康英^{1,*}
Shinya KAMIUCHI¹, Yuri SHINDO¹, Yuka UTSUMI¹, Naohiro IWATA¹,
Mari OKAZAKI¹, Fumiko SUZUKI², Hiroshi IIZUKA², Satoshi ASANO³,
Hirokazu MATSUZAKI¹, Yasuhide HIBINO^{1,*}

¹ 城西大学薬学部

² 野田食菌工業株式会社

³ 国際医療福祉大学薬学部

【要 旨】

【目的】 霊芝菌糸体培養培地抽出物 (WER) の長期摂取による 2 型糖尿病マウスの血糖上昇抑制作用を明らかにするために、本研究では肝臓での糖質代謝について検討した。

【方法】 KK-*A^y* マウスに WER を混合した飼料を自由摂取させ、8 週間飼育した。飼育終了後の肝臓における糖代謝関連酵素の発現量および酵素活性を解析した。さらに、グリコーゲン量を測定するとともに、GLUT2 発現量および AMP キナーゼ (AMPK)、グリコーゲン合成酵素キナーゼ 3β の活性化の有無を検討した。

【結果】 WER は、糖新生酵素のグルコース-6-ホスファターゼ、ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ mRNA 量および酵素活性をともに減少させ、解糖系酵素であるグルコキナーゼを増加させた。さらに、GLUT2 の発現量を亢進させるとともに、グリコーゲン合成酵素を活性化してグリコーゲン量を増加させ、加えて AMPK を活性化することから、WER は肝臓での糖新生を抑制するとともに解糖系およびグリコーゲン合成を活性化さ

せ、さらに肝臓への糖の輸送能を亢進して血糖上昇を抑制するものと考えられた。

【キーワード】

霊芝菌糸体培養培地抽出物 (WER)、2 型糖尿病、糖代謝酵素、AMP キナーゼ、KK-*A^y* マウス

はじめに

2 型糖尿病は、遺伝因子や環境因子が相互に作用することによって生じる慢性の高血糖状態を主徴とする代謝疾患である。高血糖状態が継続すると、心血管疾患などの大血管障害の発症率が高くなることから、合併症による生活の質 (QOL) が低下するのみならず、生命へ深刻な影響を及ぼす。また、糖尿病性腎症、糖尿病性網膜症、糖尿病性神経症といった細小血管合併症の発症率の上昇や高血圧、脂質異常症と協働した動脈硬化性病変も増加し、生活習慣病対策に関わる医療費の増加を招く原因となり、これら病態の改善が喫緊の課題となっている。

受理日: 2014 年 2 月 10 日

* 〒350-0295 埼玉県坂戸市けやき台 1-1 Tel: 049-271-7285 Fax: 049-271-7284 E-mail: seitaib@josai.ac.jp

近年、糖尿病予防の観点から、血糖上昇抑制作用を有する食品成分や生薬成分の研究が行われている^{1,2)}。霊芝菌糸体培養培地抽出物 (WER) は、マンネンタケ (*Ganoderma lucidum*) の菌糸体を固形培地に接種し、子実体発生直前に菌糸体が繁茂した培地ごと破碎し、熱水抽出・噴霧乾燥したもので、滋養強壯を目的とした健康食品として長く用いられている。マンネンタケあるいはその成分は、非常に広範な生理的活性を有しており、免疫調節作用³⁾ や抗悪性腫瘍作用⁴⁾、抗ウイルス作用⁵⁾、コレステロール低下作用⁶⁾、抗酸化作用⁷⁾などが報告されており、加えて血糖上昇抑制作用についてもいくつかの報告がなされている^{8,9)}。

我々は、これまでに WER が 2 型糖尿病モデルマウスである KK-*A*^y マウスにおいて、 α -グルコシダーゼ阻害作用による食後過血糖改善効果を示すことを明らかにしている¹⁰⁾。さらに、WER が KK-*A*^y マウスへの長期投与において血糖上昇抑制作用を示し、その作用メカニズムに骨格筋及び脂肪細胞におけるグルコース輸送担体 (GLUT) 4 の膜移行促進作用があることも明らかにしている¹¹⁾。一方、血糖上昇抑制には、肝臓が糖代謝の恒常性を維持する上で重要な役割を果たしていることが報告されているものの、WER の肝臓での糖質代謝への影響については未だ検討されていない。

本研究では、高脂肪飼料を負荷した 2 型糖尿病モデル動物である KK-*A*^y マウスを用いて、WER の肝臓での糖質代謝への影響を検討した。

材料・方法

1. 実験材料

本研究では、WER として野田食菌工業 (株) において製造された「MAK」を使用した。MAK は、霊芝菌糸体ペレットをバガス (砂糖キビ搾汁残渣) と脱脂した米糠の混合固形培地に接種し、約 3.5 ヶ月間培養後、子実体発生直前に培地ごと破碎し、蒸留水で懸濁、熱水抽出したもので、抽出物を珪藻土上で濾過した後、メンブランフィルター (0.45 μ m) にて濾過滅菌し、濾液の噴霧乾燥品である。

2. 実験動物

雌性 KK-*A*^y マウス (6 週齢, 日本クレア (株), 東京) を温度 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 10\%$ 、照度サイクル 12 時間 (明期 7:00~19:00) の環境下、固形飼料 (CE-2, 日本クレア (株)) および水を自由に摂取させ馴化させた。1 週間の予備飼育後、Control 群は高脂肪飼料 (Quick Fat, 日本クレア (株)), WER 群は 0.5% WER 含有高脂肪飼料

とし、自由摂取により 8 週間飼育した。さらに対照群として、ピオグリタゾン (10 mg/kg; アクトス錠 15, 武田薬品工業 (株), 大阪) もしくは、メトホルミン (50 mg/kg; SIGMA, St. Louis, MI) を Control 群の飼育 6 週目より 1 日 1 回、2 週間経口投与した。すべての動物実験は、環境省の「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」および「城西大学動物実験規定」に従って行った。

3. 血糖値の測定

マウスの尾静脈より血液を採取し、血糖値測定用の検体とした。血糖値の測定には簡易型血糖値測定器 (デキスター ZII, バイエル薬品, 大阪) を用いた。

4. Total RNA の調製および Real Time RT-PCR

マウスを 8 週間飼育後、肝臓組織から Total RNA をプロトコールに従って RNeasy Plus Micro kit (Qiagen, Valencia, CA) を用いて調製した。cDNA への逆転写反応は、Prime Script RT reagent Kit (タカラバイオ (株), 大津) を用いた。500 ng の Total RNA を鋳型として、Random 6 mers, Oligo dT Primer, RT Enzyme, dNTP mixture 存在下、 37°C で 15 分間、 85°C で 5 秒間反応させ cDNA を合成した。mRNA 発現量の定量には、SYBR premix Ex Taq (タカラバイオ (株)) を用いた。10 ng の cDNA サンプルにプライマー (それぞれ 0.2 μM) および Real Time PCR 反応液 (SYBR premix Ex Taq) を加えて、iCycler thermal cycler (Bio-Rad, Hercules, CA) により Real Time PCR を行った。反応は、 95°C で 10 秒間処理した後、 95°C で 5 秒、 55°C で 15 秒、 72°C で 15 秒を 40 サイクル行い、蛍光量の増加を経時的に検出した。また、同様の条件下で β -actin を内部標準として用いた。用いたプライマーを表に示した (表 1)。

5. 糖代謝酵素の活性測定

5.1 グルコキナーゼ (Gck) 活性

肝臓重量に対して氷冷した緩衝液 [50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 100 mM KCl, 1 mM EDTA, 10 mM 2-メルカプトエタノール] を 9 倍容加え、ポリトロンホモジナイザーで粉碎した。組織懸濁液を $15,000 \times g$, 4°C で 1 時間遠心した。上清 10 μl に反応液 [1 mM NADP, 5 mM ATP, 100 mM グルコース, 7.5 mM MgCl_2 , 100 mM Tris-HCl (pH 7.4)] を加え 1 ml に調製した。さらに、グルコース 6-リン酸脱水素酵素 (5.5 units; 和光純薬工業 (株), 大阪) を加えて、 37°C で 5 分間反応させた。反応後、340 nm の波長の吸収を測定した^{12,13)}。

5.2 グルコース-6-ホスファターゼ (G6Pase) 活性

肝臓重量に対して氷冷したスクロース溶液 (250 mM)

表1 プライマー配列

gene	Sence primer	Antisence primer
<i>β-actin</i>	CATCCGTAAGACCTCTATGCCAAC	ATGGAGCCACCGATCCACA
<i>Gck</i>	TACGACCGGATGGTGGATGA	ACCAGCTCGCCCATGTACTTTC
<i>G6pase</i>	GGATCCTGGGACAGACACACAA	TGTCAACACCTCTGGCCTCAC
<i>Fbpase</i>	CCTTAATGAGGGTTATGCCAAGGAC	GGTGAATATCAGCCACCATGGAC
<i>Pepck</i>	TGACCCTGCCTGGGAATCTC	TCTCATGGCTGCTCCTACAAACAC
<i>Glut2</i>	ATCAACATGATCTCACGGCTGTC	TGGCAGTCATGCTCACGIAACTC

All sequences are shown in 5' to 3' direction

を20倍容加え、ポリトロンホモジナイザーで粉碎した。0.1 ml の組織懸濁液に 250 mM スクロース/1 mM EDTA, 100 mM グルコース 6-リン酸, 100 mM イミダゾール (pH 6.5) をそれぞれ 0.1 ml 加えて、37°C で 15 分間反応させた。反応後、トリクロロ酢酸：アスコルビン酸 (10% : 3%, w/v) を 2 ml 加えて、625 × g, 10 分間、4°C で遠心した。さらに、上清 1 ml にモリブデン酸アンモニウム (1%, w/v) を 0.5 ml, クエン酸 (2%, w/v) を 1 ml 加え、700 nm の波長の吸収を測定した¹⁴⁾。

5.3 ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ (PEPCK) 活性

肝臓重量に対して氷冷した緩衝液 [0.1 M Tris-HCl (pH 7.4), 0.02 M EDTA, 2 mM DTT] を 20 倍容加え、ポリトロンホモジナイザーで粉碎した。組織懸濁液を 15,000 × g, 4°C で 30 分間遠心した。上清 10 μl に反応液 [50 mM HEPES (pH 7.0), 50 mM NaHCO₃, 1 mM MnCl₂, 0.25 mM NADH, 1 mM イノシンニリン酸, 2 mM ホスホエノールピルビン酸] を加え 1 ml に調製した後、37°C で 10 分間反応させた。さらに、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ (7.7 units; 和光純薬工業 (株)) を加え、350 nm の波長の吸収を測定した¹⁵⁾。

5.4 フルクトース-1,6-ビスホスファターゼ (FBPase) 活性

肝臓重量に対して氷冷したスクロース溶液 (250 mM) を 20 倍容加え、ポリトロンホモジナイザーで粉碎した。0.1 ml の組織懸濁液に反応液 [100 mM Tris-HCl (pH 7.4), 100 mM MgCl₂, 100 mM KCl, 1 mM EDTA, 50 mM フルクトース 6-リン酸 (和光純薬工業 (株))] を加え 2 ml に調製した後、37°C で 5 分間保温した。反応後、10% トリクロロ酢酸を 1 ml 加え、625 × g, 4°C で 10 分間遠心した。上清 500 μl にモリブデン酸アンモニウム (1%, w/v) を 250 μl, クエン酸 (2%, w/v) を 500 μl 加え、680 nm の波長の吸収を測定した¹⁶⁾。

6. アントロン硫酸法による肝グリコーゲン量の解析

肝臓 250 mg に対して氷冷した 10% トリクロロ酢酸を 500 μl 加え、水中にてポリトロンホモジナイザーで粉碎

した。組織懸濁液を 1,300 × g, 4°C で 10 分間遠心し、上清を 15 ml チューブに移した。残渣に 5% トリクロロ酢酸を 500 μl 加え、再び氷中で粉碎し、1,250 × g, 4°C で 10 分間遠心して上清を先述のチューブに移した。回収した上清に蒸留水を加え 10 ml に調製した。この溶液 500 μl に 95% エタノールを 1 ml, KCl 20 mg を加え、溶解するまで 100°C で保温した。室温まで冷却した後、1,300 × g, 4°C で 30 分間遠心した。上清を除去後、沈澱に 80% エタノールを 1 ml 加え、再度 1,300 × g, 4°C で 30 分間遠心した。上清を除き、残った沈澱に蒸留水を 10 ml 加え攪拌し試験溶液とした。氷中でアントロン硫酸 [アントロン (0.2%, w/v); 和光純薬工業 (株) / 水 : 濃硫酸 = 2 : 5] 2.5 ml と試験溶液 500 μl を加え攪拌し、沸騰水浴中で 10 分間加温した後、5 分間水中で冷却して、620 nm の波長の吸収を測定した^{17,18)}。グリコーゲン量は、グルコース標準品について同様の操作を行い、作成された検量線より算出した。

7. 肝臓組織の細胞抽出液の調製とウエスタンブロット

肝臓 5 mg に対して 500 μl の緩衝液 [20 mM Tris-HCl (pH 7.8), 0.5 mM phenylmethyl sulphonyl fluoride (PMSF), 300 mM NaCl, 2 mM EDTA (pH 8.0), 2 mM DTT, 2% NP-40, 0.2% sodium dodecyl sulfate (SDS), 0.2% sodium deoxycholate, 50 mM NaF, 25 mM sodium pyrophosphate, 2 mM Na₃VO₄, 40 mM β-glycerophosphate, protein inhibitor mixture (和光純薬工業 (株)), 0.1% phosphatase inhibitor cocktail 1 (P2850-1ML, SIGMA), 0.1% phosphatase inhibitor cocktail 2 (P5726-1ML, SIGMA)] を加え、ポリトロンホモジナイザーで粉碎した。組織懸濁液を 1,300 × g, 4°C で 10 分間遠心した後、上清を再度 12,000 × g, 4°C で 15 分間遠心し、得られた上清を細胞抽出液とした¹⁹⁾。

電気泳動用サンプルの調製は、30 μg の細胞抽出液に、1% SDS および 50 mM DTT を含む溶液に懸濁・溶解させ、SDS-polyacrylamide (10%) gel で電気泳動した。常法に従って PVDF 膜に転写した後、5% スキムミルクで 1 時間処理し、1 次抗体として抗 GLUT2 抗体 (1 : 200; H-67, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), 抗 β-actin 抗体

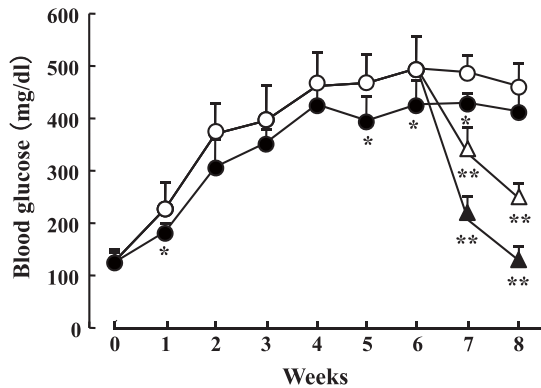


図1 血糖値に及ぼす WER の影響

1 週間の馴化後、7 週齢時より週 1 回血糖値を測定した。○対照群 (Control), ● WER 群 (WER), △ピオグリタゾン群 (Pioglitazone), ▲メトホルミン群 (Metformin) を示した。各値は、平均値±標準偏差 (SD) で示した。(n = 4-6) ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ vs. Control group

(1 : 5000; A2228, SIGMA), 抗phospho-AMPK α (Thr172) 抗体 (1 : 100; #4188, Cell Signaling Technology, Danvers, MA), 抗 AMPK α 抗体 (1 : 1000; #2532, Cell Signaling Technology), 抗 phospho-GSK3 β (Ser9) 抗体 (1 : 500; #9322, Cell Signaling Technology), 抗 GSK3 β 抗体 (1 : 200; #9315, Cell Signaling Technology) を 4°C で 1 時間作用させた。2 次抗体として抗 HRP conjugated donkey anti-rabbit IgG 抗体 (1 : 1000; GE Healthcare, Buckinghamshire, England) あるいは抗 HRP conjugated donkey anti-mouse IgG 抗体 (1 : 5000; GE Healthcare) を 1 時間作用させた。その後、ECL Plus ウェスタンブロットング検出システム (GE Healthcare) を用いて解析した。

8. 統計処理

データは、全て平均値±標準偏差として表示した。群間の統計学的有意差は、等分散検定の後、 t 検定により検定した。

結 果

1. KK- A^y マウスにおける WER の血糖上昇抑制効果

KK- A^y マウスに WER を混合した高脂肪飼料を 8 週間自由摂取させ、血糖値の推移を対照群と比較した (図 1)。飼料摂取前の血糖値は約 120 mg/dl であったが、高脂肪飼料負荷後は徐々に上昇し、対照群では 4 週間後に約 480 mg/dl を示した。WER 群においても血糖値の上昇が認められたものの、対照群と比較して WER 摂取 1 週間から上昇抑制が認められ、4 週間後より血糖値は約 400 mg/dl を推移した。一方、ピオグリタゾン、メトホルミンを対照群に 6 週間後より投与したが、薬剤投与 2 週

間で Control 群と比較して著しく低下した。因みに、データは示さないが、対照群、WER 群およびピオグリタゾン群の体重の変動は認められなかったが、メトホルミン群は飼育 8 週目において有意に減少した。

2. 糖代謝酵素遺伝子の mRNA 発現量および酵素活性に及ぼす WER の影響

解糖系酵素 *Gck*, 糖新生酵素 *G6pase*, *Pepck*, *Fbpase* の mRNA 発現量を Real Time RT-PCR 法により解析した (図 2)。*Gck* は、WER 群、ピオグリタゾン群で対照群と比較して共に 30% 有意に増加した。*G6pase* では、WER 群、ピオグリタゾン群でそれぞれ、31%、49%、*Pepck* ではそれぞれ 32%、35% 有意に減少した。また、*Fbpase* では WER 群、ピオグリタゾン群、メトホルミン群でそれぞれ 29%、35%、62% 有意に増加した。さらに各酵素の活性をそれぞれの酵素活性測定法により測定した (図 3)。*Gck* 活性は、WER 群、ピオグリタゾン群で対照群と比較して 33%、18% 有意に上昇した。*G6Pase* 活性は、WER 群、メトホルミン群でそれぞれ 16%、20% 有意に低下した。*PEPCK* 活性は、WER 群、ピオグリタゾン群で対照群と比較してそれぞれ 13%、28% 有意に低下した。*FBPase* 活性では、WER 群で 40% 有意な上昇が認められた。

3. 肝グリコーゲン量に及ぼす WER の影響

肝臓のグリコーゲン量をアントロン硫酸法により測定した結果、WER 群は対照群と比較して約 25% 有意に増加したものの、両薬剤群では有意な差は認められなかった (図 4)。

4. GLUT2 発現に及ぼす WER の影響

肝臓での糖輸送を担う GLUT2 mRNA (*Glut2*) 発現量を Real Time RT-PCR 法により (図 5A)、タンパク質量をウェスタンブロット法により解析した (図 5B)。*Glut2* 量は WER 群で対照群と比較して約 30% 有意に増加し、また GLUT2 タンパク質量でもほぼ同様の増加が認められた。一方、両薬剤群ではほとんど変動は認められなかった。

5. AMP キナーゼ (AMPK) に及ぼす WER の影響

WER は、*G6Pase* と *PEPCK* の遺伝子発現を抑制したことから、これら遺伝子発現抑制に関与する AMPK の活性化への WER の影響について、ウェスタンブロット法により検討した (図 6)。AMPK の活性化型であるリン酸化 AMPK 量は、ピオグリタゾン群、メトホルミン群と同様に WER 群で対照群と比較して増加した。

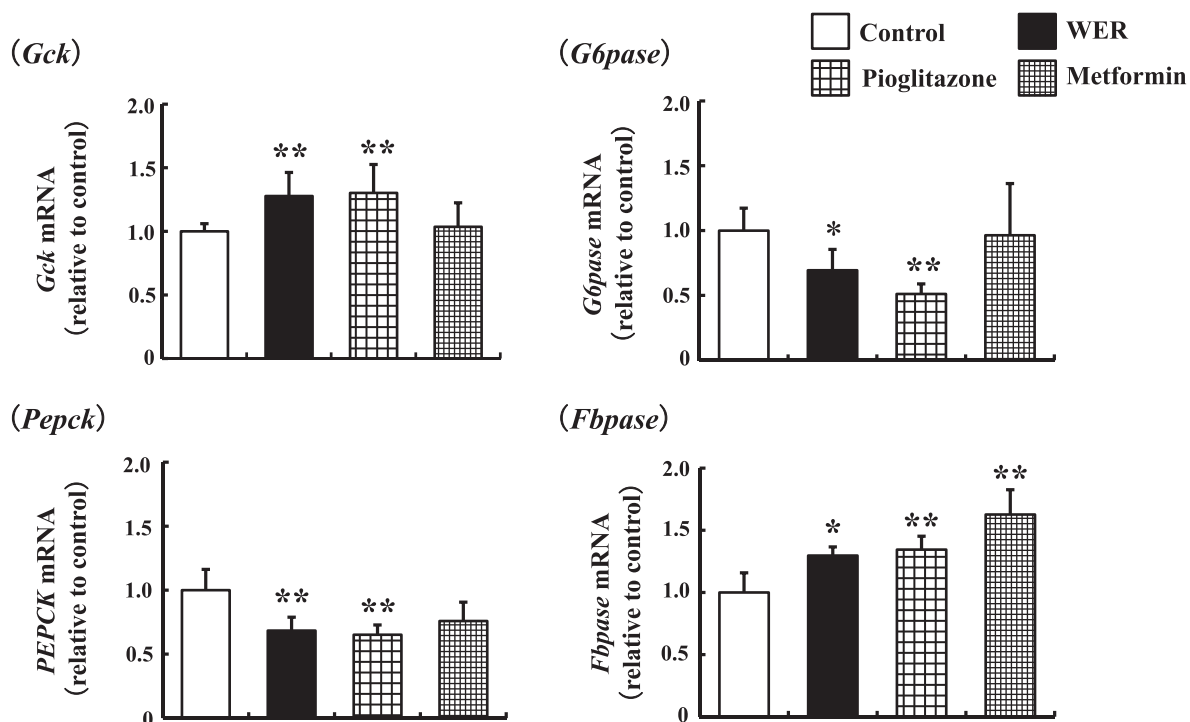


図2 糖代謝酵素遺伝子の mRNA 発現量

KK-*A^Y* マウス肝臓組織における糖代謝酵素として、グルコキナーゼ (*Gck*), グルコース-6-ホスファターゼ (*G6pase*), ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ (*Pepck*), フルクトース-1,6-ビスホスファターゼ (*Fbpase*) の mRNA 発現量を Real Time RT-PCR 法により解析した. 各酵素の mRNA 量は, Control 群のそれを 1 とした相対値で表し, 各値は, 平均値±標準偏差 (SD) で示した. (n = 4-6) ***p* < 0.01, **p* < 0.05 vs. Control group

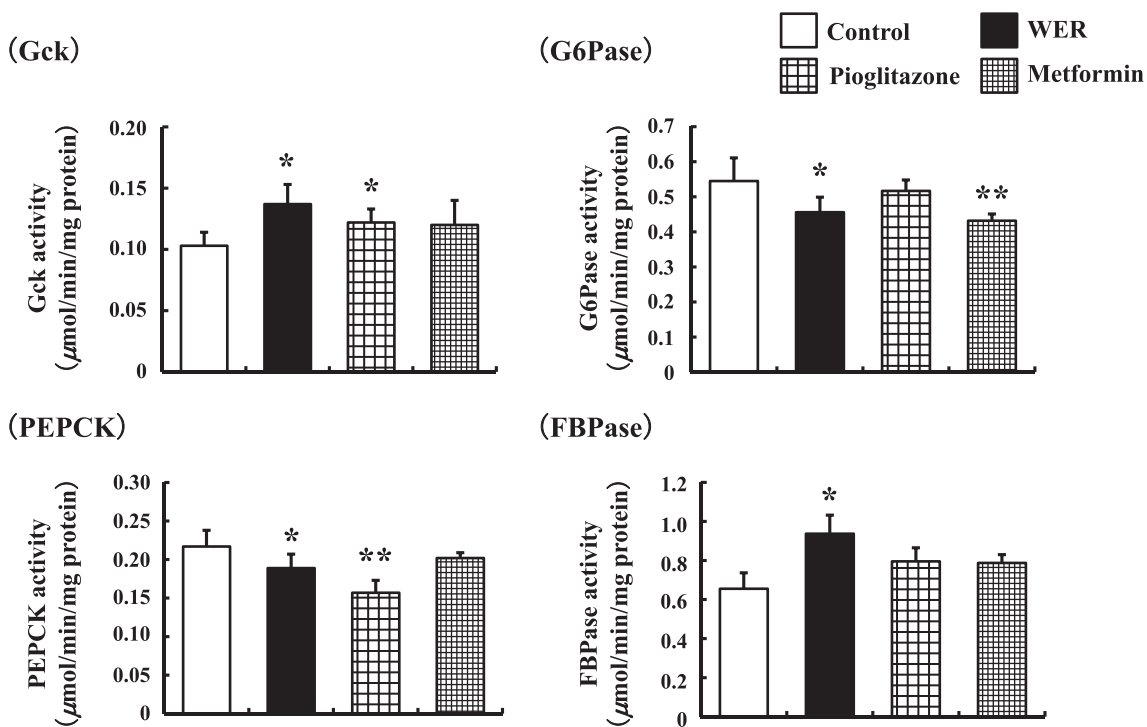


図3 糖代謝酵素の活性

KK-*A^Y* マウスの肝臓組織での *Gck*, *G6Pase*, *PEPCK*, *FBPase* 活性を, それぞれの活性測定法により測定した. 各値は, 平均値±標準偏差 (SD) で示した. (n = 4-6) ***p* < 0.01, **p* < 0.05 vs. Control group

6. GSK3 β に及ぼす WER の影響

WER は、肝グリコーゲン量を増加させたことから、グリコーゲン合成酵素の活性化に関与するグリコーゲン合成酵素キナーゼ 3 β (GSK3 β) のリン酸化への影響についてウエスタンブロット法により検討した (図 6)。その結果、WER 群でのみリン酸化 GSK3 β 量の増加が認められ、GSK3 β の不活性化によるグリコーゲン合成酵素の活性化が示唆された。

考 察

滋養強壯を目的とした健康食品として使用されている WER は、マンネンタケ菌糸体を固形培地に接種し、約 3.5 ヶ月培養後、子実体発生直前に培地と共に熱水抽出・噴霧乾燥したものであり、マンネンタケとは異なり菌糸体成分に加え、固形培地由来の成分からの分解物や自己消化産物が含まれる²⁰。WER の生理活性には、免疫賦活

作用²¹、抗腫瘍作用²²、抗うつ様作用²³などが報告されているが、我々は、WER が α -グルコシダーゼ阻害活性を有し、空腹時血糖に影響することなく正常血糖マウスにおけるマルトース負荷後の血糖上昇に対して抑制作用を示すこと²⁴、また、1 型糖尿病モデルであるストレプトゾトシン誘発糖尿病マウスの高血糖を改善することを明らかにしている²⁰。さらに、WER は 2 型糖尿病モデルマウス (KK-*A^y* マウス) への長期投与により、血糖上昇抑制作用を示し、その作用機序に骨格筋および脂肪組織での GLUT4 の膜移行促進作用があることを明らかにしている¹¹。しかし、WER の多岐にわたる作用の中で、2 型糖尿病における血糖値上昇の抑制に対して糖の取り込みの亢進だけでなく、肝臓における糖質代謝にも影響を及ぼすことが推察されることから、本研究では、KK-*A^y*

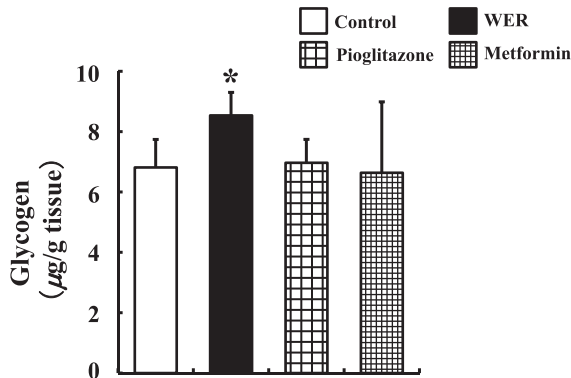


図 4 グリコーゲン量

KK-*A^y* マウス肝臓のグリコーゲン量を、アントロン硫酸法により測定した。各値は、平均値±標準偏差 (SD) で示した (n=4-6) **p*<0.05 vs. Control group

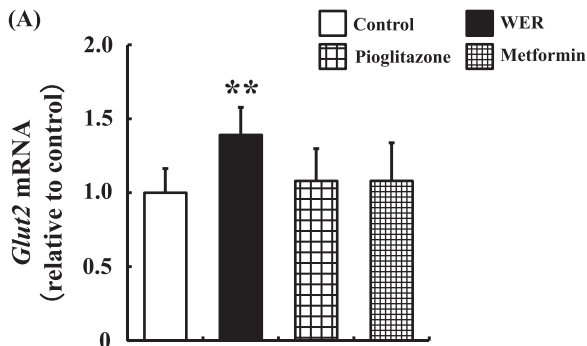


図 5 GLUT2 発現量

(A) KK-*A^y* マウス肝臓での *Glut2* mRNA 発現量を Real Time RT-PCR 法により解析した。 *Glut2* mRNA 量は、Control 群のそれを 1 とした相対値で表し、各値は、平均値±標準偏差 (SD) で示した。 (n=4-6)

***p*<0.01 vs. Control group (B) KK-*A^y* マウス肝臓での GLUT2 タンパク質発現量をウエスタンブロット法により解析した。各群の肝臓より抽出したタンパク質 30 μ g を、10% SDS-PAGE によって分離した。その後、PVDF 膜にブロットし、抗 GLUT2 抗体、抗 β -actin 抗体を作用させ、ECL を用いて検出した。

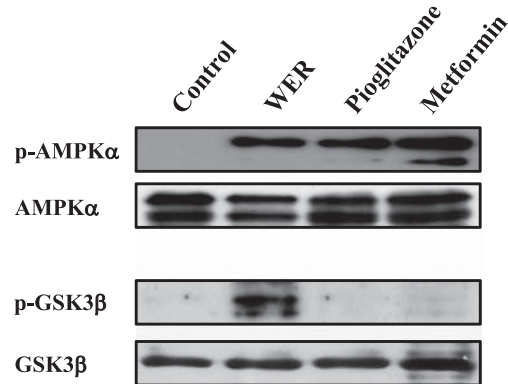
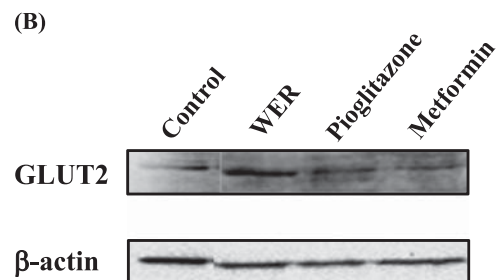


図 6 リン酸化 AMPK, GSK3 β タンパク質

KK-*A^y* マウス肝臓でのリン酸化 AMPK, GSK3 β タンパク質量を、ウエスタンブロット法により解析した。各群の肝臓より抽出したタンパク質 30 μ g を、10% SDS-PAGE によって分離した。その後、PVDF 膜にブロットし、抗 phospho-AMPK α 抗体、抗 AMPK α 抗体、抗 phospho-GSK3 β 抗体、抗 GSK3 β 抗体を作用させ、ECL を用いて検出した。



マウスにおける WER の肝糖質代謝への影響を検討した。

KK-*A'* マウスは、高血糖を早期に呈し、過食、肥満、高インスリン血症および血中アディポネクチンの低下を示す 2 型糖尿病自然発症モデルマウスである。本研究では、KK-*A'* マウスに WER を 0.5% 混合した高脂肪飼料を 8 週間摂取させたところ、飼育期間の経過に伴う血糖値の上昇抑制が認められ、一方、2 型糖尿病治療薬であるメトホルミン、ピオグリタゾンの両薬物投与群では、ともに投与直後から顕著な血糖値の低下を示した (図 1)。これらの結果は、WER が血糖の上昇抑制作用を有するもののその作用は薬物群と比較して緩やかなものであり、継続的な摂取によって急激な血糖低下による低血糖などの副作用を誘起しにくい食品であることを示唆している。

肝臓における血糖の調節は、肝細胞内外のグルコース濃度の差異によりグルコースの細胞内への吸収と血中への放出によって行われている。肝臓での糖の産生は、糖新生とグリコーゲン合成/分解のバランスの上で調節されている。特に、糖新生は肝細胞内の 3 つの酵素 (PEPCK, FBPase, G6Pase) により調節され、解糖系の Gck との協調により糖代謝が調節されていることから、本研究では、これら糖代謝酵素の mRNA 発現量および酵素活性を調査した。その結果、WER 群では、解糖系酵素 Gck の mRNA 発現量および活性が有意に増加していた。一方、糖新生酵素 G6pase と Pcpck の mRNA 発現量および酵素活性は有意に減少したが、Fbpase は有意に増加していた。これまでに、ピオグリタゾンやメトホルミンは、Pcpck, G6pase の発現を抑制することが報告されており^{25,26)}、本研究でも Pcpck, G6pase mRNA 発現量と共に酵素活性が減少していた。一方、Gck mRNA 発現量および酵素活性と、Fbpase mRNA 発現量および酵素活性は共に増加していた (図 2, 3)。これらの結果は、WER が解糖系を促進させ、糖新生を一部抑制することで血糖の上昇を抑制することを示唆しており、両薬物とほぼ同様の作用を有することが明らかとなった。

続いて、血糖の上昇抑制においてグリコーゲン合成による調節を検討した。その結果、WER はグリコーゲン量を増加させたが、両薬物群では有為な増加は認められなかった。従って、WER は、解糖系による代謝に加えてグリコーゲンとして貯蔵することで、血中への糖の放出を抑制しているものと考えられ、この点で両薬物とは作用が若干異なっていた (図 4)。ところで、インスリンによる肝臓でのグリコーゲン合成の促進は、GSK3 β がリン酸化されることによって不活性化され、結果的にグリコーゲン合成酵素が活性化されることによる²⁷⁾。そこで、GSK3 β のリン酸化について検討したところ、WER においてのみリン酸化 GSK3 β 量の増加が認められた (図 6)。

我々は、WER が KK-*A'* マウスの血糖値上昇を抑制する報告の中でインスリンに対する感受性が增大することを明らかにしており¹¹⁾、WER によるグリコーゲン量の増加は、GSK3 β の不活性化によるグリコーゲン合成酵素活性の亢進によるものであると考えられる。

肝臓への糖の取り込みは、門脈血中のグルコース濃度に伴ってインスリン非依存性の GLUT2 が担っている。これまでに、高濃度グルコース下で肝細胞の GLUT2 発現量が増加するとの報告があることから²⁸⁾、本研究においても GLUT2 の mRNA 発現量およびタンパク質量を検討した。その結果、WER は *Glut2* mRNA と GLUT2 タンパク質量を共に増加させた (図 5)。前述したように、WER は解糖系を促進するとともにグリコーゲン合成を亢進することから、おそらく WER には肝細胞への糖の取り込みを促進する作用があるものと考えられた。

本実験で用いた 2 型糖尿病薬のメトホルミンは、肝臓での G6Pase 活性を低下させるとともに AMPK を活性化させ²⁹⁾、一方、ピオグリタゾンは脂肪組織に作用しアディポネクチンの分泌を亢進させて脂肪酸の放出を抑制すると同時に、肝臓において AMPK を活性化することが明らかとなっている³⁰⁾。特に、AMPK の活性化は、糖新生系酵素の PEPCK と G6Pase の発現を抑制するとともにインスリン抵抗性を改善させ、血糖上昇抑制作用を示すことが報告されている³¹⁾。そこで、本研究においても WER の AMPK の活性化への影響を検討したところ、WER がリン酸化 AMPK を増加させ、AMPK を活性化することが明らかになった (図 6)。

これまでに、肝臓でのインスリン抵抗性に対して改善効果を有する食品成分が報告されている。オリーブの皮から抽出されたマスリン酸が、糖尿病態で異常となった肝臓の糖新生を抑制して、インスリン感受性を亢進させるとともに血中インスリンを低下させるとの報告がある³²⁾。また、カレーに含まれるクルクミンは、AMPK を活性化することで糖新生系酵素の PEPCK と G6Pase 活性を低下させるとともにインスリン抵抗性を改善させ血糖上昇抑制作用を示すことが報告されている³³⁾。さらに、ぶどうの皮や赤ワインに含まれるレスベラトロールは、AMPK を活性化させてインスリン抵抗性を改善する³⁴⁾ とともに中性脂肪を減少させることが明らかとなっている³⁵⁾。

マンネンタケ成分の血糖への影響については、子実体に含まれる多糖類のガノデラン A および B による血糖降下作用³⁶⁾、分子量約 58 万の多糖類によるインスリン分泌促進作用³⁷⁾、 α -グルコシダーゼ阻害活性を示す SKG-3 の知見³⁸⁾ などがある。WER には、多糖体、プロテオグリカン、テルペノイドなどのマンネンタケ菌糸体由来成分に加え、菌糸体による固形培地の分解物である水溶性

リグニンや菌糸体の自己消化成分などの水溶性生理活性物質が含まれていると考えられる。今後、肝臓においてインスリン抵抗性を介した血糖の上昇抑制効果を多角的に調査するとともに、WER中の活性本体を明らかにしていく必要があると考えている。

このように、血糖の調節に影響を及ぼす化合物の存在が食品成分中に認められていることから、薬物に頼ることなく血糖の上昇をマイルドに抑制する食品成分を適切に利用した食事設計の概念が、糖尿病予防対策に必要である。

結 論

WERの継続的な摂取は、2型糖尿病における高血糖状態を緩和し、肝臓での糖質代謝に影響を与え、糖新生を抑制するとともに解糖系を促進させた。さらに、グリコーゲン合成および肝臓への糖の輸送能を亢進させた。これまでにWERが、筋肉および脂肪組織での糖取り込みの亢進も明らかになっていることから、WERは2型糖尿病態に対して複数の作用を有するマイルドな血糖改善効果を示す有用な機能性食品であることが示された。

参考文献

- Nagano M, Ueno T, Fujii A, et al. Anti-hyperglycemic effect of *Kurozu Moromi Powder* in type II diabetic model KK-*A*^y mice. *J Jap Society for Food Science and Technology* 2010; 57(8): 346–354.
- Yang JY, Moon E, Nam SH, et al. Antidiabetic effects of rice hull smoke extract on glucose-regulating mechanism in type 2 diabetic mice. *J Agric Food Chem* 2012; 60: 7442–7449.
- Furnsinn C, Waldhausl W. Thiazolidinediones: metabolic actions in vitro. *Diabetologia* 2002; 45: 1211–1223.
- Zhu XL, Lin ZB. Effects of *Ganoderma lucidum* polysaccharides on proliferation and cytotoxicity of cytokine-induced killer cells. *Acta Pharmacol Sin* 2005; 26(9): 1130–1137.
- Gao Y, Gao H, Chan E, et al. Antitumor activity and underlying mechanisms of ganopoly, the refined polysaccharides extracted from *Ganoderma lucidum* in mice. *Immunol Invest* 2005; 34(2): 171–198.
- Liu J, Yang F, Ye LB, et al. Possible mode of action of antiherpetic activities of a proteoglycan isolated from the mycelia of *Ganoderma lucidum* in vitro. *J Ethnopharmacol* 2004; 95(2-3): 265–272.
- Hajjaj H, Macé C, Roberts M, et al. Effect of 26-oxygenosterols from *Ganoderma lucidum* and their activity as cholesterol synthesis inhibitors. *Appl Environ Microbiol* 2005; 71(7): 3653–3658.
- Wong KL, Chao HH, Chan P, et al. Antioxidant activity of *Ganoderma lucidum* in acute ethanol-induced heart toxicity. *Phytother Res* 2004; 18(12): 1024–1026.
- Zhang HN, Lin ZB. Hypoglycemic effect of *Ganoderma lucidum* polysaccharides. *Acta Pharmacol* 2004; 25(2): 191–195.
- Kawahara Y, Kamiuchi S, Okazaki M, et al. Inhibitory effects of a water-soluble extract from culture medium of *Ganoderma lucidum* (Rei-shi) mycelia on postprandial blood glucose elevation in type 2 diabetic mice and additional effect with α -glucosidase inhibitors. *Jap J Compl Alter Med* 2011; 8(1): 1–9.
- Kamiuchi S, Hatta Y, Miyazato A, et al. Hypoglycemic effects of a water-soluble extract from culture medium of *Ganoderma lucidum* (Rei-shi) mycelia in type 2 diabetic mice. *Jap J Compl Alter Med* 2010; 7(1): 999–1006.
- Tian LY, Bai X, Chen XH, et al. Anti-diabetic effect of methylswertianin and bellidifolin from *Swertia punicea* Hemsl. and its potential mechanism. *Phytomedicine* 2010; 17(7): 533–539.
- Ferre T, Pujol A, Riu E, et al. Correction of diabetic alterations by glucokinase. *Proc Natl Acad Sci* 1996; 93(14): 7225–7230.
- Sharma B, Viswanath G, Salunke R, et al. Effects of flavonoid-rich extract from seeds of *Eugenia jambolana* (L.) on carbohydrate and lipid metabolism in diabetic mice. *Food Chem* 2008; 110: 697–705.
- Bentle LA, Lardy HA. Interaction of anions and divalent metal ions with phosphoenolpyruvate carboxykinase. *J Biol Chem* 1976; 251(10): 2916–2921.
- Pari L, Srinivasan S. Antihyperglycemic effect of diosmin on hepatic key enzymes of carbohydrate metabolism in streptozotocin-nicotinamide-induced diabetic rats. *Biomed Pharmacother* 2010; 64(7): 477–481.
- 日本薬学会編. 衛生試験法・注解 2010. 第1版. 東京. 金原出版. 2010: 206–207.
- 大川いづみ, 渡辺達夫, 森光康次郎. 健康を考えた食品学実験. 初版. 川崎. アイ・ケイコーポレーション. 2004: 62–65.
- Muthusamy T, Murugesan P, Balasubramanian K. Sex steroids deficiency impairs glucose transporter 4 expression and its translocation through defective Akt phosphorylation in target tissues of adult male rat. *Metabolism* 2009; 58(11): 1581–1592.
- Okazaki M, Tanaka A, Hatta Y, et al. Antioxidant properties of a water-soluble extract from culture medium of *Ganoderma lucidum* (Rei-shi) mycelia and antidiabetic effects in streptozotocin-treated mice. *Jap J Compl Alter Med* 2008; 5(3): 209–218.
- 中川育也, 日比野康英, 大橋康宏ら. マンネンタケ(霊芝)菌糸体培養基より得られるヘテロ多糖・蛋白質画分(MTP2)によるマウス脾細胞の傷害活性の増強. *Biotherapy* 1999; 13: 513–515.
- Lu H, Kyo E, Uesaka T, et al. A water-soluble extract from cultured medium of *Ganoderma lucidum* (Rei-shi) mycelia suppresses azoxymethane-induction of colon cancers in male F344 rats. *Oncol Rep* 2003; 10(2): 375–379.
- Matsuzaki H, Shimizu Y, Iwata N, et al. Antidepressant-like effects of a water-soluble extract from the culture medium of *Ganoderma lucidum* mycelia in rats. *BMC Comp Alter Med* 2013; 13: 370.
- Usui T, Okazaki M, Kamiuchi S, et al. Inhibitory effects of a

- water-soluble extract from culture medium of *Ganoderma lucidum* (Rei-shi) mycelia on postprandial blood glucose elevation in mice and additional effect with α -glucosidase inhibitor. *J Jpn Soc Nuts Food Sci* 2007; 60(5): 249–255.
- 25) Viollet B, Foretz M, Guigas B, et al. Activation of AMP-activated protein kinase in the liver: a new strategy for the management of metabolic hepatic disorders. *J Physiol* 2006; 574(Pt 1): 41–53.
 - 26) Phielix E, Szendroedi J, Roden M. The role of metformin and thiazolidinediones in the regulation of hepatic glucose metabolism and its clinical impact. *Trends Pharmacol Sci* 2011; 32(10): 607–616.
 - 27) Miyake K, Ogawa W, Matsumoto M, et al. Hyperinsulinemia, glucose intolerance, and dyslipidemia induced by acute inhibition of phosphoinositide 3-kinase signaling in the liver. *J Clin Invest* 2002; 110(10): 1483–1491.
 - 28) Lin J, Chen A. Curcumin diminishes the impacts of hyperglycemia on the activation of hepatic stellate cells by suppressing membrane translocation and gene expression of glucose transporter-2. *Mol Cell Endocrinol* 2011; 333(2): 160–171.
 - 29) Ota S, Horigome K, Ishii T, et al. Metformin suppresses glucose-6-phosphatase expression by a complex I inhibition and AMPK activation-independent mechanism. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 388(2): 311–316.
 - 30) Saha AK, Avilucea PR, Ye JM, et al. Pioglitazone treatment activates AMP-activated protein kinase in rat liver and adipose tissue in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 314(2): 580–585.
 - 31) Lochhead PA, Salt IP, Walker KS, et al. A 5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside mimics the effects of insulin on the expression of the 2 key gluconeogenic genes PEPCK and glucose-6-phosphatase. *Diabetes* 2000; 49(6): 896–903.
 - 32) Liu J, Sun H, Duan W, et al. Maslinic acid reduces blood glucose in KK-*A^y* mice. *Biol Pharm Bull* 2007; 30(11): 2075–2078.
 - 33) Kim T, Davis J, Zhang AJ, et al. Curcumin activates AMPK and suppresses gluconeogenic gene expression in hepatoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 388(2): 377–382.
 - 34) Fullerton MD, Steinberg GR. SIRT1 takes a backseat to AMPK in the regulation of insulin sensitivity by resveratrol. *Diabetes* 2010; 59(3): 551–553.
 - 35) Jeon BT, Jeong EA, Shin HJ, et al. Resveratrol attenuates obesity-associated peripheral and central inflammation and improves memory deficit in mice fed a high-fat diet. *Diabetes* 2012; 61(6): 1444–1454.
 - 36) Hikino H, Konno C, Mirin Y, et al. Isolation and hypoglycemic activity of ganoderans A and B, glycans of *Ganoderma lucidum* fruit bodies I. *Planta Med* 1985; 51(4): 339–340.
 - 37) Kim SD, Nho HJ. Isolation and characterization of alpha-glucosidase inhibitor from the fungus *Ganoderma lucidum*. *J Microbiol* 2004; 42(3): 223–227.
 - 38) Zhang HN, Lin ZB. Hypoglycemic effect of *Ganoderma lucidum* polysaccharides. *Acta Pharmacol* 2004; 25(2): 191–195.

ABSTRACT

Influence of a Water-Soluble Extract from Culture Medium of *Ganoderma lucidum* Mycelia (WER) on Carbohydrate Metabolism in the Liver of Type 2 Diabetic Mice

Shinya KAMIUCHI¹, Yuri SHINDO¹, Yuka UTSUMI¹, Naohiro IWATA¹, Mari OKAZAKI¹,
Fumiko SUZUKI², Hiroshi IIZUKA², Satoshi ASANO³, Hirokazu MATSUZAKI¹, Yasuhide HIBINO¹

¹ Department of Clinical Dietetics & Human Nutrition, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Josai University

² Noda Shokukinkogyo Co., Ltd.

³ Department of Pharmaceutical Sciences, School of Pharmacy, International University of Health and Welfare

Objective: Recently, we reported that long-term intake of a water-soluble extract from culture medium of *Ganoderma lucidum* mycelia (WER) reduced hyperglycemia and enhanced glucose transporter-4 (GLUT4) translocation to the plasma membrane in skeletal muscles and adipose tissue in KK-*A^y* mice, a type 2 diabetic animal model with obesity. In the present study, we investigated the effect of WER on hepatic carbohydrate metabolism.

Methods: Female KK-*A^y* mice were given free access to water and high-fat food containing 0.5% WER for 8 weeks, and blood glucose levels were assessed every week. At the end of the experimental period, the expression and activities of sugar metabolic enzymes in the liver were determined by Real Time RT-PCR and each activity measurement method. Also, the amount of glycogen was measured by anthrone-sulfuric acid method. Furthermore, the expression level of GLUT2 and activation of AMP kinase (AMPK) and glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β) was also determined by western blot analysis.

Results: The mice with the high-fat ingestion showed a gradual increase in the levels of blood glucose and body weight. In the WER-treated mice, the blood glucose level was suppressed after 2 weeks of intake. The gene expression and enzyme activities of both glucose-6-phosphatase and phosphoenolpyruvate carboxykinase were suppressed, whereas those of glucokinase were increased in the mice with WER intake and pioglitazone administration. The accumulation of glycogen was increased. Moreover the expression of GLUT2 and phosphorylation levels of AMPK and GSK3 β were also increased in the mice with WER intake.

Conclusion: These results indicate that WER affects hepatic carbohydrate metabolism, which may derive from the suppression of gluconeogenesis through the modulation of related enzymes and enhancement of glucose uptake, glycolysis and glycogen synthesis.

Key words: water-soluble extract of *Ganoderma lucidum* mycelia (WER), type 2 diabetes, sugar metabolism enzyme, AMPK (AMP-activated protein kinase), KK-*A^y* mice