

Pickering エマルションで反応場を区画化する触媒反応の新設計戦略: 同一酵素による両エナンチオマーの作り分け

大阪大学 大学院薬学研究科

鹿又 喬平

1. はじめに

医薬分子の多くはキラル化合物であり, それらを高い光学純度で合成する不斉合成法の開発は創薬研究の重要課題に位置付けられる. キラル化合物の各エナンチオマーは一般に異なる生物活性を示し, 医薬成分の逆のエナンチオマーが深刻な副作用を引き起こすこともある (図 1). 従ってキラル化合物の両エナンチオマーを選択的かつ高光学純度で作り分ける手法は, 創薬の研究・開発いずれの段階にも不可欠である. ^[1]

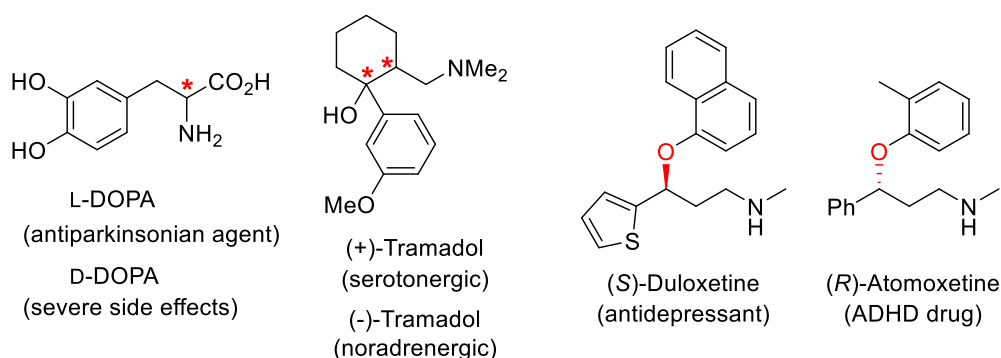


図 1. 立体構造によって生物活性の異なる医薬品分子の例

酵素は極めて優れた不斉触媒であり, 立体選択性が高いことに加え, 操作性や安全性, 環境調和性など様々な面で利点を有する. 中でも加水分解とエステル化を触媒するリパーゼは幅広い基質を変換可能であり, ラセミ体の一方のエナンチオマーを選択的に変換する速度論的光学分割の触媒として, 医薬分子の研究から生産まで広く利用されている. ^[2] 光学分割は光学活性体を高純度で得られる手法ではあるが, 最大収率が理論的に 50%であるため, これまでリパーゼとアルコールのラセミ化触媒を組み合わせるラセミ体を単一エナンチオマーのエステルへと収束的に変換する動的速度論的光学分割 (DKR) が精力的に研究されてきた. ^[3,4] しかしエステル化とラセミ化で二種類の触媒を要する DKR では, 両者の同一系内での共存や反応条件の両立が課題であり, これまで触媒の固定化や隔膜の使用などによる両者の分離が試みられてきた. ^[5,6] また酵素であるリパーゼは一方のエナンチオマーしか入手できず, その選択性は一般に加水分解・エステル化ともに R 体選択的であることが知られている.

筆者らは, 本来は両立し得ないような複数の触媒を同一系内で機能させるために, 反応場として Pickering エマルションに着目した. Pickering エマルションはナノ粒子の乳化作用により形成される油水分散体であり, ナノ粒子が油水分界面に不可逆的に吸着して極めて安定性の高い液滴を形成する (図 2). ^[7,8] 近年, Pickering エマルションは酵素反応をはじめとする反応場として注目を集めている. ^[9-12] 筆者らは, Pickering エマルションの液滴界面に吸着したナノ粒子の層が物理的な障壁となって反応場を区画化し, 本来は共存し得ない複数の酵素・触媒・

反応剤などを同一系内で互いに隔離できるとの考えのもとに研究に着手した。これまでに筆者らは、Pickering エマルションを反応場として“リパーゼ／硫酸”共触媒系によるラセミ体アルコールの DKR に成功している（図 3a）。^[13] 本反応では、有機相でリパーゼがラセミ体アルコールの光学分割を触媒し、未反応のエナンチオマーは水相で硫酸の作用によりラセミ化する。リパーゼは本来、硫酸により変性してしまうが、Pickering エマルションの区画化によって両者が同一系内で機能する反応系の構築が可能となった。

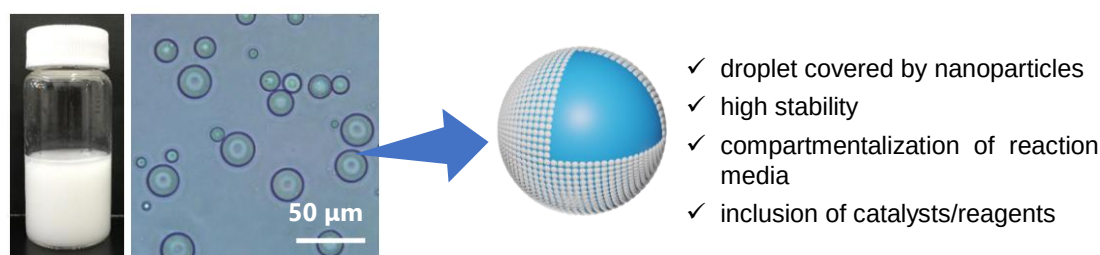
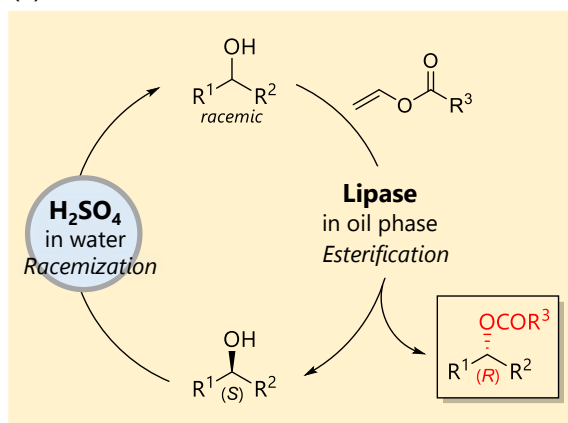


図 2. Pickering エマルションとその特徴

従来の DKR のほとんどはリパーゼを有機溶媒中で用いるエステル化反応を基軸としているため *R* 体エステル合成に限られ、*S* 体の生成物を得ることは困難である。*S* 体収束的 DKR を達成するため、これまで *S* 体選択的なプロテアーゼやエステラーゼの利用、変異導入により立体選択性が逆転したリパーゼの作成などが報告されてきた。^[15-17] これに対し本研究では、リパーゼが触媒する「加水分解」を利用することで、*R* 体収束的 DKR に用いた同じ天然リパーゼを使って *S* 体生成物を得る DKR の開発に成功した（図 3b）。^[18] すなわち、エマルション液滴の水相でリパーゼがラセミ体エステル(±)-**1** を *R* 体選択的に加水分解してアルコール(*R*)-**2** とエステル(*S*)-**1** を生じ、続いて(*R*)-**2** が別の水相で硫酸の作用によりラセミ化する。さらにラセミ化した **2** が有機相でエステル化されて(±)-**1** を再生するサイクルを繰り返すことで、*R* 体選択的なリパーゼを用いて(±)-**1** が(*S*)-**1** に収束する。これら 3 つの反応は本来は共存し得ないが、Pickering エマルションによる反応場の区画化によって同一系内で独立に進行することが可能となった。本研究によって、既に報告している *R* 体収束的 DKR^[13]と合わせて、同じ天然リパ

(a) *R* 体収束的 DKR



(b) 本研究：*S* 体収束的 DKR

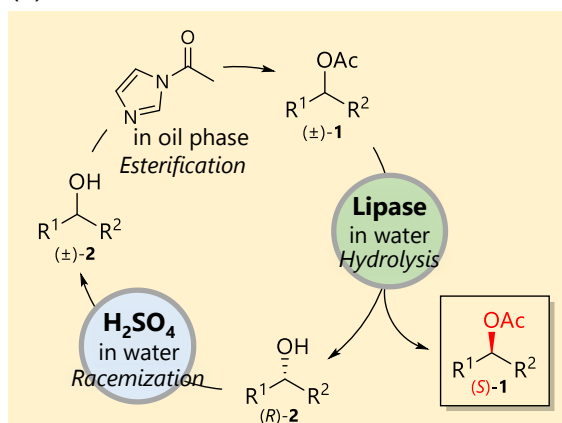


図 3. Pickering エマルションを反応場とする DKR：(a) 当グループで開発した“リパーゼ／硫酸”共触媒系による *R* 体収束的 DKR；(b) 本研究で確立した *S* 体収束的 DKR

ーゼを用いてラセミ体原料から光学活性エステルの *R/S* 両エナンチオマーへの自在な変換が可能となった。

2. Pickering エマルションの調製

本研究の DKR では、図 3 に示すように water-in-oil 型 (W/O) エマルションが反応場として適していると考え、調製容易なシリカナノ粒子を乳化に用いることとした。既報に従って $\text{Si}(\text{OEt})_4$ をアンモニア水中で重合し、さらに粒子表面を $\text{MeSi}(\text{MeO})_3$ によりメチル基修飾することで、乳化作用を持つ粒径約 400 nm のシリカ粒子を得た。^[19] 得られたシリカナノ粒子 (30 mg) とオクタン (0.6 mL)、硫酸水溶液 (0.3 mL) またはリパーゼ水溶液 (5 mg/mL CAL-B, 0.50 M リン酸緩衝液, pH 7.0) を混合し、二重刃ホモジナイザーを用いて 20,000 rpm で 90 秒処理することで W/O エマルションを得た。35 °C で 6 時間静置しても液滴の平均径やサイズ分布に変化はなく、このようにして調製した Pickering エマルションが反応条件で十分安定に機能することが示唆された。

3. *R* 体選択的リパーゼを用いる *S* 体収束的 DKR

初めにラセミ体エステル(±)-**1a** を用いて、Pickering エマルション中でリパーゼによる加水分解と、生じたアルコール(*R*)-**2a** の硫酸によるラセミ化が同時進行する条件を検討した(図 4)。本反応は理想的に進行すれば、50%の光学純粋な(*S*)-**1a** と 50%のラセミ体 **2a** が得られる。リパーゼ CAL-B のリン酸緩衝溶液と 50 mM H_2SO_4 それぞれを水相とする W/O 型 Pickering エマルションを別個に調製し、1:1 の比で混合した。この混合エマルションの有機相に(±)-**1a** を加

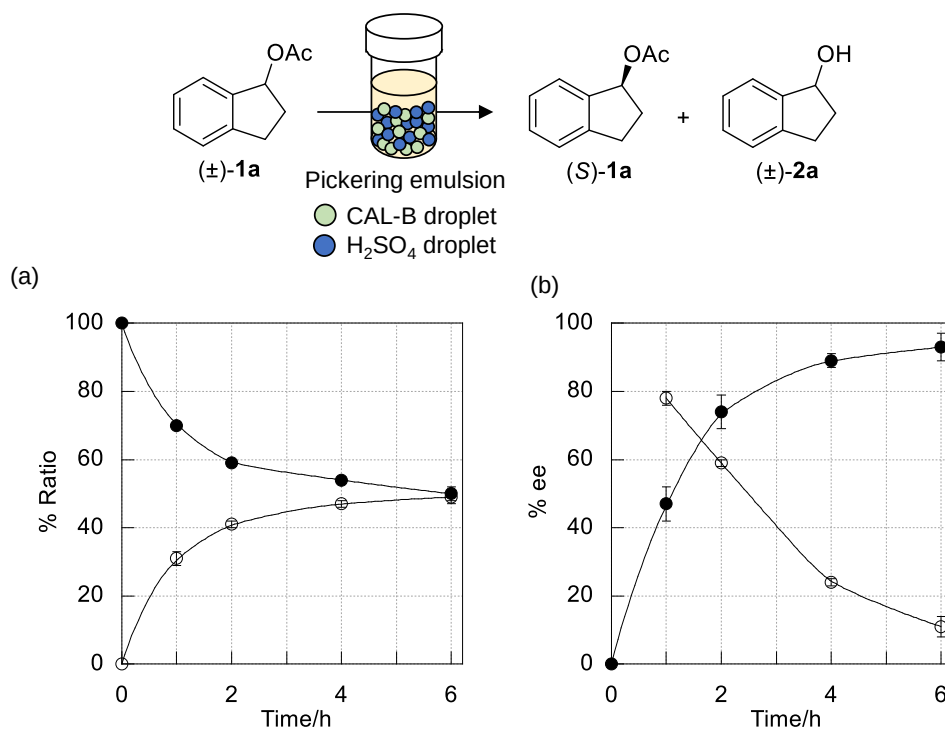


図 4. ラセミ体エステル(±)-**1a** の加水分解と生じた光学活性アルコール(*R*)-**2a** のラセミ化：
1a (●)と **2a** (○)のモル比(a)と % ee (b)の経時変化

え、35 °C で静置して反応を行い、**1a/2a** の比とそれぞれの光学純度の経時変化を追跡した。その結果、反応開始 6 時間で **1a/2a** 比が 50:50 に到達した (図 4a)。また、同時に **1a** の光学純度が漸近的に上昇して 97% ee (*S*) となり、**2a** の光学純度は 13% ee まで低下した (図 4b)。これらの結果は、リパーゼが触媒する **1a** の加水分解と硫酸触媒による **2a** のラセミ化が互いに干渉することなく進行し、かつ静置条件でこれらの反応基質が有機相と二種のエマルションの水相間を速やかに拡散したことを示唆している。

続いて *S* 体収束的 DKR の三番目の過程、すなわちラセミ体アルコールのエステル化をオクタンを溶媒として検討した (図 5)。種々のアセチル化試薬のうち、*N*-アセチルイミダゾール (**3a**) が溶媒に難溶ながらも (±)-**2a** と円滑に反応し、12 時間で定量的にエステル (±)-**1a** を与えた。一方、その他の **3b–3e** を用いた場合、**2a** のエステル化はほとんど進行しなかった。

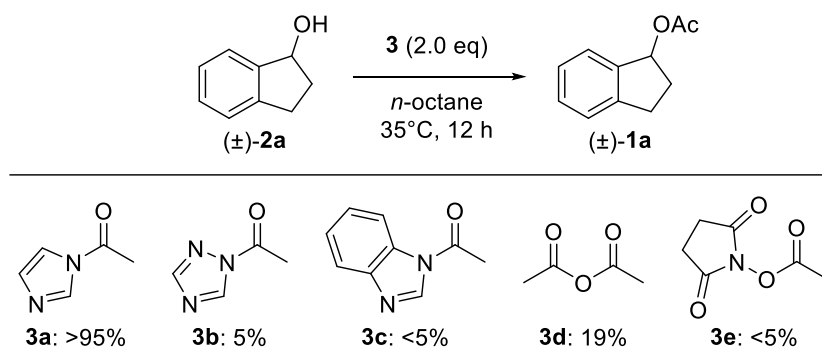
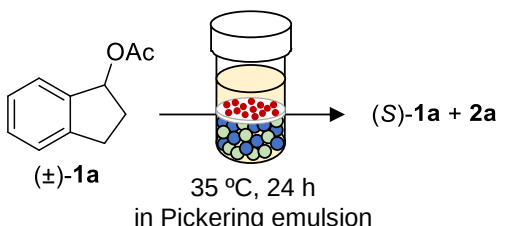


図 5. オクタン溶媒中での (±)-**2a** のエステル化

図 3b に示す *S* 体収束的 DKR の各過程を最適化できたことから、それらを統合して (±)-**1a** から (*S*)-**1a** への変換を検討した (表 1)。リパーゼ CAL-B の緩衝溶液と 50 mM H₂SO₄ の W/O 型 Pickering エマルションを 1:1 で混合し、有機相に (±)-**1a** と 5 当量の **3a** を加えて 35 °C で 24 時間静置して反応を行った (Entry 1)。その結果、(*S*)-**1a** が収率 55%, 79% ee で得られ、*R* 体選択的リパーゼを用いた *S* 体収束的 DKR の実効性が示された。一方で、反応終了時にラセミ体 **2a** が 43% (<5% ee) 副生しており、**3a** による **2a** のアセチル化が全体の律速になっていることが示唆された。エマルションの有機相が水の飽和状態になっていることが **2a** のアセチル化を阻害していると考え、有機相に脱水剤として MgSO₄ を添加した結果、(*S*)-**1a** の収率が 79% に向上した (Entry 2)。^[13] また、**3a** の添加を 5 当量から 10 当量とすることで収率が 86% に向上した (Entry 3)。有機相に MgSO₄ とともに K₂CO₃ を添加することで **1a** の光学純度がさらに向上し、(*S*)-**1a** が収率 89%, 88% ee で得られた (Entry 4)。K₂CO₃ の添加効果について詳細は明らかになっていないが、**3a** による **1a** のエステル化反応を加速していると考えている。反応時間を 48 時間に延長することで収率・光学純度ともに向上し、収率 91%, 93% ee で (*S*)-**1a** が得られた (Entry 5)。

ここで表 1 の Entry 4 の条件を用いていくつかの基質に本手法を適用したところ、収率・光学純度とも中程度に留まった (図 7 の **1e**, **1i**, **1j**, **1n**)。いずれの場合も反応終了時にはラセミ化が不十分なアルコールが生成した。図 3b において (*R*)-**2** のラセミ化が十分に進行しない場合、(*R*)-**2** から (*R*)-**1** を与えるエステル化が進行し、(*S*)-**1** への収束を妨げる要因となる。

表 1. (±)-**4a** の *S* 体収束的 DKR の検討



(±)-**1a**

35 °C, 24 h
in Pickering emulsion

(*S*)-**1a** + **2a**

● CAL-B droplet

● H₂SO₄ droplet

● **3a** (insoluble solid)

○ MgSO₄, K₂CO₃

Entry	3a	Additive	time/h	%Yield (% ee)	
				(<i>S</i>)- 1a	2a
1	5 eq.	none	24	55 (79)	43 (<5)
2	5 eq.	MgSO ₄	24	79 (77)	16 (6)
3	10 eq.	MgSO ₄	24	86 (78)	10 (14)
4	10 eq.	MgSO ₄ /K ₂ CO ₃	24	89 (88)	8 (29)
5	10 eq.	MgSO ₄ /K ₂ CO ₃	48	91 (93)	5 (8)

ここまで検討してきたバイアル中で二種のエマルジョンを混合するバッチ条件では，反応の進行を基質の自由拡散に頼っているため，図 3b に示すような反応順序の制御は困難である．そこで，3つの反応を順次進行させるため，循環式フローリアクターを採用した（図 6）．すなわち，リパーゼの緩衝溶液と硫酸水溶液それぞれを水相とする二種類の W/O 型エマルジョンを混合してカラムに充填し，一方で **3a**，MgSO₄，K₂CO₃ をバイアルに加えて，両者の間で(±)-**1** のオクタン溶液をポンプにより送液して循環させる．これにより，カラム内でリパーゼによる(±)-**1** の加水分解と生じた(*R*)-**2** のラセミ化が完全に進行した後，(*S*)-**1** と(±)-**2** の混合物がカラム出口からバイアルへと流入する．続いてバイアル内で(±)-**2** がエステル化され，3つの反応が所望の順序で進行すると考えた．

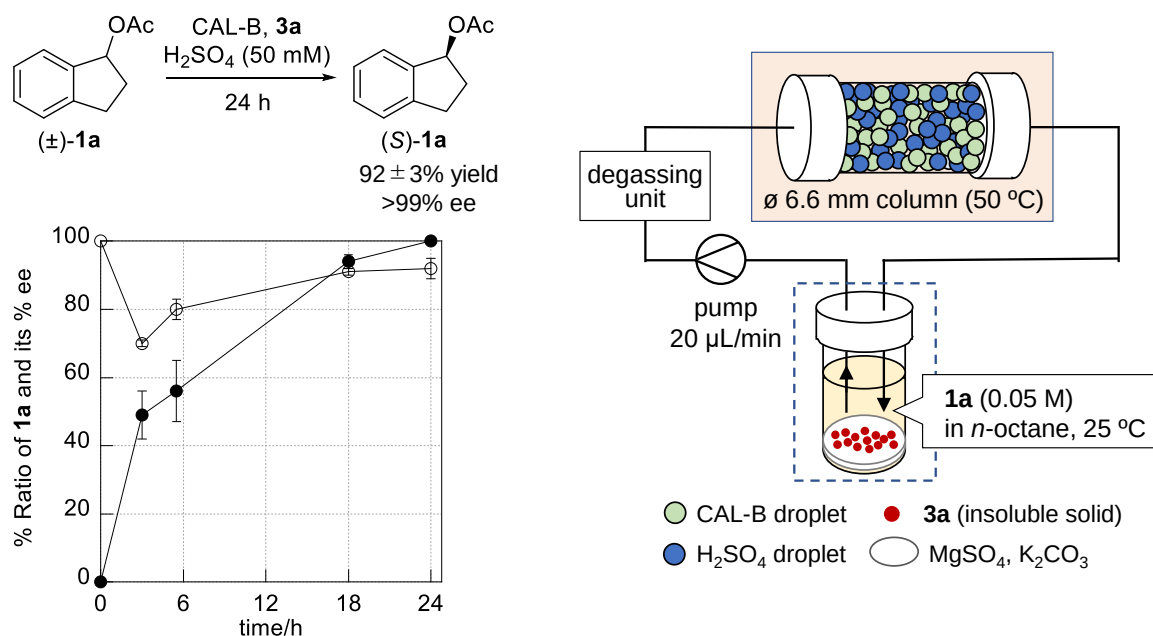


図 6. 循環フロー系による(±)-**1a** の *S* 体収束的 DKR

カラムリアクターでの加水分解とラセミ化の反応条件を種々検討した後、カラム温度 50 °C、バイアル温度 25 °C にて、(±)-**1a** のオクタン溶液をポンプにより流速 20 μL/min で循環させることで DKR を実施した (図 6)。その結果、24 時間の反応で (*S*)-**1a** が収率 92%, >99% ee で得られ、同時でのバッチ条件の検討結果 (表 1, Entry 4) を上回った。反応の経時変化をカラム出口でサンプリングして追跡したところ、反応開始 3 時間で **1a/2a** 比が約 7:3 となったのち徐々に **1a** に収束するとともに (○), **1a** の光学純度がラセミ体から漸近的に >99% ee (*S*) へと収束した (●)。また反応全体を通して **2a** の光学純度は低い値を示したことから (<3% ee), 循環フロー系によって 3 つの反応順序を狙い通りに制御できたことが示唆された。

続いて循環フロー系での *S* 体収束的 DKR の基質一般性を検討した (図 7)。エマルション水相の硫酸濃度を基質ごとに最適化することで、種々のラセミ体エステル(±)-**1** が高収率かつ非常に高い光学純度で *S* 体に収束した。ベンゼン環のパラ位に置換基を有する phenylethyl acetate (±)-**1b-1g** からは対応する (*S*)-**1b-1g** が高い収率・光学純度で得られた。電子供与性の 4-MeO 基が置換した(±)-**1c** では比較的低い硫酸濃度 (0.02 M) で、カラム温度を 35 °C に設定することで (*S*)-**1c** が収率 86%, >99% ee で得られた。一方で電子吸引性のハロゲンが置換した(±)-**1f** や (±)-**1g** の反応では、ラセミ化により高濃度の硫酸 (5.0–6.0 M) を用いることで、それぞれ (*S*)-**1f** (85%収率, 95% ee) と (*S*)-**1g** (88%収率, 96% ee) が得られた。ヘテロ芳香環を有する **1k-1m** でも反応は円滑に進行し、高い収率・光学純度で (*S*)-**1k-1m** が得られた。また、ベンジル位のアセトキシエステルだけでなく、アリル位やプロパルギル位の **1n-1p** でも反応は問題なく進行した。バッチ検討で検討した 4 つの基質 (**1e**, **1i**, **1j**, **1n**) についても、循環フロー条件で収率と光学純度に大幅な改善が見られた。

ここまでエステル(±)-**1** の *S* 体収束的 DKR を検討したが、図 3b の作業仮設に従えば、ラセミ体アルコール(±)-**2** や *R* 体エステル(*R*)-**1** を出発原料としても (*S*)-**1** が得られると考えられる。実際に(±)-**2a** と (*R*)-**1a** を出発原料に図 6 に示す循環式フロー系で反応を実施した結果、(*S*)-**1a** がそれぞれ 93% (>99% ee), 90% (98% ee) で得られた (図 8)。すなわち、図 3b に示したサイクルが厳密に制御されて進行する反応システムの構築に成功した。

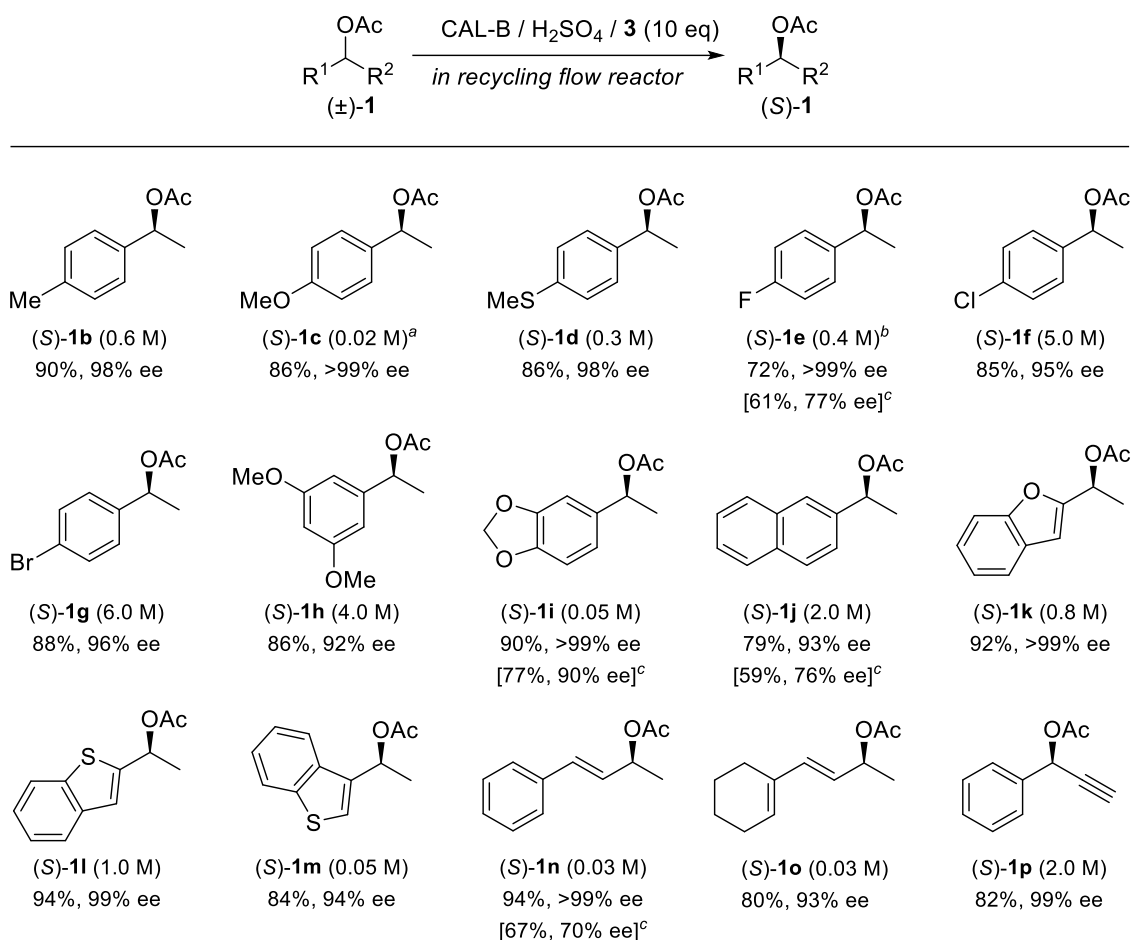


図 7. 循環フロー系での基質一般性の検討（反応条件は図 6 を参照）

^a カラム温度を 35 °C に設定

^b 15 当量の **3a** を用い流速 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ で 48 時間反応

^c 表 1 の Entry 4 の条件によるバッチ条件での反応

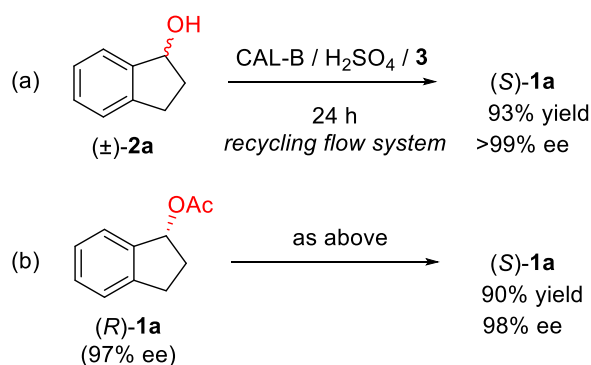


図 8. (a) ラセミ体アルコール(±)-**2** を出発原料とする S 体収束的 DKR ; (b) エステル(R)-**1a** を出発原料とする立体反転型の反応

9. まとめ

本研究では、*R* 体選択的な天然リパーゼを用いて、ラセミ体エステルを *S* 体へと収束させる動的・速度論的・光学分割 (DKR) の開発に成功した。本システムの構築には、リパーゼによるラセミ体エステルの加水分解、硫酸が触媒するアルコールのラセミ化、*N*-アセチルイミダゾールによるアルコールのエステル化を同一系内で進行させる必要があり、Pickering エマルションを用いた反応場の区画化によってこれら 3 つの反応の統合を実現した。また、循環フローシステムを採用することで 3 つの反応の順序を精密に制御することが可能となり、種々のラセミ体エステルから高収率・高光学純度で対応する *S* 体エステルが得られた。この *S* 体収束的 DKR の確立により、筆者らが既に報告している *R* 体収束的 DKR^[13] と合わせて、同一のリパーゼを用いてラセミ体アルコールを *R* 体、*S* 体の両エナンチオマーに自在に変換することが可能となった。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、多大なご支援を賜りました公益財団法人 天野工業技術研究所に心より御礼申し上げます。本研究は大阪大学大学院薬学研究科 薬品製造化学分野で実施したものです。実験を主体的に推進した西尾幸也博士の努力と創意工夫に敬意と心からの謝意を表します。また、ご指導を賜りました赤井周司教授に感謝申し上げます。

参考文献

- [1] S. Krautwald, E. M. Carreira, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 5627–5639.
- [2] U. T. Bornscheuer, R. J. Kazlauskas, *Hydrolases in Organic Synthesis: Regio- and Stereoselective Biotransformations: Second Edition*, WILEY-VCH Verlag, **2006**.
- [3] O. Verho, J. E. Bäckvall, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 3996–4009.
- [4] K. Kanomata, S. Akai, in *Sci. Synth. Dyn. Kinet. Resolut. Dyn. Kinet. Asymmetric Transform.* (Ed.: J.E. Bäckvall), Thieme: Stuttgart, **2023**, pp. 181–217.
- [5] K. Sugiyama, Y. Oki, S. Kawanishi, K. Kato, T. Ikawa, M. Egi, S. Akai, *Catal. Sci. Technol.* **2016**, *6*, 5023–5030.
- [6] L. A. De Almeida, T. H. Marcondes, C. D. F. Milagre, H. M. S. Milagre, *ChemCatChem* **2020**, *12*, 2849–2858.
- [7] A. M. B. Rodriguez, B. P. Binks, *Soft Matter* **2020**, *16*, 10221–10243.
- [8] L. Ni, C. Yu, Q. Wei, D. Liu, J. Qiu, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2022**, *61*, e202115885.
- [9] W. Wei, R. Ettelaie, X. Zhang, M. Fan, Y. Dong, Z. Li, H. Yang, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2022**, *61*, e202211912.
- [10] X. Guo, N. Xue, M. Zhang, R. Ettelaie, H. Yang, *Nat. Commun.* **2022**, *13*, 5503:1–11.
- [11] R. Hao, M. Zhang, D. Tian, F. Lei, Z. Qin, T. Wu, H. Yang, *J. Am. Chem. Soc.* **2023**, *145*, 20319–20327.
- [12] K. Kanomata, N. Fukuda, T. Miyata, P. Y. Lam, T. Takano, Y. Tobimatsu, T. Kitaoka, *ACS Sustainable Chem. Eng.* **2020**, *8*, 1185–1194.
- [13] J. Moon, T. Kin, K. Mizuno, S. Akai, K. Kanomata, *ChemCatChem* **2023**, *15*, e202300878.
- [14] R. J. Kazlauskas, A. N. E. Weissfloch, A. T. Rappaport, L. A. Cuccia, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 2656–2665.
- [15] M. J. Kim, Y. Il Chung, Y. K. Choi, H. K. Lee, D. Kim, J. Park, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 11494–11495.
- [16] L. Borén, B. Martín-Matute, Y. Xu, A. Córdova, J. E. Bäckvall, *Chem. Eur. J.* **2005**, *12*, 225–232.
- [17] K. Engström, M. Vallin, P. O. Syrén, K. Hult, J. E. Bäckvall, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 81–82.
- [18] T. Nishio, S. Akai, K. Kanomata, *ACS Catal.* **2025**, *in press* (DOI: 10.1021/acscatal.4c07986).
- [19] H. Yang, L. Fu, L. Wei, J. Liang, B. P. Binks, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 1362–1371.