

肝臓のミトコンドリア活性化に及ぼす大豆イソフラボンの効果と その分子機構に関する研究

三谷 塁一*

信州大学先鋭領域融合研究群バイオメディカル研究所代謝ゲノミクス部門

Molecular Analysis of Soy Isoflavone in Mitochondrial Activity in Hepatocyte

Takakazu MITANI*

Institute for Biomedical Sciences, Interdisciplinary Cluster for Cutting Edge Research,
Shinshu University, NAGANO 399-4598

ABSTRACT

Adipocytes in obesity secrete excessive free fatty acid (FFA) in vessels, and secreted FFA accumulates in the liver. Excessive FFA causes oxidative damage in mitochondria of hepatocytes and results in an induction of cellular senescence of hepatocytes. The cellular senescence induces various diseases such as non-alcoholic fatty liver, hepatic fibrosis and hepatoma. Thus, suppression of FFA-mediated oxidative damage is important in preventing hepatic diseases. In this study, we investigated the effects of soy isoflavone on FFA-induced oxidative damage in the mitochondria of hepatocytes. Daidzein, one of the soy isoflavones, suppressed FFA-induced lipid accumulation in HepG2 cells. On the other hand, daidzein induced an increase in ketone body production. When we assessed the effects of daidzein on FFA-induced mitochondrial damage, daidzein attenuated FFA-induced mitochondrial DNA damage and increased the copy number of mitochondria in HepG2 cells. Daidzein up-regulated the expression of hydroxymethylglutaryl CoA synthase 2 (HMGCS2) at transcriptional levels. HMGCS2 regulates ketone body production, and its enzymatic activity is regulated by posttranslational modification. The acetylation level of HMGCS2 protein is decreased in the presence of daidzein. Furthermore, daidzein increased SIRT3 protein, and knockdown of SIRT3 canceled daidzein-induced deacetylation of HMGCS2. These results suggest that daidzein decreases lipid accumulation by increasing the conversion from FFA to ketone body and consequently prevents FFA-induced mitochondrial damage and increases mitochondrial number. Furthermore, deacetylation of HMGCS2 by SIRT3 is involved in these daidzein-induced effects in HepG2 cells. *Soy Protein Research, Japan*

* 〒399-4598 長野県上伊那郡南箕輪村8304

Key words : isoflavone, daidzein, mitochondria, hydroxymethylglutaryl CoA synthase 2, SIRT3

肥満者の脂肪組織からは様々な生理活性物質が分泌されており、これが2型糖尿病をはじめとした生活習慣病の発症に関与する。生理活性物質の中には遊離脂肪酸も含まれており、内臓脂肪組織から分泌された過剰な遊離脂肪酸は、まず肝臓へとたどり着く。肝細胞に取込まれた遊離脂肪酸は、中性脂肪へと変換されることで脂肪毒性から細胞を保護するが、過剰な遊離脂肪酸は、小胞体やミトコンドリアの傷害を誘導する。このミトコンドリアの傷害が活性酸素種の蓄積、細胞の老化を促し、その結果、非アルコール性脂肪肝 (non-alcoholic fatty liver disease; NAFLD) の発症へと繋がるとされている¹⁾。それ故に、肥満誘導性の脂肪肝を予防する方法として、(i) 血中の遊離脂肪酸濃度を低下する。(ii) 肝細胞に取込まれた遊離脂肪酸の代謝を促進することでミトコンドリアの傷害を抑制する。(iii) 脂肪毒性からミトコンドリアを保護し、活性酸素種の蓄積を抑制することが挙げられている^{2, 3)}。実際に (i), (iii) に関する治療薬としてメバロチン等の高脂血症治療薬やビタミンE等の抗酸化薬が使用されている。また、食品成分を用いたNAFLDの予防効果の研究も盛んに行われている。高脂肪食摂取ラットにおいて、大豆イソフラボン摂取することで肝臓の脂質蓄積と脂肪酸合成酵素の発現量低下が示されている^{4, 5)}。そこで、本課題では、大豆イソフラボンが過剰な遊離脂肪酸によって引き起こされるミトコンドリア傷害に対して抑制効果があるのかを (ii) の観点から解析し、その分子機構を細胞レベルで明らかにすることを目的とした。

方 法

細胞培養

ヒト肝がん由来細胞株であるHepG2細胞 (JCRB Cell Bank) の培養は、10%牛胎児血清、100 units/mL ペニシリンG、100 μ g/mL ストレプトマイシン硫酸塩を含むDulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) を用いた。培養はすべて95% air、5% CO₂、湿度98%、37°C インキュベーター内で行った。

細胞内脂質とケトン体の解析

HepG2細胞を遊離脂肪酸 (0.5 mmol/Lのパルミチン酸塩と0.25 mmol/Lのオレイン酸塩) 存在下で24時間培養した後に、大豆イソフラボン (10 μ mol/L) を含む培地に交換しさらに24時間培養した。培養終了後、細胞を4%パラホルムアルデヒド溶液で固定し、oil O redで細胞内の脂肪滴を染色した。100% イソプロパノールを使って染色色素を抽出し、吸光度 (500 nm) を測定することで、脂質蓄積を相対値として算出した。ケトン体生成量の測定法は、 β -hydroxybutyrate Fluometric Assay Kit (Cayman, Chemicals) で、たん白質の定量はBradford法で行った。

細胞老化の検出

老化細胞において過剰発現が認められるSA- β -gal (senescence-associated β -galactosidase) を検出することで老化細胞を解析した。HepG2細胞を遊離脂肪酸 (0.5 mmol/Lのパルミチン酸塩と0.25 mmol/Lのオレイン酸塩) とダイゼインの共存在下で24時間培養した。細胞を4%パラホルムアルデヒド溶液で固定、その後、老化細胞をSPiDER- β Gal (Dojindo) で染色し、核をHoechst33342で染色した。染色画像を蛍光顕微鏡 (EVOS FL Auto, Thermo Fisher Scientific) で検出し、 β Gal の蛍光値をHoechstの蛍光値で除することで細胞老化を相対値として比較した。

ミトコンドリアのDNA傷害の検出

HepG2細胞を遊離脂肪酸 (0.5 mmol/Lのパルミチン酸塩と0.25 mmol/Lのオレイン酸塩) とダイゼインの共存在下で24時間培養した。mtDNAエキストラクター WBキット (Wako) を用いて培養後の細胞からミトコンドリアDNAを抽出した。ミトコンドリアDNAは酸化傷害を受けると一定領域で断片化する。ミトコンドリアDNAの260-421の領域 (162 bp) でDNA傷害が起こると80 bpの断片 (260-339) が生じる⁶⁾。それをPCRで増幅することでミトコンドリアのDNA傷害を間接的に検出した。PCRに使用したプライマーはTable 1に記載する。

Table 1. Primer sets

	Name	sequences; 5' to 3'
Fig. 2A	HVII-FOR260	GCCACTTTCCACACAGACATCATA
	HVII-L421	AGTGCATACCGCCAAAAGATAAAA
	HVII-C339	TGTTTAAGTGTGTGGCCAGA
Fig. 2C	MT-RNA1_Fw	CCTCCCAATAAAGCTAAAA
	MT-RNA1_Re	GCTATTGTGTGTTTCAGATAT
	MT-ND4_Fw	AAGTCAAAAAGCTATTA
	MT-ND4_Re	CTTACATCCTCATTACTATTC
Fig. 3	HMGCS2_Fw	CTAGCCTCCCGAAAGTGTGT
	HMGCS2_Re	GGTGGGAGAAATTCACCTT
	HMGCSL_Fw	TGAAGGGCATTGAGAAGTTTCC
	HMGCSL_Re	TCTGAGGCAGCTCCAAAGATG
	CPT1A_Fw	TGCTTTACAGGCGCAAAGCTG
	CPT1A_Re	TGGAATCGTGGATCCAAA
	MCAD_Fw	GCTGGTGTGTTGGATTAGCA
	MCAD_Re	CCTTTCCAGGCATACCTTGTT
	FAT_Fw	CAAATGAAGATGAGCATAGGACAT
	FAT_Re	GTTGACCTGCAGTCGTTTTC

定量PCR法とウエスタンブロット法

HepG2細胞をダイゼインの存在下で24時間培養した。回収した細胞からRNAを抽出し、逆転写反応でcDNAを合成した。合成したcDNAを鋳型として各遺伝子の発現量をTable 1のプライマーを用いて解析した。

ウエスタンブロット法

HMGCS2を検出する際は、ダイゼインの存在下で24時間培養したHepG2細胞を用いた。SIRT3を検出する際は、ダイゼイン (10 $\mu\text{mol/L}$) の存在下で3, 6, 12, 24時間培養したHepG2細胞を用いた。回収した細胞を細胞溶解緩衝液中で破砕後、SDS-PAGEに供し、ウサギ抗HMGCS2ポリクローナル抗体 (H-70, Santa Cruz Biotechnology), ウサギ抗SIRT3ポリクローナル抗体 (H-40, Santa Cruz Biotechnology), そしてマウス抗 β -Actinモノクローナル抗体 (C4, Santa Cruz Biotechnology) を用いてウエスタンブロットを行った。

免疫沈降法

ダイゼイン (10 $\mu\text{mol/L}$) の存在下で3時間培養したHepG2細胞に細胞溶解緩衝液を加えて穏やかに懸濁した後、ローテーターを用いて4°Cで30分間転倒混和することで細胞を溶解した。その後、遠心分離 (20,000 $\times g$, 4°C, 20分間) した上清の細胞抽出液を免疫沈降法に用いた。細胞抽出液にHMGCS2抗体 (0.2 μg) 加え、ローテーターを用いて一晩、4°Cで混合した。その後、

Protein G Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare; 40 μL) を細胞溶液に加え、1時間、4°Cでローテーターすることで免疫沈降を行った。その後、Protein G Sepharoseを細胞溶解緩衝液で3回洗浄し、80°C、5分間熱処理することでProtein G Sepharoseに結合するHMGCS2を溶出し、マウスAcetyl-Lysモノクローナル抗体 (BioLegend) 用いてウエスタンブロットで解析した。

統計解析

統計解析にはJMP 統計解析ソフトウェア (ver 11.2.0, SAS Institute, Cary) を用いてANOVA法により解析し、 $p < 0.05$ をもって統計的有意とした。post-hoc分析にはTukey-Kramer法またはDunnett法を用いた。

結果と考察

大豆イソフラボンが細胞内脂肪酸の蓄積に及ぼす影響

遊離脂肪酸添加による細胞内の脂質蓄積に対する大豆イソフラボンの効果を検討したところ、ゲニステインとエクオールは脂質蓄積に対して影響を示さなかったのに対して、ダイゼインは脂質蓄積を有意に減少した (Fig. 1A)。ダイゼインによる細胞脂質蓄積の減少が、脂質代謝の亢進に起因するのかを検討した。肝臓での脂肪酸は β 酸化によってATPとアセチルCoAに代謝されるだけでなく、アセチルCoAはケトン体へと代謝される。そこで代表的なケトン体である β ヒドロキシ酪酸の生成量を測定したところ、10 $\mu\text{mol/L}$ 以上のダイゼインによって β ヒドロキシ酪酸生成量が増加した (Fig. 1B)。以上の結果から、ダイゼインは細胞内に取込まれた遊離脂肪酸をケトン体へと代謝する反応を促進することで脂質蓄積量を減少することが示された。

ダイゼインが遊離脂肪酸誘導性のミトコンドリア傷害に及ぼす影響

ダイゼインが細胞内脂質蓄積を減少したことから、ダイゼインは遊離脂肪酸による脂肪毒性を緩和していることが予想される。そこで、ダイゼインがミトコンドリア傷害と細胞老化に及ぼす影響について解析した。ミトコンドリアの傷害をミトコンドリアDNA (mtDNA) の断片化を指標として半定量した結果、遊離脂肪酸によって断片化mtDNA量は増加し、ダイゼインはその増加を抑制した (Fig. 2A)。ミトコンドリア傷害は、活性酸素種の蓄積を促し、細胞

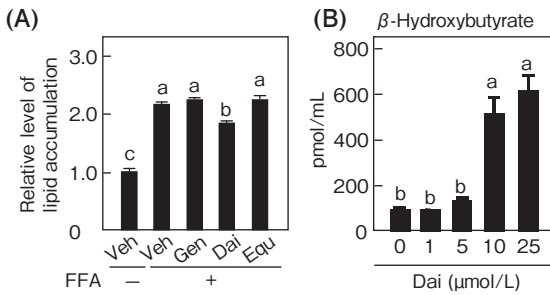


Fig. 1. Effect of soy isoflavone on Lipid metabolism in HepG2 cells. HepG2 cells were incubated with free fatty acid (palmitate; 0.5 mmol/L and oleate 0.25 mmol/L) for 24 h. Then, the cells were incubated in the presence of 10 μmol/L soy isoflavone (genistein; Gen, daidzein; Dai, equol; Equ) for an additional 24 h. Lipid droplets (A) or β-hydroxybutyrate contents (B) in the cells were quantified. Data are means ± SD (n = 3). Significant differences ($p < 0.05$) are indicated by the corresponding letters.

老化を引き起こす。老化した細胞で発現が増加する β-galactosidaseの活性を測定したところ、遊離脂肪酸によって増加した β-galactosidaseの活性をダイゼインは抑制した (Fig. 2B)。これらの結果は、ダイゼインが遊離脂肪酸によるミトコンドリア傷害を抑制する効果をもつことを示唆する。遊離脂肪酸非存在下でのミトコンドリア活性に及ぼすダイゼインの効果をミトコンドリアのコピー数を指標にして解析した結果、ミトコンドリア遺伝子にコードされている12SリボソームRNA (MT-RNA1) とNADHデヒドロゲナーゼサブユニット4 (MT-ND4) の発現量がダイゼインによって増加した (Fig. 2C)。つまり、ダイゼインは遊離脂肪酸によるミトコンドリア傷害を抑制するだけでなく、ミトコンドリアのコピー数を増加することでミトコンドリアの活性化にも寄与していることが示唆された。

ダイゼインによる脂質代謝関連遺伝子の発現パターンの変化

ダイゼインによって細胞脂質の代謝が亢進されたので、脂質代謝に関与する遺伝子の発現パターンがダイゼインによって変化するのかを検討した。ダイゼインを24時間処理したHepG2細胞の各遺伝子のmRNAを解析したところ、脂肪酸トランスポーター (FAT) の発現量には影響を示さなかったが、一部の β酸化関連酵素 (MCAD) のケトン体生成経路の律速酵素であるHMGCS2の遺伝子発現を濃度依存的に増加した (Fig.

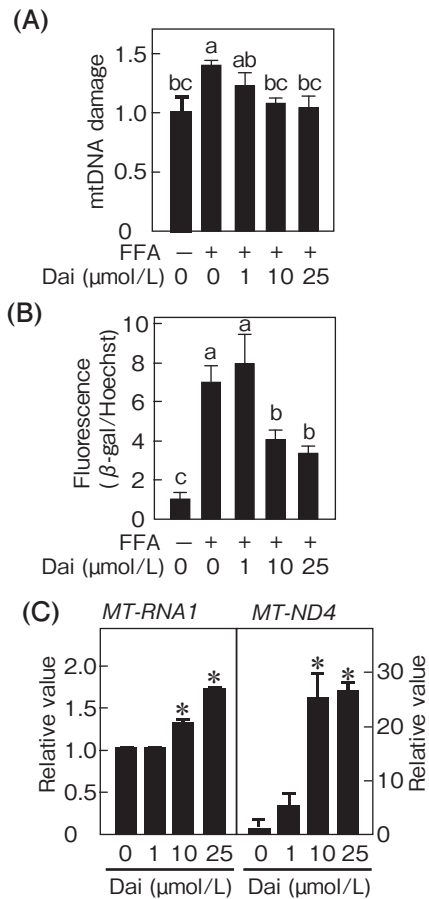


Fig. 2. Effect of daidzein on FFA-induced mitochondrial damages. (A) Estimation of mitochondrial DNA (mtDNA) damage in HepG2 cells incubated with FFA (palmitate; 0.5 mmol/L and oleate 0.25 mmol/L) and/or daidzein (Dai) for 24 h. (B) Analysis of β-galactosidase activity in HepG2 cells incubated with FFA and/or Dai for 24 h. (C) Quantification of mtDNA encoded gene expression in HepG2 cells incubated with various concentrations of Dai for 24 h. Data are means ± SD (n = 3). (A and B) Significant differences ($p < 0.05$) are indicated by the corresponding letters. (C) * $p < 0.05$ compared to vehicle-treated cells.

3A)。さらにHMGCS2の発現量の増加はたん白質レベルでも示された (Fig. 3B)。HMGCS2の酵素活性は、翻訳後修飾によって制御される⁷⁾。中でもLys残基のアセチル化はHMGCS2の活性を抑制する⁸⁾。そこで、ダイゼインがHMGCS2のアセチル化状態に及ぼす影響を、ダイゼインを3時間処理したHepG2細胞の細胞抽

出液を用いて免疫沈降法で解析した。その結果、ダイゼインの添加によってアセチル化HMGCS2のたん白質量が減少した (Fig. 3C)。以上の結果から、ダイゼインはケトン体生成の律速酵素であるHMGCS2の発現量だけでなく、脱アセチル化を誘導することで活性化型へとすることが示された。

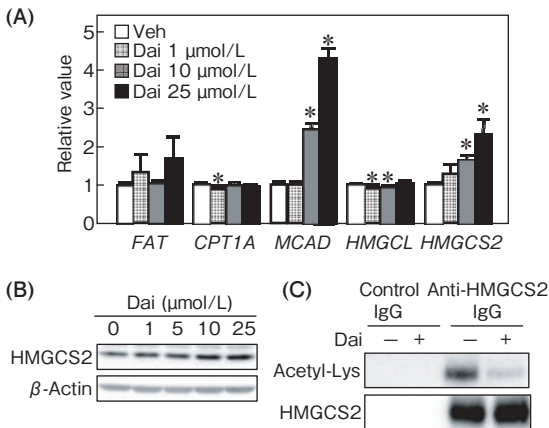


Fig. 3. Effect of daidzein on expression and acetylation levels of HMGCS2. (A) Quantification of lipid metabolism-associated gene expression in HepG2 cells incubated with various concentrations of daidzein (Dai) for 24 h. * $p < 0.05$ compared to vehicle-treated cells. (B) Western blot analysis of HMGCS2 in HepG2 cells incubated with various concentrations of Dai for 24 h. (C) Immunoprecipitation of acetylated HMGCS2. HepG2 cells were incubated with Dai (10 μmol/L) for 24 h, and acetylated HMGCS2 was immunoprecipitated by anti-HMGCS2 antibodies, followed by western blot analysis using anti-acetyl-Lys antibodies. Data are means \pm SD ($n = 3$).

ダイゼインによるHMGCS2の脱アセチル化反応におけるSIRT3の関与

HMGCS2の脱アセチル化反応は、ミトコンドリアに局在する脱アセチル化酵素であるSIRT3によって仲介される⁸⁾。ダイゼインが、SIRT3のたん白質発現量に及ぼす影響を解析したところ、ダイゼインの添加3時間後にSIRT3のたん白質レベルはピークに達し、添加24時間後では基底レベルに戻っていた (Fig. 4A)。SIRT3がダイゼインによるアセチル化HMGCS2の減少に関与するのかわ、SIRT3をsiRNAでノックダウンしたHepG2細胞にダイゼインを3時間処理して検討した。その結果、ダイゼインによるアセチル化HMGCS2レベ

ルの減少効果は、SIRT3をノックダウンすることで解除された (Fig. 4B)。ダイゼインは、HMGCS2のたん白質発現量自体にも影響を示したので、HMGCS2の発現量に及ぼすSIRT3の効果を検討した。SIRT3をノックダウンしたHepG2細胞にダイゼインを24時間作用させたところ、SIRT3のノックダウンはHMGCS2の発現量に影響を示さなかった (Fig. 4C)。以上の結果から、ダイゼインは、SIRT3の発現量を一過的に増加することでHMGCS2の脱アセチル化を誘導することが示された。一方で、SIRT3はダイゼインによるHMGCS2の発現量の増加に関与しないことが示された。

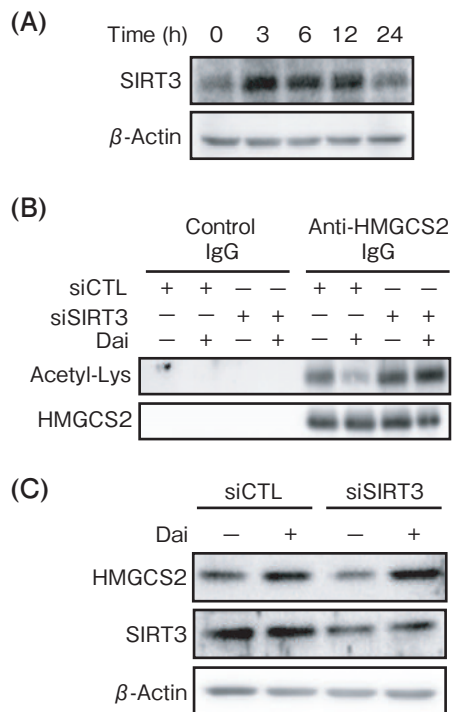


Fig. 4. Involvement of SIRT3 in daidzein-mediated HMGCS2 acetylation. (A) Western blot analysis of SIRT3 in HepG2 cells incubated in the presence of daidzein (Dai; 10 μmol/L) at various time points. (B) Immunoprecipitation of acetylated HMGCS2 in SIRT3-knocked down HepG2 cells. After siRNA transfection, the cells were incubated with Dai (10 μmol/L) for 24 h. Acetylated HMGCS2 was immunoprecipitated by anti-HMGCS2 antibodies, followed by western blot analysis using anti-acetyl-Lys antibodies. (C) Western blot analysis of HMGCS2 in SIRT3-knocked down HepG2 cells incubated with Dai (10 μmol/L) for 24 h. Data are means \pm SD ($n = 3$).

考 察

本研究により、ダイゼインは遊離脂肪酸によるミトコンドリア傷害を抑制することが示された。ダイゼインは細胞内の脂質蓄積を減少するとともにケトン体生成を増加したことから、細胞内の脂質の代謝を促進していることが示された。一方、ダイゼインは脂肪酸トランスポーターであるFATの発現量には影響を示さなかったことから、脂肪酸の取込みを抑制することで脂質蓄積を減少しているのではないと考えられる。以上の結果から、ダイゼインは細胞内の脂肪の代謝を促進することで脂質毒性を緩和し、ミトコンドリアの傷害を抑制したと考えられる。そして、その結果細胞の老化が抑制されたと言える。

ダイゼインは、脂質の β 酸化に関与する遺伝子の発現を増加した。そしてダイゼインは、ケトン体生成の律速酵素であるHMGCS2の発現量とアセチル化HMGCS2を減少した。HMGCS2はミトコンドリアに局在し、アセトアセチルCoAを3-ヒドロキシ-3-メチル

グルタリルCoAに代謝する反応を触媒する⁹⁾。ダイゼインの処理24時間では、HMGCS2のたん白質発現量が増加したが、SIRT3の発現量は処理3時間がピークであり、24時間後で基底レベルまでたん白質発現量は低下した。つまり、ダイゼインによるSIRT3を介したHMGCS2の脱アセチル化の誘導とHMGCS2の発現量の増加は別々の経路で制御されていることが示唆される。これは、SIRT3をsiRNAでノックダウンしてもダイゼインの処理24時間後でのHMGCS2のたん白質発現量には影響を示さなかったことから示唆される。HMGCS2遺伝子の発現量は、グルカゴンやcyclic-AMP (cAMP) によって制御される¹⁰⁾。ポリフェノールの中には細胞膜に局在するアデニル酸シクラーゼを活性化することでcAMP生成量を増加¹¹⁾したり、cAMPの分解を触媒するホスホジエステラーゼの活性を阻害¹²⁾したりするものが存在する。ダイゼインもこれこれの経路によってHMGCS2の発現量を制御している可能性がある。今後はこれらの経路へのダイゼインの効果を検討する必要がある。

要 約

肥満者の脂肪脂肪からは過剰な遊離脂肪酸が血流に分泌される。そして、分泌された遊離脂肪酸は肝臓に蓄積する。肝臓の肝細胞に蓄積した過剰な脂肪酸はミトコンドリアの酸化傷害を引き起こし、細胞老化を誘導する。細胞老化は非アルコール性脂肪肝や肝硬変、肝がんの発症に繋がるとされる。従って、遊離脂肪酸誘導性のミトコンドリアの酸化傷害を抑制することは上記の肝疾患を予防する為に重要である。本課題で我々は、肝細胞において大豆イソフラボンが遊離脂肪酸誘導性のミトコンドリアの酸化傷害を抑制するかについて検討した。遊離脂肪酸で処理したHepG2細胞に大豆イソフラボンを作用させたところ、ダイゼインで有意に細胞内脂質蓄積が減少した。そして肝細胞における脂質の代謝物産物であるケトン体の生成量がダイゼインで増加した。遊離脂肪酸誘導性のミトコンドリア傷害に及ぼすダイゼインの効果を評価したところ、ダイゼインは遊離脂肪酸によるミトコンドリアDNAの断片化を抑制し、そしてミトコンドリアコピー数も増加した。ダイゼインはケトン体生成経路の律速酵素であるHMGCS2の発現量を転写レベルで増加した。HMGCS2の酵素活性はアセチル化によって負に制御されることから、ダイゼインによるHMGCS2のアセチル化状態を解析したところ、ダイゼインはアセチル化HMGCS2量を減少した。HMGCS2の脱アセチル化反応にはSIRT3が関与することから、ダイゼインがSIRT3に及ぼす影響を検討した。ダイゼインは短時間でSIRT3のたん白質量を増加し、SIRT3をノックダウンすることでダイゼインによるアセチル化HMGCS2量の減少は解除された。以上より、ダイゼインはSIRT3のたん白質安定性を向上することでHMGCS2の脱アセチル化(活性化状態)を誘導することが示された。このHMGCS2の活性化が細胞内脂質の代謝を促進することで脂質毒性を緩和しミトコンドリアの活性化に繋がったことが示唆された。

文 献

- 1) Ogrodnik M, Miwa S, Tchkonina T, Tiniakos D, Wilson CL, Lahat A, Day CP, Burt A, Palmer A, Anstee QM, Grellescheid SN, Hoeijmakers JHJ, Barnhoorn S, Mann DA, Bird TG, Vermeij WP, Kirkland JL, Passos JF, von Zglinicki T and Jurk D (2017): Cellular senescence drives age-dependent hepatic steatosis. *Nat Commun*, **8**, 15691.
- 2) Park H, Shima T, Yamaguchi K, Mitsuyoshi H, Minami M, Yasui K, Itoh Y, Yoshikawa T, Fukui M, Hasegawa G, Nakamura N, Ohta M, Obayashi H and Okanoue T (2011): Efficacy of long-term ezetimibe therapy in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol*, **46**, 101-107.
- 3) Violi F and Cangemi R (2010): Pioglitazone, vitamin E, or placebo for nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med*, **363**, 1185-1186.
- 4) Liu H, Zhong H, Leng L, Jiang Z (2017): Effects of soy isoflavone on hepatic steatosis in high fat-induced rats. *J Clin Biochem Nutr*, **61**, 85-90.
- 5) Panneerselvam S1, Packirisamy RM, Bobby Z, Elizabeth Jacob S and Sridhar MG (2016): Soy isoflavones (Glycine max) ameliorate hypertriglyceridemia and hepatic steatosis in high fat-fed ovariectomized Wistar rats. *J Nutr Biochem*, **38**, 57-69.
- 6) Valdecantos MP, Pérez-Matute P, González-Muniesa P, Prieto-Hontoria PL, Moreno-Aliaga MJ and Martínez JA (2012): Lipoic acid improves mitochondrial function in nonalcoholic steatosis through the stimulation of sirtuin 1 and sirtuin 3. *Obesity*, **20**, 1974-1983.
- 7) Kostiuk MA, Corvi MM, Keller BO, Plummer G, Prescher JA, Hangauer MJ, Bertozzi CR, Rajaiah G, Falck JR and Berthiaume LG (2008): Identification of palmitoylated mitochondrial proteins using a bio-orthogonal azidopalmitate analogue. *FASEB J*, **22**, 721-732.
- 8) Shimazu T, Hirschev MD, Hua L, Dittenhafer-Reed KE, Schwer B, Lombard DB, Li Y, Bunkenborg J, Alt FW, Denu JM, Jacobson MP and Verdin E (2010): SIRT3 deacetylates mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA synthase 2 and regulates ketone body production. *Cell Metab*, **12**, 654-661.
- 9) Hegardt, F.G. (1999): Mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase: a control enzyme in ketogenesis. *Biochem J*, **338**, 569-582.
- 10) HegardtFG (1998): Transcriptional regulation of mitochondrial HMG-CoA synthase in the control of ketogenesis. *Biochimie*, **80**, 803-806.
- 11) Totsuka Y, Ferdows MS, Nielsen TB and Field JB (1983): Effects of forskolin on adenylate cyclase, cyclic AMP, protein kinase and intermediary metabolism of the thyroid gland. *Biochim Biophys Acta*, **756**, 319-327.
- 12) Zhang Y, Chen ML, Zhou Y, Yi L, Gao YX, Ran L, Chen SH, Zhang T, Zhou X, Zou D, Wu B, Wu Y, Chang H, Zhu JD, Zhang QY and Mi MT (2015): Resveratrol improves hepatic steatosis by inducing autophagy through the cAMP signaling pathway. *Mol Nutr Food Res*, **59**, 1443-1457.