

# 摂取カロリー制限の抗老化・寿命延長作用

## —その背景とメカニズム—

野澤義則<sup>1</sup>・鈴木紀子<sup>2</sup>・平光美津子<sup>3</sup>

(1, 3: 東海学院大学健康福祉学部管理栄養学科, 2: 岐阜大学大学院医学研究科産科婦人科学)

### 要 約

古くから“腹八分目は長生き”とか“To live longer, eat less”などと摂取カロリーの低減が長寿をもたらすと伝えられてきたが、その科学的根拠は明らかでなかった。1935年にコーネル大学のMcCay研究グループが、ラットの寿命がカロリー制限によって顕著に延長することを実験で示したのを契機として、老化遅延・寿命延長のメカニズム関連の研究が急速に進展した。線虫の老化遺伝子AGE-1(Johnsonら, 1998年)や酵母の長寿遺伝子SIR2(Guaranteら, 2000年)などの発見、さらには哺乳動物の長寿遺伝子サーチュイン(Sirtuins, SIRT1-7)ファミリーの存在が明らかとなり、広く生物種を超えた抗老化・長寿シグナル伝達系の分子メカニズムが解明されつつあり多くの貴重な知見が得られている。SIR2やSIRT1の遺伝子産物はNAD依存性脱アセチル化酵素であり、ヒストンはじめp53、FOXO、PGC-1 $\alpha$ などの転写因子やさまざまな酵素たんぱく質の脱アセチル化による活性制御を介して老化遅延・寿命延長に関連する生体機能調節において重要な役割を果たしている。本稿ではそのような背景を踏まえて、カロリー制限による寿命延長に関する研究のこれまでの経緯および最近の動向を概説する。

キーワード: 摂取カロリー制限、老化メカニズム、ヘイフリック限界、長寿遺伝子(サーチュイン)、抗老化・長寿シグナリング、レスベラトロール

### 1. はじめに

元気で長生きは、古くより人類共通の願望であり、中国統一を成し遂げた秦の始皇帝は不老不死の薬を求め各地を探させ、また研究をさせたといわれている。国内では、江戸時代の儒学者の貝原益軒は、自分の体験に基づき「養生訓」を著し、その中で“腹八分目にすべし満腹に禍あり”と説き、それに端を発し“腹八分目に医者いらす”とか、国外でも“Light suppers make long life”など食事軽減が健康によいとされ、今日の摂取カロリー制限による抗老化・寿命延長のルーツともなっている。しかしながら、これらは食生活における教訓的なものであって、これを裏付ける科学的根拠はなかった。そのような中で、80年ほど前に米国のクリーブ・マックケイ(McCay, C. 1935年)<sup>1)</sup>は、カロリー制限食によるラットの寿命延長効果を初めて示し、その後同様の現象が小動物(ラット・マウス)のみならず昆虫、線虫、酵母など広く種々のモデル生物種においても観察され、その分子メカニズムに関する研究が活発に行われ、腹八分目の科

学が目覚ましい進展が見られた。なかでも、レオナルド・ガラランテ(Guarante, L. 1999年)<sup>2)</sup>によるエポックメイキングな長寿遺伝子サーチュイン(SIR2)の発見は、今日の長寿研究の貴重なマイルストーンとなっている。

本稿では、このような背景のもとにカロリー制限(Calorie restriction, CR)によってもたらされる老化遅延・寿命延長作用およびその分子メカニズムについて概説する。

### 2. 加齢・老化と寿命

加齢(Aging, エイジング)とは、誕生から寿命を終える時点(死)までの物理的な時間的経過、つまり年ごとに年齢を重ねることである。ただし、通常では、加齢の過程で老化が進行するために、エイジングが老化と同じように使われることが多い。アンチエイジング(抗老化)もその例である。一方、生物学的な老化(Scenesence, セネセンス)とは、加齢に伴って諸種の生理的機能の低下や形態変化が生じ、生体内外の環境変化に対して適切に

答する能力が減弱・消失することである。このような生理的老化に加え、諸種の疾患や健康リスクなどにより、老化の進行が速められ寿命が短縮する病的老化があるが、本稿では生理的老化を中心に述べる。加齢・老化の関係を端的に表すと、加齢プロセスのある時点、つまり実年齢が同じであっても“老けて見える”、“若く見える”というように老化の進行と実年齢との間に差がある。

ところで、寿命(Lifespan, Longevity, Length of life)は誕生から老化を経て死ぬまでの期間であり、因みに日本人の平均寿命は男性 81 歳、女性 87 歳で共に世界第 2 位である。寿命の長短は老化プロセスの進行速度に依存しており、老化を遅くすれば寿命は長くなる。

## 2-1 老化の分子メカニズム

老化の仕組みに関しては、さまざまな仮説が提唱されてきているが、ここではその主なものについて述べる。なお、他にも生命活動速度説、神経内分泌説、自己免疫説などがある。

### a) プログラム説 — ヘイフリックの分裂限界:

個々の細胞には、分裂できる回数が決まっており、その限界に達すると分裂が停止し、細胞を複製する能力が次第に失われてくる(複製老化, Replicative senescence)、すなわち細胞にはあらかじめ分裂回数の限界がプログラムされているとするレナード・ヘイフリック(Hayflick, R. 1961 年)の分裂限界説がある<sup>3)</sup>(図 1)。

たとえば、ヒトの細胞ではほぼ 50 回、ラットでは 15 回が限界であるが、各臓器に存在する幹細胞(Stem

cells)には分裂限界がなく、自己複製を続けることができる。この分裂限界を支配しているのは、分裂時計あるいは老化時計と呼ばれるテロメア(Telomere)である。テロメアは真核細胞の染色体末端に存在し、DNA 反復配列(TTAGGG, テロメア DNA)と、さまざまな結合たんぱく質から構成されている。細胞分裂が起こるたびにテロメアの短縮化が起こり限界に達し細胞分裂が停止する。テロメアの長さ(塩基対)は年齢によって異なり、新生児で 10,000、35 歳で 7,500、65 歳以上で 4,800 と言われている。テロメアの伸長はその修復酵素テロメラーゼ(Teromerase)によって行われ、この酵素がない通常のヒトの体細胞では上記のように分裂に伴ってテロメアが短くなる。この酵素の活性は、生物・組織・細胞の種類によって異なり、真核単細胞生物(酵母、原生動物細胞など)にはテロメラーゼ活性があり、真核多細胞生物、たとえばヒトでは生殖細胞、幹細胞あるいはがん細胞を除いてその酵素活性はほとんど見られない。テロメラーゼは、テロメア配列の鋳型となる RNA(ヒトでは 451 塩基)と逆転写酵素(Teromere reverse transcriptase, TER1)、さらに制御サブユニットから構成されており、6 塩基配列(TTAGGG)の付加を繰り返しテロメアの伸長を行う。エリザベス・ブラックバーン(Blackburn, E.)は、単細胞原生動物のテトラヒメナ細胞からテロメラーゼを単離し、テロメアの反復配列を同定した業績でノーベル生理学・医学賞を受賞した(2009 年)。筆者(野澤)も生体膜研究のモデル細胞としてテトラヒメナ細胞を長年扱っていただけに、その受賞には格別な思いがあった。

### b) 摩耗・擦り切れ(Wear-and-Tear)説:

ドイツの生物学者アウグスト・ワイスマン(Weissman, A. 1882 年)によって提唱された初期の老化仮説である。細胞、組織、臓器の機能維持のための活発な生化学的反応が営まれているが、長年にわたる内・外リスク因子によって核酸やたんぱく質などの生体高分子が摩耗し、損傷を受け修復不能となり損傷が蓄積して老化が起こる。リスク要因は、加水分解反応、糖化反応、放射線、紫外線、化学物質、フリーラジカルなど多彩である。水は比較的弱い求核分子であるが、細胞内の感受性の高い分子と反応し、たんぱく質ではペプチド結合の加水分解によりポリペプチド鎖が切断される。また、より重要なのは DNA 中のヌクレオチド塩基のシトシン、アデニン、グアニンの複素環式芳香環のアミノ基は加水分解を受けやすく、アミノ基がカルボニル基に置換されウラシル、ヒポキサンチン

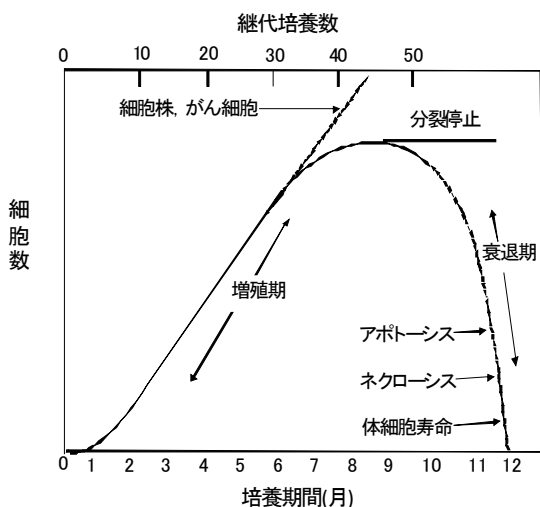


図 1. 胎児細胞の分裂能と寿命—ヘイフリック限界

ン、キサンチンを生成する。DNAのこのような塩基変化は突然変異の原因となり、修復されずに残ると遺伝子発現の障害が生じる。また、DNAのヌクレオチド塩基とデオキシリボース間の結合が加水分解を受けると塩基は除去され配列上に欠失が生じ、ヌクレオチド置換やフレームシフト変異が起こる。また、たんぱく質のアミノ基がグルコースなどの還元糖と反応しアマドリ (Amadori) 化合物を生成し、隣接するたんぱく質のアミノ基と反応できるようになり、2つのたんぱく質や他の生体高分子の間で共有結合による架橋が形成され、さらに糖化が進むと架橋による凝集体の糖化反応最終生成物 (AGE: Advanced glycation endproduct) が生じる。コラーゲンの硬化、白内障、ヘモグロビン A1c (糖尿病で上昇) などはその例である。紫外線によって DNA、RNA の共有結合の断裂、たんぱく質の架橋、さらには活性酸素種 (ROS) の生成が起こる。なかでも、ヒドロキシラジカル ( $\cdot\text{OH}$ ) やスーパーオキシドアニオン ( $\text{O}_2^-$ ) などのフリーラジカルは、反応性が強く DNA やたんぱく質などの高分子のみならず、不飽和脂肪酸と結合し損傷が生じ細胞機能障害に伴って老化が進行する。これがデンハム・ハーマン (Harman, D.) によって提唱された老化のフリーラジカル説であり、ミトコンドリア説と呼ばれることもある<sup>4)</sup>。ROS の主要な発生源はミトコンドリアであるが、生体内では消去システムが作用し ROS レベルを制御している。なお注目すべきは、ROS によってテロメア配列の GGG の部分が傷つきやすく、またテロメラーゼ活性が減退する。ところで、老化において中心的な役割を果たすのは DNA 機能の変化であり、上記のようなさまざまな細胞内・外因子によっておこる DNA 損傷に加え、細胞分裂に伴う突然変異によっても塩基配列の過誤 (エラー) が生じ蓄積されると細胞機能障害、つまり老化の原因となる (エラー破局説)。細胞一個に含まれる DNA (総塩基対 30 億) には、1 日あたり数千個もの傷がつくと考えられている。

c) 老化遺伝子の発現と作用機構: 1980 年代後半から 1990 年代には、老化制御と遺伝子に関する研究の急速な進展が見られたが、その要因の 1 つとして有用モデル系の線虫 (*C.elegans*) によるところが大きい。線虫は体調 1mm で約 1,000 個の細胞から成る多細胞生物であり、平均寿命は約 3 週間と短く産卵後数日で老化が始まり、その全プロセスを短期間で解析できるきわめて都合なモデル系である。また、全ゲノムの塩基配列が解明され

ており、遺伝子数はヒトの 23,000 個に対し線虫は 19,000 個で、しかも多くの部分がよく似ている。

このモデル系を使って老化制御に関与する遺伝子の探索が活発に行われてきた。その中で特記すべきは、コロラド大学のトーマス・ジョンソン (Johnson, T. 1988 年) らによる老化遺伝子 AGE-1 の発見であり、この遺伝子の変異線虫は 2 倍ほど長生きした<sup>5)</sup>。さらに 5 年後には、シンティア・ケニヨン (Kenyon, C. 1993 年) ら<sup>6)</sup> は、別の老化遺伝子 DAF-2 に変異をもつ線虫は、やはり野生型より老化進行が遅く長生きすることを示した。

ところで興味深いことに、AGE-1 遺伝子は哺乳類の PI3K (Phosphatidylinositol 3-kinase) のオルソログ (ortholog, 相同分子種) であり、DAF-2 は AGE-1 の上流に位置するインスリン/IGF-1 受容体のオルソログで、IGF-1 シグナリングの重要な因子として作用している。PI3K の活性化は  $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$  から  $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$  を生成し、これが PDK-1・AKT キナーゼ系を活性化すると、転写因子 DAF-16 (FOXO, フォークヘッドのオルソログ) がリン酸化装飾を受け核内移行が阻害され、IGF-1 シグナリングが低下することで DAF-16 が活性化し老化抑制に必要な遺伝子を発現する (図 2)。

したがって、DAF-2 変異体では IGF-1 シグナリングが抑制されて老化速度が低下し寿命延長がもたらされる。これと同様な現象はショウジョウバエやマウスなどでもみられ、種を超えた共通の老化制御システムと考えられ

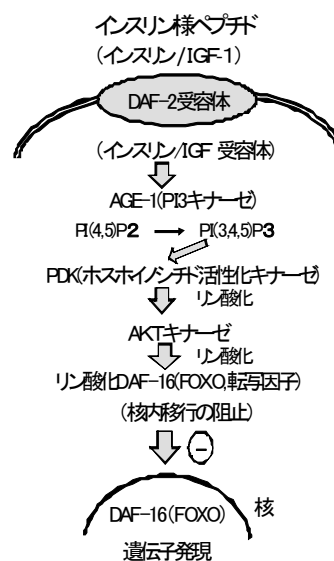


図 2. 老化遺伝子 AGE-1 とインスリン/IGF-1 シグナリング

ている<sup>7)</sup>。これらの知見を直接ヒトに適用することはできないが、ユダヤ人女性の百寿者では IGF-1 受容体の遺伝子変異による IGF-1 シグナリング低下が多いとの報告がある。また、FOXO3A の一塩基多型 (Single nucleotide polymorphism, SNP) の解析が米国、ドイツ、イタリア、中国などで行われ、いくつかの長寿関連 SNP が同定されている。

## 2-2 個体と細胞の寿命・死

**a) 個体の寿命・死：**個体や細胞にはそれぞれの寿命があり、それを終えると死を迎える。生物学的な個体は、それぞれ独立に生命を維持するために必要な内部環境を備えており、動物では個性性が明確であり、消化器・循環器系・排泄系などが発達している。生命の基本単位は細胞であり、その集合体が個体を形成するが、限られた寿命を生きて死に至る。このような多細胞個体とは異なって、1 個の細胞で 1 つの個体をなしているのが大腸菌のような単細胞生物であり、一倍体で無性生殖し無限に分裂・増殖し続け、寿命は無く不死である。

同じ単細胞生物でも原生動物のゾウリムシは、二倍体で無性生殖でも有性生殖でも増えることができる。この細胞には大核と小核があり、生命活動の情報は大核に依存し、小核は有性生殖に必要である。600~700 回ほど分裂すると異常が生じ死に至るが、その前に有性生殖 (接合) によって遺伝子をリセット (小核交換) すれば再び分裂を無限に続けることができ寿命はない。また、別の単細胞生物の酵母は一倍体と二倍体の中間的な存在で、両者の周期 (生活環) がみられる。

ところで、生物の種によって最大寿命 (極限寿命) も平均寿命もさまざまであり、最大寿命に関しては、たとえば、ガラパゴスゾウガメ/170 年、ヒト/122 年、アフリカゾウ/80 年、ウマ/46 年、ネコ/31 年、イヌ/16 年、スズメ/20 年、ミツバチ/11 か月など大きな差がある。人類史上最も長く生きたのは、フランスのジャンヌ・カルマン女史 (122 歳, 1997 年没) で、チョコレートと赤ワインを楽しみ続けたと伝えられている。興味深いことに、生物の種によって細胞の分裂回数の限界が決められており、しかも種 (個体) の寿命の長さとはよく一致している。その根拠としてテロメアの長さが考えられるが、寿命数年のマウスのテロメアがヒトのテロメアより長いことから、寿命の長さを決めている原因はまだ明確ではない。

**b) 細胞の寿命・死：**生体を構成する細胞にはそれぞれの寿命があり、たとえばヒトの場合には全体として 1 日に約 3,000 億個 (約 200g) の細胞が死んで、その分だけ再生によって新しい細胞が補充される。寿命の長さも細胞の種類によって差がある。最も短い (1 日) のは胃・腸粘膜細胞で、最も長い (平均寿命ぐらい) のは再生されない脳神経細胞と心筋細胞である。その他の細胞では、骨の細胞 (10 年)、赤血球 (120 日)、皮膚 (30 日)、血小板 (10 日)、白血球 (9 日)、精子 (2-3 日)、卵子 (1 日) などとさまざまである。なお、寿命の無い細胞、いわゆる不死化細胞として組織・臓器に存在し増殖・分化能の高い幹細胞 (Stem cells) とがん細胞がある。ES 細胞 (胚性幹細胞) や iPS 細胞 (人工多能性幹細胞) は万能細胞とも呼ばれ再生医療への応用が期待されている。

ところで、細胞はさまざまな原因で生命活動の終末である死を迎える。細胞死には、傷害、栄養不足、毒物、感染など外因による壊死 (ネクローシス, Necrosis) と寿命が尽きて死に至る自発死とに分けられる (表 1)。そして、この自発死にも定期券タイプと回数券タイプとがある。定期券タイプの例は、上述した最長寿命の脳神経細胞と心筋細胞であり、細胞分裂はしないかわりに生まれてから死ぬまでほとんど入れ替わることがなく、終生有効な定期券である。定期券の期限が切れて (寿命が過ぎて) 死ぬことをアポビオーシス (Apobiosis) という。回数券タイプの細胞死はアポトーシス (Apoptosis) と呼ばれ、ヒトの皮膚細胞のように約 1 か月で入れかわるが、これは分裂回数 (テロメア) で決まっており、一般的な体細胞では 50~60 回が限界であることから回数券にたとえられる。このように、あらかじめプログラムされた生理的な細胞の自発死はプログラム死とも呼ばれ、生命を維持するための死である。形態的には核の凝集、DNA 断片化、アポトーシス小体が認められ、最終的にはマクロファージによって貪食される。ネクローシスの場合は、細胞の膨潤、崩壊、細胞質溶出が起こる。

表 1. 細胞の寿命・死のしくみ

障害などの偶発的な原因で死ぬ - 事故死・栄養不足など…壊死(ネクローシス)
寿命が尽きて死ぬ - 自発死・自然死・計画死(約3千億個/日の細胞が死んでいく)
定期券タイプ: 脳神経細胞, 心筋細胞などの非再生系細胞。生まれてから死ぬまで入れ替わらない(有効期限が切れるまで)…アポビオーシス
回数券タイプ: 皮膚など多くの再生系細胞。約50回分裂をくり返すと死ぬ(分裂するたびに回数券一枚が減る)…アポトーシス(プログラム死)

### 3. 摂取カロリー制限と寿命延長 — 単細胞生物から霊長類まで

老化・寿命の研究にさまざまなモデル生物が用いられてきた。単細胞生物の酵母、多細胞生物ではあるが全細胞数が1,000個ほどの線虫（線形動物）、昆虫のショウジョウバエ、小動物・げっ歯類のマウス、ラット、さらには霊長類のアカゲザルなどが主なものであり、これらの生物種を超えて摂取カロリー制限による寿命延長の現象が観察されている。またヒトに関しても、アカゲザルの知見などから寿命延長が期待されるが、まだ明らかではない。

#### 3-1 モデル下等生物 — 酵母・線虫・ショウジョウバエ

酵母には出芽酵母 (*S. cerevisiae*) と分裂酵母 (*S. pombe*) とがあり、前者は母細胞が出芽によって増える非対称分裂であるのに対して、後者は動物細胞のように二分裂して増える対称分裂である。老化・寿命の研究には、一般に出芽酵母がよく使われ、寿命の測定には複製寿命 (Replicative lifespan) あるいは経時寿命 (Chronological lifespan) による方法がある。前者の場合、1個の母細胞が一生の間に分裂（出芽）できる回数には限界があり、最終的には娘細胞ができなくなり死に至るが、この分裂限界はテロメアとは関係がなく寿命は娘細胞の数として示される。それに対して経時寿命では、栄養枯渇によって分裂不能になった定常期 (Stationary state) の細胞が生存できる時間の長さが寿命として示される。

2000年にマサチューセッツ工科大のレオナード・ガラランテ (Guarante, L.) らのグループによる注目すべき先駆的な研究がある<sup>8)</sup>。出芽酵母を0.5%、2%グルコース含有培地で生育させると低濃度グルコースの方が高濃度培養に比べ寿命が延長され、しかもその原因が転写調節遺伝子のサーター (SIR2) によることを明らかにした (図3)。

これが契機となってその後の他生物種におけるカロリー制限の寿命延長研究の進展を加速させることになった。

線虫に関しては酵母と同様にカロリー制限で寿命が延長することは知られていたが、ハーバード大のブルーネ (Brunet, A) らのグループは、新しい食餌制限法 (Solid dietary restriction, sDR)、すなわち2日ごとに大腸菌 (餌) ( $5 \times 10^8 \sim 5 \times 10^{12}/\text{ml}$ ) を含む新鮮培地に移すという簡便な方法を用いて検討し、高濃度の大量投与に比べ低濃度投与の方が著しく寿命が延長することを示した<sup>9)</sup>。また、エネルギーセンサーであるたんぱくリン酸化酵素

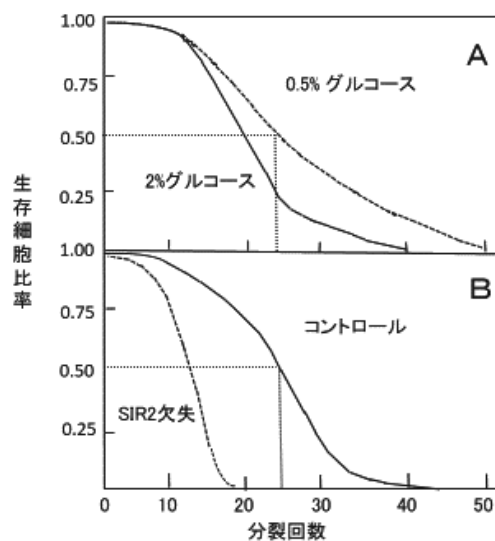


図3. 酵母のカロリー制限による寿命延長効果と SIR2 の関与

の AMP キナーゼ (AMPK, 線虫オルソログは AAK-2) が食餌制限によって活性化され、ついで AMPK による FOXO (線虫オルソログ: DAF-16) のリン酸化が起こり、ストレス抵抗性や寿命延長に関与する遺伝子の転写活性が上昇することが明らかにされた。

昆虫のショウジョウバエにおいても、低カロリー飼食 (5%スクロース、5%イースト、2%寒天)の方が高カロリー (15%スクロース、15%イースト、2%寒天)飼育より寿命が長くなり、酵母や線虫の場合と同様に SIR2 が重要因子として作用している<sup>10)</sup>。

#### 3-2 げっ歯類 — ラット・マウス

上述のような下等生物を用いたカロリー制限による寿命延長効果のメカニズムに関する活発な研究によって数々の新見解が得られているが、そのルーツは80余年前 (1935年)のコーネル大学のクリーブ・マッケイ (McCay, MC) の研究グループによるラットの実験であった<sup>1)</sup>。必要な栄養素 (ビタミン、たんぱく質、ミネラル) を含み、栄養不足でない低カロリー食で離乳後から飼育されたラットは、普通食ラットより最大寿命が長くなるというエポックメイキングな実験知見であった。そして、摂取カロリーの低減によって成長・発育の進行が遅くなり、老化プロセスの遅延が最大寿命の延長をもたらすと結論づけられた。この実験は再現性も高く、しかも他種のラットやマウスにでも同様な結果が得られた。

表 2. 老化, カロリー制限による遺伝子発現の変化(マウス腓腹筋)

老化	カロリー制限
<b>ストレス応答の増大</b> 熱ショックたんぱく質(27kDa, 71kDa) DNA損傷(GADD-45) 酸化ストレス(クレアチンキナーゼ)	<b>たんぱく質代謝の亢進</b> 合成活性(伸長因子1- $\gamma$ ) 代謝回転(26Sプロテアーゼ, サブユニットTRR-1)
<b>エネルギー代謝の低下</b> 解糖系の低下( $\alpha$ -エノラーゼ, ATP合成酵素) ミトコンドリアの機能障害	<b>エネルギー代謝の亢進</b> 糖新生・ペントースリン酸シャント(トランスケトラーゼ, フルクトース1,6-ビスホスファターゼ)
<b>運動ニューロンの減少</b> 神経再生(ニューロトロフィン) 神経突起の伸展(シナプス小胞・プロテイン-2)	<b>生合成系の亢進</b> 脂肪酸(脂肪酸合成酵素) ヌクレオチド前駆体(プリンヌクレオシド・ ホスホリラーゼ)
	<b>高分子物質の損傷の軽減</b> 熱ショック因子, 解毒系酵素, DNA修復系 (DnaJホモログ, チトクローム-P450, DNAポリメラーゼ $\beta$ )

ところが、その後テキサス大学のマソーロ(Masoro, E.J.)らによって制限食投与の開始が離乳時でなくても、たとえば生後6か月と6週から始めた場合でも最大寿命を比較するとほぼ同程度の延長効果が示され、成長・発育の緩徐な進行が寿命延長の根拠とするマッケイ仮説の解釈に異論が唱えられた<sup>11)</sup>。また一方でマウスの系統の遺伝背景の差によって食餌制限の寿命応答が異なり、寿命の短縮が起こることが報告されている<sup>12)</sup>。ところで、カロリー制限によって老化に伴う遺伝子発現が抑制されることがマウス腓腹筋の実験で示された<sup>13,14)</sup>(表2)。

5か月マウスと30か月(老齢)マウスの筋サンプルについてオリゴヌクレオチド・マイクロアレイで分析し、6,347遺伝子の中で老化による発現上昇あるいは低下を示す遺伝子は、それぞれ58個と55個であり、わずかに0.5%ほどで老化が大きな遺伝子発現の変化によるものではなさそうである。老化に伴う発現変動として、ストレス応答関連遺伝子の発現増大、エネルギー代謝系の発現低下および神経障害系の発現増大が見られる。さらに、通常食とカロリー制限食(24%減)で30か月間飼育し、同じ方法で遺伝子発現を比較検討したところ、制限食飼育のマウス筋ではたんぱく質・エネルギー代謝および生合成関連遺伝子の発現増大に加え、高分子物質障害の軽減を反映して解毒・DNA修復・酸化ストレス応答関連の遺伝子発現の低下が示された。

### 3-3 霊長類 — アカゲザル、ヒト

酵母、線虫、ショウジョウバエやマウス、ラットなど

のモデル生物は、寿命も短くカロリー制限実験も比較的短期間で行える利点があり、これまでも寿命延長メカニズムに関する数多くの貴重な知見が得られているが、ヒトにおけるカロリー制限の効果については長期にわたる実験も容易でなく結論は出ていない。そこで、ヒトに近い霊長類のアカゲザル(平均寿命:約27年、最大寿命:約40年)を用いた研究調査が1990年代初期からアメリカを中心に開始された<sup>15)</sup>。そのなかでも、米国の国立老化研究所(NIA)とウィスコンシン大学(UW)は二大拠点として大規模実験が行われてきたが、当初は寿命延長というよりは、むしろ糖尿病、心臓血管病、がんなどの老化関連疾患のリスク因子に対する影響を調査するのが主要な研究目的であった。実際にカロリー制限食(30%減)を与えられたサルでは疾患リスク、死亡リスクともに著しく軽減することが示され、このことが寿命の延長をもたらすと推測されていた。

その後2000年代に20~23年間にわたる大規模調査の結果がScience誌(NIA)とNature誌(UW)に発表され、カロリー制限の寿命延長効果の有無に関して一大論争となり、多くの関連研究者の注目の的となった。2009年にUWの研究チームは、カロリー制限(30%減)によって老化関連疾患(糖尿病、心臓血管病、がん)の発症時期が遅延し、またそれらの疾患が原因で死亡する割合も著しく低下することを発表し、カロリー制限の寿命延長効果を主張した<sup>16)</sup>。その論文中には平均寿命(27歳)時の対照群サルとカロリー制限サルの体型、表情、毛並の状態を比較したカラー写真も示されており、老化進行の

差が明らかである。ところが、2012年にNIA研究チームは、カロリー制限を若齢期（1～14歳）と老齢期（16～23歳）で開始し23年間にわたる実験の結果を発表し、体重減少、コレステロール低下などの健康改善効果は認められたが、カロリー制限群と対照群とで寿命の延長効果は見られずUWチームの実験結果に反論を唱えた<sup>17)</sup>。その上で霊長類のカロリー制限効果は複雑で、環境、栄養、遺伝子などの因子の関与を指摘している。その後5年を経て、長年にわたる論争に決着がつきNature誌（2017年1月）に発表された<sup>18)</sup>。両研究チーム（UW、NIA）が合同でそれぞれの実験データを詳細に比較検討した結果、実験方法（カロリー制限の開始年齢、摂食法、食事成分など）に両研究でかなり差があり、寿命延長効果については明確な結論が得られていないが、老化関連疾患の予防・改善にカロリー制限は有効であり、その結果として長生きすることになると結論した。両研究チームによる再検討でまとめた共同論文タイトルは、“Calorie restriction improves health and survival of rhesus monkeys”であり、“Taken together, data from both UW and NIA studies support the concern that lower food intake in adult or advanced age is associated with improved survival in nonhuman primates”が結論である。

ところで、ヒトに関しては、かの有名な貝原益軒（江戸中期、本草学者の「養生訓」にある「腹八分目」の教えに端を発している。当時の平均年齢は35歳ぐらいであったが、彼はその2倍を越える84歳まで長生きし、自己体験に基づいて83歳の時に健康な暮らし方についてまとめたもので、今日でもその教訓は引き継がれている。外国でも“To live longer, eat less”とか“Light suppers make long life”など長生きにはカロリー減がよいとされてきた。上述したように、単細胞生物から小動物に至る広く種を超えてカロリー制限による寿命延長効果が観察されたが、霊長類のアカゲザルでは老化に伴う疾患の発症時期の遅延や改善効果は認められたが、寿命延長効果に関しては明白な見解は得られていない。したがって同じ霊長類のヒトに至っては、老化研究も各年齢層を対象とする横断研究が中心であり、同一対象者を幼少期から老年期にわたって継続的に分析する縦断研究は、母集団の数、数十年以上の調査期間などの条件から実際的には不可能である。そのためにヒトでのカロリー制限の寿命への影響に関する直接的な科学的データが得られていないが、20年間近くのアカゲザルの研究成果から、遺伝

子の共通性も高いヒトでもカロリー制限によって生活習慣病の発症が抑えられ健康寿命が延びる可能性があり、「腹八分目」の基本概念は今なお健在である<sup>19,20)</sup>。ただし、成長期と高齢者の場合のカロリー制限には特別な配慮が必要である。

### 3-4 カロリー制限による長寿効果のメカニズム — 長寿遺伝子サーチュインを中心に

カロリー制限による寿命延長のメカニズムに関して諸説が提示され、実験モデル生物ではかなり具体的な細胞シグナル伝達系までも明らかとなった部分もあるが、その一方で高等動物、特に霊長類に関しては、複雑多様な生体内・外因子が寿命制御に関与しているためにカロリー制限と寿命延長との因果関係について明確な定説が得られていない。ただし、適切なカロリー制限が老化に伴う動脈硬化や糖尿病のような生活習慣病など諸疾患の予防、発症遅延や改善に良い効果をもたらすことは、疫学調査研究も含め、いくつかの報告からも明らかであり、その結果として長寿につながるものと考えられている。

ところで、このような経緯のなかで、加齢とともに進行する老化プロセスの仕組みに関しては、前述したように老化遺伝子の発見も含め、分子レベルでもかなり明らかにされてきた。したがって、得られた知見をもとに抗老化すなわち老化遅延が寿命延長をもたらすとの視点から、カロリー制限による長寿効果のさまざまな要因が指摘されている。その主なものとして、グルコース/インスリン・システム（グルコースの効率的利用、インスリン感受性の増大）、活性酸素(ROS)低減（たんぱく質・核酸・脂質の酸化障害の減少）、ストレス耐性（グルココルチコイド増加、熱ショックたんぱく質の誘導発現）、インスリン/IGF-1システム（シグナル伝達系の活性低下）などが報告されている。ここでは、長寿遺伝子サーチュインを中心に述べる。

a) 酵母 SIR2 の発見からサーチュインファミリーへ：シンクレア(Sinclair, DA)とガラランテ(Guarante, L.)は、出芽酵母の老化研究のなかで核小体の膨潤・断片化が老化の原因であることを見出した(1997年)<sup>21)</sup>。リボソームDNA(rDNA)は、染色体上に線状に並んだリピート構造として存在するが、分裂を重ねて老化が進行するにつれて異常な環状リボソームDNA(Extrachromosomal rDNA circles, ERC)が染色体から離断・断片化して、核小体に蓄積し母細胞の分裂停止・死に至る。この時点で

は分裂回数が約 20 回で母細胞 1 個あたりの ERC は 500 ~1,000 個にも達する。ついで、同じ研究グループはこの老化ステップを抑制する遺伝子を探索し SIR2(Silent Information Regulator)という遺伝子を発見した<sup>8)</sup>。SIR2 たんぱく質は DNA 上の性決定遺伝子の情報を読み取れなくする働きがあり、リピート DNA を転写活性が抑えられたヘテロクロマチン様状態にする。実際に、この遺伝子を細胞に過剰発現させると ERC 形成が減り、老化が遅くなって寿命が延びるが、その遺伝子活性を抑制すると、ERC 蓄積が促進し寿命が短縮する。同様な現象は、線虫やショウジョウバエの実験でも確認された。しかも興味深いことに、カロリー制限で SIR2 が活性化されることが示され大きな反響を呼び、長寿遺伝子と呼ばれる所以となった。さらに SIR2 と同じような働きをするたんぱく質はヒトを含む哺乳類では 7 種類(SIRT1-7)あり、サーチュイン(Sirtuin)と総称されている<sup>22, 23)</sup>。このように種を超えて存在するサーチュイン遺伝子は、寿命延長の中心的な因子として働き、その活性をオンにすることが長寿をもたらすと考えられ、古くから伝えられてきた「腹八分目」説にとって 1 つの科学的インパクトとなった。SIRT1, 6, 7 は核、SIRT2 はサイトゾル、また SIRT3, 4, 5 はミトコンドリアに局在しており、それぞれの役割を介してカロリー制限に対応している。そのなかでも特に、SIRT1 は多様な細胞機能の重要な調節因子として作用し生体のホメオスタシスを維持している<sup>24)</sup>。SIRT1 がカロリー制限によって誘導発現され細胞生存・寿命延長をもたらすことがラット・FaO へパトーマ細胞やヒト・HEK 胎児細胞を用いた実験で示されている<sup>25)</sup>。ラットに 40%減のカロリー制限食(CR)を離乳後 12 か月間与えると、組織中(脳, 腎, 肝など)の SIRT1 発現量が対照ラットより増加し、また CR ラット血清培地で培養した FaO 細胞・HEK 細胞の SIRT1 量が 2 倍以上に増え、ストレス耐性が高まり生存維持が可能となる。

**b) カロリー制限によるサーチュイン活性化機構:**

生物種を超えて高度に保存されているサーチュインは、普段はスイッチオフの状態であるが、摂取カロリーを制限するとスイッチオンとなり活性化される<sup>8)26, 27)</sup>。サーチュインたんぱく質は、NAD (Nicotinamide adenine dinucleotide) 依存性の脱アセチル酵素 (Deacetylase) であって、ヒストンや転写因子、酵素などさまざまなアセチル化たんぱく質から取り去ったアセチル基を ADP リボースに付加し O-アセチル-ADP リボ

ースができる。つまりサーチュイン反応産物として、ニコチンアミド、脱アセチル化たんぱく質とに O-アセチル-ADP リボースが生じる。NAD はエネルギー代謝(解糖系 TCA 回路)に関わる脱水素酵素 (Dehydrogenase) の補酵素として働き、活性制御の重要な因子であると同時に、サーチュインは NAD で活性化されるのでエネルギー代謝のセンサーとしても働いている。カロリー制限で解糖系代謝は低下し、ミトコンドリア呼吸が促進され細胞内 NAD が増えサーチュインがスイッチオンとなる<sup>28)</sup> (図 4)。サーチュインは、NAD レベルに反映されるエネルギー代謝情報を転写制御因子の脱アセチル化を介して、遺伝子発現のエピジェネティック制御という重要な役割を果たしている。たとえば、ミトコンドリア生成に重要な因子である PGC-1 $\alpha$  が脱アセチル化されて活性化し、ミトコンドリアの数と活性が増加し、呼吸促進による活性酸素 (ROS) 生産が高まると考えられるが、この系でつくられたミトコンドリアは ROS 産生の少ない良質なもので、“高効率ミトコンドリア” (Effective mitochondria) とも呼ばれている<sup>29, 30)</sup>。

ところで、SIR2 活性化に伴い NAD が分解されてニコチンアミドが生じるが、これは SIR2 の阻害物質である。興味深いことに、カロリー制限によってニコチンアミドをニコチン酸にする律速酵素 (PNC1 : Pyrazinamide nicotinamidase) の発現誘導が促進され、結果として SIR2 阻害物質のニコチンアミドが低減することになる

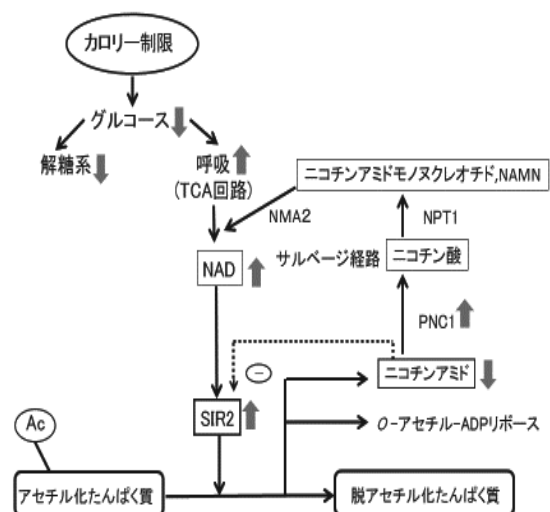


図 4. カロリー制限によるサーチュイン SIR2 の活性化と制御メカニズム

NAD; ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド、PNC1; ピラジナミド・ニコチンアミダーゼ、NPT1; ニコチンアミド・ホスホリボシルトランスフェラーゼ、NMA2; ニコチンアミドモノヌクレオチド・アデニルトランスフェラーゼ



(図4)。ハーバード大のデービッド・シンクレア (Sinclair, DA.) らの研究グループは、カロリー制限の寿命延長効果は、NAD 増加による SIR2 活性化というよりはむしろ、ニコチンアミド減少によるニコチンアミド・モデル (Nicotinamide model) を提唱しており、PNC1 遺伝子を特異的な長寿遺伝子と呼んでいる。また、PNC1 に次いで2つの酵素、すなわちNPT1(Nicotinamide phosphoribosyltransferase) と NMA2(Nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase) が作用して NAD が生じるが、この再利用系をサルベージ (Salvage) 経路と呼んでいる。中間産物のニコチンアミドモノヌクレオチド (NMN) は、サーチュインを活性化するサプリメントとしての可能性が話題となっている。なお、NAD 合成にはトリプトファンからの *de novo* 経路があるが、哺乳類ではサルベージ系が重要である。

c) カロリー制限ミメティック作用 — レスベラトロールとサーチュイン活性: 上述のように各種生物において、摂取カロリー制限が寿命の延長や老化関連疾患の発症予防・改善効果をもたらし、しかもサーチュイン活性が重要因子であることを示す数多くの研究報告がある<sup>23)25,26)</sup>。そこで、サーチュインを活性化する低分子化合物のスクリーニングが活発に行われるようになり候補物質が見つかったが、その中でもレスベラトロール (Resveratrol, RSV) がリコンビナント (組み換え体) SIR2・SIRT1 に対する最も強い活性化を示した。さらに、RSV 投与によって出芽酵母の寿命 (出芽回数) を70%延長することができ、老化マーカーの環状リボソーム DNA の形成も抑制された。これらの研究結果、つまり RSV によるサーチュイン活性化と寿命延長効果が、前出のシンクレアらによって2003年にNature誌<sup>31)</sup>に発表されると、大きな反響を呼ぶことになるが、それはよく知られている「フレンチパラドックス (フランスの逆説)」との関連からである。フランス人はチーズなど脂肪食品を多く食べているのに心臓疾患の発症が少なく平均寿命が長いのは、赤ワインに含まれるポリフェノールによる抗酸化作用によると考えられていたが、サーチュイン活性化・寿命延長という新知見は世の中に大きなインパクトを与えた<sup>32,33)</sup>。その後、線虫やショウジョウバエでも RSV によって寿命が延びることが報告された。マウスに関しては、高カロリー食で肥満になって寿命が短縮するが、RSV 投与で標準カロリー食と同程度に長くなるということが示されたが、標準食マウスに対する寿命延長効

果は認められなかった<sup>34,35)</sup>。なお、下等生物で見られたような直接的な寿命延長は見られないが、インスリン感受性の改善効果や老化に伴う心臓疾患の抑制効果によって長生きすると推測されている<sup>36)</sup>。RSV 投与マウスの骨格筋では、SIRT1 によるミトコンドリア、PGC-1 $\alpha$  の発現・活性の増大が報告されている<sup>37)</sup>。ヒトではインスリン感受性の増大など代謝改善効果が疫学のおよび臨床的研究で示され、たとえば肥満者の RSV 投与によって骨格筋の PGC-1 $\alpha$  発現が上昇しミトコンドリア活性が改善する。さらに、ヒト培養細胞に RSV を投与するとアディポネクチン増加、PAI-1 低下やトリグリセリド減少などが生じるが、SIRT1 の関与については言及されていない。

このように、RSV によるサーチュイン活性化を介して寿命延長や代謝調節、疾患予防・改善などさまざまな効果が多数の研究報告で示され、RSV の医学的有用性が注目の的となった。ところが、その一方で RSV のサーチュイン活性化に対して否定的な論文が発表され<sup>38-41)</sup>、賛否両論があり最終的な結論は得られていないが、その原因は *in vitro* アッセイ法にある。これまでの SIR2・SIRT1 の活性測定には、非生理的な蛍光分子をもつ人工ペプチ

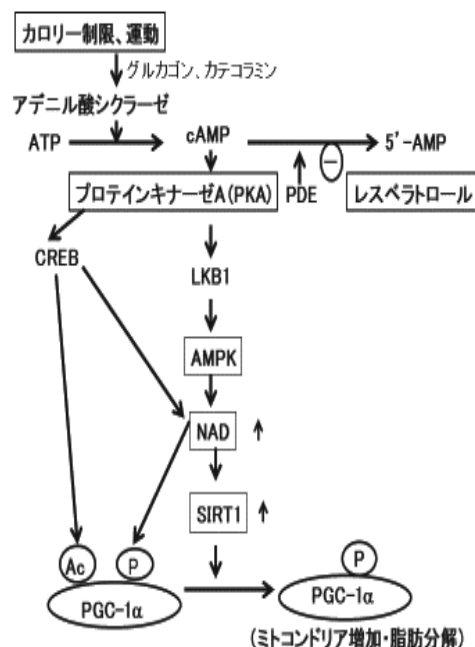


図5. レスベラトロールによる SIRT1 の間接的な活性化  
PDE: ホスホジエステラーゼ, CREB: cAMP 応答配列結合たんぱく質, AMPK: AMP 依存性プロテインキナーゼ, PGC-1 $\alpha$ : 転写活性化補助因子, LKB1: セレン・スレオニンキナーゼ

ド(Fluor de Lys キット製品)を基質に用いているが、蛍光分子のないアセチル化ペプチド (PGC-1) を基質にした場合には脱アセチル化活性に対する RSV の影響は認められず、また酵母の RSV 投与による SIR2 活性化も見られないことなどから、RSV は SIRT1 の直接的な活性化剤ではないと結論している。なお、これらの報告に対する反論もあり、RSV は SIRT1, SIRT5 と直接結合して活性化し、SIRT3 を阻害することが示された<sup>42)</sup>。さらに、RSV による間接的な SIRT1 活性化のメカニズムが提示され、RSV が PDE4 (cAMP ホスホジエステラーゼ) を阻害して cAMP 分解を抑制し、PKA (プロテインキナーゼ A)・AMPK (AMP 依存性キナーゼ) 系を介して SIRT1 活性化が起こり、PGC-1α の脱アセチル化によってミトコンドリアの増加・機能亢進が生じる<sup>43)</sup>(図 5)。

#### d) サーチェインを介さない寿命延長システム :

ガランテ研究グループによる酵母 SIR2 遺伝子の発現に端を発し、その後の研究で生物種を超えてカロリー制限の寿命延長にサーチェインが関与していることが広く知られるようになった。ところが、このようなサーチェインのサクセスストーリーでは説明できない研究報告がある。酵母の経時寿命(Chronological lifespan)は、分裂寿命(Replicative lifespan, 分裂回数で示す)とは異なっており、カロリー制限・寿命延長におけるサーチェインの関与についての研究報告は少ない。酵母サーチェイン SIR2 を欠失させた変異酵母のカロリー制限(グルコース 2% → 0.5%)による寿命延長は、野生酵母(SIR2 存在)と同程度で 2%グルコース培養の 100 倍以上の生存が見られ、また 2%培養でも寿命が短くなることはなく、むしろ長くなる傾向が観察されたことなどから、カロリー制限の寿命延長には SIR2 を介さない別システムの存在が示唆されている<sup>44)</sup>。なお、分裂寿命についても SIR2 非依存性の経路を示す報告がある。

カロリー制限による寿命延長は、老化要因の活性酸素種(ROS)の産生低下によるとする説が従来よく指摘されてきたが、実際には呼吸代謝は亢進し ROS 産生はむしろ増加することが示され、別の機構として ROS 消去酵素系が注目された。低グルコース(0.5%)培養酵母では、スーパーオキシドディスムターゼ(SOD)、カタラーゼ、グルタチオンペルオキシターゼ(GPx)の発現が誘導されるが、SIR2 欠失による影響はなく SIR2 は関与していない<sup>45)</sup>。また、SIR2 を介さない系として TOR(Target of

rapamycin)経路がある<sup>46)</sup>。このたんぱくリン酸化酵素(TOR キナーゼ)は、下流の SCH9(S6 キナーゼ、S6K)を活性化すると TOR キナーゼ活性が低下しリボソーム合成が抑制され、分裂寿命および経時寿命ともに延長する。また、TOR 遺伝子欠失や阻害剤のラパマイシン処理で寿命が長くなる。なお、マウスでもラパマイシン投与による寿命延長が実験で示されている。

ルイギ・フォンタナ(Fontana L.)らは、カロリー制限において TOR シグナル系が、広い生物種に共通して重要な役割を果たしていることを強調するレビューを Science 誌(2010 年 4 月 16 日)に発表した<sup>47)</sup>。そのタイトルは“Extending Healthy Life Span - From Yeast to Humans”で、カロリー制限による寿命延長のメカニズムを各生物種についてカラー図で示されている。酵母では TOR・S6 キナーゼ系と AC(アデニル酸シクラーゼ)・PKA(プロテインキナーゼ A)系、線虫とショウジョウバエでは TOR・S6 キナーゼ系とインスリン/IGF-1・AKT 系、マウスでは TOR・S6 キナーゼ系と GH(成長ホルモン)/IGF-1・AKT 系が示され、カロリー制限ではこれらのシグナリング経路が抑制され、寿命の延長がもたらされる。ヒトに関しては GH/IGF-1 システムの関与がマウス実験などから推測されるが、他の生物の場合のような実験は不可能で統一見解は得られていない。

ところで、このレビュー論文では、カロリー制限・寿命延長のルーツであるサーチェインに関する記述が全く無いのが不思議にも思えるが、その 4 か月後(4 月 26 日)の Science 誌(Letters)で、ガランテ、シンクレアを含む多数のサーチェイン研究者による反論コメントが示された<sup>48)</sup>。そのタイトル“Dietary Restriction : Standing Up for Sirtuins”から自明のように、すでに 1,000 編以上の論文で健康有用性が示されているにもかかわらず、“no mention of the sirtuins”は受け入れ難いとし、冒頭からサーチェインの議論を“should have included”、いくつかの引用文献が“misleading”などと、かなり激しい表現で反論し、多数の研究が“a central role of sirtuins”を支持していることを強調している。共著者数も 33 研究機関の 1 名の代表研究者からなる総勢 33 名(日本人 7 名)と多いことから事情がよく窺える。

また、この反論に対して同論文のレスポンス欄でフォンタナらのグループは、疾患での予防・改善での重要性は認めながらもサーチェイン活性化による哺乳類の寿命延長を実験的に示した論文は無いと反論している。両グループとは別の立場から、ヘイフリック限界説を唱えた

レオナルド・ヘイフリックは、カロリー制限効果は過食・肥満による寿命短縮を防ぐことにあるとコメントしたが、寿命延長は単なる疾患予防によるものとする考えに反論している。

なお、これらの意見対立の根底には、カロリー制限・寿命延長とサーチュインの関連性に対する評価の差にある。つまり、酵母・線虫など下等生物で見られる密接な関わりが高等動物にどの程度適用できるかが論点の中心となっている。サーチュインがヒストンたんぱく質を脱アセチル化するエピジェネティック酵素であることからすれば、複雑な生体シグナリング・システムを備えるヒトでのカロリー制限・寿命の分子メカニズムの解明は、今後の研究進展に待たねばならない。

## 7. おわりに

古来、不老長寿は人類の願望であったが、そのための薬はもとより具体的に有効な手段はないままに長い年月が過ぎた。生物学的には、不老(老いないこと)は不可能であり、老化の進行を遅らせ長生きする老化遅延・寿命延長、世に言う「元気で長生き」がより現実的な人の願いである。そのような中で、江戸中期の儒学者・貝原益軒は「養生訓」で長生きには「腹八分目」が良いと説いており、これが今日のいわゆる摂食カロリー制限(Calorie restriction)説のルーツとなっている。実際にその効果を最初に示したのが、コーネル大のマッケイら(1935年)によるラットの実験であり、カロリー低減食によって寿命が延長することが確かめられた。これを契機にそのメカニズム解明の研究が急速に進展し、線虫の老化遺伝子 AGE-1、酵母の長寿遺伝子 SIR2 の発見、さらには哺乳類のサーチュイン (Sirtuin)・ファミリー (SIRT1-7) の存在が明らかとなり、カロリー制限による老化遅延・長寿に関する細胞シグナル伝達システムが示された。ところで、このような下等モデル生物やラットなどの実験小動物では顕著なカロリー制限による長寿効果が見られたが、霊長類 (アカゲザル) では効果の有無に関しては大論争が展開され、結局はカロリー制限による老化関連疾患 (糖尿病、がん、心疾患など) の予防・改善が長寿をもたらすとの結論で落ち着いた。人については、20余年にわたるアカゲザル実験のようなことは不可能である上に、サー

チュイン遺伝子を介するより複雑な生体機能調節がなされており、カロリー制限の長寿効果は必ずしも定かではないが、やはり基本的には老化に伴う各種疾患のリスク軽減・発症抑制をすることが健康長寿をもたらすものと考えられている。

## 参考文献

- 1) McCay CM, Crowell MF, Maynard LA. The effect of retarded growth upon the length of life span and upon the ultimate body size. *J Nutr.* (1935)10:63-79.
- 2) Guarente L. Diverse and dynamic functions of the Sir silencing complex. *Nat Genet.* (1999)23:281-285.
- 3) Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res.* (1961) 25:585-621.
- 4) Harman D. The Biologic clock: the mitochondria? *J Am Geriatr Soc.* (1972)20:154-157.
- 5) Friedman DB, Johnson TE. Three mutants that extend both mean and maximum life span of the nematode, *Caenorhabditis elegans*, define the age-1 gene. *J Gerontol.* (1988)43:B102-109.
- 6) Kenyon C, Chang J, Gensch E, Rudner A, Tabtiang R. A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type. *Nature.* (1993)366:461-464.
- 7) Ziv E, Hu D. Genetic variation in insulin/IGF-1 signaling pathways and longevity. *Ageing Res Rev.* (2011)10:201-204.
- 8) Lin SJ, Defossez PA, Guarente L. Requirement of NAD and SIR2 for life-span extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science.* (2000)289:2126-2128.
- 9) Greer EL, Dowlatsahi D, Banko MR, Villen J, Hoang K, Blanchard D, et al. An AMPK-FOXO pathway mediates longevity induced by a novel method of dietary restriction in *C. elegans*. *Curr Biol.* (2007)17:1646-1656.

- 10) Rogina B, Helfand SL. Sir2 mediates longevity in the fly through a pathway related to calorie restriction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (2004)101:15998-16003.
- 11) Masoro EJ. Possible mechanisms underlying the antiaging actions of caloric restriction. *Toxicol Pathol.* (1996)24:738-741.
- 12) Liao CY, Rikke BA, Johnson TE, Diaz V, Nelson JF. Genetic variation in the murine lifespan response to dietary restriction: from life extension to life shortening. *Aging Cell.* (2010)9:92-95.
- 13) Lee CK, Klopp RG, Weindruch R, Prolla TA. Gene expression profile of aging and its retardation by caloric restriction. *Science.* (1999)285:1390-1393.
- 14) Weindruch R, Kayo T, Lee CK, Prolla TA. Microarray profiling of gene expression in aging and its alteration by caloric restriction in mice. *J Nutr.* (2001)131:918S-923S.
- 15) Lane MA, Black A, Ingram DK, Roth GS. Calorie restriction in nonhuman primates: implications for age-related disease risk. *J Anti-Aging Med.* (1998) 1:315-326.
- 16) Colman RJ, Anderson RM, Johnson SC, Kastman EK, Kosmatka KJ, Beasley TM, et al. Caloric restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys. *Science.* (2009)325:201-204.
- 17) Mattison JA, Roth GS, Beasley TM, Tilmont EM, Handy AM, Herbert RL, et al. Impact of caloric restriction on health and survival in rhesus monkeys from the NIA study. *Nature.* (2012)489:318-321.
- 18) Mattison JA, Colman RJ, Beasley TM, Allison DB, Kemnitz JW, Roth GS, et al. Caloric restriction improves health and survival of rhesus monkeys. *Nat Commun.* (2017)8:14063.
- 19) Heilbronn LK, Ravussin E. Calorie restriction and aging: review of the literature and implications for studies in humans. *Am J Clin Nutr.* (2003)78:361-369.
- 20) Omodei D, Fontana L. Calorie restriction and prevention of age-associated chronic disease. *FEBS Lett.* (2011)585:1537-1542.
- 21) Sinclair DA, Guarente L. Extrachromosomal rDNA circles - a cause of aging in yeast. *Cell.* 1999) 91:1033-1042.
- 22) Michan S, Sinclair D. Sirtuins in mammals: insights into their biological function. *Biochem J.* (2007)404:1-13.
- 23) Wątroba M, Szukiewicz D. The role of sirtuins in aging and age-related diseases. *Adv Med Sci.* (2016)61:52-62.
- 24) Bordone L, Guarente L. Calorie restriction, SIRT1 and metabolism: understanding longevity. *Nat Rev Mol Cell Biol.* (2005)6:298-305.
- 25) Cohen HY, Miller C, Bitterman KJ, Wall NR, Hekking B, Kessler B, et al. Calorie restriction promotes mammalian cell survival by inducing the SIRT1 deacetylase. *Science.* (2004)305:390-392.
- 26) Guarente L, Picard F. Calorie restriction - the SIR2 connection. *Cell.* (2005)120:473-482.
- 27) Kaeberlein M, McVey M, Guarente L. The SIR2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in *Saccharomyces cerevisiae* by two different mechanisms. *Genes Dev.* (1999)13:2570-2580.
- 28) Anderson RM, Bitterman KJ, Wood JG, Medvedik O, Sinclair DA. Nicotinamide and PNC1 govern lifespan extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* (2003)423:181-185.
- 29) Civitarese AE, Carling S, Heilbronn LK, Hulver MH, Ukropcova B, Deutsch WA, et al. Calorie restriction increases muscle mitochondrial biogenesis in healthy

- humans. *PLoS Med.* (2007)4:e76.
- 30) López-Lluch G, Hunt N, Jones B, Zhu M, Jamieson H, Hilmer S, et al. Calorie restriction induces mitochondrial biogenesis and bioenergetic efficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (2006)103:1768-1773.
- 31) Howitz KT, Bitterman KJ, Cohen HY, Lamming DW, Lavu S, Wood JG, et al. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature.* (2003)425:191-196.
- 32) Lekli I, Ray D, Das DK. Longevity nutrients resveratrol, wines and grapes. *Genes Nutr.* (2010)5:55-60.
- 33) Das DK, Mukherjee S, Ray D. Resveratrol and red wine, healthy heart and longevity. *Heart Fail Rev.* (2010)15:467-477.
- 34) Baur JA, Pearson KJ, Price NL, Jamieson HA, Lerin C et al. Resveratrol improves health and Survival of mice on a high-calorie diet. *Nature* (2006) 444: 337-342.
- 35) Agarwal B, Baur JA. Resveratrol and life extension. *Ann NY Acad Sci.* (2011)1215:138-143.
- 36) Lam YY, Peterson CM, Ravussin E. Resveratrol vs. calorie restriction: data from rodents to humans. *Exp Gerontol.*(2013)48:1018-1024.
- 37) Lagouge M, Argmann C, Gerhart-Hines Z, Meziane H, Lerin C, Daussin F, et al. Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC- $\alpha$ . *Cell.* (2006) 127:1109-1122.
- 38) Kaeberlein M, McDonagh T, Heltweg B, Hixon J, Westman EA, Caldwell SD, et al. Substrate-specific activation of sirtuins by resveratrol. *J Biol Chem.* (2005)280:17038-17045.
- 39) Borra MT, Smith BC, Denu JM. Mechanism of human SIRT1 activation by resveratrol. *J Biol Chem.* (2005) 280:17187-17195.
- 40) Beher D, Wu J, Cumine S, Kim KW, Lu SC, Atangan L, et al. Resveratrol is not a direct activator of SIRT1 enzyme activity. *Chem Biol Drug Des.* (2009)74:619-624.
- 41) Pacholec M, Bleasdale JE, Chrnyk B, Cunningham D, Flynn D, Garofalo RS, et al. SRT1720, SRT2183, SRT1460, and resveratrol are not direct activators of SIRT1. *J Biol Chem.* (2010)285:8340-8351.
- 42) Gertz M, Nguyen GT, Fischer F, Suenkel B, Schlicker C, Fränzel B, et al. A molecular mechanism for direct sirtuin activation by resveratrol. *PLoS One.*(2012) 7:e49761.
- 43) Chung JH, Manganiello V, Dyck JR. Resveratrol as a calorie restriction mimetic: therapeutic implications. *Trends Cell Biol.* (2012)22:546-54.
- 44) Smith DL, McClure JM, Matecic M, Smith JS. Calorie restriction extends the chronological lifespan of *Saccharomyces cerevisiae* independently of the sirtuins. *Aging Cell.* (2007):649-662.
- 45) Agarwal S, Sharma S, Agrawal V, Roy N. Caloric restriction augments ROS defense in *S. cerevisiae*, by a Sir2p independent mechanism. *Free Radic Res.* (2005) 39:55-62.
- 46) Kaeberlein M, Powers RW, Stefen KK, Hu D, Kirkland KT, Fields S. et al. Regulation of yeast replicative life span by TOR and Sch9 in response to nutrients. *Science* (2005) 310: 1193-1196.
- 47) Fontana L, Partridge L, Longo VD. Extending healthy life span-from yeast to humans. *Science.* (2010) 328:321-326.
- 48) Baur JA, Chen D, Chini EN, Chua K, Cohen HY, de Cabo R, et al. Dietary restriction: standing up for sirtuins. *Science.* (2010)329:1012-1016.