Development of Azaelectrocyclization-Based Labeling and Application to Noninvasive Imaging and Targeting Using *N*-Glycan Derivatives —In Pursuit of *N*-Glycan Functions on Proteins, Dendrimers, and Living Cells—

アミノ基の高速化学標識に基づく *N*-結合型糖鎖の非侵襲的イメージングとターゲティング
—糖タンパク質、デンドリマー、および生細胞上の *N*-結合型糖鎖の機能解析を目指して—

Tanaka, Katsunori^{1,2}; and Fukase, Koichi¹

¹Department of Chemistry, Graduate School of Science, Osaka University, 1-1 Machikaneyama, Toyonaka, Osaka 560-0043, Japan

²RIKEN, Advanced Science Institute, Biofunctional Synthetic Chemistry Laboratory, 2-1 Hirosawa, Wako, Saitama 351-0198, Japan
FAX: 81-48-467-9379, E-mail: kotzenori@riken.jp

(Received on September 13, 2011, accepted on February 20, 2012)

Key Words: *6*π-azaelectrocyclization, lysine, labeling, chemical engineering, living cells, *N*-glycan, *in vivo* imaging, tumor targeting

Abstract

The authors have developed the new positron emitting metal and fluorescence labeling protocol of ε-amino group of lysine through their rapid 6π-azaelectrocyclization. Using the same reaction, the small organic molecules could also be introduced on the amino groups of the living cell surface with simple operations under quite mild conditions, establishing the chemistry-based cell surface engineering with complex-type *N*-glycans. PET and the noninvasive fluorescence imaging of the *N*-glycoproteins and the world's largest *N*-glycoclusters, mimicking the natural *glyco-bioenvironment*, for the first time visualized the differences in their *in vivo* dynamics and excretion pathway depending on the presence of the non-reducing end sialic acid as well as their linkages to the galactose residue. The authors also synthetically developed the artificial lymphocytes to target the tumors in living animals by introducing the complex-type *N*-glycans on the cell surfaces.

要 約

著者らは、独自に開発した高速6π-アザ電子環状反応を基盤として、リジン側鎖のアミノ基にポジトロン放出核種や蛍光基で標識する新規方法を開発した。また、同反応を用いて細胞表層上のアミノ基に対して穏やかな条件下で簡便に有機低分子を導入することにも成功し、細胞表層を化学的に複合型*N*-型糖鎖で修飾する化学的手法を確立した。これらの方法を用いて、糖タンパク質や生体内での糖鎖構造を疑似化した世界最大のクラスターのPETや非侵襲的な蛍光イメージングを実施することにより、*N*-型糖鎖の非還元末端シアル酸の存在やガラクトースとの結合様式に依存する動態や代謝過程の相違を初めて可視化することに成功した。さらに、リンパ球の表面に対して有機合成化学的に複合型糖鎖を導入することにより、生きた動物内で癌を認識させることに成功した。

A. Introduction

Asparagine-linked oligosaccharides (*N*-glycans) are involved in a variety of important physiological events, including cell-cell and cell-protein interactions, quality control of the proteins, signal transduction in immune responses, folding of the proteins, and so on (1). Moreover, it has long been known that the sialic acids in *N*-glycans on soluble proteins or peptides enhance circulatory residence (2). These important findings and previous efforts in investigating *N*-glycan functions have been mostly based on *in vitro* experiments using isolated lectins, cultured cells, and dissected tissues. Now, interest has shifted to the *in vivo* functions and dynamics of these glycans and the targeting to the desired organs or tumors using the glycans; molecular imaging is the most promising tool to visualize the “on-time” *N*-glycan dynamics *in vivo*. Recently, biomolecule-based tracers such

A. はじめに

アスパラギン結合型糖タンパク質糖鎖(*N*-結合型糖鎖)は、細胞間相互作用、細胞/タンパク質相互作用、タンパク質品質管理におけるタグ分子、免疫応答におけるシグナル伝達、あるいはタンパク質の3次構造の形成等、様々な生物学的機能発現に深く関与している(1)。特に可溶性タンパク質においては、非還元末端にシアル酸を含む*N*-型糖鎖がその血中内安定性にも重要な役割を果たしていることが示されている(2)。これら重要な発見の多くは、様々な生物学的および臨床学的な知見を基に、これまで主にインビトロの実験から導き出されてきた。すなわち、標的とする糖鎖が関与する様々な現象を、精製されたレクチンや培養した細胞、あるいは切片にした組織を用いて検討されてきた。次なる興味は、インビトロで解明された糖鎖が関与する個々の相互作用が、実際に生体内(インビボ)でどのようなダイナミックなプロセスを経て機能発現に寄与するのかを明らかにし、さらには診断や臨床へ

as peptides and antibodies, in addition to the small organic molecules (3), have actively been investigated to visualize *in vivo* dynamics and target specific organs (4). Although fluorescence imaging is the method of choice due to the convenient experimental and detection procedures at the small animal levels (such as mouse), MR (magnetic resonance) and the PET (positron emission tomography) imaging, which have technologically improved sensitivity, are well-suited even for diagnostic applications. ^{18}F -FDG as a successful example (2-deoxy-2- ^{18}F fluoro-D-glucose), where the C2-hydroxyl group of glucose was exchanged with the β -emitter ^{18}F , is widely applied to the tumor diagnosis as a Food and Drug Administration-approved PET-radiopharmaceutical (5). By using these advanced imaging apparatus, the *in vivo* dynamics of the glycans, of which target receptors or interacting organs are known, can directly be investigated as the images. Alternatively, the imaging of the glycans with unknown functions, could bring us a new insight on the biological significance of individual glycans.

Nevertheless, except the case of ^{18}F -FDG, technically a monosaccharide, a very few imaging trials of glycans have been reported. A single molecule of the *N*-glycan, either obtained from a natural or synthetic source (6), is readily degraded in the blood and/or excreted from the body (7). The bioactivity and the highly selective recognition of the oligosaccharides might be derived from the pattern recognition through the multivalency and/or heterogeneous environment, *i.e.*, on cell surfaces that are composed of oligosaccharide clusters along with other biomolecules. Therefore, efficiently mimicking a *N*-glycan-involved bioenvironment (termed as glyco-bioenvironment), *e.g.*, by conjugating the *N*-glycans to the liposomes, to the clusters, or even to the surface of the cells, may provide information on the “*in vivo* dynamics” of *N*-glycans. Furthermore, based on these glycoconjugate imaging, we could explore the glycans which efficiently target the inflammation or tumor, and those selectively accumulate in the nerve systems, lymphatic organs, or spleen. The recent successful noninvasive imaging and biodistribution study of glycans and/or glycoconjugates dealt with natural- and neoglycoproteins, liposomes, and nanoparticles (8).

We have been applying the rapid azaelectrocyclization, which was developed by ourselves, to the PET or noninvasive fluorescence imaging of biomolecules in order to analyze the dynamics of glycans, peptides, and proteins *in vivo*, and to develop the biomolecule-based diagnosis tracers for inflammation and tumors. Thus, we developed the highly efficient positron emitting metal and fluorescence labeling probes for the *N*-glycoconjugates by designing the rapid azaelectrocyclization with the amino groups (4,9), and achieved the noninvasive *in vivo* imaging of the *N*-glycoproteins (4,9) or the whole living cells (10).

の展開を意図して、糖鎖を特定の臓器や癌組織、炎症部位に集積 (ターゲティング) させることである。これを実現する1つの手段として、“糖鎖を生体内で可視化する”方法が挙げられるが、最近では低分子有機化合物に関わらず(3)、ペプチドや抗体などの生体高分子の蛍光標識体を用いることによって、マウスなどの小動物ではインビボ蛍光イメージングが比較的容易に実施できるようになってきた(4)。常磁性元素やポジトロン放出核種を増幅剤、あるいは標識基とするMR(magnetic resonance)イメージングやPET(positron emission tomography)イメージングでは、高感度測定装置の開発により、小動物を用いたイメージングが可能となったばかりではなく、重要なトレーサーが見出された時、速やかにヒトへの応用が可能である。例えば、単糖であるグルコース2位の水酸基が単寿命放射線原子である ^{18}F に置き換えられた ^{18}F -FDG(2-deoxy-2- ^{18}F fluoro-D-glucose)は、既に現在、癌のPET診断に幅広く用いられている(5)。これらの最新インビボイメージング機器を活用し、既にその標的レセプターや相互作用する器官が明らかにされている糖鎖のイメージングを実施することによって、当該糖鎖の生体内でのダイナミクスを直接可視化することが可能である。また、機能が未知である糖鎖の生体内イメージングを行うことにより、逆に個々の糖鎖が持つ生物学的意義を明らかにできる可能性を有する。

しかし単糖である ^{18}F -FDGを除いては、現在までに「糖鎖」のインビボイメージングの報告例は非常に少ない。例えば、合成(6)や天然から入手できる単分子の*N*-型糖鎖を生体内でイメージングしても、多くの場合は血中内で分解されるか速やかに体外排出され(7)、その糖鎖が持つ本来の生物学的機能に迫ることは難しい。細胞表層上では様々な糖鎖と種々の生体分子が生体分子社会を形成しているが、細胞間の認識では、それぞれの細胞の生体分子社会同士が互いにパターン認識を行うことにより、高度な選択的認識を可能にしている。そこで、*N*-型糖鎖を人工的にクラスター化したり、リポソームや細胞表層上に対して複合体として再構成してイメージングを行うことで、生体分子社会における*N*-型糖鎖の生物学的意義に迫ることができよう。さらにこれらの知見を基盤にして、生体内で炎症部位や癌を特異的に認識する糖鎖、神経系やリンパ節、あるいは脾臓などの臓器に選択的に取り込まれる*N*-型糖鎖構造を容易に探索することが期待できる。実際に最近では、糖鎖をタンパク質やリポソーム、あるいはナノ粒子に導入し、非侵襲的イメージングや生体内分布実験が盛んに検討されている(8)。

このような背景のもと著者らは、独自に開発した高速アザ電子環状反応の反応特性を最大限に活用して、ペプチドやタンパク質などの生体高分子の動物内でのダイナミクスを解明すると共に、炎症や癌組織の診断薬の開発に結びつけることを目的として、PETや蛍光観察を基盤とした非侵襲的インビボイメージング研究を実施した。すなわち、アミノ基との高速アザ電子環状反応を設計することによって、ポジトロン放出核種や蛍光基の革新的標識分子ツールを開発し(4,9)、*N*-結合型糖タンパク質(4,9)や生細胞丸ごと(10)の画期的な非侵襲

Furthermore, the world's largest *N*-glycoclusters with molecular mass of 50 kDa, which efficiently mimic the multivalency effects *in vivo*, could be prepared, and their imaging studies successfully visualized the remarkable dependence of the non-reducing end sialic acid and its linkages to galactose on the clearance and the organ-specific accumulation (11). Furthermore, we developed the method for introducing the *N*-glycans on living cell surfaces using the same azaelectrocyclization (cell surface glycan engineering), and the glycan-engineered artificial cells were used as the whole cell-based imaging tracers of tumors, thus establishing the new strategy for tumor targeting (12). In this review, we would like to first discuss our new electrocyclization-based labeling of biomolecules, providing the reactivity profiles in details, and then describe our recent trials on the *in vivo* imaging of the *N*-glycoconjugates.

B. Development of New Labeling Probes of Lysines through Rapid Azaelectrocyclization

Generally, PET or SPECT (single-photon emission computerized tomography) experiments of the "biomolecules", including peptides, proteins and antibodies, is achieved by conjugation to metal chelating agents such as DOTA (1,4,7,10-tetraazacyclodecane-1,4,7,10-tetraacetic acid) or DTPA (diethylenetriaminepentaacetic acid) prior to radiolabeling with a suitable radioactive metal (Fig. 1A). DOTA is preferentially used due to the preferable kinetics for metal incorporation as well as high thermodynamic stability of the complexes with any metals (4). An example of positron emitting metal-DOTA conjugates for PET is tumor diagnosis using ^{68}Ga -DOTA-octreotide, a metabolically stable analog of

the in vivo imaging was realized. Additionally, in vivo imaging of the glycan multivalent effect was effectively demonstrated to achieve this, the molecular weight of 50,000 or more, the world's largest *N*-glycan-type glycan cluster synthesis was successful, and, by their imaging, the non-reducing end sialic acid presence or galactose binding mode was significantly dependent on the metabolic process or accumulation was found (11). On the other hand, the same reaction on the cell surface layer after the reaction, the *N*-glycan-type glycan introduction (cell surface glycan modification) was used as a base, the cancer tissue targeting new strategy was established (12). In this paper, we will first discuss the development of the new electrocyclization-based labeling of biomolecules, providing the reactivity profiles in details, and then describe our recent trials on the *in vivo* imaging of the *N*-glycoconjugates.

B. High-speed Azide Electrocyclization Using a Revolutionary Lysine Residue Labeling Probe Development

Generally, peptides or proteins, or even antibodies, PET or SPECT (single-photon emission computerized tomography) experiments are performed by first labeling with a suitable metal chelator, and then introducing various radioactive metals (Fig. 1A). Metal chelators include DOTA (1,4,7,10-tetraazacyclodecane-1,4,7,10-tetraacetic acid) and DTPA (diethylenetriaminepentaacetic acid), etc., but many metals have high coordination rate constants, and the stability of the metal complex is high, DOTA is often used (4). Up to now, the reported positron-emitting metal/DOTA labeling as a base for PET experiments, for example, the use of the biologically active peptide somatostatin in the blood, the use of the stable conductor octreotide, the use of the cancer diagnosis research is being carried out. ^{68}Ga -DOTA-octreotide is, in fact, being examined in patients with inflammatory bowel disease, and

Fig. 1. Labeling of biomolecules through (A) NHS method and (B) azaelectrocyclization.

somatostatin (4). ^{68}Ga -DOTA-octreotide which was injected into patients suffering from meningiomas, could detect even the smallest tumors of 7 mm diameter, achieving much higher sensitivity than ^{18}F -FDG PET or MRI. Alternatively, other natural peptides, monoclonal antibodies, minibody, (a smaller fragment of monoclonal antibody (mAb) showing better biodistribution), or even mRNA and PNA (peptide nucleic acid), have also been reported as the DOTA-based PET probes of biomolecules. These recent trend for PET imaging of biomolecules is summarized in details in the authors' review (4).

In most cases, the chelating agent, DOTA, can be introduced via a reaction of N-terminal amino groups or lysine ϵ -amino groups with DOTA-*O*-sulfo-succinimidyl ester, NHS reagent (Fig. 1A). However, the reactivity of the activated DOTA ester is not high, and the labeling requires high reaction concentrations (10^{-3} – 10^{-4}M for biomolecules, 10^{-1}M for reagents) and long reaction times (2–24 hours) at room temperature. The conjugate efficiency is usually not high (20–30 %). In most cases, therefore, the method requires a large quantity of sample, in worst cases, as much as 4–20 mg to maintain high reaction concentrations, hence to efficiently prepare the DOTA-conjugates. Importantly, labeling under such high reagent concentrations indiscriminately modifies many lysines, including the key lysines for the activity.

Under such circumstances, new chemical approaches towards the protein modification, employing advanced organic reactions, including Cu(I)-catalyzed Huisgen [2+3] cycloaddition (13), Staudinger reaction (14) and ligation using the strained acetylenes under the Cu-free conditions as the improved version of Huisgen protocol (15,16), have been reported (Fig. 2A). By these chemical protocols, the protein

^{18}F -FDG をトレーサーとした PET や MRI よりも高感度で直径 7mm の癌を追跡できることが報告されている。他にも様々な天然ペプチドやモノクローナル抗体、あるいは体内でより効果的な動態を示す抗原認識フラグメント、minibody も盛んに検討されており、最近では、mRNA や PNA (peptide nucleic acid) を用いた研究も癌診断の生体高分子プローブとして報告されるようになってきた。これら最近の生体高分子イメージングの詳細については、著者らの総説にまとめているのでご参照いただきたい (4)。

さて、従来、ペプチドやタンパク質 (抗体) を DOTA で標識する場合には、N-末端アミノ基やリジンの ϵ -アミノ基に対して、スクシンイミジルエステル試薬 (NHS 試薬) を作用させることにより実施されてきた (図 1 A)。しかし、スクシンイミジルエステル試薬の反応性があまり良くないため、標識するサンプルの反応濃度を高濃度に保たなければならず ($10^3 \sim 10^4 \text{ M}$ 程度のタンパク質濃度、 10^{-1} M の試薬濃度)、さらに長い反応時間 (室温で 2 ~ 24 時間程度) が必要とされる。標識効率も大抵の場合は良くない (20–30% 程度)。このため、多くの例では、効率的に DOTA 標識サンプルを調製するために、4 ~ 20 mg 程度の大量の生体高分子サンプルが用いられている。さらに高濃度反応条件下では、無差別に多くのアミノ基が標識されることに起因して、標識サンプルの活性が著しく低下することが大きな問題であった。

近年、タンパク質修飾に対する新しい合成化学的なアプローチとしてアジドとアセチレンとの銅触媒による Huisgen [2+3] 反応 (13) や、Staudinger 反応 (14)、さらには Huisgen 反応の改良法として、歪んだアセチレンとの銅非存在下での反応 (15,16) などが報告されている (図 2 A)。これらの反応で

Fig. 2. Chemistry-based bioconjugation methods on (A) proteins and (B) living cells.

labeling could be achieved without affecting the activity, when the azide groups were selectively introduced at the desired positions within the amino acid sequences of the target proteins; such protocols are referred to be “bioorthogonality (17)”. However, although the genetically engineering methods which efficiently express the unnatural amino acids, *i.e.*, azide-containing residues, into the natural proteins, have actively been investigated, they are still not trivial issues to us. These authors believes that such bioorthogonal methods could soon bring the breakthrough to the molecular imaging and the chemical biology fields, but the generality and broader applicability to chemists, biologists, as well as the physicians, still remains to be explored.

は、タンパク質の特定の位置に選択的にアジド基を導入すれば、活性を損なうことなく標識が可能である。すなわち、生物直交性ある方法 (bioorthogonality) である (17)。しかし、まずタンパク質に対してアジド基を導入することは、必ずしも容易ではない。異常アミノ酸を天然タンパク質に発現させる革新的な遺伝子工学的方法が続々と報告されており、近い将来にブレイクスルーを引き起こすことには間違いないが、現状では、まだ化学者から生物学者、あるいは医療分野に簡単に適応できる汎用性かつ即効性ある方法にまでは展開されていない。

in Fig. 3, the Stille coupling as the key step. Currently, our amino-labeling probes in Fig. 3, which show the excellent labeling efficiency and can readily be applied using the quite simple procedures, were developed as a labeling kit “STELLA⁺”; it could be utilized in near future for molecular biology, diagnosis, and the other bio-directed research with broader applications (9e).

As expected, the aldehyde probe **1a** prepared in Fig. 3 showed the excellent reactivity for labeling of the biomolecules. Thus, the 10^{-6} M – 10^{-8} M solution of DOTA-STELLA⁺ **1a** quantitatively labeled the lysines on peptides and proteins within 5–30 min in various buffer solutions (pH = 6–9) (Fig. 1B). Detailed discussion is provided in the original papers (9,10), but the author’s labeling via azaelectrocyclization can be performed within a very short time under extremely low concentrations of both probe and the lysines in comparison with the conventional NHS method. Under such mild labeling conditions, ϵ -amino groups of lysines are preferentially labeled to those N-terminal amines. Steric accessibility of the lysines also affects their labeling selectivity; although reactions with internal lysines in the protein tertiary structures are very slow, lysines at the protein’s surface, which are usually not involved in the protein activity, can react rapidly; therefore, labeling occurs preferentially at surface positions and the activity is retained. On the other hands, the conventional NHS method necessitates much higher reaction concentrations due to the low reactivity profile of the activated esters, therefore resulting in the non-selective lysine modification.

Moreover, dihydropyridines as the electrocyclization products, which retain cationic charges as those of the inherent lysines, should contribute to the retention of the protein activity. For instances, the 10^{-7} M solution of anti-GFP and EGF receptor (EGFR) antibodies (as little as a few pg– μ g, a few pmol of the samples) was successfully labeled by **1c** in 30 min at room temperature; this probe preferentially labeled the more accessible Fc fragment with two fluorophore molecules, while retaining its GFP and EGFR recognition activity as those of the intact mAb (9a). While the reaction with the azide functions being introduced at the specific position of the proteins, which was shown in Fig. 2, is the “bioorthogonal”, the authors’ azaelectrocyclization as well as the conventional succinimidyl ester methods are categorized as “non-bioorthogonal”. Nevertheless, the unique reactivity of the azaelectrocyclization as described above could satisfy some of requirements for “bioorthogonal reaction” (17), namely, (1) fast (kinetics), (2) non-toxic to the biological environment (biocompatibility), or (3) selective at the target molecules *in vivo* (selectivity), *etc.*; thus, we could propose and realized a new concept of the “pseudo-bioorthogonal reaction, through the development of the authors’ rapid azaelectrocyclization.

は、現在標識キット STELLA⁺ として開発し、これまでの既存標識プローブと比較して、格段に高い効率性とその操作の簡便性から、分子生物学や実験医学の分野から注目を集めている (9e)。

期待したように、図3で効率的に調製したアルデヒドプローブは生体高分子の標識において顕著な反応性を示した。 10^{-6} ~ 10^{-8} M 濃度の DOTA-STELLA⁺ **1a** をペプチドやタンパク質などのリジン残基と作用させると、様々な水素イオン濃度指数の緩衝溶液中 (pH = 6 ~ 9)、5 ~ 30 分以内の短い反応時間で、定量的に標識体を与えた (図1B)。詳細は原著に譲るが (9,10)、著者らの方法では試薬の反応性が高いため、NHS 法などの既存法と比較して、非常に短い時間内でかつ格段に低い濃度で標識を実施できる。このような温和な条件下では、リジン残基の ϵ -アミノ基が N-末端アミノ基に優先して速やかに標識化を受ける。さらに、極低濃度条件下では、タンパク質表面の最も接近し易いリジン残基のみが優先して標識を受ける。タンパク質表面の活性には関与しない突き出たリジンが選択的に反応するため、ほとんどの場合、生体高分子サンプルの活性を低下させることがない。一方、NHS 法では、反応性が劣るために高い濃度条件を必要とし、その結果リジンに対する選択性が発現しない。

さらに、リジン側鎖アミノ基との標識付加体がリジン残基と同様に正電荷を保持することも、標識サンプルの生物活性を損なわない今一つの理由である。例えば、 10^{-7} M 程度の GFP 抗体や抗 EGFR 抗体 (数 pg ~ μ g, 数 pmol のサンプル) に対して、STELLA⁺ **1c** を室温で 30 分間作用させると、抗原認識能にほとんど影響を与えず Fc 部位の 1 ~ 2 個のリジン残基を効率的に標識することでできた (9a)。先に図2で紹介した、タンパク質の特定の位置に導入したアジド基に対する反応が「生物直交性型反応」であるのに対して、従来のスクシンイミジルエステル法や著者らの方法は基本的に「非生物直交性型反応」である。しかし、著者らのアザ電子環状反応のユニークな反応性を効果的に利用することにより、「生物直交性型反応」に用いることのできる反応の幾つかの条件 (17) を満たすことができる。すなわち、(1) 速度が早く、(2) 生体内で他の生体分子の機能を損なうことなく、(3) 様々な生体分子が混在する煩雑物系で標的分子選択的に実施できる。このように、「偽 (pseudo: 類似の) 生物直交性型反応」の概念を提起し、著者らのアザ電子環状反応を以て実現することができた。

さらに、プローブ **1a** の DOTA の部分を他のレポーター

Not only for the DOTA-probe **1a**, the established route in Fig. 3 could but also be used for preparing the general fluorescence probes; various biomolecules are efficiently labeled by fluorescence-**STELLA⁺ 1b-d** (9e), *i.e.*, coumarin-, TAMRA-, and Cy5-fluorescences (Figs. 1 and 3). Additionally, paramagnetic metal Gd^{3+} could be chelated in the DOTA unit of **1a** prior to peptide labeling (**1a**: $M = Gd^{3+}$ in Fig. 1); this new process should allow valuable and/or unstable materials, which might decompose during metal-incorporation to DOTA afterwards, to be labeled for MRI purposes. Efficient labeling protocol in our hands, we have investigated the noninvasive imaging of the *N*-glycans and glycoconjugates.

C. PET Imaging of Soluble Glycoproteins: Effects of Sialo-*N*-Glycans on Circulatory Residence of Proteins

Effects of non-reducing end sialic acid residues on the circulatory residence of the glycoproteins were examined by combined use of the labeling probe **STELLA⁺** and MicroPET imaging (Fig. 4) (4,9). According to the established procedure above, orosomucoid and asialoorosomucoid as the representative mucin-type glycoproteins, which are available in only small amounts (~10 μ g of glycoproteins), were labeled successfully and 2 and 3 units of DOTA were incorporated by incubating the respective protein with DOTA-**STELLA⁺ 1a** for 30 min. The DOTA-glycoprotein adducts obtained were then treated with $^{68}Ga^{3+}$ (readily obtained from $^{68}Ge^{3+}$) as a β^+ emitting radiometal (19) for PET. Approximately, 1 μ g (200 pmol) of the ^{68}Ga -DOTA-labeled glycoprotein tracers were then administered from the tail vein of the rabbit and the dynamic PET images were obtained (Fig. 4). PET of these two proteins successfully visualized asialoglycoprotein as well as its decomposed products being rapidly moved to the kidney in 30 min and then cleared in 240 min much faster than orosomucoid. Asialoorosomucoid was also transferred to gallbladder, hence the excretion pathway through the liver to the gallbladder was suggested; the results show that the asialoorosomucoid without sialic acids is rapidly cleared from the body. That is, the sialic acid residue on the non-reducing end of the *N*-glycans contributes to the stability of glycoproteins in the blood. It has been well known that the introduction of sialic acid of the *N*-glycans extends the life time of the glycoproteins *in vivo* (2), *e.g.*, erythropoietin (EPO) (2b) or insulin (2c). To the best of our knowledge, the results in Fig. 4 achieved the first visualization of sialic acid-dependent circulatory residence of glycoproteins. Furthermore, we observe from Fig. 4 that the asialoglycoprotein strongly accumulated in the spleen and the lung in a time-dependent manner, thus showing such a significant difference in the biodistribution in the presence and absence of the sialic acid residues in the glycoproteins. It is noted that the spleen is an organ located in the abdomen of the body, involved in

分子に変換することにより、様々な各種標識を行うことができた (図1、3)。蛍光色素を持つ **STELLA⁺ 1b-d** (9e) を用いると蛍光標識を行うことができ、さらに DOTA に常磁性金属である Gd^{3+} を予め配位させることにより (プローブ **1a**: $M = Gd^{3+}$ 、図1)、MR 用の標識ペプチドやタンパク質を容易に調製することが可能となった。DOTA 配位子で標識した後に各種金属を配位させる際に分解する不安定なタンパク質や、後の金属導入では配位しにくいタンパク質も、著者らの方法では穏やかな条件下で簡単に標識することが可能となった。そこで本プローブを用いて、以下に糖鎖誘導体の生体内イメージングを実施した。

C. 可溶性糖タンパク質の PET イメージング：シアル酸含有糖鎖によるタンパク質の血中内安定性への影響

まず、糖鎖非還元末端のシアル酸がタンパク質の血中内滞留性に及ぼす影響を、著者らの標識プローブ、**STELLA⁺** と PET によって可視化することを試みた (図4)(4,9)。数十マイクログラムのムチン系糖タンパク質であるオロソムコイドとアシアロオロソムコイドに対して、先の手順に従って DOTA-**STELLA⁺ 1a** を室温で 30 分間作用させたところ、各タンパク質に対して 2 分子、または 3 分子の DOTA 配位子で標識することに成功した。次いで、 $^{68}Ge^{3+}$ から容易に得られる $^{68}Ga^{3+}$ を単寿命放射線金属 (19) として各タンパク質に共有結合させた DOTA に導入した後、得られた 2 つの ^{68}Ga -DOTA-糖タンパク質トレーサー (1 μ g, 200 pmol) をウサギに尾静脈注射して、ダイナミック PET 画像を得た (図4)。糖鎖構造にシアル酸を有するオロソムコイドに比較して、シアル酸の無いアシアロオロソムコイド、またはその分解物は、30 分後に腎臓に素早く移行し、その後 240 分後には徐々に消失した。シアル酸の無いアシアロオロソムコイドは胆嚢にも素早く移行しているため、胆嚢—腸管経路を経た体外排出ルートも示唆された。以上の結果は、アシアロオロソムコイドが素早く体外排出されることを示しており、これは糖鎖構造における非還元末端に存在するシアル酸が、タンパク質の血中内安定性に寄与することを意味する。シアル酸含有糖鎖の導入により、糖タンパク質の生体内での半減期が長くなることは古くから報告されてきた (2)。特に、エリスロポエチン (2b) や糖鎖導入インシュリン (2c) のように、シアル酸含有 *N*-結合型糖鎖がタンパク質やペプチドの血中内安定性に大きく寄与することが有名であるが、著者らの知る限り、図4の結果はこれを PET イメージングにより可視化した初めての例である。さらに、シアル酸の無いアシアロオロソムコイドは、脾臓および肺へより強く

Fig. 4. Dynamic microPET images of ^{68}Ga -DOTA-glycoproteins in rabbits (axial view, overlapped with CT). Time course of accumulation of (A) ^{68}Ga -DOTA-orosomucoid and (B) ^{68}Ga -DOTA-asialoorosomucoid in some peripheral organs. Radioactivity of each ^{68}Ga -DOTA-labeled glycoclusters was adjusted to 10 MBq, prior to the injection.

the secondary lymphoid organs. It can function as part of the immune system, *i.e.*, by phagocytosis-mediated defense mechanism through the reticuloendothelial system (RES) or by the activation and regulation of the systemic and mucosa immunity; the antigen-specific antibodies could be produced by interacting the T-cells with the mature B-cells. Although it await for the further investigation to rationale the accumulation of the asialoglycoprotein in the spleen, these imaging results in Fig. 4 may suggest the negative regulation effects of the sialo-*N*-glycoproteins on the immune system through the interaction with Siglec 2 (CD22) (20,21), a Neu α (2–6)Gal-specific lectin, which is overexpressed on mature B-cells or T-cells. Overall, when applying our labeling probe STELLA⁺, the circulatory residence of the glycoproteins could readily be visualized by PET, hence the results in Fig. 4 would give a promising opportunity for developing the proteins as the future pharmacological and/or clinical applications.

D. Development of the World's Largest *N*-Glycoclusters and Their *In Vivo* Dynamics by Noninvasive Imaging

As visualized the significant effects of *N*-glycan

集積することが図4のイメージ図より初めて明らかとなった。脾臓は二次リンパ器官に属し、細網内皮系 (RES) を介した異物の貪食による生体防御や、全身免疫と粘膜免疫における抗原特異的免疫の誘導や制御に深く関わっている。T細胞と成熟B細胞が相互作用して、抗原特異的抗体を産生する。更なる検討が必要であるが、著者らは図4の結果を、シアル酸含有*N*-型糖鎖がB細胞やT細胞上でのシグレック2(CD22)(20,21)と相互作用して、免疫を負に抑制することと関連があるのではないかと考えている。このように著者らの標識プローブ、STELLA⁺を用いることによって、糖タンパク質の血中内滞留性をPETイメージングによって簡便に可視化することから、将来タンパク質を生物製剤として利用する上で大変意義深い結果であると考えている。

D. 世界最大の*N*-結合型糖鎖クラスターの開発と非侵襲的イメージングによる生体内ダイナミクス解析

糖鎖構造に依存した顕著なタンパク質動態に関する知見を得たので、次に糖鎖分子自身の生体内での挙動解析を検討

structures on proteins dynamics *in vivo*, our next concern was the dynamics of the *N*-glycan themselves (11). As noted in Introduction, single molecules of the *N*-glycans (monomeric glycan), however, in general are not suited as the imaging tracer due to the small size and the weak interaction with the sugar binding proteins. Consequently, they are readily excreted through the kidney *via* the biofiltration (7). Most of the glycans in nature are therefore enhancing their interactions and target selectivity by forming the glycocluster (termed as cluster effects and/or multivalency effects) (22). On the other hands, the natural glycoclusters are often consisted of the several kinds of the glycans (termed as glycoform), thus highly diversifying the *glyco-bioenvironment*; such heterogeneous glycoclusters could be responsible for regulating and/or adjusting the glycan-dependent dynamics and functions *in vivo* (1). In order to mimic such *glyco-bioenvironment*, we initially designed the homogeneous dendrimer-type glycoclusters (11). Examples of the large glycodendrimers consisting of the *N*-glycans with complex structures have not been reported (23), we efficiently synthesized the world's largest *N*-glycoclusters with molecular mass of 50 kDa (Fig. 5A). Thus, 4, 8, and 16 molecules of *N*-glycans (24) were introduced on the

した(11)。しかし前述のように、単分子の糖鎖は分子サイズが十分でなく、また単分子の糖鎖と糖鎖認識タンパク質との相互作用は一般に弱いために腎臓から素早く排出される(7)。多くの糖鎖はクラスターを形成して糖鎖相互作用の強度ならびに選択性を増強する(クラスター効果、または多価効果)(22)。一方、生体内糖鎖の多くは不均一であり(グライコフォーム)、クラスター形成下で多様性の高い糖鎖生体分子社会を作り出して、糖鎖依存的な動態や機能を微妙に調節しているものと思われる(1)。そこでこの分子社会を疑似構築することを目標として、まず構造依存的な糖鎖動態を解析するために、均一糖鎖のデンドリマーを合成した(11)。*N*-結合型糖鎖のような複雑糖鎖の巨大デンドリマーの合成例はなかったが(23)、著者らは分子量が5万以上の世界最大の糖鎖デンドリマーを構築した(図5A)。すなわち、ポリリジン型デンドリマー2の末端に導入したプロパルギルグリシンに対して、銅媒介による Huisgen 環化反応を用いて、4、8および16分子の*N*-結合型糖鎖(24)を導入した。この際、著者らが独自に開発し

Fig. 5. (A) Preparation of glycoclusters. (B) Dynamic microPET imaging of glycoclusters 2a-c in normal BALB/c nude mice over 0-4 h after injection. Radioactivity of each ⁶⁸Ga-DOTA-labeled glycoclusters was adjusted to 10 MBq, prior to the injection; H: heart; K: kidney; L: liver; B: urinary bladder; GB: gallbladder.

polylysine-based dendrimer core with the terminal histidine and propargyl glycine residues, by Cu(I)-mediated Huisgen cycloaddition; by applying the authors' "self activating click reaction" which utilizes the histidine derivatives as the internal activators (25), various complex-type *N*-glycans were quantitatively clustered at room temperature for 40 min. Terminal amino groups of these glycoclusters were subsequently labeled by ^{68}Ga -DOTA (labeling using STELLA⁺ **1a**) or near-infrared fluorescence, Cy5-fluorophore (650 nm, using STELLA⁺ **1d**) through rapid 6 π -azaelectrocyclization for PET and fluorescence imaging in BALB/c nude mice (Fig. 5B).

First of all, the *in vivo* dynamics between the generations of the clusters, namely those between 4-mer, 8-mer, and 16-mer containing the bis-Neu α (2-6)Gal structure at the non-reducing end (see structure **2a** in Fig. 5A), remarkably differed; although 4-mer and 8-mer were rapidly and almost completely cleared through the kidney over 1 h, the radioactivity derived from 16-mer **2a** was still retained in the body after 4 h, resulting in the accumulation in the liver, but was excreted slowly from the kidney/urinary bladder and from the gallbladder (Fig. 5B). The differences in the clearance properties between the dendrimer generations may be due to their molecular size (26). Alternatively, the degree of negative charge and/or that of the hydrophilicity of the clusters, *i.e.*, hydrophilic *N*-glycans vs. the hydrophobic polylysine backbone occupying the surface on the clusters may affect the rapid clearance through the kidney (27). Hence, the 16-mer cluster should be well suited for efficiently visualizing the *in vivo* dynamics of *N*-glycan in living animals.

We subsequently examined the effects of the *N*-glycan structures on their *in vivo* dynamics and the biodistribution using the 16-mer clusters **2a-2c** (Fig. 5B). Unlike bis-Neu α (2-6)Gal-case **2a**, asialo-glycan cluster **2b** rapidly cleared through the kidney to the bladder, although some accumulation was observed in the liver over 4 h, because the asialoglycoprotein receptors are highly expressed in this organ (2a). The results are consistent with the PET analyses of glycoproteins as described in the previous section, that the sialic acid contributes to the stabilization of the glycoclusters in the body. However, bis-Neu α (2-3)Gal-case **2c**, which also contains sialic acid but α -linking to the 3-OH of galactose, was readily excreted through the kidney/urinary bladder over 1h, substantially different phenomena from those of bis-Neu α (2-6)Gal-case **2a**. Since the Neu α (2-3)Gal moieties cannot usually be found in the serum proteins, the mamarian blood circulatory systems might precisely recognize the sialic acid linkages to the galactose at the non-reducing end of the glycans. Namely, Neu α (2-3)Gal-cluster **2c** is probably recognized as an invader and smoothly excreted by the vascular endothelial cells, erythrocytes, leucocytes, and *via* the phagocytosis by a

たヒスチジン誘導体を活性化剤とする自己活性化クリック反応 (25) を実施することにより、種々の複合型 *N*-結合型糖鎖を、室温・40分という温和な条件下で定量的にクラスター化することに成功した。次いで、糖鎖クラスター末端のアミノ基に対して、電子環状反応を用いて、放射線核種である ^{68}Ga -DOTA(STELLA⁺-プローブ **1a**) や近赤外線に吸収を持つ Cy5 蛍光基 (650nm, STELLA⁺-プローブ **1d**) を効率的に導入した後、BALB/c ノードマウスにおける PET や蛍光イメージングを実施した (図 5B)。

まず、非還元末端に2つの Neu α (2-6)Gal 構造をもつ *N*-結合型糖鎖 (図 5A、**2a** の糖鎖構造参照) を用いて、デンドリマーの世代が生体内動態に及ぼす効果を調べた。その結果、糖鎖を4分子、または8分子持つクラスターでは、1時間以内に速やかに腎臓から排出されるのに対して、糖鎖を16分子有するクラスター **2a** では、血中内での滞留性が著しく向上し、4時間後に主に肝臓に集積すると共に、腎臓—膀胱からの排出に加えて、胆嚢を経てゆっくりと体内から排出されることが分かった (図 5B)。クラスターの分子サイズに加えて (26)、デンドリマー世代の違いによるクラスター表面での糖鎖の親水性、およびペプチド基本骨格の疎水性が腎臓からの排出 (27) に大きく影響していると考えられる。このように、*N*-結合型糖鎖の“生きている動物内”におけるダイナミクスを効率良く可視化するためには、糖鎖を16分子クラスター化することが重要であることが判明した。

そこで、クラスター **2a-2c** を用いて、糖鎖構造が代謝や集積に及ぼす効果についてさらに検討した (図 5B)。アシアロ糖鎖である **2b** の場合には、4時間後に肝臓にわずかに集積したものの、ほとんどが膀胱に排出された。このように、先の糖タンパク質の場合と同じく糖鎖クラスターの場合にもシアル酸が糖鎖の生体内での安定性を増すことが観測された。尚、肝臓にはアシアロ糖タンパク質受容体が発現しているので (2a)、デンドリマー **2a** の末端のガラクトース残基が認識されて肝臓に集積したものと考えられる。一方、興味深いことに、同じシアル酸含有糖鎖でも2つの Neu α (2-3)Gal を非還元末端構造に持つデンドリマー **2c** の場合では、対応する Neu α (2-6)Gal 結合を持つ **2a** の場合とは劇的に異なり、1時間程度で速やかに膀胱に排出されることが判明した。シアリル α (2-3) ガラクトース構造は血液中に存在するタンパク質には含まれていないので、動物の血液循環システムは末端シアル酸の結合位置を認識していることになる。血管内皮細胞や各種リンパ球、ある

macrophage; the smaller sized degradation products may be filtered in the kidney. Alternatively, the “excretion-escaping” mechanism by stimulating the immunosuppressive signals through the ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif) molecules via Siglec families (20), may account for the higher stability of Neu α (2-6)Gal-cluster **2a**. Thus, our dynamic PET images for the first time visualized the strikingly different in vivo dynamics as well as excretion pathways between the *N*-glycoclusters, which are sensitively regulated by the truncated structures at the non-reducing end, even by the linkages between the sialic acid and galactose.

A biodistribution study of the glycoclusters **2a-e** (16-mer), which in addition to the clusters investigated above, include the glycans containing both Neu α (2-6)Gal and Neu α (2-3)Gal moieties, was performed in further detail using fluorescence imaging (Fig. 6). Overall, these in vivo images clearly visualize the importance of “at least” one Neu α (2-6)Gal moiety in the circulatory residence of the *N*-glycoclusters in BALB/c nude mice, and these clusters **2a**, **2d**, and **2e** eventually accumulated mostly in the liver, presumably due to the interaction with asialoglycoprotein receptor (2a,28-30), and were also observed in the spleen after 4 h (Fig. 6A). As in the sialoglycoprotein case described in the previous section, these glycoclusters might also interact with Siglec 2 on B- or T-cells.

Additionally, an examination of these glycoclusters in cancer model (human colon carcinoma: DLD-1, implanted to the left femoral regions) was performed. Although these clusters did not target the tumor tissue, the excretion rates of the asialo-glycocluster **2b** was considerably suppressed in

いはマクロファージによるファゴサイトーシスによってクラスターが分解され、腎臓から排出されるのであろう。一方見方を変えると、Neu α (2-6)Gal 構造をもつクラスター **2a** ではシグレックファミリー (20)、すなわち ITIM 分子を介した免疫抑制機構が働き、血中内からの排出が回避されている可能性も考えられる。このように、生体内イメージングの手法を用いることにより、シアル酸のガラクトース残基への結合位置によっても、代謝過程が著しく異なることを初めて見出した。

さらに、上記で示した糖鎖クラスターに加えて、Neu α (2-6)Gal 結合、および Neu α (2-3)Gal 結合の両方を持つパイアンテナリー型糖鎖クラスター (16 分子クラスター) を蛍光イメージングに供した (図 6)。その結果、正常マウスでの代謝安定性には、(1) Neu α (2-6)Gal 結合を少なくとも 1 つ有することが必要であること、また (2) これら糖鎖クラスター **2a**、および **2d,e** は、大部分がアシアロ糖タンパク質受容体との相互作用によって肝臓に (2a, 28-30)、さらに 4 時間後には優位に脾臓に集積することを見出した (図 6A)。先のオロソムコイドの場合と同様に、B 細胞や T 細胞上でのシグレック 2 との相互作用の可能性を糖鎖クラスターを用いた研究でも観察することができた。

一方、同様にヒト結腸腺癌 DLD-1 を移植した癌モデルマウスに対してもこれら糖鎖クラスターの蛍光イメージングを実施した結果、いずれのデンドリマーにおいても癌への集積は観測されなかったが、正常マウスでは速やかに排出されたアシアロ型のデンドリマー **2b** の滞留性が向上した (図 6B)。

the cancer mice (Fig. 6B). Moreover, the accumulation of the glycoclusters **2a**, **2d**, and **2e**, which contain the Neu α (2-6)Gal moiety, was not detected in the spleen. Thus, the markedly different excretion observed from those in normal mice could make these *N*-glycoclusters applicable to a new class of the tumor diagnostic tracers.

E. Live Cell Surface Labeling and Imaging through Rapid Azaelectrocyclization, and Tumor Targeting in Living Animals Based on Chemistry-Based Cell Surface Engineering

Our azaelectrocyclization-based probe, STELLA⁺, can also fluorescently label a whole living cell (Fig. 7) (10). For instances, the C6 glioma cells could be efficiently labeled by treating with even 10⁻⁸ M PBS buffer solution of TAMRA-STELLA⁺ or Cy5-STELLA⁺ (**1c**, **d**) at either 24 °C or 37 °C only for two minutes. Similar to the protein-labeling cases, the azaelectrocyclization using such extremely diluted probe concentration, selectively proceeds at the highly expressed and hence the accessible amino groups on cell surface constituents, *i.e.*, lysines of membrane proteins and/or ethanol amine derivatives without the probe internalization, and therefore without interfering with their native functions. As exemplified by Bertozzi's and Boons' research, the live cell labeling is now actively investigated, *e.g.*, the methods utilize the Staudinger ligation (14) or the cell-friendly 1,3-cycloaddition under the copper-free conditions (15,16) with the azides on the cell surfaces (Fig. 2B). Nevertheless, these require in advance an expression of the azide functions on the cell surfaces by making use of the sugar metabolic pathway, that usually takes for a few days. Our STELLA⁺, on the other hands, is the only reaction-based probe, which can efficiently and directly anchor the labels on the cell surfaces through the bond-forming organic reaction at the target functional groups, *i.e.*, a

また、Neu α (2-6)Gal 結合を有する糖鎖クラスター **2a,d,e** の脾臓への集積が観測されなかった。このように、癌モデルマウスでは糖鎖の代謝が正常マウスとは全く異なることを見出し、著者らの糖鎖クラスターのイメージングトレーサーとしての可能性を示した。

E. 高速電子環状反応を経た細胞表面の標識と生細胞のイメージング、および化学的な細胞表面修飾による生きた動物内での癌のターゲティング

さらに著者らの標識プローブ、STELLA⁺を用いると、丸ごとの細胞を蛍光標識化することも可能となった(図7)(10)。例えば、Glioma C6細胞に対して、10⁻⁸ Mという極低濃度のTAMRA-STELLA⁺、およびCy5-STELLA⁺(**1c**, **d**)のリン酸緩衝溶液を24 °C、あるいは37 °Cでたった2分間作用させるだけで、細胞表面を標識することができた。タンパク質の標識の場合と同じように、このような薄い濃度のSTELLA⁺プローブ存在下では、細胞表面のリジン残基やホスファチジルエタノールアミン等の一級アミンが過剰に存在する部分のみで選択的に反応が進行する。また、標識試薬は細胞内に浸透せず、その結果細胞機能を阻害することはない。現在、BertozziやBoonsらの研究を代表例として、細胞表面上に導入したアジド基とのStaudinger反応(14)や銅イオン非存在下での「細胞に優しい」[2+3]環化反応を行って(15,16)、生細胞を蛍光標識する試みが盛んに検討されている(図2B)。しかし、彼女らの方法では、例えば糖の代謝過程を利用して、最初に数日かけて細胞表面にアジド基を導入しなければならない。著者らのSTELLA⁺は、細胞表面の特定官能基に対する結合形成反応を経る化学的標識化法の中で、このような温和な条件下、数分という短時間で直接的に標識基を共有結合できる唯一の有機

Fig. 7. Fluorescence labeling and engineering of living cells.

covalent bond formation, under extremely mild conditions for just a few minutes (9e).

Complex-type *N*-glycans and other functional molecules, such as biotin, could also be introduced on cell surfaces using the probes **1e** and **f** (chemistry-based cell surface engineering) (Fig. 7) (12); thus, the probes **1e** and **f**, which were prepared *in situ* through Staudinger ligation (14), were immobilized on cell surfaces through the azaelectrocyclization chemistry, by reacting with the live cells at 24 °C for 10–30 min. We have recently established the second-generation protocol as more efficient and general method, and the convenient cell surface engineering is now possible.

Based on the cell surface labeling and engineering established above, lymphocytes (1 mL, 1.0×10^5 cells) extracted from the abdominal cavity of the wild-type mice were labeled by Cy5-fluorescence (probe **1d**, Fig. 7), and the noninvasive fluorescence imaging was performed in the BALB/c nude mouse (Fig. 8A) (10). The dynamic images provided the marked results that the trafficking of the cells into the spleen and the lymph nodes as the secondary lymphoid organs, was clearly visualized with exceptionally high imaging contrasts compared with those reported previously (4,31); thus, the observation highlights our azaelectrocyclization-

合成反応プローブである (9e)。

さらに、同様にプローブ **1e,f** を用いることにより、細胞表層に対してビオチンや複合型 *N*-結合型糖タンパク質糖鎖を簡便に導入することも可能となった (化学的な細胞表層修飾) (図7)(12)。Staudinger 反応によって系内で調製した **1e** および **1f** を (14)、細胞に対して 10 ~ 30 分間室温で作用させることにより、アザ電子環状反応を経て細胞表面に低分子を結合させることができた。現在では、さらに効率的で汎用性のある第2世代の手法を開発しており、より簡便に細胞表層を化学修飾することが可能となっている。

そこで、これらの結果を基にして、野生型マウスから抽出したリンパ球 (1 mL, 1.0×10^5 cells) に対して、近赤外線領域付近の吸収を持つ Cy5 蛍光基で標識し (プローブ **1d**, 図7)、ヌードマウスに対する非侵襲的なインビボ蛍光イメージングを実施した (図8A)(10)。その結果、これまでに報告されている細胞のホーミングイメージング結果と比較して (4,31)、格段に高いコントラストで二次リンパ器官である脾臓や腸管膜リンパ節に集積することを可視化することに成功した。このように、著者らのアザ電子環状反応によって、体内での細胞の動きを容易に画像化することが可能となった (32)。

Fig. 8. Fluorescence imaging of lymphocytes in mice. Labeled and/or engineered cells were administrated intravenously ($n=3$, 100 $\mu\text{L}/\text{mouse}$, 10^4 cells) and whole body was scanned from the back side by eXplore Optix, GE Healthcare, Bioscience (excitation at 646 nm, emission 663 nm), 1h, 2h, 4h, 6h, 48h, 1 week after injection. Data were normalized. SP: spleen; LN; lymph node of epidermal intestinal tract; TM (tumor); DLD-1 human colon carcinoma. (A) Cy5-labeled cells to the nude mice. (B) Cy5-labeled cells to the DLD-1 implanted nude mice at dorsal division. (C) Cy5-labeled and *N*-glycan-engineered lymphocytes into the tumor model.

based labeling in applying to a whole cell-based *in vivo* imaging (32).

The fluorescence-labeled lymphocytes were then injected to the mouse of the cancer model, where the DLD-1 was implanted to the dorsal division of mouse; although they accumulated in the secondary lymphoid organs as those observed for the nude mice, no trafficking to the tumor tissues could be detected (Fig. 8B) (12). On the other hands, we made a remarkable observation when the *N*-glycan probe **1f** was introduced to the cell surface of the lymphocytes by using the procedures established in Fig. 7 (Fig. 9); namely, the chemically engineered cells still traffic to the secondary lymphoid organs, while they gradually began to accumulate into tumor region (TM) (Fig. 8C, Fig. 9). Although the imaging results in Fig. 8 cannot be explained on the biological basis by the currently available data in our hands, neither the native lymphocytes nor the complex-type *N*-glycan clusters traffic to the cancer regions on their own (Fig. 6B) (11). Therefore, the *N*-glycan-enriched lymphocytes might interact with the tumor via additional interaction with lectins on cancer cells. Alternatively, the interaction of Siglec and internal sialoglycans, responsible for the immunosuppressive signals (20), could be interrupted by the *N*-glycan externally introduced by the chemical engineering. Whatever the reasons are, the artificial cells, which could target the tumor in living animals, were efficiently prepared by applying the authors' chemical reaction (Fig. 9). Although the correlation between the glycans introduction on cell surfaces and the target efficiency, the tumor selectivity depending on the *N*-glycan structures, the position on the cell surfaces where the glycans are chemically introduced, and the metabolic analysis of the glycans *in vivo*, should be throughout investigated for future

一方、DLD-1 を移植した癌モデルマウスに対して、蛍光標識リンパ球のイメージングを行ったところ、二次リンパ器官へのホーミングは認められたものの、癌組織への移行は認められなかった(図8B)(12)。しかし、図7の手順に従って、*N*-結合型糖鎖 **1f** を化学的に細胞表層に導入したところ(図9)、化学的な表層修飾処理を行った細胞が二次リンパ器官へのホーミングに加えて、癌組織にも集積することが判明した(図8C、図9)。現在のデータからこの現象の原理を説明することはできないが、前節の糖鎖クラスター実験において *N*-結合型糖鎖は癌組織に集積しない結果を得ており(図6B)(11)、図8の結果は、*N*-結合型糖鎖とリンパ球表層の両者の機能が細胞表層上で協調的に働いた可能性がある。あるいは *N*-結合型糖鎖を多量に細胞表層に導入したことにより、リンパ球表層のシグレックに作用して、リンパ球の活性化が起こった可能性もある(20)。いずれにしても、有機合成化学的に複合型 *N*-型糖鎖を導入したリンパ球をトレーサーとして、癌組織をターゲティングすることに成功した(図9)。細胞上への *N*-結合型糖鎖の導入量とそのターゲティングの効率、*N*-結合型糖鎖の種類による癌細胞選択性、*N*-結合型糖鎖の導入位置の同定と生体内での導入糖鎖のプロセッシング等について、今後更に検討を加えなければならないが、著者らが独自に開発した電子環状反応を経る有機反応ツール、STELLA⁺を駆使して、有機合成化学分野と糖鎖生物分野から、癌組織ターゲティング

Fig. 9. New synthetic strategy of glycan-engineered artificial cells for tumor targeting in living animals.

applications, we believe that a new tumor targeting strategy of using the living cells was proposed from the fields of synthetic organic chemistry and glycobiology, through the authors' chemical tool, STELLA⁺.

F. Conclusion

We have described the noninvasive imaging of *N*-glycoproteins, *N*-glycoclusters, and *N*-glycan-engineered lymphocytes based on the authors' chemical bond-forming reaction, *i.e.*, rapid azaelectrocyclization. A new strategy for tumor targeting using the live cells was also proposed. Since the authors' azaelectrocyclization using the labeling kit, STELLA⁺ (9e), proceeds at the amino groups of the various biomolecules and the cell surfaces, it is quite rare and promising synthetic transformation, of which application is not restricted to the molecular imaging and the diagnosis fields, but is in more broader sense applicable to any kinds of chemical, biological and medical studies. These authors strongly hope that the STELLA⁺ could be more widely and generally utilized in future, thereby the imaging of the various biomolecules are more common to us.

In future, when performing the *in vivo* imaging of the glycans in pursuit of elucidating their dynamics and analyzing the *glyco-bioenvironment in vivo*, and further applying to diagnosis and even clinical trials, we need to efficiently synthesize and mimic the heterogeneous *glyco-bioenvironment*, consisting the various glycan structures and the other biomolecules on the cell surfaces (33). As described in Introduction, the various labels-containing liposomes or nanoparticles with the enhanced serum stability are recently developed. Heterogeneously immobilizing the glycans and the antibodies on their surfaces, the targeting of inflammations or tumors is actively investigated (8). Alternatively, heterogeneous clusters consisted of two different glycans on the dendrimer template, were recently developed and these showed for the first time the enhanced and/or the decreased reactivity towards antibodies, that are sensitively affected by the neighboring glycans in the heterogeneous structures (34). These results are in most of cases realized based on the advanced synthetic organic chemistry, *e.g.*, immobilizing the various glycans and/or biomolecules on the liposomes or particles, conjugating efficiently and selectively (for functional groups) the glycans on dendrimer templates, *etc.* Thus, the synthetic chemistry bears an important role for breakthrough in future glycan imaging studies; the *glyco-bioenvironment in vivo* could be efficiently constructed in a combinatorial fashion, by integrating the synthetic chemistry and the glycobiology.

Acknowledgments

The authors' research described in this minireview

の新しいストラテジーを提起できたものと考えている。

F. 結 論

以上、著者らの革新的結合形成反応を基盤とした *N*-型糖タンパク質、*N*-型糖鎖クラスター、および *N*-型糖鎖で修飾したリンパ球の非侵襲的イメージング、および癌の新規ターゲティング法を紹介した。著者らの高速電子環状反応、および標識キット STELLA⁺(9e) は、様々な生体高分子や細胞表層のアミノ基に対して 10⁻⁸M という低濃度でも進行するので、診断法への応用に限らず、生物学や基礎医学、さらには臨床医学に対しても幅広い適応範囲が見込める革新的な有機合成反応である。将来、この化学反応が大いに活用され、様々な生体高分子の簡便なイメージング実験を誰もが簡便に実施できる日が来ることを期待する。

今後、インビボで糖鎖のイメージングを実施し、生体内での糖鎖のダイナミクス、および糖鎖が携わる生体分子社会を解析し、さらにこれを診断や医療へと展開する研究において、細胞表層上の様々な糖鎖群、または糖鎖と他の生体分子群によって構成される“不均一な糖鎖生体分子社会”を如何にして効率的かつ自由自在に模倣できるかが鍵となろう (33)。冒頭で述べたように、最近では様々な血中内滞留性を向上させた標識基内包型のリボソームやナノ粒子が開発され、さらにその表層に様々な糖鎖や抗体を不均一に導入することによってマウスでの炎症や癌のターゲッティングが盛んに検討されている (8)。一方、デンドリマー上に2種類の複合型糖鎖を不均一に導入することにより、1種類の糖鎖構造を用いるよりも、不均一構造中の周りの局所糖鎖構造に影響を受け、抗体への相互作用が著しく向上したり、逆に低下するという例も報告されている (34)。何れのケースにおいても、リボソームや粒子表面に対する糖鎖や生体分子の簡便な担持方法、あるいはデンドリマー上への効率的かつ官能基選択的な導入反応の開発によってこれらの研究成果が得られており、最新の化学がこれら糖鎖の生体内イメージングの発展や機能解析へのブレークスルーにおいて重要な役割を担っている。生物学と化学による分野融合により生体内での糖鎖の生体分子社会が効率的に構築され、インビボでの糖鎖イメージング研究が大いに発展することが期待される。

謝 辞

本稿で紹介した著者らの研究は、大阪大学大学院理学研究科において中心に実施されました。PET イメージング実験は理研分子イメージング科学研究センター・渡辺恭良教授

was performed mainly in Department of Chemistry, Osaka University. The authors acknowledge Professor Yasuyoshi Watanabe at RIKEN, Japan, for directing the molecular imaging research. The authors thank Professor James C. Paulson and Dr. Weihsu C. Chen, The Scripps Research Institute for cell-based assay for the glycoclusters. We also thank Otsuka Chemical Co., Ltd. for supplying *N*-glycans. We acknowledge Mr. Koichi Koyama, Kishida Chemical Co., Ltd. for *in vivo* fluorescence imaging as well as developing the labeling kit, STELLA⁺. The work cited in this review were in part financially supported by Grants-in-Aid for Scientific Research from the Japan Society for the Promotion of Science, Grant-in-Aid for Science Research on Innovative Areas from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology (MEXT), New Energy and Industrial Technology Development Organization (NEDO, Financial support to young researchers), The Naito Foundation Subsidy for Promotion of Specific Research Projects, NOVARTIS Research Grants, Kaneko-Narita Research Grant from Protein Research Foundation, Esai Award in Synthetic Organic Chemistry, Japan, Collaborative Development of Innovative Seeds from Japan Science and Technology Agency (JST), Research Grants from The Mitsubishi Foundation, Research Grants from Yamada Science Foundation, Molecular Imaging Research Program from MEXT, and Osaka University Global COE Program (“Global Education and Research Center for Bio-Environmental Chemistry”).

References

1. Kamerling, J. P., Boons, G.-J., Lee, Y. C., Suzuki A., Taniguchi N., and Voragen A. G. J., eds. (2007) Analysis of Glycans, Polysaccharide Functional Properties & *Biochemistry* of Glycoconjugate Glycans, Carbohydrate-mediated Interactions: Comprehensive Glycoscience. From Chemistry to Systems Biology. Elsevier, UK. Vol II & III.
2. a) Morell, A. G., Irvine, R. A., Sternlieb, I., Scheinberg, I. H., and Ashwell, G. (1968) *J. Biol. Chem.* **243**, 155–159. b) Elliott, S., Lorenzini, T., Asher, S., Aoki, K., Brankow, D., Buck, L., Busse, L., Chang, D., Fuller, J., Grant, J., Hernday, N., Hokum, M., Hu, S., Knudten, A., Levin, N., Komorowski, R., Martin, F., Navarro, R., Osslund, T., Rogers, G., Rogers, N., Trail, and G., Egrie, J. (2003) *Nat. Biotechnol.* **21**, 414–421. c) Sato, M., Furuie, T., Sadamoto, R., Fujitani, N., Nakahara, T., Niikura, K., Monde, K., Kondo, H., and Nishimura, S. I. (2004) *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 14013–14022.
3. a) Suzuki, M., Noyori, R., Langstom, B., and Watanabe, Y. (2000) *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **73**, 1053–1070. b) Hosoya, T., Sumi, K., Doi, H., Wakao, M., and Suzuki, M. (2006) *Org. Biomol. Chem.* **4**, 410–415.
4. a) Tanaka, K., and Fukase, K. (2008) *Org. Biomol. Chem.* **6**, 815–828. b) Tanaka, K., and Fukase, K. (2008) *Mini-Rev. Org. Chem.* **5**, 153–162.
5. a) Ido, T., Wan, C. N., Cassela, V., Fowler, J. S., and Wolf, A. P. (1978) *J. Label. Compds. Radiopharm.* **14**, 175–183. b) Gambhir, S. S. (2002) *Nat. Rev. Cancer* **2**, 683–693.
6. Tanaka, K., Fujii, Y., Tokimoto, H., Mori, Y., Tanaka, S., Bao, G.-m., Siwu, E. R. O., Nakayabu, A., and Fukase, K. (2009) *Chem. Asian J.* **4**, 574–580, and references cited therein.
7. a) Vyas, S. P., Singh, A., and Sihorkar, V. (2001) *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* **18**, 1–76. b) Willis, M., and Forssen, E. (1998) *Adv. Drug Deliv. Rev.* **29**, 249–271.
8. Representative examples of noninvasive imaging and biodistribution experiments, see: a) Andre, S., Unverzagt, C., Kojima, S., Dong, X., Fink, C., Kayser, K., and Gabius, H.-J. (1997) *Bioconjugate Chem.* **8**, 845–855. b) Andre, S., Unverzagt, C., Kojima, S., Frank, M., Seifert, J., Fink, C., Kayser, K., von der Lieth, C.-W., and Gabius, H.-J. (2004) *Eur. J. Biochem.* **271**, 118–134. c) Andre, S., Kojima, S., Prah, I., Lensch, M., Unverzagt, C., and Gabius, H.-J. (2005) *FEBS J.* **272**, 1986–1998. d) Andre, S., Kojima, S., Gundel, G., Russwurm, R., Schrott, X., Unverzagt, C., and Gabius, H.-J. (2006) *Biochim. Biophys. Acta* **1760**, 768–782. e) Ikehara, Y., Niwa, T., Biao, L., Ikehara, S. K., Hohashi, N., Kobayashi, T., Shimizu, Y., Kojima, N., and Nakanishi, H. (2006) *Cancer Res.* **66**, 8740. f) Andre, S., Kozar, T., Schuberth, R., Unverzagt, C., Kojima, S., and Gabius, H.-J. (2007) *Biochemistry* **46**, 6984–6995. g) Andre, S., Kozar, T., Kojima, S., Unverzagt, C., and Gabius, H.-J. (2009) *Biol. Chem.* **390**, 557–565. h) Pimm, M. V., Perkins, A. C., Strohm, J., Ulbrich, K., and Duncan, R. (1996) *J. Drug Targeting* **3**, 385–390. i) Prata, M. I. M., Santos, A. C., Torres, S., Andre, J. P., Martins, J. A., Neves, M., Garcia-Martin, M. L., Rodrigues, T. B., Lopez-Larrubia, P., Cerdan, S., and Gerald, C. F. G. C. (2006) *Contrast Media Mol. Imaging* **1**, 246–258. j) Hirai, M., Minematsu, H., Kondo, N., Oie, K., Igarashi, K., and Yamazaki, N. (2007) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **353**, 553–558. k) Chen, W. C., Completo,

のご指導により得られた成果であります。糖鎖クラスターは、米国スクリプス研究所の James C. Paulson 教授および Weihsu C. Chen 博士との共同研究によって実施されました。また、本イメージング研究で使用した *N*-型糖鎖は大塚化学株式会社にご供与頂きました。さらに、蛍光イメージング、ならびに電子環状反応のキット化に関する研究では、(株)キシダ化学・小山幸一氏にご尽力頂きました。この場をお借りして、文献記載の共同研究者の皆様に深く感謝申し上げます。本研究は、日本学術振興会、文部科学省科学研究費、NEDO 若手支援研究、内藤記念特定研究助成金、ノバルティス研究奨励金、蛋白質研究奨励会 金子・成田研究奨励金、有機合成化学協会 エーザイ研究企画賞、JST 産学共同シーズイノベーション事業 顕在化ステージ、三菱財団研究助成、山田科学振興財団、文部科学省分子イメージング研究プログラム委託事業、大阪大学 G-COE プログラムからご支援を受けて遂行したものであり、ここに感謝いたします。

- G. C., and Paulson, J. C. (2008) *Glycobiology* **18**, 963–963. l) Laughlin, S. T., Baskin, J. M., Amacher, S. L., and Bertozzi, C. R. (2008) *Science* **320**, 664–667. m) Serres, S., Anthony, D. C., Jiang, Y., Broom, K. A., Campbell, S. J., Tyler, D. J., van Kasteren, S. I., Davis, B. G., and Sibson, N. R. (2009) *J. Neurosci.* **29**, 4820–4828. n) van Kasteren, S. I., Campbell, S. J., Serres, S., Anthony, D. C., Sibson, N. R., and Davis, B. G. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 18–23. o) Kikkeri, R., Iepenes, B., Adibekian, A., Laurino, P., and Seeberger, P. H. (2009) *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 2110–2112. p) Contessa, J. N., Bhojani, M. S., Freeze, H. H., Ross, B. D., Rehemtulla, A., and Laerence, T. S. (2010) *Clin. Cancer Res.* **16**, 3205–3215. q) Ning, X., Lee, S., Wang, Z., Kim, D., Stubbefeld, B., Gilbert, E., and Murthy, N. (2011) *Nat. Mater.* **10**, 602–607.
9. a) Tanaka, K., Masuyama, T., Hasegawa, K., Tahara, T., Mizuma, H., Wada, Y., Watanabe, Y., and Fukase, K. (2008) *Angew. Chem. Int. Ed.* **47**, 102–105. b) Tanaka, K., Masuyama, T., Minami, K., Fujii, Y., Hasegawa, K., Tahara, T., Mizuma, H., Wada, Y., Watanabe, Y., and Fukase, K. (2008) in *Peptide Science 2007* (Aimoto, S., and Ono, S., eds.), pp. 91–94, Japanese Peptide Society, Osaka. c) Tanaka, K., Fujii, Y., and Fukase, K. (2008) *ChemBioChem* **9**, 2392–2397. d) Tanaka, K., Kitadani, M., and Fukase, K., (2011) *Org. Biomol. Chem.* **9**, 5346–5349. e) Lysine Labeling & engineering kit “STELLA™” from Kishida Chemical Co., Ltd., <http://www.kishida.co.jp/>.
10. Tanaka, K., Minami, K., Tahara, T., Fujii, Y., Siwu, E. R. O., Nozaki, S., Onoe, H., Yokoi, S., Koyama, K., Watanabe, Y., and Fukase, K. (2010) *ChemMedChem* **5**, 841–845.
11. Tanaka, K., Siwu, E. R. O., Minami, K., Hasegawa, K., Nozaki, S., Kanayama, Y., Koyama, K., Chen, W. C., Paulson, J. C., Watanabe, Y., and Fukase, K. (2010) *Angew. Chem. Int. Ed.* **49**, 8195–8200.
12. Tanaka, K., Minami, K., Tahara, T., Siwu, E. R. O., Koyama, K., Nozaki, S., Onoe, H., Watanabe, Y., and Fukase, K. (2010) *J. Carbohydr. Chem.* **29**, 118–132.
13. For selected examples of protein labeling, see: a) Wang, Q., Chan, T. R., Hilgraf, R., Fokin, V. V., Sharpless, K. B., and Finn, M. G. (2003) *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 3192–3193. b) Speers, A. E., Adam, G. C., and Cravatt, B. F. (2003) *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 4686–4687. c) Link, A. J., and Tirrell, D. A. (2003) *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 11164–11165. d) Chin, J. W., Cropp, T. A., Anderson, J. C., Mukherji, M., Zhang, Z. W., and Schultz, P. G. (2003) *Science* **301**, 964–967. e) Deiters, A. D., Cropp, T. A., Mukherji, M., Chin, J. M., Anderson, J. C., and Schultz, P. G. (2003) *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 11782–11783. f) Kho, Y., Kim, S. C., Barma, J. D., Kwon, S. W., Cheng, J. K., Jaunbergs, J., Weinbaum, C., Tamanori, F., Falck, J., and Zhao, Y. M. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 12479–12484. g) Speers, A. E., and Cravatt, B. F. (2004) *Chem. Biol.* **11**, 535–546. h) Zhan, W.-h., Barnhill, H. N., Sivakumar, K., Tian, H., and Wang, Q. (2005) *Tetrahedron Lett.* **46**, 1691–1695. i) Gierlich, J., Burley, G. A., Gramlich, P. M. E., Hammond, D. M., and Carell, T. (2006) *Org. Lett.* **8**, 3639–3642. j) Link, A. J., Vink, M. K. S., Agard, N. J., Prescher, J. A., Bertozzi, C. R., and Tirrell, D. A. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 10180–10185. k) Yamaguchi, M., Kojima, K., Hayashi, N., Kakizaki, I., Kon, A., and Takagaki, K. (2006) *Tetrahedron Lett.* **47**, 7455–7458. l) Lin, P.-C., Ueng, S.-H., Yu, S.-C., Jan, M.-D., Adak, A. K., Yu, C.-C., and Lin, C.-C. (2007) *Org. Lett.* **9**, 2131–2134. m) van Kasteren, S. I., Kramer, H. B., Jensen, H. H., Campbell, S. J., Kirkpatrick, J., Oldham, N. J., Anthony, D. C., and Davis, B. G. (2007) *Nature* **446**, 1105–1109. n) Lin, Y. A., Chalker, J. M., Floyd, N., Bernardes, G. J. L., and Davis, B. G. (2008) *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 9642–9643. o) Becker, C. F. W., Liu, X., Olschewski, D., Castelli, R., Seidel, R., and Seeberger, P. H. (2008) *Angew. Chem. Int. Ed.* **43**, 8215–8219. p) Song, W., Wang, Y., Qu, J., and Lin, Q. (2008) *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 9654–9655. q) Chang, P. V., Chen, X., Smyrniotis, C., Xenakis, A., Hu, T., Bertozzi, C. R., and Wu, P. (2009) *Angew. Chem. Int. Ed.* **48**, 4030–4033.
14. a) Saxon, E., and Bertozzi, C. R. (2000) *Science* **287**, 2007–2010. b) Kiick, K. L., Saxon, E., Tirrell, D. A., and Bertozzi, C. R. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 19–24. c) Vocadlo, D. J., Hang, H. C., Kim, E. J., Hanover, J. A., and Bertozzi, C. R. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 9116–9121. d) Chang, P. V., Prescher, J. A., Hangauer, M. J., and Bertozzi, C. R. (2007) *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 8400–8401.
15. a) Baskin, J. M., Prescher, J. A., Laughlin, S. T., Agard, N. J., Chang, P. V., Miller, I. A., Lo, A., Modelli, J. A., and Bertozzi, C. R. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**, 16793–16797. b) Codelli, J. A., Baskin, J. M., Agard, N. J., and Bertozzi, C. R. (2008) *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 11486–11493. c) Laughlin, S. T., Baskin, J. M., Amacher, S. L., and Bertozzi, C. R. (2008) *Science* **320**, 664–667. d) Sletten, E. M., and Bertozzi, C. R. (2010) *Acc. Chem. Res.* **33**, 666–676.
16. Ning, X., Guo, J., Wolfert, M. A., and Boons, G.-J. (2008) *Angew. Chem. Int. Ed.* **47**, 2253–2255.
17. Representative bioorthogonal reaction, see: a) van Berkel, S. S., Dirks, A. T., Meeuwissen, S. A., Pinggen, D. L., Boerman, O. C., Laverman, P., van Delft, F. L., Cornelissen, J. J., and Rutjes, F. P. (2008) *ChemBioChem* **9**, 1805–1815. b) Devaraj, N. K., Weissleder, R., and Hilderbrand, S. A. (2008) *Bioconjugate Chem.* **19**, 2297–2299. c) Gutsmedl, K., Wirges, C. T., Ehmke, V., and Carell, T. (2009) *Org. Lett.* **49**, 2405–2408. d) Ning, X., Temming, R. P., Dommerholt, J., Guo, J., Ania, D. B., Debets, M. F., Wolfert, M. A., Boons, G.-J., and van Delft, F. L. (2010) *Angew. Chem. Int. Ed.* **49**, 3065–3068. e) Stöckmann, H., Neves, A. A., Stairs, S., Brindle, K. M., and Leeper, F. J. (2011) *Org. Biomol. Chem.* **9**, 7303–7305. f) Bertozzi, C. R. (2011) *Acc. Chem. Res.* **9**, 651–653.
18. a) Tanaka, K., Kamatani, M., Mori, H., Fujii, S., Ikeda, K., Hisada, M., Itagaki, Y., and Katsumura, S. (1998) *Tetrahedron Lett.* **39**, 1185–1188. b) Tanaka, K., Kamatani, M., Mori, H., Fujii, S., Ikeda, K., Hisada, M., Itagaki, Y., and Katsumura, S. (1999) *Tetrahedron* **55**, 1657–1686. c) Tanaka, K., and Katsumura, S. (2000) *Org. Lett.* **2**, 373–375. d) Tanaka, K., Mori, H., Yamamoto, M., and Katsumura, S. (2001) *J. Org. Chem.* **66**, 3099. e) Tanaka, K., and Katsumura, S. (2002) *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 9660. f) Tanaka, K., Kobayashi, T., Mori, H., and Katsumura, S. (2004) *J. Org. Chem.* **69**, 5906. g) Kobayashi, T., Nakashima, M., Hakogi, T., Tanaka, K., and Katsumura, S. (2006) *Org. Lett.* **8**, 3809–3812. h) Kobayashi, T., Hasegawa, F., Tanaka, K., and Katsumura, S. (2006) *Org. Lett.* **8**, 3813–3816. i) Sakaguchi, T., Kobayashi, T., Hatano, S., Tsuchikawa, H., Fukase, K., Tanaka, K., and Katsumura, S. (2009) *Chem. Asian J.* **4**, 1573–1577. j) Tanaka, K., Fukase, K., and Katsumura, S. (2010) *Chem. Rec.* **10**, 119–139. k) Tanaka, K., Fukase, K., and Katsumura, S. (2011) *Synlett* 2115–2139. l) Tanaka, K. (2011) *J. Synth. Chem. Jpn.* **69**, 1389–1401.
19. Maecke, H. R., Hofmann, M., and Haberkorn, U. (2005) *J. Nucl. Med.* **46**, 172S–178S.
20. a) Crocker, P. R., and Varki, A. (2001) *Immunology* **103**, 137–145. b) Crocker, P. R., and Varki, A. (2001) *Trends Immunol.* **22**, 337–342. c) Angata, T. (2006) *Mol. Divers.* **10**, 555–566. d) Varki, A., and Angata, T. (2006) *Glycobiology* **16**, 1R–27R.
21. a) Cyster, J. G., and Goodnow, C. C. (1997) *Immunity* **6**, 509–517. b) Collins, B. E., Blixt, O., DeSieno, A. R., Bovin, N., Marth, J. D., and Paulson, J. C. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 6104–6109. c) Crocker, P. R., Paulson, J. C., and Varki, A. (2007) *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 255–266.
22. a) Manning, D. D., Hu, X., Beck, P., and Kiessling, L. L. (1997) *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 3161–3162. b) Reuter, J. D., Myc, A., Hayes, M. M., Gan, Z., Roy, R., Qin, D., Yin, R., Piehler, L. T., Esfand, R., Tomalia, D. A., and Baker Jr, J. R. (1999) *Bioconjugate Chem.* **10**, 271–278. c)

- Andre, S., Kaltner, H., Furuike, T., Nishimura, S.-I., and Gabius, H.-J. (2004) *Bioconjugate Chem.* **15**, 87–98. d) Ladmiral, V., Mantovani, G., Clarkson, G. J., Cauet, S., Irwin, J. L., and Haddleton, D. M. (2006) *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 4823–4830. e) Carlson, C. B., Mowery, P., Owen, R. M., Dykhuizen, E. C., and Kiessling, L. L. (2007) *ACS Chemical Biol.* **2**, 119–127. f) Wolfenden, M. L., and Cloninger, M. J. (2006) *Bioconjugate Chem.* **17**, 958–966. g) Kim, J., Ahn, Y., Park, K. M., Kim, Y., Ko, Y. H., Oh, D. H., and Kim, K. (2007) *Angew. Chem. Int. Ed.* **46**, 7393–7395. h) Lee, M. J., Pal, K., Tasaki, T., Roy, S., Jiang, Y., An, J. Y., Banerjee, R., and Kwon, Y. T. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 100–105.
23. Representative reviews for glycodendrimers and clusters: a) Roy, R., and Beak, M.-G. (2002) *Rev. Mol. Biotechnol.* **90**, 291–309. b) Leeuwenburgh, M. A., van der Marel, G. A., and Overkleeft, H. S. (2003) *Curr. Opin. Chem. Biol.* **7**, 757–765. c) Renaudet, O. (2008) *Mini-Rev. Org. Chem.* **5**, 274–286. d) Chabre, Y. M., and Roy, R. (2008) *Curr. Top. Med. Chem.* **8**, 1237–1285. e) Chabre, Y. M., and Roy, R. (2010) in *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*. Elsevier, UK. Vol 63, pp165–393.
24. Kind gifts from Otsuka Chemical Co., Ltd., <http://tansaku.otsukac.co.jp/en/oligo04.html>. These structurally pure *N*-glycans were isolated from egg yolk according to the procedure developed by Kajihara and co-workers: Kajihara, Y., Suzuki, Y., Yamamoto, N., Sasaki, K., Sakakibara, T., and Juneja, L. R. (2004) *Chem. Eur. J.* **10**, 971–985.
25. Tanaka, K., Kageyama, C., and Fukase, K. (2007) *Tetrahedron Lett.* **48**, 6475–6479.
26. a) Haraldsson, B., Nyström, J., and Deen, W. M. (2008) *Physiol. Rev.* **88**, 451–487. b) Edwards, A., Daniels, B. S., and Deen, W. M. (1999) *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **276**, F892–F902.
27. Wyatt, A. R., Yerbury, J. J., Poon, S., and Wilson, M. R. (2009) *Curr. Med. Chem.* **16**, 2855–2866.
28. Tozawa, R., Ishibashi, S., Osuga, J., Yamamoto, K., Yagyu, H., Ohashi, K., Tamura, Y., Yahagi, N., Iizuka, Y., Okazaki, H., Harada, K., Gotoda, T., Shimano, H., Kimura, S., Nagai, R., and Yamada, N. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 12624–12628.
29. a) Unverzagt, C., Andre, S., Seifert, J., Kojima, S., Fink, C., Srikrishna, G., Freeze, H., Kayser, K., and Gabius, H.-J. (2002) *J. Med. Chem.* **45**, 478–491. b) Park, E. I., Mi, Y., Unverzagt, C., Gabius, H.-J., and Baenziger, J. U. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 17125–17129.
30. Lee, Y. C., Townsend, R. R., Hardy, M. R., Lonngren, J., Arnarp, J., Haraldsson, M., and Lonn, H. (1983) *J. Biol. Chem.* **258**, 199–202.
31. a) Matsui, K., Wang, Z., McCarthy, T. J., Allen, P. M., and Reichert, D. E. (2004) *Nucl. Med. Biol.* **31**, 1021–1031. b) Radu, C. G., Shu, C. J., Nair-Gill, E., Shelly, S. M., Barrio, J. R., Satyamurthy, N., Phelps, M. E., and Witte, O. N. (2008) *Nat. Med.* **14**, 783–788.
32. For leading examples of MRI using the whole cells, see: a) Yeh, T.-C., Zhang, W., Ildstad, S. T., and Ho, C. (1993) *Magn. Reson. Med.* **30**, 617–625. b) Bulte, J. W. M., Duncan, I. D., and Frank, J. A. J. (2002) *Cereb. Blood Flow Metab.* **22**, 899–907. c) Hoehn, M., Kustermann, E., Blunk, J., Wiedermann, D., Trapp, T., Wecker, S., Focking, M., Arnold, H., Hescheler, J., Fleischmann, B. K., Schwindt, W., and Buhrle, C. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 16267–16272. d) Toyoda, K.-I., Tooyama, I., Kato, M., Sato, H., Morikawa, S., Hisa, Y., and Inubushi, T. (2004) *NeuroReport* **15**, 589–593.
33. For examples, see: a) Sadamoto, R., Matsubayashi, T., Shimizu, M., Ueda, T., Koshida, S., Koda, T., and Nishimura, S.-I. (2008) *Chem. Eur. J.* **14**, 10192–10195. b) Sadamoto, R. (2005) *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **17**, 97–105. c) Sadamoto, R., Niikura, K., Sears, P. S., Liu, H., Wong, C.-H., Suksomcheep, A., Tomita, F., Monde, K., and Nishimura, S.-I. (2002) *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 9018–9019. d) Wilson, J. T., Krishnamurthy, V. R., Cui, W., Qu, Z., and Chaikof, E. L. (2009) *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 18228–18229. e) Rabuka, D., Forstner, M. B., Groves, J. T., and Bertozzi, C. R. (2008) *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 5947–5953. Other examples for chemistry-based cell surface engineering, see: f) Dutta, D., Pulsipher, A., Luo, W., and Yousaf, M. N. (2011) *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 8704–8713.
34. Liang, C.-H., Wang, S.-K., Lin, C.-W., Wang, C.-C., Wong, C.-H., and Wu, C.-Y. (2011) *Angew. Chem. Int. Ed.* **123**, 1646–1650.

Profile of the Authors

Katsunori Tanaka received his BS (1996) and Ph.D. (2002) from Kwansei Gakuin University in Japan under the direction of Professor Shigeo Katsumura. After a post-doc with Professors Koji Nakanishi and Nina Berova at Columbia University, New York (2002–2005), he joined Professor Koichi Fukase's group at Osaka University as an Assistant Professor (2005–2012). He started his own research group in April, 2012 in Riken, Advanced Science Institute as an Associate Chief Scientist. His research interests include exploring new methods for total synthesis, configurational analysis, biological evaluation, molecular imaging, and molecular recognition of natural products, especially the glycoconjugates and alkaloids.

Koichi Fukase received his Ph.D. in 1987 from the Department of Chemistry, Graduate School of Science, Osaka University under the direction of Prof. Tetsuo Shiba, and continued his research as a postdoctoral fellow in the same group. Then he became a Research Associate (1988–1996) at the Department of Chemistry, Faculty of Science, Osaka University (Prof. Shoichi Kusumoto). From 1994 to 1995, he joined the group of Prof. W. Clark Still at Columbia University as a postdoctoral fellow. He was promoted to Assistant Professor (1996), Associate Professor (1998) (Prof. Shoichi Kusumoto), and became a full Professor in 2004. Research projects within his group focus on 1) chemistry in innate immunity, 2) efficient and selective methods for glycosylation and oligosaccharide synthesis, 3) new labeling methods for PET imaging, and 4) combinatorial chemistry, solid-phase synthesis, and high-throughput synthesis using affinity separation.