

レビュー

## タンパク質の構造や酵素反応へのマイクロ波の影響 Microwave Effects on Protein Structures and/or Enzymatic Reactions

栢森 史浩<sup>1,2\*</sup>、平尾 莞<sup>1</sup>、鶴岡 孝章<sup>1</sup>、中西 伸浩<sup>2,3,4</sup>、臼井 健二<sup>1,2,4\*</sup>  
Fumihito Kayamori<sup>1,2\*</sup>, Kan Hirao<sup>1</sup>, Takaaki Tsuruoka<sup>1</sup>, Nobuhiro Nakanishi<sup>2,3,4</sup>, Kenji Usui<sup>1,2,4\*</sup>

1. 甲南大学フロンティアサイエンス学部、
  2. 甲南大学非電離放射線生体環境総合研究所、
  3. 株式会社ディーエスピーリサーチ、
  4. 甲南大学 Beyond5G 寄附講座
- 1, 2. 〒650-0047 兵庫県神戸市中央区港島南町 7-1-20,  
3. 〒650-0047 兵庫県神戸市中央区港島南町 1-4-3,  
4. 〒658-8501 兵庫県神戸市東灘区岡本 8-9-1

1. Faculty of Frontiers of Innovative Research in Science and Technology (FIRST),
2. Research Institute for Nanobio-environment and Non-Ionizing Radiation (RINNIR),  
Konan University, 7-1-20, Minatojima-minamimachi, Chuo-ku, Kobe, Hyogo, 650-0047, Japan
3. DSP Research, Inc., 1-4-3, Minatojima-minamimachi, Chuo-ku, Kobe, Hyogo, 650-0047, Japan
4. Beyond5G Donated Lecturers, Konan University,  
8-9-1, Okamoto, Higashinada-ku, Kobe, Hyogo, 658-8501, Japan

Corresponding authors\*, E-mail address: kayamori@konan-u.ac.jp, kusui@konan-u.ac.jp

キーワード: タンパク質、ペプチド、酵素反応、食品、マイクロ波

Keywords: protein, peptide, enzymatic reaction, food, microwave

### Abstract

Microwave (MW) is applied to various fields such as microwave oven, wireless local network, and satellite broadcasting. There is great interest in microwave effects on biomolecules including proteins as the microwave technology expands. Various researches of MW effects were conducted, however such effects at molecular level of life phenomena have not been elucidated. This review summarizes some researches of MW effects on protein structures and/or enzymatic reactions.

### 1. 緒言

マイクロ波 (Microwave: MW) は 300 MHz から 300 GHz の周波数域の電磁波であり、電子レンジや無線 LAN など幅広く用いられている [1]。1986 年、有機合

成反応への初めての MW の利用 [2-3] が報告されて以降、引き続きペプチドを含む有機化合物の合成 [4-7] やスケールアップ合成 [8-9] といった有機反応への展

開のみならず、無機材料の合成 [10-12] など様々な分野で用いられるようになった。多くの分野での MW を用いた研究が進むにともない、生命科学への展開にも興味を持たれている。しかし現状では、生命現象への MW の影響は十分に理解されておらず、さらなる研究の進展が待ち望まれている。生命現象への MW の効果を調べるためには、生命現象の大半を担うタンパク質 (ポリペプチド) などの生体分子への MW の影響を確認することが必要である。我々の研究室ではこれまでに、生命現象の一例としてペプチド (小タンパク質) を用いたバイオミネラリゼーションを取り上げ、マイクロ波による影響を調べてきた。炭酸カルシウムのミネラリゼーションにおいて、MW の電界強度が炭酸カルシウムの沈殿物の形状に影響を及ぼすことが判明している [13]。

本総説ではペプチドよりも複雑かつ大きな分子であり生命現象の主役であるタンパク質に着目し、マイクロ波が生命科学現象に与える影響を考察するため、これまでに明らかとなっているタンパク質へのマイクロ波の影響を紹介する。2 では、タンパク質の構造への MW による影響について、実サンプルを用いた研究例とともにシミュレーションによる研究例を紹介する。3 では、触媒活性を有するタンパク質 (酵素) に着目し、MW 照射による反応への影響についてまとめた。

## 2. マイクロ波によるタンパク質の構造への影響

タンパク質の構造には、ポリペプチド鎖を構成するアミノ酸配列を示す一次構造や、その一次構造が様々な結合や相互作用によって折り畳まれた高次構造がある。タンパク質の高次構造には、 $\alpha$ -ヘリックス、 $\beta$ -シー

Table 1. 実サンプルを用いた研究例

タンパク質	MW 周波数 (GHz)	MW 強度	タンパク質への効果	文献
$\beta$ -ラクトグロブリン	2.45	800 W	低温変性状態からのリフォールディングを促進	14
	2.45	800 W	ネイティブな正常構造からの変性を促進	14
	2.45	4 W	酸性条件下での線維形成	15
	2.45	投入エネルギー 0.8-4 kJ	酸性条件下での線維形成	17
	2.45	1100 W	酸性条件下での凝集体の形成	18
ウシ血清アルブミン	1	0.5 W	凝集体の形成	19
	0.9	8-25 mA/m (磁場強度)	$\beta$ -シート構造の増加	20
ウシインスリン	1	0.5 W	酸性条件下でのアミロイド線維の形成	19
ミオグロビン	1.95	51 mW/g	酸性条件下でのリフォールディング速度の低下	22
	0.9	8-25 mA/m (磁場強度)	$\beta$ -シート構造の増加	20
アセチルコリンエステラーゼ	2.45	10-20 mW/cm <sup>2</sup>	$\beta$ -シート、ランダムコイル構造の増加	23
リゾチーム	0.9	8-25 mA/m (磁場強度)	二次構造への影響	20
	2.45	270-630 W	表面疎水性度の向上、二量化	24
G-アクチン	2.45	5.56-27.78 mW/cm <sup>2</sup>	フォールディングに影響	25

トなど規則性を持った二次構造や、複数の二次構造を分子内に持つポリペプチド鎖のフォールディングによって形成する三次構造、さらに三次構造を持つ複数のポリペプチドが相互作用して集まる四次構造が存在する。そして一般にタンパク質は正常な構造を形成すること（フォールディング）ではじめて機能を発現する。2 では、マイクロ波によるタンパク質のこれら立体構造の変化に関するこれまでの研究について、実サンプルを用いた研究例、シミュレーションによる研究例をそれぞれ 2-1、2-2 で紹介する。

## 2-1. 実サンプルを用いた研究例

Table 1 に今回調査したタンパク質の一覧を記した。以下、それぞれのタンパク質に対するマイクロ波の影響を紹介する。

### 2-1-1. $\beta$ -ラクトグロブリン

$\beta$ -ラクトグロブリンは、162 残基のアミノ酸が縮合した球状タンパク質の一種である。2000 年 H. Bohr らは、 $\beta$ -ラクトグロブリンに対するマイクロ波の影響を調べ、低温変性状態からのリフォールディング（変性した状態から元の正常な構造に折りたたまれること）や、ネイティブな正常な構造からの変性がマイクロ波によって促進されることを報告した [14]。本報告以降、いくつかの研究チームからマイクロ波による  $\beta$ -ラクトグロブリンの構造変化に関する研究が報告されている。2012 年 C. A. Hettiarachchi らは、MW 照射によって  $\beta$ -ラクトグロブリンが変性することにより引き起こされる線維化について調査した [15]。ポリペプチド鎖（タンパク質）は一般に、条件によっては本来の構造とは異なって誤って折りたたまれ（ミスフォールディング）、その多くは凝集体となる。さらにタンパク質の凝集体には、規則的な構造であるクロス  $\beta$  構造を持つアミロイド線維が存在する [16]。 $\beta$ -ラクトグロブリン水溶液（pH2）をマイクロ波によって 80°C で 2 時間加熱したところ、自己集合が顕著に促進されることが分かった。得られた線維の収率は、従来の伝熱プロセスで 16 時間加熱した際に得られるものと同様であった。さらにマイクロ波により 2 時間以上加熱すると、線維の分解がみられることも報告している。2015 年 G. Lee らは、 $\beta$ -ラクトグロブリンへのマイクロ波の照射条件がそのタンパク質に与える影響について報告した [17]。

MW の照射時間や照射間隔、照射回数によって、 $\beta$ -ラクトグロブリン線維のらせんのピッチや直径、長さを制御できることを示した。2018 年 W. Lee らは、使用する  $\beta$ -ラクトグロブリンの濃度により、線維形成前の粒子状態である凝集体の形成量や大きさに影響を与えることを報告した [18]。0.1、0.5、1 wt% の三種類の濃度の  $\beta$ -ラクトグロブリンを用いて、原子間力顕微鏡（Atomic Force Microscope: AFM）の高さ情報による凝集体の解析を行った。その結果、濃度による凝集体の大きさの変化は観察されなかったが、凝集体の形成量は濃度依存的に増加した。またアミロイド凝集指示薬であるチオフラビン T 法による線維形成の評価は、AFM 観察の結果を支持することが分かった。

### 2-1-2. ウシ血清アルブミン

2003 年 D. I. de Pomerai らは、MW (1 GHz) によるウシ血清アルブミンの凝集体形成を報告した [19]。凝集体の形成速度に与える MW の影響を確認するため、動的光散乱法（Dynamic Light Scattering: DLS）により散乱強度を測定した。MW 照射条件では、非照射時と比較して散乱強度が高く、MW による凝集体形成の促進が確認された。また 2010 年 E. Calabrò らは、ウシ血清アルブミンの二次構造への MW (900 MHz) による影響を赤外吸収スペクトル（Infrared Adsorption Spectroscopy: IR）によって評価した [20]。IR における  $1650\text{ cm}^{-1}$  付近のアミド I バンドは、ペプチド結合の C=O の伸縮振動に由来し、そのシフトからタンパク質の二次構造を同定できる。牛血清アルブミンに対して MW を 8 時間照射したところ、アミド I バンドの強度が大きくなり、わずかではあるがピーク位置のシフトも見られたことから、MW によるタンパク質の二次構造への影響が示唆された。さらに、フーリエ変換ボリュメトリック法による解析から、MW 照射によって  $\beta$ -シートの含量が増加することが分かり、スペクトルのシフトは  $\beta$ -シートの増加に起因することが示唆された。

### 2-1-3. ウシインスリン

ウシインスリンは変性して凝集すると、アミロイド線維を形成することが知られている [21]。アミロイド線維の形成やその速度、大きさが MW 照射の影響を受けることが報告されている。2003 年、D. I. de Pomerai らは、ウシインスリンへの MW 照射による影響を調

べるため、透過型電子顕微鏡 (Transmission Electron Microscope: TEM) による形状観察を行った。1 GHz の MW により、ウシインスリン水溶液 (pH 2) を 60 °C、24 時間処理したところ、アミロイド線維の形成が確認された。一方 MW 非照射条件では、同温度、同時間の処理によりアミロイド線維の形成は確認されなかった [19]。

#### 2-1-4. ミオグロビン

ミオグロビンは、主に骨格筋や心筋に存在するヘムタンパク質であり、酸素の貯蔵体として働く。2004 年 F. Mancinelli らは、ミオグロビンへの MW の影響を調べるため、1.95 GHz の MW によって処理したミオグロビンについて、ヘムの紫外可視吸収スペクトル (Ultraviolet Visible Adsorption Spectroscopy: UV-vis) を測定した [22]。ヘム由来の吸収についてその経時変化を確認したところ、MW 照射したミオグロビンは通常加熱を行ったサンプルとは異なる挙動を示し、これはヘム周辺に誘起された構造の違いに由来すると考えられる。

2010 年 E. Calabrò らは、ミオグロビンの二次構造への MW の影響を IR の測定結果から評価した [20]。ミオグロビンに対して 900 MHz の MW を 8 時間照射したところ、アミド I バンドの強度が大きくなった。MW 照射前後のピーク位置を比較したところ、照射により  $2.5 \text{ cm}^{-1}$  シフトが見られ、MW によるタンパク質の二次構造への影響が示唆された。さらに、フーリエ変換ボリュメーション法による解析から、MW 照射によって  $\beta$ -シートの含量が増加することが分かり、スペクトルのシフトは  $\beta$ -シートの増加に起因することが示唆された。

#### 2-1-5. アセチルコリンエステラーゼ

2005 年 T. Vukova らは、カエル骨格筋由来のアセチルコリンエステラーゼへの MW の効果を調べた [23]。アセチルコリンエステラーゼに対して 2.45 GHz MW を 30 分間照射し、MW が酵素の活性やタンパク質の構造に与える影響を確認した。酵素活性を測定したところ、MW 照射によって減弱がみられた。また IR の測定結果から、MW の照射により  $\beta$ -シートやランダムコイル構造の増加が示唆された。

#### 2-1-6. リゾチーム

2010 年 E. Calabrò らは、リゾチームの二次構造への MW 影響を調べた。MW を 8 時間照射したところ、アミド I バンドのピーク強度が大きくなり、リゾチームの二次構造への MW の影響が示唆された [20]。2020 年 T. Yang らは、リゾチームを MW によって処理し、加水分解活性を評価した [24]。得られた MW 処理リゾチームは、従来の処理方法で得られたものと比較して加水分解活性が高かった。MW の照射によるリゾチームの表面疎水性度の向上、二量化が確認された。

#### 2-1-7. G-アクチン

2017 年 X. Lou らは、G-アクチンのフォールディングへの MW の影響を調べた [25]。G-アクチンに 2.45 GHz MW を照射し、得られたサンプルの表面疎水性度と SH 基の含有量を確認した。表面疎水性度や SH 基の含有量は MW の出力に依存し、共に 300 W で最大となることが分かった。得られた結果から、MW の出力が 300 W までは、分子内の SH 基が露出及び表面疎水性度の上昇がみられ、G-アクチンがアンフォールディングすることが示唆された。さらに MW 出力を 300 W から 500 W まで上昇させると、G-アクチンがリフォールディングすることが示唆された。

#### 2-1-8. まとめ

2-1 では、実サンプルを用いた研究例を紹介した。これまでに様々なタンパク質について、MW の影響が確認され、MW がタンパク質の高次構造に影響を与え、線維化や凝集を引き起こすことが示されてきた。今回紹介したタンパク質以外に、小麦粉や牛肉など食品由来のタンパク質 [26-28] についても、MW による影響が確認されており、MW による影響の確認は現在盛んに行われている。

#### 2-2. シミュレーションによる研究例

タンパク質に代表される生体分子の挙動を解析するシミュレーションは、一般に膨大な計算量と計算時間を要するが、近年計算手法の開発により計算速度が格段に向上してきた。ここでは MW による振動電場がペプチドに与える影響をシミュレーションによって解析した例を取り上げる。Table 2 には、2-2 で取り上げる研究例を記した。以下、各研究について紹介する。

2018 年 A. K. Singh らは、鶏卵白色リゾチームについて、MW の照射による影響を分子動力学シミュレー

ションを用いて評価した [29]。周波数 10GHz、電界強度  $8 \times 10^2$  V/m の条件で MW を連続的に照射し、鶏卵白色リゾチームを構成する 129 個のアミノ酸残基の平均位置の変位を調べた。15 分未満の MW 照射では、アミノ酸残基の平均位置にほぼ変化がみられなかったが、約 20 分の照射によって変位が確認され、30 分での変位が最大となった。さらに 30 分から 45 分にかけては、変位が徐々に小さくなっていくことが示された。一方、著者らはシミュレーションだけではなく実サンプルを使用した実験についても行っている。MW 照射後のリゾチームの円二色性 (Circular Dichroism Spectroscopy: CD) 測定及びラマンスペクトル測定の結果から、二次構造の変化は示唆されなかった。これらの結果から、今回の MW の照射条件ではアミノ酸残基の平均位置の変化は小さく、MW はタンパク質の二次構造にほとんど影響を及ぼさなかったと考えられる。

2020 年 N. Todorova らは、アミロイド形成能をもつペプチド apoC-II に対する MW の効果を、全原子非平衡分子動力学シミュレーションによって評価した [30]。ペプチドのコンフォメーションは、マイクロ波の周波数や電界強度に依存することが分かった。 $7 \times 10^8$  V/m の電界強度では、周波数が 1.0GHz から 5.0GHz に大きくなるにつれ、様々なコンフォメーションをとりやすくなることが分かった。 $3.85 \times 10^7$ – $7 \times 10^7$  V/m の電界強度では、1.0 GHz 及び 2.5 GHz において、ペプ

た。1.0 GHz では線維形成可能なコンフォメーションだけではなく線維形成を抑制するコンフォメーションをとり、2.5 GHz では主に線維形成するコンフォメーションとなった。5.0GHz の周波数ではペプチドの動きが活発となり、芳香族側鎖が線維形成可能な配置を持ち、主鎖が伸びたような構造が形成された。 $7 \times 10^5$ 、 $7 \times 10^6$  V/m の電界強度では、検討した周波数すべてにおいて、アミロイド形成傾向をもつヘアピン構造を形成することが示された。

2020 年 M. Gladovic らは、 $\beta$ -ペプチドのコンフォメーションへのマイクロ波の影響を評価した [31]。分子動力学計算の結果、マイクロ波によってペプチドと水との分子間水素結合が弱まり、ペプチドのコンフォメーションに大きな影響を与えることが示された。クラスター解析の結果、MW はアルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、クロイツフェルト・ヤコブ病などの神経変性疾患やアミロイドーシスなどのがんの発症に関連するヘアピン型のペプチド構造の形成に寄与することが示された。

一方、2012 年 M. Damm らは、トリプシンおよびウシ血清アルブミンへ MW が与える影響を分子力学シミュレーションにより解析し [32]、タンパク質のコンフォメーション変化を引き起こすには  $1 \times 10^7$  V/m 以上の高い電界強度が必要であると主張している。

以上、2-2 では、分子シミュレーションを用いた研究

Table 2. 分子動力学シミュレーションによる研究例

タンパク質/ ペプチド	MW 周波数 (GHz)	MW 強度	シミュレーションから予測できた、マイクロ波によるタンパク質への効果	文献
リゾチーム	10	800 V/m	アミノ酸残基の平均位置が変化する (実サンプルを用いた検討では、タンパク質の二次構造に対してほとんど影響がない)	29
apoC-II ペプチド	1.0, 2.5, 5.0	$7 \times 10^5$ – $7 \times 10^8$ V/m	高電界強度では、コンフォメーションの自由度が高くなる 低電界強度では、アミロイド形成傾向をもつコンフォメーションをとりやすい	30
$\beta$ -ペプチド	-*	361–1730 W	ペプチドと水との水素結合が弱まる	31

\* 周波数について記載なし

チドは特定のコンフォメーションをとることが分かっ

例を紹介した。今回紹介した例では、周波数や電界強度

など MW の照射条件によるタンパク質への影響が調べられていたが、MW と分子との相互作用によって発生する熱エネルギーに関する議論が不十分である印象を受けた。今後、シミュレーションを用いた研究において、MW による熱的効果についても考慮した検討が必要であると考えられる。現在のところ報告例は限られているが、シミュレーション技術はタンパク質への MW の効果を調べるうえで必要不可欠あり、今後シミュレーションを用いた研究事例が増加すると考えられる。

### 3. マイクロ波による酵素反応への影響

2 では、MW 照射によるタンパク質への影響について、実サンプルあるいはシミュレーションによる研究例を示し、MW がタンパク質のコンフォメーション変化を誘起することを紹介した。タンパク質の構造はその機能と密接に関わっていることが知られており、3 では触媒機能を有するタンパク質、すなわち酵素に注目する。これまでに光学分割や加水分解など様々な酵素反応への MW の影響に関して研究が行われており、特に有機溶媒中では反応活性の増強や選択性の向上などが報告されている [33]。一方、水系溶媒中での酵素反応における MW の影響は効果がない、あるいは酵素を不活性化するという研究例もある [33]。3 では水系溶媒中での酵素反応に焦点を当て、マイクロ波により酵素反応が促進された例を中心に紹介する。

#### 3-1. 収量から求めた酵素活性に着目した研究例

2008 年 D.D.Young らは、*Pyrococcus furiosus* 由来の  $\beta$ -グルコシダーゼ (Pfu CelB)、*Thermotoga maritima* 由来の  $\alpha$ -ガラクトシダーゼ (Tm GalA)、*Sulfolobus solfataricus* P1 由来のカルボキシエステラーゼ (SsoP1 CE) について、2.45 GHz の MW の照射がその酵素活性に与える影響を調査した [34]。酵素活性については、目的とする生成物の収量を用いて算出した。Pfu CelB では、MW の照射により酵素活性が約 10000 倍上昇し、反応における最適温度の低下もみられた。また、Tm GalA と SsoP1 CE についても、MW によって酵素活性が約 10 倍向上した。一方、*Prunus dulcis* 由来の CelB Pdu CelB については、MW による酵素活性の増強は確認されず、酵素の種類によっては活性化されないことが判明した。

2014 年 I.Nagashima らは、 $\beta$ -グルコシダーゼ HT1 を用いた 4-メトキシフェニルグルコピラノシドの加水分解反応へのマイクロ波の影響を確認した [35]。 $\beta$ -グルコシダーゼ HT1 は、最適温度が 60 °C の耐熱酵素であり、加水分解反応の触媒として働く。MW の周波数効果を調べると、インキュベーターによる同温度での加熱と比較して、2.45 GHz MW 加熱では反応が促進され、一方 5.8 GHz ではマイクロ波による反応の促進効果はみられなかった。また 2.45 GHz MW 反応において、酵素の最適温度が 50 °C となり、通常加熱での反応と比較して 10 °C 低下することが判明した。複素誘電率を測定したところ、2.45 GHz では系内のイオンによる導電損失や水による誘電損失が起こるのに対し、5.8 GHz では水の誘電損失のみ起こることが示唆された。これらの結果から、2.45 GHz では、MW がイオンと相互作用し、酵素と基質との複合体形成における親和性に影響を与えることが考えられるが、詳細な解析は行われていなかった。

2015 年 S.A.Mazinani らは、トリプシンによるカゼインの加水分解反応への MW 照射の影響を調べた [36]。2.45 GHz の MW 照射により酵素活性の上昇がみられ、活性の増強はカゼインの高濃度条件において特に顕著であった。CD の測定結果から、MW 照射によるトリプシンの二次構造の変化が確認され、この変化が活性に影響を与えたことが示唆された。一方 2016 年には  $\alpha$ -アミラーゼによるデンプンの加水分解、アルカリフォスファターゼによる p-ニトロフェニルリン酸の加水分解への 2.45 GHz MW の影響を確認したが、通常加熱と比較して酵素活性に変化はみられなかった [37]。

以上の研究では、目的物の収量から算出した酵素活性を主眼に置いて議論がなされており、活性の向上に関する詳細な研究は行われていなかった。次にタンパク質の構造変化にも着目した 2018 年の研究例を紹介する。H. Cao らは、トランスグルタミナーゼ (TGase) の活性への MW の影響を検討したところ、MW 照射により TGase の活性が向上することが分かった [38]。UV-vis や蛍光スペクトルから、MW は TGase 分子のコンフォメーション変化を誘起し、また CD スペクトルから、MW 照射により  $\alpha$ -ヘリックスが減少し、 $\beta$ -

シートや  $\beta$ -ターンの増加することが判明した。一方、水浴加熱で二次構造にほとんど変化がみられなかった。本研究では、MW 照射によって TGase の構造が変化することが示されたが、この構造変化が酵素活性にどう影響するのか詳細にはまだ解明できていない。

以上、3-1 では、目的物の収量から求めた酵素活性に着目した研究例を中心に紹介した。MW 照射下での酵素反応を解明するためには、目的物の収量だけではなく、タンパク質の構造解析やミカエリス・メンテン式による速度論解析が必要であると考えられる。3-2 では、最大反応速度  $V_{\max}$  やミカエリス・メンテン定数  $K_m$  を用いて解析した研究例を紹介する。 $V_{\max}$  や  $K_m$  の挙動が分かれば、MW が触媒活性部位周辺の構造、あるいは基質結合部位周辺の構造に影響を与えているのか、より詳細な解析が可能となることが期待できる。

### 3-2. ミカエリス・メンテン式を用いた詳細な研究例

2018 年 N. Rokhati らは、セルラーゼによるキトサンの加水分解に与える MW の影響について検討した [39]。ミカエリス・メンテン式による解析を行ったところ、MW 照射下での反応の  $V_{\max}$  は、通常加熱に対して約 20 倍大きくなることが分かった。また  $K_m$  は、マイクロ波照射下で低下することが示された。 $K_m$  は酵素/基質複合体の親和性を表しており、MW の照射により酵素と基質の親和性が増強されたと考えられる。

3-2 ではミカエリス・メンテン式による解析を行った研究例を紹介した。3-1 のように MW による酵素反応変化のみに着目した研究は数多く報告されているものの、3-2 のような比較的詳細な解析を行った研究は、筆者らの知る限りごく最近に限られている。今後様々な酵素において、速度論パラメータを用いた研究を行うことはもちろんのこと、2 で挙げたような構造解析研究とも融合することにより、MW による酵素反応への影響の理解がさらに進むと考えられる。酵素反応への MW の利用は、食品分野において多くの報告例 [40-42] があり、今後も活発な研究が行われるであろう。

## 4. 結言

本総説で紹介したように、MW は  $\alpha$ -ヘリックスや  $\beta$ -シートなどタンパク質の二次構造に影響を与え、線維化や凝集体形成を引き起こす。分子動力学シミュレ

ーションからも、モデルとして用いたペプチドに対する MW 照射により、凝集傾向を示すコンフォメーションをとることが示された。MW の照射によるタンパク質の構造変化が明らかとなりつつある一方、酵素活性に影響を与えるメカニズムについては未解明な部分が多い。そのメカニズムを解析するためには、酵素反応変化のみに着目するだけではなく、ミカエリス・メンテン式による速度論解析や、核磁気共鳴 (Nuclear Magnetic Resonance: NMR) スペクトルや X 線解析などの詳細な構造解析研究を融合させることが重要である。またマイクロ波との相互作用を評価するため、反応に用いる各成分の誘電特性の把握やシミュレーション技術の活用が、今後益々重要になると考えられる。生命現象への影響を解明するためには、タンパク質の変化が細胞へさらにどのような影響を与えていくのか、という解析研究も今後必要となる。我々もペプチド (小タンパク質) を題材に、細胞導入に関する MW の影響実験を行いつつある。このような細胞への影響研究 [43] についても今後のさらなる進展が望まれる。

## 引用文献

1. 国際規格 IEC 61307.
2. R. Gedye, F. Smith, K. Westaway, H. Ali, L. Baldisera, L. Laberge, J. Rousell, The use of microwave ovens for rapid organic synthesis. *Tetrahedron Lett.* **1986**, 27, 279–282.
3. R. J. Giguere, T. L. Bray, S. M. Duncan, G. Majetich, Application of commercial microwave ovens to organic synthesis. *Tetrahedron Lett.* **1986**, 27, 4945–4948.
4. A. Kumar, Y. E. Jad, J. M. Collins, F. Albericio, B. G. de la Torre, Microwave-assisted green solid-phase peptide synthesis using  $\gamma$ -valerolactone (GVL) as solvent. *ACS Sustainable Chem. Eng.* **2018**, 6, 8034–8039.
5. S. L. Pedersen, A. P. Tofteng, L. Malik, K. J. Jensen, Microwave heating in solid-phase peptide synthesis. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, 41, 1826–1844.
6. K. Kumari, V. K. Vishvakarma, P. Singh, R. Patel, R. Chandra, Microwave: an important and efficient tool for the synthesis of biological potent organic compounds.

- Curr. Med. Chem.* **2017**, *24*, 4579–4595.
7. C. O. Kappe, Microwave dielectric heating in synthetic organic chemistry. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 1127–1139.
  8. C. R. Strauss, On scale up of organic reactions in closed vessel microwave systems. *Org. Process Res. Dev.* **2009**, *13*, 915–923.
  9. J. R. Schmink, C. M. Kormos, W. G. Devine, N. E. Leadbeater, Exploring the scope for scale-up of organic chemistry using a large batch microwave reactor. *Org. Process Res. Dev.* **2010**, *14*, 205–214.
  10. H. Yin, T. Yamamoto, Y. Wada, S. Yanagida, Large-scale and size-controlled synthesis of silver nanoparticles under microwave irradiation. *Mater. Chem. Phys.* **2004**, *83*, 66–70.
  11. Y.-J. Zhu, F. Chen, Microwave-assisted preparation of inorganic nanostructures in liquid phase. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 6462–6555.
  12. H. J. Kitchen, S. R. Vallance, J. L. Kennedy, N. T. Ruiz, L. Carassiti, A. Harrison, A. G. Whittaker, T. D. Drysdale, S. W. Kingman, D. H. Gregory, Modern microwave methods in solid-state inorganic materials chemistry: from fundamentals to manufacturing. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 1170–1206.
  13. 臼井健二, 富樫浩行, 圓東那津実, 尾崎誠, 有本米次郎, 裏鍛武史, 大沢隆二, 皆木幸一, 中西伸浩, 梅谷智弘 生体分子の挙動解析研究を目標としたマイクロ波照射システムの開発 ～ペプチドのバイオミネラライゼーションにおけるマイクロ波影響解析をモデルとして～. *日本電磁波エネルギー応用学会論文誌*, **2017**, *1*, 17–24.
  14. H. Bohr, J. Bohr, Microwave-enhanced folding and denaturation of globular proteins. *Phys. Rev. E* **2000**, *61*, 4310–4314.
  15. C. A. Hettiarachchi, L. D. Melton, J. A. Gerrard, S. M. Loveday, Formation of  $\beta$ -lactoglobulin nanofibrils by microwave heating gives a peptide composition different from conventional heating. *Biomacromolecules* **2012**, *13*, 2868–2880.
  16. K. Usui, J. D. Hulleman, J. F. Paulsson, S. J. Siegel, E. T. Powers, J. W. Kelly, Site-specific modification of alzheimer's peptides by cholesterol oxidation products enhances aggregation energetics and neurotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2009**, *106*, 18563–18568.
  17. G. Lee, W. Lee, H. Lee, C. Y. Lee, K. Eom, T. Kwon, Self-assembled amyloid fibrils with controllable conformational heterogeneity. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 16220.
  18. W. Lee, Y. Choi, S. W. Lee, I. Kim, D. Lee, Y. Hong, G. Lee, D. S. Yoon, Microwave-induced formation of oligomeric amyloid aggregates. *Nanotechnology* **2018**, *29*, 345604.
  19. D. I. de Pomerai, B. Smith, A. Dawe, K. North, T. Smith, D. B. Archer, I. R. Duce, D. Jones, E. P. M. Candido, Microwave radiation can alter protein conformation without bulk heating. *FEBS Letters* **2003**, *543*, 93–97.
  20. E. Calabrò, S. Magazù, Inspections of Mobile Phone Microwaves effects on proteins secondary structure by means of fourier transform infrared spectroscopy. *JEMAA* **2010**, *2*, 607–617.
  21. M. Bouchard, J. Zurdo, E. J. Nettleton, C. M. Dobson, C. V. Robinson, Formation of insulin amyloid fibrils followed by FTIR simultaneously with CD and electron microscopy. *Protein Sci.*, **2000**, *9*, 1960–1967.
  22. F. Mancinelli, M. Caraglia, A. Abbruzzese, G. d'Ambrosio, R. Massa, E. Bismuto, Non-thermal effects of electromagnetic fields at mobile phone frequency on the refolding of an intracellular protein: myoglobin. *J. Cell. Biochem.* **2004**, *93*, 188–196.
  23. T. Vukova, A. Atanassov, R. Ivanov, N. Radicheva, Intensity-dependent effects of microwave electromagnetic fields on acetylcholinesterase activity and protein conformation in frog skeletal muscles. *Med. Sci. Monit.* **2005**, *11*, BR50–56.
  24. T. Yang, G. Leśnierowski, Thermal modification of hen egg white lysozyme using microwave treatment. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.* **2020**, *19*, 149–157.
  25. X. Lou, Q. Yang, Y. Sun, D. Pan, J. Cao, The effect of microwave on the interaction of flavour compounds with G-actin from grass carp (*Catenopharyngodon idella*). *J. Sci. Food Agric.* **2017**, *97*, 3917–3922.



26. E. Calabrò, S. Magazù, Modulation of Maillard reaction and protein aggregation in bovine meat following exposure to microwave heating and possible impact on digestive processes: An FTIR spectroscopy study. *Electromagn. Biol. Med.* **2020**, *39*, 129–138.
27. S. Xiang, H. Zou, Y. Liu, R. Ruan, Effects of microwave heating on the protein structure, digestion properties and Maillard products of gluten. *J. Food Sci. Technol.* **2020**, *57*, 2139–2149.
28. B. F. C. A. Gohi, J. Du, H.-Y. Zeng, X.-j. Cao, K.m. Zou, Microwave pretreatment and enzymolysis optimization of the lotus seed protein. *Bioengineering* **2019**, *6*, 28.
29. A. K. Singh, P. S. Burada, S. Bhattacharya, S. Bag, A. Bhattacharya, S. Dasgupta, A. Roy, Microwave-radiation-induced molecular structural rearrangement of hen egg-white lysozyme. *Phys. Rev. E* **2018**, *97*, 052416.
30. N. Todorova, A. Bentvelzen, I. Yarovsky, Electromagnetic field modulates aggregation propensity of amyloid peptides. *J. Chem. Phys.* **2020**, *152*, 035104.
31. M. Gladovic, C. Oostenbrink, U. Bren, Could microwave irradiation cause misfolding of peptides? *J. Chem. Theory Comput.* **2020**, *16*, 2795–2802.
32. M. Damm, C. Nussold, D. Cantillo, G. N. Rechberger, K. Gruber, W. Sattler, C. O. Kappe, Can electromagnetic fields influence the structure and enzymatic digest of proteins? A critical evaluation of microwave-assisted proteomics protocols. *J. Proteomics* **2012**, *75*, 5533–5543.
33. B. Rejasse, S. Lamare, M.-D. Legoy, T. Besson, Influence of microwave irradiation on enzymatic properties: applications in enzyme chemistry. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2007**, *22*, 518–526.
34. D. D. Young, J. Nichols, R. M. Kelly, A. Deiters, Microwave activation of enzymatic catalysis. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 10048–10049.
35. I. Nagashima, J. Sugiyama, T. Sakuta, M. Sasaki, H. Shimizu, Efficiency of 2.45 and 5.80 GHz microwave irradiation for a hydrolysis reaction by thermostable  $\beta$ -Glucosidase HT1. *Biosci. Biotech. Biochem.* **2014**, *78*, 758–760.
36. S. A. Mazinani, B. DeLong, H. Yan, Microwave radiation accelerates trypsin-catalyzed peptide hydrolysis at constant bulk temperature. *Tetrahedron Lett.* **2015**, *56*, 5804–5807.
37. S. A. Mazinani, H. Yan, Impact of microwave irradiation on enzymatic activity at constant bulk temperature is enzyme-dependent. *Tetrahedron Lett.* **2016**, *57*, 1589–1591.
38. H. Cao, D. Fan, X. Jiao, J. Huang, J. Zhao, B. Yan, W. Zhou, W. Zhang, W. Ye, H. Zhang, W. Chen, Intervention of transglutaminase in surimi gel under microwave irradiation. *Food Chem.* **2018**, *268*, 378–385.
39. N. Rokhati, B. Pramudono, T. Istirokhatun, H. Susanto, Microwave irradiation-assisted chitosan hydrolysis using cellulase enzyme. *Bull. Chem. React. Eng. Catal.* **2018**, *13*, 466–474.
40. S. Horikoshi, K. Nakamura, M. Yashiro, K. Kadomatsu, N. Serpone, Probing the effect(s) of the microwaves' electromagnetic fields in enzymatic reactions. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 8945.
41. H. Yin, Y. Jiang, X. Zhou, Y. Zhong, D. Wang, Y. Deng, H. Xue, Effect of radio frequency, ultrasound, microwave-assisted papain, and alcalase hydrolysis on the structure, antioxidant activity, and peptidomic profile of *Rosa roxburghii* Tratt. seed protein. *J. Food Sci.*, **2022**, *87*, 4040–4055.
42. F. Wang, Y. Liu, C. Du, R. Gao, Current strategies for real-time enzyme activation. *Biomolecules*, **2022**, *12*, 599.
43. 平田桃, 川内敬子, 西方敬人, 中西伸浩, 臼井健二  
マイクロ波照射による細胞への影響とその応用. *日本電磁波エネルギー応用学会論文誌*, **2021** *5*, 38–48.

Manuscript received: Sep. 16, 2022

Revised: Nov. 19, 2022

Accepted: Feb. 3, 2023