

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	生体直交型反応を用いた体内での糖鎖クラスター構造変換と動態制御法の開発
Title(English)	
著者(和文)	山田健士郎
Author(English)	Kenshiro Yamada
出典(和文)	学位:博士(工学), 学位授与機関:東京科学大学, 報告番号:甲第306号, 授与年月日:2025年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:田中 克典,大河内 美奈,芹澤 武,中村 浩之,伊藤 繁和,田中 浩士
Citation(English)	Degree:Doctor (Engineering), Conferring organization: Institute of Science Tokyo, Report number:甲第306号, Conferred date:2025/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

生体直交型反応を用いた
体内での糖鎖クラスター構造変換と
動態制御法の開発

2025年1月

物質理工学院応用化学系応用化学科
田中克典研究室

山田健士郎
Kenshiro Yamada

略語

Ac Acetyl アセチル

ADC Antibody-drug conjugate 抗体薬物複合体

ASGPR Asialoglycoprotein receptor アシアロ糖タンパク質受容体

Ar Aryl アリール

Boc tert-butoxy carbonyl tert-ブトキシカルボニル基

CD シクロデキストリン

DCM dichloromethane ジクロロメタン

DBU dizabicycloundecene ジアザビシクロウンデセン

DBCO Dibenzocyclooctene ジベンゾシクロオクチン

DIFO difluorocyclooctyne ジフルオロシクロオクチン

DIPEA Diisopropylamine ジイソプロピルアミン

DMSO Dimethyl sulfoxide ジメチルスルホキシド

DMF Dimethyl formamide ジメチルホルムアミド

ESI Electron spray ionization エレクトロスプレーイオン化

Et Ethyl エチル

Fuc Fucose フコース

Gal Galactose ガラクトース

Glc Glucose グルコース

HPLC High performance liquid chromatography 高速液体クロマトグラフ

Ph Phenyl フェニル

HATU 1-[Bis(dimethylamino)methylene]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridinium3-Oxide 1-[ビス(ジメチルアミノ)メチレン]-1H-1,2,3-トリアゾロ[4,5-b]ピリジニウム 3-オキシドヘキサフルオロホスファート

HSA Human serum albumin ヒト血清アルブミン

IEEDA Inverse electron-demand Diels-Alder 逆電子要請型ディールズアルダー反応

LDA Lithium diisopropyl amine リチウムジイソプロピルアミン

MALDI Matrix assisted laser desorption ionization マトリックス支援レーザー脱理イオン化

Man Mannose マンノース

Me Methyl メチル

MS Mass Spectrometry 質量分析法

NMR Nuclear magnetic resonance 核磁場共鳴分析

Sia Sialic acid シアリル酸

SE Succinimidyl ester スクシンイミジルエステル

SPAAC Strain-promoted azide-alkyne cyclization 歪み解消アジドアルキンクリック反応

SPECT Single Photon Emission Computed Tomography 単一フォトン放射断層撮影装置

TAMRA tetramethylrhodamine テトラメチルローダミン

TCO *trans*-cylcooctene トランスシクロオクテン

TFA Trifluoro acetic acid トリフルオロ酢酸

TLC Thin-layer chromatography 薄層クロマトグラフィー

Tz Tetrazine テトラジン

目次

序論

第一節 糖鎖パターン認識を利用した標的化技術の開発

1-1 生体内での糖鎖認識機構	1
1-2 糖鎖クラスターによる多価相互作用	5
1-3 不均一な糖鎖クラスターによる選択的な相互作用	11
1-4 糖鎖アルブミン分子による糖鎖パターン認識の実証	14
第二節 細胞・動物系で使用可能な生体内合成化学反応の概観	21
第三節 本研究の目的	27
第四節 本論文の概要	29

第一章 生体直交性基を導入した糖鎖アルブミンの設計・合成および反応性の評価

第一節 糖鎖アルブミンの体内移動戦略の概要	31
第二節 <i>trans</i> -シクロオクテンを有する糖鎖アルブミンの合成・評価	
2-1. <i>trans</i> -シクロオクテン含有糖鎖修飾プローブの設計	33
2-2. <i>trans</i> -シクロオクテン含有糖鎖修飾プローブの合成	36
2-3. ガラクトシル化糖鎖テトラジン化合物の設計	43
2-4. 理研クリック反応によるアルブミンの糖鎖修飾	45
第三節 糖鎖付け替え反応の検討	
3-1. フラスコ中での糖鎖付け替え反応	48
3-2. モデル小分子を用いた糖鎖付け替え反応の速度論的な調査	50
3-3. マウス血液を反応溶媒に用いた糖鎖付け替え反応	57
第四節 結論	61

第二章 生体条件下での糖鎖付け替えと体内移動の検討

第一節 細胞系中での糖鎖付け替え反応の検討	
1-1. HepG2 がん細胞系中での糖鎖付け替え反応	62
1-2. SW620 がん細胞系中での糖鎖付け替え反応	67
第二節 動物体内での糖鎖付け替え反応の検討	
2-1. マウス体内の血中での糖鎖付け替え反応	71
2-2. 腫瘍組織内での糖鎖付け替え反応	78
第三節 結論	80

総括	81
----	----

Experimental Section	82
-----------------------------	----

参考文献	161
------	-----

謝辞	168
----	-----

序論

第一節 糖鎖パターン認識を利用した標的化技術の開発

1-1. 生体内での糖鎖認識機構

糖鎖は単糖がグリコシド結合によって鎖状に連なった化合物の総称であり、ほぼ全ての生物の組織・細胞が持つ生体分子である。生体内では主に、タンパク質や脂質と結合することで複合糖質として存在しており、糖タンパク質・糖脂質・プロテオグリカンなどがその代表である。哺乳類に見られる糖鎖について、これを構成する代表的な単糖構造は10種類以下に限られており、**Figure 1** にまとめた。例えばグルコース (Glu)・ガラクトース (Gal)・マンノース (Man) は水酸基の立体配置のみが異なるように、その基本構造にはわずかな違いしかない。しかし、これらの単糖構造が組み合わさって連結した糖鎖においては、単糖同士の結合位置・結合様式・分岐構造などに由来した莫大な多様性が生み出される。この多様性に由来して糖鎖は、核酸やタンパク質に続く第三の生命鎖と呼ばれている。

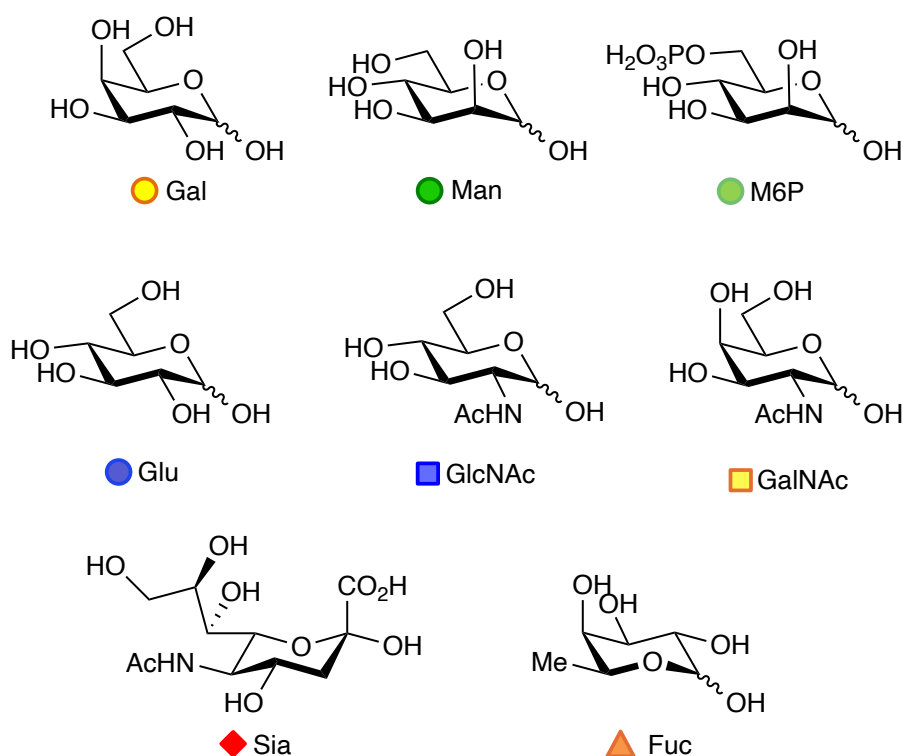


Figure 1. 哺乳類の糖鎖を構成する代表的な単糖と複合糖質の構造

Gal:ガラクトース, Man:マンノース, M6P:マンノース 6 リン酸, Glu:グルコース,
GlcNAc:N-アセチルグルコース, GalNAc:N-アセチルガラクトース, Sia:シアリル酸,
Fuc:フコース

特に、細胞表面においては多種多様な構造の糖鎖が存在しており、構成糖鎖の構造や数、配置などを含めた糖鎖修飾パターンは細胞に固有であることから、糖鎖は細胞の顔とも呼ばれる。実際に細胞表面では、様々な複合糖質が同時に発現して糖鎖クラスターを形成し、細胞の種類や状態を反映して異なる糖鎖パターンを示す^{ref1} (Figure 2)。

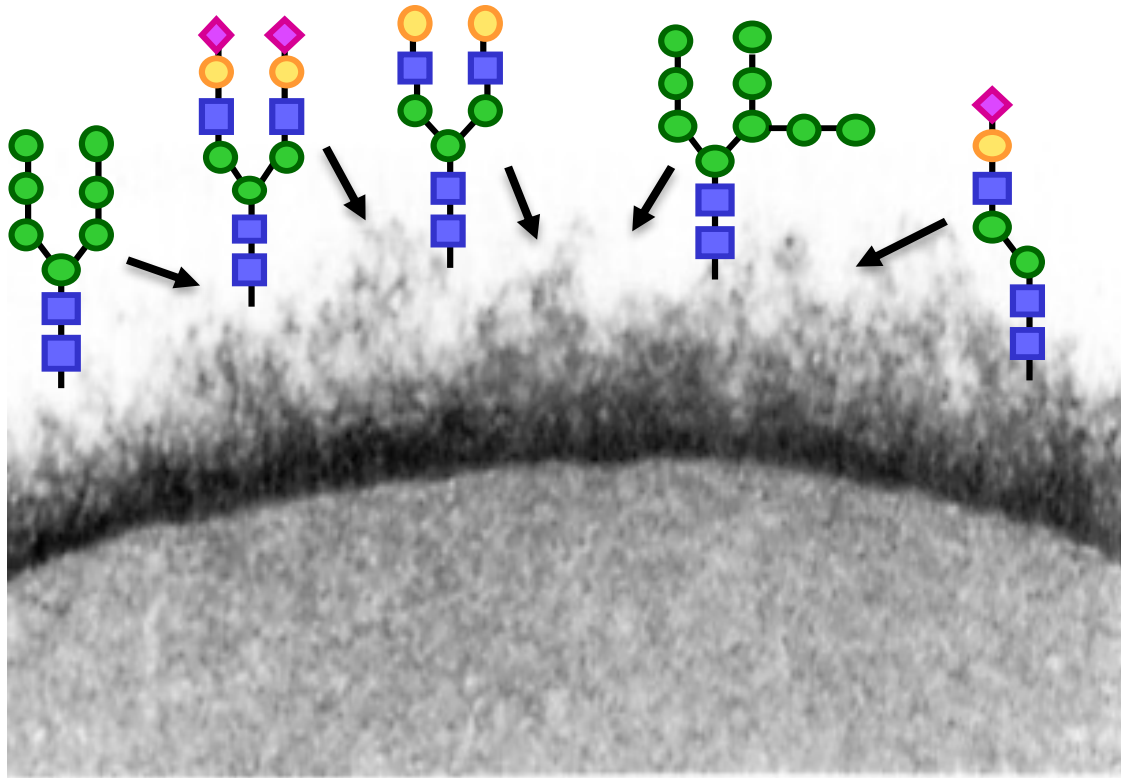


Figure 2. 赤血球表面の電子顕微鏡画像

(Biochemistry, 4th Edition, Donald Voet, Judith G. Voet,
ISBN: 978-0-470-57095-1, December 2010 1520 Pages)

レクチンは糖鎖認識部位を有するタンパク質の総称であり、植物、動物、細菌などが普遍的にもち^{ref2}いくつかのファミリーに分類される。例えば、C型レクチンは糖鎖認識部位 (CRD) 部位に Ca^{2+} が配位しており、 Ca^{2+} 依存的に糖鎖を認識する^{ref3}。C型レクチンのCRDの構造は主にマンノース結合型とガラクトース結合型の二種類に分類され、膜貫通型と可溶性型がそれぞれ存在する。一方で、ガレクチンは、ガラクトースを特異的に認識する可溶性のレクチンである^{ref4}。このようにレクチンはファミリーごとに特徴的なCRDを有しており、糖鎖に対する特異性の違いはCRD周辺のアミノ酸によって決定されている。

レクチンの研究は1800年に遡るが、発見当初レクチンは血液凝集毒素として植物から抽出された^{ref5}。赤血球表面の糖鎖は動物種や血液型によって異なる構造を示すが、レクチン

はこれらの糖鎖構造を見分けて相互作用することで、動物種あるいは血液型特異的な凝集を引き起こすことが明らかとなり、レクチンの特異的糖鎖結合活性の研究が広く行われた^{ref6}。さらに悪性細胞凝集活性の発見を契機として、細胞表面における糖鎖とレクチン相互作用が注目されるようになった^{ref7}。これまでの研究により、レクチンが膜貫通型または可溶性のレクチンとして細胞表面上に普遍的に存在しており、糖鎖を認識することで、細胞間コミュニケーションを普遍的に制御していることがわかっている。これを言い換えれば、糖鎖-レクチン相互作用の異常は細胞間コミュニケーションを破綻させ、種々の疾患を引き起こすということである^{ref8}。例えばがん細胞では、細胞表面の糖鎖およびレクチンの発現について多くの異常が報告されている。これらの糖鎖やレクチンの多くはがん細胞の増殖・浸潤・血管新生・免疫逃避などに関連するものである^{ref8}。また、腫瘍組織では、がん化した細胞が免疫細胞や血管内皮細胞、線維芽細胞といった間質細胞とともに腫瘍微小環境と呼ばれる独自の環境を構築することも徐々にわかってきている^{ref9}。がん細胞上に異常発現する糖鎖やレクチンは、これらの間質細胞との糖鎖-レクチン相互作用を介した細胞間コミュニケーションにより、自らの生存に有利な環境を作り上げていると考えられる。

このように細胞間コミュニケーションをつかさどる糖鎖とレクチンだが、意外にも、単一の糖鎖とレクチン間の相互作用は、平衡定数の値が mM レベルと、酵素-基質間または抗体-抗原間の相互作用(nM レベル)と比較して弱い (**Figure 3**)。

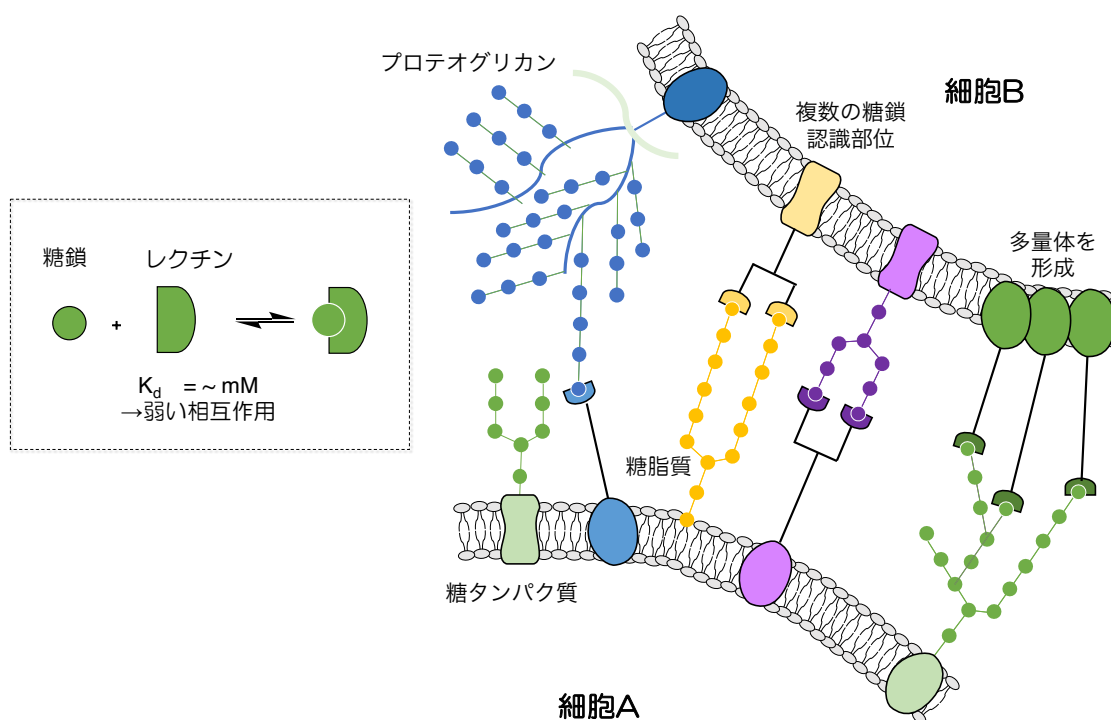


Figure 3. 糖鎖とレクチンの多価相互作用を介した細胞間での相互作用

そのため、一分子の糖鎖とレクチン間の相互作用では、細胞間コミュニケーションを制御するような強い相互作用にはなり得ない。そこで、この相互作用の弱さを補うように、糖

鎖とレクチンは多価的な相互作用（multivalency effect）を利用していることが広く理解されている^{ref10}。実際に細胞表面において、糖タンパク質・糖脂質・プロテオグリカンなどの複合糖質が高密度に存在することで、細胞に固有の糖鎖クラスターが形成されており、一方のレクチンに関しても、その大多数が複数の糖鎖認識部位を持つことや、多量体形成が可能であることから、膜貫通型あるいは可溶性のレクチンとして細胞表面に集合し、多価的な相互作用を介してその機能を発揮する。つまり、細胞表面にクラスター化した糖鎖とレクチンが発現し、細胞同士でこれを互いに認識し合うことで、強く選択的な細胞間コミュニケーションが成立していると考えられる

1-2. 糖鎖クラスターによる多価相互作用

第一節では糖鎖とレクチンの相互作用が細胞間認識を担う重要な相互作用であることを述べた。これらの相互作用研究においては、テンプレート上に人工的に糖鎖をクラスター化した様々な糖鎖クラスター分子が用いられてきた。よって第二節では、糖鎖クラスター分子を用いた多価相互作用について述べる。

初期の糖鎖-レクチン間の分子レベルでの相互作用研究において、アシアロ糖タンパク質受容体 (Asialo Glyco Protein Receptor: ASGPR) と多価の糖リガンドを用いた相互作用研究が代表的な例として挙げられる (Figure 4) ^{ref11}。ASGPR は C 型レクチンの一種であり、糖鎖末端の Gal または GalNAc と弱く相互作用する糖鎖認識部位を 3 つ有しており、これらの部位に対して同時に相互作用可能な多価糖リガンドは、飛躍的に増強された相互作用を示す。実際に単一の GalNAc リガンドと比較して、三分子の GalNAc をクラスター化した分子では K_d 値が 10^6 倍小さくなることが報告されている ^{ref11}。このように、糖鎖リガンドを複数結合した糖鎖クラスターが、標的レクチンと複数の部位で同時に結合することで相互作用が増加する効果が広く知られており、糖鎖の多価効果として利用されている ^{ref12}。

また、ASGPR は肝臓の実質細胞に一細胞あたり 500,000 個以上発現していることに加え、ASGPR との相互作用がクラスリン依存性のエンドサイトーシスを引き起こすことから、肝臓ターゲティングにおける標的受容体としても離党されている ^{ref3}。例えば、三分岐型 GalNAc リガンドに siRNA が結合したジブラーリ®は肝臓表面の ASGPR との相互作用を介して、肝細胞内へ siRNA を効率的に送達する。このように、レクチンと糖鎖の多価効果を利用した臓器ターゲティングも行われている。

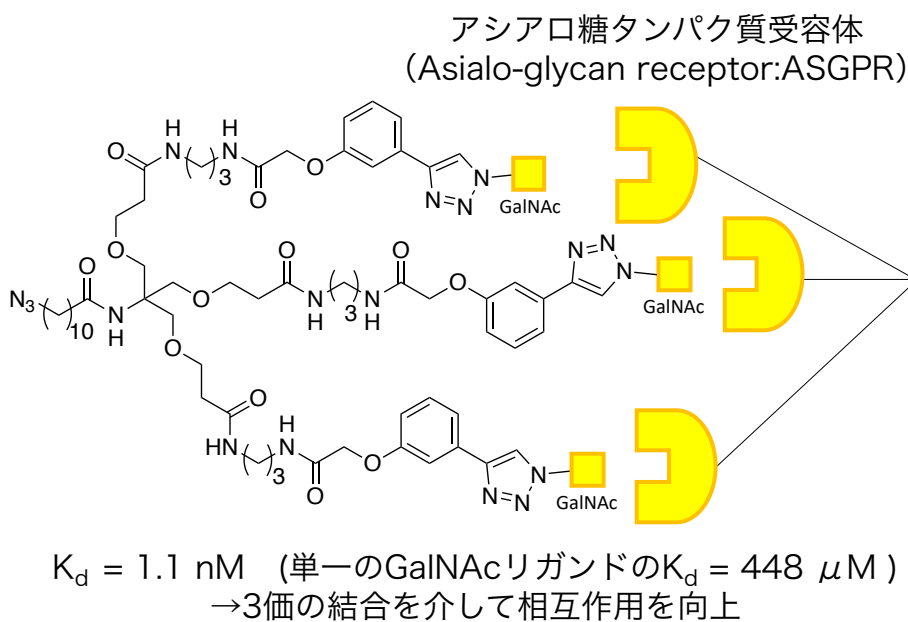


Figure 4. ASGPR と 3 分岐型 GalNAc 分子の多価相互作用

糖鎖の多価効果の研究において、複数の修飾部位を有する様々なテンプレート分子に対して、任意の種類・数の糖鎖を導入した糖鎖クラスターが合成・利用されてきた。共有結合性の有機小分子では、分岐構造を持つ分子やペプチド、糖、オリゴヌクレオチドが一般的に用いられる。また、デンドリマーやタンパク質などの高分子、あるいはリポソームを用いた糖鎖クラスターも用いられてきた^{ref13}。

Kiessling らは、様々なテンプレート分子上に糖鎖をクラスター化することで、多価効果におけるテンプレート分子の影響を調査し、例えば全く同じ種類の単糖をクラスター化する場合であっても、テンプレート分子の違いによって、レクチンとの相互作用に違いが生じることがわかった^{ref12} (Figure 5)。その一例として、タンパク質である Bovine serum albumin (BSA)を用いた糖クラスターでは受容体レクチンの集合化を引き起こしたのに対して、直鎖合成ポリマーの場合にはレクチンの活性阻害を引き起こし、異なる相互作用様式が生じうることを示した。このように、用いる糖鎖や標的となるレクチンによって最適なテンプレートは異なる。

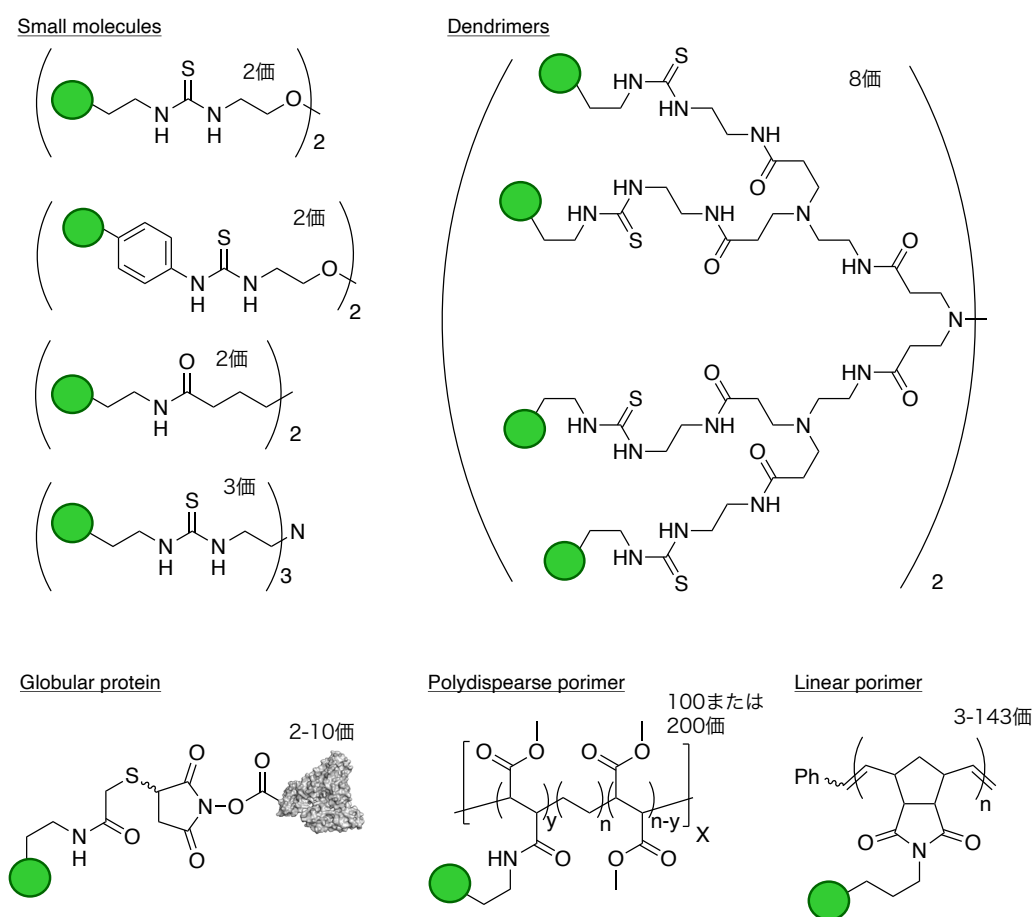


Figure 5. 小分子から高分子まで種々のテンプレートを用いた糖鎖クラスター分子

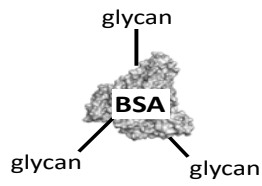
糖鎖クラスターとレクチンの多価相互作用を用いて、特定の臓器や疾患細胞のみを選択的に認識・治療する糖鎖ターゲティング研究も数多く行われており、特に入手・取り扱いが容易な単糖の化学修飾が一般的に用いられる。例えば、先ほども述べたように Gal または GalNAc 修飾による肝臓のターゲティングは最もよく知られる糖鎖ターゲティングの一つである^{ref14}。一方で、修飾する単糖の種類を変化させれば、肝臓の非実質細胞へのターゲティングも可能である。代表的には、Man (マンノース) 修飾では、類洞内皮細胞およびクッパー細胞をターゲティングするのに対して、Fuc (フコース) 修飾においては類洞内皮細胞よりもクッパー細胞を強く選択的にターゲティング可能である。また MP6 (6-リン酸化マンノース) 修飾では、他の非実質細胞である星状細胞をターゲティング可能であることが報告されている^{ref15}。また、腫瘍組織では一般的にレクチンの発現量が増加しており、がん種ごとに特定のレクチンが過剰発現していることが報告されている^{ref16}。よって、この過剰発現するレクチンを標的化するがんターゲティングも実施されている^{ref17}。

一方で、レクチンは糖鎖リガンドの分岐や配列・結合様式を含めて認識するため、単糖よりも複雑な構造をもつ糖鎖をクラスター化すれば、より選択的なターゲティング効果を期待できる。しかし、糖鎖は入手や取り扱いが困難であることから、糖鎖クラスター分子の合成および調査は限られている。

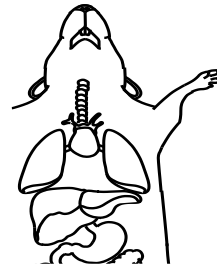
このような背景の中で、Gabiúsらは、ウシ血清アルブミン (Bobine serum albumin: BSA) に対して様々な N-結合型糖鎖を 2-4 個程度修飾し、この糖鎖アルブミンのマウス体内分布やがん細胞に対する結合活性を調査した^{ref18}。N-結合型糖鎖は主に血漿タンパクを修飾する糖鎖であり、修飾した血漿タンパクの体内動態を制御する役割がある。実際に N-結合型糖鎖である、末端ガラクトシル化糖鎖、末端 $\alpha(2,3)$ -、 $\alpha(2,6)$ -シアリル化糖鎖を 2-4 個導入した人工糖鎖修飾アルブミンの体内分布を比較した結果、シアリル化糖鎖に比べてガラクトシル化糖鎖では、血中への分布が 20 倍以上減少した (Figure 6)。シアリル化糖鎖は血清タンパク質によく見られる糖鎖であり、この糖鎖の末端シアリル化糖鎖がシアリダーゼ (シアル酸の加水分解酵素) によって切断され、末端ガラクトシル糖鎖に変換されると、血漿タンパクは肝臓での代謝を受けて速やかに体外へと排泄されることが知られており、これと一致する結果となった。

また、これら三つの糖鎖アルブミンとがん細胞との相互作用プロファイルも調査している^{ref18}。いずれの糖鎖の場合にも CCRF-CEM 細胞 (ヒト T リンパ球性白血病細胞)、BLIN-1 細胞 (プレ B 細胞白血病細胞) に対して中程度の相互作用を示し、がんターゲティングへの応用可能性を開いた (Figure 7)。一方で、本研究では、糖鎖導入数は 4 分子以下に留まっており、糖鎖クラスターの高密度化には至っていない。

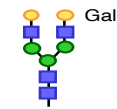
糖鎖アルブミン分子
(2-4個の糖鎖修飾)



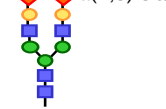
体内分布
(マウス体内)



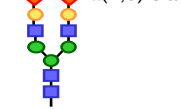
3.6分子



2.4分子

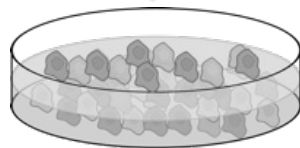
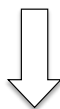
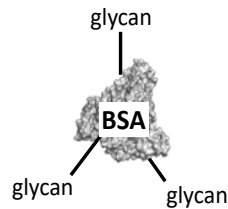


3.0分子



	3.6分子	2.4分子	3.0分子
血中	1	29.5	26.8
肝臓	1	2.3	2.5
腎臓	1	4.5	4.0
心臓	1	19.2	19.6
肺	1	7.9	8.0

糖鎖アルブミン分子
(2-4個の糖鎖修飾)



Cancer cells

3.6分子

alpha(2,3)

2.4分子

alpha(2,6)

3.0分子

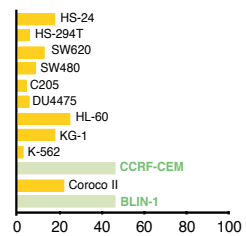
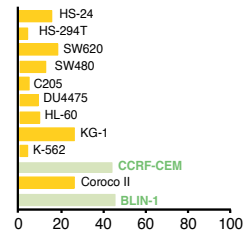
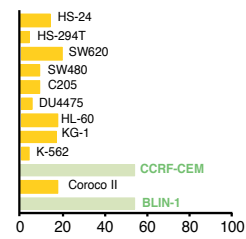


Figure 6. 2~4 個の糖鎖を修飾した糖鎖アルブミン分子と種々のがん細胞との相互作用

一方で著者らの研究室では、ポリリジン型 dendrimer をテンプレートとして、16分子の糖鎖を導入した当時世界最大の糖鎖クラスター分子の合成を報告している^{ref19}。すなわち、ポリリジン型 dendrimer の末端に導入したプロパルギルグリシンに対して、銅触媒存在下での Huisgen 環化反応により、4、8、および16分子の $\alpha(2,6)$ -シアリル化糖鎖を導入した (Figure 8)。

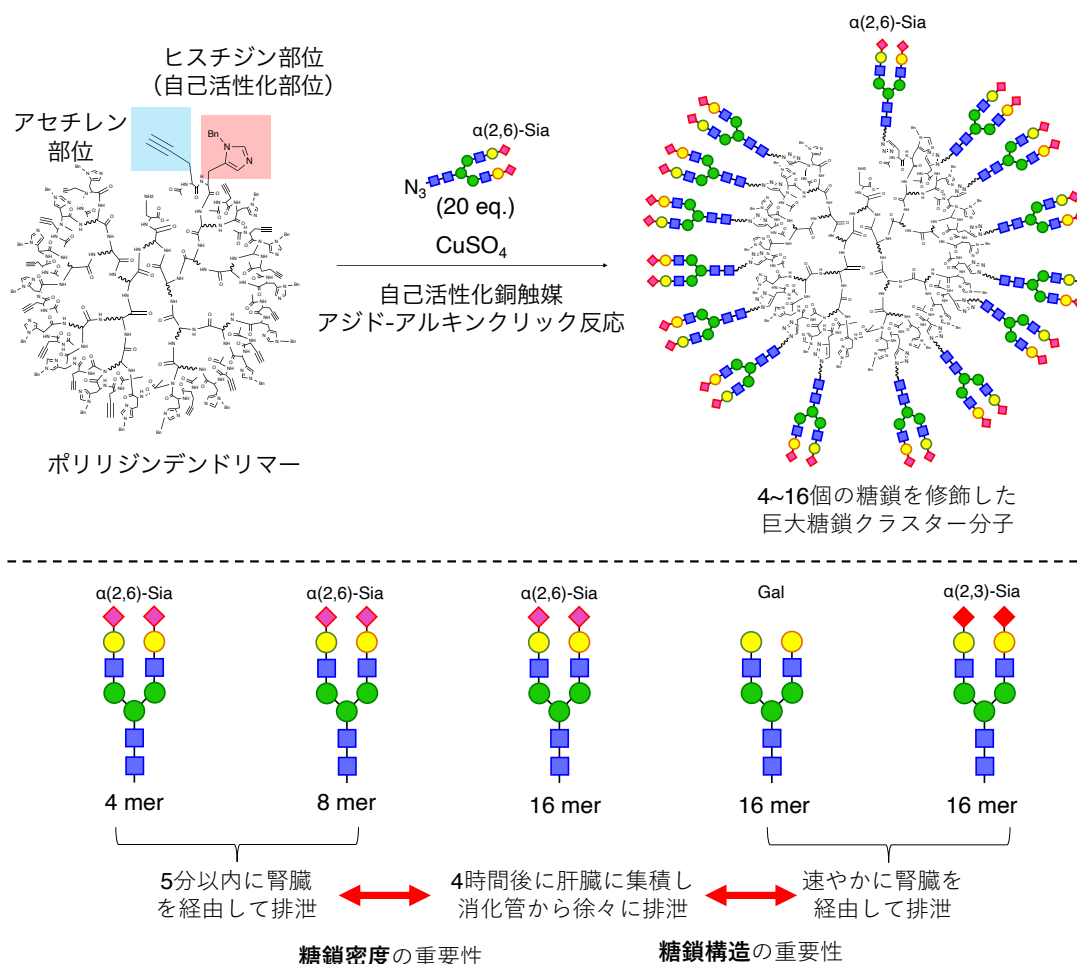


Figure 7. ポリリジン dendrimer 型糖鎖クラスターの合成と糖鎖の修飾密度と種類による排泄経路の違い

この際、著者らの研究室で開発したヒスチジン誘導体を利用した自己活性化クリック反応を用いることで室温下、わずか40分で定量的に糖鎖をクラスター化することが可能であった。さらに、蛍光や放射線核種で標識した糖鎖クラスター分子を用いて、生きたマウス体内で糖鎖クラスター分子の体内動態を調査した。例えば、 $\alpha(2,6)$ -シアリル化糖鎖を4、8または16分子導入した糖鎖クラスターのマウス体内動態を比較すると、4または8分子の場合は5分以内に速やかに腎臓を経由して体外へ排出されるのに対して、16分子の場合には血中滞留性が著しく向上し、4時間後に肝臓へ集積したのち、腎臓または胆嚢を経由し

て消化管から徐々に排泄された。さらに、16分子の糖鎖クラスターにおいて、末端ガラクトシル化糖鎖、末端 $\alpha(2,3)$ -、 $\alpha(2,6)$ -シアリル化糖鎖の三種類を比較したところ、 $\alpha(2,6)$ -シアリル化糖鎖では血中安定性の向上が確認されたこととは対照的に、末端ガラクトシル化糖鎖および末端 $\alpha(2,3)$ -シアリル化糖鎖の場合は速やかに体外に排泄された。Gabijsらの2~4分子の糖鎖クラスターでは、 $\alpha(2,3)$ -および $\alpha(2,6)$ -シアリル化糖鎖の体内動態の違いがほとんど見られなかったことから、糖鎖クラスターの糖鎖密度を高めることによって、糖鎖構造による糖鎖クラスターの体内動態への影響を明確に可視化できることが示唆された。

1-3. 不均一な糖鎖クラスターによる選択的な相互作用

第二節で単一種類の単糖および糖鎖クラスターを用いた糖鎖多価効果の研究が充実していることを述べたが、生体内の細胞表面では、多様な糖鎖が組み合わさった不均一な糖鎖生体分子社会（グリコカリクスと呼ばれる）が形成され、相互作用の強度や選択性が適切に制御されることで、細胞の機能が調整されていると考えられる^{ref20}。よって、複数の糖鎖を組み合わせて修飾した不均一糖鎖クラスターを合成することができれば、より選択的なターゲティングの実現が期待できる。

実際に、細胞表面の局所的なヘテロな糖鎖クラスター構造を模倣する試みもなされているが、ホモ糖鎖クラスターと比較してヘテロ糖鎖クラスターの場合には、糖鎖の導入割合や配列の制御が課題となる。2015年に Renaudet らは環状ペプチドに4つの直交反応性置換基を組み込むことで、4つの異なる修飾反応により単糖を順次導入し、均一なヘテロ糖鎖クラスターを合成することに成功している^{ref21} (**Figure 8**)。このように、小分子の合成テンプレートを用いたヘテロ糖鎖クラスターは合成例が多く存在する。

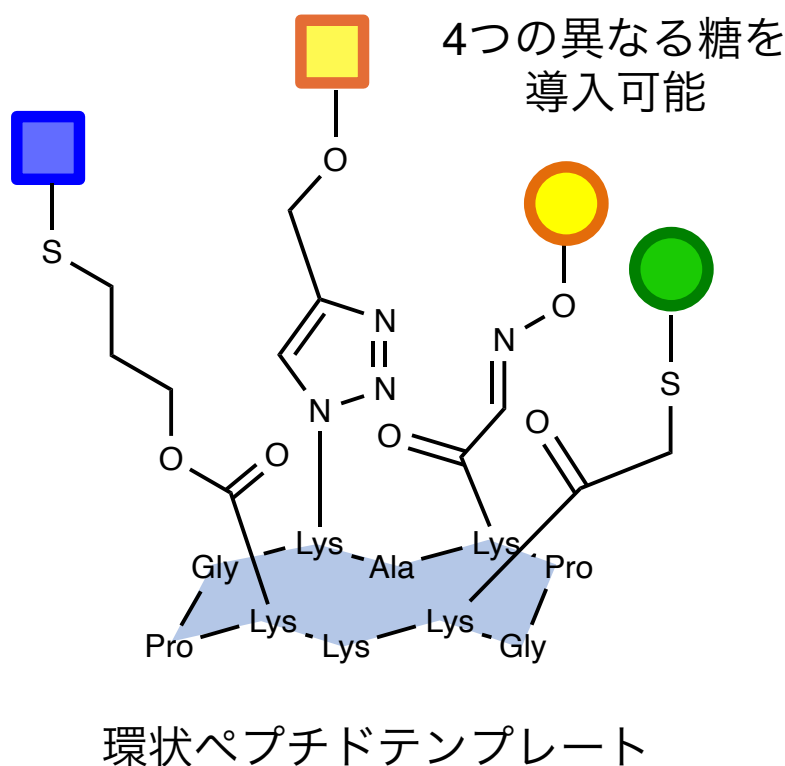


Figure 8. 環状ペプチドテンプレートを用いた糖鎖クラスター分子

続いて、ヘテロ糖鎖クラスターを用いた糖鎖-レクチン相互作用研究について以下に二例を紹介する。Wong および Wu らは、複数の糖鎖を組み合わせて不均一な糖鎖パターンをマイクロアレー上に作成し、複数の糖鎖認識部位を有する抗体との相互作用を解析している

ref22。その結果、単一の糖鎖と比較して、二種類の糖鎖からなる不均一な糖鎖クラスターがより強い認識を示し、ヘテロ糖鎖クラスターの有用性を示した。

また、Fernándezらは、7つの結合部位を持つβ-シクロデキストリン（CD）をテンプレートとして7または14分子のα-Manからなるホモ糖鎖クラスター(α-Man)₇-CD、(α-Man)₁₄-CD、およびβ-Lac（ラクトース）を追加修飾したヘテロ糖鎖クラスター(α-Man)₇(β-Lac)₇-CD、(α-Man)₁₄(β-Lac)₇-CDを合成した^{ref23}（Figure 9）。マンノースを特異的に認識するレクチン Con A を用いて、同じα-Man数をもつホモおよびヘテロ糖鎖クラスター同士でレクチン結合活性を評価したところ、Lac単体ではCon Aへ弱い結合活性しか示さないにも関わらず、ヘテロ糖鎖クラスターの方が明確に強い相互作用を示した。この結果は、単一では弱い相互作用であっても、多価相互作用に組み込むことができれば、相互作用の向上に寄与することを示している。このようなヘテロ糖鎖クラスター化による相互作用増強効果は、糖鎖の不均一効果と呼ばれている。

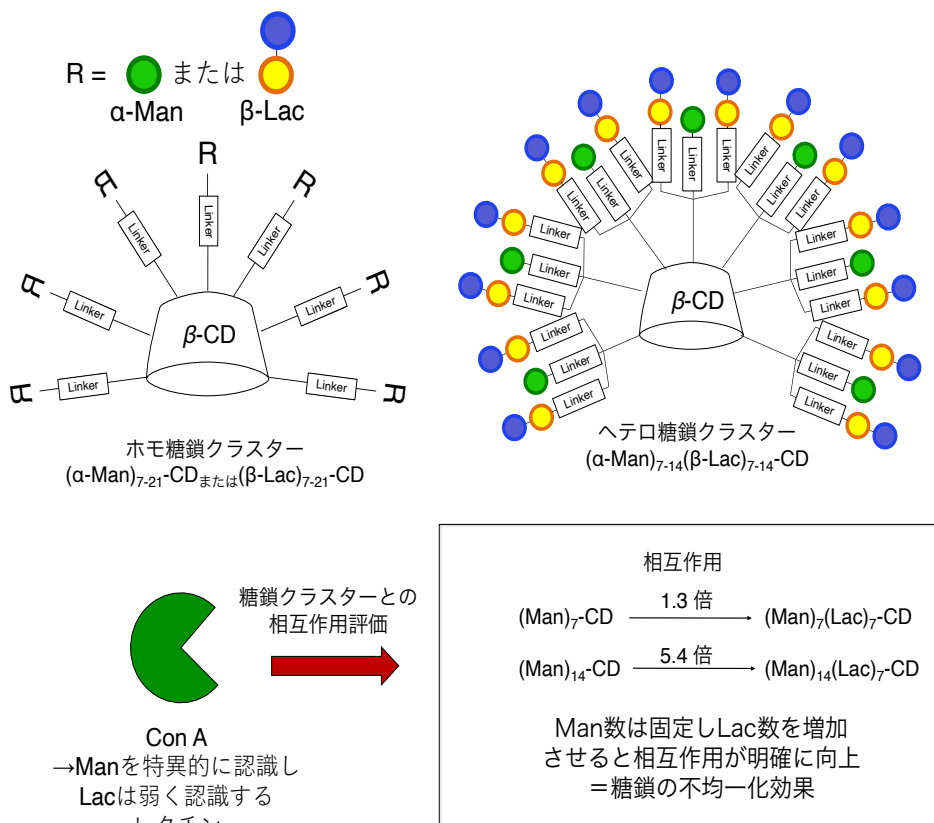


Figure 9. β-シクロデキストリンを用いたホモおよびヘテロ糖鎖クラスター分子と Man 認識レクチンである Con A の相互作用による不均一効果

また、糖鎖の不均一効果を *in vivo* で利用した例として、Wu らは、LacCer（ラクトシルセラミド）と Gb3（グロボトリオース含有糖脂質）という、二つの糖脂質リガンドを組み合わせて修飾したヘテロ糖鎖クラスター化リポソームを用いて *in vivo* での緑膿菌ターゲットティングを実施した^{ref24} (Figure 10)。緑膿菌 PAO1 に対して LacCer は強いターゲットティング効果を示さないが、既知の緑膿菌リガンドである Gb3 と組み合わせて修飾することで、両者を単体で修飾する場合よりも明確にターゲットティング効果が上昇した。実際に、緑膿菌感染マウスに対して抗菌剤内包リポソーム投与による治療効果を比較すると、ヘテロ糖鎖修飾リポソームの場合にマウスが最も高い生存率を示したことから、ターゲットティング効率の向上が確認された。Wu らはこの不均一効果を以下のように説明している。つまり、強いリガンド-受容体間の結合により弱いリガンド-受容体間の結合が加速されることで、単体では結合に参加することが困難な弱いリガンドでも多価的な相互作用に寄与することができる、というものである。以上のように、糖鎖の多価効果および不均一効果を利用することで、選択的な臓器・細胞ターゲットティングの実現が期待される。一方で、これまでの糖鎖クラスター合成手法においては糖鎖導入効率が課題となり、糖鎖導入数を制御しつつ、ヘテロ糖鎖クラスターへ展開することは困難であった。

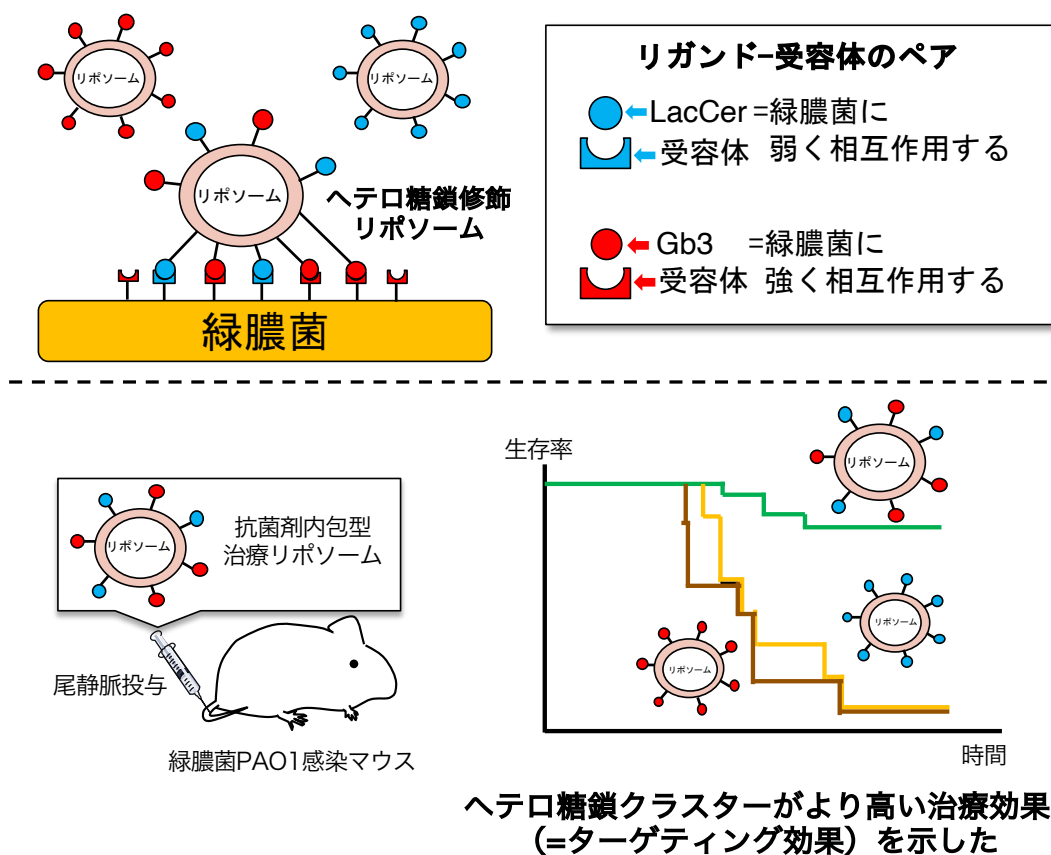


Figure 10. ヘテロ糖鎖クラスター化リポソームを用いた緑膿菌感染マウスの抗菌治療研究。

1-4. 糖鎖アルブミン分子による糖鎖パターン認識の実証

一方で我々は、新たなタンパク質の修飾手法として理研クリック反応（高速 6π -アザ電子環状反応）を報告している^{ref25}。本反応は、第一級アミンとの縮合により得られるイミンの 6π -アザ電子環状反応であり、4,6位に導入した電子求引基および共役基の効果により、水中・ 37°C という生理条件下であっても、高速かつ温和に不可逆的に反応が進行する。本反応により、生理条件下、短時間・高効率に10個以上の糖鎖をヒト血清アルブミンに導入可能であることを見出している。さらに、これまでに理研クリック反応を用いたアルブミンの糖鎖修飾において、修飾されやすいリジン残基の位置を明らかとしている^{ref26b}。すなわち、10個の糖鎖で修飾した糖鎖アルブミンにて、糖鎖が修飾されたりジンの位置10箇所を決定しており、その位置はアルブミンの外側のアクセスしやすい位置であった。よって、より立体的に近づきやすいリジンから順番に糖鎖修飾反応が進行していると理解できる。本反応を用いることで、アルブミンを均一に、狙った数の糖鎖で修飾する事が可能になり、二種類以上の糖鎖を組み合わせて修飾したヘテロ糖鎖アルブミンの合成も容易となった。

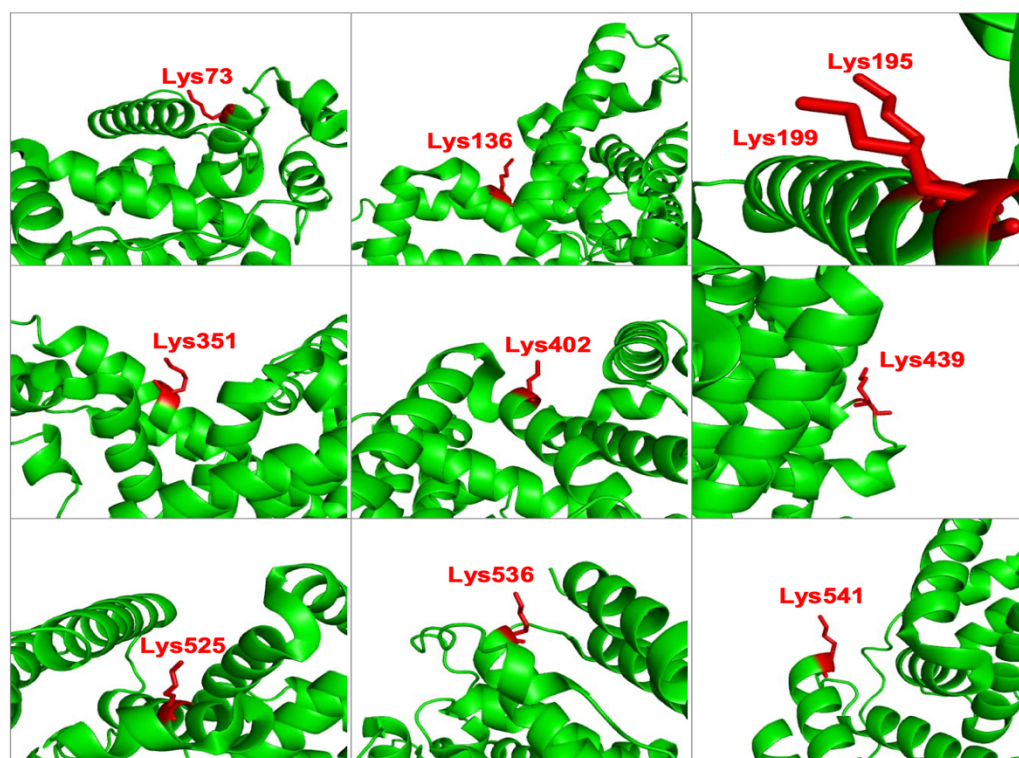


Figure 11. アルブミンの糖鎖修飾において修飾されやすい10箇所のリジン残基の位置

さらに実際に合成した糖鎖アルブミン分子を用いることで、密度の高い糖鎖クラスター構造を作成し、明確な糖鎖多価効果・糖鎖不均一効果を *in vitro* および *in vivo* でも実証している ^{ref26a,c} (Figure 12,13,14)。

まず種々の *N*-結合型糖鎖を修飾した糖鎖アルブミンの体内動態を観察した (Figure 12)。ヒト血清アルブミン (Human serum albumin: HSA), および2分子の $\alpha(2,3)$ -シアリル化糖鎖を修飾した糖鎖アルブミンは、特定の臓器への集積を示さない。一方で、10分子の糖鎖で修飾した場合、糖鎖の末端構造に依存して異なる動態を示す。つまり **a**, **b**, または

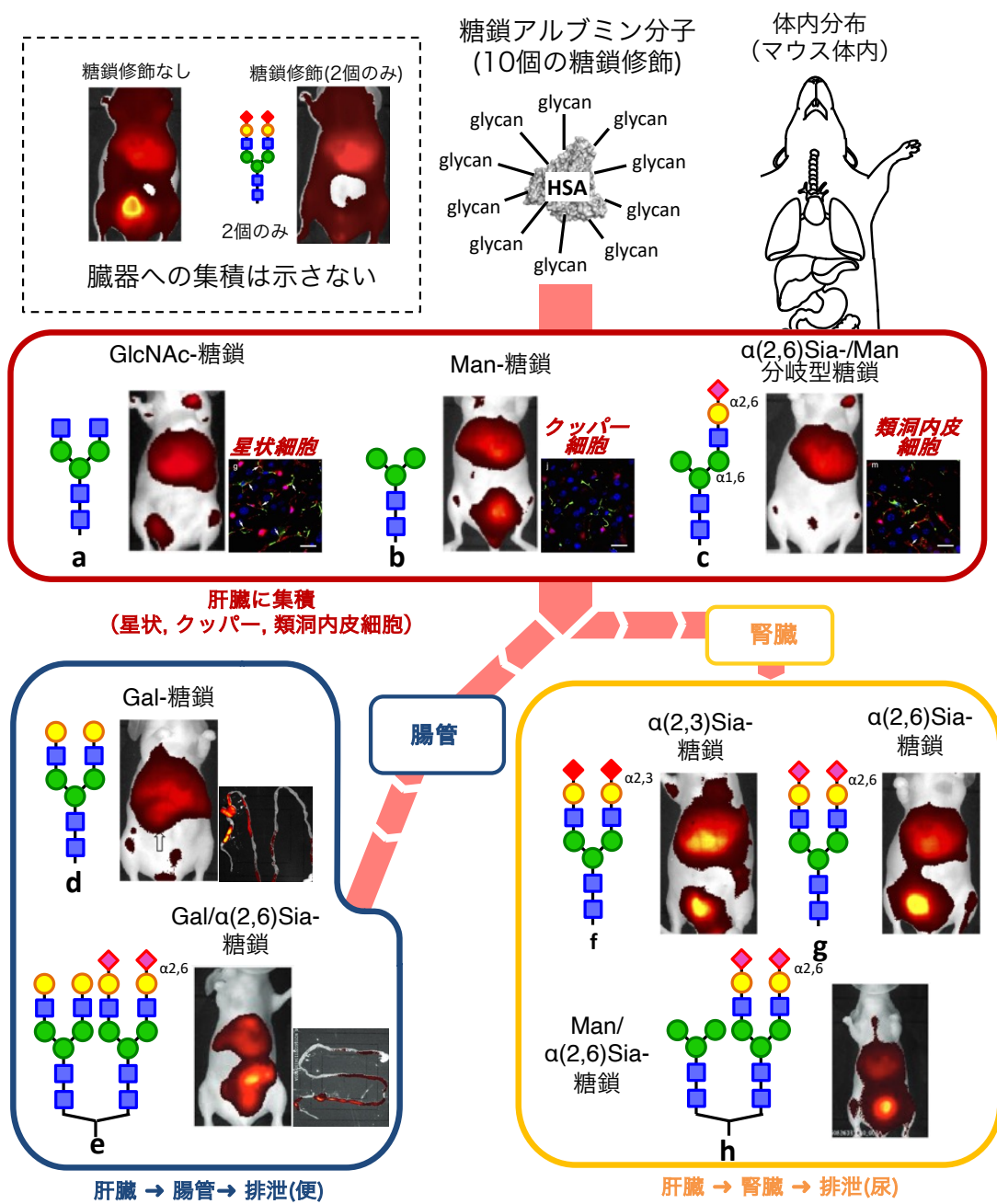


Figure 12. 10分子の糖鎖を修飾した糖鎖アルブミン分子のマウス体内動態解析

cの糖鎖を修飾した糖鎖アルブミンは全て肝臓に集積し、肝臓に含まれる細胞の中でそれぞれ異なる細胞を認識した。つまり、GlcNAc糖鎖aでは星状細胞を、Man糖鎖bではクッパー細胞を、 $\alpha(2,6)$ -Sia/Man分岐型糖鎖cでは類洞内皮細胞を認識した。

一方で末端Gal糖鎖を有するdまたはeでは肝臓を経由して腸管へと移行し、便から排泄されたのに対し、末端シアリル化糖鎖を有するf, g, hは肝臓と腎臓を経由して膀胱へと移行し徐々に尿から排泄される。タンパク質のシアリル化糖鎖修飾が血中安定化に寄与する一方で、この糖鎖の末端シアリル酸が切断されて末端ガラクトシル化糖鎖へと変換されると、肝臓表面のASGPRとの相互作用を介して排泄経路へと導かれることが広く知られており、本結果と一致する。また、ASGPRはガラクトシル化糖タンパク質を細胞内に取り込み、代謝する役割を持つことから、ガラクトシル化糖鎖アルブミンは、肝細胞内に取り込まれたのち代謝を受けて、腸管へ移行し便排泄されたと考えられる。

このように、10分子の糖鎖を修飾した糖鎖アルブミンの体内動態を蛍光イメージングすることで、糖鎖多価相互作用の違いを明確に示し、糖鎖構造の選択によって糖鎖アルブミンの体内動態を制御可能であることを実証した。

また、末端シアリル化糖鎖と末端ガラクトシル化糖鎖からなる不均一な糖鎖アルブミンを用いて、二種の糖鎖の割合によって排泄経路・がん認識が大きく変化することを明らかにしている^{ref27} (Figure 13)。つまり、末端シアリル化糖鎖アルブミンは血中を安定に循環して徐々に尿から排泄され、末端ガラクトシル化糖鎖アルブミンは肝実質細胞に取り込まれたのち腸管から排泄されるのに対して、これら二つの糖鎖を組み合わせた不均一な糖鎖アルブミンにおいては、末端ガラクトシル化糖鎖の割合が増加する毎に、アルブミンの排泄経路が膀胱から腸管へと変化する。これは肝臓表面のASGPRとの相互作用が增強され

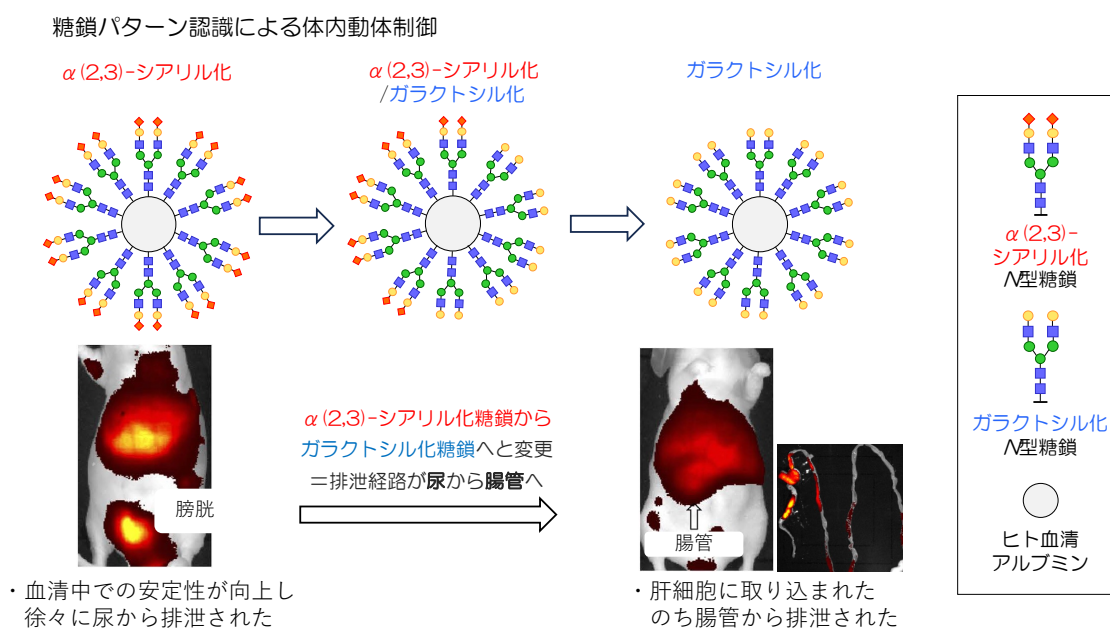


Figure 13. 糖鎖アルブミンの糖鎖付け替えによる排泄経路の制御計画

たために、腸管排泄の割合が増加したと理解できる。

さらに、ヘテロ糖鎖アルブミンを用いて 11 種類のがん細胞に対して相互作用を評価したところ、糖鎖パターンに依存して、細胞に対する選択性も全く異なるという結果を得た^{ref26b} (Figure 14)。代表的な例として三つの糖鎖アルブミンを示した。f, f/c, f/g は全く異なるがん細胞認識プロファイルを示し、それぞれ SW620 がん, A549 がん, HeLa229 がんをそれぞれ強く認識した。さらに担がんマウスを用いた *in vivo* 実験においても、これらの強い認識が働いてがん種選択的なターゲティングが可能であることを証明した。例えば、f/g は HeLa229 がんを強く認識する一方で、U87MG, DLD-1 がんを弱く認識する。そこで、これらの三種のがんを移植した多種がん移植マウスに対して f/g の糖鎖アルブミンを投与したところ、*in vitro* で強い認識を示した HeLa229 がんのみを認識を示し、糖鎖のパターン認識が *in vivo* でも有効に働くことを明らかとした (Figure 15)。

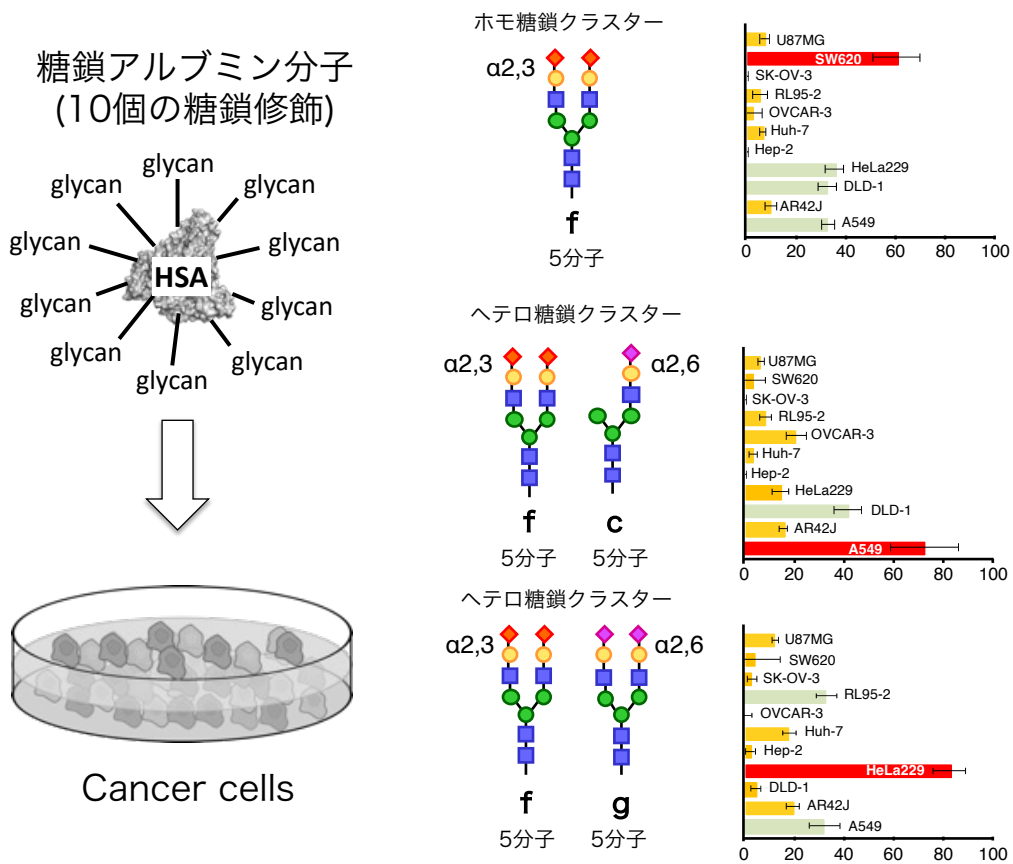


Figure 14. 10 分子の糖鎖を修飾した糖鎖アルブミン分子の種々のがん細胞との相互作用解析

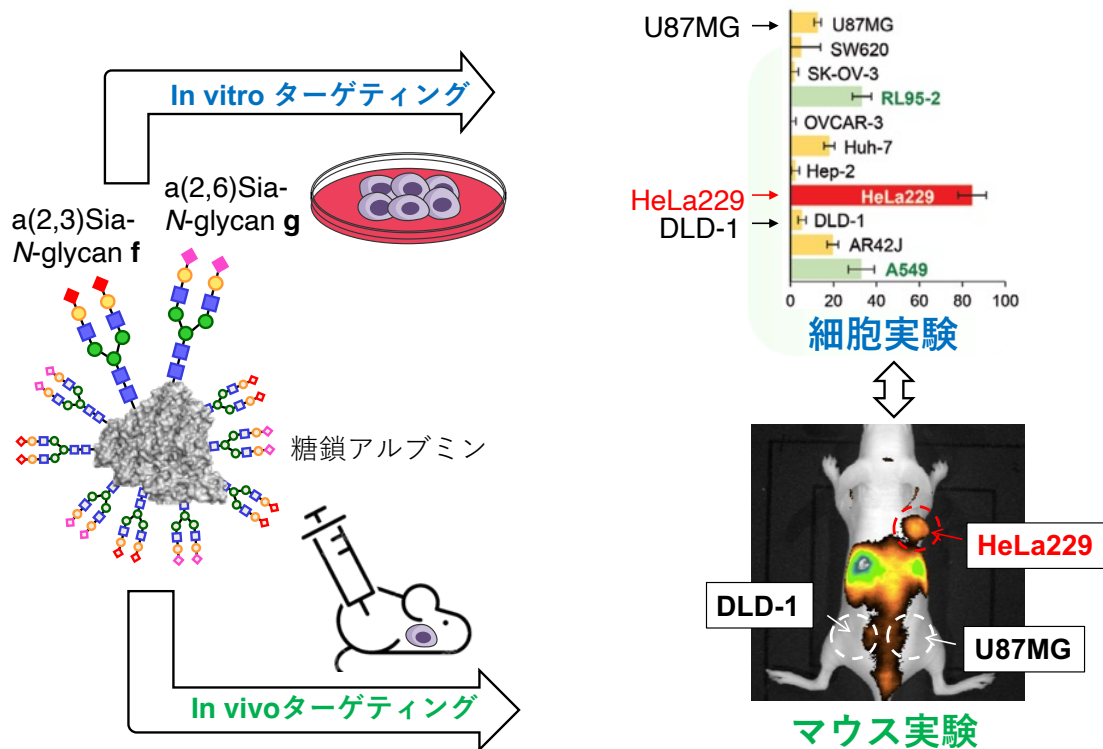


Figure 15. 糖鎖アルブミンによる in vitro および in vivo でのがんターゲティング

以上のように著者らの研究室では、糖鎖アルブミンを用いることで糖鎖の多価効果および不均一効果を実証してきた。我々は糖鎖多価効果と不均一効果を併せて糖鎖パターン認識と呼んでおり、以下のように理解している (Figure 16) まず、単一の糖鎖ではレクチンとの相互作用が弱く標的を認識することはできない。一方で、弱い糖鎖を集めたホモ糖鎖クラスターは、標的レクチンを多く発現する細胞に対して多価相互作用が可能であり、細胞認識が発現する。つまり、ホモ糖鎖クラスターの場合には、細胞上の標的レクチン発現量を見分け、ある閾値以上の発現量をもつ細胞に対して認識を示すと考えられる。

一方で複数種類の糖鎖を組み合わせたヘテロ糖鎖クラスターにおいては、糖鎖不均一効果により複数のレクチンに対して多価的に相互作用可能な場合に標的認識が増強されると考えられる。つまり、Figure 16 に示したように、細胞表面に発現したレクチンのパターンがマッチの場合、多価的な相互作用が可能となり強い細胞認識が生じる。一方で、糖鎖とレクチンのパターンがミスマッチの細胞 B や細胞 C の場合には、糖鎖はむしろ立体障害として負に働き、強い認識は発揮されない。

以上に示した糖鎖パターン認識は、これまでも述べてきたように、生体内での細胞同士の認識においても同様に働いていると考えられる。すなわち、一つ一つの細胞には、その細胞に固有のヘテロ糖鎖クラスターおよびレクチンの発現パターンを有しており、細

細胞同士は互いの糖鎖-レクチンと相互作用し合い、その相互作用がマッチする場合にのみ強い細胞認識を発現することで、精密な細胞認識を実現している。よって、細胞表面の糖鎖クラスターを模倣した糖鎖アルブミン分子においても、より幅広い細胞を標的化し、がん以外にも様々な疾患細胞に対して選択的なターゲティング・治療へと展開可能であると期待できる。

糖鎖パターン認識

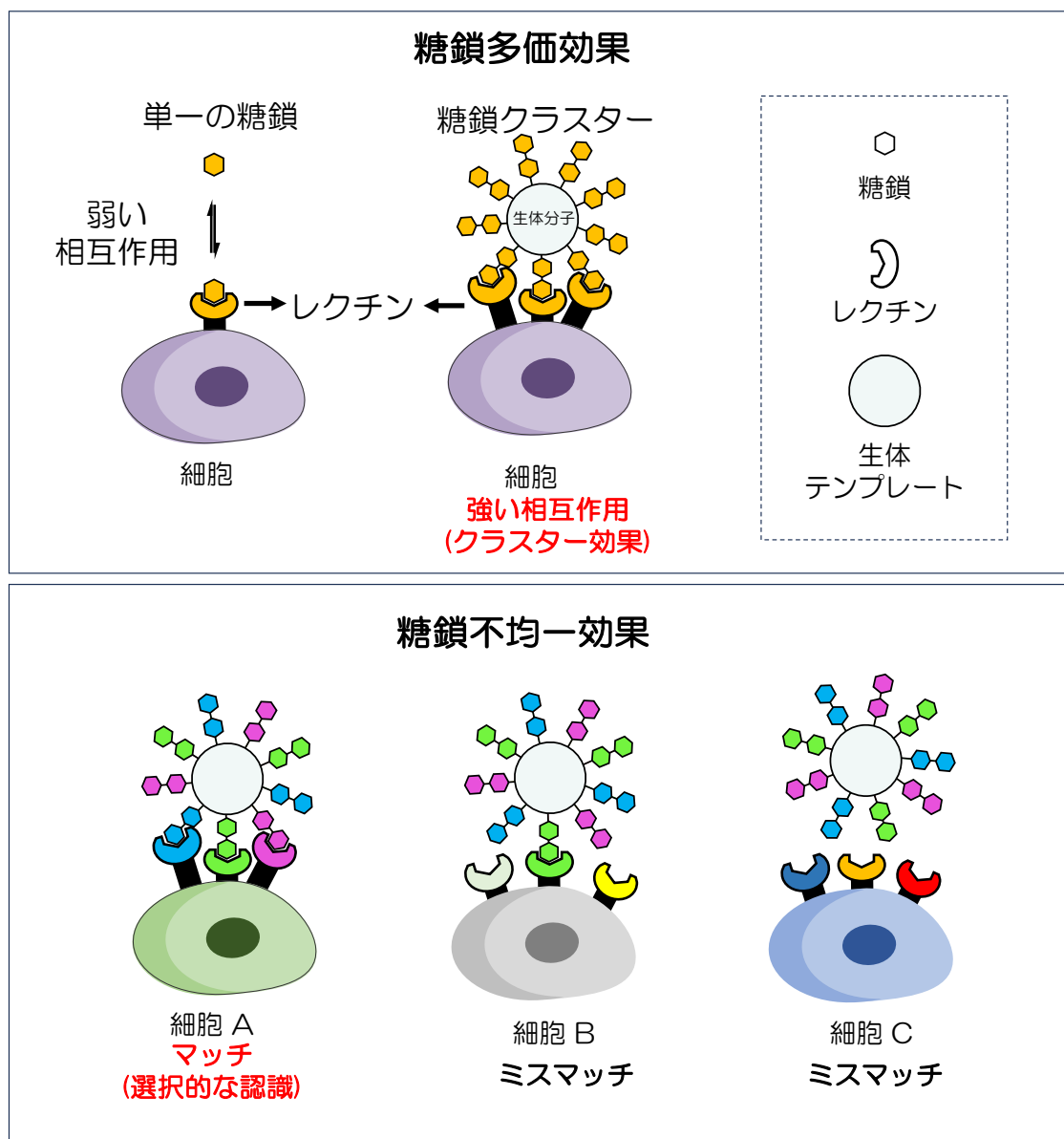


Figure 16. 糖鎖パターン認識の概念図

また、実際に生体内で細胞ターゲティングを実施し、疾患の診断・治療へ応用する場合には、標的細胞を認識することだけではなく、他の正常細胞には認識を示さないこと、つまり認識の選択性が重要となる。このような視点から、弱い相互作用を集めた糖鎖アルブミンを用いることで、従来の抗体やペプチドリガンドなどの強い相互作用を用いた場合よりも、選択的かつ汎用性の高い細胞ターゲティングを実現可能であると考えられる。すなわち、抗体やペプチドリガンドを用いると、単分子でも強く相互作用して認識が生じてしまう。よって、標的細胞にのみ特異的にリガンド受容体が発現している必要があるが、このように特異的に発現する受容体は限られた細胞にしか発現しない。一方で、弱い相互作用を利用する糖鎖パターン認識では、それぞれの細胞上に普遍的に存在するレクチンを利用するため、特異的に発現する受容体を必要としない。標的化する細胞毎に糖鎖パターンを再構築しパターン認識を最適化することも容易である。

ここで、糖鎖パターン認識においては、糖鎖修飾パターンの小さな変化に応じて標的細胞や排泄経路が大きく変化する特徴に着目し、糖鎖アルブミン分子の体内動態をマウス体内で変更できるのではないかと考えた。例えば、糖鎖アルブミン上の糖鎖修飾パターンを生きた動物個体内で任意の糖鎖パターンに更新できれば、糖鎖アルブミンの標的も切り替わる。例えば、マウス体内の標的-1 を認識している糖鎖アルブミン-1 に対して、生体内化学反応を実施し、標的-2 を認識する糖鎖アルブミン-2 へと糖鎖パターンを付け替えることができれば、標的-1 から標的-2 へと糖鎖アルブミンが移動すると期待できる。つまり、標的から新たな標的へと体内を移動する分子デバイスという新概念を初めて実現可能であると着想した (Figure 17)。

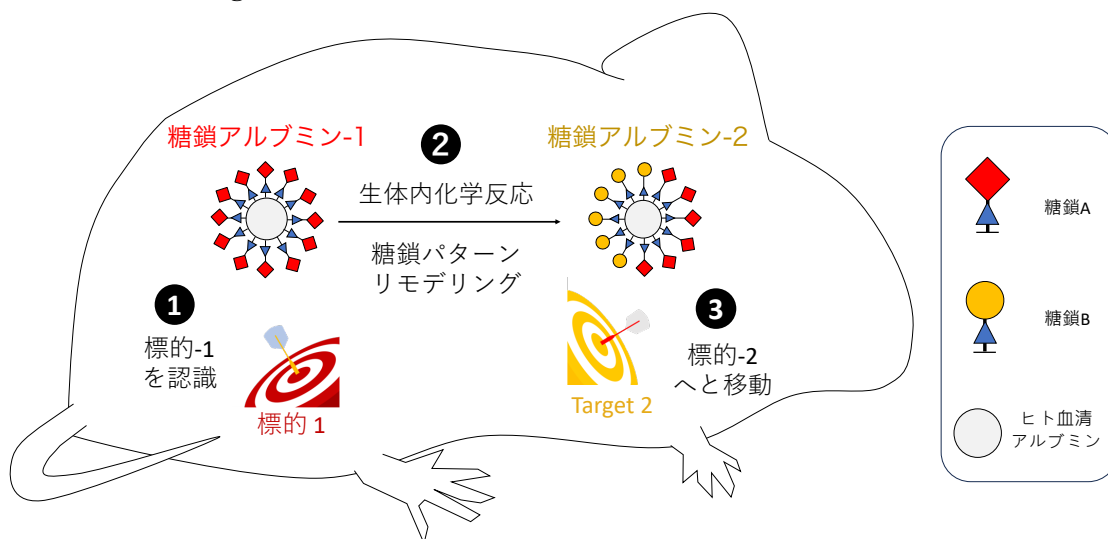


Figure 17. 生体内化学反応による体内での糖鎖クラスター構造変換と糖鎖アルブミンの生体内移動

第二節細胞・動物系で使用可能な生体内合成化学反応の概観

第三節では、糖鎖アルブミンの糖鎖パターンの変化に応じて糖鎖アルブミンを体内で移動させる計画について述べた。ここで、糖鎖パターンを変更する手法として、生体内化学を用いることとした。本節では、まず生体内化学反応の概観について述べる。

多くの有機合成反応においては、試薬の等量、濃度、触媒の添加、有機溶媒の使用、高温・高圧などの条件を精密に制御することで、初めて目的の位置の化学結合のみを選択的に形成・切断した所望の化合物を得ることができる。近年では小分子に限らず、タンパク質上あるいは細胞表面での有機化学反応が盛んに実施されているが、これらを基質とする用いる場合には、非共有結合も含めた立体構造を保ちつつ変換反応を進行させなければ、生体分子の機能が損なわれてしまうため、生理条件化（水中 37°C）で高効率に選択的な反応を進行させる必要がある。

Sharpless らは、クリックケミストリーについて、ベルトのバックルが”Click”して連結するように、異なる分子同士を結合させるような化学反応と表現している^{ref28}。つまり、クリック反応とは、簡便な実験操作により、水中を含む種々の溶媒下で、目的物のみを高効率で与えることに加え、全く機能や構造が異なる分子同士でも互いに結合するような反応のことを指す。クリック反応の発展に伴い、生理条件下でも選択的に高効率で進行する反応を、合成経験のない生物学者でも簡単に実施できるようになったことから、近年では創薬分野や複合ナノ材料分野でもクリック反応が盛んに用いられている^{ref29}、特にアジドとアルキンを用いた Huisgen 付加環化反応が最も一般的なクリック反応として利用される^{ref30}。アジドとアルキンの両者は、生体内に存在する種々の生体分子や水などとは反応せずに安定に存在可能で、銅触媒存在下あるいはアルキンへ歪みを導入した場合にのみ、付加環化反応を進行させる生体直交性基である。例えば、Bertozzi らは、アジド基を導入した非天然型の単糖誘導体を用いて、単糖が細胞表面の糖鎖に組み込まれる代謝経路を利用することで、細胞表面糖鎖末端へアジドを導入した（Figure 18）。さらに、このアジド基

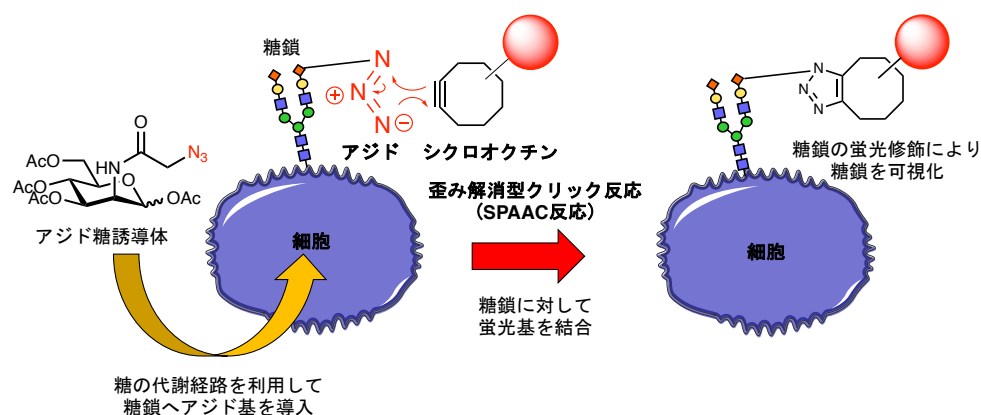


Figure 18.アジドと歪みアルキンの Huisgen 環化反応を用いた細胞表面糖鎖の可視化

に対して歪んだ三重結合を含むシクロオクチンClick反応を利用し、細胞系中またはゼブラフィッシュ体内で細胞表面糖鎖に蛍光基を導入することで可視化に成功している^{ref31}。この報告を契機として、細胞系中 (in vitro) での Click 反応の活用が現在までに多数報告されている^{ref32}。

さらに近年、in vitro だけではなく、より複雑な環境である生きた動物体内 (in vivo) でのクリック反応も徐々に可能となってきた。in vivo での化学反応においては、in vitro での化学反応よりも、さらに高い反応速度が求められる。これは、先に述べた通り、投与した試薬が生体内で血中を循環して各臓器に分布し、代謝・排泄を受けるため、体内での濃度は徐々に減少し、実際の投与量から見積もられる濃度より低い濃度条件での反応となってしまうためである。もしこの濃度の課題を補うために投与量を増加させると、投与分子の毒性が懸念される。これらの課題を考慮しつつ、反応の位置・時間・反応量を制御することが理想であるため、より早い反応速度定数が必要となるというわけである。

このような背景から SPAAC 反応においては、多様な歪みアルキンによる反応の加速効果が検証されてきた。中でも歪みとフッ素の置換基効果により二重の加速効果をもつ DIFO (Difluorinated Cyclooctyne) においては、ベンジルアジドとの反応速度定数が $k = 7.6 \times 10^{-2} \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$ まで向上することが報告されている (Figure 19)。しかし、動物体内での反応では投与した分子が代謝排泄を受けることから、体内で投与分子の濃度が減少してしまうそのため、より高い反応速度定数を示すクリック反応の探索が行われてきた^{ref32}。

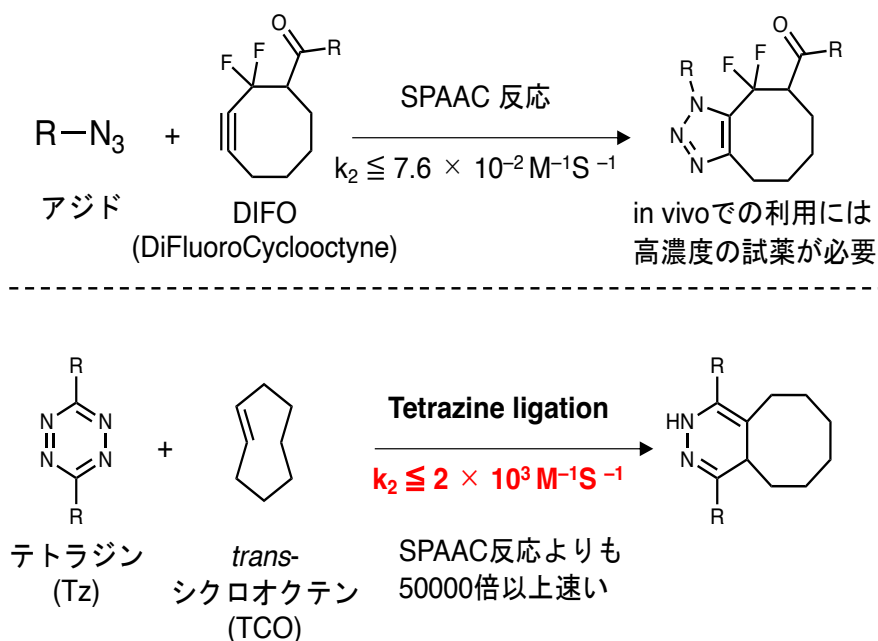


Figure 19. SPAAC 反応とテトラジンライゲーシンの反応速度の比

近年 Huisgen 付加環化反応よりも速い反応速度をもつ反応として、trans-シクロオクテン (TCO: trans-cyclooctene) とテトラジン (Tz: tetrazine) の逆電子要請型 Diels-Alder 反応

(IEDDA: Inverse Electron-Demand Diels-Alder) が注目されている^{ref33}。すなわち、高度に歪み、高いHOMOを持つTCOおよび、4つの窒素原子に起因する低いLUMOをもつTz間でのIEDDA反応は、反応速度定数の値が最大 $k=2\times 10^3\text{ M}^{-1}\text{ s}^{-1}$ と速い反応速度を示す。この反応速度定数は、先ほど挙げたDIFOとベンジルアジド間のHuisgen付加環化反応より50,000倍程度速い。テトラジンライゲーションと呼ばれる本反応は、マウス体内であっても、高用量の試薬を用いることなく、結合形成反応を可能とし、現在までにin vivoでの利用が多数報告されている。

その例として2010年Robillardらは、担がんマウス腫瘍近傍でのテトラジンライゲーションにより、TCOを結合させた抗体に対して、放射性同位体を標識化することに成功している^{ref34} (Figure 20)。すなわち、TCO含有抗体を担がんマウスに尾静脈投与し、腫瘍組織に蓄積させる。一日後、放射性同位体を結合させた低分子のTzを投与することで、腫瘍部位に集積した抗体に放射性同位体が標識される。抗体上のTCOと反応した放射性同位体標識Tzが腫瘍組織内に固定されるのに対して、未反応の放射性同位体標識Tz分子はすぐさま排泄系へと移行し体内には残留しないため、SPECT (Single Photon Emission Computed Tomography) イメージングにて高いコントラストでの腫瘍の可視化を達成している。

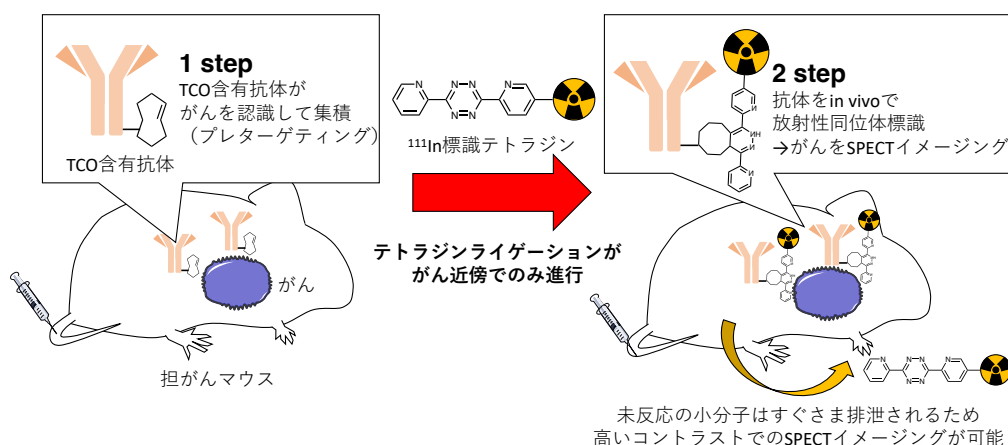


Figure 20. TCO含有抗体によるがんプレターゲティング法とがんイメージング

この背景として、抗体を利用する場合、腫瘍組織への蓄積までの時間が6~24時間以上と長く、予め放射性同位体標識した抗体を直接マウスへ投与した場合には、血中を循環する放射性同位体標識抗体がバックグラウンドになってしまう課題があった。よって本研究は、マウス体内でのクリック反応を用いて、がん診断の精度を向上させる先駆的な研究となった。

さらに近年結合の切断を伴うクリック反応として、Click-to-Release 反応が盛んに利用されている^{ref35} (Figure 21)。本反応では、放出したいアミンを、ウレタン結合を介してTCO

のアリル位に導入した分子に対して、Tz を反応させると、両者の逆電子要請型 Diels-Alder 反応と N₂分子の脱離を伴う逆 Diels-Alder 反応はジヒドロピリダジンを与え、エナミンへの異性化につづいて、芳香族化を駆動力としたアミンのリリースが起こる。本反応は高速かつ高効率に進行することから、この反応を利用して、目的の位置・タイミングでアミンをリリースさせることが可能であり、ドラッグデリバリーシステムへと応用されている。

Click-to-Release

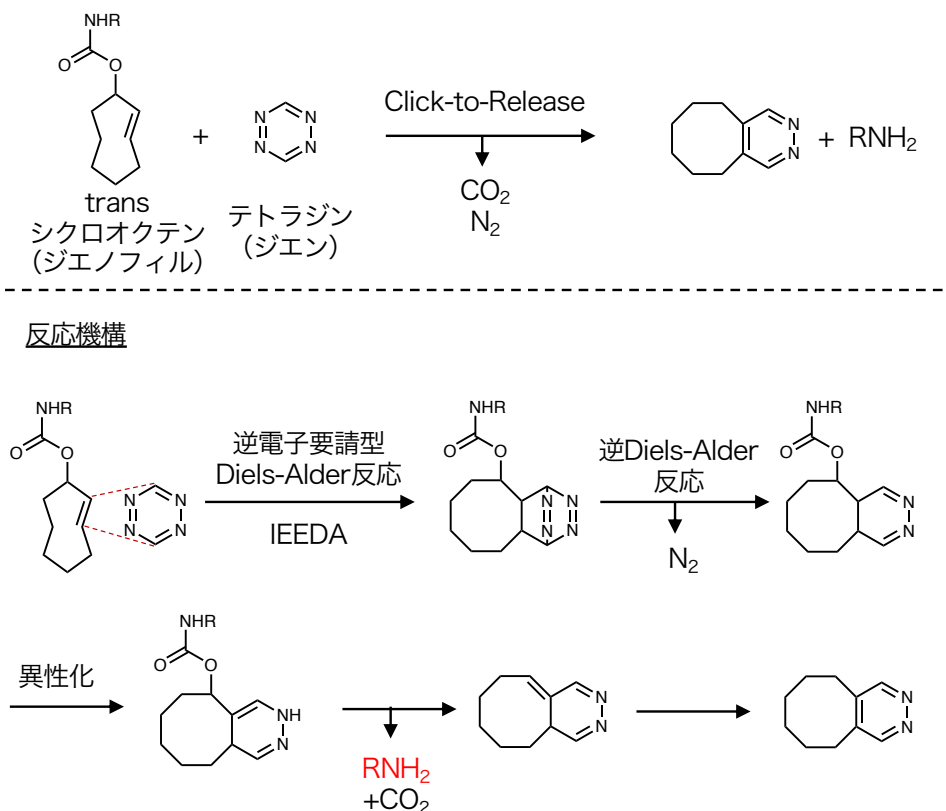


Figure 21. Click-to-Release 反応の概要と反応機構

例えば、Click-to-Release 反応は、抗体薬物複合体(Antibody-drug-conjugate: ADC)からの薬剤リリースにも応用されている^{ref36}。Robillard らは anti-TAG72 mAb CC49 抗体にドキソルビシン (Dox) のアミン部位を、TCO リンカーを介して結合させた ADC を合成した (Figure 22)。この ADC を用いた *in vitro* での反応性試験では、活性化剤となるジメチルテトラジン (DMT) での処理により PBS 中の反応において反応開始からわずか2分以内に 60%以上のドラッグ分子をリリース可能であることが示された。さらに、*in vivo* での Click-to release 反応も実施しており、がん治療効果を得ることにも成功している。

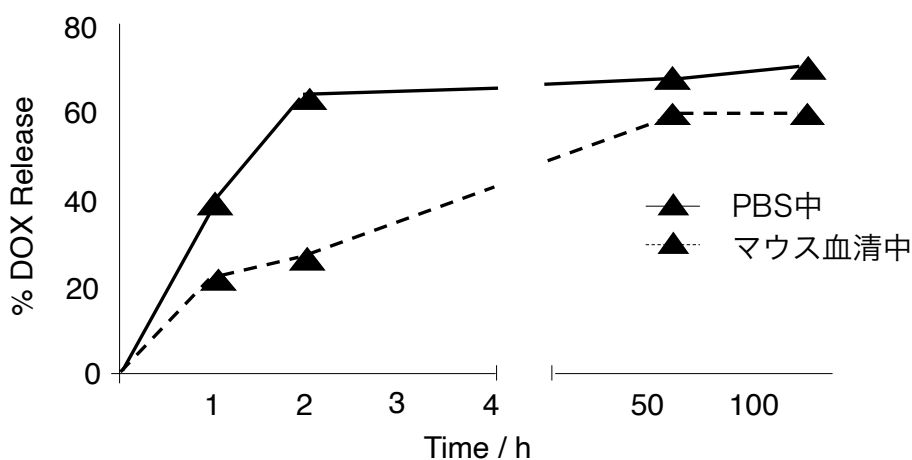
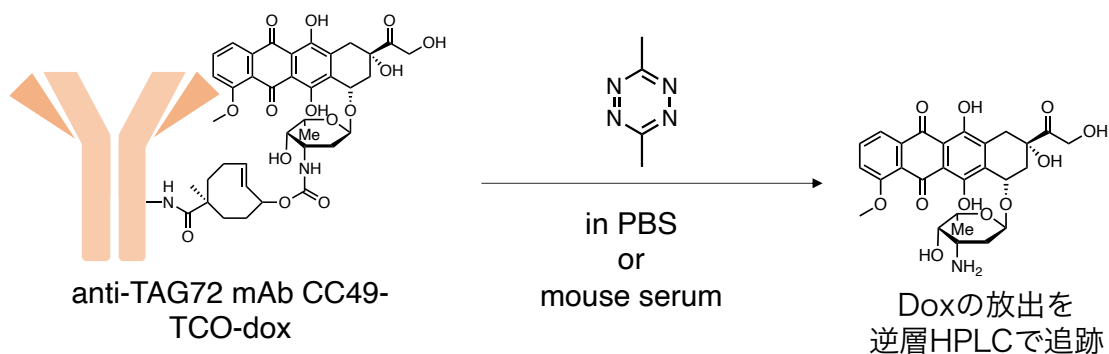


Figure 22. *trans*-シクロオクテンをリンカーとする ADC(薬剤-抗体複合体)を用いたドキシソルビシンのリリース反応の追跡

さらに、Click-to-Release 反応を利用したがん治療法についてヒト体内での利用を検討できるレベルまで発展している。Oneto らは、テトラジンを経結合させた高分子ゲルを腫瘍に直接注射したのちに、薬剤分子の活性部位への TCO の結合により不活性化させた薬剤分子前駆体（プロドラッグ）を投与することで、ヒトの腫瘍組織内で Click-to-Release 反応を進行させ、ドラッグ分子を放出させる手法を開発した（**Figure 23**）。現在 Phase II の試験が進行中であり^{reB7}、Proof of Concept を証明する段階ではあるが、もしこの CAPAC 戦略を用いた治療法が承認されれば、ヒト体内で生体直交性反応を用いて治療を行う最初の例となり、より本反応の活用が推進されることは明白である。つまり、本反応は *in vivo* においても、タンパク質などの生体分子に TCO リンカーを介して導入した分子をリリースする最も強力な手法である。

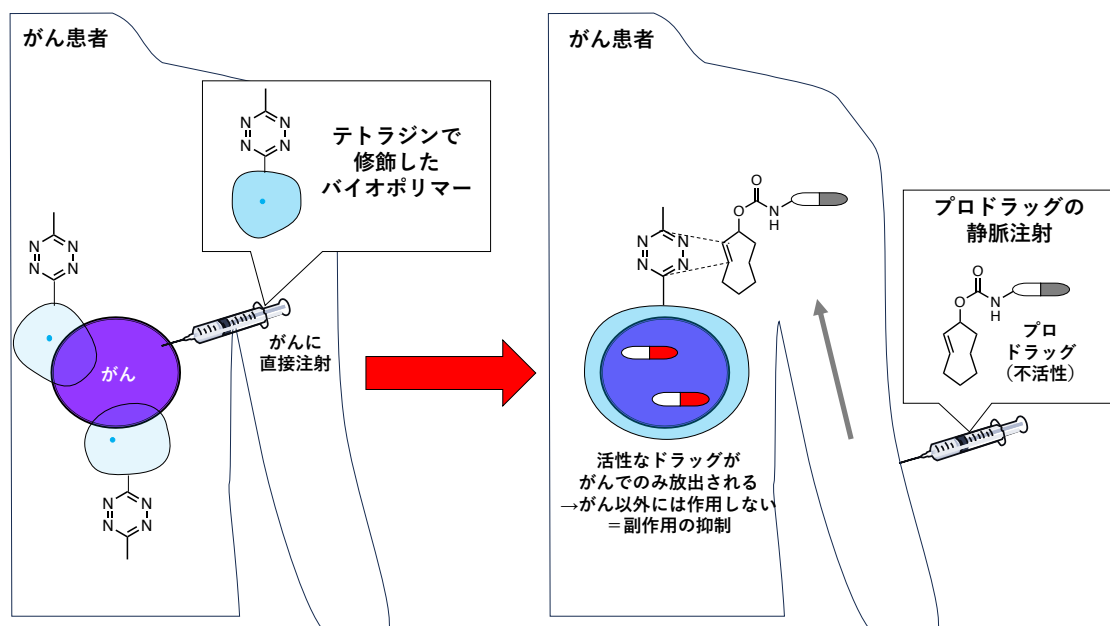


Figure 23. 生体内 Click-to-Release 反応によるプロドラッグ活性化を利用したがん治療戦略

第三節 本研究の目的

これまでに述べたように、著者らの研究室ではこれまでに、「膀胱」や「腸管」など排泄経路を制御する糖鎖パターンや、種々のがん細胞へ強い認識を示す糖鎖パターンを見出している。よって、もしこれらの糖鎖パターンを生体内で制御することができれば、糖鎖アルブミンを生体内で移動させることができると考えた。また、アルブミン上で糖鎖パターンを変更可能な手法として、Click-to-Release 反応に着目し、この反応が *in vivo* での利用が可能な強力なクリック反応であることを述べた。

以上の背景を踏まえて本研究では、糖鎖アルブミン上に構築した糖鎖パターンを、Click-to-Release 反応を用いて生体内で変更することで、排泄経路の制御及び「がん」から他の臓器への移動を実施し、「糖鎖アルブミンの標的から新たな標的へと体内移動」を実証することを目的として位置付けた。

もし、生体内を移動する糖鎖アルブミンが実現すれば、体内の複数の疾患部位を同時に診断・治療する新たな医療技術へと展開できると考えられる。これまでに生体内で利用されている疾患診断デバイスとして、例えば、消化器系を移動して観察するカプセル内視鏡が挙げられるが、体内への投与から排泄までの動態を制御することはできない。より精密な診断やデバイス本体から生じうる副作用を回避するといった観点から、体内動態を制御する移動型カプセル型デバイスの実現が期待されているが、体内移動のエネルギーの確保・デバイスの小型化・診断または治療機能の複合化などの課題がある。また、サイズの観点から血管内を移動させることは物理的に不可能であり、アクセスできる部位に限りがある。

さらに著者らの研究室では、アルブミンの人工金属酵素化研究を実施してきた ^{ref38} (**Figure 24**)。すなわち、アルブミンの疎水性ポケットに親和性を持つリガンドと遷移金属触媒を結合させた分子をアルブミンに作用させると、遷移金属触媒がアルブミン疎水性ポケットに内包され、生きた細胞や動物体内で遷移金属触媒の活性が保持されることを見出した。

さらに、糖鎖修飾によるがんターゲティングと組み合わせ、がん現地での遷移金属触媒反応によるがん診断・治療研究へと発展させ、**Figure 24** に示した生体内合成化学治療・細胞タギング治療の二つの診断・治療方法をすでに確立している。例えば、生体内合成化学治療では、遷移金属触媒反応により抗がん剤分子をがん近傍でのみ合成することで、がん以外には作用しない（副作用のない）化学療法を行い ^{ref39}、細胞タギング治療ではがん表面上に存在する求核性置換基を利用した遷移金属触媒反応により、がん細胞に対して機能性分子を直接導入し、治療へと展開した ^{ref40}

この人工金属酵素研究における重要な発見は、アルブミンに内包された遷移金属触媒が実際に触媒としての機能を保持していたことである。すなわち、遷移金属触媒の生体内利用においては、チオール基を含み細胞内に高濃度で発現するグルタチオンによって、遷移金属触媒がすぐさま失活してしまうことが大きな課題であるが、著者らの人工金属酵素で

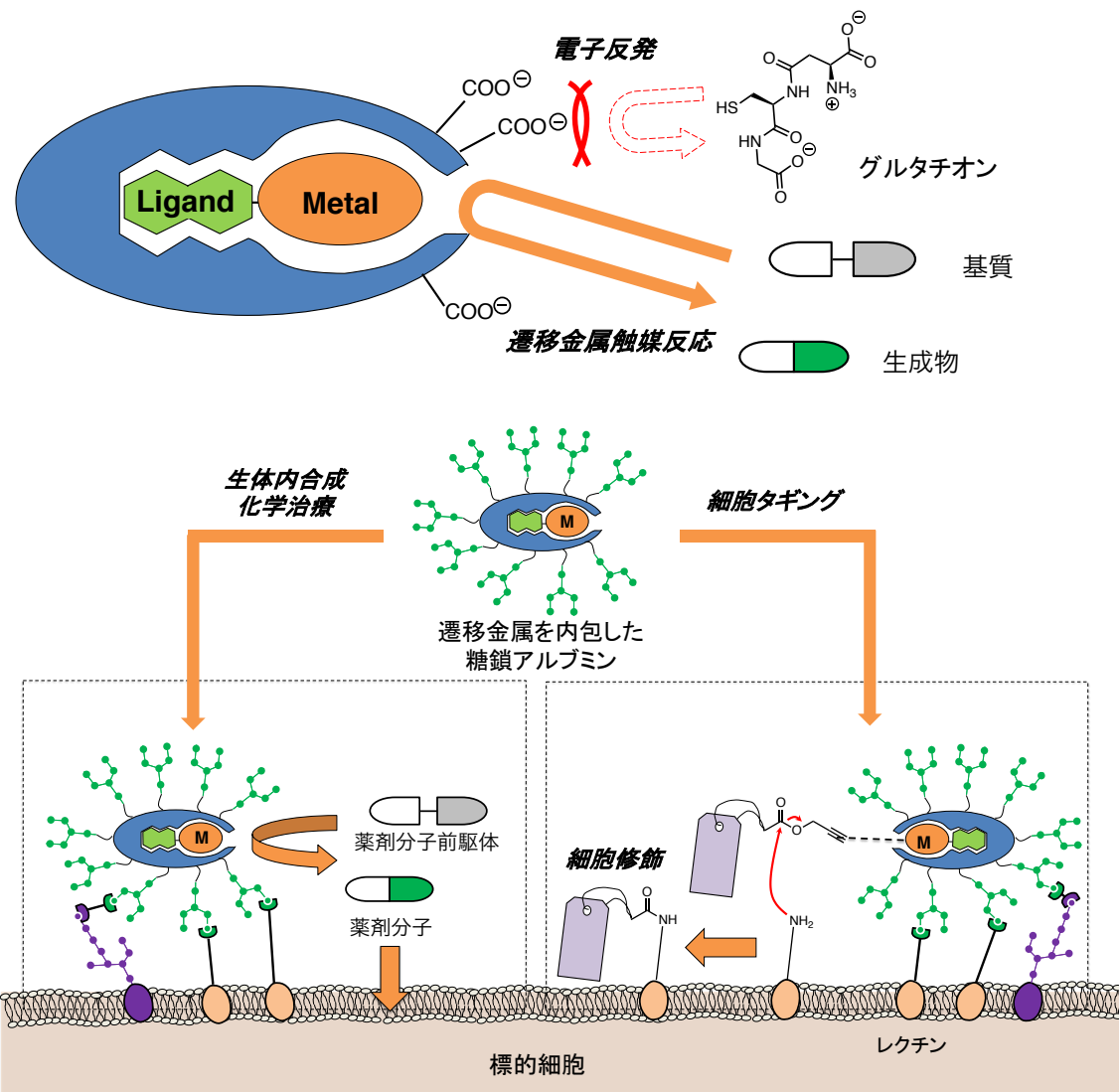


Figure 24. アルブミンの人工金属酵素化と生体内合成化学治療および細胞タギング治療の概念図

はアルブミン疎水性ポケット内で触媒活性が保護され、細胞内やマウス体内でも触媒的な遷移金属触媒反応が可能であった。よって、アルブミンの生体へ移動が実現すれば、この人工金属酵素を生体内で二つの疾患部位へと送達し、遷移金属を触媒的に二箇所へ展開できる。

第四節 本論文の概要

本論文は、「生体内化学反応を利用した糖鎖パターン認識制御により動物体内を移動する糖鎖アルブミン分子の開発」と題し、序論および本論、結論で構成されている。また、本論は二章構成となっている。

序論では、糖鎖の多価効果と不均一効果について、これら二つの効果に関する研究を交えて概説したのち、著者らの研究室で実証した糖鎖パターン認識について述べた。ここで著者は、「糖鎖パターンの変化に鋭敏に応答し認識を変化させる」特徴を活用することで、生体内を移動する分子デバイスを実現できるのではないかと着想し、本研究の目的として位置づけた。

第一章「生体直交性基を導入した糖鎖アルブミンの合成および糖鎖付け替え反応」では、アルブミンに生体直交性基を導入した糖鎖アルブミンと、糖鎖テトラジンをそれぞれ合成し、両者の反応により、糖鎖パターンの付け替え反応を検討した。

第一節「研究背景および糖鎖アルブミン分子の体内移動計画」では、click-to-release反応を用いたアルブミンの体内移動戦略の詳細について述べた。

第二節「*trans*-シクロオクテンを有する糖鎖アルブミンの合成・評価」では、体内移動型糖鎖アルブミンおよび移動のトリガー分子となる糖鎖テトラジンをそれぞれ設計・合成した。すなわち、生体直交性基として *trans*-シクロオクテンを導入した糖鎖アルブミン分子と、tetrazine が結合した糖鎖分子をそれぞれ調製した。

第三節「糖鎖付け替え反応の検討」では、*trans*-シクロオクテンを導入した糖鎖アルブミン分子と tetrazine が結合した糖鎖分子を用いて、水溶液中あるいはマウス血液溶媒中での糖鎖付け替え反応を検討した。また、小分子のモデル化合物を用いた糖鎖付け替え反応を HPLC にて追跡することで、糖鎖付け替え反応に関する速度論的な調査を実施した。

第二章「生体条件下での糖鎖付け替え反応と体内移動の検討」では、in vitro 及び in vivo での調査を行なった。

第一節「細胞系中での糖鎖付け替え反応の検討」では、まず HepG2 細胞および SW620 細胞系中での糖鎖付け替え反応を、対照実験を含めて実施し、細胞に対する相互作用の変化を反応前後で比較し、糖鎖付け替え反応の進行を確認した。また、共焦点顕微鏡を用いて、糖鎖アルブミンの細胞局在に関する知見を得た。

第二節「動物体内での糖鎖付け替え反応の検討」では、マウス体内での糖鎖付け替え反応を実施した。すなわち、マウス体内で蛍光修飾糖鎖アルブミンの糖鎖付け替え反応を実施し、蛍光イメージングにより糖鎖アルブミンの体内動態の変化を追跡した。まず、マウス血中内に投与した糖鎖アルブミンに対する糖鎖付け替え反応を実施し、糖鎖アルブミンの「血中」から「腸管」への移動、および「膀胱」から「腸管」への排泄経路の切り替えを検討した。また、腫瘍組織内での糖鎖パターン更新反応により、「がん」から「腸管」への移動を検討した。

本論

第一章 生体直交性基を導入した糖鎖アルブミンの設計・合成および反応性の評価

序論では、糖鎖の多価効果と不均一効果からなる糖鎖パターン認識を Click-to-Release 反応により制御することで、「糖鎖アルブミンの標的から新たな標的への移動」の実現を目指すことを述べた。第一章第一節では、糖鎖アルブミンの体内移動計画について、Click-to-Release 反応の利用法、用いる糖鎖とその標的を含めた詳細を述べる。

第一節 糖鎖アルブミンの体内移動戦略の概要

序論で述べたように、Click-to-Release 反応では、テトラジンライゲーシオンと呼ばれる TCO と Tz 間の付加反応に続いて、アミンのリリース反応が進行する。これまでの Click-to-Release 反応の利用においては、例えば薬剤分子や蛍光分子のリリースによる薬剤分子や蛍光分子の活性のスイッチングのように、リリース段階のみが注目されてきた。一方で、すでに述べたように、テトラジンライゲーシオンによって生体分子のラベリングが可能であることを考慮すると、Click-to-Release 反応では、新たな分子の導入と古い分子のリリースを同時に進行させることができると考えた。この糖鎖付け替え反応の反応機構の詳細を示す (Figure 25)。

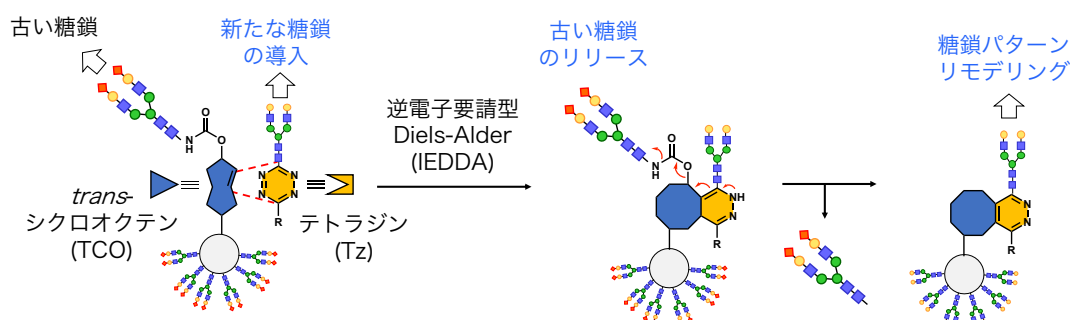


Figure 25. 糖鎖アルブミン上での Click-to-Release 反応による糖鎖付け替え戦略の概要

まず、TCO を導入した糖鎖アルブミンと、新たに結合させたい糖鎖を有する Tz を作用させると、まずテトラジンライゲーシオンによって、アルブミン上に新たな糖鎖が付与される。続いて、TCO 基と結合した「追い出したい糖鎖」がアルブミンから放出される。以上の二段階の反応によって、アルブミン上に新しい「糖鎖パターン」が作成される。実際に糖鎖アルブミンを移動させる際には、糖鎖アルブミンが動物体内で標的と相互作用している状況で、この糖鎖付け替え反応を実施する。反応の進行に伴って標的に対する相互作用が変化し、標的から糖鎖アルブミンが乖離するとともに、新たな標的への認識が発現し、標的から新たな標的へと、糖鎖アルブミンが移動すると考えられる。

次に、序論で示した糖鎖アルブミンの体内動態を参考にして、「血中やがん」から「腸管」へ糖鎖アルブミンを移動させる計画を立てた (Figure 26)。まず「血中」から「腸管」への糖鎖アルブミンの移動について詳細を述べる。すなわち、アルブミンの血中安定性を

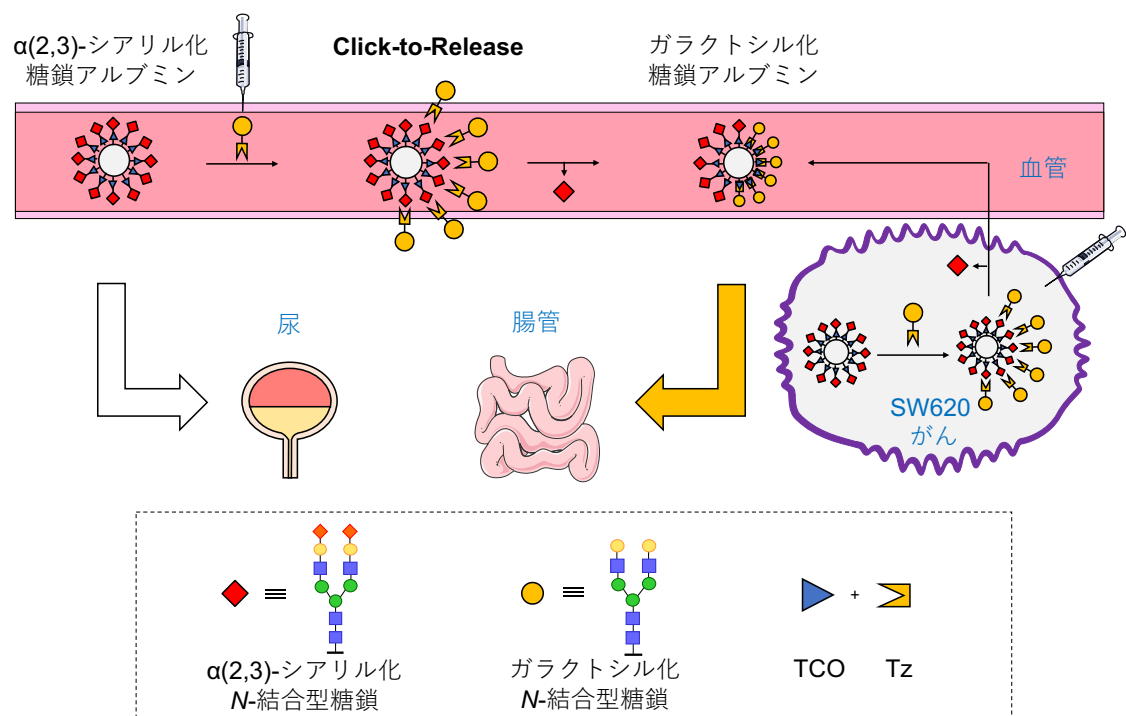


Figure 26. 動物体内での糖鎖付け替えによる糖鎖アルブミンの体内移動計画の概要

向上させる $\alpha(2,3)$ -シアリル化糖鎖から、腸管への移行と便排泄を促進するガラクトシル化糖鎖アルブミンへと糖鎖を付け替えることで、「血中」から「腸管」へと糖鎖アルブミンが移動すると考えた。この際、糖鎖アルブミンの排泄経路がシアリル化糖鎖アルブミンの尿排泄から、ガラクトシル化糖鎖アルブミンの便排泄へと切り替わると考えられる。よって、マウス体内で TCO を含むシアリル化糖鎖アルブミンとガラクトシル化Tz を反応させて体内動態を調査し、糖鎖付け替え反応を実施しない条件および予め反応実施済みの糖鎖アルブミンを投与する条件をコントロールとして結果を比較することで、糖鎖付け替え反応・糖鎖アルブミンの体内移動を確認する。

続いて「がん」から「腸管」への糖鎖アルブミンの移動について詳細を述べる。

「SW620 がん」と強く相互作用するシアリル化糖鎖アルブミンに対して、ガラクトシル化糖鎖アルブミンへと糖鎖付け替えできれば、SW620 がんへの強い相互作用は失われ、糖鎖アルブミンはがんから離れる。糖鎖アルブミンに新たに導入されたガラクトシル化糖鎖はアルブミンを腸管へと移行させる。よって、腫瘍組織内で糖鎖付け替え反応が進行すれば、「がん」から「腸管」へとアルブミンが移動すると考えられる。糖鎖アルブミンの体内動態をコントロール条件と比較することで、糖鎖付け替え反応の進行と腸管への移動を確認することとした。

第二節 *trans*-シクロオクテンを有する糖鎖アルブミンの合成・評価

第一章第一節では、糖鎖アルブミンの糖鎖付け替え反応により、「血中やがん」から「腸管」へ糖鎖アルブミンを移動させる計画を述べた。本章の第二節ではこの *trans*-シクロオクテン (TCO) 含有糖鎖アルブミンを合成するために必要な糖鎖修飾クリックプローブの構造設計・合成およびアルブミンの糖鎖修飾と糖鎖アルブミン上での TCO の反応活性評価について述べる。

2-1. *trans*-シクロオクテン含有糖鎖修飾プローブの設計

TCO を有する糖鎖アルブミンを設計するにあたり、以前に我々が開発した糖鎖修飾理研クリックプローブを参考にした^{ref41}。その構造を **Figure 27** に示す。本プローブは、理研クリック部位・ジベンゾシクロオクチン(DBCO)部位・*N*-結合型糖鎖から構成されている。

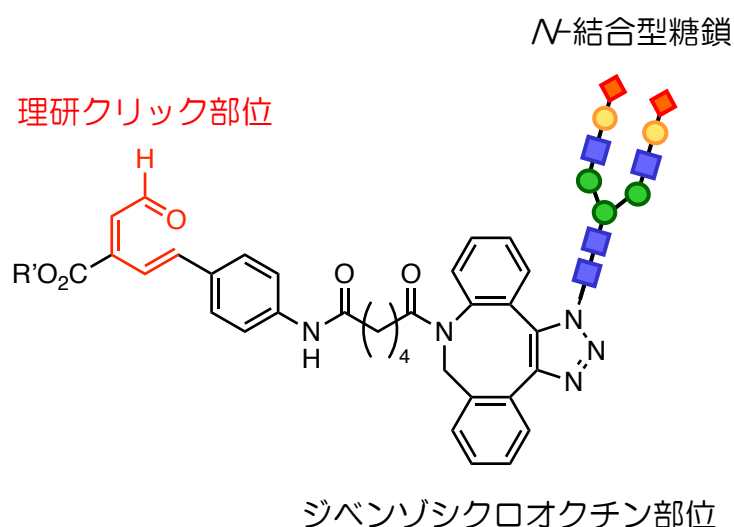


Figure 27. 以前の糖鎖修飾プローブの構造

理研クリックアルデヒドは、4 位にエステル基、6 位に Ph などの共役基が置換された 1-オキサ-トリエンからなる。第一級アミンとの縮合により得られる共役イミンの 6π -アザ電子環状反応により、1,2-ジヒドロピリジンを生成物として与える (**Figure 28**)。本反応は、4,6 位の置換基効果により、水中・37°C という生理条件下であっても、高速かつ温和に不可逆的な反応を進行させる。そのため、タンパク質中のリジン残基側鎖の第 1 級アミンに対して、低濃度・温和かつアミン選択的に修飾反応を行うことができた。例えば、蛍光基を導入した蛍光修飾プローブを細胞に対して用いると、わずか 10 nM という低濃度条件下でも蛍光修飾反応が進行することを示しており、強力なリジン残基修飾の手法であるといえる^{ref25}。一方で理研クリックアルデヒドに様々な機能性分子を導入するための足場として用いたのが DBCO 基である。DBCO 基は大きな歪みを有する八員環化合物であり、アジド化合物との Huisgen 付加環化反応が無触媒で進行することが知られ、*in vitro* および *in vivo* でも利用される^{ref42}。そのため、予め理研クリック部位と DBCO 基を結合し、ここにアジド

理研クリック反応

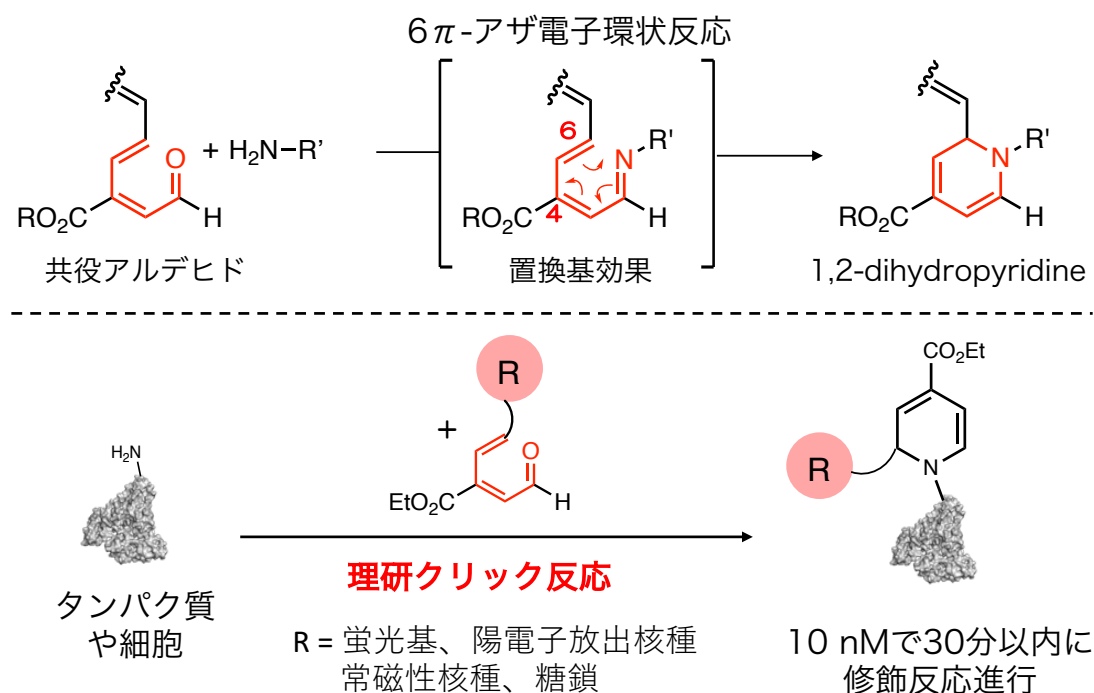


Figure 28. 理研クリック反応によるタンパク質や細胞表面の修飾

基を導入した種々の機能性分子を作用させることで、高反応性の理研クリックアルデヒドを損なうことなく、Huisgen付加環化反応が進行する。得られた機能性分子含有理研クリックアルデヒドを用いることで蛍光基放射性同位体、糖鎖などを容易にタンパク質や細部表面へ導入できた^{ref25} (Figure 29)。

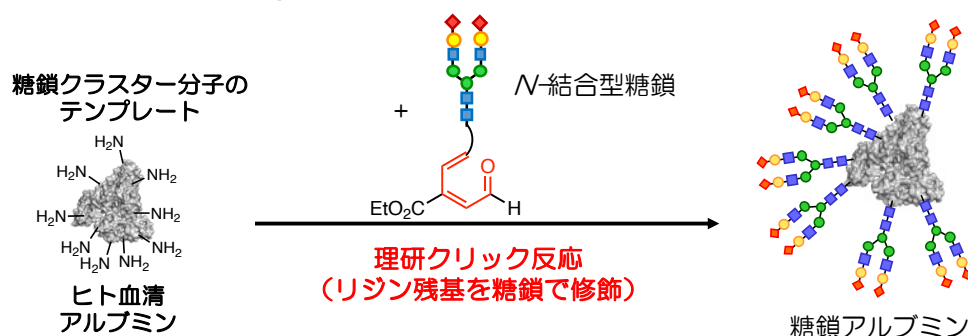


Figure 29. 理研クリック反応によるヒト血清アルブミンのN-結合型糖鎖修飾

本研究においては、糖鎖アルブミンに生体直交性基としてTCOを導入し、糖鎖をアルブミンからリリースする必要があるため、以前の糖鎖修飾プローブの構造に対してTCOを組み込んだ**1**を設計した (Figure 30)。TCO部位には、Robillardらが開発した二官能基性TCO誘導体**2**を用いた^{ref35}。本誘導体に対して、アリールアルコール部位にリリースしたい糖鎖を

導入し、カルボン酸部位を利用してアルブミンを修飾する計画である。実際には、TCO 誘導体 **2** と DBCO アミン **3**^{ref42} の縮合によりウレタン結合を形成し、続いて TCO 誘導体 **2** の立体的に嵩高いカルボン酸部位へ共役アリアルアルコール部位を有するアミン **4**^{ref41} を縮合させたのち、アリアルアルコール部位を理研クリックアルデヒドへと酸化させ、最後に DBCO 部位と糖鎖アジド **5** の Huisgen 付加環化反応を行うことで、TCO 含有糖鎖修飾プローブを合成する計画を立てた。

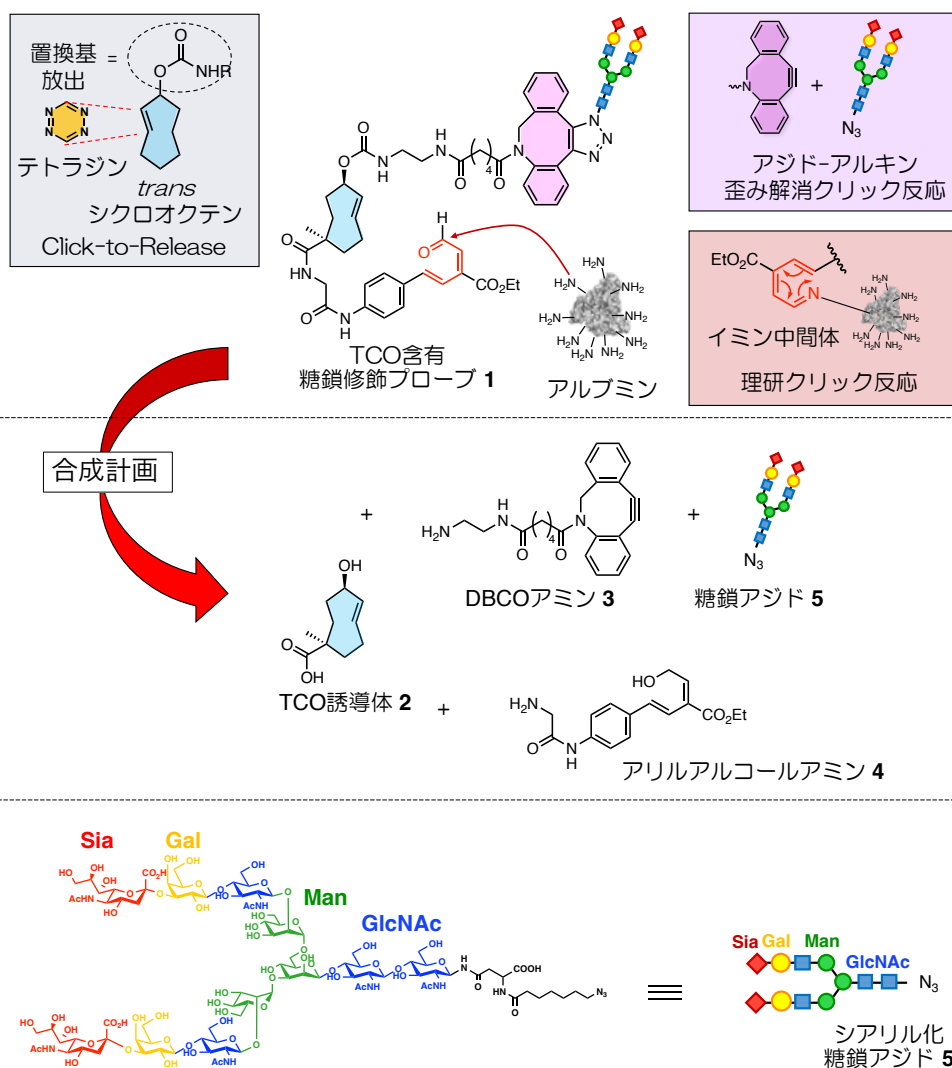


Figure 30. TCO 含有糖鎖修飾プローブの構造と合成計画

2-2. *trans*-シクロオクテン含有糖鎖修飾プローブの合成

まず既知の合成スキームに従い TCO 誘導体 **6_{ax}** を合成した^{ref43} (Figure 31)。まず、市販の 1,5-シクロオクタジエン **7** を、臭素化体 **8** を経由してシアノ体 **9** とし、これを加水分解することでカルボン酸 **10** へと導いた。続いて、カルボン酸 **10** の α 位をメチル化した **11** に変換後、ヨードラクトン化により **12** を得た。生じたヨード基を、DBU を用いる条件で脱離させラクトン **13** を合成した。ラクトンの加水分解によって得られるカルボキシラートを、ワンポットでそのままアルキル化することでメチルエステル **14** への変換を既知の条件にて試みた。しかし、この反応においては目的物と共に出発物のラクトンおよびヒドロキシ基もメチル化された生成物が得られ、収率の再現性が得られなかった。過剰の塩基の存在により水酸基が脱プロトン化されることで、再ラクトン化またはメチル化が引き起こされていると考え、加水分解後、酸処理によりカルボン酸として回収した。その後メチル化反応を一等量の塩基を用いて行ったところ副反応を抑え、光異性前駆体となる **14** を収率・再現性よく得ることができた。最後に **14** に対して光照射による異性化反応を行った。詳細は次に述べるが、生成物は axial 体 **6_{ax}** と equatorial 体 **6_{eq}** の配座異性体混合物として得られた。両者はカラムクロマトグラフィーによる単離が可能であり、(\pm)-**6_{ax}** を 15%、(\pm)-**6_{eq}** を 20% の収率でそれぞれラセミ体として得た。

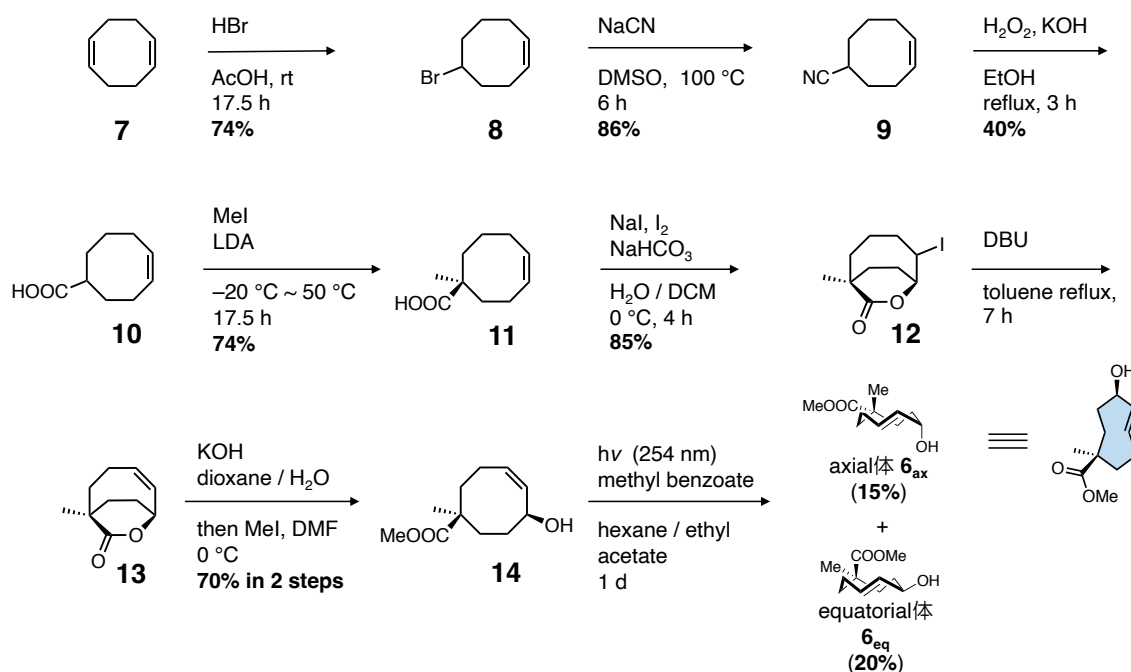


Figure 31. TCO 誘導体の合成経路

先ほど述べた光照射による **14** の異性化反応の詳細について以下に述べる。光増感剤存在下で紫外光を照射するオレフィンの光異性化については古くから知られているが、TCO の

場合にはその大きな歪みによる *cis* 体への逆反応や *trans* 体の不安定性から、通常の光異性化条件では目的物はほとんど得られない^{ref44}。この問題を解決する方法として *trans* 体に対して選択的に錯体形成する銀塩を用いる特殊な反応設計が報告されている。すなわち、送液ポンプと AgNO₃ 修飾シリカゲルカラムを組み合わせた反応装置を用いることで、光異性化を受けた TCO のみが銀錯体を形成し、これがカラム中にトラップされ反応系から除外されるため、光異性化生成物を効率よく得ることができる^{ref45}。AgNO₃ は *cis*, *trans* どちらのオレフィンに対しても錯体を形成し、オレフィンの π 電子が Ag の d*軌道に逆供与されることにより安定化することが知られている。中でも八員環中に *trans* 配置の二重結合を含み、高度な歪みを有する *trans*-シクロオクテンは、AgNO₃ との錯体形成により π 電子の逆供与により二重結合性が減少して歪みが緩和されるため、より強い錯体を形成すると考えられる。

本反応系では、これまでに光源として高価な装置が用いられてきた。本光源は光強度が高く反応の高効率化が望める一方で、用途が非常に限定的である。一方で有機合成の研究室で一般的に用いている 254nm の光源としては、TLC 分析用の紫外線ランプが挙げられる。よって、TLC 分析用の光源・HPLC 用のポンプ・石英ガラス製の三角フラスコを用いて簡易的な光異性化装置を構築し、14 の光異性化反応を実施した (Figure 32)。反応時間が 72 時間の場合でも axial 体 **6_{ax}** の収率が 15% と反応効率には課題が残るものの、高価で用途の限られる光照射装置を用いることなく、TCO 誘導体を得ることができた。また本反応では、TCO の立体配座異性体が混合物として得られた。TCO 環の高度な歪みにより環構造が反転できないために、両配座異性体が別々に観測可能となっていると考えられる。実際に両異性体はシリカゲルカラムクロマトグラフィーにて分離可能であった。さらに、加水分解反応により反応性の高い axial 体のみがカルボン酸誘導体へと変換されることで、反応終了後分液操作のみで両者を分離することも可能であった。また、両配座異性体のうち axial 体の方が、テトラジンとの Click-to-Release 反応に対してより反応速度定数が 2 倍程度大きい値を示すことが知られており^{ref45}、こちらを利用することとした。

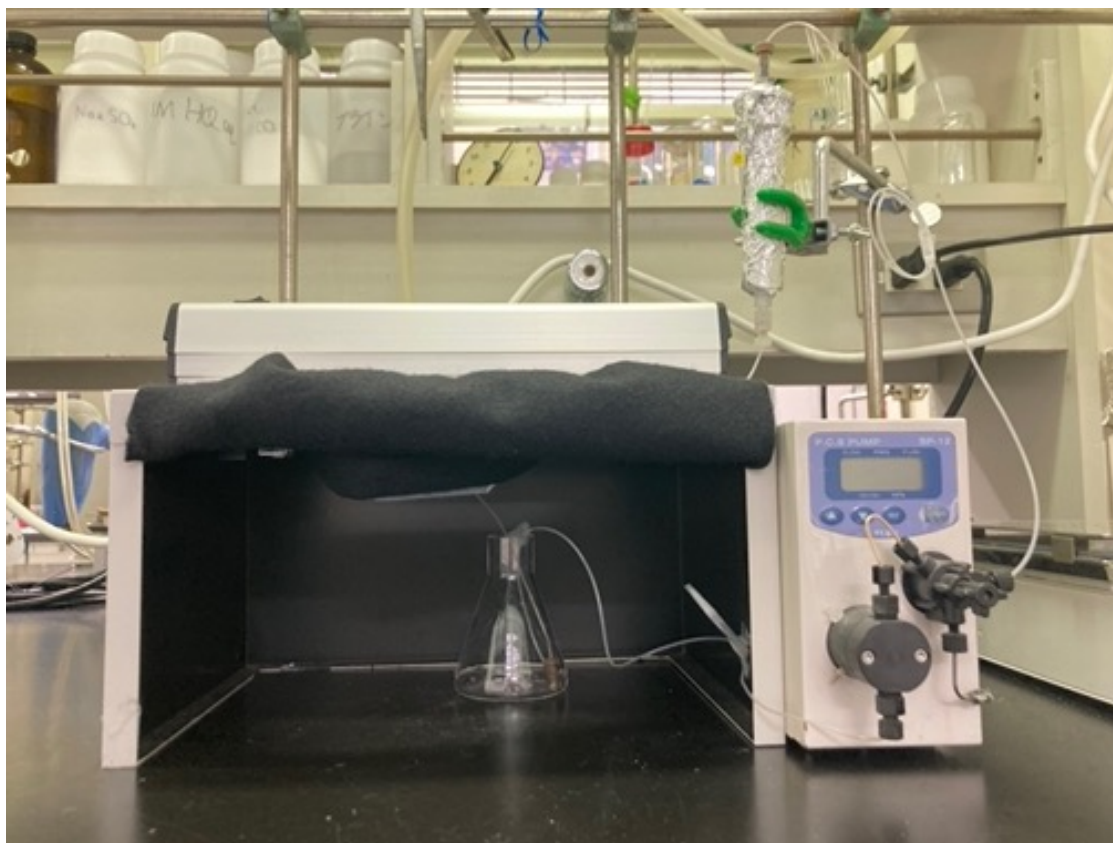
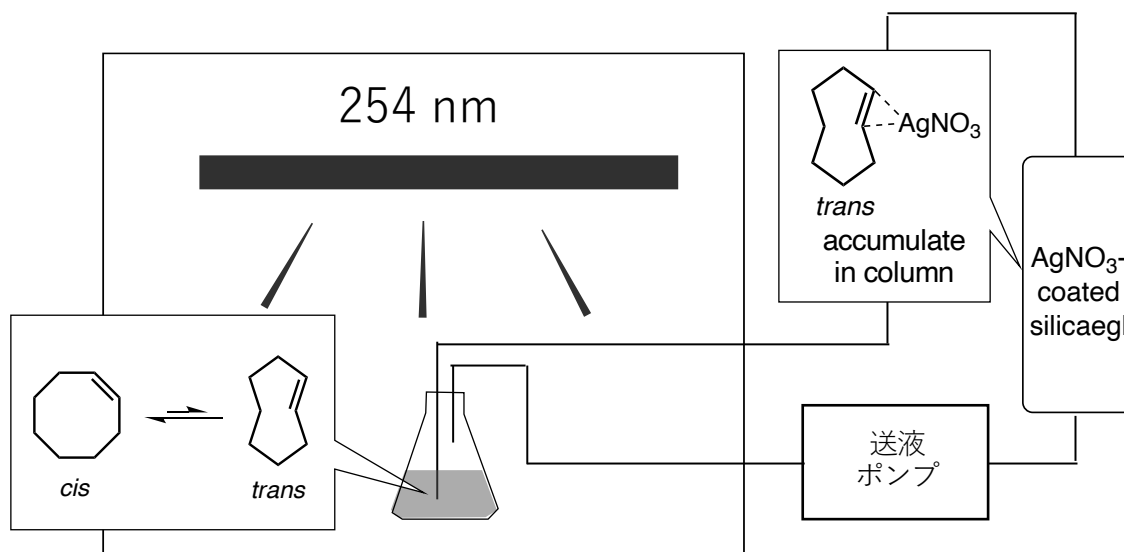


Figure 32. 光異性化装置の概要と実際に用いた装置

続いて、TCO 基に導入する DBCO アミン **3** の合成を行なった。DBCO カルボン酸 **15** に対して、エチレンジアミンを縮合させることで DBCO アミン **3** を合成した (Figure 33)。エチレンジアミンの二カ所のアミン部位に対して縮合しうることから、エチレンジアミンの等量を第過剰である 20 等量に設定することで、収率 75% で **3** へと変換できた。

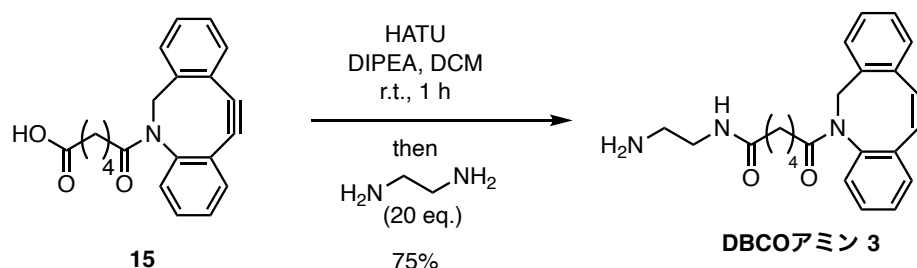


Figure 33. DBCO アミン **3** の合成

続いて、共役アリルアルコール部位を有するアミン **4** の調製に取りかかった (Figure 34)。アニリン **16** に対して、*N*-Boc グリシンを縮合させ、*N*-Boc アミド **17** を収率 70% で得た。この際、DMAP を用いた場合には、アリルアルコール部位に縮合したエステル **18** が収率 55% で主生成物として得られたことから、条件によって反応位置が変化することが明らかとなった。続いて **17** の Boc 基の除去を試みた。TFA 条件または塩酸条件で反応を試みたところ反応が進行して原料が消失し、ESI-TOF-MASS からも目的物の生成は確認できるものの、**4** の単離には至らなかった。

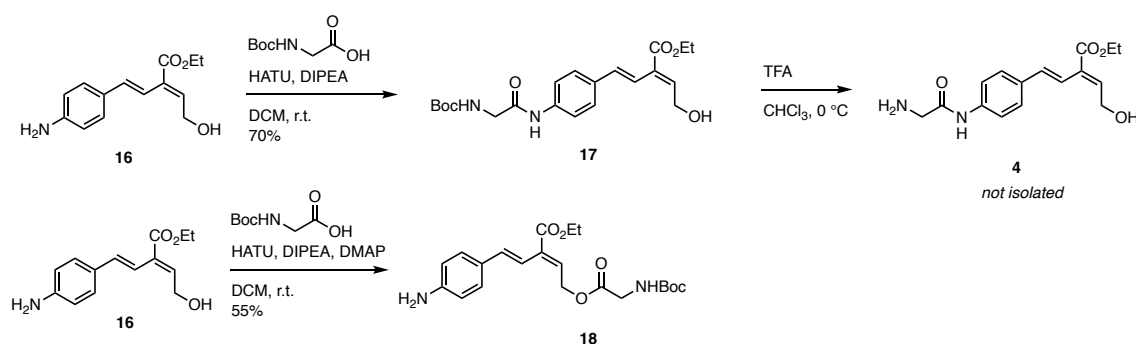


Figure 34. 理研クリックアルコール **16** と *N*-Boc グリシンの縮合

よって、アミン **4** を経由しない合成経路として、グリシン部位を先に TCO 部位へと縮合した後にアニリンを縮合させることとした (Figure 35)。すなわち(±)-**6_{ax}** を収率 80% で加水分解したのち、得られたカルボン酸 **19** に対してグリシンメチルエステルを縮合したところ、収率 88% でメチルエステル **20** を得た。続いてアリルアルコール部位に対してクロロギ酸 *p*-ニトロフェニルを作用させることで、収率 88% で炭酸エステル **21** へと変換した。ここに

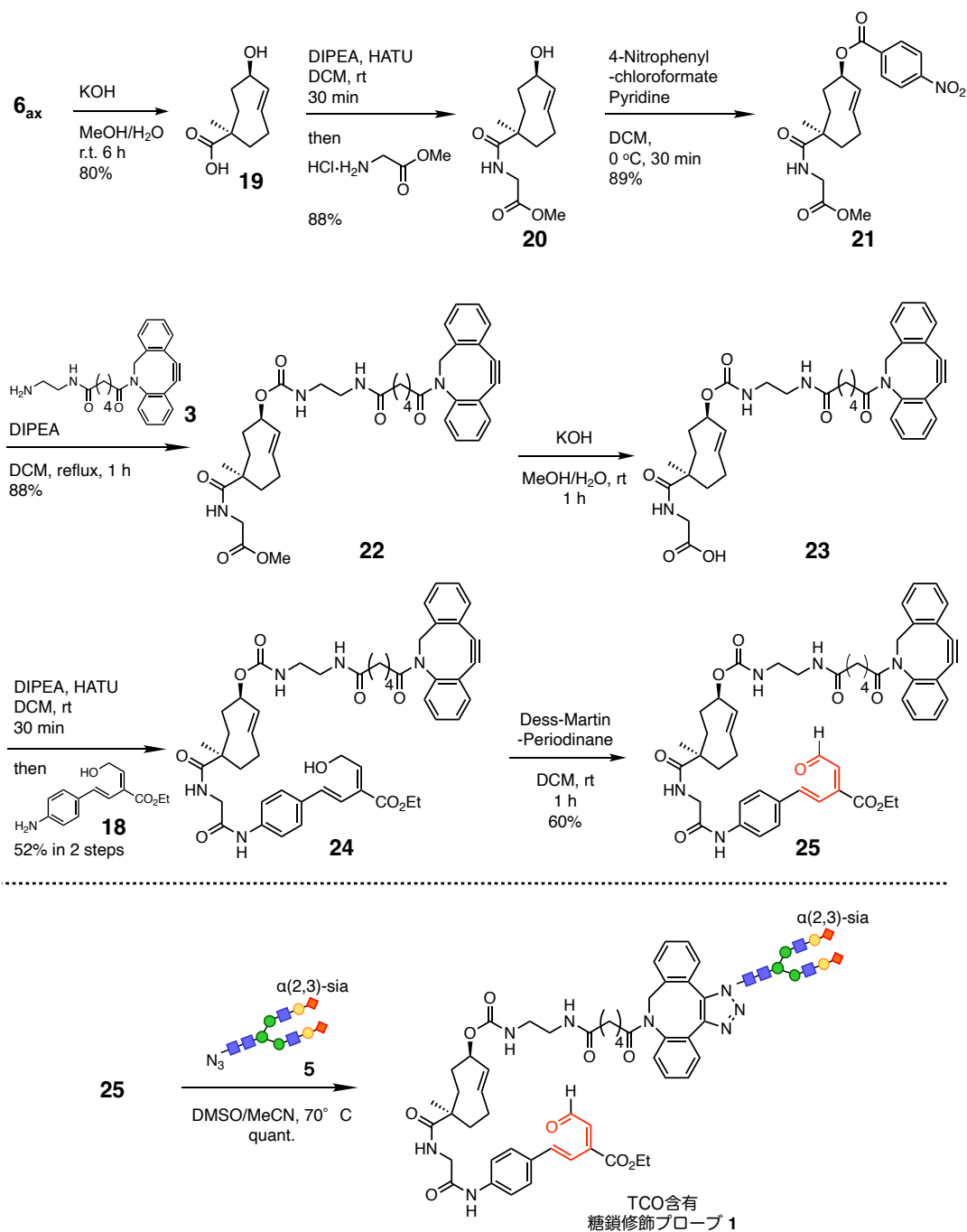


Figure 35. TCO 誘導体 6_{ax} から糖鎖修飾プローブ **1** までの合成経

DBCO アミン **3** を作用させたところ、収率 89% でカーバメート結合を介して DBCO 基が導入された **22** が得られた。続いてメチルエステル部位を加水分解し **23** としたのち、得られたカルボン酸に対して酸塩化物法を用いてアニリン **16** を縮合させたところ、二段階収率 52% で目的のアリルアルコール **24** へ導いた。

TCO に対して DBCO 部位およびアリルアルコール部位を導入できたため、残すは理研クリックアルデヒドへの酸化および糖鎖の導入である。まず、アリルアルコール **24** に対して

デスマーチンペルヨージナンを作用させると、共役アルデヒドへの酸化反応が進行し、理研クリックアルデヒド **25** が得られた。生成物は光・シリカゲルでの精製に対して不安定であったため、遮光下で分液およびエバポレーションを行った。¹H NMRにて 10 ppm 付近の理研クリックアルデヒド **25** に相当する領域に一本のピークを確認し、不純物のピークは確認できなかった。よって、次の反応にそのまま用いることにした。

続いて歪み解消型のクリック反応によって、糖鎖の導入を検討した。すなわち、**25** に対して 1.7 等量の糖鎖アジド **5** を、ジメチルスルホキシド/アセトニトリル混合溶媒中、70 °C で反応させた。3 時間後の ESI-MASS 測定から糖鎖修飾プローブ **1** と糖鎖アジド **5** に相当するピークを検出した一方で、**25** および **5** のピークが消失し、反応が完結したことを確認した (Figure 36, 37)。

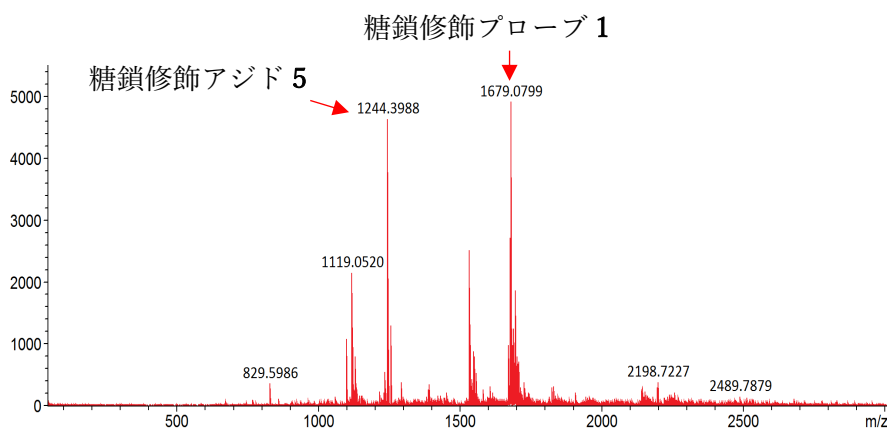


Figure 36. 糖鎖修飾プローブ **5** への変換における ESI-MS 分析

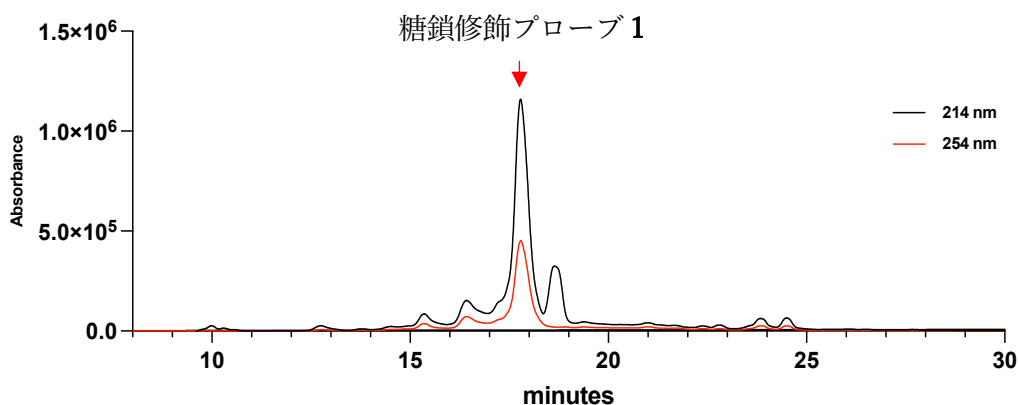


Figure 37. 反応開始3時間後の反応混合のHPLC分析

ここで、**1** 以外にも不純物のピークが観測されているが、これはアルデヒド **25** の段階でカラム精製を行っていないことに由来するピークであると考えられる。また、反応 3 時間後の HPLC 分析から、18 分付近に新たなピークを検出した (Figure 37)。このピーク部分を

分取し ESI-MASS 測定を行ったところ糖鎖修飾プローブ **1** に相当するピークを検出した (Figure 38)。以上の結果から, Huisgen 付加環化反応が進行し, TCO-糖鎖修飾理研クリックプローブを合成できた。

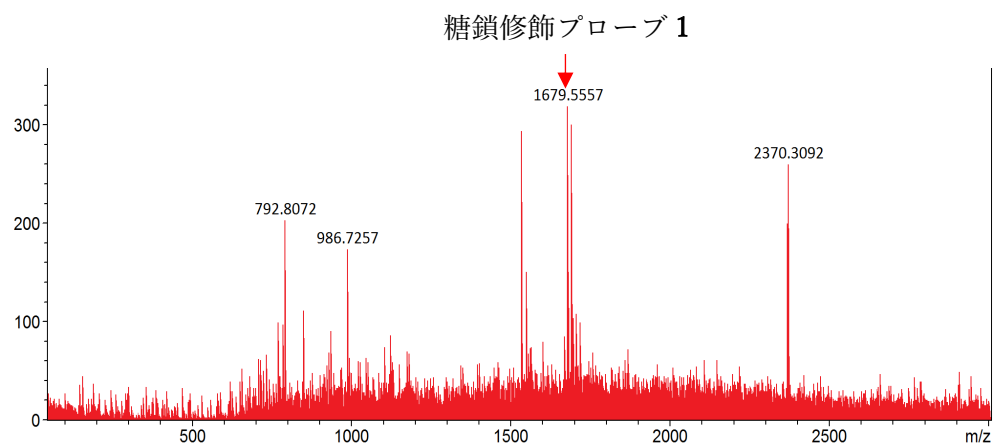


Figure 38. 糖鎖修飾プローブ **1** の ESI-MASS 分析

2-3. ガラクトシル化糖鎖テトラジン化合物の設計

続いて、糖鎖付け替えに必要なガラクトシル化糖鎖 Tz の構造設計について述べる。これまでに Click-to-Release におけるテトラジンの置換基効果が研究されており、電子求引基がテトラジンライゲーションを加速する一方で、リリース反応が阻害されることがわかっている。一方で、本研究で用いる二官能性の TCO 誘導体においては、置換基効果の詳細は明らかとなっていない^{ref45}。そのような中で、序論にも述べたとおり Oneto らは Me 基と Ar 基が置換したテトラジンを高分子ゲルに結合させることで、ヒト体内での Click-to-Release 反応による臨床試験を実施中である。この Me, Ar 置換テトラジン含有高分子ゲルを用いた *in vitro* での反応性試験も行われており、TCO と vancomycin または daptomycin が結合したプロドラッグとの反応では、2 時間以内に 99% と高効率でリリース反応が進行したことを報告している^{ref37a}。

よって、本研究ではこの Me-Ar 型のテトラジンを利用することとして、ガラクトシル化糖鎖が結合したテトラジン化合物: Gal-Tz を合成した (Figure 39)。すなわち、市販の活性エステルを有するテトラジン 26 に対して、末端アミノ基を有するガラクトシル化糖鎖 27 を縮合させ、HPLC にて精製したところ、収率 52% で目的の Gal-Tz が得られた。

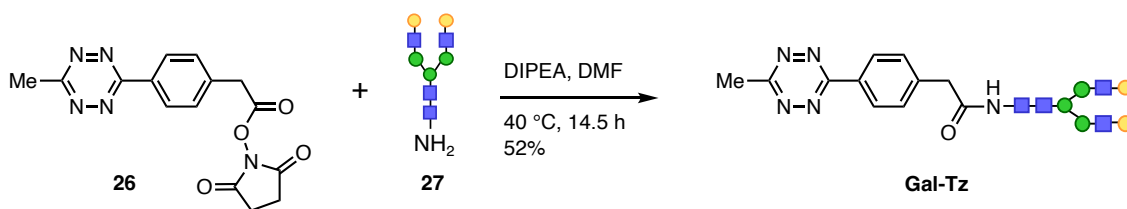


Figure 39. 26 と 27 の縮合によるガラクトシル化糖鎖結合テトラジン Gal-Tz の合成。

また、序論で述べたとおり、生体内化学反応に用いる基質においては、基質の体内動態・血中滞留性を考慮する必要がある。ガラクトシル化糖鎖テトラジンについて体内動態・血中滞留性を考えてみると、単純に分子量 1800 程度のガラクトシル化糖鎖と分子量 100 以下のテトラジンを結合させた場合、構造の大部分を占めるガラクトシル化糖鎖部分に大きく影響されると考えられる。また、分子量の観点から、分子量 2000 程度の小分子であるガラクトシル化テトラジンは腎臓にて糸球体濾過を受けうる一方で、肝臓の ASGPR と相互作用を介して肝臓取り込みを受ける可能性がある。

Rice らは、ガラクトシル化糖鎖の末端アスパラギン酸 Boc 保護体 YY の I¹²⁵ 標識体を利用し、これをマウスに尾静脈注射した際の血漿濃度変化を調査した^{ref46} (Figure 40)。その結果、ガラクトシル化糖鎖誘導体が血中から消失し徐々に尿排泄されること (30 分後の血漿濃度は 5% 程度に減少)、そして肝臓にはほとんど分布しないことが明らかとなっている。これは、肝臓表面の ASGPR に対する相互作用が一分子のガラクトシル化糖鎖では弱く、肝臓への取り込みよりも尿排泄が優先したことが示唆される。つまり、Gal-Tz の場合にも、血中を循環して尿排泄されると予想できる。

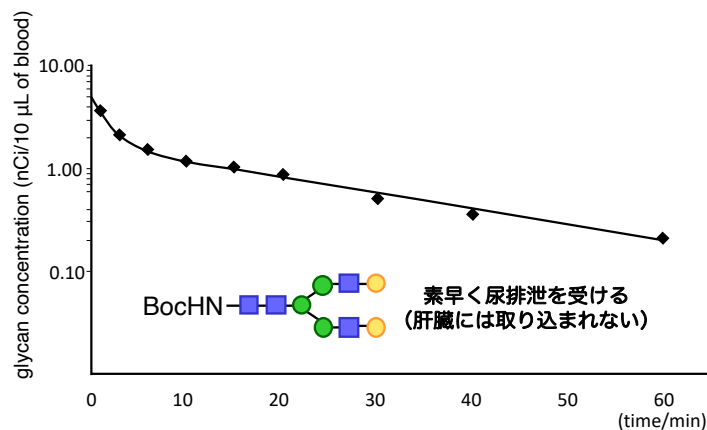


Figure 40. 26 と 27 の縮合によるガラクトシル化糖鎖結合テトラジン Gal-Tz の合成。

これまでに小分子に血漿中での滞留時間を増加させる目的で、PEG やデキストリンなどの多糖類を導入し腎臓での糸球体濾過を受けにくくする手法が報告されており、これを利用して生体内化学反応に用いる試薬の血中滞留性を向上させることができれば、反応効率の改善が期待できる。実際に、Weisslederらはマウス体内でのテトラジンライゲーションの検討において、テトラジンに分子量 10,000Da 以上のシクロデキストリンを結合させることで、血漿中での滞留時間の延長、反応効率の向上を報告している^{ref47} (Figure 41)。

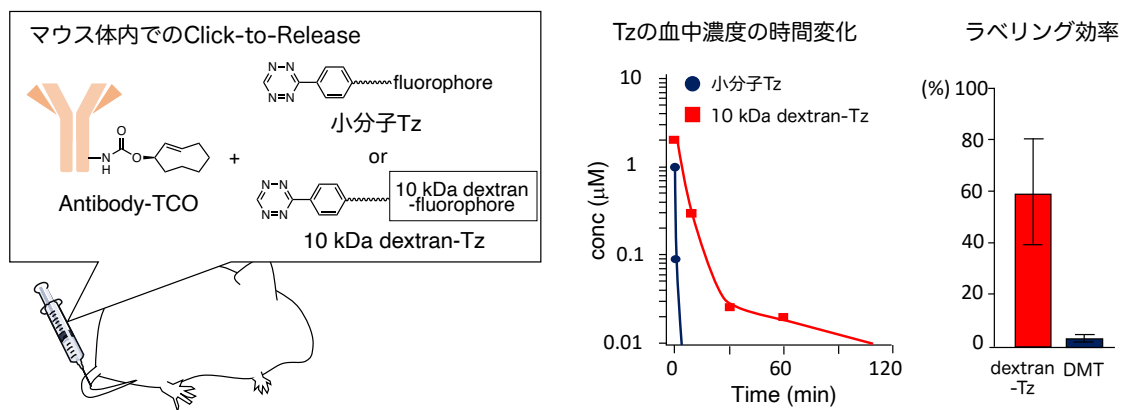


Figure 41. 26 と 27 の縮合によるガラクトシル化糖鎖結合テトラジン Gal-Tz の合成。

しかし、本研究では、糖鎖付け替え反応そのものよりも、糖鎖を付け替えによる糖鎖アルブミンの標的認識の変更に焦点を当てている。もし高分子結合型のガラクトシル化テトラジンを用いると、糖鎖アルブミンにその高分子が導入されてしまい、糖鎖アルブミンの標的認識・体内動態に影響することが示唆される。よって今回、ガラクトシル化テトラジンの体内動態を改善するような工夫は行わないこととした。

2-4. 理研クリック反応によるアルブミンの糖鎖修飾

糖鎖修飾プローブ **1** および **Gal-Tz** を合成し、有機小分子の合成を完了したため、アルブミンを用いた検討に移った。まず、**1** をヒト血清アルブミンに対して作用させることで、TCO 含有糖鎖アルブミンを合成した。まず、ヒト血清アルブミンに対して 15 等量の TCO 含有糖鎖修飾プローブ **1** を 10% DMSO 水溶液中 37 °C で 3.5 時間作用させた。反応終了後、Amicon10K による限外濾過にて精製し、分子量 10,000 以下の小分子を除去したのち、MALDI-TOF-MASS によりアルブミンの分子量を測定した (**Figure 42**)。反応前のアルブミンの分子量が 66.5 kDa であったのに対し、反応終了後には 108 kDa をピークの頂点とする分子イオンピークを観測したことからアルブミン 1 分子当たり平均 12 個の糖鎖を修飾した **Glycoalbumin-I** を得た。この結果から、80% 程度の効率でアルブミンの糖鎖修飾が進行し

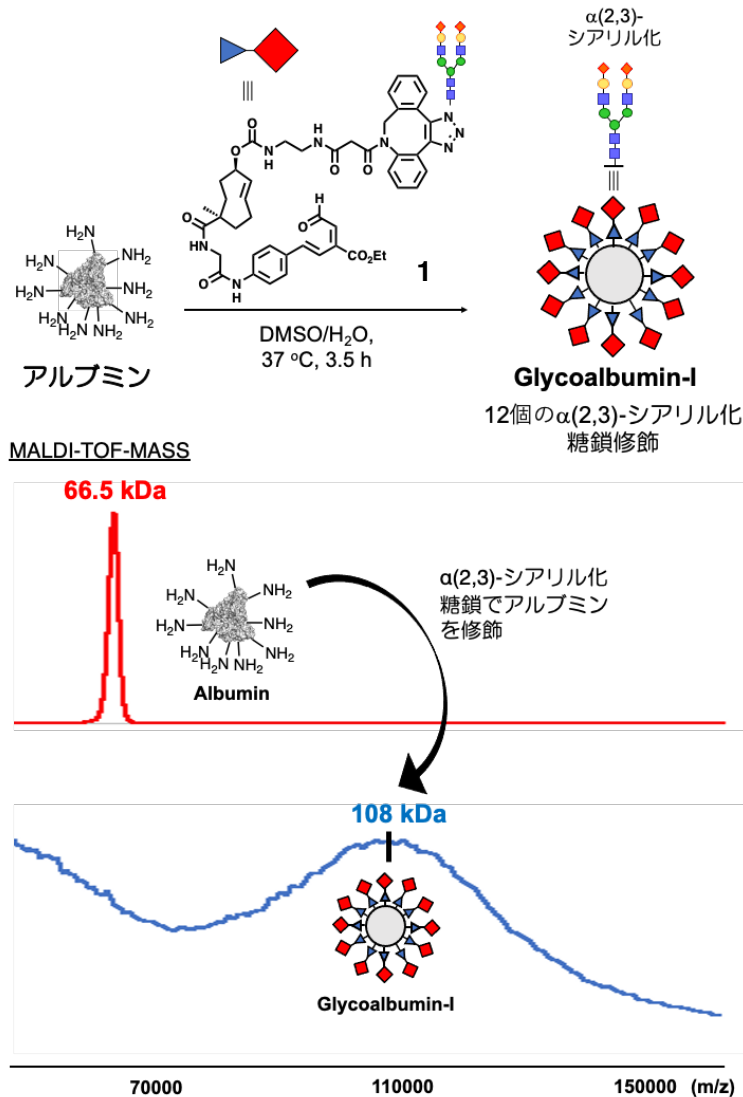


Figure 42. TCO 含有糖鎖修飾プローブ **1** によるアルブミンの糖鎖修飾と MALDI-TOF-MASS 分析による反応追跡

たことがわかった。糖鎖修飾プローブには微量の不純物を考慮すると、ほぼ定量的に反応が進行していると考えられ、理研クリック反応の有用性を示す結果である。

さらに、プローブの等量を制限することで、糖鎖修飾の個数を制御可能であった。例えば、アルブミンに対して最大 17 個の糖鎖を修飾することにも成功した。

続いて、**Glycoalbumin-I**に対して糖鎖を持たないテトラジンを作用させることで、Click-to-Release 反応が進行するか確認することとした。ジメチルテトラジン (**DMT**) は高いリリース効率を示すことが知られていることから^{ref44}, **Glycoalbumin-I**に対して **DMT** を作用させ、アルブミンの分子量の減少を追跡することとした。

まず、10 個の糖鎖を修飾した糖鎖アルブミン (100 kDa) に対して、**DMT** を 50 等量 (TCO に対して 5 等量) 添加し、糖鎖リリース反応を試みた (**Figure 43a**)。この際、MALDI-TOF-MASS を用いて分子量の変化を追跡し、その分子量変化からリリース効率を算出した (**Figure 43b**)。その結果、反応開始わずか 10 分後には、糖鎖アルブミンに修飾した 10 個の糖鎖のうち、半分に相当する 5 個の糖鎖をリリースすることができた。反応 10 分後以降には分子量の変化はほとんど見られなかったことから、10 分後には反応がほとん

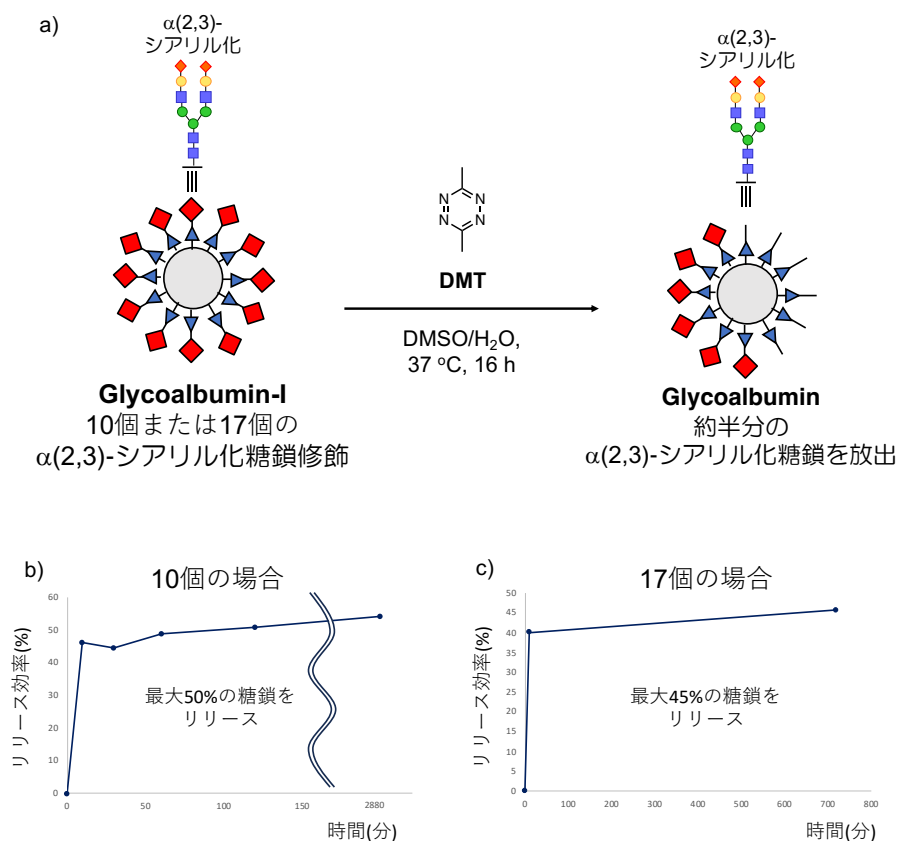


Figure 43. アルブミンの糖鎖リリース反応と MALDI-TOF-MASS 分析 a)10 個または 17 個の糖鎖で修飾した **Glycoalbumin-I** に対する糖鎖リリース b)10 個の糖鎖の場合の糖鎖リリース反応の時間経過 c)17 個の糖鎖の場合の糖鎖リリース反応の時間経過

ど終了していたことがわかった。続いて、17 個の糖鎖を修飾したシアリル化糖鎖アルブミンに対しても、同様の条件で反応を調査した (**Figure 43c**)。糖鎖修飾数の増加により、アルブミン表面がより立体的に混み合った状態になり反応性に変化が見られると予想されたが、糖鎖リリース反応はわずか 10 分後で 45%程度進行したことから、糖鎖数の増加による反応効率への影響はほとんど見られなかった。つまり、小分子の TCO 誘導体であれば糖鎖アルブミン表面に十分に接近可能であり、糖鎖修飾数を増加させても反応には影響しないことがわかった。

第三節 糖鎖付け替え反応の検討

3-1. フラスコ中での糖鎖付け替え反応の検討

合成した **Glycoalbumin-I** の TCO 部位が糖鎖リリース活性を保持していることが確認できたため、続いてガラクトシル化糖鎖を有するテトラジンである **Gal-Tz** を用いた糖鎖付け替え反応の検討に移った。ここで、反応の進行を確認する方法として、先ほど同様、MALDI-TOF-MSによる分子量変化を観察することとした。**Gal-Tz** と **Glycoalbumin-I** の反応において、両者の付加反応がより速く進行し、続くリリース反応の進行が遅い場合には、反応初期に糖鎖付加により分子量が増加し、反応後期には糖鎖リリースにより分子量が減少する過程を観察できると期待した。

12 個の $\alpha(2,3)$ -Sia 糖鎖を修飾した **Glycoalbumin-I** (分子量 108 kDa) に対して **Gal-Tz** を 60 等量反応させ (TCO に対して 5 等量)、MALDI-TOF-MS により **Glycoalbumin-I** の分子量の経時変化を測定した (Figure 44)。まず、反応開始 5 分後には 118 kDa, 10 分後には 127 kDa を頂点とする分子イオンピークをそれぞれ観測した。糖鎖一つ分の付加により 2.0kDa の分子量が増加することから、5 分後には 5 個分、10 分後には 10 個分の末端ガラクトシル化糖鎖がアルブミンに付加されたことが明らかとなった。一方で、反応開始後 30 分後には 125kDa, 1.5 時間後には 123kDa, 3 時間後には 118kDa, 4 時間後には 112kDa, そして 16 時間後には分子量が 110 kDa まで減少した。一つ分のシアリル化糖鎖のリリースによって、分子量が 2.8kDa 減少することから、反応開始 10 分後から 16 時間後までに、シアリル化糖鎖 6 個分がリリースされたことが明らかとなった。これは、12 個修飾した末端 $\alpha(2,3)$ シアリル化糖鎖のうち半分にあたる。つまり、 $\alpha(2,3)$ -シアリル化糖鎖 12 個を修飾した **Glycoalbumin-I** を、 $\alpha(2,3)$ -シアリル化糖鎖 6 個・末端ガラクトシル化糖鎖 10 個の糖鎖パターンを有する **Glycoalbumin-II** へと変化させることができた。

以上の結果から、**Glycoalbumin-I** に対する糖鎖付け替え反応においては、新たな糖鎖の付加が 10 分以内に 80%以上の効率で進行する一方、糖鎖のリリース過程は 4 時間で 50%程度の効率にとどまることがわかった。DMT の場合に **Glycoalbumin-I** の糖鎖修飾数を 10 個から 17 個に増やしても反応性に大きな影響がなかったことから、**Glycoalbumin-I** 上での糖鎖付け替え反応の反応速度において、アルブミン上の糖鎖による立体障害は重要な要因ではないことがすでに示唆されている。一方で、糖鎖リリースの過程においては、DMT とガラクトシル化糖鎖を有する **Gal-Tz** で大きな変化が見られたことから、テトラジン上の置換基がリリース反応の速度に大きく影響することが示唆された。細胞系中や動物体内での糖鎖付け替え反応の際には、投与分子が代謝や排泄を受けて濃度が減少することを考慮すると、二分子間反応である糖鎖付加段階により早い速度が求められる。よって、**Glycoalbumin-I** への糖鎖の付加反応がわずか 10 分で完結した本結果は、生体内反応への展開において有利に働くと期待される。一方で糖鎖リリース反応は、分子間反応ではないため濃度に依存せず、一段階目の糖鎖付加反応さえ進行してしまえば時間の経過とともに進行する。よって、細胞系中あるいは動物体内での反応の進行が期待できる。

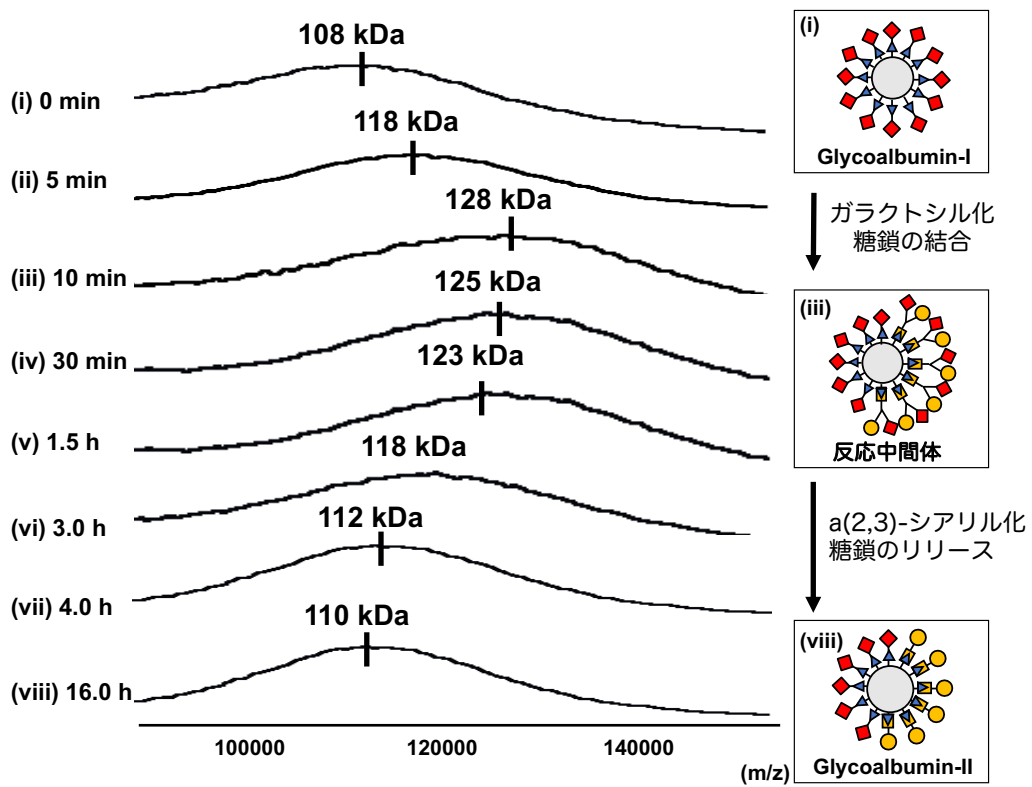
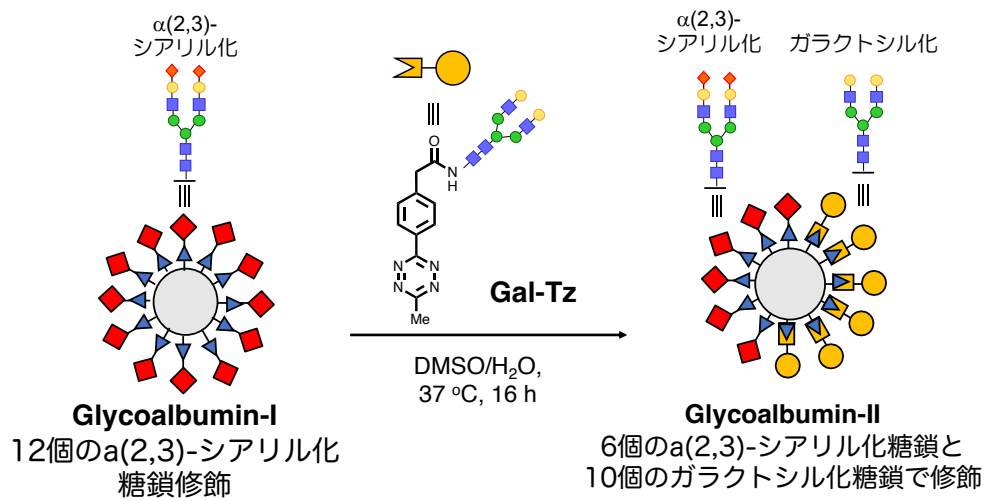


Figure 44. Glycoalbumin-Iから Glycoalbumin-IIへの糖鎖付け替え反応と MALDI-TOF-MS による反応追跡 i) 0分 (108 kDa, Glycoalbumin-I), ii) 5分 (118 kDa), iii) 10分 (128 kDa, 反応中間体), iv) 30分 (125 kDa), v) 1.5時間 (123 kDa), vi) 3.0時間 (118 kDa), vii) 4時間 (112 kDa) viii) 16時間 (110 kDa, Glycoalbumin-II)

3-2. モデル化合物を用いた糖鎖付け替え反応の速度論的な調査

ここまでの糖鎖付け替え反応の調査においては、糖鎖アルブミンの分子量変化から糖鎖リリース反応の進行度合いを間接的に算出したが、詳細な糖鎖付け替え反応の速度論的調査は十分ではない。これは、糖鎖アルブミン上での定量的な反応追跡が困難であるためである。よって糖鎖付け替えのモデル反応として、単純化した構造を持つ $\alpha(2,3)$ -シアリル化糖鎖モデル小分子 **28** と **Gal-Tz** 間での Click-to-Release 反応を行い、HPLCにて両者の付加反応および糖鎖のリリース反応の進行を観察することにした。

まず検討に用いる化合物を次のように合成した。 $\alpha(2,3)$ -シアリル化糖鎖モデル化合物 **28** に関しては、合成中間体であるメチルエステル **23** に対して糖鎖アジド **5** を結合させた (Figure 45)。反応後3時間後の HPLC により目的物の生成を確認し、その後 HPLC により単離した。

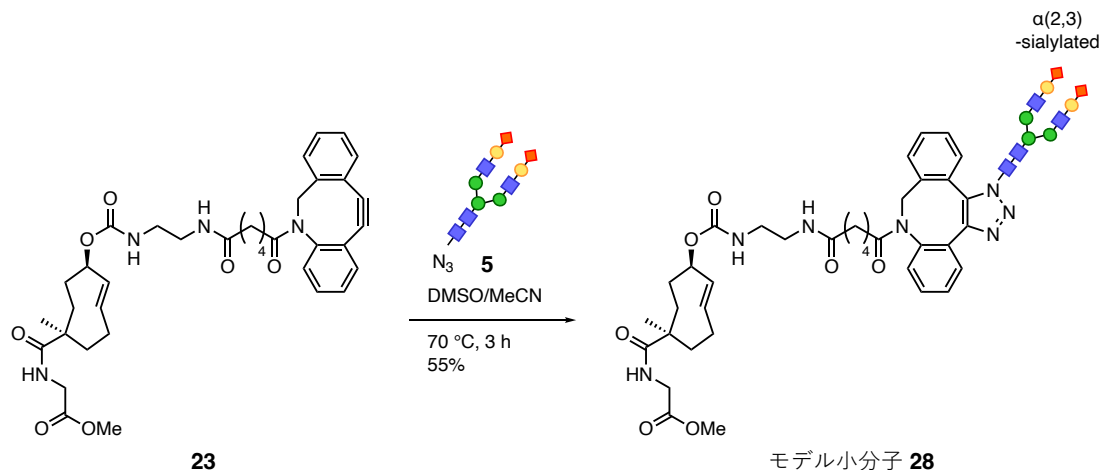


Figure 45. メチルエステル **23** と糖鎖アジド **5** の SPAAC 反応による $\alpha(2,3)$ -シアリル化糖鎖モデル化合物 **28** の合成

また、糖鎖付け替え反応のリリース生成物である $\alpha(2,3)$ -シアリル化糖鎖アミン **29** についても、合成中間体の DBCO アミン **3** と糖鎖アジド **5** の SPAAC 反応によって同様に合成し、

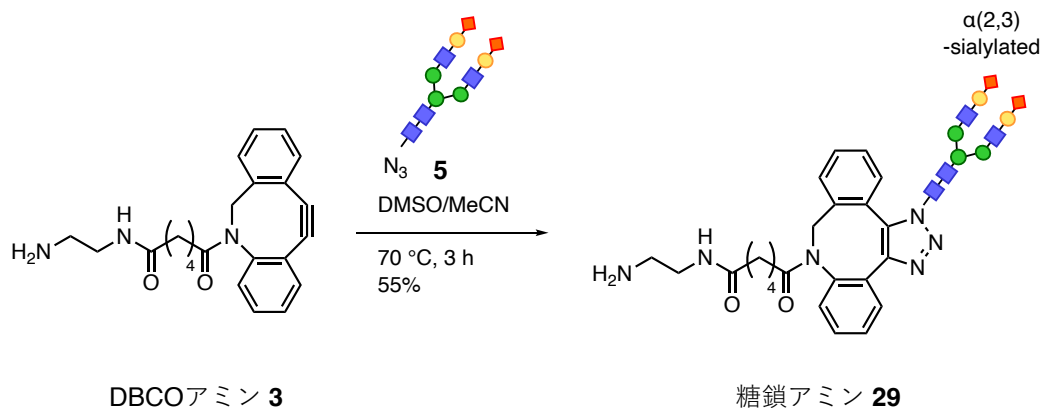


Figure 46. DBCO アミン **3** と糖鎖アジド **5** の SPAAC 反応による糖鎖アミン **29** の合成

HPLCにて単離した (Figure 46)。

合成したモデル分子 **28** と **Gal-Tz** を用いて、糖鎖付け替え反応を実施した (Figure 47)。本反応では、**28** と **Gal-Tz** の反応により、付加中間体を經由して糖鎖アミン **29** とガラクトシル化ピリダジン **30** がそれぞれ生成すると考えられる。

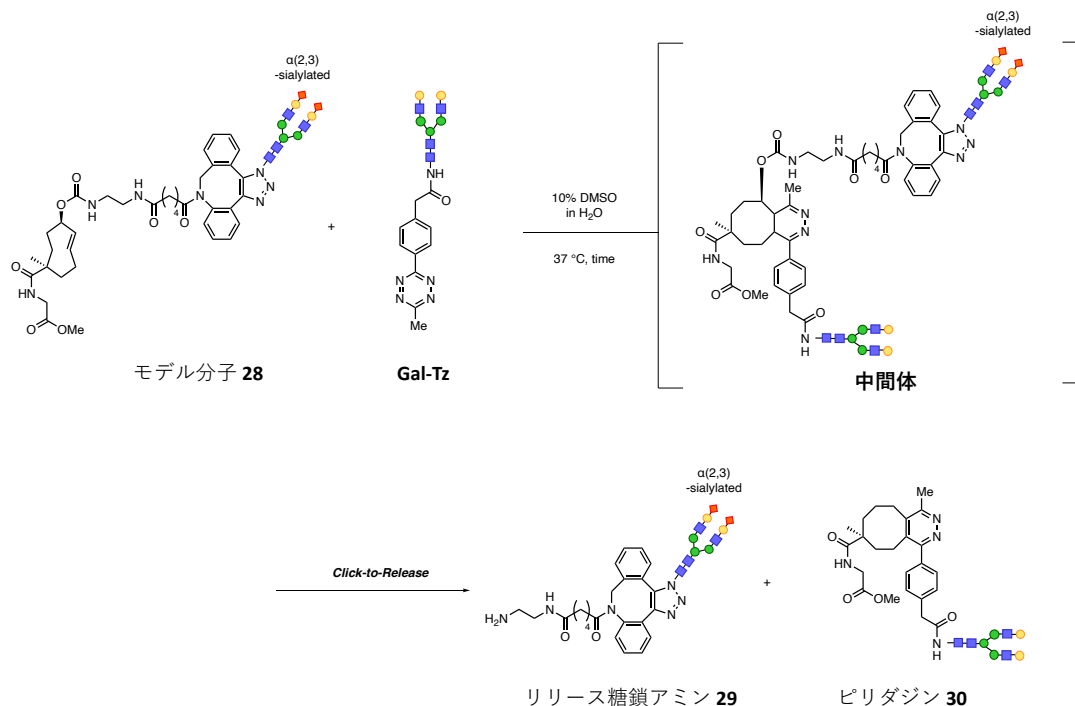


Figure 47. $\alpha(2,3)$ -シアリル化糖鎖モデル化合物 **28** と **Gal-Tz** 間での Click-to-Release 反応

この反応の進行を HPLC にて追跡した (Figure 48; 分析条件, 分析カラム: 4.6 × 250 mm Cosmosil 5C18-AR-300 (Nacalai Tesque); solvent A: H₂O + 0.1% TFA; solvent B: MeCN + 0.1% TFA; gradient: from 10%B/90%A to 70%B/30%A over 20 min; 流速: 1 ml/min.)。まず、モデル分子 **28** (200 μ M) に対して、**Gal-Tz** (1 mM) を 10% DMSO 水溶液中で反応させたところ、反応開始後わずか 1 分で **28** のピークが完全に消失し、付加反応の過程を追跡できなかった。そこで、**Gal-Tz** の濃度を **28** と同様の 200 μ M へと下げて検討を行なった。

モデル分子 **28**, **Gal-Tz** のピークは反応開始後 10 分後までに大部分が減少したことから、一段階目の付加反応は反応初期の段階でほぼ完結したことがわかった。一方のリリース反応においては、反応開始後わずか 1 分後に、リリース糖鎖アミン **29** のピークを確認し、10 分後までにピークが顕著に増大した。なおこのピークは 240 分後まで徐々に増大を続けた。また、9.5 分に検出されたピークについても 240 分後まで同様に徐々に増大したため、本ピークは同時に生成するピリダジン生成物 **30** であると考えられた。実際に本ピークを分離し ESI-MS 分析したところ、これと一致する分子イオンピークを検出できた。

これらの結果から、一段階目の付加反応と二段階目のリリース反応には速度の差があるため付加中間体を観測可能である。13.5 分のピークに着目すると、反応開始 1 分後に生成

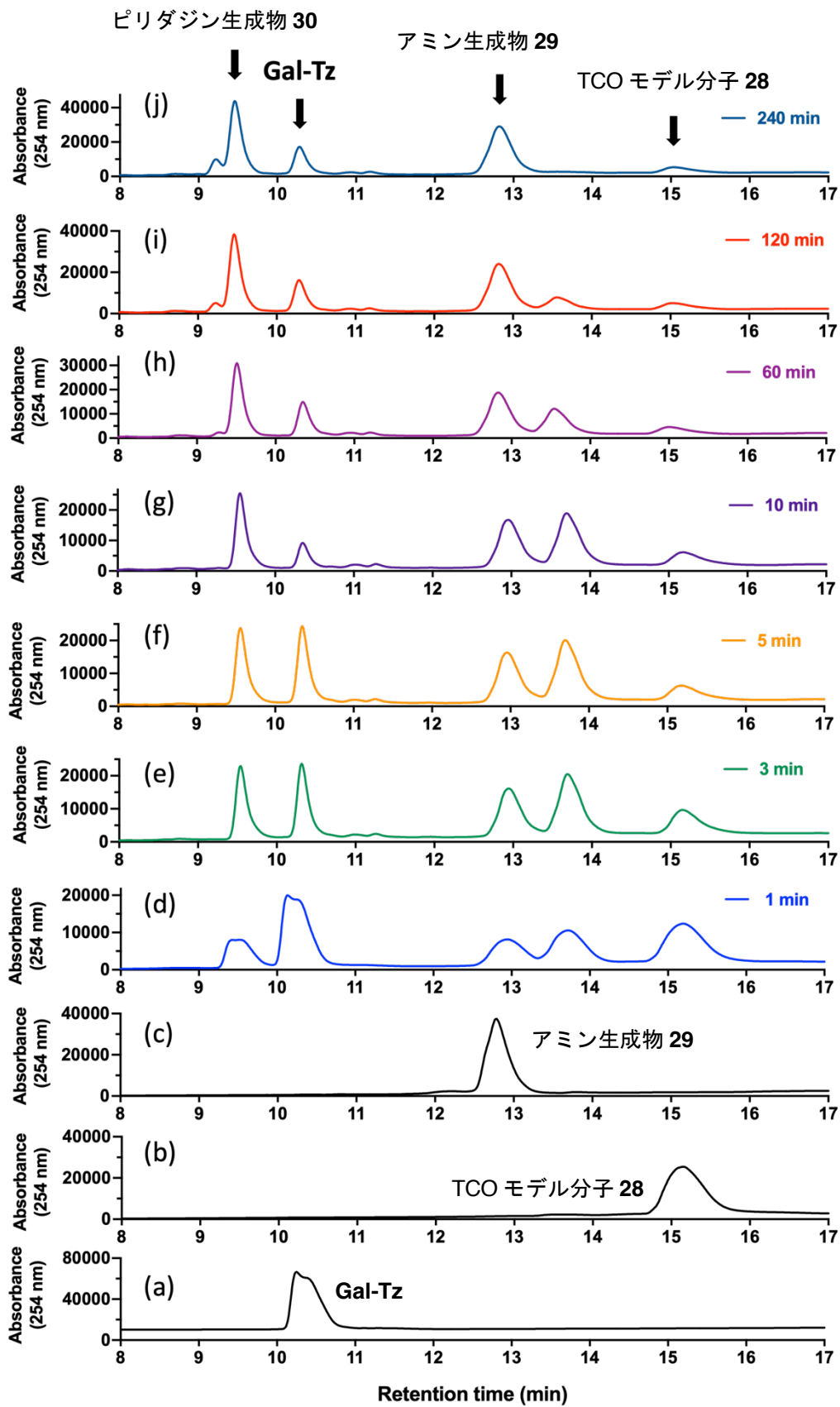


Figure 48. モデル化合物を用いた糖鎖付け替え反応の HPLC 分析 a)Gal-Tz 標準品, b) $\alpha(2,3)$ -シアリル化糖鎖モデル化合物 **28** c)リリース糖鎖化合物 **29**, 反応開始後 d)1分 e)3分 f)5分 g)10分 h)60分 i)120分 j)240分における反応溶液の HPLC 分析結果

し、10 分後から徐々にピークが減少しており、本ピークが付加中間体であると考えられる。ここで得られた $\alpha(2,3)$ -シアリル化モデル化合物 **28** とアミン **29** のピーク面積をそれぞれの時間ごとに算出し、反応開始前のピーク面積と比較することで反応の進行をグラフ化した (**Figure 49**)。モデル化合物については、反応開始後 10 分後までに 90%以上が反応している一方で、アミン生成物に関しては、開始 10 分後に 40%程度生成したのち、240 分までに徐々に 80%程度まで増加していることが明らかとなった。

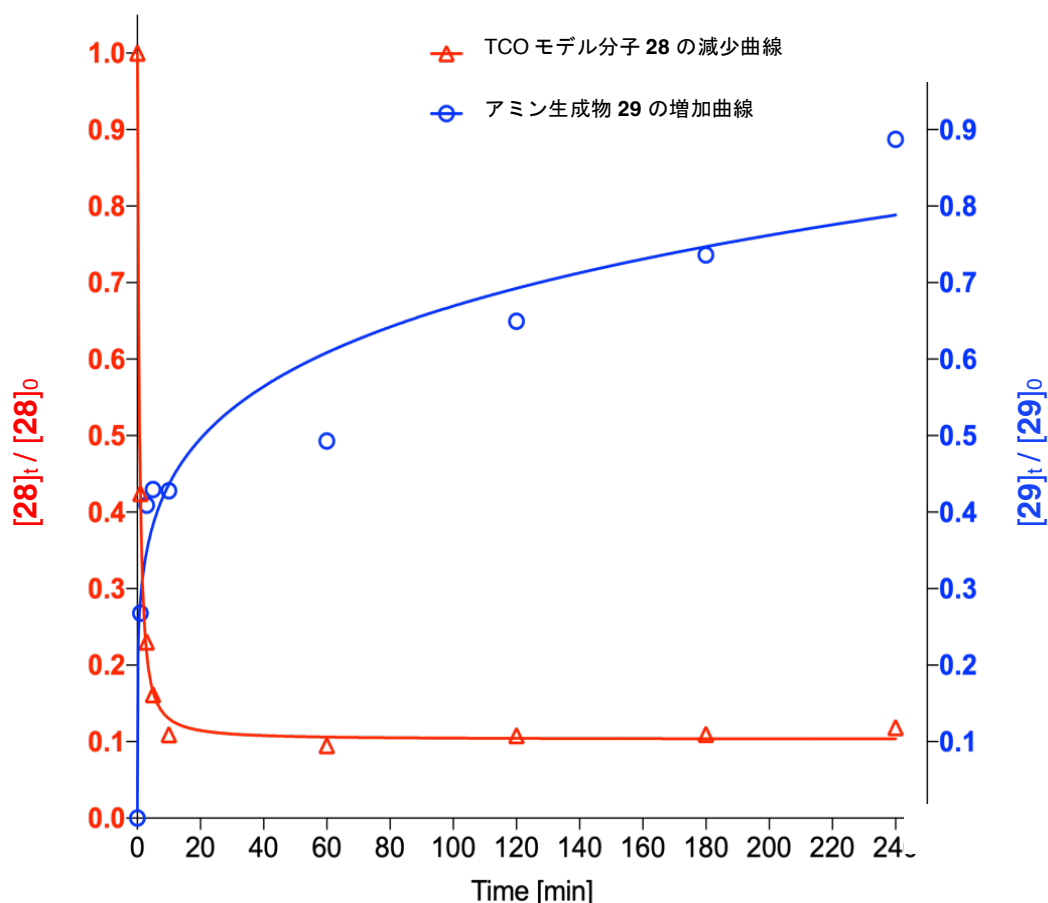


Figure 49. モデル TCO 分子 **28** と Gal-Tz を用いた糖鎖付け替え反応の追跡。 $[28]_t = t$ 分における **28** のピーク面積。 $[28]_0 = 0$ 分における **28** のピーク面積。 $[29]_t = t$ 分における **29** のピーク面積。 $[29]_0 = 0$ 分における **29** のピーク面積。

Weissleder らは、Click-to-Release の詳細な反応機構について、以下のように説明している^{ref48} (Figure 50)。TCO に対して Tz が作用すると、逆電子要請型 Diels-Alder 反応・逆 Diels-Alder 反応が連続で進行し、二つのイミン構造をもつ 2,4-ジヒドロピリダジンが生成する。続いて、1,5-ジヒドロピリダジンへと異性化すれば、カーバメート基の脱離反応がすぐさま進行する。一方で 4,5-ジヒドロピリダジンへ異性化すると脱離反応は進行しないため、逆方向への異性化により 2,4-ジヒドロピリダジンを経由して 1,5-ジヒドロピリダジンとなる必要がある。これらの 4,5-ジヒドロピリダジンから 2,4-ジヒドロピリダジンへの異性化反応は中性条件下では一般的に遅い。

これを考慮して糖鎖の Click-to-Release 反応について考察する。反応開始後 10 分までに 40% 程度リリースされた生成物に関しては、上述した 1,5-ジヒドロピリダジンを経由して、すぐさま脱離反応が進行したと考えられる。一方で、10 分後から 4 時間後にかけて徐々にリリースされた生成物に関しては、まず 2,4-ジヒドロピリダジンへと異性化したために、すぐさまリリースできず 1,5-ジヒドロピリダジンへの再異性化を経てリリースが進行したとことが示唆される。

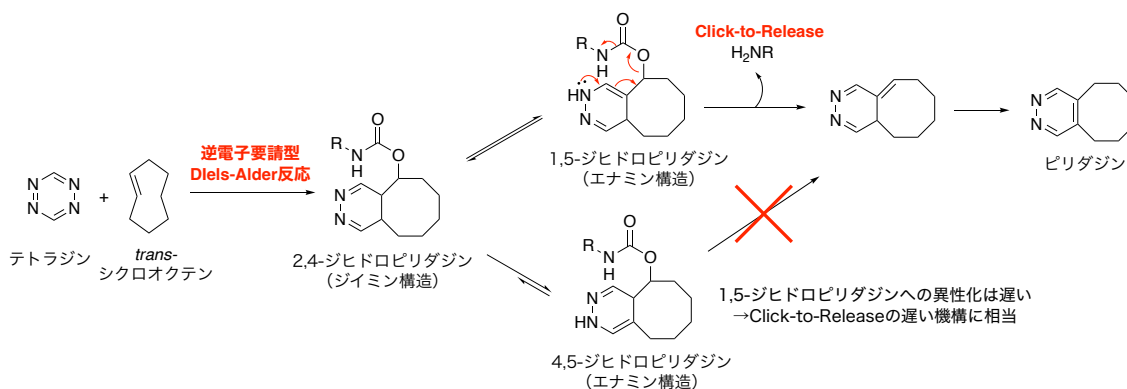


Figure 50. Click-to-Release 反応の反応機構

本章の第二節から第四節で実施した糖鎖付け替え反応、つまり、モデル小分子 **28** または **Glycoalbumin-I** に対して **Gal-Tz** または **DMT** を作用させた際の、両者の付加段階および糖鎖リリース段階の効率をそれぞれ以下に要約した (Figure 51)。

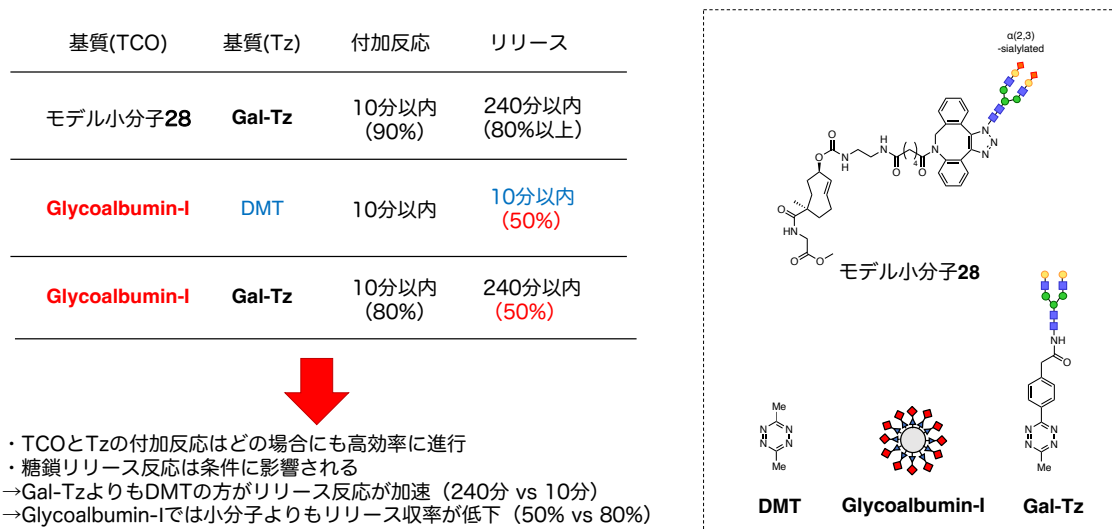


Figure 51. 糖鎖付け替え反応の検討結果の要約

まず、付加反応の段階に着目すると、全ての条件で 10 分以内に反応がほぼ完結していることがわかる。つまり、**Glycoalbumin-I**への付加反応においてはアルブミンや周辺の糖鎖の影響を大きく受けず、効率良く反応が進行していることが示唆される。

一方で、モデル小分子 **28** と **Glycoalbumin-I**のリリース反応を比較すると、ジメチルテトラジンと **Gal-Tz** リリース段階での効率が 50%程度に留まっている。まず付加反応が効率よく進行するという結果は、**Glycoalbumin-I**上のリジンに修飾された TCO 含有糖鎖に対して、そのアミノ酸配列上の位置に関わらず付加反応が進行していることを示している。序論で述べた通り、理研クリック反応での糖鎖修飾では、アルブミンの外側に位置するリジンが優先的に修飾される。よって、**Gal-Tz** の付加反応においても、比較的アクセス容易な位置での反応となるため、効率よく反応が進行したと考えられる。一方で糖鎖リリースの効率が 50%程度に留まっているが、これはタンパク質表面のアミノ酸側鎖の影響であると考えている。まず反応機構から、リリース反応の低収率の原因がジヒドロピリダジンの異性化段階であることは明らかである。糖鎖修飾されているリジンの位置に応じて近傍のアミノ酸側鎖による影響が異なるため、異性化が 4,5-ジヒドロピリダジン (リリース反応を起こせない) へと傾く影響を受ける場合には、リリース反応が進行しないと予想される。この結果、タンパク質上でのリリース効率が 50%程度に留まったと考えられる。

また、**Gal-Tz** を用いたリリース反応が 240 分程度で進行する一方、**DMT** の場合には 10 分程度で反応がほとんど完結する。これはテトラジンの置換様式による差であると考えら

れる。先ほどと同様に反応機構から考えると、ジメチルテトラジンの場合にはリリースが可能な 1,5-ジヒドロピリダジンへの異性化がより早く進行するため、リリース反応が速いと考えられる。

これらの考察から、糖鎖付け替え反応において、糖鎖アルブミン **Gal-Tz** の付加反応においては糖鎖間の立体障害の影響は見られず 10 分以内に付加反応が完結した。マウス体内で反応を実施する際には、分子間反応である両者の付加反応に高い反応速度を示すことが求められることから、この糖鎖付け替え反応が生体内での利用に適していることが示唆される。一方でリリース反応の完結には、4 時間以上が必要となるが、リリース反応は単分子での反応となることから、体内での反応においても同様に進行し影響はないと考えられる。

3-3. 血中での糖鎖付け替え反応の追跡

Glycoalbumin-Iと **Gal-Tz** の糖鎖付け替え反応が十分な反応速度を示すことが明らかとなったので、より動物体内を模倣した環境での糖鎖付け替え反応検討のため、マウス血液を反応溶媒として糖鎖付け替え反応を実施した。マウス血液中には様々な生体分子が含まれており、HPLCによるリリース糖鎖の検出や、MALDIによる糖鎖アルブミンの分子量変化の追跡は困難である。そこで本検討においては、Tetramethyl Rhodamine; TAMRA 修飾糖鎖アルブミンの SDS-PAGE 解析を用いて、TAMRA の蛍光バンドの位置の変化から糖鎖アルブミンの分子量変化を見積もることで反応を追跡することとした。本手法では、血液中の他の生体分子存在下で、TAMRA 蛍光基を持つ修飾糖鎖アルブミンの蛍光バンドのみについて分子量変化を観察できるため、本検討に適していると考えた。

蛍光基 TAMRA で修飾した **TAMRA-Glycoalbumin-I**および **TAMRA-Glycoalbumin-II**の合成に着手した。まずアルブミンに対して 2.5 等量の TAMRA-スクシンイミドエステル (SE) を PBS/DMSO 溶液中、37°Cで 10 分間反応させたのち、限外濾過にて精製し、MALDI-TOF-MSにて生成物の分子量を測定した (Figure 52, 53)。アルブミンの分子量が 66.5kDa であるのに対して、反応後には分子量が 67.0kDa であったことから、アルブミン一分子当たり 1.3 等量の TAMRA で修飾した **TAMRA-albumin** が得られた。

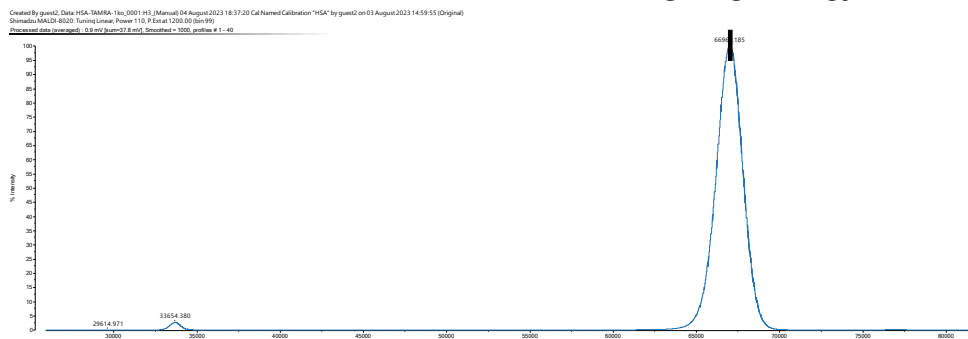
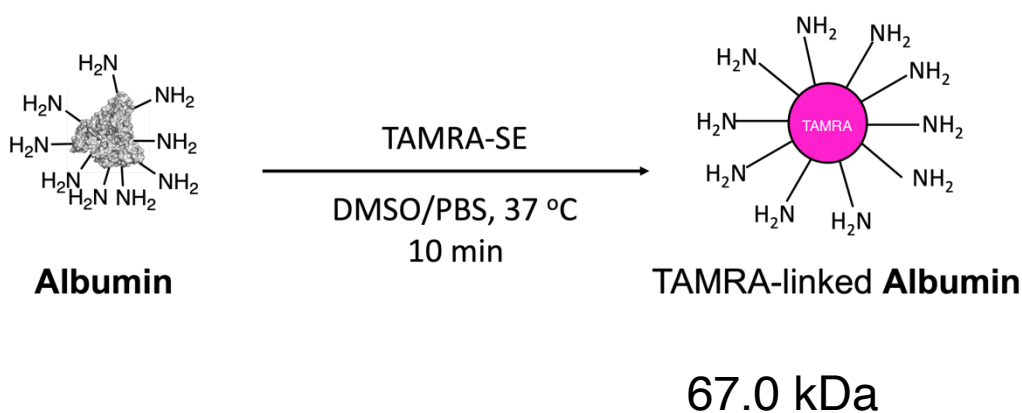


Figure 52. アルブミンの蛍光修飾反応と MALDI-TOF-MS 分析

続いて、**TAMRA-albumin** に対して糖鎖修飾プローブ **1** を 12 等量作用させたのち MALDI-TOF-MS にて **TAMRA-albumin** の分子量変化を追跡した (**Figure 53**)。 **TAMRA-albumin** の分子量 (67.1kDa) に対して、生成物の分子量は 110 kDa へと増加したことから、 **TAMRA-albumin** 一分子当たり 13 個の糖鎖で修飾した **TAMRA-Glycoalbumin-I** が得られた。

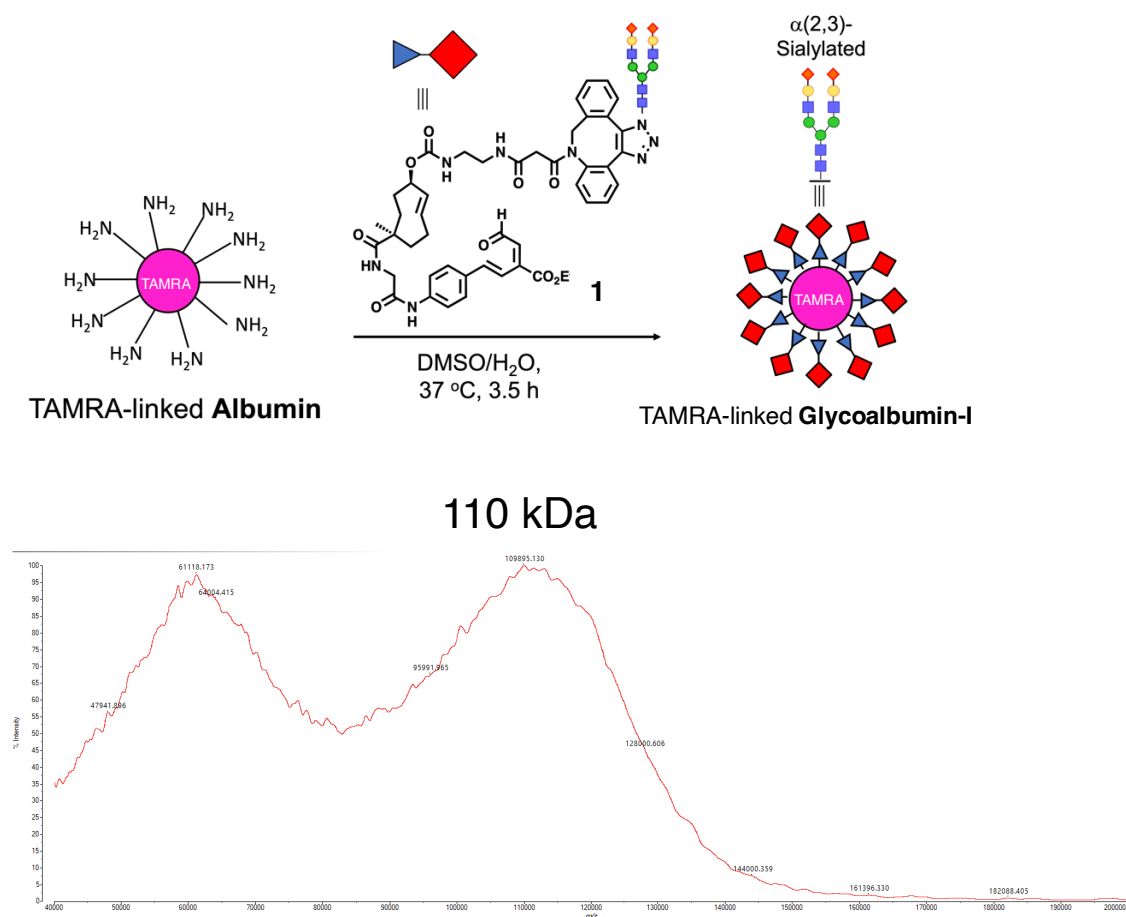
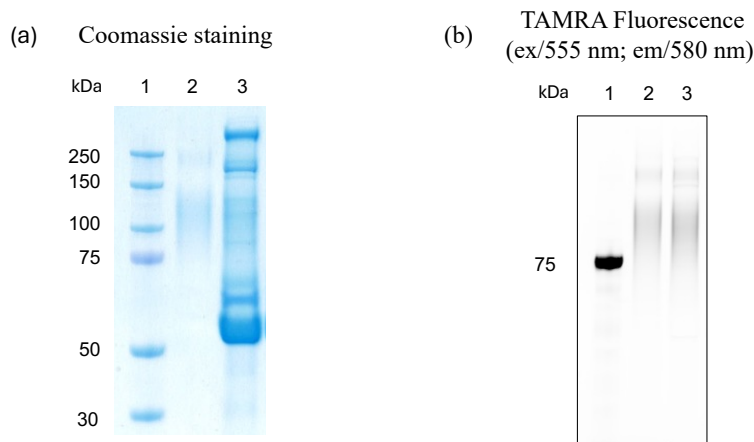
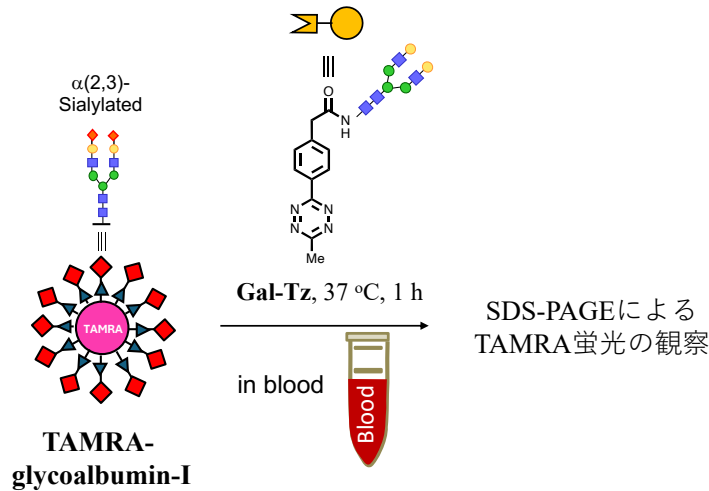


Figure 53. TAMRA-アルブミンのシアリル化糖鎖修と MALDI-TOF-MS

合成した **TAMRA-Glycoalbumin-I** と **Gal-Tz** を用いて、血液中での糖鎖付け替え反応の検討に移った (**Figure 54**)。まず、TAMRA 修飾した **Glycoalbumin-I** (20 μ M) に対して、**Gal-Tz** (1.0 mM) を 15%DMSO/マウス血液中 37°C で 1 時間反応させた。反応後遠心分離にて沈殿を除去して上澄み液を SDS-PAGE にて分離し、得られたゲルをそれぞれ a) Coomassie 染色 b) TAMRA の蛍光波長で観察した。Lane 1 にはタンパク質標準試料, Lane 2 には **TAMRA-Glycoalbumin-I**, Lane 3 には **TAMRA-Glycoalbumin-I** および **Gal-Tz** の血中反応後の試料を用いた。TAMRA の蛍光波長の観察には ChemiDocTM Touch (Bio-Rad) を

Blot/UV/Stain-free tray with Pro-Q Diamond の条件で用いた。結果として、反応前の糖鎖アルブミンの蛍光バンドが 75-150kDa 付近に検出されたのに対し、血液中での反応後のサンプルはバンドの位置の明確な変化を示さなかった (Figure 54b)。これは、糖鎖付け替え反応において、分子量変化の差が小さいことが原因であると考えられた。すなわち、新たな糖鎖の導入と、元の糖鎖のリリースによって、反応前後での分子量変化は 2kDa であり、この程度の差を検出することは困難であった。



Lane 1: Protein Marker

Lane 2: TAMRA-labeled glycoalbumin-I only as a standard

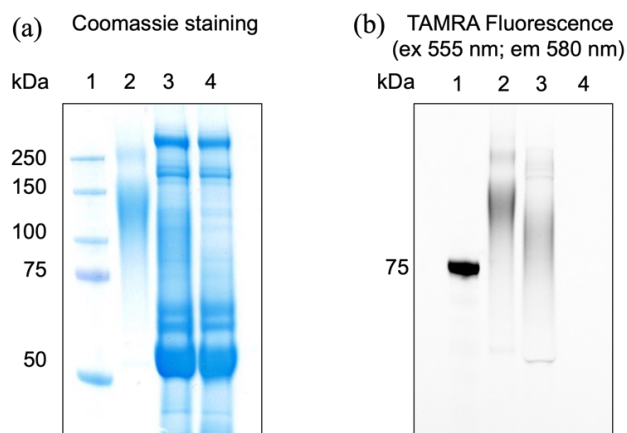
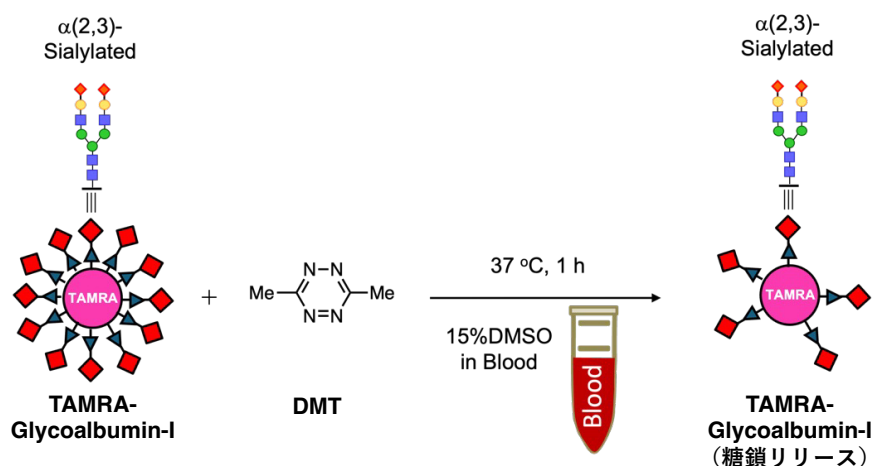
Lane 3: TAMRA-labeled glycoalbumin-I and Gal-Tz in blood for 1 h

Figure 54. 血液中での糖鎖付け替え反応と SDS-PAGE を用いた分子量変化の追跡

そこでより明確に反応が進行したことを確認するため、糖鎖をもたない **DMT** を用いる検討に切り替えた。すなわち、**DMT** との反応では糖鎖リリース反応によって分子量が大きく減少するのみであるため、分子量変化の差を明確に検出できると考えた。すでにフラスコ中での **DMT** の反応が 50%程度進行することを確認しており、例えば 10 個の糖鎖で修飾した **TAMRA-Glycoalbumin-I** から 5 個の糖鎖をリリースした場合、15kDa 程度分子量が変

化すると考えられるため、この分子量変化を SDS-PAGE にて確認できると期待した。

先ほどと同様の操作にて **DMT** を用いた検討を実施した (**Figure 55**)。Lane 1 にはタンパク質標準試料, Lane 2 には **TAMRA-Glycoalbumin-I**, Lane 3 には **TAMRA-Glycoalbumin-I** および **DMT** の血中反応後の試料, Lane 4 にはマウス血液を用いた。その結果, 反応前の Lane 2 と比較して, Lane 3 の反応後の蛍光バンドの位置が低分子方向へ移動した。すなわち, 血中での糖鎖のリリース反応が進行して糖鎖がリリースされ, 糖鎖アルブミンの分子量が減少したと考えられる。よって, 血中での糖鎖アルブミン上での糖鎖リリース反応の進行を確認できた。



Lane 1: protein MW standards

Lane 2: TAMRA-linked **glycoalbumin-I**

Lane 3: Mixture of TAMRA-linked **glycoalbumin-I** and **DMT** in a mixture blood solution

Lane 4: mouse blood.

Figure 55.血中での **TAMRA-glycoalbumin-I**と **DMT** による糖鎖リリース反応と SDS-PAGE による反応追跡

第五節 結論

第一章では、生体内を移動する糖鎖アルブミン分子の実現に向け、糖鎖付け替え反応を開発した。本反応に必要な TCO 導入糖鎖アルブミン **Glycoalbumin-I** および糖鎖結合テトラジン **Gal-Tz** を合成し、両者の反応をフラスコあるいはマウス血液中で実施した。糖鎖アルブミンの分子量変化を追跡することで、新たな糖鎖の付加と古い糖鎖の脱離の二段階の反応を確認し、糖鎖付け替え反応の進行を実証した。さらに、モデル化合物を用いて糖鎖付け替え反応の速度についても調査した。その結果、生体内での利用に適した速い反応速度を有していることが明らかとなった。

第一節では、糖鎖アルブミン上での糖鎖付け替え戦略について述べた。さらに以前に得た知見に基づいて、糖鎖アルブミンを血中またはがんから腸管に移動させることを計画した。

第二節では、糖鎖付け替え反応の検討に必要な、TCO を導入した糖鎖アルブミン:**Glycoalbumin-I**の合成を計画した。既知物である TCO 誘導体の合成には、cis/trans 異性化に高価な UV 光照射機と送液ポンプが必要となるが、TLC 観察用の 254nm の UV 照射装置と HPLC 用のポンプを組み合わせ装置を自作することで、簡単に TCO 誘導体を得ることができた。また、アルブミンの糖鎖修飾試薬として設計した TCO-糖鎖アルデヒドプローブを既知物から 7 段階で合成し、**Gal-Tz** を市販品から 1 段階で調製した。

第三節では、TCO-糖鎖アルデヒドプローブによるアルブミンの糖鎖修飾反応を実施し、80%以上と高効率に、10 個以上の糖鎖をアルブミンに導入可能であることを明らかとした。さらに **Glycoalbumin-I** と **Gal-Tz** 間での糖鎖付け替え反応を実施し、MALDI-TOF-MS にて分子量変化を追跡した。その結果、新たな糖鎖の付加と古い糖鎖のリリースの二段階の反応をそれぞれ確認できたことから、糖鎖付け替え反応の進行していることを実証した。さらに、低分子のモデル化合物を用いて、糖鎖付け替え反応を HPLC にて調査した。時間経過とともに TCO-モデル化合物 **28** と **Gal-Tz** が消費されて、リリース糖鎖生成物 **29** が増加する様子を追跡できた。また、中間体である付加生成物や副生するピリダジン生成物も検出し、反応を詳細に解析することができた。また、**28** と **Gal-Tz** の付加反応が生体内での利用への応用が期待できる反応速度を有していることを明らかとした。続いて生体内を模倣した環境として、マウス血液中での反応を実施した。血液に含まれる他の生体分子の影響を考慮し、SDS-PAGE と蛍光バンドの観察により反応前後のおおまかな分子量変化を確認する方法を採用した。この際、**Gal-Tz** を用いた糖鎖付け替え反応においては、分子量変化が十分でなく変化を確認できなかったが、**DMT** を用いた糖鎖リリース反応では、蛍光バンドが低分子側へシフトし、糖鎖リリース反応の進行を証明できた。以上のようにして、アルブミン上での糖鎖付け替え反応を調査し、動物体内への応用が期待できる結果を得た。

第二章 生体条件下での糖鎖付け替え反応と体内移動の検討

第一章では、糖鎖アルブミン上での糖鎖付け替え反応が水中あるいはマウス血液中でも進行し、糖鎖アルブミンの糖鎖パターンを変更できることを明らかとした。よって、第二章では細胞系・動物系での糖鎖付け替え反応および糖鎖アルブミンの生体内移動を検討した。

第一節 細胞表面での糖鎖付け替え反応の検討

1-1. HepG2 がん細胞表面での糖鎖付け替え反応

糖鎖アルブミンの生体内移動戦略に移る前に、まずは細胞表面での糖鎖付け替え反応の検討に着手した。すでに序論で述べたように、ガラクトシル化糖鎖糖鎖アルブミンは、ASGPR への強い相互作用を介して肝臓内に取り込まれ、代謝を受けたのちに腸管から排泄されると期待できる^{ref27}。よって、たとえば、ASGPR を過剰発現することが知られている HepG2 細胞表面で^{ref3}糖鎖付け替え反応を実施し、HepG2 細胞との相互作用の変化を観察することで、糖鎖付け替え反応の進行を確認することができると考えた。さらに ASGPR への相互作用を増強することができれば、糖鎖アルブミンの腸管排泄の促進が可能であることを示唆する結果となる。

以上のことから、まず **Glycoalbumin-I** から **Glycoalbumin-II** への糖鎖付け替え反応を HepG2 肝臓がん細胞で行い、糖鎖アルブミンと HepG2 がん細胞との相互作用の変化を観察することとした。この方法として、糖鎖アルブミンとがん細胞との相互作用強度を、蛍光イメージングにより評価することとした。すなわち、蛍光基 TAMRA で修飾した糖鎖アルブミンをがん細胞に処理した後に洗浄操作を行うと、細胞と強く相互作用する糖鎖アルブミンのみが細胞に残る。この糖鎖アルブミンを蛍光イメージングすることで、蛍光量から相互作用の強さを比較する。この際、コントロール条件として、**TAMRA-Glycoalbumin-I** のみの投与（反応を実施しない条件）、**TAMRA-Glycoalbumin-II** のみを投与（予め反応を実施した反応済みの条件）を採用することとした。

まず、本検討に用いる TAMRA 修飾糖鎖アルブミンを合成した (**Figure 56**)。つまり、合成済みの 13 個のシアリル化糖鎖で修飾した **TAMRA-Glycoalbumin-I** (110 kDa) に対して Gal-Tz による糖鎖付け替え反応をフラスコ中で実施し、**TAMRA-Glycoalbumin-II** を合成した。MALDI-TOF-MS によって反応を追跡した結果、反応開始後 30 分後には 124 kDa まで分子で分子量が増加し、7 個のガラクトシル化糖鎖が導入された。また反応 16 時間後には 112 kDa まで分子量が減少し、5 個のシアリル化糖鎖がアルブミンから放出された。よって、13 個のシアリル化糖鎖を持つ **TAMRA-Glycoalbumin-I** から、8 個のシアリル化糖鎖と 7 個のガラクトシル化糖鎖をもつ **TAMRA-Glycoalbumin-II** と糖鎖パターンを変更した。

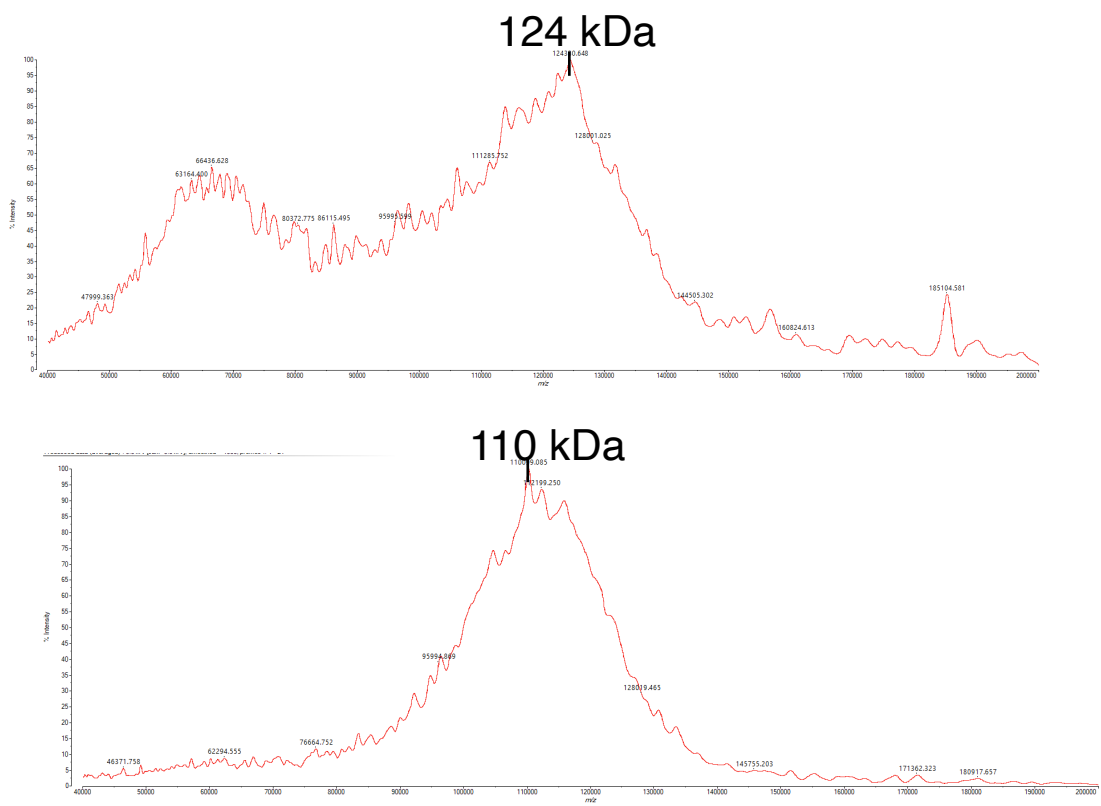
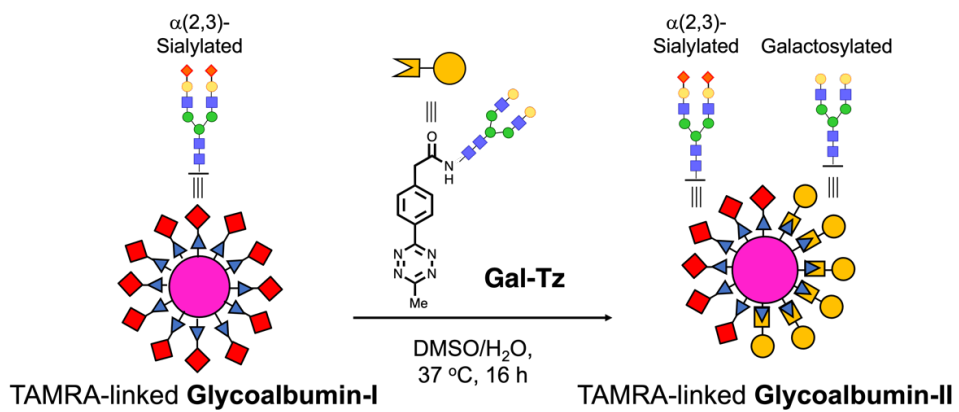


Figure 56. TAMRA-Glycoalbumin-Iの糖鎖付け替え反応終了後の MALDI-TOF-MASS 分

続いてシアリル化糖鎖を持つ **TAMRA-Glycoalbumin-I** とガラクトシル化糖鎖が結合した **Gal-Tz** を用いて、HepG2 がん細胞系中での糖鎖付け替え反応を実施した (**Figure 57**)。まずコントロール条件として、シアリル化糖鎖のみをもつ **TAMRA-Glycoalbumin-I** (1 μ M) またはガラクトシル化糖鎖を併せ持つ **TAMRA-Glycoalbumin-II** (1 μ M) を HepG2 細胞に投与し、37°Cで 3 時間インキュベーションした後に洗浄操作を行い、がん細胞に結合して細胞系中に残った糖鎖アルブミンを蛍光顕微鏡にて観察し画像を撮影した (**Figure 57a,c**)。それぞれ Hoechst 蛍光 (核染色)、TAMRA 蛍光 (蛍光修飾糖鎖アルブミン)、明視野画像、マージ画像を表した。Hoechst および TAMRA 蛍光画像を用いて、細胞部位のみを指定して蛍光量を定量解析した (**Figure 57e**)。全ての実験は独立して 3 回ずつ実施し、有意差は two-way-ANOVA を用いて決定した (** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$)。その結果、**TAMRA-Glycoalbumin-I** のみの条件と比較して、**TAMRA-Glycoalbumin-II** のみの場合、蛍光量が 6 倍程度増加し、有意差を示した。これは前述したように、ASGPR を過剰発現する HepG2 細胞^{ref48} とガラクトシル化糖鎖の強い相互作用によるものだと考えられる。次いで、蛍光標識した **TAMRA-Glycoalbumin-I** (1 μ M) と **Gal-Tz** (60 μ M) を連続的に HepG2 がん細胞に投与し同様に蛍光画像の撮影・解析したところ、**TAMRA-Glycoalbumin-I** のみと比較して蛍光量が 4 倍程度増加し、有意差を示した (**Figure 57b,e**)。これらの結果から、HepG2 細胞系中での糖鎖付け替え反応が進行しに従い ASGPR への相互作用が増加したことが強く示唆された。続いて、ASGPR が HepG2 細胞表面での相互作用部位であることを証明するため、**TAMRA-Glycoalbumin-II** に対して、競合阻害剤として(D)-ガラクトースを過剰量 (50 mM) 添加して同様の実験を実施した。その結果、**TAMRA-Glycoalbumin-II** のみの条件と比較して蛍光量が減少し、その値は **TAMRA-Glycoalbumin-I** のみの条件と同程度となった (**Figure 58d,e**)。これは、**TAMRA-Glycoalbumin-II** と HepG2 細胞の相互作用が(D)-ガラクトースによって阻害された結果であると考えられる。よって、**TAMRA-Glycoalbumin-II** は HepG2 細胞表面の ASGPR と相互作用していることを確認できた。

以上の結果に加えて、ASGPR はガラクトシル化糖タンパク質と結合したのち、クラスリン依存性のエンドサイトーシスによって、その糖タンパク質を 3 分以内に細胞内へと移行させることが知られている^{ref3}。そこで、ガラクトシル化糖鎖を有する **TAMRA-Glycoalbumin-II** の HepG2 細胞系中での細胞局在を観察し、ガラクトシル化糖鎖を有する **TAMRA-Glycoalbumin-II** が ASGPR を介して細胞内へ取り込まれるのかを調査することで、腸管排泄経路を有するかの判断材料にもなると考えた。共焦点顕微鏡を用いて、**TAMRA-Glycoalbumin-II** の HepG2 細胞への細胞局在を調査した (**Figure 58f**)。 **TAMRA-Glycoalbumin-II** (1 μ M) を HepG2 細胞に投与し、37 °Cで 3 時間インキュベーション後、PBS を用いて細胞を洗浄したのち、共焦点顕微鏡と 60 倍のレンズを用いて Hoechst 蛍光 (核染色)、TAMRA 蛍光 (糖鎖アルブミン)、マージ画像を撮影した。その結果、細胞核周辺の領域に TAMRA 蛍光が見られたことから、**TAMRA-Glycoalbumin-II** のほとんどが細胞内部へと取り込まれていたことがわかった。これらの結果は、**TAMRA-Glycoalbumin-II**

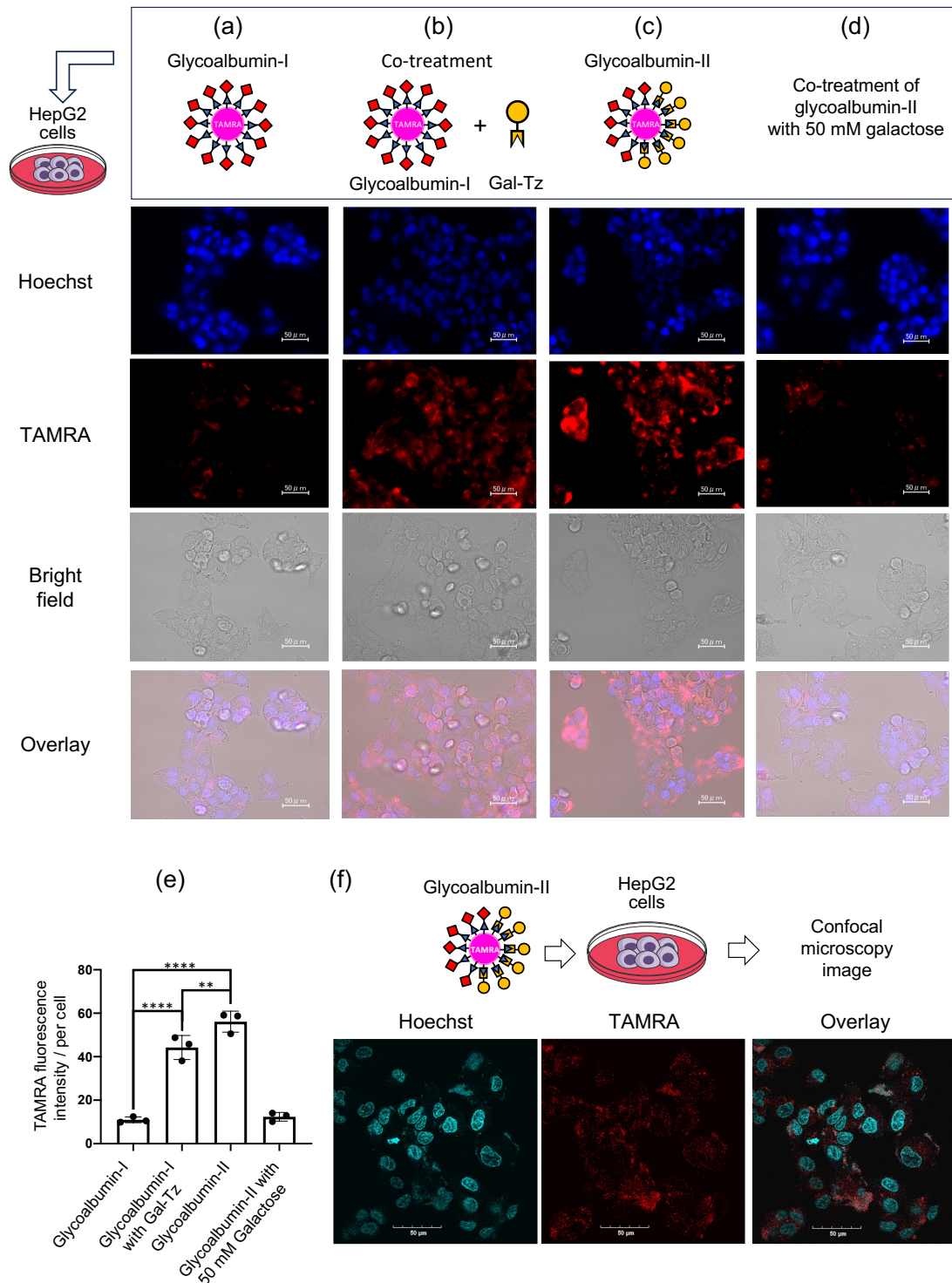


Figure 57. HepG2 細胞系中での糖鎖付け替え反応と細胞との相互作用評価 a) TAMRA-Glyco-albumin-I (1 μ M)のみ, b) TAMRA-Glycoalbumin-I (1 μ M)と Gal-Tz (300 μ M)の共処理, c) TAMRA-Glyco-albumin-II (1 μ M)のみ, d) TAMRA-Glycoalbumin-II (1 μ M)と(D)-ガラクトース (50 mM)の共処理, e)TAMRA 蛍光量のグラフ, f)共焦点顕微鏡による細胞局在の観察

が HepG2 細胞表面の ASGPR との結合を介して細胞内部に取り込まれたことに加え、**TAMRA-Glycoalbumin-II**がマウス体内で、ASGPR を介した肝実質細胞内への取り込みを受け、代謝されたのちに腸管へと移行し排泄されることを強く支持する。以上の結果より、細胞系中でのシアリル化糖鎖からガラクトシル化糖鎖への糖鎖付け替え反応の進行を証明し、HepG2 がん細胞表面の ASGPR への相互作用を制御が可能であることを示した。

1-2. SW620 がん細胞表面での糖鎖付け替え反応

HepG2 細胞に対しては、糖鎖アルブミンとの相互作用を増強させることができたため、続いては糖鎖付け替え反応によって、相互作用を減少させる場合についても検討することとした。先に述べた通り、 $\alpha(2,3)$ -シアリル化した糖鎖アルブミンは SW620 細胞を強く認識する一方で、 $\alpha(2,3)$ -シアリル化糖鎖アルブミンの半分の糖鎖をガラクトシル化糖鎖へと置き換えた糖鎖アルブミンでは、SW620 細胞への強い認識は失われる^{ref26b}。すなわち、SW620 細胞に対して相互作用しているシアリル化 **Glycoalbumin-I** を、シアリル化糖鎖とガラクトシル化糖鎖からなる **Glycoalbumin-II** へと変換することができれば、SW620 がん細胞への相互作用は弱まると期待できるため、先ほどと同様にして糖鎖付け替え反応の進行および SW620 がん細胞への相互作用制御を検討できる。

ここで、SW620 細胞表面上でシアリル化糖鎖の標的となるレクチンについて述べる。SW620 細胞表面上には、末端 $\alpha(2,3)$ -シアリル化糖鎖を認識するレクチンである **Galectin-8** が過剰発現していることが報告されている。**Galectin-8** はガレクチンの一種であり、2つの異なる糖鎖認識部位(**Gal-8N** と **Gal-8C**)がペプチドによって結合しているタンデムリピート型のガレクチンに分類される。**Galectin-8** の特徴として、**Gal-8N** が $\alpha(2,3)$ sia 糖鎖を特異的に認識することに加えて、分泌型のレクチンであることということが挙げられる (**Figure 58**)。ガレクチンの多くは、細胞表面の糖タンパク質との多価相互作用を介して、ガレクチン格子と呼ばれるネットワーク構造を形成する^{ref4}。よって、シアリル化糖鎖アルブミンと SW620 がんの相互作用においては、シアリル化糖鎖アルブミンが **Galectin-8** を介して細胞表面の糖タンパク質とネットワーク構造を形成することで細胞表面に固定化されていると考えられる。

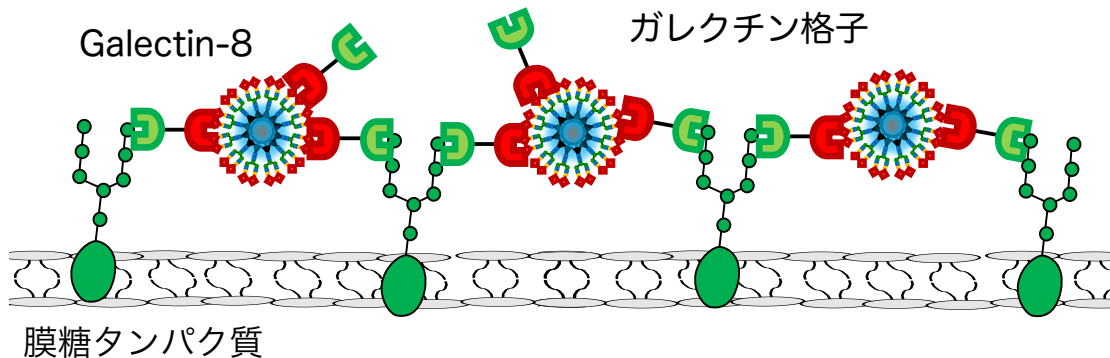


Figure 58. Galectin-8 とシアリル化糖鎖アルブミンの相互作用

以上のことを参考にして、先ほどと同様に、シアリル化糖鎖を持つ **TAMRA-Glycoalbumin-I** とガラクトシル化糖鎖が結合した **Gal-Tz** を用いて、SW620 がん細胞系中での糖鎖付け替え反応を実施した (**Figure 59**)。まず、糖鎖を持たない **TAMRA-albumin** のみ ($5 \mu\text{M}$) を SW620 細胞に投与し、 37°C で 30 分インキュベーションした後に洗浄操作を行い、細胞容器に結合して残った糖鎖アルブミンを蛍光顕微鏡にて観察し画像を撮影した (**Figure 59a**)。それぞれ Hoechst 蛍光 (核染色), TAMRA 蛍光 (蛍光修飾糖鎖アルブミン),

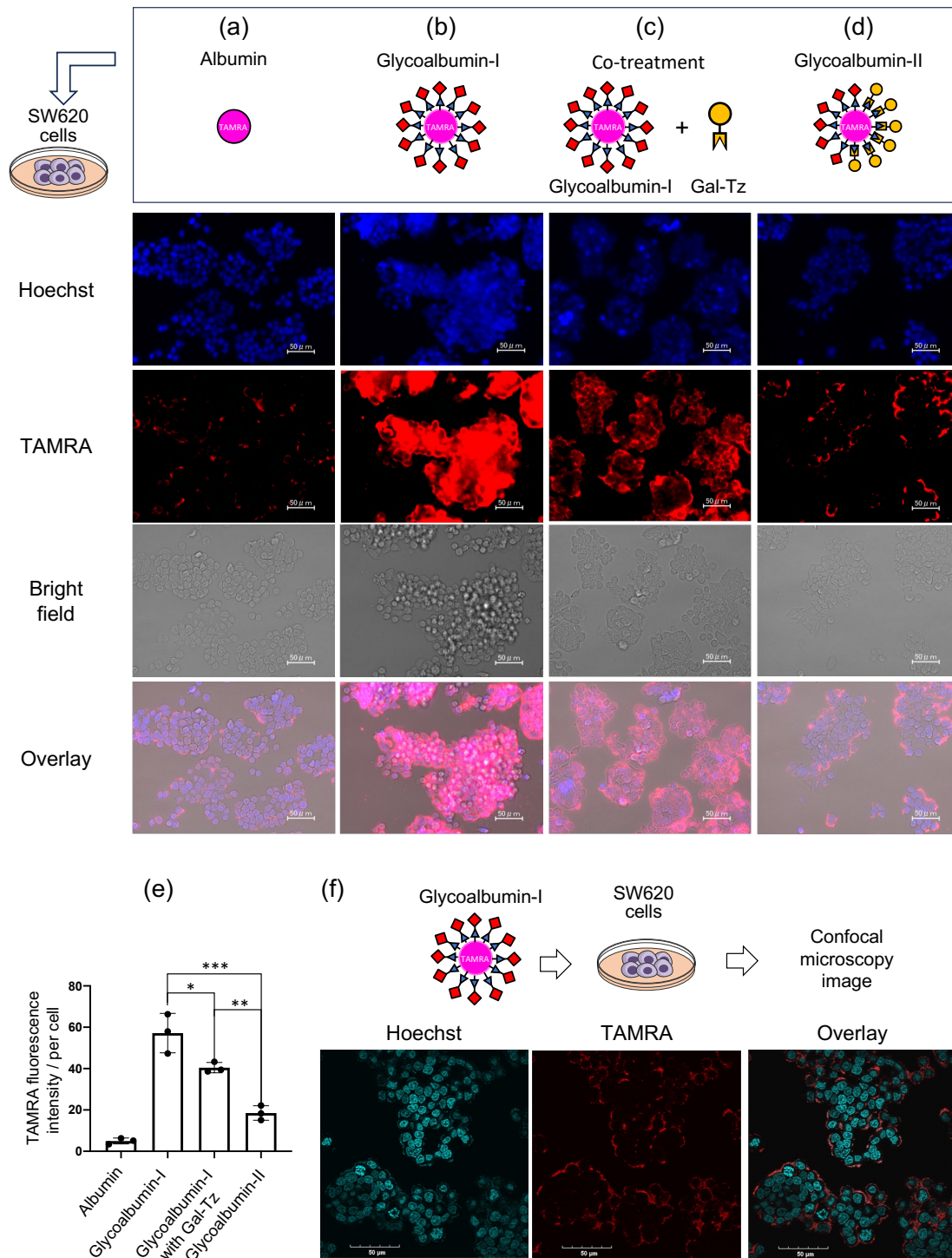


Figure 59. SW620 細胞系中での糖鎖付け替え反応と SW620 細胞との相互作用評価。 a) TAMARA-albumin (1 μ M)のみ, b)TAMARA- Glycoalbumin-I (1 μ M)のみ, c) TAMARA-Glycoalbumin-I (1 μ M)と Gal-Tz (300 μ M)の共処理, d) TAMARA-Glyco-albumin-II (1 μ M)のみ, e)TAMRA 蛍光量のグラフ, f)共焦点顕微鏡による細胞局在の観察

明視野画像，マージ画像を表している。また，HoechstおよびTAMRA蛍光画像を用いて，細胞部位のみを指定して蛍光量を定量解析した（Figure 59e）全ての実験は独立して3回ずつ実施し，有意差はtwo-way-ANOVAを用いて決定した。（* $p < 0.05$ ，** $p < 0.01$ ；*** $p < 0.001$ ）。その結果，TAMRA-albuminのみの条件と比較して，シアリル化糖鎖で修飾したTAMRA-Glycoalbumin-I（5 μM ）のみを用いた場合には，蛍光量が10倍以上増加し有意差を示した（Figure 59a,b）。よって，シアリル化糖鎖とSW620細胞間に強い相互作用が生じていることを確認できた。一方で，TAMRA-Glycoalbumin-I（5 μM ）とGal-Tz（300 μM ）を連続的にSW620がん細胞に投与し，同様の操作を実施した結果，TAMRA蛍光画像において蛍光量が約1/4倍に減少し，有意差を示した（Figure 59b）。また対照実験として，糖鎖付け替え反応が完了しているTAMRA-Glycoalbumin-II（5 μM ）のみを投与した場合には，蛍光量が1/6倍に減少し，有意差を示した（Figure 59c）。これらの結果から，SW620がん細胞系中で，TAMRA-Glycoalbumin-IとGal-Tzの糖鎖付け替え反応が進行し，SW620がん細胞への相互作用が弱まったことが強く示唆される。

ここでSW620細胞への相互作用が減少する要因として，糖鎖付け替え反応の進行に従い，SW620細胞との認識を担うシアリル化糖鎖がリリースされるため，SW620がんへの多価相互作用が弱くなること考えられる。一方で，新たに糖鎖アルブミンに導入されるガラクトシル化糖鎖は，SW620がん細胞に対して強い認識を示さないことがわかっているため，立体障害としてSW620がん細胞との相互作用を阻害すると考えられる。つまり，糖鎖付け替え反応によって以上の二つの効果が発揮され，SW620がんへの相互作用が弱められていると考えられる。

さらにHepG2細胞の場合と同様に，共焦点顕微鏡を用いてTAMRA-Glycoalbumin-IのSW620細胞に対する細胞局在を調査した。すなわち，SW620細胞に対してTAMRA-Glycoalbumin-I（5 μM ）を投与し，37°Cで30分インキュベーションしたのち共焦点顕微鏡と60倍のレンズを用いて，Hoechst蛍光（核染色），TAMRA蛍光（糖鎖アルブミン），マージ画像を撮影した（Figure 59f）。その結果，細胞核周辺の領域にはTAMRA蛍光が見られず，細胞膜周辺の領域にのみTAMRA蛍光が観察された。つまり，HepG2細胞とTAMRA-Glycoalbumin-IIの組み合わせでは糖鎖アルブミンが細胞内に局在することと対照的に，SW620細胞膜上にTAMRA-Glycoalbumin-Iが分布していることが明らかとなった（Figure 60）。

さらに10分後・30分後・3時間後でのTAMRA-Glycoalbumin-Iの1局在の経時変化を観察した（Figure 60）。その結果，10分および30分における観察では，先ほどと同様に細胞膜周辺の領域にTAMRA蛍光が観察される一方，3時間後における観察では，TAMRA-Glycoalbumin-Iが細胞内部へと取り込まれていたことがわかった。

ここで，糖鎖付け替え反応を利用した生体内移動において，糖鎖アルブミンの細胞膜上への分布は有利に働くと考えられる。もし糖鎖アルブミンが細胞内に局在している場合，糖鎖付け替え試薬Gal-Tzも細胞内に送達しなければ反応できない。細胞内での糖鎖付け替

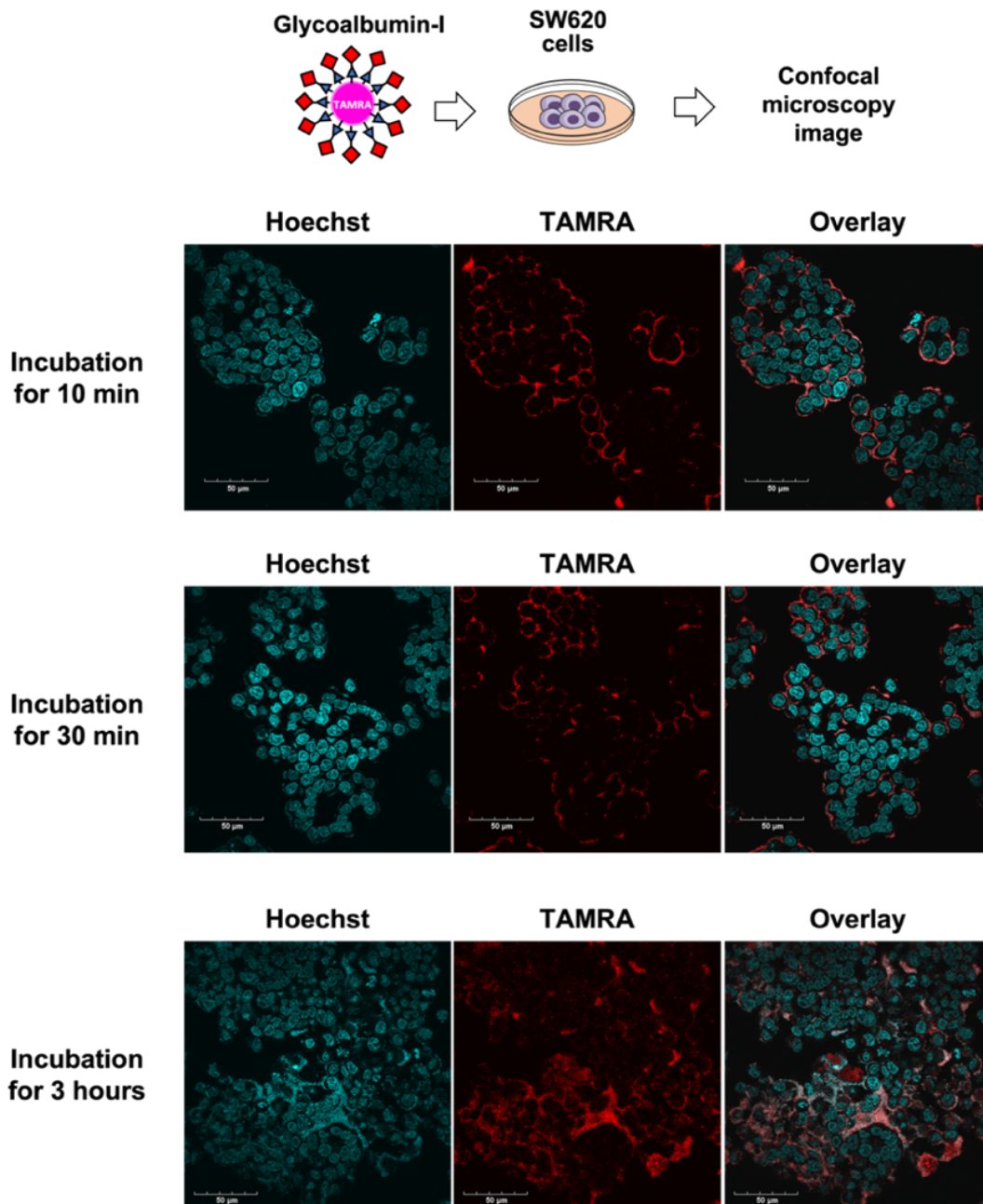


Figure 60. 共焦点顕微鏡を用いた TAMRA-Glycoalbumin-I の SW620 細胞系中での局在
え反応が進行したとしても、糖鎖アルブミンが細胞外に排出されなければ、他の臓器や細胞へと移動することはできない。また、一度細胞内に取り込まれれば、代謝されるため、そのままの構造を保って細胞外に戻ってくることは期待できない。よって、細胞膜上に局在する糖鎖アルブミンに対して、糖鎖付け替え反応を実施することが望ましい。
本結果は、**Glycoalbumin-I**を用いて SW620 がんを最初に標的化し、**Glycoalbumin-I**が SW620 がん細胞膜上に留まっている間に糖鎖付け替え反応を実施できれば、効率よく糖鎖付け替え反応・体内移動が進行することを示唆している。

第二節 動物体内での糖鎖付け替え反応の検討

第二章第一節では、HepG2 および SW620 がん細胞系中での糖鎖付け替え反応を実施し、がん細胞認識の変化を可視化・定量化することで、細胞表面での反応の進行を証明した。よって、第二章第二節では、マウス体内での糖鎖付け替え反応と体内移動を検討した。

2-1. マウス体内の血中での糖鎖付け替え反応

HepG2 細胞を用いた検討から、糖鎖付け替え反応によって ASGPR に対する相互作用を強め、腸管排泄を促進できることが示唆された。よって、マウス体内でのシアリル化糖鎖からガラクトシル化糖鎖への糖鎖付け替え反応により、血中から腸管への移動を検討することとした。この際、シアリル化糖鎖からガラクトシル化糖鎖への付け替えにより、排泄経路が尿から腸管へと切り替わると予想される。よって、マウス体内での糖鎖付け替え反応を実施するとともに、糖鎖アルブミンの体内動態の変化を追跡し、血中から腸管への移動、排泄経路の切り替わりが進行しているかを確認する。ここで、糖鎖アルブミンの体内動態を観察する手法が必要となる。

以前に我々は、蛍光修飾糖鎖アルブミンを利用したマウス体内動態イメージング手法を開発している。近赤外領域に吸収を持つ FL750 蛍光基は、励起光、蛍光ともに生体をよく透過し、餌や生体内でのバックグラウンド蛍光に影響を受けないため、生きたマウス体内で、高感度に、任意の時間に分子イメージングを実施可能である。序論でも示した通り、FL750 で修飾した糖鎖アルブミンを用いたマウス体内動態イメージングにより、糖鎖パターンに依存した体内動態の違いを明確に示すことに成功している。よって、本研究においても同様の手法を用いて、体内分布の経時変化を観察することとした。まず、この検証実験に用いる FL750-Glycoalbumin-I を調製した (Figure 61)。FL750-スクシンイミジルエステルをアルブミンに対して 4 等量作用させ、DMSO/PBS 混合溶媒中 37°C で 10 分反応させたのち、Amicon10K にて限外濾過・洗浄し精製した。得られたサンプルの MALDI-TOF-MASS 測定より、アルブミンの分子量(66.5 kDa)から反応後には 68.1 kDa まで分子量が増加していたことから、1 個の蛍光基を導入した FL750-linked albumin を調製することができた。

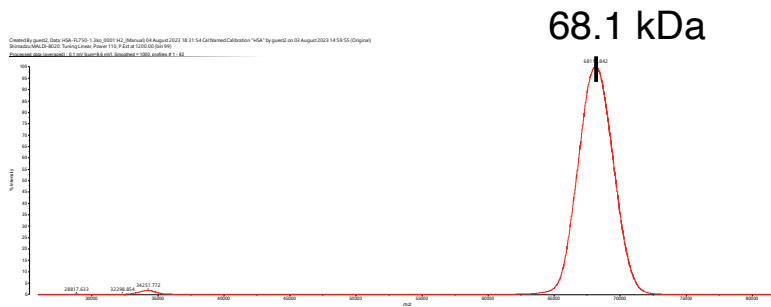
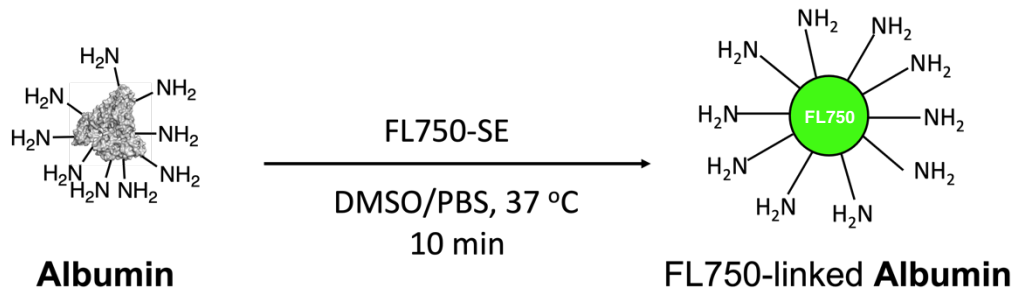


Figure 61. FL750 アルブミンの MALDI-TOF-MASS 分析

続いて、これまでと同様の手順で、**FL750-linked albumin** に対して糖鎖修飾反応を行った (**Figure 62**)。糖鎖修飾反応後の MALDI-TOF-MS 測定により、分子量は 99.2 kDa となり、FL750-linked glycoalbumin-I の糖鎖修飾数を 9 個と算出した。

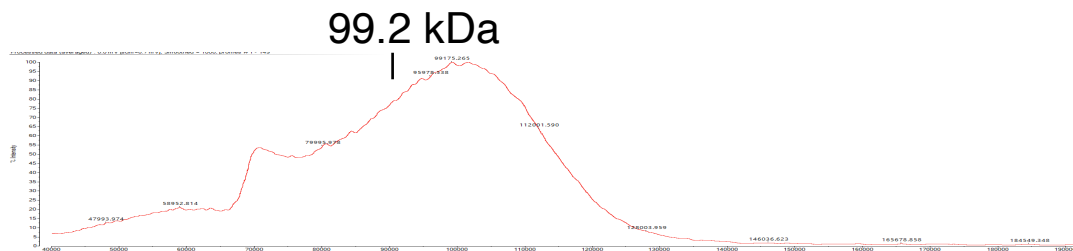
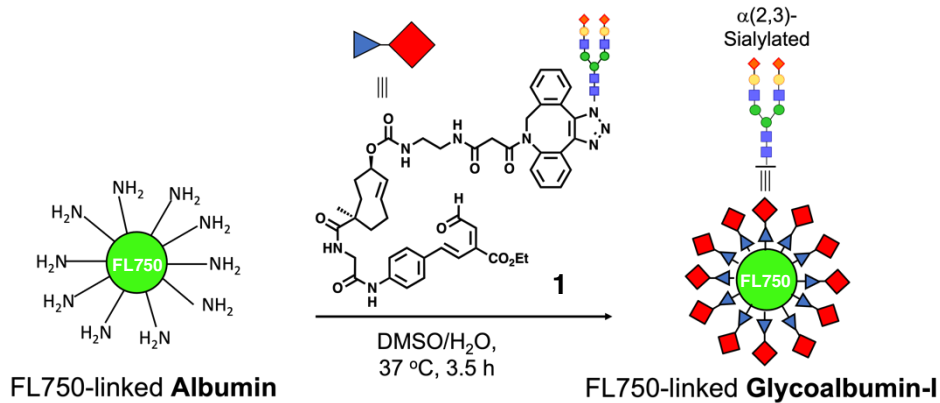


Figure 62. FL750-albumin-I の MALDI-TOF-MASS 分析

さらに FL750-linked Glycoalbumin-I に対して 50 等量の Gal-Tz を作用させることで、FL750-linked Glycoalbumin-II へと変換した (Figure 63)。本反応を MALDI-TOF-MS を用いて追跡した結果、30 分後には分子量が 110 kDa まで増加し、16 時間後には分子量が 99.9 kDa まで減少したことから、約 5 個のガラクトシル化糖鎖を付加し、4 個のシアリル化糖鎖をリリースすることができた。つまり、シアリル化糖鎖 5 個とガラクトシル化糖鎖 5 個を有する FL750-linked Glycoalbumin-II を得た。

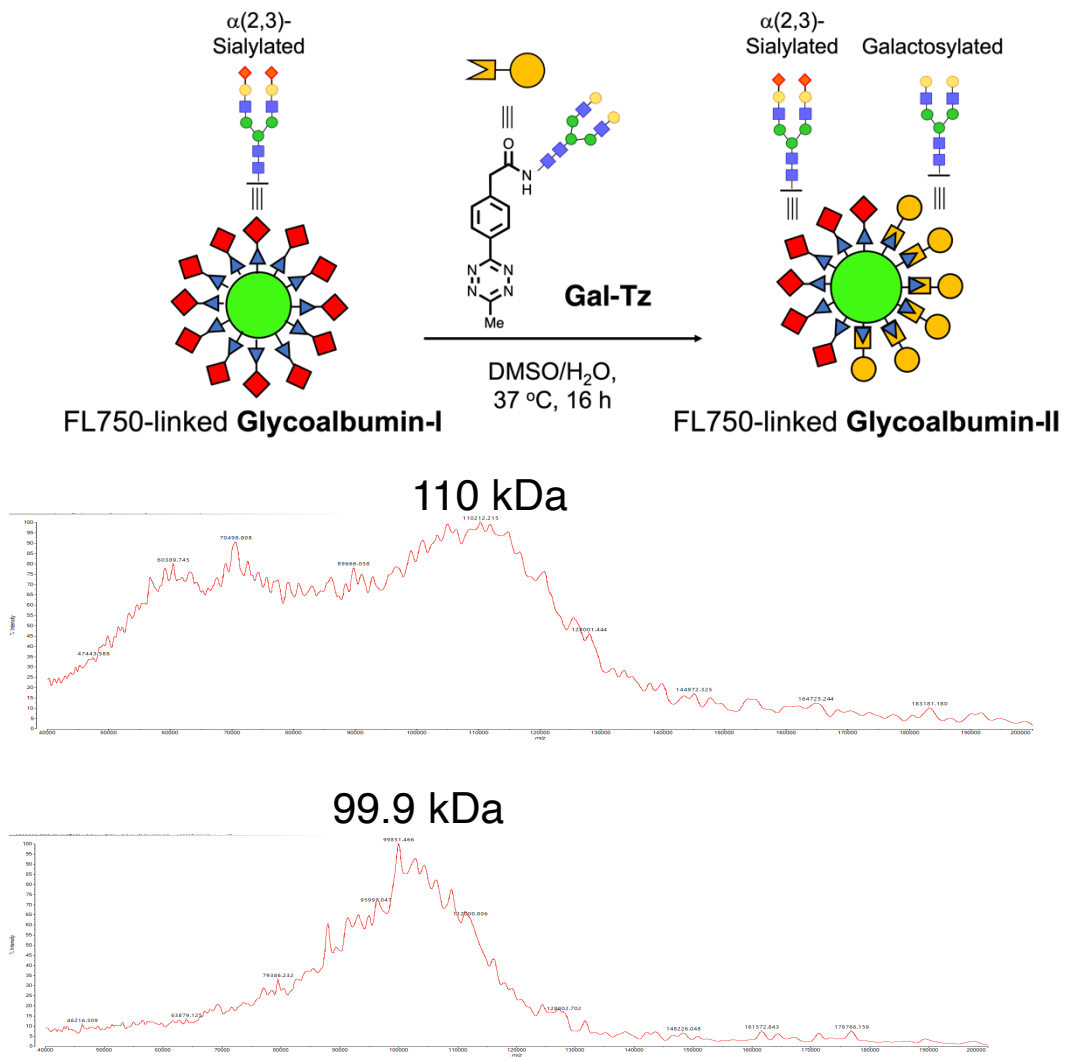


Figure 63. FL750-Glycoalbumin-IIの MALDI-TOF-MASS 分析

FL750-Glycoalbumin-I, IIを調製できたため、マウス体内での糖鎖付け替え反応により、糖鎖アルブミンの代謝経路を尿から腸管排泄へ切り替える検討に移った。すなわち、ヌードマウスへ **FL750-Glycoalbumin-I** を尾静脈注射することで血中へ直接投与して **FL750-Glycoalbumin-I** を血中で循環させたのち、同様にして **Gal-Tz** を血中に投与して **FL750-Glycoalbumin-I** に作用させることで糖鎖付け替え反応を実施した。**FL750** 修飾糖鎖アルブミンの体内動態を蛍光イメージングにて観察することで、代謝経路が尿から腸管へと切り替わり、血中から腸管へと糖鎖アルブミンが移動したかを確認することとした。

本実験では細胞実験同様の三つの条件を用いて、糖鎖アルブミンの体内動態を比較した (**Figure 64a**)。まずコントロール条件として、ヌードマウスに対して、**FL750-Glycoalbumin-I** (1.5 nmol) あるいは **FL750-Glycoalbumin-II** (1.5 nmol) の生理食塩水溶液 (200 μ L) を尾静脈注射し、蛍光イメージングにて体内動態を比較した。一方、体内で糖鎖付け替え反応を行う条件として、**FL750-Glycoalbumin-I** (1.5 nmol) の生理食塩水溶液 (100 μ L) をヌードマウスへ尾静脈注射し、その 10 分後に、**Gal-Tz** (500 nmol) の生理食塩水溶液 (100 μ L) を尾静脈注射した。全ての条件において、投与 3 時間後にマウスの全身イメージングを実施した。その後マウスを解剖し、腸管・尿・血液を採取してそれぞれイメージングし結果を比較した。

まず、全個体での投与 3 時間後のマウス開腹状態での全身イメージングの結果を示した。白い矢印で示した部分が膀胱部分の蛍光を、黄色の矢印で示した部分が腸管の蛍光を指している。**FL750-Glycoalbumin-I** のみ投与した場合には (**Figure 65b**) 膀胱部分の蛍光のみが観測されたのに対して (**Figure 65c**)、**FL750-Glycoalbumin-II**のみを投与した場合 (**Figure 65d**) には全ての個体で腸管部分での蛍光が確認できた。**FL750-Glycoalbumin-I** と **Gal-Tz** を投与した場合にも、全ての個体で腸管部分での蛍光が確認できたため、反応がマウス体内で進行し、血中から腸管へと糖鎖アルブミンが移動していることが示唆された。この結果だけでも、糖鎖アルブミンの代謝経路の明確な変化を、生きた状態のマウス全身イメージングによって証明することができた。

続いて、投与 3 時間後にマウスを解剖し、腸管・尿・血液を採取してそれぞれイメージングし結果を比較した (**Figure 65a**) また、腸管・尿・血液の蛍光イメージング画像から、蛍光量をそれぞれ算出し、分布量をそれぞれグラフ化し、二元配置分散分析法 (two-way ANOVA) を用いて、それぞれの条件での蛍光量における有意差を判定した。 (**Figure 65b~d**)。その結果は、全身イメージングと一致していた。まず、腸管に関して、**FL750-Glycoalbumin-I** と比較して、**FL750-Glycoalbumin-I** と **Gal-Tz** の連続投与条件および **FL750-Glycoalbumin-II**の条件では蛍光量が 3 倍に増加し、有意差な差を示した。一方で尿においては、**FL750-Glycoalbumin-I** と比較して、**FL750-Glycoalbumin-I** と **Gal-Tz** の連続投与条件および **FL750-Glycoalbumin-II**の条件では 1/2 倍程度に減少し、有意差を示した。これらの結果より、糖鎖付け替え反応の進行および糖鎖アルブミン代謝経路の尿から腸管排泄へと切り替え、および血中から腸管への糖鎖アルブミンの生体内移動を実証した。

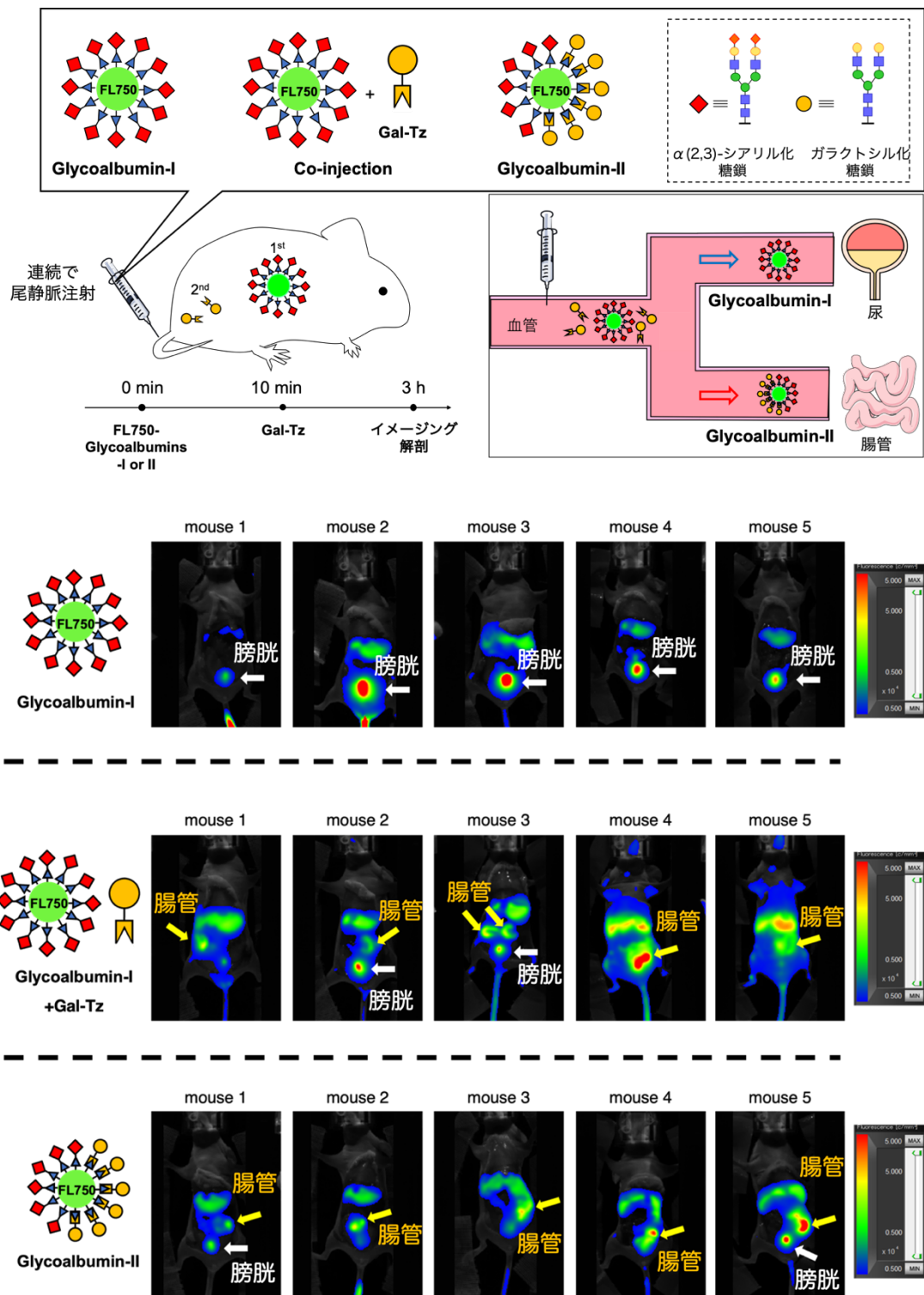


Figure 64. 血中内での糖鎖付け替え反応による糖鎖アルブミンの代謝経路の制御と血中から腸管への移動。FL750-Glycoalbumin-Iのみ，FL750-Glycoalbumin-IとGal-Tz，FL750-Glycoalbumin-IIのみを投与した結果をそれぞれ示している（黄色の矢印：腸管，白色の矢印：膀胱）

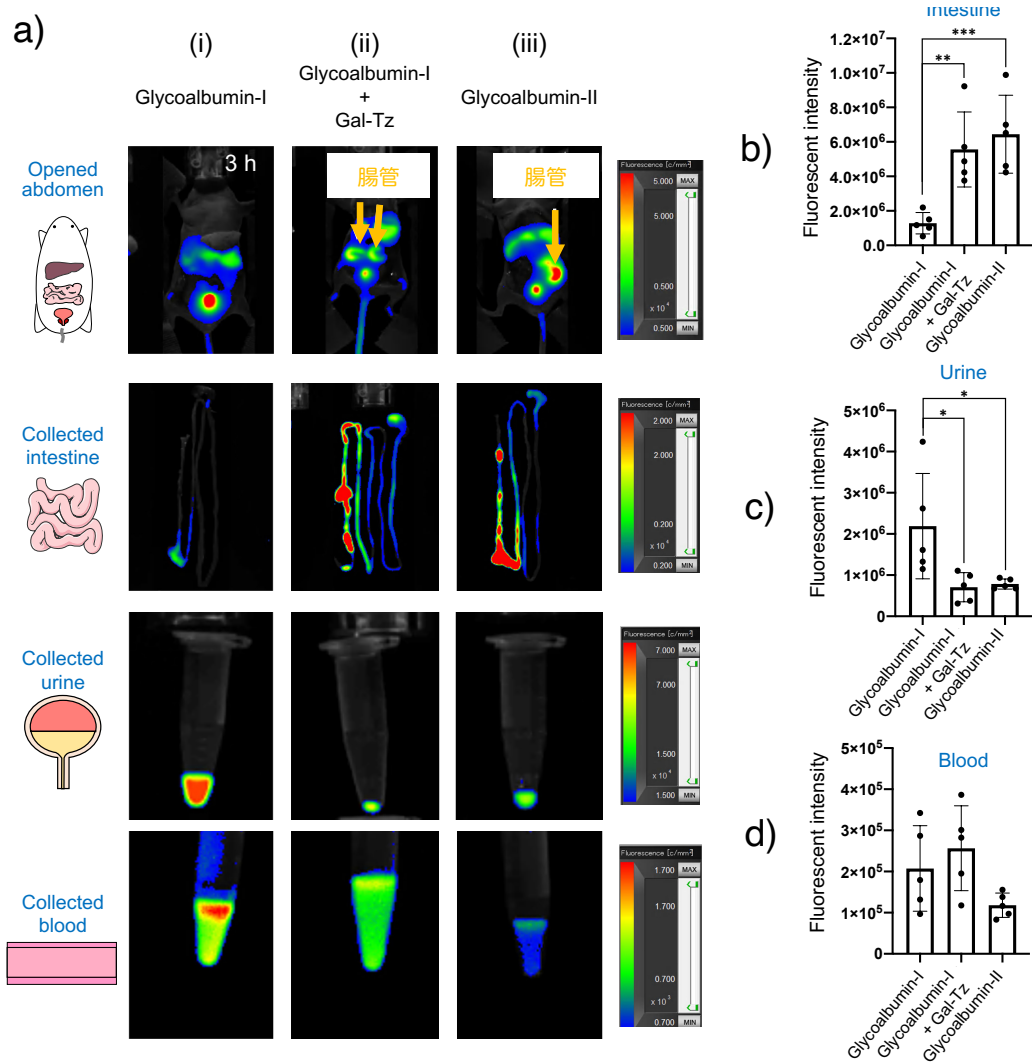
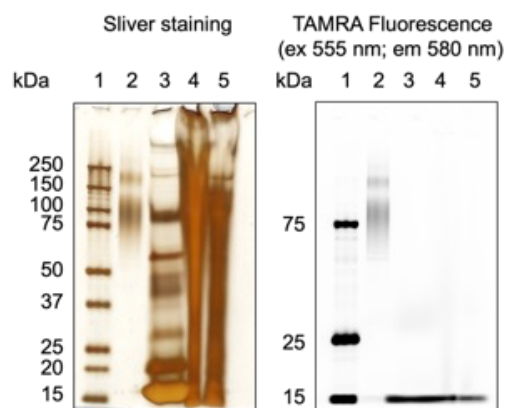


Figure 65. 血中内での糖鎖付け替え反応による糖鎖アルブミンの体内分布の調査。マウス解剖後の a) 全身（開腹した状態で腹側から）、腸管、血液、尿の蛍光イメージング画像。b)腸管 c)血液 d)尿での蛍光量のグラフ、黄色の矢印:腸管

これまでの動物実験の結果から、糖鎖付け替え反応が生体内で進行し、ガラクトシル化された糖鎖アルブミンが腸管へ移行することを証明したが、ガラクトシル化糖鎖アルブミンが肝臓でどのように代謝を受け腸管へ移行するかについては実際に調査されていなかった。そこで、糖鎖アルブミンをマウスに投与したのち、腸管・尿にどのような形で存在しているかを調査することにした。つまり、尿・腸管に移行した糖鎖アルブミンを SDS-PAGE により分離するとともに、おおよその分子量を見積もることで、糖鎖アルブミンの代謝を追跡することとした。

先ほど同様に **TAMRA-Glycoalbumin-II** をヌードマウスに投与し、三時間後にマウスを解剖後、尿・便を採取した (**Figure 66**)。SDS-PAGE を用いて尿・便のサンプルを分離し、TAMRA の蛍光バンドを観察した。Lane 1 をタンパク質スタンダード、Lane 2 を **TAMRA-Glycoalbumin-II**、Lane 3 を尿、Lane 4,5 を腸の抽出物 (Lane 4: 盲腸の抽出物、Lane 5: 結腸内の便抽出物) とし、SDS-PAGE ゲルを銀染色または TAMRA 蛍光イメージングした結果を **Figure 70** に示した。その結果、**TAMRA-Glycoalbumin-II** そのものの蛍光バンドが 75kDa 付近に幅広く検出されたのに対し (Lane 2)、尿・腸抽出物の蛍光バンドは 15kDa 以下の位置に検出された (Lane 3-5) よって、マウスに投与した **TAMRA-Glycoalbumin-II** は、肝臓での代謝を受けて 15kDa 以下の TAMRA 修飾ペプチドへ断片化したのちに腸管へと移行していることが明らかとなった。本結果は、ガラクトシル化糖鎖アルブミンが肝臓表面の ASGPR との相互作用を介して肝実質細胞に取り込まれ、代謝を受けたのちに腸管へ移行するという推定排泄経路と一致しており、この排泄経路を支持する結果となった。



Lane 1 protein MW standard

Lane 2 **FL750-Glycoalbumin-II**

Lane 3 urine

Lane 4 extract from the cecum

Lane 5 extract from inner feces of the colon

Figure 66. 尿および腸管に移行した **TAMRA-Glycoalbumin-II** の SDS-PAGE

2-2. 腫瘍組織内での糖鎖付け替え反応

これまでの実験から、マウス体内でも **Glycoalbumin-I**の糖鎖付け替え反応が進行し、糖鎖パターン認識の変化に伴い糖鎖アルブミンの代謝経路を制御できることが明らかとなった。つづいて、糖鎖アルブミンの腫瘍内での糖鎖付け替え反応による腫瘍から腸管への移動を検討した。細胞実験の結果より、マウス体内の腫瘍組織においても、シアリル化糖鎖を有する **Glycoalbumin-I** は SW620 がん細胞強く認識する一方で、**Glycoalbumin-II**への糖鎖付け替え反応が進行すれば、相互作用は弱まりがん細胞から乖離すると期待できる。また、**Glycoalbumin-II**は速やかに腸管へ移行し便として排泄されることを既に明らかとしているため、糖鎖アルブミンは腫瘍組織から腸管へと移動すると期待できる。ここで、先ほどのマウス実験では糖鎖アルブミンと Gal-Tz を尾静脈投与したが、本実験では、腫瘍組織から腸管への移動を着実に進行させ、これを可視化すること最優先とし、腫瘍内投与を選択した。すなわち、腫瘍内投与により、糖鎖アルブミンと Gal-Tz が腫瘍内に高濃度で存在することになるため、反応が加速されてより移動が起こりやすくなると期待した。

担がんマウスに対して、先ほど同様三つの条件を実施することで糖鎖アルブミンの腫瘍-腸管間移動を検討した (**Figure 67a**)。まず、**FL750-Glycoalbumin-I** (0.5 nmol) の生理食塩水溶液 (10 μ L) を腫瘍組織内に直接注射し、その 10 分後に、**Gal-Tz** (200 nmol) のセライン溶液 (10 μ L) を腫瘍組織内に注射して、蛍光イメージングを実施した。注射後一時間毎にマウス全身の蛍光イメージングを行い、アルブミンのマウス体内での動態を観察した。投与 5 時間後にマウスを解剖し、腸管・尿・血液を採取してそれぞれイメージングを実施した。対照実験として、SW620 担がんマウスに対して、**FL750-Glycoalbumin-I** (0.5 nmol) の生理食塩水溶液 (20 μ L) あるいは **FL750-Glycoalbumin-II** (0.5 nmol) の生理食塩水溶液 (20 μ L) を投与して蛍光イメージングを実施し体内動態を比較した。

まず、全ての条件において、投与直後には大部分の蛍光が腫瘍内に観測され、腫瘍内への投与に成功したことを確認した (**Figure 67a : 右上**)。続いて投与 5 時間後のマウス解剖後に腸管・尿・血液の蛍光イメージングを実施した (**Figure 67b**)。さらに、これらの蛍光イメージング画像から、蛍光の分布量をそれぞれ算出し、グラフ化した (**Figure 67 c,d,e**)。この際、二元配置分散分析法 (two-way ANOVA) を用いて、各条件での蛍光量の有意差を確認した。まず腸管の蛍光分布量において **FL750-Glycoalbumin-I** を基準として、**FL750-Glycoalbumin-I < FL750-Glycoalbumin-I + Gal-Tz < FL750-Glycoalbumin-II**の順に蛍光量がそれぞれ3倍、4倍に増加した。この結果は、腫瘍組織から腸管へと糖鎖アルブミンが移動したことを示す確かな証拠である。一方で尿において、**FL750-Glycoalbumin-I > FL750-Glycoalbumin-I + Gal-Tz > FL750-Glycoalbumin-II**の順になり、蛍光量がそれぞれ 1/4 倍に減少した。これらの結果は、糖鎖付け替え反応が腫瘍組織内において進行し、糖鎖アルブミンの代謝経路が尿から腸管へと切り替わったことを示している

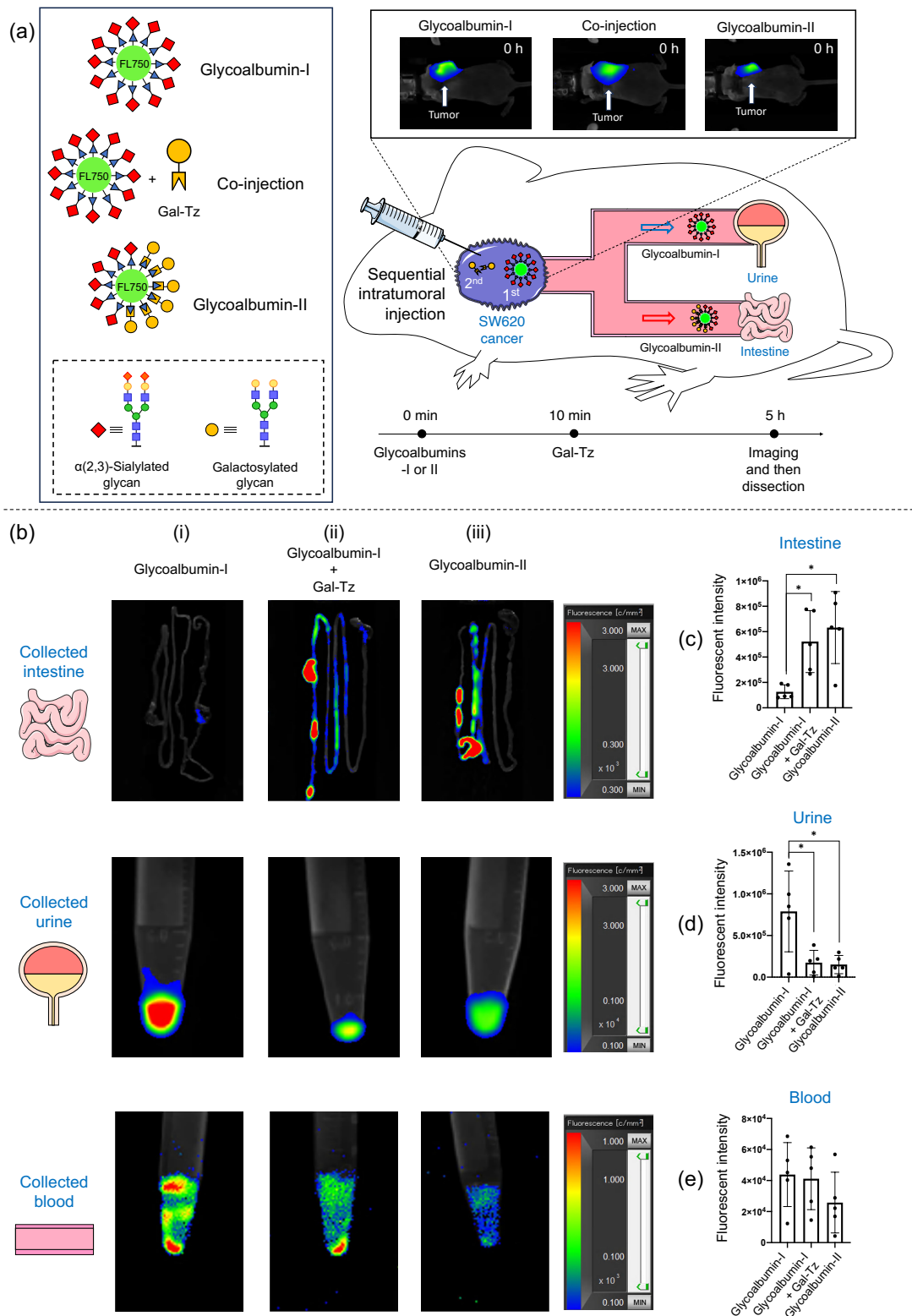


Figure 67. 腫瘍組織内での糖鎖付け替え反応による FL750 修飾糖鎖アルブミンの移動実験 a)SW620 担がんマウスを用いた実験プロトコル。b)全身（開腹した状態で腹側から）、腸管、血液、尿の蛍光イメージング画像 c)腸管 d)血液 e)尿の蛍光量

第三節 結論

第二章では、糖鎖アルブミンの生体内移動の実現に向けて、細胞系あるいはマウス体内での糖鎖付け替え反応をおよびマウス体内移動を検討した。その結果、マウス体内の血中あるいは腫瘍組織内で糖鎖付け替え反応が進行し、血中または腫瘍組織から腸管へと糖鎖アルブミンを移行させることができた。

第一節では、細胞系中での糖鎖付け替え反応を検討した。シアリル化糖鎖のみからなる **Glycoalbumin-I** からガラクトシル化糖鎖をもつ **Glycoalbumin-II** へと糖鎖付け替えすることで、HepG2 がん細胞に対しては相互作用を強め、SW620 がん細胞に対しては相互作用を弱めたことを実証し、がん細胞認識を制御可能であることを示した。さらに共焦点顕微鏡を用いた観察により、SW620 がん細胞に **Glycoalbumin-I** を投与した場合には、がん細胞表面に糖鎖アルブミンが局在しているのに対し、HepG2 がん細胞と **Glycoalbumin-II** の場合には、細胞内部に糖鎖アルブミンが取り込まれていることまで明らかとした。

第二節では、マウス体内での糖鎖付け替えとマウス体内での移動実験を実施した。まず、マウス体内での蛍光イメージングにおいて、FL750 蛍光修飾糖鎖アルブミンを利用してマウス体内動態を観察することとした。シアリル化糖鎖を有する **FL750-Glycoalbumin-I** からガラクトシル化糖鎖を有する **FL750-Glycoalbumin-II** への糖鎖付け替えをマウス血中内で試みたところ、糖鎖アルブミンの代謝経路が尿から腸管へと切り替わり、糖鎖付け替え反応の進行を確認し、糖鎖アルブミンの血中から腸管への移動を実証した。最後に、SW620 担がんマウスを用いて、腫瘍組織内での糖鎖付け替え反応を実施した。糖鎖アルブミンの体内分布を比較することで、反応進行に伴って排泄経路が腸管から尿へと切り替わり、糖鎖アルブミンが腫瘍組織内から腸管へと移行したことを証明した。

以上の結果から、化学反応を駆動力として糖鎖アルブミン分子が生体内を移動するという概念を実証することができた。これらの結果から、糖鎖アルブミンの糖鎖付け替え戦略によって、投与から排泄までを制御するドラッグデリバリーシステムの実現が期待できる。

総括

糖鎖のパターン認識機構においては、糖鎖パターンの小さな違いが認識に大きな違いを生み出すことに着目し、これまでに誰も達成したことのない、生体内を標的から標的へと移動する糖鎖クラスター分子を創成できると考えた。近年発展が目覚ましい生体内化学反応と組み合わせることで、生体内での化学反応をトリガーとして糖鎖パターンを自在に変化させ、標的認識を制御する手法を考案した。

これまでに田中研究室では、糖鎖アルブミンによるがんターゲットングを開発しており、アルブミンに修飾した糖鎖パターンの違いに依存して、異なるがんや体内の臓器を選択的に見分けることができた。そこで、糖鎖アルブミン上の糖鎖パターンを動物の体内で更新することができれば、体内での標的の更新に伴い、糖鎖アルブミンが標的から新たな標的へと移動すると考えた。

第一章では、生体内を移動する糖鎖アルブミン分子の実現に向け、糖鎖リモデリング反応を開発した。本反応に必要な、TCO 導入糖鎖アルブミン:**Glycoalbumin-I**、糖鎖結合テトラジン:**Gal-Tz**を合成し、両者の反応をフラスコあるいはマウス血液中で実施した。糖鎖アルブミンの分子量変化を追跡することで、新たな糖鎖の付加と古い糖鎖の脱離の二段階の反応を確認し、糖鎖リモデリング反応を実証した。さらに、モデル化合物を用いて糖鎖リモデリング反応の速度についても調査し、新たな糖鎖の付加段階が早く進行することから、*in vitro* および *in vivo* での利用に有利であることを明らかにした。

第二章では、マウス体内での糖鎖リモデリングとマウス体内での移動実験を実施した。まず、マウス体内での蛍光イメージングにおいて、FL750 蛍光修飾糖鎖アルブミンを利用してマウス体内動態を観察することとした。シアリル化糖鎖を有する **FL750-Glycoalbumin-I**からガラクトシル化糖鎖を有する **FL750-Glycoalbumin-II**への糖鎖リモデリングをマウス血中内で試みたところ、糖鎖アルブミンの代謝経路が尿から腸管へと切り替わったことから、糖鎖リモデリング反応の進行と糖鎖アルブミンの血中から腸管への移動を実証した。また、SW620 担がんマウスを用いて、腫瘍組織内での糖鎖リモデリング反応を実施した。糖鎖アルブミンの体内分布を比較することで、反応進行に伴って排泄経路が腸管から尿へと切り替わり、糖鎖アルブミンが腫瘍組織内から腸管へと移行したことを証明した。これらの結果から、化学反応を駆動力として糖鎖アルブミン分子が生体内を移動するという概念を実証することができた。

以上のように著者は本博士論文において、糖鎖アルブミン上での糖鎖リモデリング反応を開発し、フラスコ中・*in vitro*・血中または腫瘍組織中でこれを実施することで、糖鎖リモデリング反応が進行して糖鎖アルブミンの標的認識が更新され、マウスの体内を糖鎖アルブミンが移動することを証明した。当研究室では糖鎖パターンの組み合わせの探索や、糖鎖アルブミンの人工金属酵素化とがん治療研究への展開も同時に進行中であり、糖鎖アルブミンの体内移動戦略をがん治療へと展開し、より身体的負担の少ないがん治療の実現も可能となると期待される。

Experimental section

General information.

Reagents and buffer components were purchased from Sigma-Aldrich, Fisher Scientific, TCI, Wako Chemicals without further purification. All N-glycans were supplied from Glytech, Inc. Human serum albumin, lyophilized powder (Product no. A1653-5G), was purchased from Sigma-Aldrich. HiLyte™ Fluor 750 acid, SE (Product no. AS-81266) was purchased from Anaspec, Inc. 5(6)-TAMRA, SE (Product no. ABD-371-100) was purchased from AAT Bioquest, Inc. DMEM medium (Product no. 044-29765) and Leivovitz's L-15 medium (Product no. 128-06075) were purchased from Wako Chemicals. FBS (Mexico origin, Product no.173012) was purchased from Sigma-Aldrich. 1% penicillin-streptomycin (Product no. 15140-122) was purchased from Gibco. Amicon Ultra Centrifugal Filters (10 kDa) was purchased from Merck Millipore. All experiments dealing with air and moisture sensitive compounds were conducted under an atmosphere of argon. Anhydrous solvents were used as received, including dichloromethane (anhydrous; Kanto Chemical), DMF (anhydrous; Kanto Chemical). Thin layer chromatography (TLC) analyses (F-254) were performed with 60Å silica gel from Merck.

Nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy. ¹H- and ¹³C-NMR spectra were measured by Bruker (400MHz) instruments with the solvent peaks as internal standard δ H 7.26 and δ C 77.0 for CDCl₃, δ H 5.32 and δ C 53.8 for CD₂Cl₂.

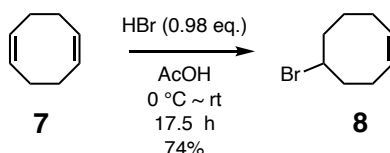
HPLC analysis. To identify compounds from reaction mixtures, reverse-phase HPLC was used with a Shimadzu system consisting of two LC-20AP pumps, an SPD-20AV photodiode array detector. The column was an analytical 4.6 × 250 mm Cosmosil 5C18-AR-300 from Nacalai Tesque. Samples were eluted using a combination of mobile phases A (H₂O with or w/o 0.1% TFA) and B (acetonitrile with or w/o 0.1% TFA).

For absorbance, the detector was set to 220 and 254 nm. Product peaks are identified by retention times and mass spectrometry analysis.

Mass spectrometry (MS). For chemical synthesis, high-resolution mass spectra were obtained on a Bruker MicroTOF-QIII spectrometer by electron spray ionization time-of-flight (ESI-TOF-MS). High weight mass characterizations (i.e. albumin and glycoalbumin) were done using matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) analysis on a Shimadzu Benchtop Linear MALDI-8020 mass spectrometer. Sample preparations used sinapic acid as a matrix.

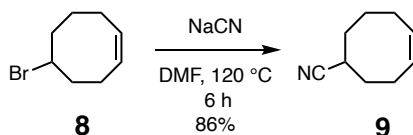
Synthesis of compounds

Synthesis of **8**



To a stirred solution of 33 %w/w HBr in AcOH (22.2 mL, 90.6 mmol, 0.98 eq.), (1Z,5Z)-cycloocta-1,5-diene (10 g, 92.4 mmol, 1 eq.) was added dropwise into above solution over 30 minutes at 0 °C. The reaction mixture was stirred for 17.5 h and allowed to warm to room temperature. The reaction mixture was diluted with H₂O and extracted with 10% Et₂O in pentane. The combined organic layers were washed with H₂O and sat. NaHCO₃, dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated in vacuo. The crude **8** (12.9 g, 68.4 mmol, 74%) was obtained as an oil and used in the next step without further purification: ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 5.70 – 5.54 (m, 2H), 4.40 – 4.21 (m, 1H), 2.47 – 2.37 (m, 1H), 2.34 – 2.19 (m, 3H), 2.19 – 1.99 (m, 4H), 1.79 – 1.67 (m, 1H), 1.60 – 1.48 (m, 1H). Spectroscopic data was in agreement with literature¹.

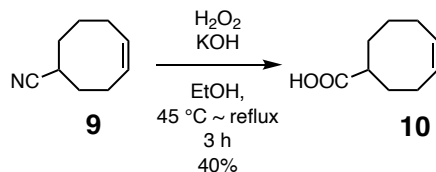
Synthesis of **9**



The suspension of Sodium cyanide (9.39 g, 191.5 mmol, 2.8 eq.) in Anhydrous DMSO (250 mL) was stirred at 100 °C to dissolve the cyanide. The crude bromide **8** (12.9 g, 68.4 mmol, 1 eq.) was added to the reaction mixture over 30 minutes using a dropping funnel. The reaction mixture was stirred for 6 hours at 120 °C before cooling on ice and diluting with H₂O. The aqueous phase was extracted with 10% Et₂O in hexane. Performing the extraction without cooling the reaction mixture often resulted in the formation of emulsions. The combined organic layers were dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated in vacuo. The crude nitrile **9** (7.95 g, 58.8 mmol, 86%) was obtained as an orange oil and used in the next step without further purification.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 5.76 – 5.50 (m, 2H), 2.85 – 2.73 (m, 1H), 2.51 – 2.35 (m, 1H), 2.33 – 2.19 (m, 1H), 2.19 – 2.06 (m, 2H), 2.06 – 1.92 (m, 1H), 1.92 – 1.74 (m, 4H), 1.55 – 1.37 (m, 1H). Spectroscopic data was in agreement with literature¹.

Synthesis of **10**

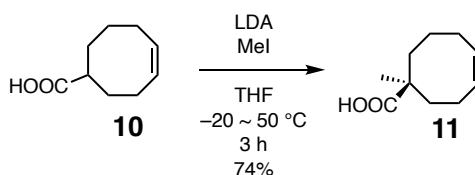


To a solution of The crude nitrile **9** (7.95 g, 58.8 mmol, 1 eq.) and EtOH (30 mL), 30% w/w KOH aq. (90 mL) were added and the reaction mixture was stirred at 40 °C. 30% w/w H₂O₂ (56.7 mL, 499.8 mol, 8.75 eq.) was added to the reaction mixture over 2 h using a dropping funnel. After complete addition, the reaction mixture was refluxed for 17 h before cooling down to room temperature. H₂O was added and the mixture was washed with hexane. The organic layer was extracted with H₂O. The combined aqueous layers were acidified with conc. HCl to pH 1. Then, the combined acidified aqueous layers were extracted with Et₂O. The combined organic layers were dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated in vacuo. The crude carboxylic acid **10** (3.63 g, 23.5 mmol, 40%) was obtained as a yellow oil and used in the next step without further purification.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 10.80 (br s, 1H), 6.09 – 5.26 (m, 2H), 2.56 – 2.45 (m, 1H), 2.45 – 2.32 (m, 1H), 2.21 – 2.02 (m, 4H), 1.97 – 1.84 (m, 1H), 1.79 – 1.52 (m, 3H), 1.47 – 1.33 (m, 1H).

Spectroscopic data was in agreement with literature¹.

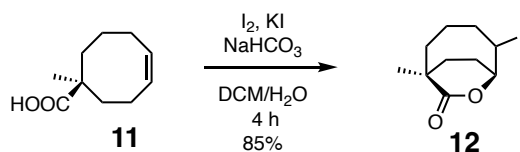
Synthesis of **11**



To a solution of 2.0 M lithium diisopropyl amine (43.1 mL, 86.2 mmol, 3.7 eq.) in THF was added crude carboxylic acid **10** (3.66 g, 23.3 mmol, 1 eq.) in anhydrous THF (10 mL). The reaction mixture was stirred for 3 hours at 50 °C. Afterwards, the reaction mixture was cooled to 0 °C and added CH₃I (5.8 mL, 93.2 mmol, 4.0 eq.) over 30 min. The reaction mixture was stirred for 3 hours at 50 °C. The reaction mixture was cooled on ice, quenched with sat. NH₄Cl and concentrated in vacuo. The residue was diluted with HCl and toluene. The organic layer was washed with 2 M HCl. The combined aqueous layers were extracted with toluene. The combined organic layers were dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated in vacuo. The crude, methylated carboxylic acid **11** (2.90 g, 17.2 mmol, 74%) was obtained as a dark oil and used in the next step without further purification.

¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 10.65 (br s, 1H), 5.69 (dt, J = 11.1, 5.5 Hz, 1H), 5.53 – 5.42 (m, 1H), 2.42 – 2.05 (m, 5H), 1.90 – 1.82 (m, 1H), 1.79 – 1.50 (m, 4H), 1.25 (s, 3H). Spectroscopic data was in agreement with literature¹.

Synthesis of **12**

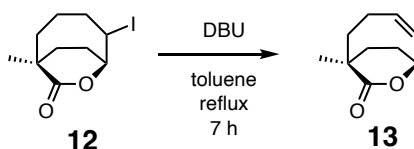


To a stirred solution of crude methylated product **11** (2.90 g, 17.2 mmol, 1 eq.) in DCM (100 mL) and H₂O (50 mL), NaHCO₃ (4.33 g, 51.6 mmol, 3 eq.) was added and the mixture was stirred for 30 min before cooling to 0 °C. I₂ (2.18 g, 17.2 mmol, 1.0 eq.) and KI (3.14 g, 18.9 mmol, 1.1 eq.) were added portion wise to reaction mixture. After complete addition, the reaction mixture was stirred for 5 h and allowed to reach room temperature. Subsequently, the reaction mixture was cooled to 0 °C and quenched with 10% Na₂S₂O₃ aq. until discoloration was complete. Aqueous phase was extracted with DCM and washed with brine. The obtained organic layers were dried over Na₂SO₄ filtered and concentrated over vacuo. The crude product was obtained as a dark oil which was crystallized from EtOH to obtain iodolactone **12** (3.64 g, 14.6 mmol, 85%, 12% over 5 steps) as a solid.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 5.04 (dt, *J* = 8.1, 2.7 Hz, 1H), 4.66 – 4.50 (m, 1H), 2.59 – 2.39 (m, 2H), 2.37 – 2.24 (m, 1H), 2.22 – 1.99 (m, 2H), 1.98 – 1.75 (m, 3H), 1.71 – 1.61 (m, 1H), 1.56 – 1.42 (m, 1H), 1.29 (s, 3H).

Spectroscopic data was in agreement with literature¹.

Synthesis of **13**

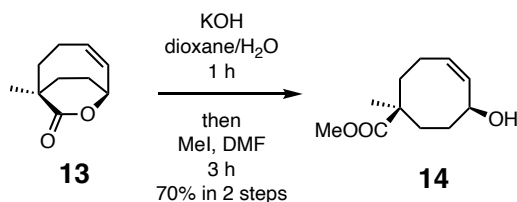


To a stirred solution of Iodolactone **12** (3.64 g, 14.6 mmol, 1 eq. co-evaporated with anhydrous toluene), DBU (4.41 mL, 29.2 mmol, 2.0 eq.) was added and the reaction mixture was stirred at 70 °C for 12 h. The reaction mixture was cooled to room temperature before washing with H₂O. The combined aqueous layers were extracted with toluene. The combined organic layers were dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated in vacuo. The crude bicyclic olefin **13** was obtained as an oil and used in the next step without further purification.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 5.95 (ddd, *J* = 11.9, 9.6, 5.4 Hz, 1H), 5.46 (ddd, *J* = 11.9, 4.8, 2.4 Hz, 1H), 5.10 (br s, 1H), 2.50 – 2.37 (m, 1H), 2.27 – 2.08 (m, 2H), 1.99 – 1.86 (m, 1H), 1.84 – 1.66 (m, 4H), 1.32 (s, 3H).

Spectroscopic data was in agreement with literature¹.

Synthesis of **14**



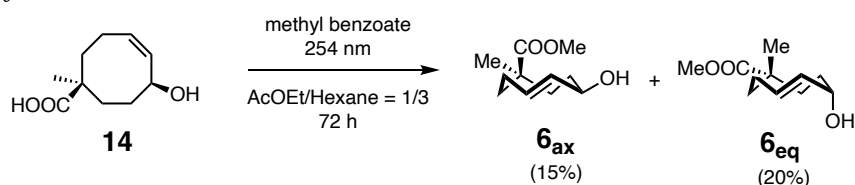
The crude bicyclic olefin **13** was dissolved in a mixture of dioxane (10 mL) and H₂O (10 mL) in a 1 L round-bottom flask. The mixture was cooled to 0 °C before adding KOH (2.05 g, 36.5 mmol, 2.5 equiv) portion wise. The reaction mixture was stirred for 1 h and allowed to warm to room temperature. The reaction mixture was added 2 M HCl and extracted with AcOEt. The combined organic layers were dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated in vacuo and co-evaporated with anhydrous toluene.

To a stirred solution of hydrolyzed product in anhydrous DMF (10 mL), KOH (819 mg, 14.6 mol, 1 eq.) was added and stirred the mixture for 1 h. To this reaction mixture CH₃I (3.63 mL, 58.4 mmol, 4.0 eq.) was added dropwise and stirred the mixture for 3 h at room temperature. H₂O was added and the reaction mixture was extracted with Et₂O. The combined organic layers were washed with H₂O and brine, dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated in vacuo. The crude product was purified by silica gel chromatography. Methyl ester **14** (1.70 g, 10.2 mmol, 70% over 2 steps) was obtained as a yellow oil.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 5.58 (dtd, *J* = 11.6, 5.6, 2.0 Hz, 1H), 5.41 – 5.28 (m, 1H), 5.00 – 4.86 (m, 1H), 3.66 (s, 3H), 2.36 – 2.22 (m, 1H), 2.19 – 2.00 (m, 4H), 1.77 (d, *J* = 4.7 Hz, OH), 1.74 – 1.63 (m, 2H), 1.60 – 1.52 (m, 1H), 1.22 (s, 3H).

Spectroscopic data was in agreement with literature¹.

Synthesis of **6_{ax}**



Methyl ester **10** (1.00 g, 8.73 mmol, 1 eq.) was irradiated ($\lambda = 254$ nm, handy UV lamp, SUV-16) in the presence of methyl benzoate (3.30 mL, 26.2 mmol, 10 eq.) in a quartz flask containing a solution of AcOEt/Hexane (1:3, 50 mL). During irradiation, the reaction mixture was continuously circulated over a silica column (16 g size, AgNO₃ impregnated silica (10% wt, containing ca. 13 mmol AgNO₃, 1.5 equiv)) at a flowrate of 5 mL/min. The column was placed in the dark and shielded with aluminum foil during the irradiation. After 72 h, the column was flushed with AcOEt/Hexane (1:3, 200 mL) before drying over a stream of air. Next, the contents of the column were emptied into an

Erlenmeyer flask containing NH_4OH (28%w/w, 50 mL) and DCM. The biphasic mixture was stirred for ~ 1 h before filtration of the silica gel. The organic layer was separated and the aqueous layer was extracted with DCM (200 mL). The combined organic layers were washed with H_2O (100 mL), dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated in vacuo. The crude product was purified by silica gel chromatography to separate conformational isomer to give axial isomer **6_{ax}** (150.3 mg, 1.31 mmol, 15%,) and equatorial isomer **6_{eq}** (200.1 mg, 1.75 mmol, 20%).

For **6_{ax}**: ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 6.18 – 5.96 (m, 1H), 5.63 (dd, $J = 16.6, 2.4$ Hz, 1H), 4.48 (br s, 1H), 3.64 (s, 3H), 2.38 – 2.03 (m, 3H), 2.01 – 1.60 (m, 5H), 1.60 – 1.46 (m, 1H), 1.11 (s, 3H).

Spectroscopic data was in agreement with literature¹.

For **6_{eq}**: 5.80 (ddd, $J = 15.8, 11.6, 3.9$ Hz, 1H), 5.37 (dd, $J = 16.2, 9.4$ Hz, 1H), 4.21 (td, $J = 9.8, 5.7$ Hz, 1H), 3.73 (s, 3H), 2.72 (qd, $J = 11.9, 4.6$ Hz, 1H), 2.01 – 1.60 (m, 2H), 1.38 – 1.24 (m, 1H), 1.60 – 1.46 (1H), 1.20 (s, 3H).

Spectroscopic data was in agreement with literature¹.

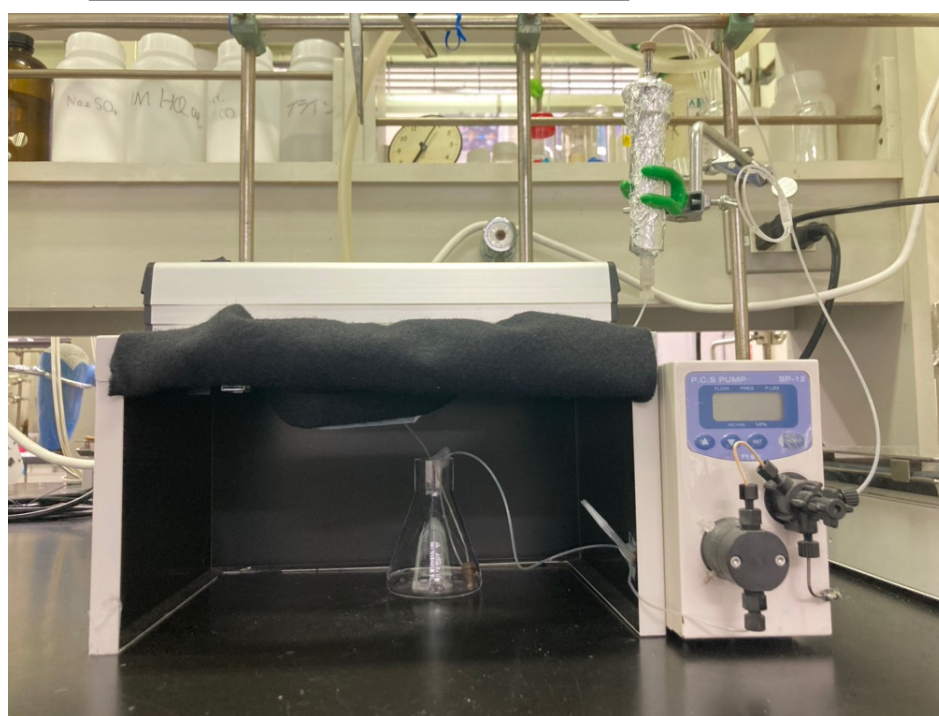
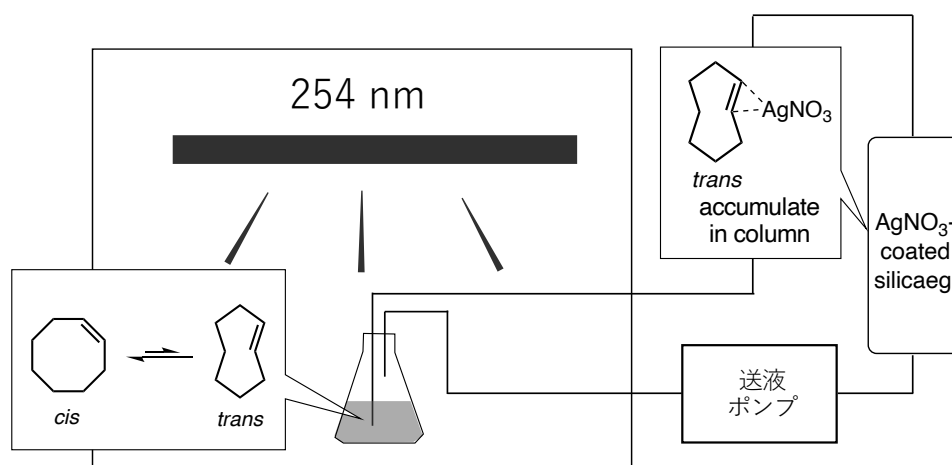
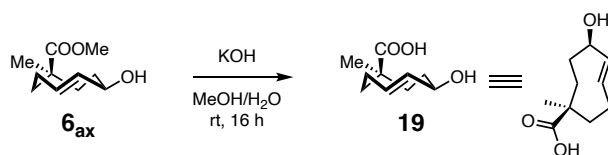


Figure S1. Overview of reaction equipment for photoisomerization of **14** to **6**

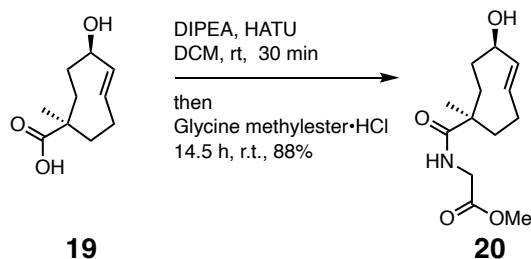
Synthesis of **19**



The axial isomer **6_{ax}** (150.1 mg, 757.0 μmol , 1 eq.) was dissolved in MeOH (10 mL) and cooled on ice whilst stirring. A solution of KOH (424.8 mg, 7.57 mmol, 10 eq.) in H₂O (10 mL) was cooled on ice and subsequently added to the mixture. The reaction mixture was placed in the dark, shielded with aluminum foil and stirred for 12 h. The reaction mixture was diluted with H₂O and added 1 M HCl aq. to acidify the reaction mixture. Then, aqueous phase was extracted with Et₂O. The combined organic layers were washed with H₂O and brine, dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated in vacuo to obtain axial carboxylic acid **6_{ax}** (124.1 mg, 673.7 μmol , 89%) as a yellow oil which was used in the next step without further purification.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 6.07 (ddd, J = 16.4, 10.8, 3.4 Hz, 1H), 5.64 (dd, J = 16.6, 2.5 Hz, 1H), 4.49 (br s, 1H), 2.39 – 2.08 (m, 3H), 2.06 – 1.77 (m, 4H), 1.65 (dd, J = 15.9, 6.1 Hz, 1H), 1.11 (s, 3H). Spectroscopic data was in agreement with literature¹.

Synthesis of 20



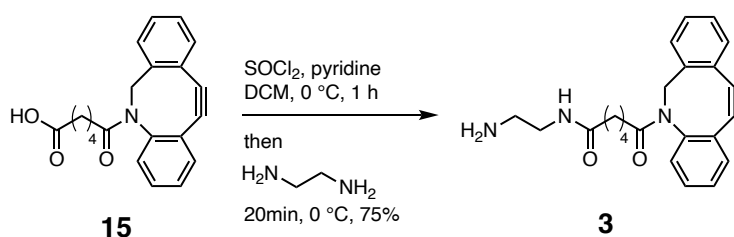
To a stirred solution of the reported carboxylic acid **19** (51.7 mg, 283.5 μmol , 1.0 eq.) and DIPEA (60.0 μL , 343.5 μmol , 1.2 eq.) in anhydrous DCM (10.0 ml) was added HATU (129.3 mg, 340.0 μmol , 1.2 eq.) at room temperature. After stirring the mixture for 30 minutes, the mixture solution of glycine methyl ester hydrochloride (70.2 mg, 850.5 μmol , 3.0 eq.) and DIPEA (198.0 μL , 1133.6 μmol , 4.0 eq.) in anhydrous DCM was added dropwise into the above solution. The resulted mixture was stirred for 14.5 hours at room temperature, followed by removing solvent under vacuum, and purified by silica gel column chromatography (eluent Hexane/AcOEt gradient from 50% to 100%) to give methyl ester **20** as a colorless viscous oil at 88% yield.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 6.08 (s, 1H), 6.05 (ddd, $J = 16.2, 11.1, 3.7$ Hz, 1H), 5.63 (dd, $J = 16.6, 2.6$ Hz, 1H), 3.96 (d, $J = 5.2$ Hz, 2H), 3.73 (s, 3H), 2.34 – 2.28 (m, 1H), 2.24 (qd, $J = 11.8, 3.9$ Hz, 1H), 2.14 – 1.74 (m, 7H), 1.58 (dd, $J = 15.4, 6.2$ Hz, 1H), 1.11 (s, 3H).

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3): δ 180.89, 170.92, 135.18, 130.31, 69.68, 52.40, 45.93, 44.52, 41.53, 38.48, 31.10, 30.20, 17.82.

HRMS (ESI): m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calculated for $\text{C}_{13}\text{H}_{21}\text{NNaO}_4$: 278.1363; found 278.1361.

Synthesis of 3



To a stirred solution of the reported carboxylic acid **15** (200.0 mg, 600.6 μmol , 1.0 eq.) and pyridine (52.7 μL , 660.7 μmol , 1.1 eq.) in anhydrous DCM (10.0 ml) was added by SOCl_2 (47.9 μL , 660.7 μmol , 1.1 eq.) in 0 °C. After stirring the mixture at 0 °C for 1 hour, the solution was added into ethylene diamine dropwise (80.0 μL , 1.2 μmol , 20 eq.). The obtained solution was stirred for 20 minutes at 0 °C, followed by removing solvent under vacuum and purified by silica gel column chromatography (eluent $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ gradient from 5% to 30%) to give amine **3**, as a dark brown amorphous solid at 75% yield.

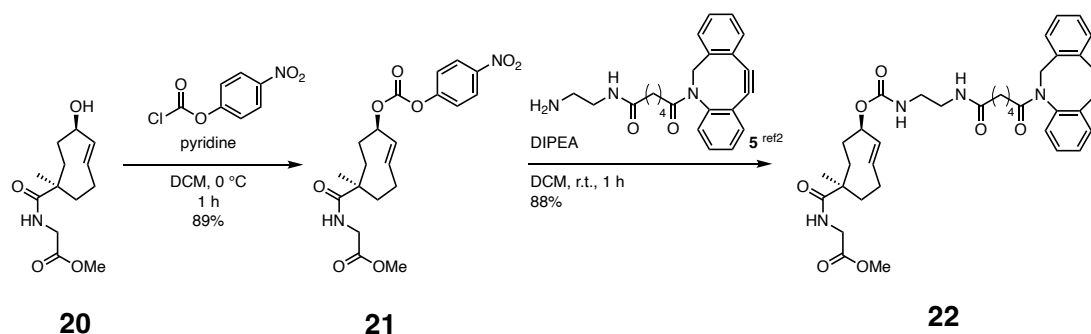
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.69 (d, $J = 7.4$ Hz, 1 H), 7.43 – 7.24 (m, 7 H), 5.16 (d, $J = 14.0$ Hz,

1 H), 3.66 (d, $J = 14.0$ Hz, 1 H), 2.27 – 2.19 (m, 2 H), 2.12 (td, $J = 7.4, 1.4$ Hz, 2 H), 1.96 – 1.86 (m, 2 H), 1.54 – 1.28 (m, 6 H).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 173.54, 173.25, 151.77, 148.20, 132.42, 129.13, 128.59, 128.34, 128.29, 127.90, 127.28, 125.64, 123.22, 122.64, 115.07, 108.01, 55.54, 41.60, 41.29, 35.99, 34.60, 25.06, 24.45.

HRMS (ESI): m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculated for $\text{C}_{23}\text{H}_{26}\text{N}_3\text{O}_2$ 376.2020; found 376.2019

Synthesis of **22**



To a stirred solution of alcohol **20** (47.7 mg, 186.8 μmol , 1.0 eq.) and anhydrous pyridine (150.0 μl , 1865.0 μmol , 10.0 eq.) in anhydrous DCM (5.0 ml) was added by 4-nitrophenyl chloroformate (180.0 mg, 932.5 μmol , 5.0 eq.) at 0 °C. The obtained solution was stirred for 1 hours, followed by removing solvent under vacuum, and purified by silica gel column chromatography (eluent Hexane/AcOEt gradient from 10% to 100%) to give carbonate intermediate **21** as an amorphous solid at 89% yield.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.28 (d, $J = 9.3$ Hz, 2H), 7.40 (d, $J = 9.3$ Hz, 2H), 6.08 (ddd, $J = 16.8, 11.3, 3.6$ Hz, 1H), 6.01 (s, 1H), 5.65 (dd, $J = 16.8, 2.6$ Hz, 1H), 5.29 (s, 1H), 4.00 (dd, $J = 5.1, 1.9$ Hz, 2H), 3.76 (s, 3H), 2.44 – 2.37 (m, 1H), 2.30 (qd, $J = 11.8, 3.9$ Hz, 1H), 2.24 – 2.13 (m, 2H), 2.02 – 1.86 (m, 3H), 1.75 (dd, $J = 15.1, 6.3$ Hz, 1H), 1.18 (s, 3H).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 180.18, 170.90, 155.68, 151.71, 145.52, 133.02, 129.53, 125.45, 121.94, 77.01, 52.53, 45.66, 44.47, 41.54, 35.87, 31.27, 31.17, 18.01.

HRMS (ESI): m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calculated for $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{NaO}_8$ 443.1425; found 443.1427.

To a mixture solution of carbonate intermediate **21** (11.1 mg, 26.4 μmol , 1.0 eq.) and amine **5** (15.7 mg, 41.8 μmol , 1.6 eq.) in anhydrous DCM (1.0 ml) was added by DIPEA (9.3 μl , 52.8 μmol , 2.0 eq.) at 35 °C. After stirring the mixture for 1 hours, solvent was removed under vacuum and purified by silica gel column chromatography (eluent $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ gradient from 1% to 7%) to give methyl ester **22** as a yellowish amorphous solid at 88% yield.

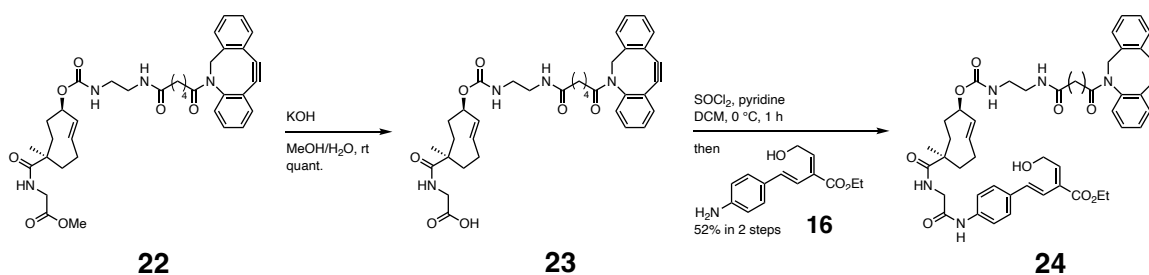
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.72 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.43 – 7.24 (m, 7H), 6.09 (s, 1H), 5.91 (m, 2H), 5.73 – 5.67 (m, 1H), 5.61 (dd, $J = 16.7, 2.6$ Hz, 1H), 5.17 (s, 1H), 5.16 (d, $J = 13.9$ Hz, 1H), 3.96

(d, $J = 5.1$ Hz, 2H), 3.43 – 3.05 (m, 4H), 3.25 (q, $J = 5.6$ Hz, 2H), 3.20 – 3.05 (m, 1H), 2.35 – 2.19 (m, 3H), 2.08 (m, 2H), 1.99 – 1.75 (m, 7H), 1.64 (dd, $J = 15.5, 6.1$ Hz, 1H), 1.52 – 1.37 (m, 3H), 1.14 (s, 3H).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 180.63, 173.74, 173.55, 170.92, 156.32, 151.74, 148.16, 132.47, 131.68, 131.59, 131.47, 129.19, 128.64, 128.35, 128.31, 128.04, 127.31, 125.71, 123.26, 122.58, 115.01, 108.11, 72.34, 55.60, 52.44, 45.74, 44.50, 41.49, 41.17, 40.00, 36.05, 35.67, 34.68, 31.17, 25.05, 24.07, 17.96.

HRMS (ESI): m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calculated for $\text{C}_{37}\text{H}_{44}\text{N}_4\text{NaO}_7$ 679.3102; found 679.3120.

Synthesis of **24**



To a stirred solution of **22** (7.6 mg, 11.6 μmol , 1.0 eq.) in mixture of MeOH (1.0 ml) and H₂O (1.0 ml) was added by 30% KOH aqueous solution at room temperature. After stirring the mixture for 1 hours, the mixture was cooled to 0 °C, followed by acidifying to a pH of 1.0 using a 2 M HCl aqueous solution. The mixture solution was diluted with H₂O (10 ml) and then extracted with AcOEt (20 ml \times 3). The combined organic layers were washed with sat. NaCl aqueous solution (10 ml \times 2), dried over by Na₂SO₄, filtered, and concentrated under vacuum. The obtained crude carboxylic acid **23** was an amorphous solid and used in the next step without further purification.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.67 (d, $J = 7.1$ Hz, 1H), 7.48 – 7.21 (m, 7H), 6.55 (s, 1H), 6.51 – 6.44 (m, 1H), 6.08 – 5.99 (m, 1H), 5.86 – 5.79 (m, 1H), 5.57 (d, $J = 16.4$ Hz, 1H), 5.14 (d, $J = 13.8$ Hz, 1H), 5.12 (s, 1H), 3.94 (dd, $J = 18.3, 5.3$ Hz, 2H), 3.68 (d, $J = 13.8$ Hz, 1H), 3.43 – 3.07 (m, 4H), 2.26 – 1.76 (m, 12H), 1.59 (dd, $J = 14.8, 5.9$ Hz, 1H), 1.45 – 1.35 (m, 3H), 1.11 (s, 3H).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 181.42, 174.45, 174.04, 172.10, 156.58, 151.58, 148.04, 132.47, 131.72, 131.46, 129.14, 128.70, 128.47, 128.34, 128.03, 127.34, 125.70, 123.20, 122.62, 115.07, 107.99, 72.28, 55.70, 45.58, 44.47, 41.85, 40.94, 40.06, 36.05, 35.78, 34.54, 31.17, 29.84, 24.93, 24.38, 17.97.

HRMS (ESI): m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calculated for $\text{C}_{36}\text{H}_{42}\text{N}_4\text{NaO}_7$ 665.2946; found 665.2958

To a stirred solution of carboxylic acid **23** (7.4 mg, 11.6 μmol , 1.0 eq.) and pyridine (2.3 μl , 29.0 μmol , 2.5 eq.) in anhydrous DCM (5.0 ml) was added by SOCl₂ (1.0 μl , 13.9 μmol , 1.2 eq.) in 0 °C. After stirring the mixture at 0 °C for 10 minutes, aniline **7** (8.6 mg, 34.8 μmol , 3.0 eq.) in anhydrous

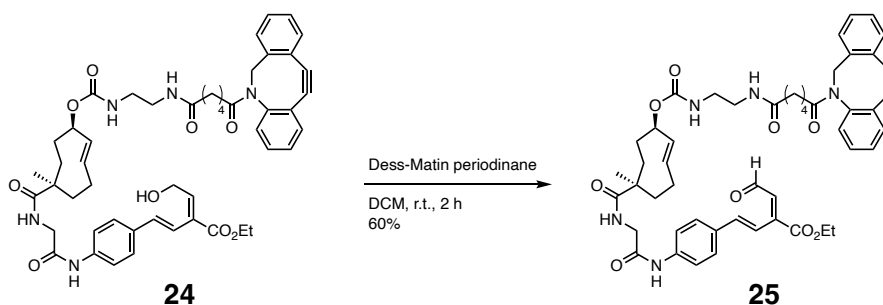
DCM (1.0 ml) was added into the above solution. The obtained mixture solution was stirred for 1 hours at 0 °C, followed by removing solvent under vacuum, and purified by silica gel column chromatography (eluent CHCl₃/MeOH gradient from 1% to 10%) to give the allyl alcohol **24** at a 52% yield in 2 steps.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.68 (d, J = 7.1 Hz, 1H), 7.49 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 7.44 – 7.19 (m, 9H), 6.86 – 6.75 (m, 3H), 6.28 – 6.11 (m, 1H), 6.06 – 5.92 (s, 1H), 5.92 – 5.80 (m, 1H), 5.58 (d, J = 16.5 Hz, 1H), 5.13 (d, J = 13.5 Hz, 1H), 5.12 (s, 1H), 4.51 (d, J = 6.1 Hz, 2H), 4.26 (q, J = 7.1 Hz, 2H), 4.11 – 3.86 (m, 2H), 3.67 (d, J = 13.5 Hz, 1H), 3.38 – 3.05 (m, 4H), 2.33 – 2.10 (m, 6H), 1.98 – 1.90 (m, 2H), 1.87 – 1.74 (m, 4H), 1.58 (dd, J = 15.5, 6.3 Hz, 1H), 1.45 – 1.36 (m, 3H), 1.32 (t, J = 7.1 Hz, 3H), 1.15 (s, 3H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 181.62, 173.78, 173.66, 167.71, 167.06, 156.45, 151.71, 148.16, 140.92, 138.01, 134.26, 133.14, 132.45, 131.81, 130.85, 129.14, 128.66, 128.38, 128.34, 128.33, 128.01, 127.44, 127.32, 125.68, 123.23, 122.58, 120.24, 120.01, 115.03, 108.09, 72.26, 70.71, 61.21, 59.82, 55.61, 44.57, 40.96, 40.05, 36.02, 35.85, 34.63, 31.49, 31.15, 31.05, 25.08, 24.34, 18.03, 14.39.

HRMS (ESI): m/z [M+H]⁺ calculated for C₅₀H₅₈N₅O₉ 872.4229; found 872.4226.

Synthesis of **25**



To a stirred solution of allyl alcohol **24** (0.87 mg, 1.0 μ mol, 1.0 eq.) in DCM (5.0 ml) was added by Dess-Martin periodinane (1.6 mg, 4.0 μ mol, 4.0 eq.) at room temperature. After stirring the mixture for 3 hours, the reaction was quenched by adding saturated NaHCO₃ aqueous solution (1.0 ml) and 10% Na₂SO₃ aqueous solution (1.0 ml). The obtained solution was stirred for 30 min and then added by brine (10ml). The mixture solution was extracted with DCM (10 ml \times 2), and the combined organic layer was dried over by Na₂SO₄ and filtered. The obtained aldehyde product was unstable at room temperature after removal of solvent. Therefore, the solvent evaporation was performed at 0 °C. Crude aldehyde **25** was obtained as a yellowish oil and the reaction yield was determined by NMR (60%-calculated; DMF was used as reference), which was used in the next step without further purification.

¹H NMR (400 MHz, CD₂Cl₂) δ 10.08 (d, J = 7.1 Hz, 1H), 7.60 (d, J = 7.4 Hz, 1H), 7.16 – 7.47 (m, 12H), 6.99 (d, J = 15.9 Hz, 1H), 6.49 (d, J = 7.1 Hz, 1H), 5.72 – 5.91 (m, 2H), 5.53 (d, J = 16.4 Hz, 1H), 5.06 (d, J = 14.0 Hz, 2H), 4.25 (q, J = 7.2 Hz, 2H), 3.60 (d, J = 14.0 Hz, 1H), 3.04 – 3.25 (m,

4H), 2.09 – 2.23(m, 4H), 1.71 – 1.88(m, 6H), 1.47 – 1.60 (m, 6H), 1.27 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H), 1.07 (s, 3H).

^{13}C NMR (101 MHz, CD_2Cl_2) δ 191.60, 173.71, 173.68, 168.20, 166.88, 162.65, 156.46, 148.84, 146.49, 141.00, 132.73, 131.68, 131.66, 131.61, 131.02, 130.97, 129.57, 128.98, 128.78, 128.52, 128.48, 128.38, 128.17, 128.14, 127.49, 125.91, 123.61, 122.80, 120.07, 115.02, 108.47, 72.47, 62.44, 55.83, 44.83, 41.37, 36.59, 36.24, 36.10, 34.88, 32.34, 31.43, 30.10, 29.77, 25.37, 23.10, 18.12, 14.34.

HRMS (ESI): m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculated for $\text{C}_{50}\text{H}_{56}\text{N}_5\text{O}_9$ 870.4073; found 870.4091.

Synthesis and Characterization of glycan aldehyde **1**

The synthesis was performed in the dark because of the light-labile character of aldehydes **25** and **1**. To a solution of $\alpha(2,3)$ -disialoglycan-azide **5** (1.25 mg, 500 mol) in DMSO (150 mL) was added the solution of aldehyde **25** (0.26 mg, 300 nmol) in MeCN (300 mL). The resulting mixture was reacted for 3 h at 70 °C and monitored by ESI-TOF-MS and HPLC (solvent A: $\text{H}_2\text{O} + 0.1\%$ TFA; solvent B: MeCN + 0.1% TFA; gradient: from 10% B/90% A to 100% B over 30 min). The retention time of glycan aldehyde **1** was observed at 18.0 min. After 3 h, the mixture was cooled down to room temperature, followed by the removal of MeCN under vacuum to give a 5.0 mM stock solution in DMSO.

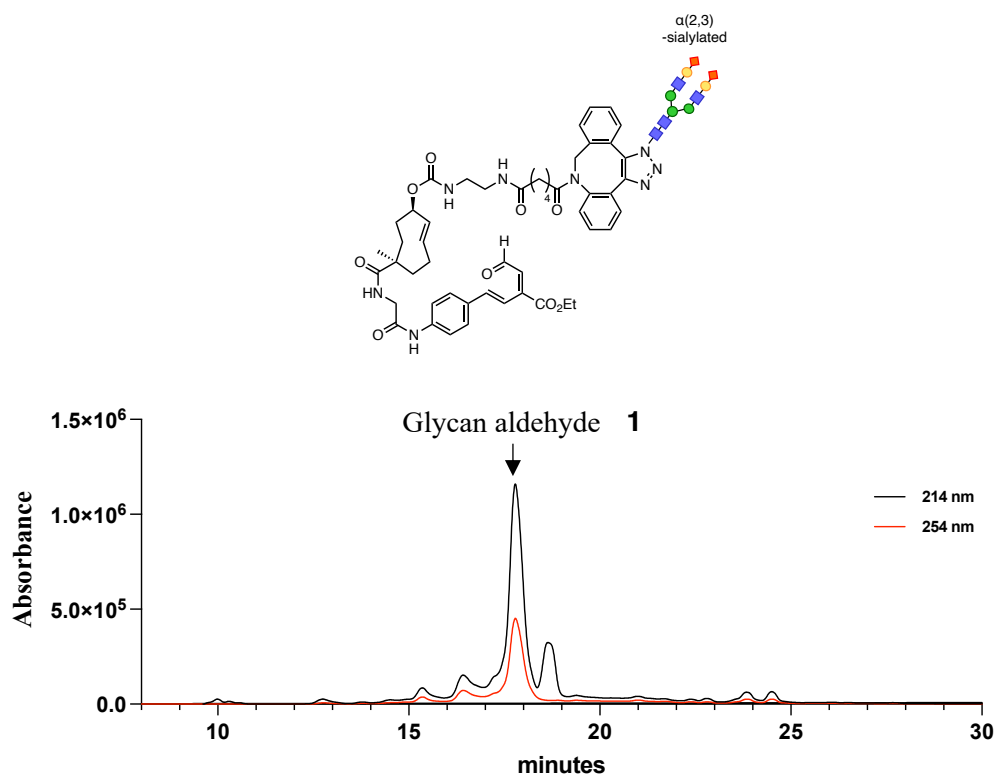


Figure S2. HPLC analysis (column was an analytical 4.6×250 mm Cosmosil 5C18-AR-300 from Nacalai Tesque; solvent A: $\text{H}_2\text{O} + 0.1\%$ TFA; solvent B: MeCN + 0.1% TFA; gradient: from

10%B/90%A to 100%B over 30 min; flow rate: 1 ml/min;) of the reaction mixture of SPAAC reaction between $\alpha(2,3)$ -sialylated glycan azide **3** and aldehyde **25** after 3 hours. The glycan aldehyde **1** was observed at 18 min and confirmed by ESI-MS (**HRMS (ESI)**: m/z $[M-2H]^{-2}$ calculated for $C_{145}H_{210}N_{16}O_{74}$ 1679.6586; found 1679.6545).

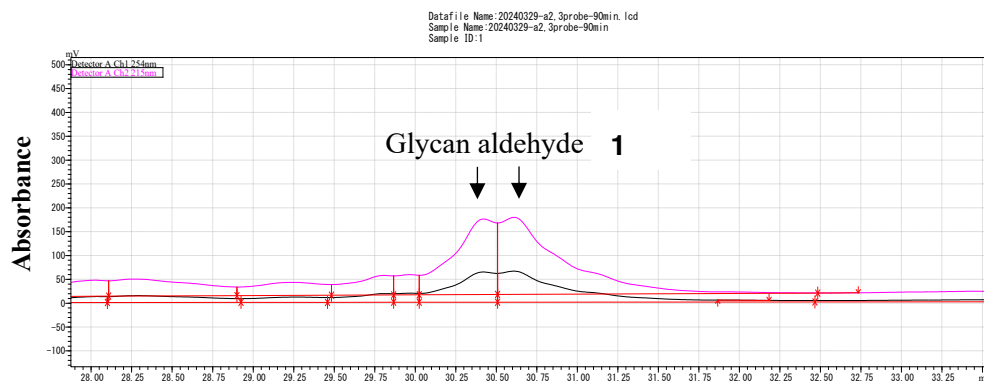


Figure S3. HPLC analysis (column was an analytical 4.6×250 mm Cosmosil 5C18-AR-300 from Nacalai Tesque; solvent A: $H_2O + 0.1\%$ TFA; solvent B: MeCN + 0.1% TFA; gradient: from 10%B/90%A to 100%B over 90 min; flow rate: 1 ml/min) of the purified glycan aldehyde **1** showed two peaks at 30.3 and 30.7 min to indicate two regioisomers of **1** as a result of the SPAAC reaction.

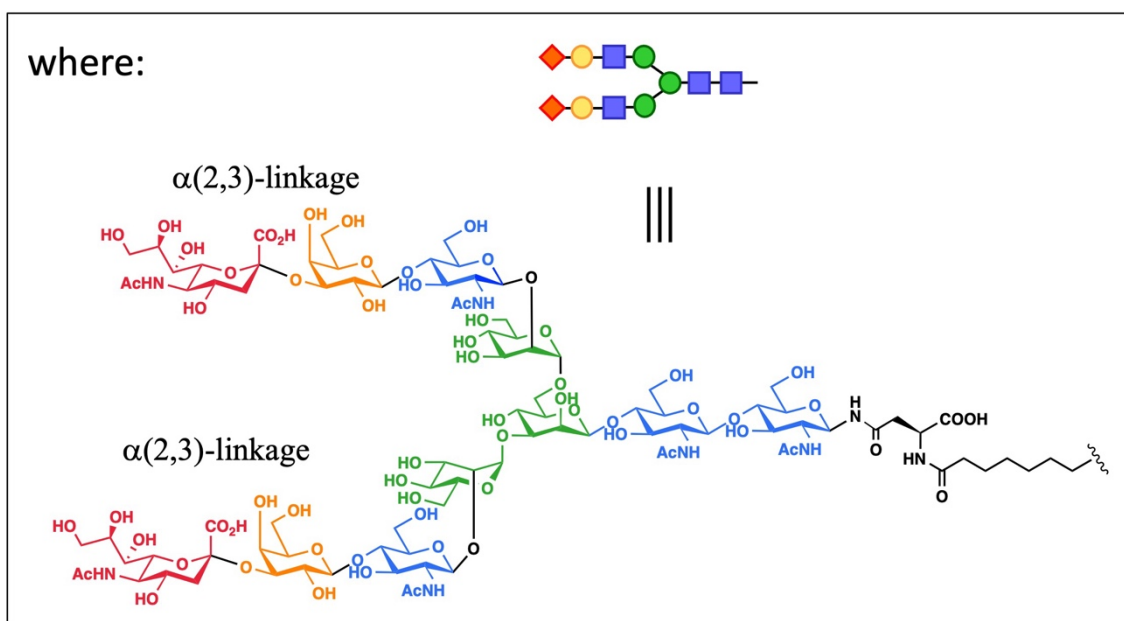
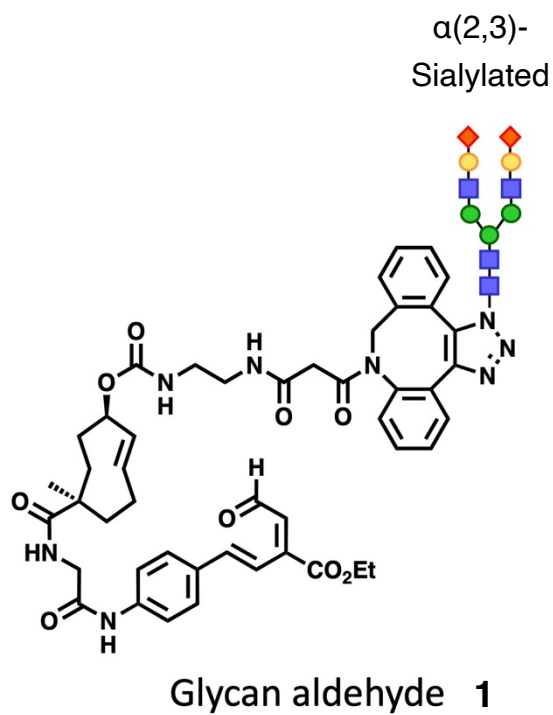
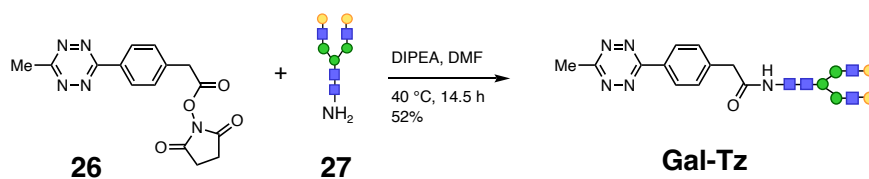


Figure S4. The structure of glycan aldehyde **1**.

Synthesis of **Gal-Tz**



To a mixture solution of ester **26** (10.2 mg, 25.8 μmol , 5.0 eq.) and Gal-amine **27** (8.9 mg, 5.1 μmol , 1.0 eq.) in DMF (3.0 ml) was added by DIPEA (9.0 μl , 51.0 μmol , 10.0 eq.). After stirring the mixture for 5 hours at 35 °C, the solvent was removed under vacuum and purified by HPLC (column was an analytical 4.6 \times 250 mm Cosmosil 5C18-AR-300 from Nacalai Tesque; solvent A: H₂O + 0.1% TFA; solvent B: MeCN + 0.1% TFA; gradient: from 10%B/90%A to 100%B over 30 min; flow rate: 1 ml/min) to give the **Gal-Tz** at a 53% yield.

¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ 8.39 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.58 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.58 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 5.12 (s, 1H), 5.04 (d, J = 9.5 Hz, 1H), 4.93 (s, 1H), 4.76 (s, 1H), 4.61 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 4.58 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 4.47 (dd, J = 7.8, 2.5 Hz, 2H), 4.25 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 4.19 (dd, J = 3.6, 1.5 Hz, 1H), 4.11 (dd, J = 3.7, 1.7 Hz, 1H), 4.02 – 3.44 (m, 56H), 3.07 (s, 3H), 2.88 (dd, J = 5.8, 2.1 Hz, 2H), 2.07 (s, 3H), 2.05 (s, 3H), 2.05 (s, 3H), 1.97 (s, 3H).

HRMS (ESI): m/z [M+Na]⁺ calculated for 1989.6941 C₇₇H₁₁₈N₁₀NaO₄₉; found 1989.6959.

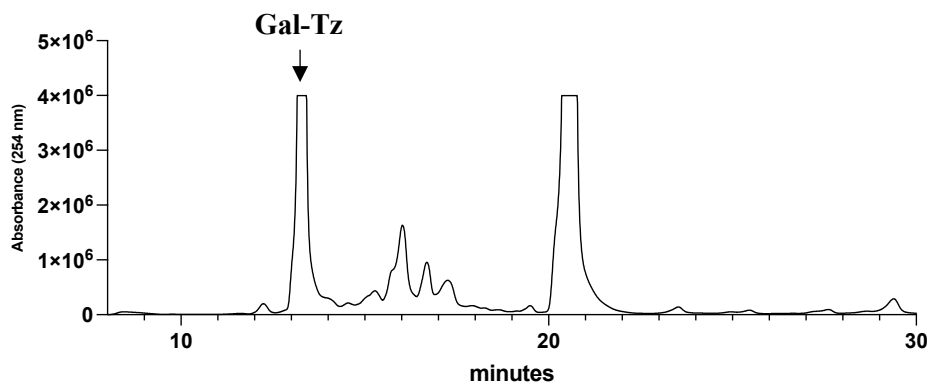


Figure S5. Preparative HPLC of the crude **Gal-Tz**. The **Gal-Tz** was observed at 13.5 min.

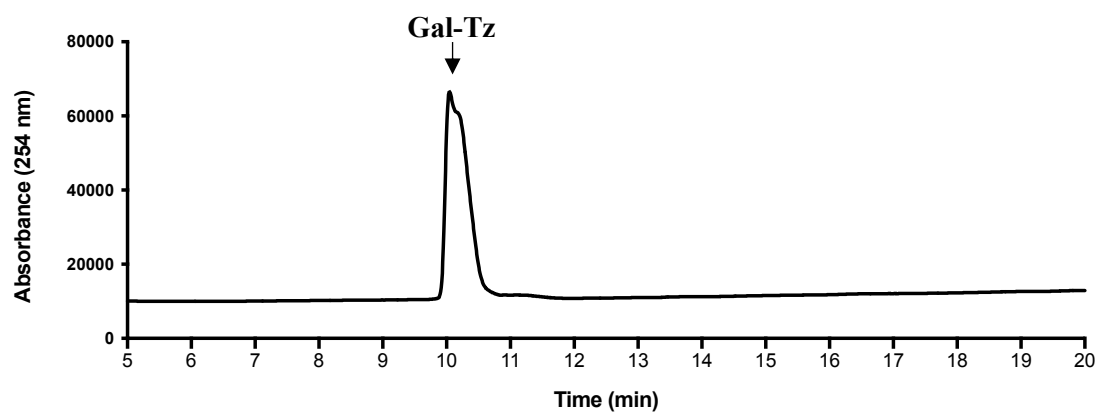


Figure S6. HPLC analysis (column was an analytical 4.6 × 250 mm Cosmosil 5C18-AR-300 from Nacalai Tesque; solvent A: H₂O + 0.1% TFA; solvent B: MeCN + 0.1% TFA; gradient: from 10%B/90%A to 70%B/30%A over 20 min; flow rate: 1 ml/min) of the purified **Gal-Tz**. The **Gal-Tz** was observed at 10.5 min.

Structure of **Gal-glycan**

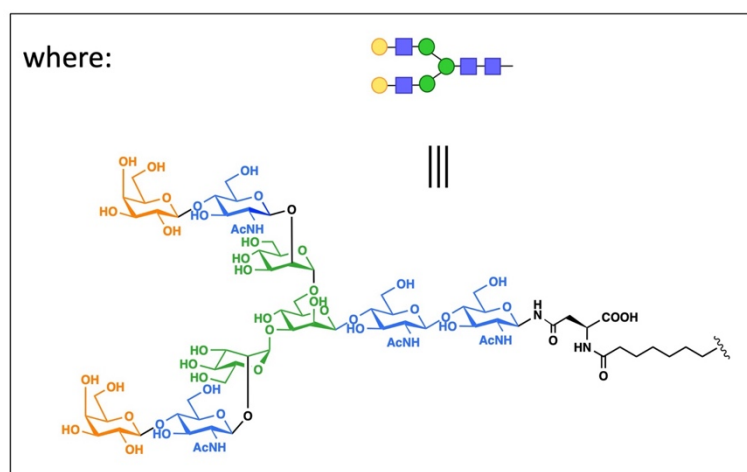
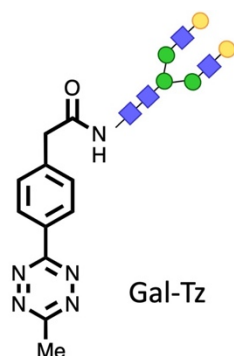
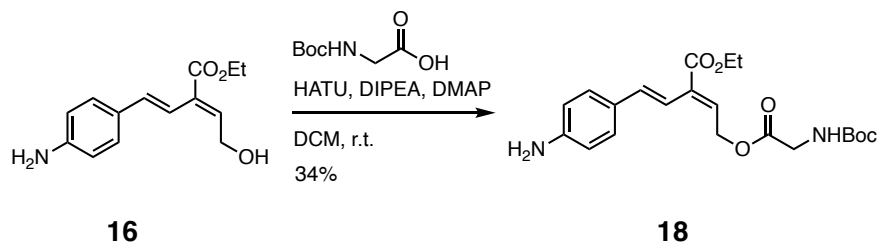


Figure S7. The structure of **Gal glycan**

Synthesis of **18**



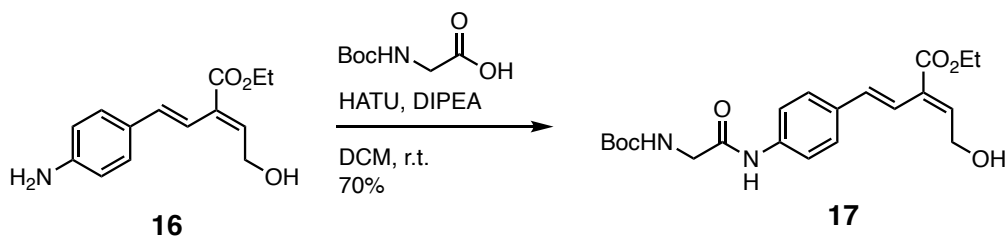
To a stirred solution of *N*-Boc glycine (35.5 mg, 202.4 μmol , 1.0 eq.), aniline **16** (50.0 mg, 202.4 μmol , 1.0 eq.), DMAP (5.0 mg, 40.5 μmol , 0.2 eq.), and DIPEA (107.5 μL , 607.2 μmol , 3.0 eq.) in anhydrous DCM (5.0 ml) was added EDCI·HCl (46.6 mg, 242.9 μmol , 1.2 eq.) at room temperature. The resulted mixture was stirred for 3 hours at room temperature, followed by removing solvent under vacuum, and purified by silica gel column chromatography (eluent Hexane/AcOEt gradient from 10% to 90%) to give *N*-Boc amine **18** as yellow solid at 34% yield

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 7.27 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 6.70 (d, $J = 10.5$ Hz, 2H), 6.65 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 6.60 (t, $J = 6.4$ Hz, 1H), 5.02 (d, $J = 6.4$ Hz, 2H), 5.02 (s, 1H), 4.27 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 3.96 (d, $J = 5.8$ Hz, 2H), 1.46 (s, 9H), 1.34 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): δ 170.27, 166.76, 147.09, 136.09, 133.92, 132.16, 128.37, 127.28, 120.02, 116.70, 115.18, 62.09, 61.28, 42.57, 28.44, 27.89, 14.37

HRMS (ESI): m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calculated for $\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{NaO}_6$: 427.1840; found 427.1844.

Synthesis of **17**



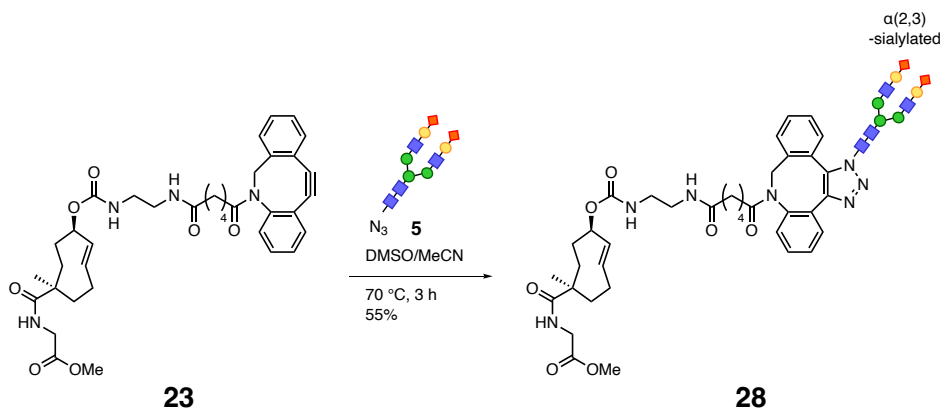
To a stirred solution of *N*-Boc glycine (35.5 mg, 202.4 μmol , 1.0 eq.), aniline **16** (50.0 mg, 202.4 μmol , 1.0 eq.) and DIPEA (107.5 μL , 607.2 μmol , 3.0 eq.) in anhydrous DCM (5.0 ml) was added EDCI·HCl (46.6 mg, 242.9 μmol , 1.2 eq.) at room temperature. The resulted mixture was stirred for 3 hours at room temperature, followed by removing solvent under vacuum, and purified by silica gel column chromatography (eluent Hexane/AcOEt gradient from 10% to 90%) to give *N*-Boc amine **17** as yellow solid at 34% yield with 37% recovery of starting material.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 6.08 (s, 1H), 6.05 (ddd, *J* = 16.2, 11.1, 3.7 Hz, 1H), 5.63 (dd, *J* = 16.6, 2.6 Hz, 1H), 3.96 (d, *J* = 5.2 Hz, 2H), 3.73 (s, 3H), 2.34 – 2.28 (m, 1H), 2.24 (qd, *J* = 11.8, 3.9 Hz, 1H), 2.14 – 1.74 (m, 7H), 1.58 (dd, *J* = 15.4, 6.2 Hz, 1H), 1.11 (s, 3H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 180.89, 170.92, 135.18, 130.31, 69.68, 52.40, 45.93, 44.52, 41.53, 38.48, 31.10, 30.20, 17.82.

HRMS (ESI): *m/z* [M+Na]⁺ calculated for C₂₁H₂₈N₂NaO₆: 427.1840; found 427.1844.

Synthesis of α(2,3)-sialylated-TCO-model compound **28**



To a stirred solution of glycan-azide **5** (10.0 mg, 4.0 μmol, 1.0 eq.) in DMSO (803 ml) was added by the TCO-ester **23** (2.9 mg, 4.4 μmol, 1.1 eq.). After stirring the mixture for 3 hours at 70 °C, the reaction mixture was purified by HPLC (column was a preparative 20.0 × 250 mm Cosmosil 5C18-AR-300 from Nacalai Tesque; solvent A: H₂O + 0.1% TFA; B: MeCN + 0.1% TFA; gradient: from 10% B/100% A to 100% B over 30 min; flow rate: 8 ml/min; the product **28** was observed at 17.0 min (mixture of regioisomers). The **28** was collected and followed by lyophilization to give a white solid at a 55% yield.

¹H-NMR (400 MHz, D₂O) δ 7.62 – 7.51 (m, 4H), 7.39 – 7.34 (m, 3H), 7.18 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 5.92 (d, *J* = 16.4 Hz, 1H), 5.78 – 5.55 (m, 6H), 5.27 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 5.06 (s, 2H), 4.99 (dd, *J* = 17.3, 7.9 Hz, 2H), 4.92 (s, 1H), 4.87 (s, 2H), 4.53 – 4.51 (m, 7H), 4.42 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H), 4.19 (s, 2H), 4.14 (s, 2H), 4.06 – 3.27 (m, 72H), 3.26 – 3.14 (m, 5H), 2.73 – 2.67 (m, 4H), 2.23 – 1.64 (m, 36H), 1.56 – 0.97 (m, 23H).

LRMS (ESI): *m/z* [M-2H+2Na]²⁺ calculated for 1574.5782 C₁₂₉H₁₉₁N₁₅Na₂O₇₂; found 1574.6251.

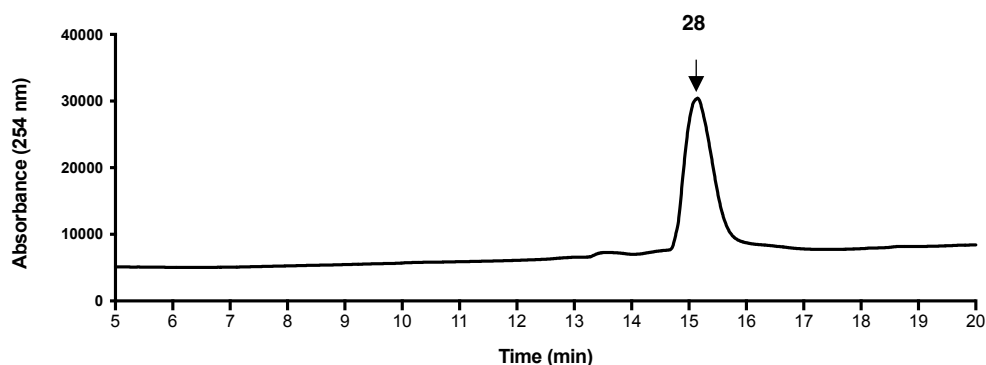


Figure S8. HPLC analysis (column was an analytical 4.6 × 250 mm Cosmosil 5C18-AR-300 from Nacalai Tesque; solvent A: H₂O + 0.1% TFA; solvent B: MeCN + 0.1% TFA; gradient: from 10%B/90%A to 70%B/30%A over 20 min; flow rate: 1 ml/min) of the purified **28**. The **28** was observed at 15.2 min.

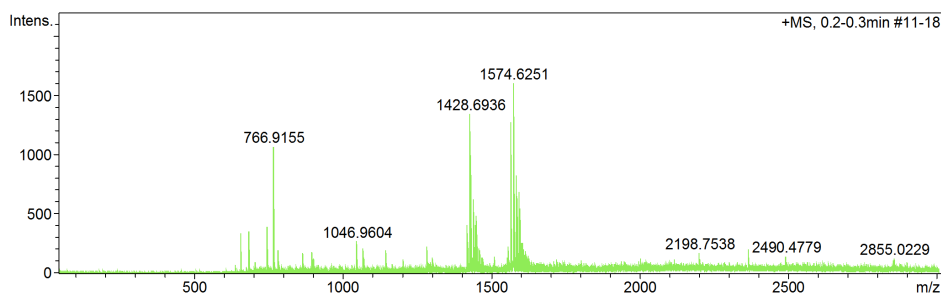
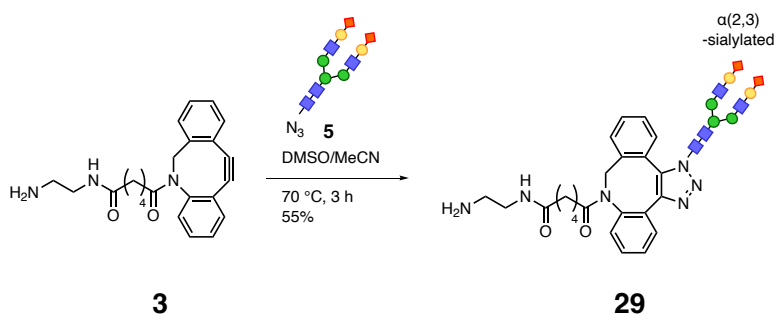


Figure S9. ESI MASS-spectrum (positive mode) of TCO-ester **28**. Derived peak at 1574 m/z is corresponding to $[M+2H]^{2+}$ of **28**

Synthesis of amine product **29**



To a stirred solution of glycan-azide **5** (1.8 mg, 723 nmol, 1.0 eq.) in DMSO (140 ml) was added by amine **3** (1.0 mg, 2.7 μmol, 3.7 eq.) at room temperature. After stirring the mixture for 3 hours at 70 °C, the reaction mixture was purified by HPLC (column was preparative 20.0 × 250 mm Cosmosil 5C18-AR-300 from Nacalai Tesque; solvent A: H₂O + 0.1% TFA; B: MeCN + 0.1% TFA; gradient: from 10% B/100% A to 100% B over 30 min; flow rate: 8 ml/min; the product **29** was observed at 16.0 min. The **29** was collected and followed by lyophilization to give a white solid at 55% yield.

¹H-NMR (400 MHz, D₂O) δ 7.68 – 7.53 (m, 4H), 7.47 – 7.34 (m, 4H), 7.29 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 7.22 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 5.94 (d, J = 17.1 Hz, 1H), 5.64 (d, J = 17.1 Hz, 1H), 5.10 (s, 1H), 5.05 – 4.97 (m, 1H), 4.95 – 4.84 (m, 4H), 4.64 – 4.49 (m, 8H), 4.45 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 4.40 – 4.26 (m, 3H), 4.23 (s, 1H), 4.17 (s, 1H), 4.12 (s, 1H), 4.09 (s, 2H), 4.03 – 3.31 (m, 60H), 3.12 – 3.08 (m, 3H), 2.80 (d, J = 4.7 Hz, 2H), 2.74 (dd, J = 12.6, 4.4 Hz, 2H), 2.31 – 2.24 (m, 2H), 2.18 – 1.93 (m, 20H), 1.90 – 1.72 (m, 4H), 1.61 – 1.52 (m, 2H), 1.48 – 1.09 (m, 11H).

LRMS (ESI): m/z [M-2H]²⁻ calculated for 1431.5481 C₁₁₈H₁₇₈N₁₄O₆₇; found 1431.9180.

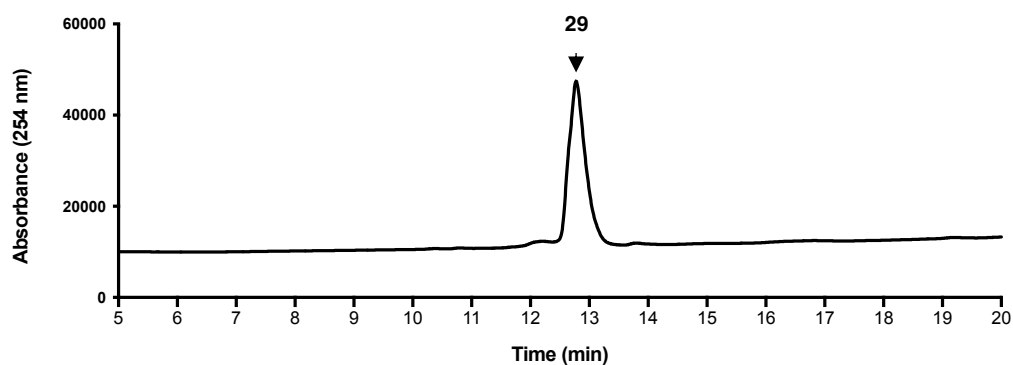


Figure S10. HPLC analysis (column was an analytical 4.6 × 250 mm Cosmosil 5C18-AR-300 from Nacalai Tesque; solvent A: H₂O + 0.1% TFA; solvent B: MeCN + 0.1% TFA; gradient: from 10%B/90%A to 70%B/30%A over 20 min; flow rate: 1 ml/min) of the purified **29**. The **29** was observed at 12.8 min.

H and ¹³C NMR spectrum

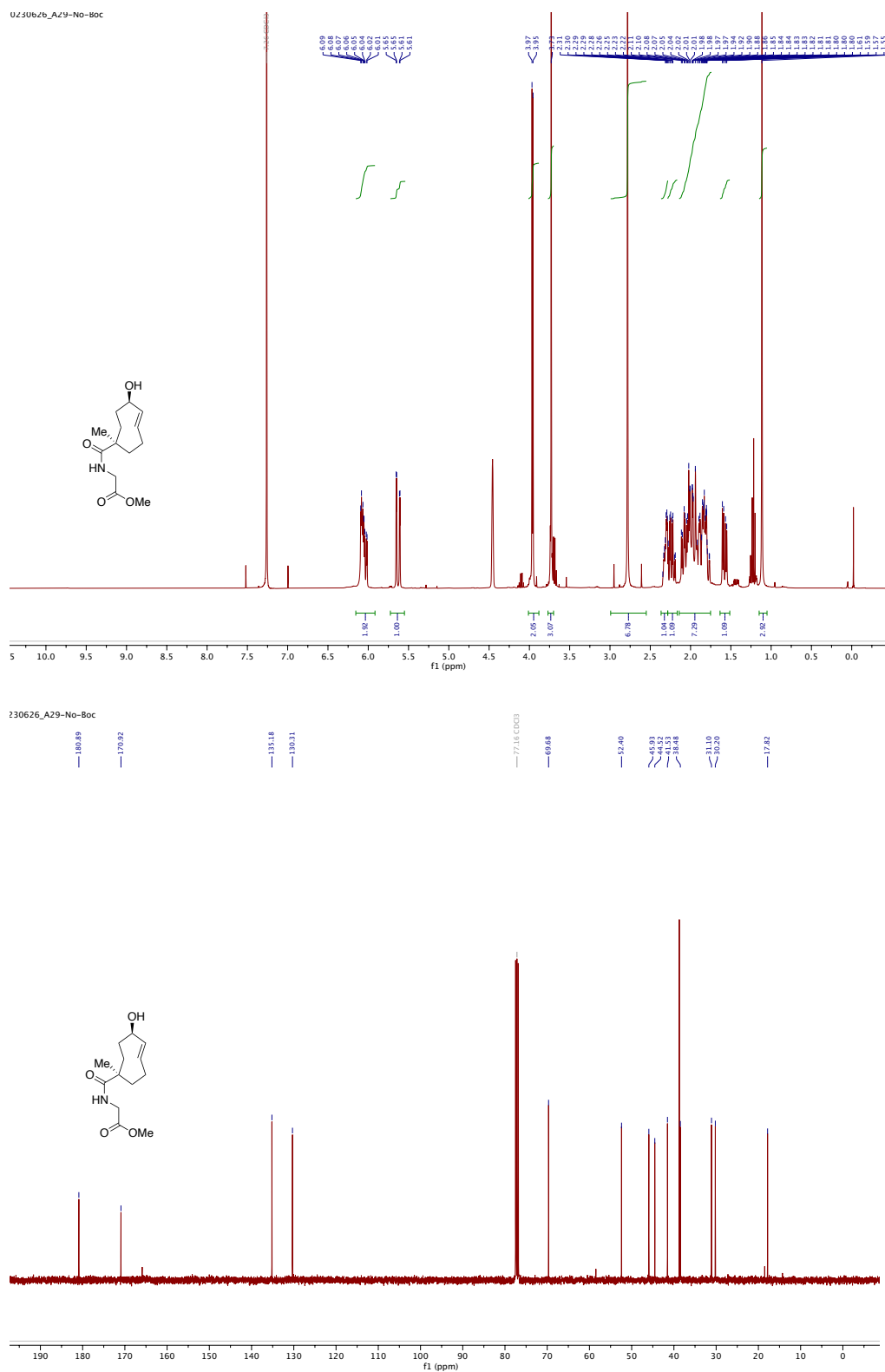


Figure S11. ¹H and ¹³C NMR spectra of ester 20

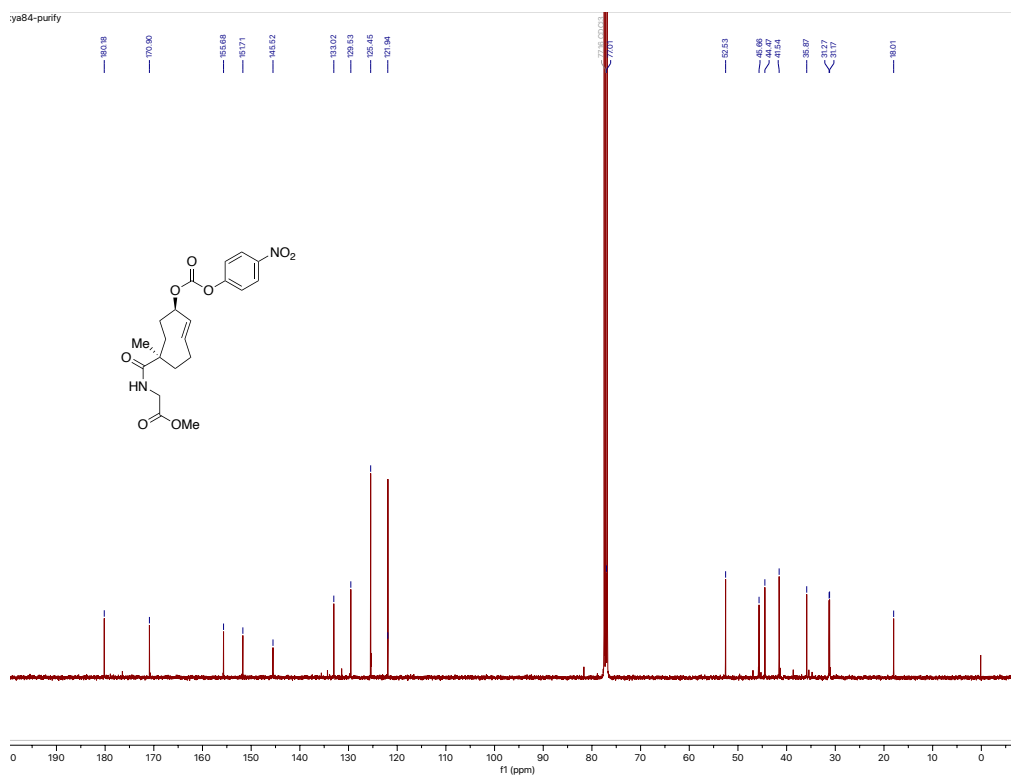
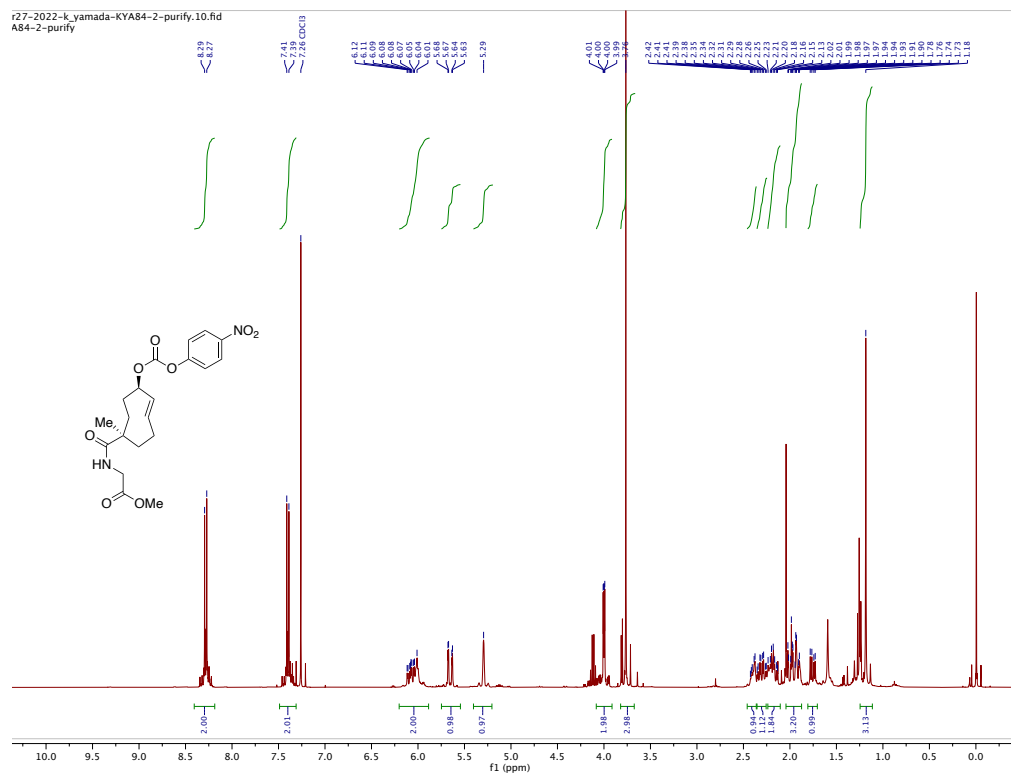


Figure S13. ^1H and ^{13}C NMR spectra of carbonate intermediate 21

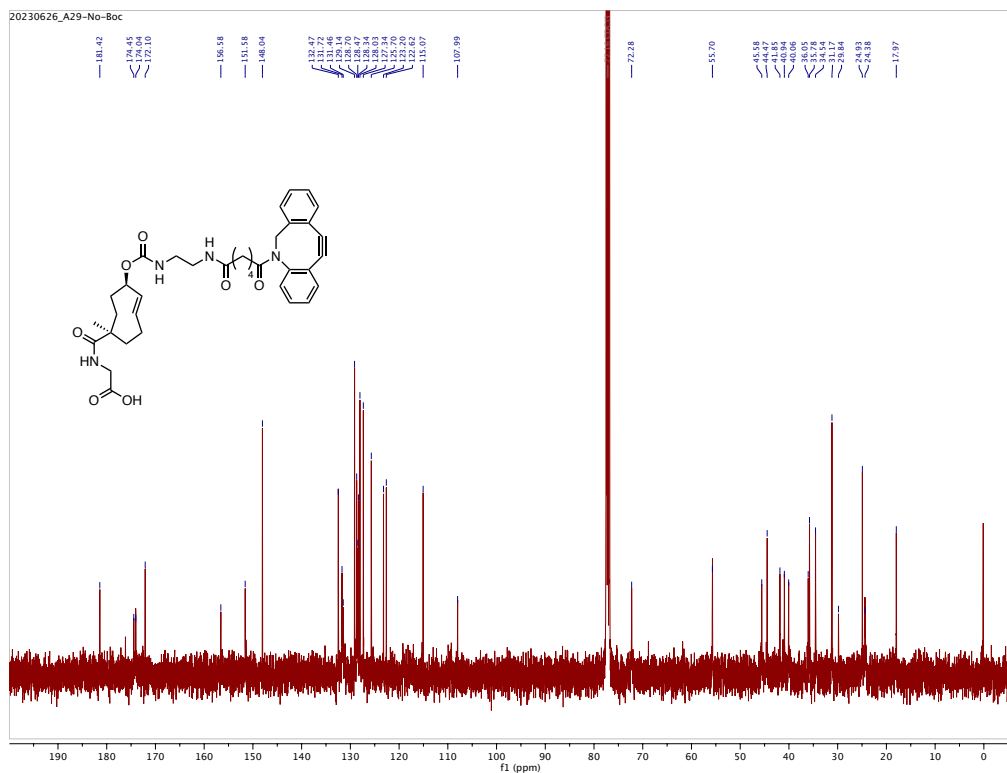
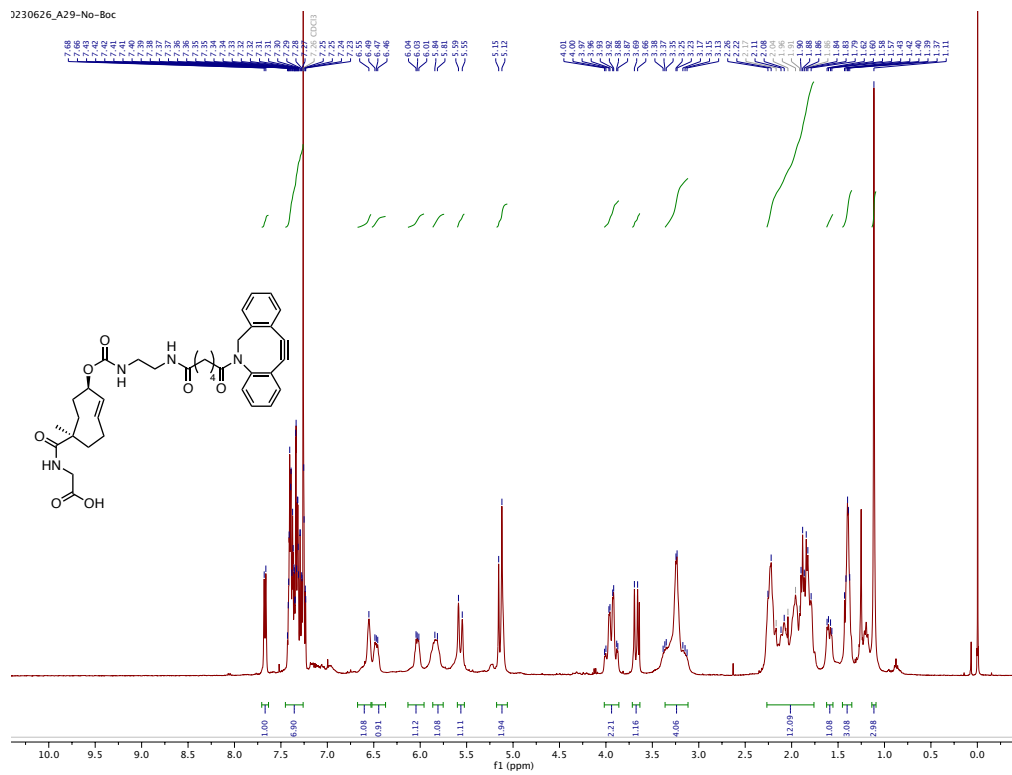


Figure S15. ^1H and ^{13}C NMR spectra of carboxylic acid **23**

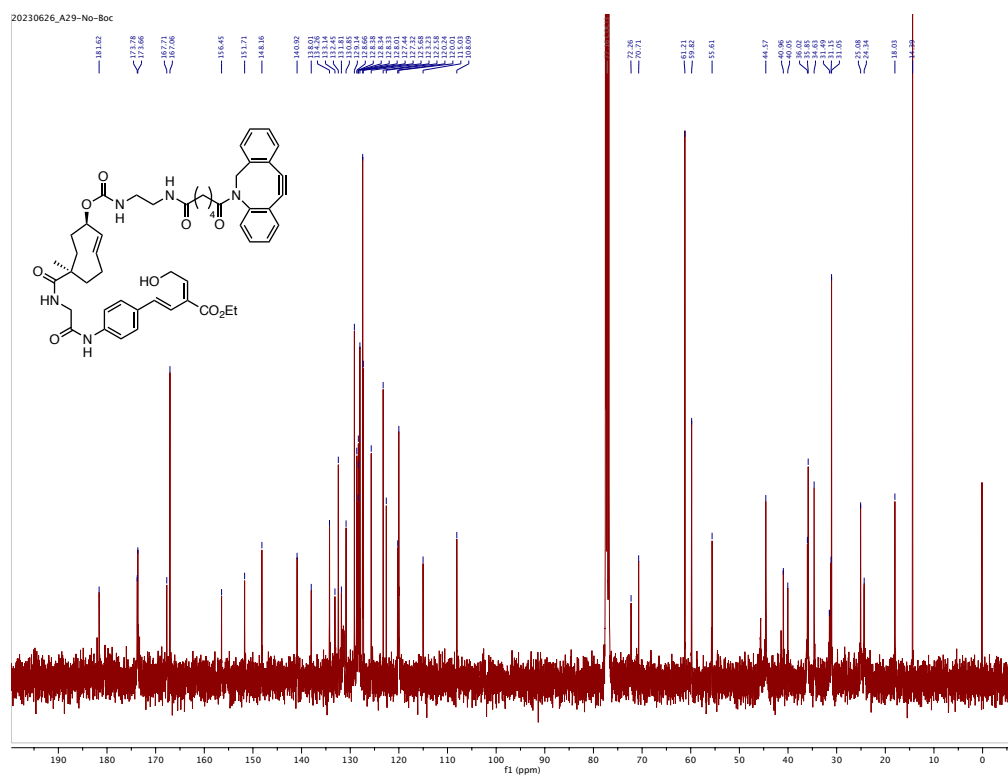
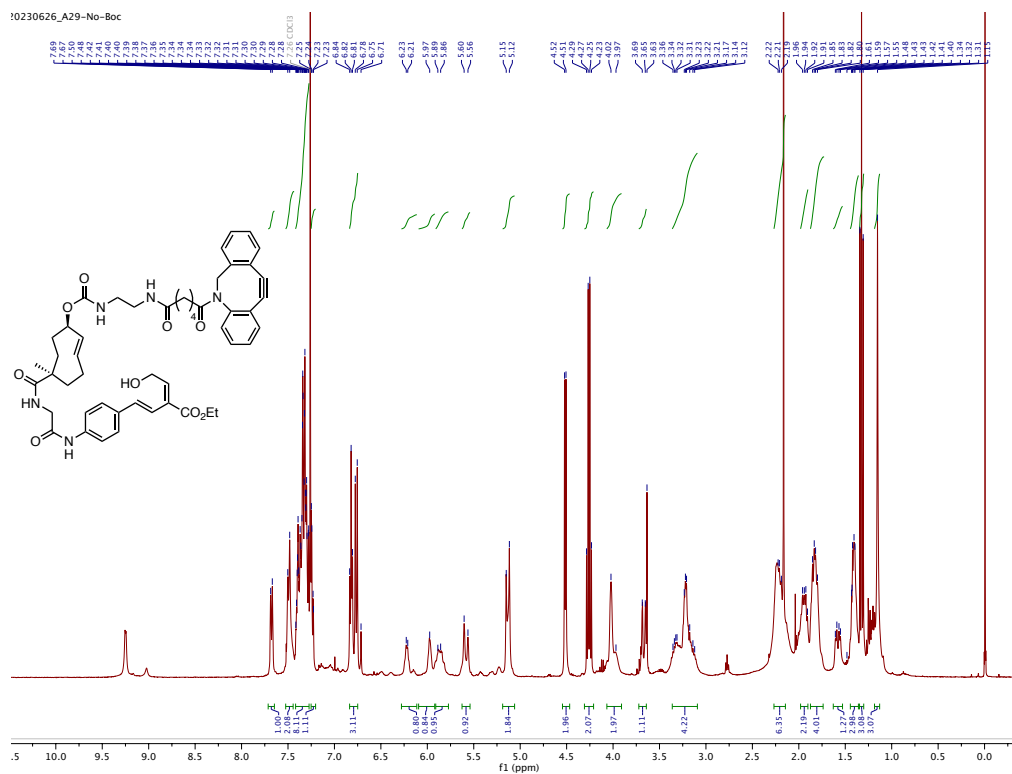


Figure S16. ¹H and ¹³C NMR spectra of allyl alcohol 24

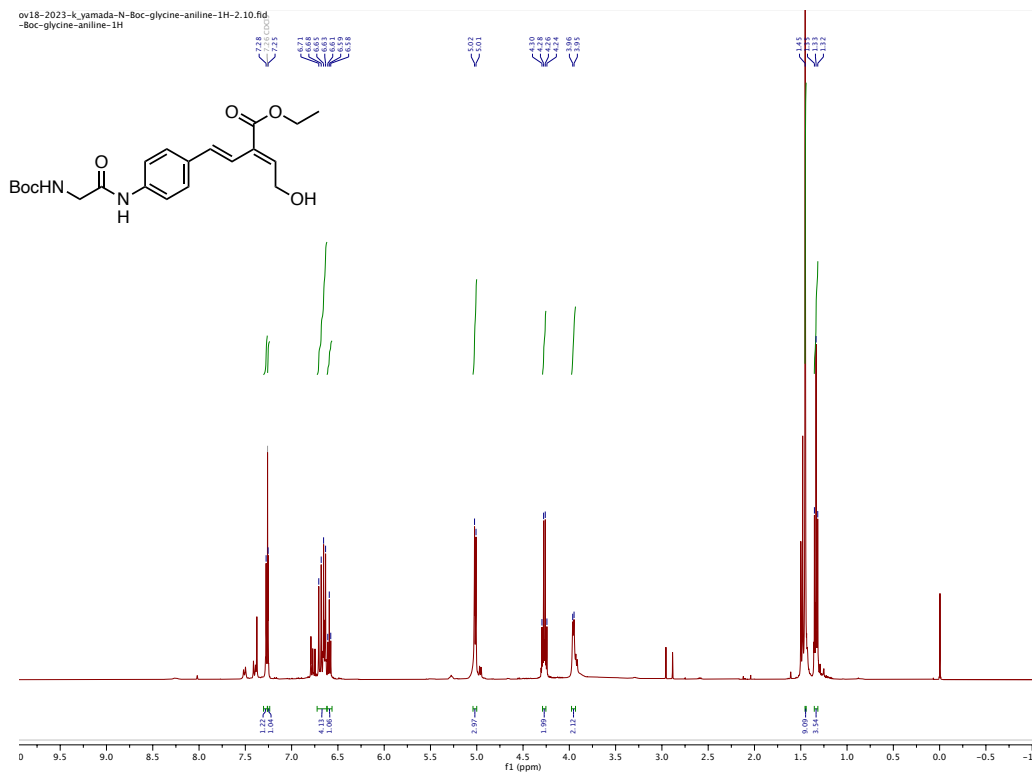


Figure S21. ¹H NMR spectra of 17

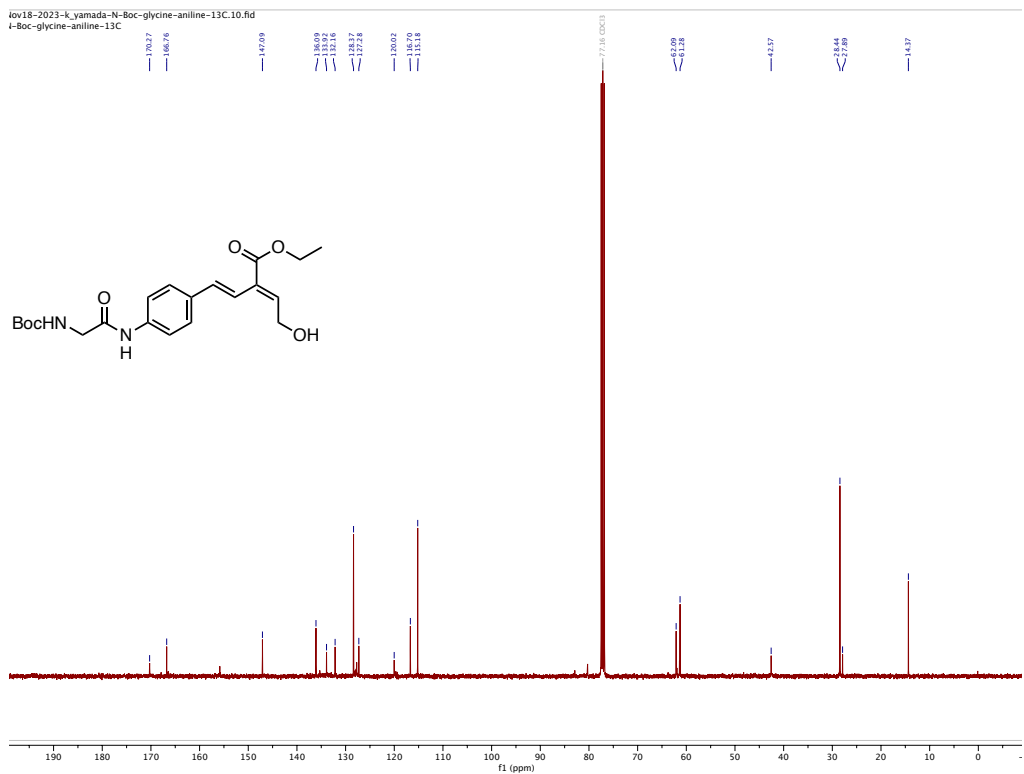


Figure S22. ¹³C NMR spectra of 18

Synthesis of glycoalbumin

General protocol for preparation of glycoalbumin-I and fluorophore-linked glycoalbumin-I

The glycan aldehyde **1** solution (75 nmol, 15 μ l from 5.0 mM stock solution in DMSO) was added to either of albumin, **TAMRA-linked albumin**, or **FL750-linked albumin** (5 nmol) in milli-Q water (135 μ l). The resulting solution was mildly mixed and incubated for 3.5 h at 37 °C in the dark. To remove the unreacted **1**, the solution was concentrated and washed with milli-Q water using Amicon 10K® ultra centrifugal filters (10 kDa cut-off). The solution of **Glycoalbumin-I** or **fluorophore-linked glycoalbumin-I** was then diluted in milli-Q water to necessary volumes as required: 100 μ l to obtain 50 μ M. To confirm formation of glycoalbumins, MALDI-TOF-MS was done. Analysis under positive mode, as for **Glycoalbumin-I**, an average molecular weight of 108 kDa was detected, which indicated 12.4 molecules of $\alpha(2,3)$ -sialylated glycan are conjugated per albumin. As for TAMRA-linked glycoalbumin-I, an average molecular weight of 109.9 kDa was detected, which indicated 12.7 molecules of $\alpha(2,3)$ -sialylated glycan are conjugated per albumin. As for **FL750-linked Glycoalbumin-I**, an average molecular weight of 99.2 kDa was detected, which indicated 9.3 molecules of $\alpha(2,3)$ -sialylated glycan are conjugated per albumin.

General protocol for Click-to-Release using glycoalbumin-I and dimethyl tetrazine (DMT).

To a solution of **Glycoalbumin-I** (4.0 nmol) in milli-Q water (216 μ l) was added by the **DMT** (240 nmol) solution in DMSO (24 μ l). The resulting mixture was mildly mixed and incubated at 37 °C. To monitor the process of releasing $\alpha(2,3)$ -sialylated glycans, a portion (1/40) of the mixture solution was washed with milli-Q water using Amicon 10K® ultra centrifugal filters (10 kDa cut-off), followed by measurement using MALDI-TOF-MS for a specific time.

A protocol for preparation of glycoalbumin-II by glycan remodeling

To a solution of **Glycoalbumin-I** (4.0 nmol) in milli-Q water (216 μ l) was added by the **Gal-Tz** (240 nmol) solution in DMSO (24 μ l). The resulting mixture was mildly mixed and incubated for 16 h at 37 °C. To monitor the process of replacing $\alpha(2,3)$ -sialylated glycans with galactosylated ones, a portion (1/40) of the mixture solution was washed with milli-Q water using Amicon 10K® ultra centrifugal filters (10 kDa cut-off), followed by measurement using MALDI-TOF-MS for a specific time (5, 10, and 30 min, 1.5, 3.0, 4.0 and 16.0 h). After 16 h, the solution was concentrated and washed with milli-Q water using Amicon 10K® ultra centrifugal filters (10 kDa cut-off) to remove the unreacted **Gal-Tz** to afford **Glycoalbumin-II**, which consisted of 6 molecules of $\alpha(2,3)$ -sialylated glycan and 10 molecules of galactosylated glycan.

General protocol for preparation of fluorophore-linked glycoalbumin-II by glycan remodeling

To a solution of fluorophore-linked glycoalbumin-I (4.0 nmol) in milli-Q water (216 μ l) was added by the Gal-Tz (240 nmol) solution in DMSO (24 μ l). The resulting mixture was mildly mixed and incubated for 16 h at 37 °C. To monitor the process of replacing α (2,3)-sialylated glycans with galactosylated ones, a portion (1/40) of the mixture solution was washed with milli-Q water using Amicon 10K® ultra centrifugal filters (10 kDa cut-off), followed by measurement using MALDI-TOF-MS for a specific time (30 min and 16.0 h). After 16 h, the solution was concentrated and washed with milli-Q water using Amicon 10K® ultra centrifugal filters (10 kDa cut-off) to remove the unreacted **Gal-Tz** to afford **fluorophore-linked glycoalbumin-II**. The **TAMRA-linked Glycoalbumin-II** consisted of 8.1 molecules of α (2,3)-sialylated glycan and 7.6 molecules of galactosylated glycan. The **FL750-linked glycoalbumin-II** consisted of 5.7 molecules of α (2,3)-sialylated glycan and 5.8 molecules of galactosylated glycan.

Preparation of Glycoalbumin-I

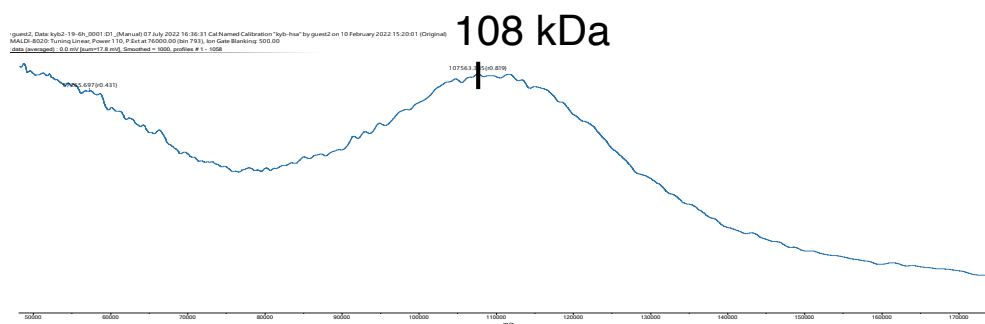
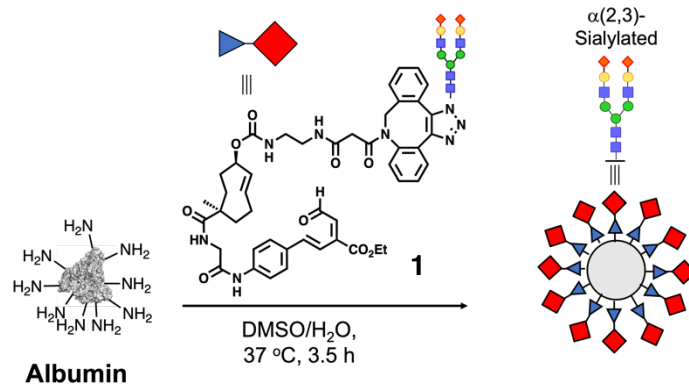


Figure S23. MALDI-TOF-MS of Glycoalbumin-I

Glycan remodeling reaction of *Glycoalbumin-I* to give *Glycoalbumin-II*

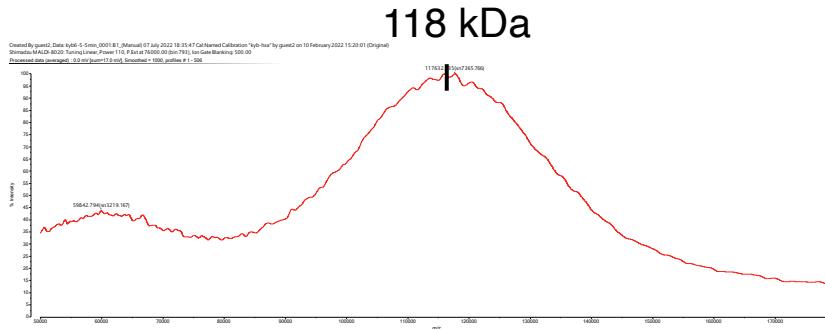
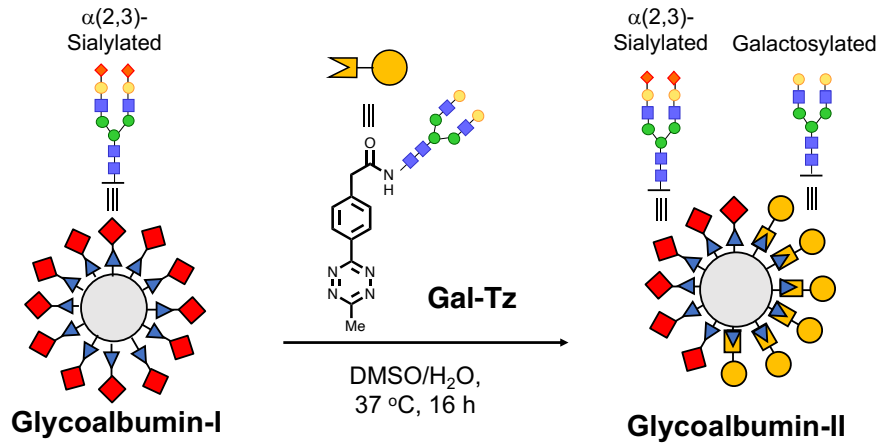


Figure S24. MALDI-TOF-MS data of *Glycoalbumin-II* for 5 min after starting the reaction.

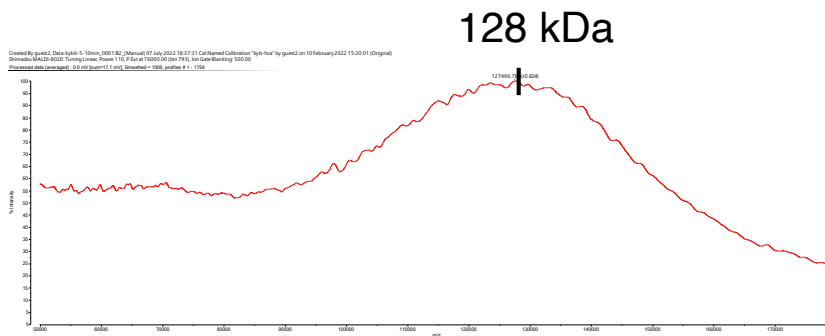


Figure S25. MALDI-TOF-MS data of *Glycoalbumin-II* for 10 min after starting the reaction.

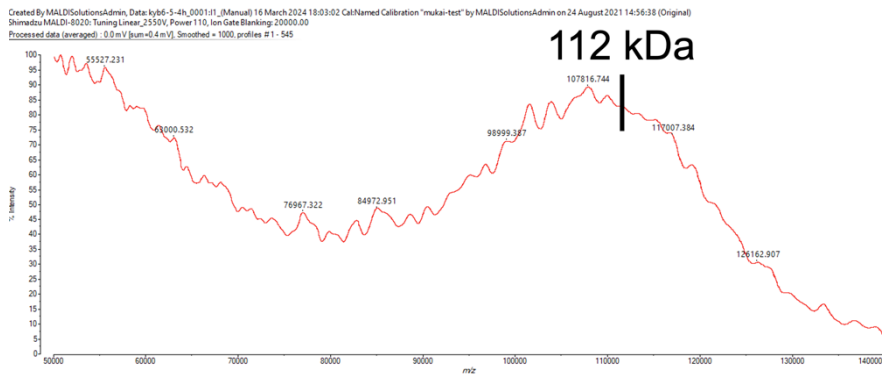


Figure S29. MALDI-TOF-MS data of **Glycoalbumin-II** for 4 h after starting the reaction.

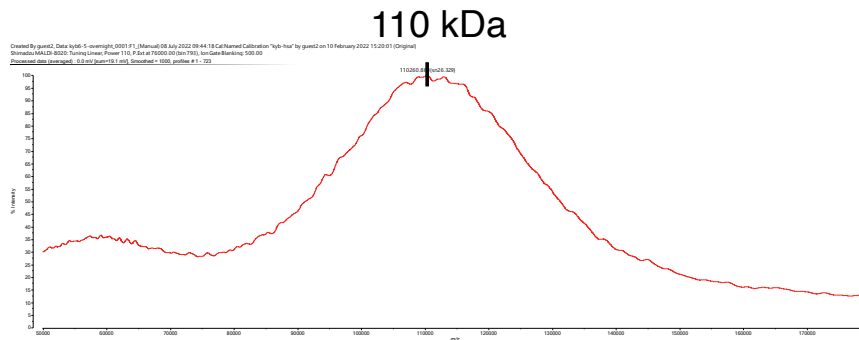
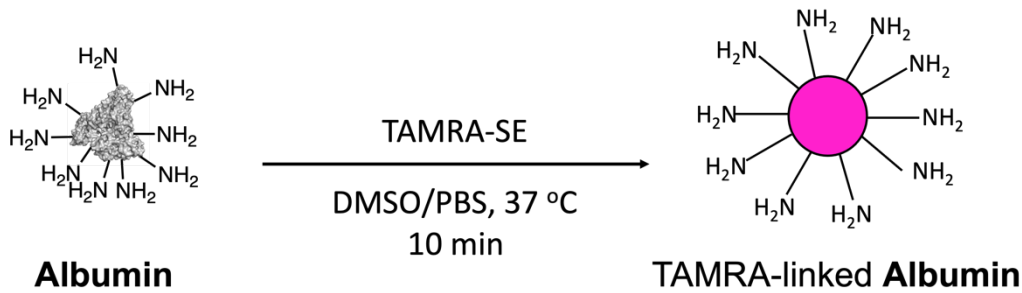


Figure S30. MALDI-TOF-MS data of **Glycoalbumin-II** for 16 h after starting the reaction.

Preparation of TAMRA-linked albumin



To a solution of human serum albumin (6.7 mg, 100 nmol) in PBS buffer (pH 7.4, 1.0 ml) was added 5(6)-carboxytetramethylrhodamine succinimidyl ester (0.13 mg, 250 nmol) in DMSO (13 μ l). The resulted mixture solution was reacted at 37 $^\circ$ C. After 10 min, the solution was concentrated and washed with milli-Q water using Amicon 10K[®] ultra centrifugal filters (10 kDa cut-off) to remove the unreacted TAMRA. To confirm formation of **TAMRA-linked albumin**, MALDI-TOF-MS was done. Analysis under positive mode, an average molecular weight of 67.0 kDa was detected, which indicated 1.3 molecules of TAMRA fluorophore were conjugated per albumin.

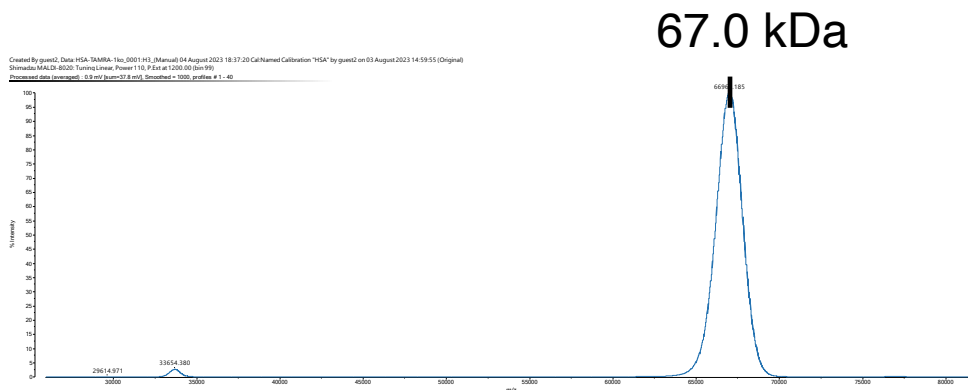


Figure S31. MALDI-TOF-MS data of **TAMRA-linked albumin**.

Preparation of TAMRA-linked Glycoalbumin-I

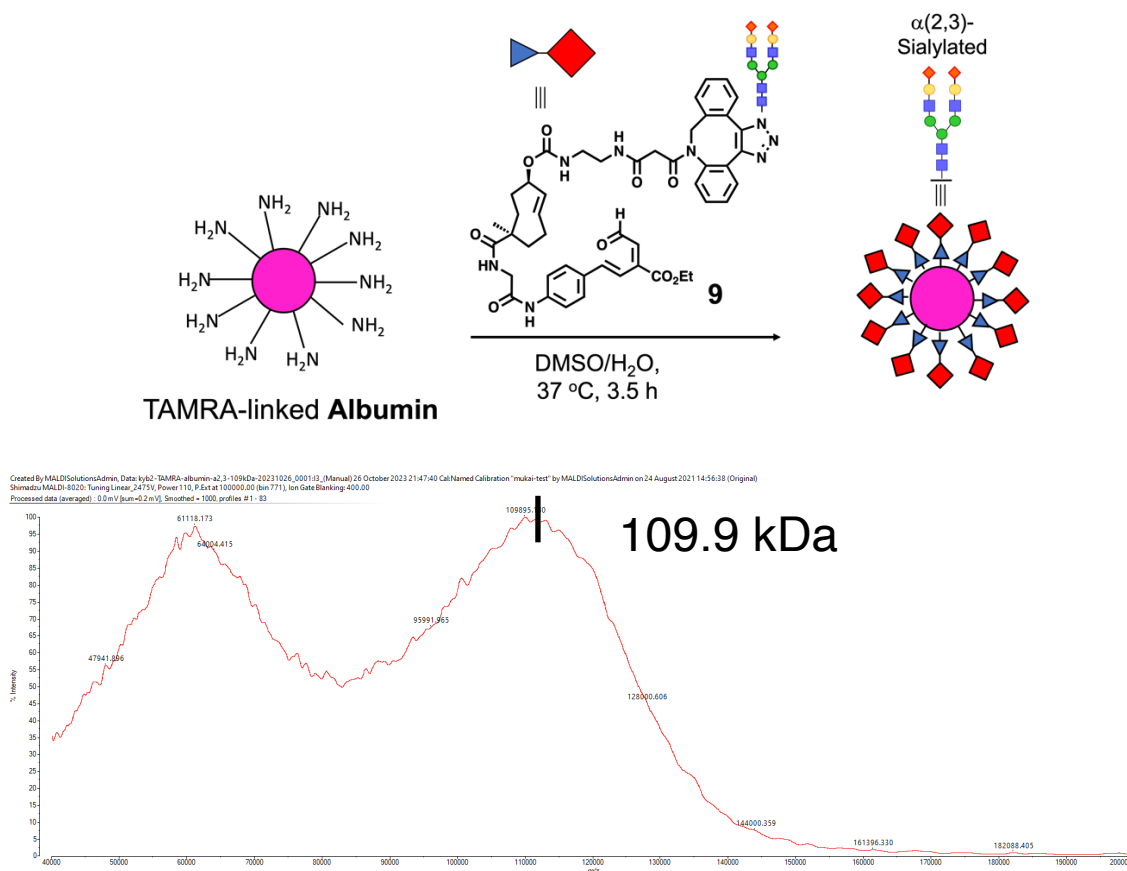


Figure S32. MALDI-TOF-MS of TAMRA-linked Glycoalbumin-I

Glycan remodeling reaction of TAMRA-linked glycoalbumin-I to give TAMRA-glycoalbumin-II

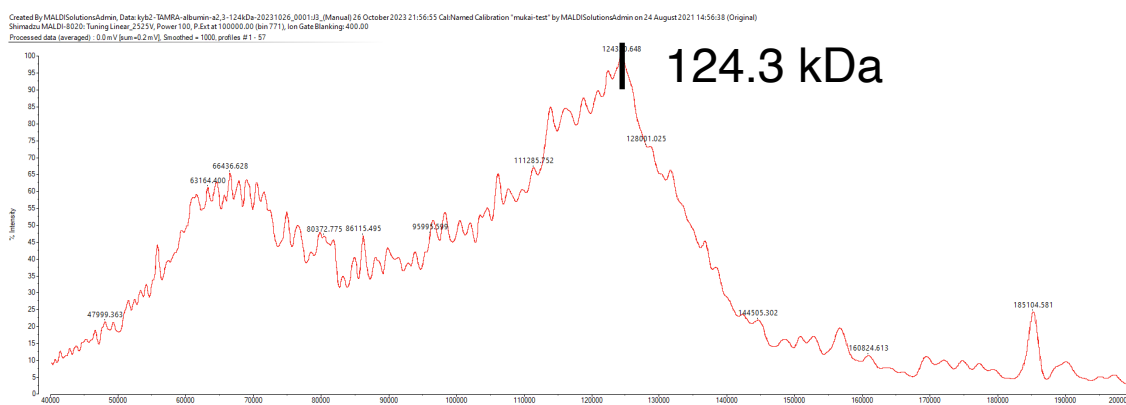
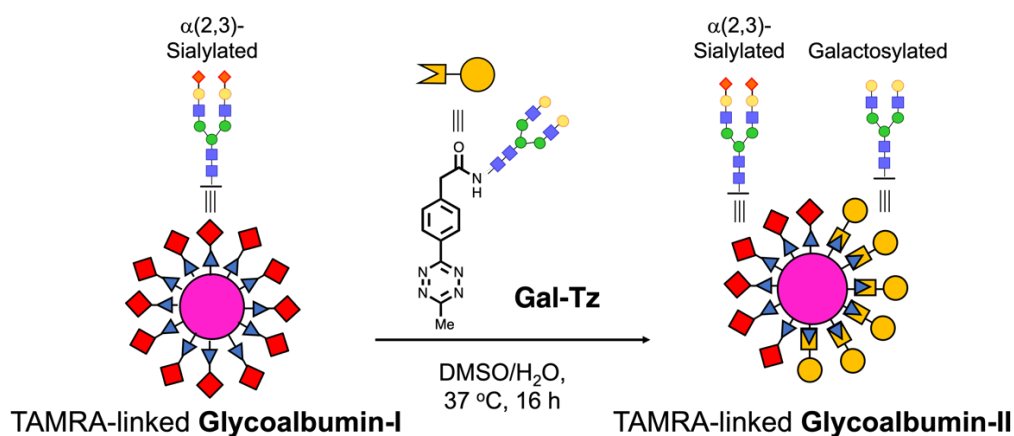


Figure S33. MALDI-TOF-MS of TAMRA-linked Glycoalbumin-I for 30 min after starting the reaction.

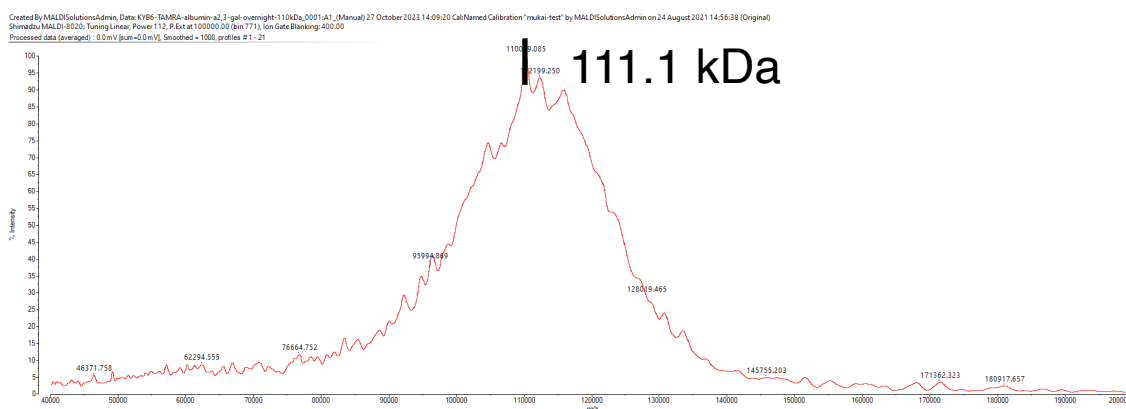
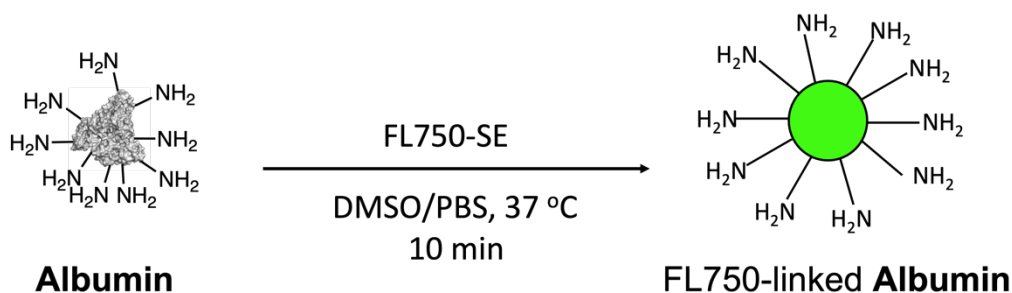


Figure S34. MALDI-TOF-MS of TAMRA-linked Glycoalbumin-I for 16 h after starting the reaction.

Preparation of FL750-linked albumin.



To a solution of human serum albumin in phosphate saline buffer (pH 7.4, 300 μl) was added by HiLyte Fluor 750 acid SE[®] (0.25 mg, 0.19 μmol) in DMSO (10 μl). The resulted mixture solution was reacted at 37 $^\circ\text{C}$. After 10 min, the solution was concentrated and washed with milli-Q water using amicon 10K[®] ultra centrifugal filters (10 kDa cut-off) to remove the unreacted Fluor 750 dye. To confirm formation of FL750-linked albumin, MALDI-TOF-MS was done. Analysis under positive mode, an average molecular weight of 68.1 kDa was detected, which indicated 1.3 molecules of FL750 fluorophore were conjugated per albumin.

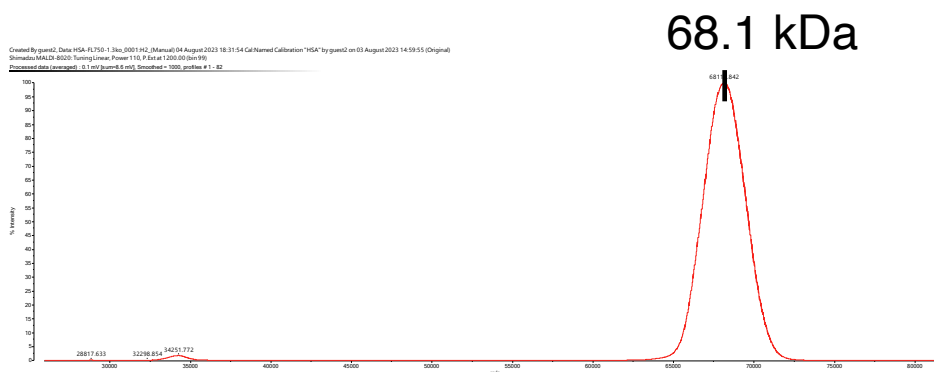


Figure S35. MALDI-TOF-MS of FL750-linked albumin.

Preparation of FL750-linked glycoalbumin-I

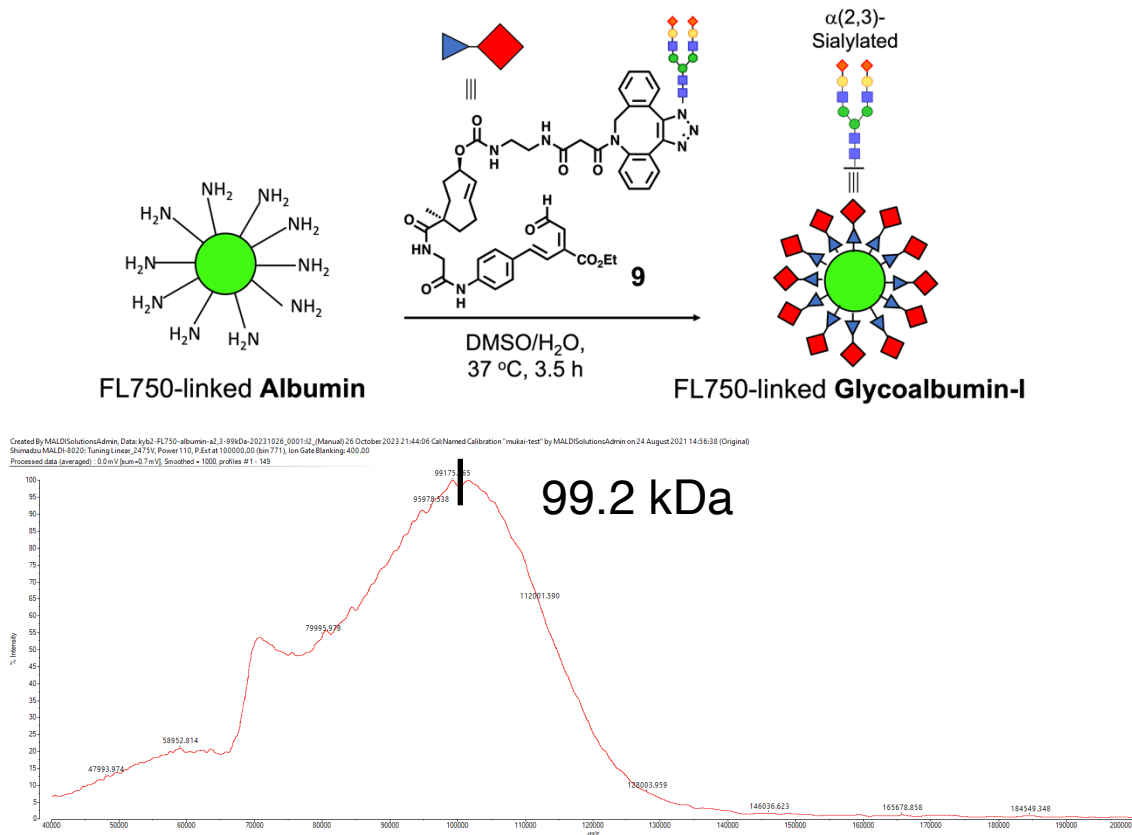
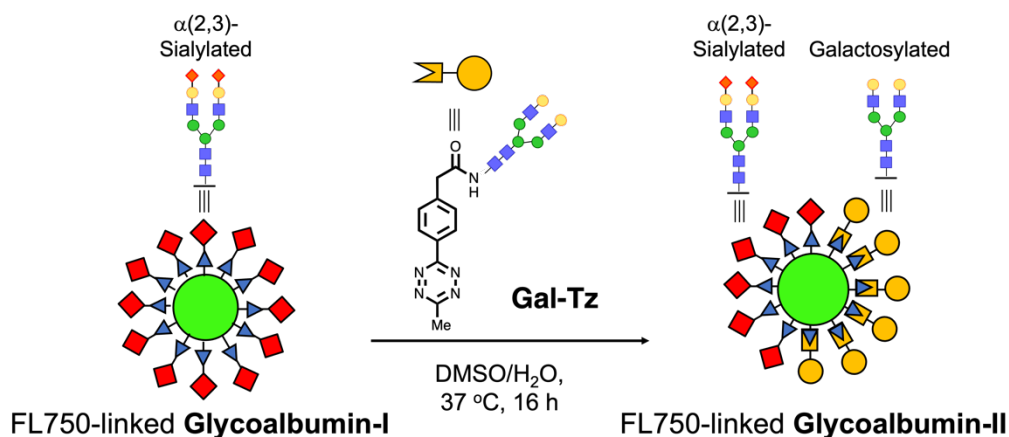


Figure S36. MALDI-TOF-MS of FL750-linked Glycoalbumin-I

Glycan remodeling reaction of FL750-linked glycoalbumin-I to give FL750-linked glycoalbumin-II



The protocol for the glycan remodeling reaction of **FL750-linked glycoalbumin-I** to give **FL750-linked Glycoalbumin-II** was described in the main text. After starting the reaction at 30 min, the average molecular weight of **FL750-linked Glycoalbumin-I** was measured by MALDI-TOF-MS (positive mode) to reveal an increase to 110.2 kDa, indicating that around 5.8 galactosylated glycans were conjugated. After 16 h, the average molecular weight of **FL750-linked Glycoalbumin-I** was decreasing to 99.9 kDa, indicating that around 3.6 $\alpha(2,3)$ -sialylated glycans were released. As a result, **FL750-linked Glycoalbumin-II** consisted of 5.7 $\alpha(2,3)$ -sialylated glycans and 5.8 galactosylated glycans.

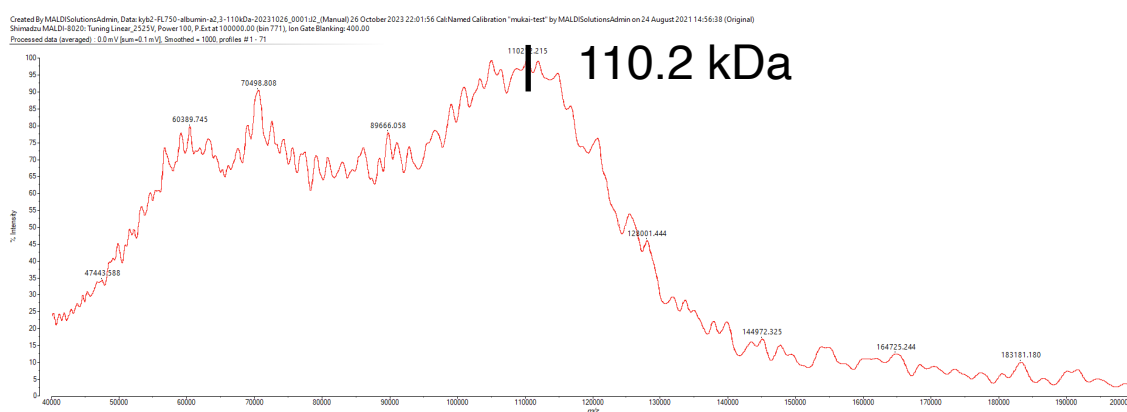


Figure S37. MALDI-TOF-MS of **FL750-linked Glycoalbumin-I** for 30 min after starting the reaction.

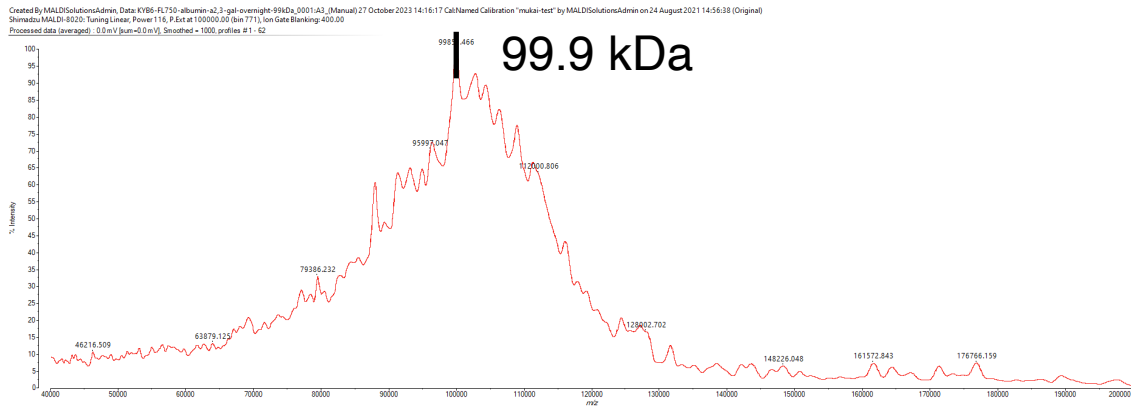
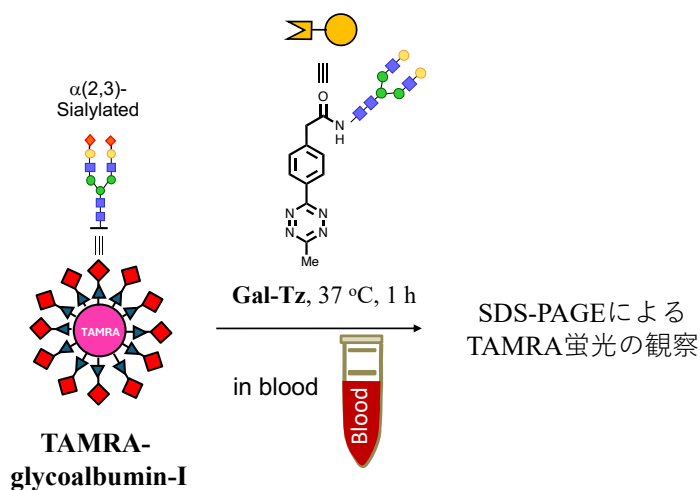


Figure S38. MALDI-TOF-MS of FL750-linked Glycoalbumin-I for 16 h after starting the reaction.

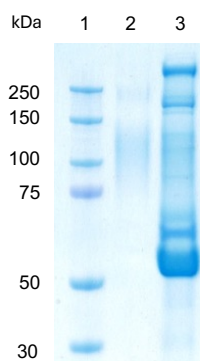
Glycan-remodeling reaction in blood

In Blood reaction protocol

To 34 μ L of blood collected from mice, 50 μ M TAMRA-linked Glycoalbumin-I solution (20 μ L) was added. To the solution, 833 μ M of Gal-Tz or DMT (50 eq.) in DMSO (6 μ L) was added and reaction container was shaken under 37 $^{\circ}$ C. After the specified time has passed, the reaction mixture was centrifuged, supernatant solution was collected. To the derived solution was added 2 \times SDS-PAGE Sample Buffer (for Electrophoresis) in the same volume as the sample and the mixture was heated at 90 $^{\circ}$ C for 5 min. The sample solution was applied to 10% acrylamide gel. After 1 h of electrophoresis with 100V, fluorescence band was detected by fluorescence. Precision plus protein dual color standard (BioRad Laboratories) was used as a standard protein ladder.



(a) Coomassie staining



Lane 1: Protein Marker

Lane 2: TAMRA-labeled glycoalbumin-I only as a standard

Lane 3: TAMRA-labeled glycoalbumin-I and Gal-Tz in blood for 1 h

(b) TAMRA Fluorescence
(ex/555 nm; em/580 nm)

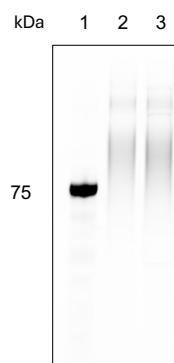
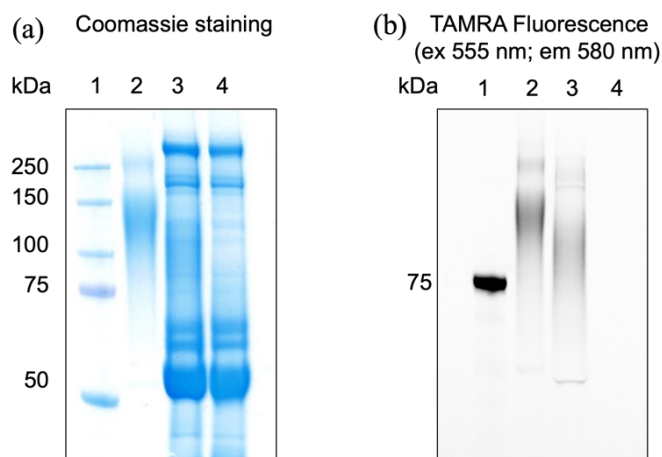
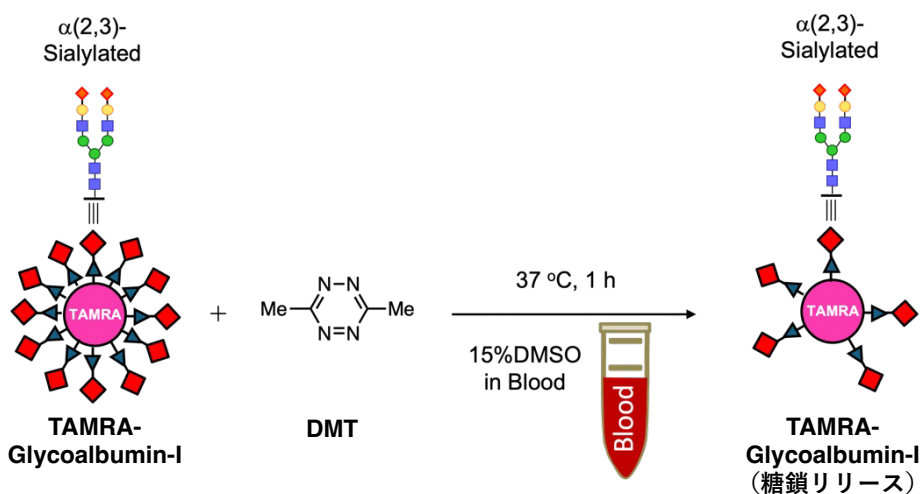


Figure S39. TAMRA-linked Glycoalbumin-I (20 μ M) and Gal-Tz (1 mM) were reacted in a mixture of blood solution (15% DMSO in mouse blood) at 37 $^{\circ}$ C for 1 h. After reaction, the solution was centrifuged for 10 min at 16900 x g and the generated supernatant was analyzed by SDS-PAGE. SDS-PAGE gel images showing Coomassie staining (a) and TAMRA fluorescence (b) for the same gel. Lane 1 is protein MW standards. Lane 2 is the TAMRA-linked Glycoalbumin-I. Lane 3 is the mixture of TAMRA-linked Glycoalbumin-I and Gal-Tz in a mixture blood solution. The ChemiDocTM Touch (Bio-Rad) was used to record the TAMRA fluorescent images using a Blot/UV/Stain-free tray with Pro-Q Diamond setting. The TAMRA fluorescent images were obtained at a 0.1s exposure setting.



Lane 1: protein MW standards

Lane 2: TAMRA-linked **glycoalbumin-I**

Lane 3: Mixture of TAMRA-linked **glycoalbumin-I** and **DMT** in a mixture blood solution

Lane 4: mouse blood.

Figure S40. TAMRA-linked Glycoalbumin-I (20 μ M) and tetrazine **1** (1 mM) were reacted in a

mixture of blood solution (15% DMSO in mouse blood) at 37 °C for 1 h. After reaction, the solution was centrifuged for 10 min at 16900 x *g* and the generated supernatant was analyzed by SDS-PAGE. SDS-PAGE gel images showing Coomassie staining (a) and TAMRA fluorescence (b) for the same gel. Lane 1 is protein MW standards. Lane 2 is the **TAMRA-linked Glycoalbumin-I**. Lane 3 is the mixture of **TAMRA-linked Glycoalbumin-I** and tetrazine **1** in a mixture blood solution. Lane 4 is mouse blood. The ChemiDoc™ Touch (Bio-Rad) was used to record the TAMRA fluorescent images using a Blot/UV/Stain-free tray with Pro-Q Diamond setting. The TAMRA fluorescent images were obtained at a 0.1s exposure setting.

Kinetics analysis

Kinetics analysis protocol

A reaction consisted of the **28** (100 mM) and 1 equivalent of **Gal-Tz** (100 mM) in the 10% DMSO/H₂O solution. Following initiation by **Gal-Tz** addition, the reactions mixture was mixed and incubated at 37 °C. As shown in Figure S9, the result was monitored at the indicated times (1, 3, 5, 10, 60, 120, and 240 min) by HPLC analysis and UV-visible detection. HPLC conditions: column was an analytical 4.6 × 250 mm Cosmosil 5C18-AR-300 from Nacalai Tesque; solvent A: H₂O + 0.1% TFA; solvent B: MeCN + 0.1% TFA; gradient: from 30%B/70%A to 80%B/20%A over 20 min; flow rate: 1 ml/min. The **Gal-Tz** conjugation progress was observed by monitoring the peak area of **28** decrease at 15.2 minutes of retention times, whereas the α(2,3)-sialylated glycan release progress was observed by monitoring the peak area of **29** increase at 12.8 minutes of retention times. As depicted in Figure S10, the peak area ratios ($[\mathbf{28}]_t/[\mathbf{28}]_0$ and $[\mathbf{29}]_t/[\mathbf{29}]_0$) were plotted versus reaction time using GraphPad Prism 9. $[\mathbf{28}]_t$ = HPLC chromatogram peak area of **28** at t minutes. $[\mathbf{28}]_0$ = HPLC chromatogram peak area of **28** at 0 minutes. $[\mathbf{29}]_t$ = HPLC chromatogram peak area of **29** at t minutes. $[\mathbf{29}]_0$ = HPLC chromatogram peak area of **29** at 0 minutes.

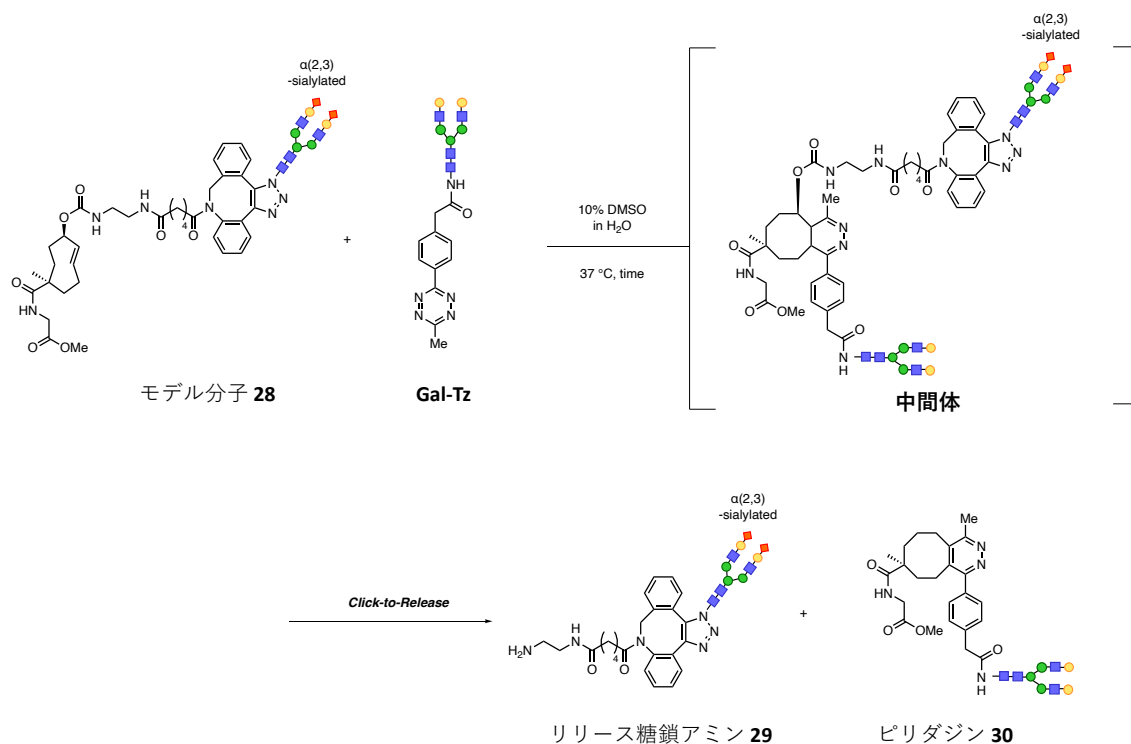


Figure S41. glycan remodeling reaction between model compound **28** and **Gal-Tz** to give amine **29** and pyridazine **30**

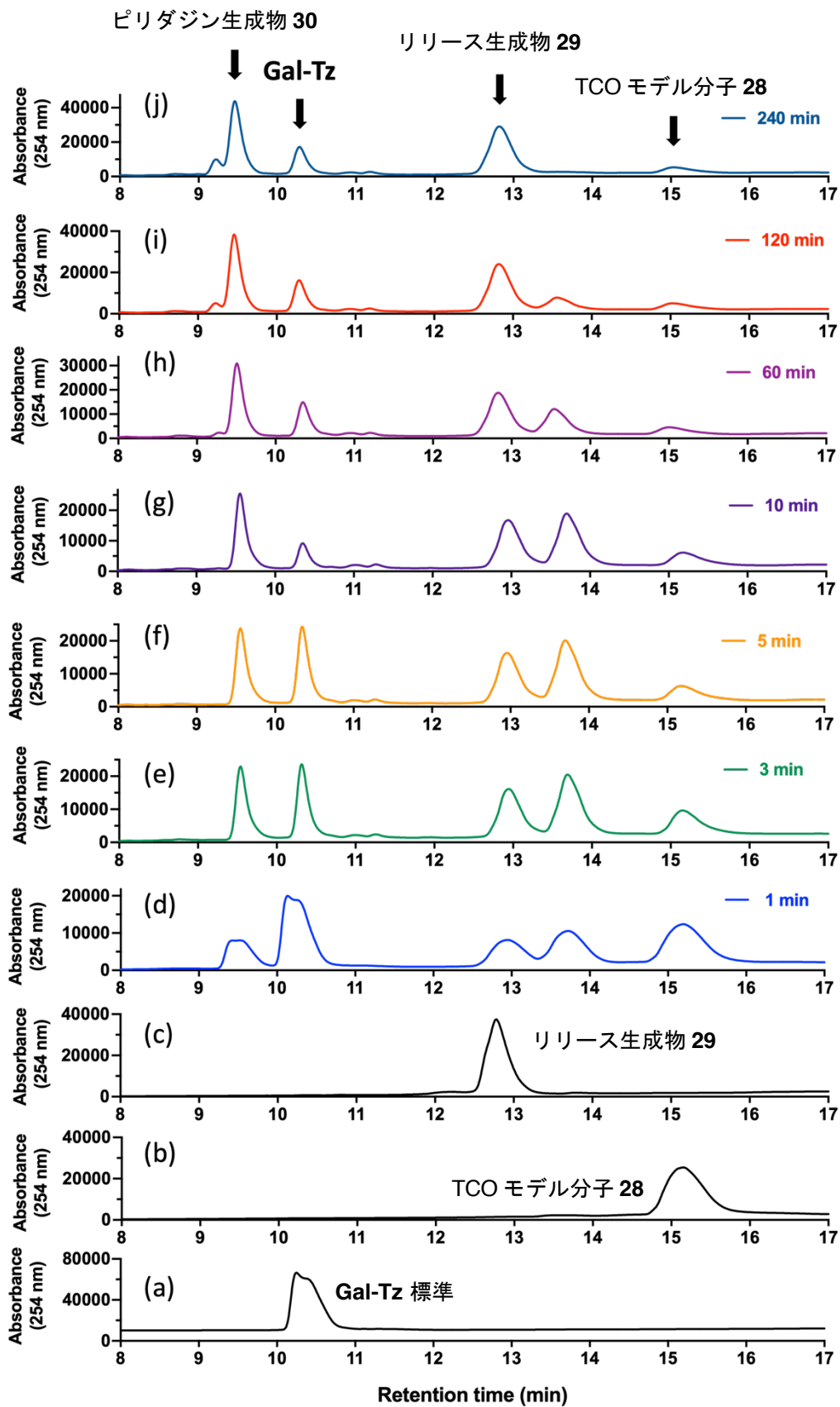


Figure S42. HPLC time trace of the click-to-release reaction between **28** (100 mM) and **Gal-Tz** (100 mM) in the 10% DMSO/H₂O solution at 37 °C. Standard runs of known compounds include (a) **Gal-Tz** standard, (b) **28** standard and (c) **29** standard. Example HPLC traces of the reactions at (d) 1 min, (e) 3 min, (f) 5 min, (g) 10 min, (h) 60 min (i) 120 min, and (j) 240 min. HPLC conditions: column was an analytical 4.6 × 250 mm Cosmosil 5C₁₈-AR-300 from Nacalai Tesque; solvent A: H₂O + 0.1% TFA; solvent B: MeCN + 0.1% TFA; gradient: from 10%B/90%A to 70%B/30%A over 20 min; flow rate: 1 ml/min. The **30** was observed at 9.5 min and confirmed by ESI-MS (LRMS (ESI): m/z [M-H]⁻¹ calculated for C₉₀H₁₃₆N₉O₅₂ 2175.8313; found 2175.7168.

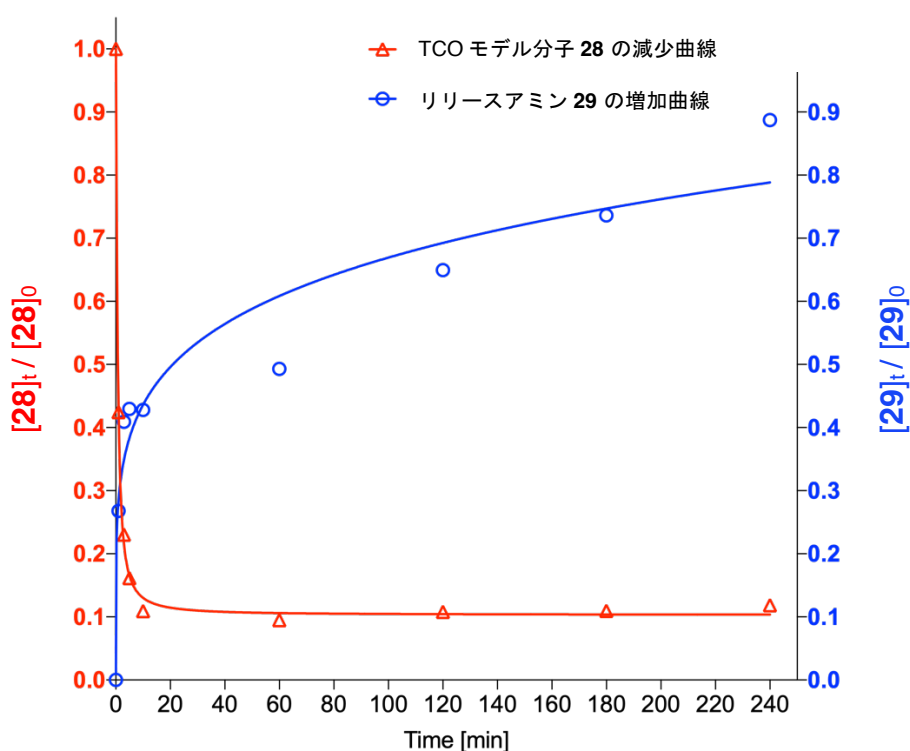


Figure S43. The click-to-release reaction between **28** (100 mM) and **Gal-Tz** (100 mM) in the 10% DMSO/H₂O solution at 37 °C was monitored at the indicated times (1, 3, 5, 10, 60, 120, and 240 min) by HPLC and UV-visible detection. The HPLC chromatogram peak area-changing ratios of **28** (red line) and **29** (blue line) were plotted against reaction time. [28]_t = HPLC chromatogram peak area of **28** at *t* minutes. [28]₀ = HPLC chromatogram peak area of **28** at 0 minutes. [29]_t = HPLC chromatogram peak area of **29** at *t* minutes. [29]₀ = HPLC chromatogram peak area of **29** at 0 minutes.

Cell studies

Cell culture

Cell lines were obtained from RIKEN Cell Bank and typically incubated at 37 °C with a 5% CO₂ humidified environment. HepG2 cancer cell line (Human hepatocellular carcinoma cells) and SW620 (human colon cancer cells) were cultured in DMEM medium with supplemented with 10% FBS and 1% penicillin-streptomycin.

Cell imaging studies protocol

To determine the degree of binding between α 2,3-sialylated **Glycoalbumin-I** or glycan-remodeled **glycoalbumin-II** and HepG2 cells, fluorescent imaging study was performed. HepG2 cells was plated onto 96-well clear-bottomed plates at a density of 10^4 cells per well and grown. After 2 days, the medium was then removed, followed by treatment (final concentration) of either 1 μ M of **TAMRA-linked Glycoalbumin-I** or 1 μ M **TAMRA-linked Glycoalbumin-II** in DMEM medium with 10% FBS. Cells were then incubated for 3 h at 37 °C. After the medium was removed, cells were washed (3 \times) with PBS buffer, followed by the addition of 200 μ l nuclear staining agent hoechst (20000 \times diluted solution by PBS buffer). Following incubation period of 15min at room temperature, cells were washed with 1 \times with PBS buffer 200 μ l and prepared for microscopy imaging using a Keyence BZ-X810 all-in-one fluorescence microscope. For TAMRA dye observation, fluorescence was measured at $\lambda_{EX} = 545$ nm/ $\lambda_{EM} = 605$ nm, while for Hoechst-dye observation, fluorescence was measured at $\lambda_{EX} = 360$ nm/ $\lambda_{EM} = 460$ nm. Images were obtained at 40 \times magnification. Bright field images were obtained at a 1/500s exposure setting, Hoechst images were obtained at a 1/10s exposure setting, TAMRA images were obtained at a 3s exposure setting. The obtained TAMRA and Hoechst images were analyzed using the free software Fiji. For TAMRA images, fluorescent regions were specified by Threshold, and the brightness value of the region was measured and designated as the fluorescence intensity; for Hoechst images, the number of nuclei in the image was manually counted and designated as the number of cells.

Cell imaging studies

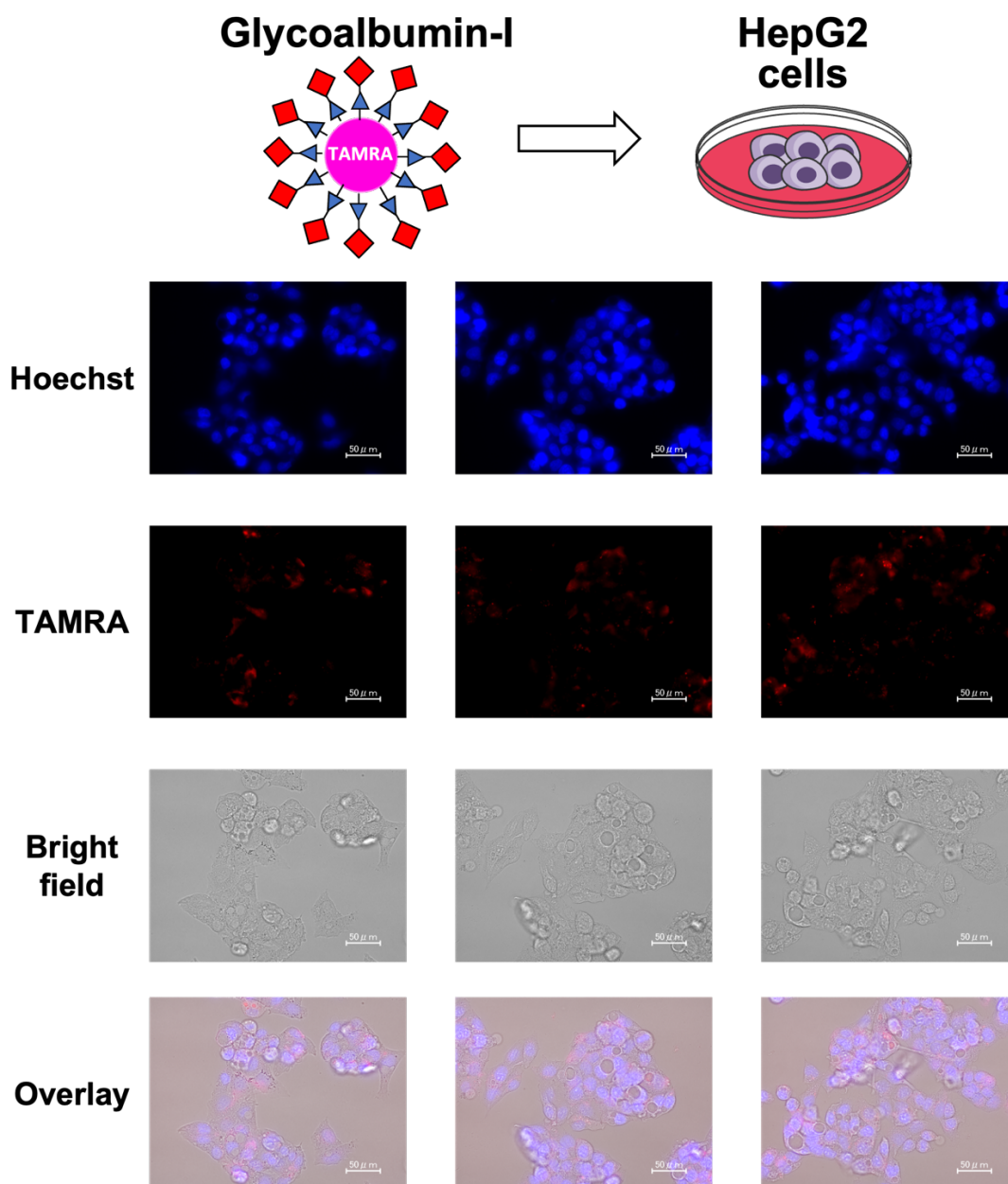


Fig S44. HepG2 cell imaging results following incubation (3 hours, 37 °C) with **TAMRA-linked Glycoalbumin-I** (1 μM) in cell medium (n = 3). Shown are images obtained via TAMRA (3s exposure time), Hoechst (1/10s exposure time), Brightfield (1/500s exposure time), and the combined Overlay. The scale bar corresponds to 50 μm .

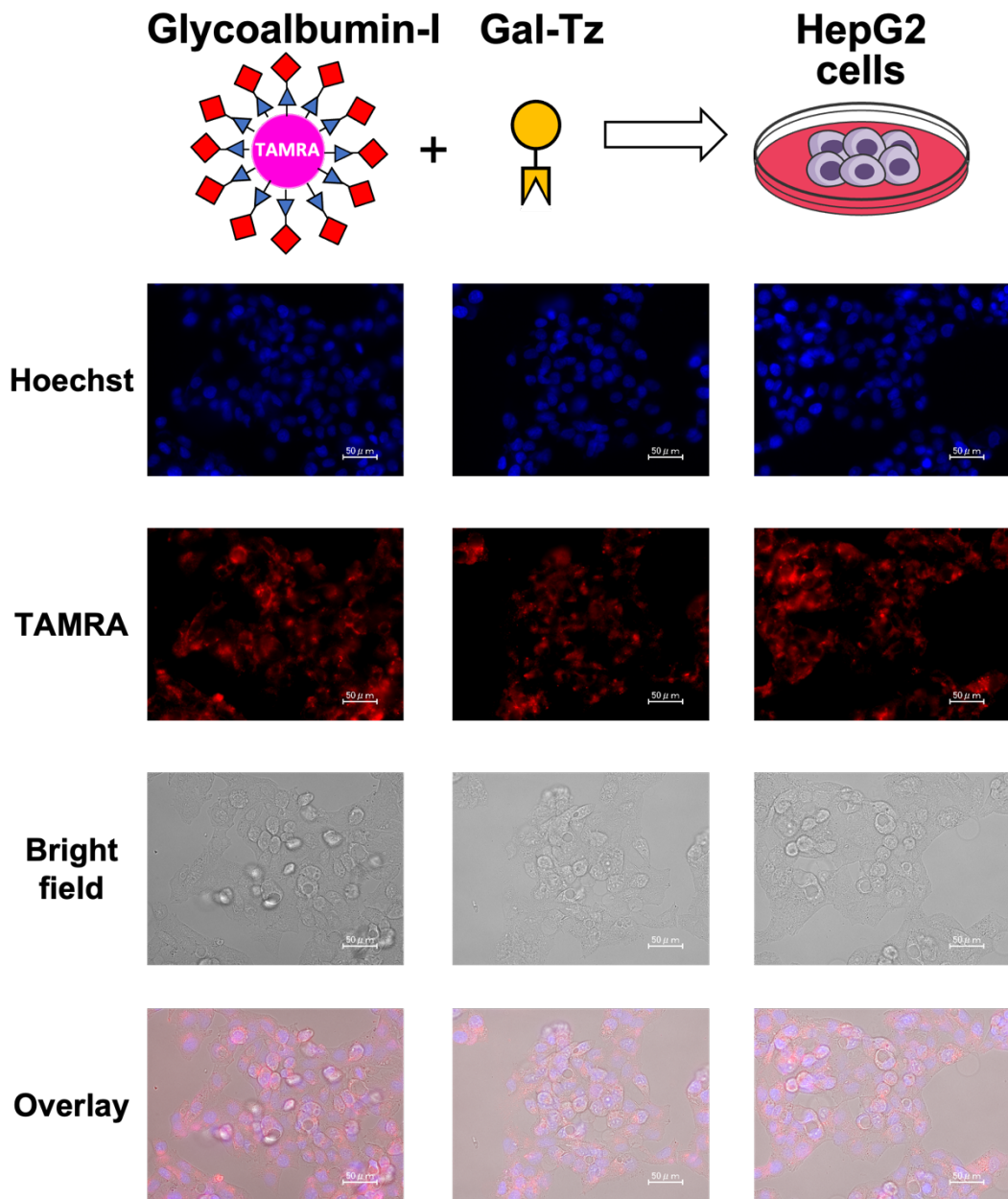


Figure S45. HepG2 cell imaging results following incubation (3 hours, 37 °C) with **TAMRA-linked Glycoalbumin-I** (1 μM) and **Gal-Tz** (60 μM) in cell medium (n = 3). Shown are images obtained via TAMRA (3s exposure time), Hoechst (1/10s exposure time), Brightfield (1/500s exposure time), and the combined Overlay. The scale bar corresponds to 50 μm.

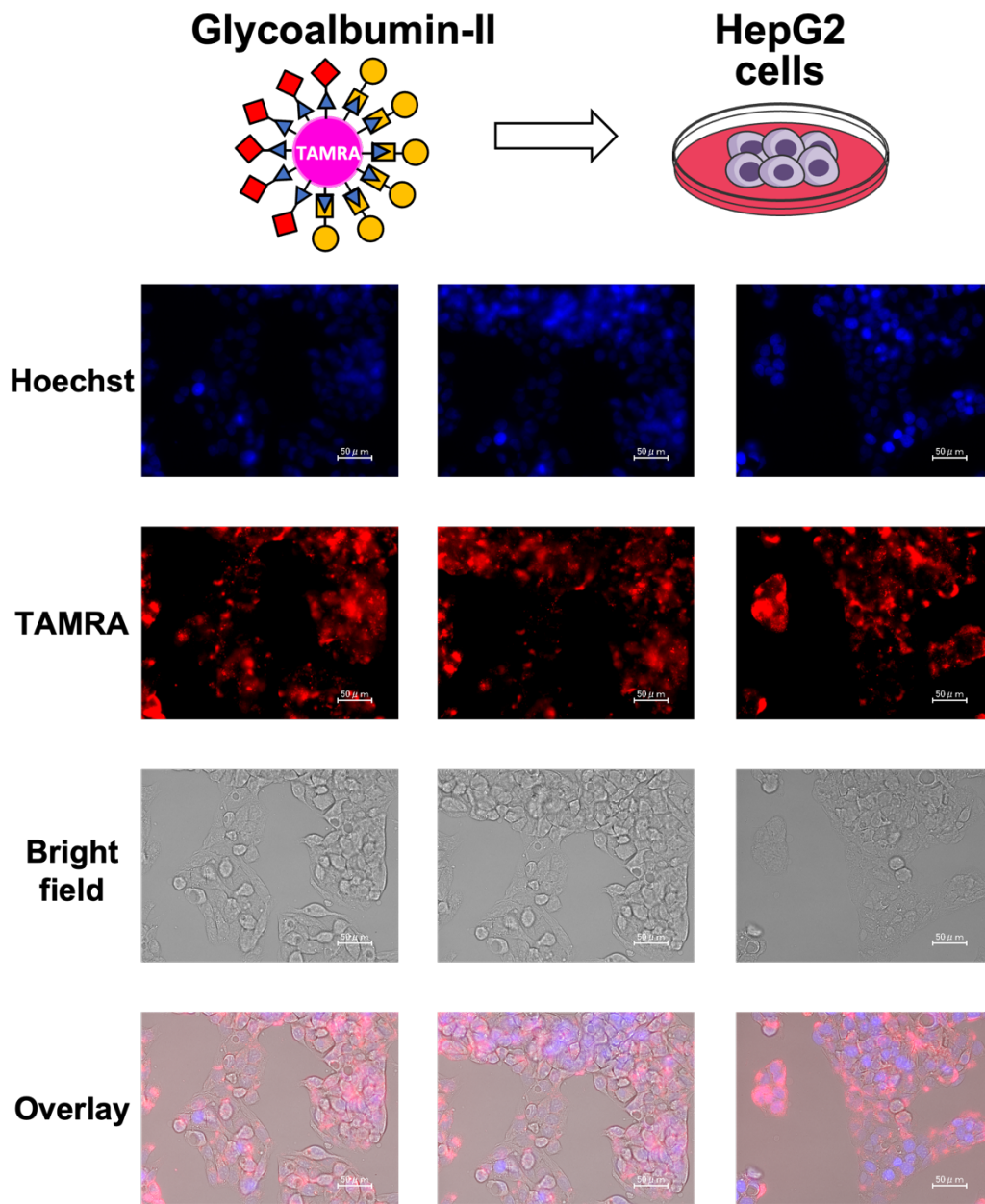


Figure S46. HepG2 cell imaging results following incubation (3 hours, 37 °C) with **TAMRA-linked Glycoalbumin-II** (1 μM) in cell medium (n = 3). Shown are images obtained via TAMRA (3s exposure time), Hoechst (1/10s exposure time), Brightfield (1/500s exposure time), and the combined Overlay. The scale bar corresponds to 50 μm .

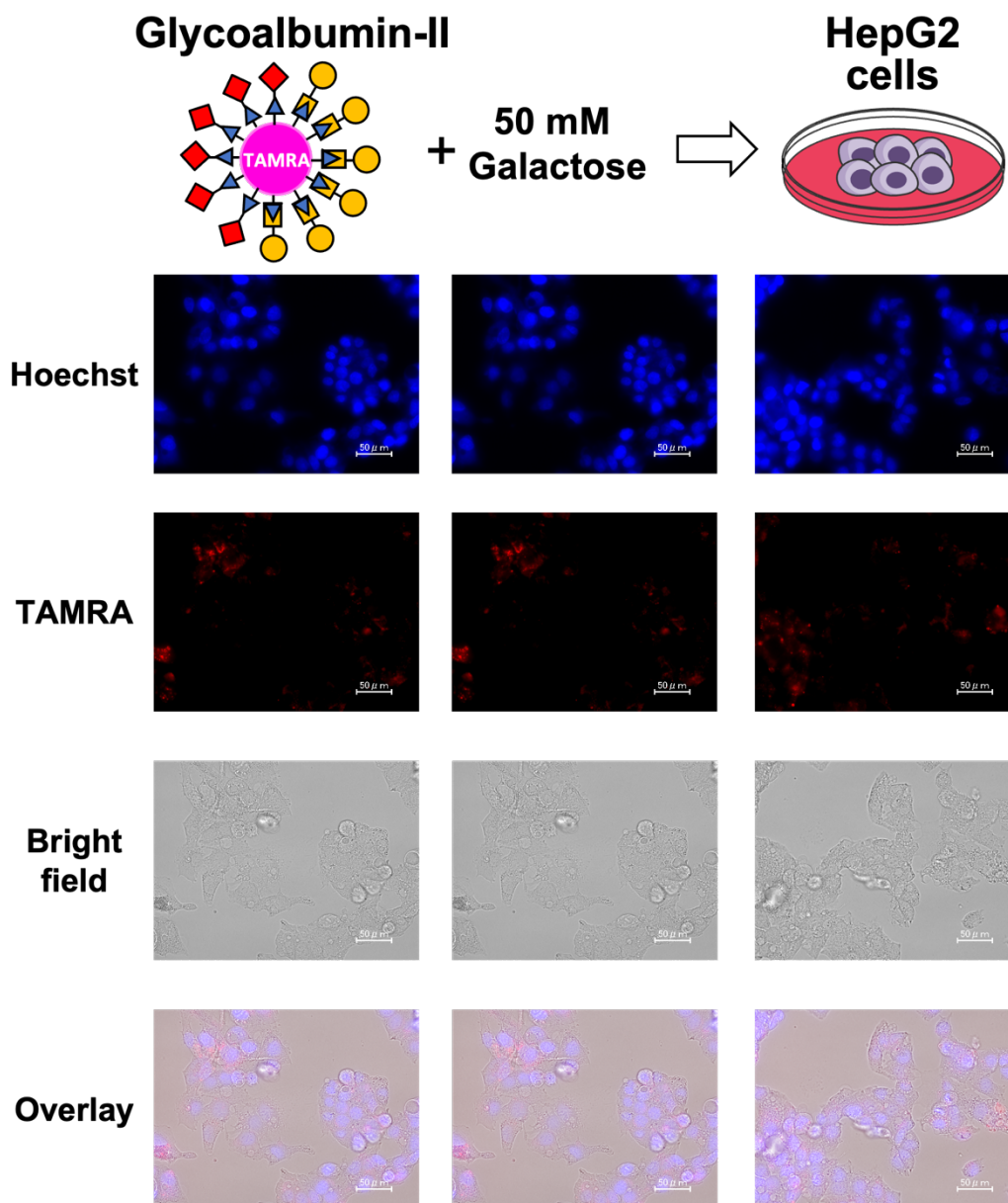


Figure S47. HepG2 cell imaging results following incubation (3 hours, 37 °C) with **TAMRA-linked Glycoalbumin-II** (1 μM) and 50 mM of galactose in cell medium ($n = 3$). Shown are images obtained via TAMRA (3s exposure time), Hoechst (1/10s exposure time), Brightfield (1/500s exposure time), and the combined Overlay. The scale bar corresponds to 50 μm .

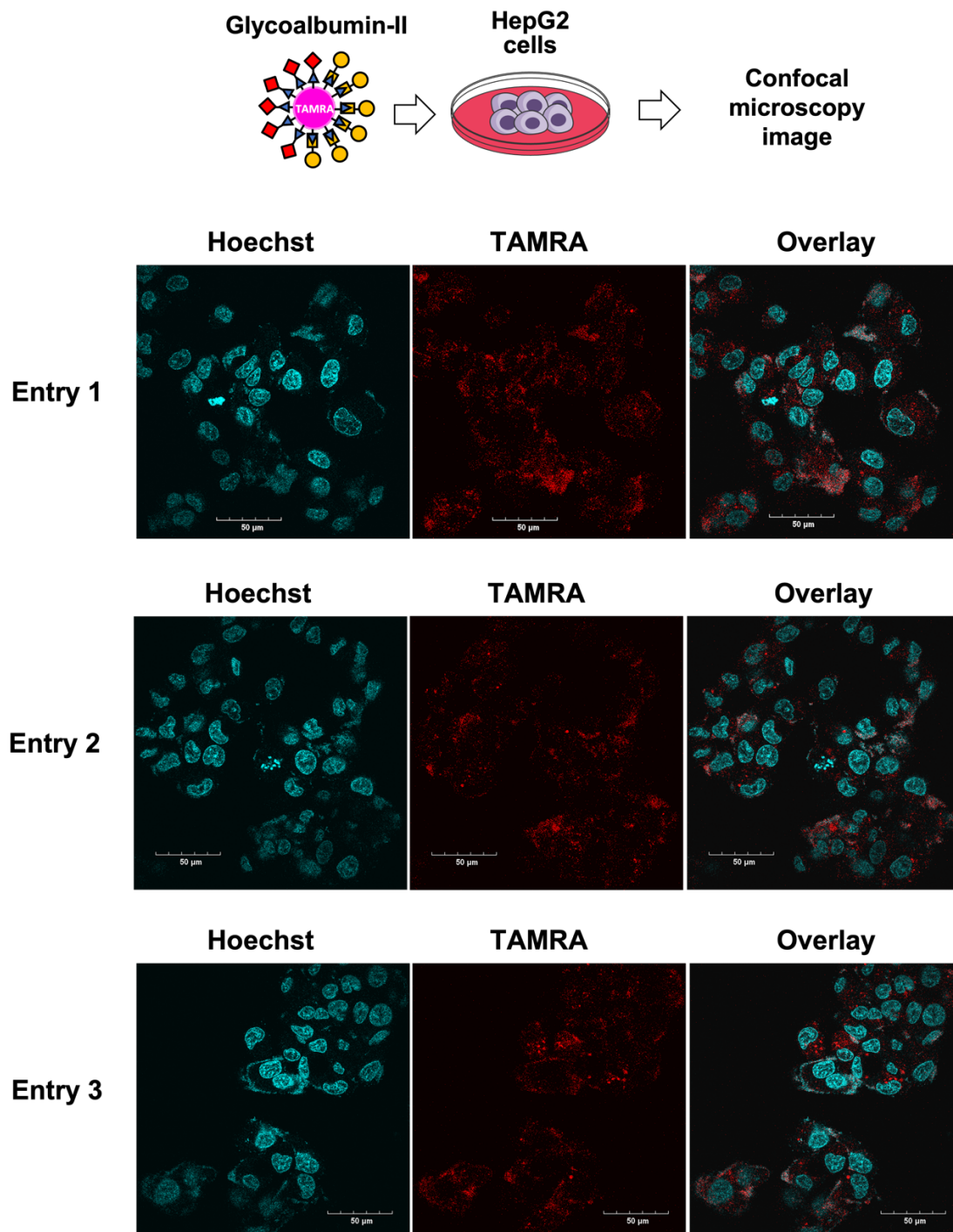


Figure S48. Confocal microscopy fluorescence images of HepG2 cells incubated with galactosylated TAMRA-linked Glycoalbumin-II (1 μM) at 37°C for 3 h. The shown images obtained at 60x magnification *via* Hoechst fluorescence (cell nuclei staining), TAMRA fluorescence (glycoalbumins), and the combined overlay. The scale bar corresponds to 50 μm. Three independent replicates were presented. The scale bar corresponds to 50 μm.

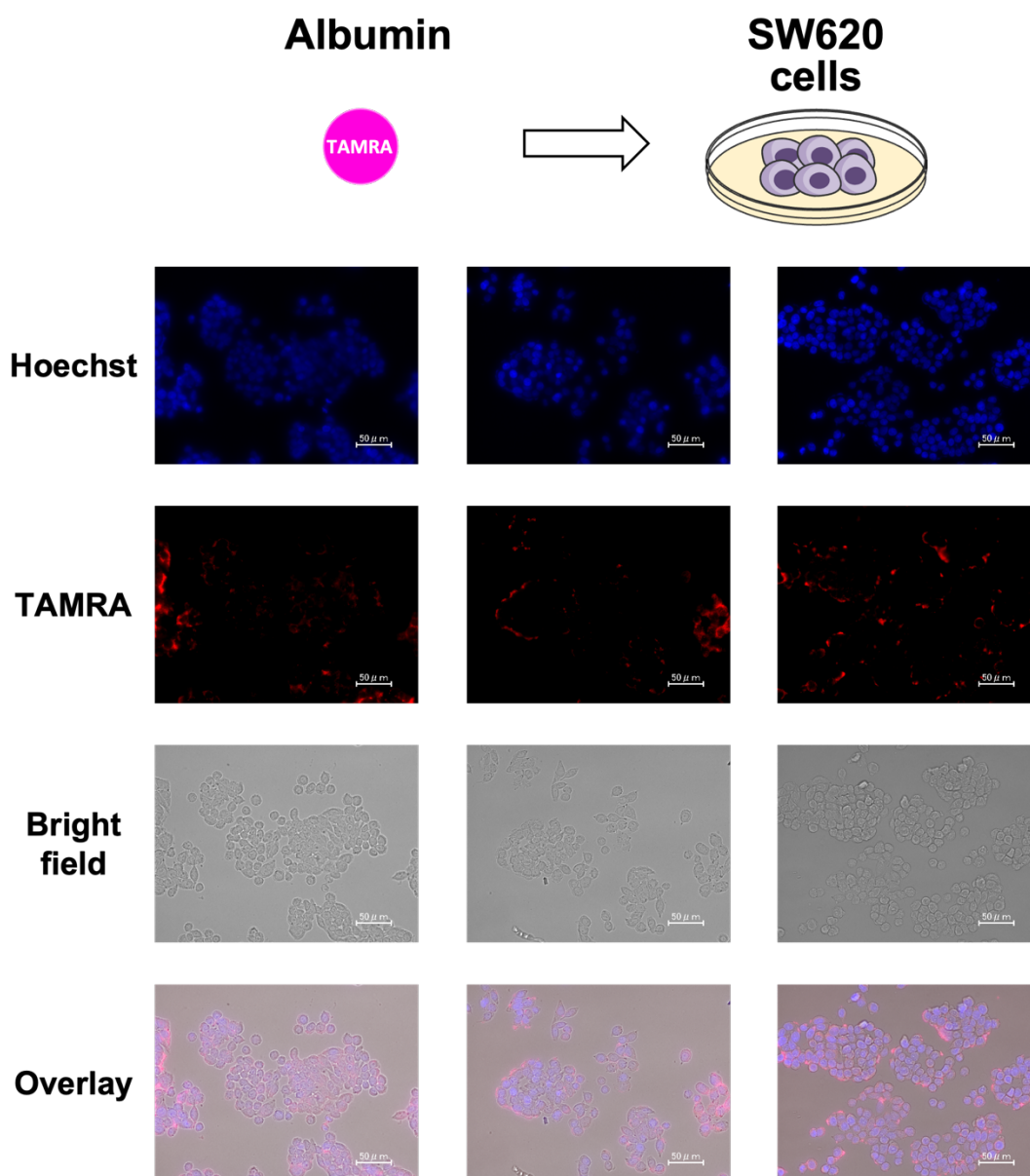


Figure S49. SW620 cell imaging results following incubation (30 min, 37 °C) with **TAMRA-linked albumin** (5 μ M) in cell medium (n = 3). Shown are images obtained via TAMRA (2s exposure time), Hoechst (1/10s exposure time), Brightfield (1/500s exposure time), and the combined Overlay. The scale bar corresponds to 50 μ m.

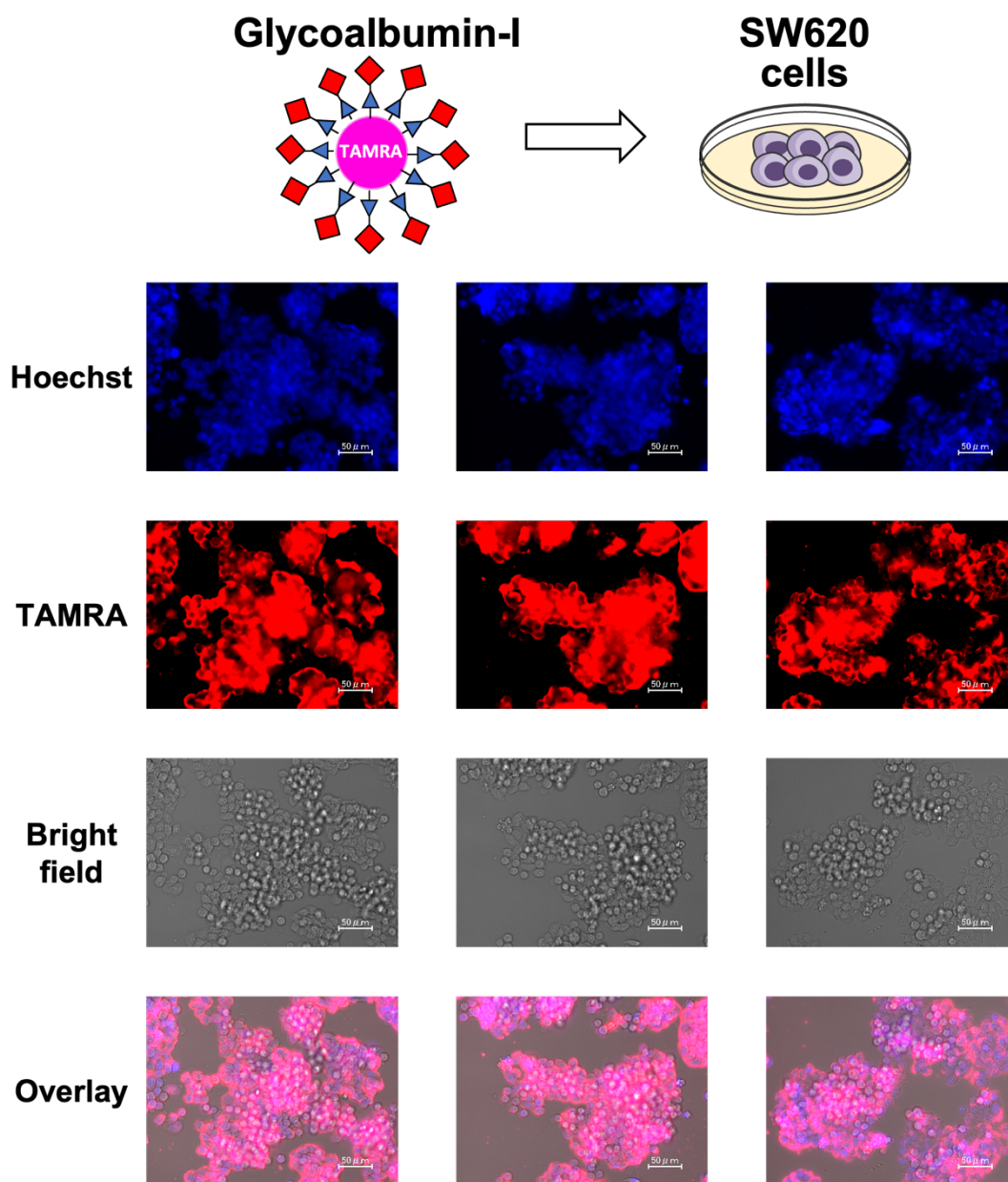


Figure S50. SW620 cell imaging results following incubation (30 min, 37 °C) with TAMRA-labeled glycoalbumin-I (5 μ M) in cell medium (n = 3). Shown are images obtained via TAMRA (2s exposure time), Hoechst (1/10s exposure time), Brightfield (1/500s exposure time), and the combined Overlay. The scale bar corresponds to 50 μ m.

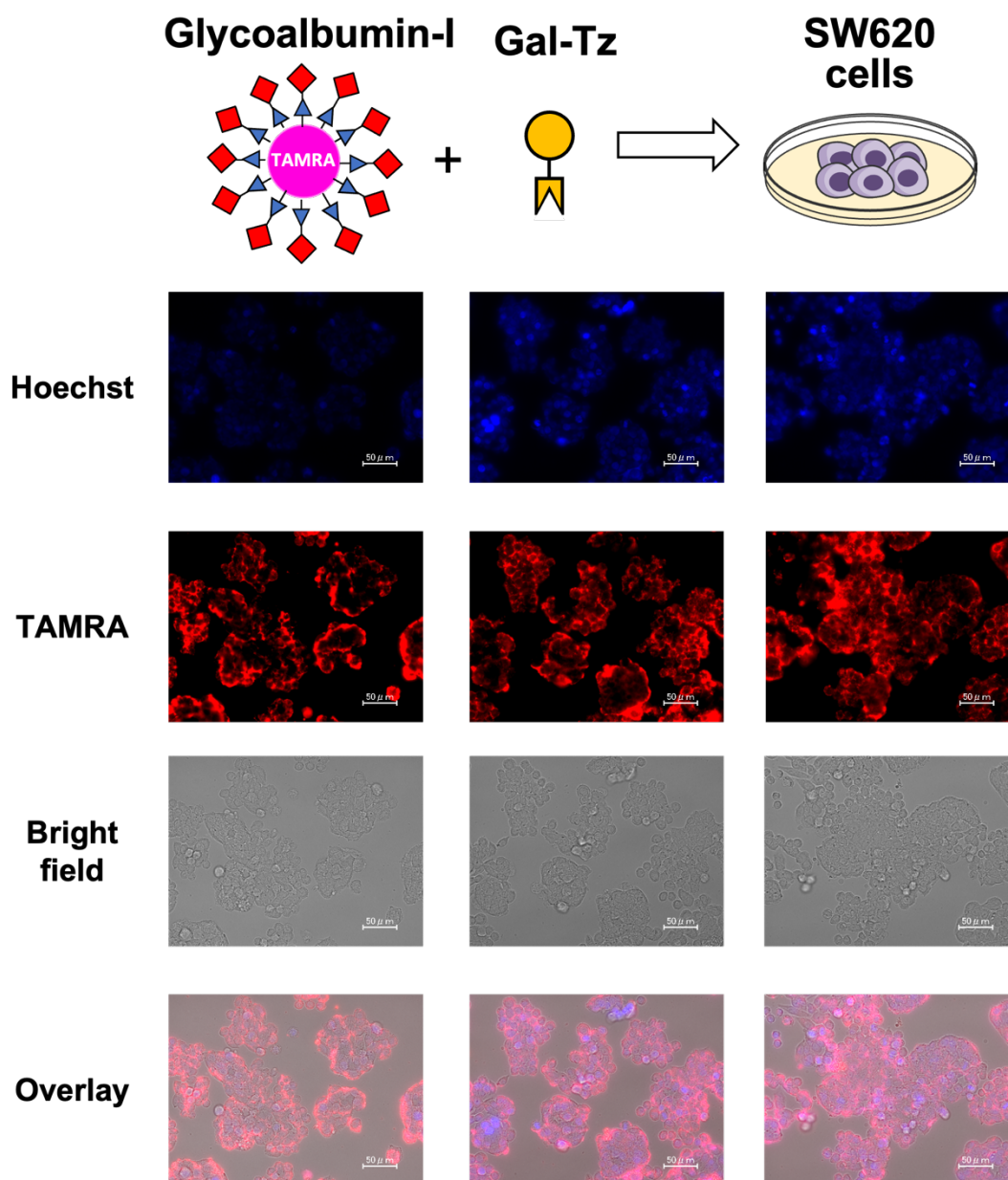


Figure S51. SW620 cell imaging results following incubation (30 min, 37 °C) with TAMRA-labeled glycoalbumin-I (5 μM) and Gal-Tz (300 μM) in cell medium (n = 3). Shown are images obtained via TAMRA (2s exposure time), Hoechst (1/10s exposure time), Brightfield (1/500s exposure time), and the combined Overlay. The scale bar corresponds to 50 μm.

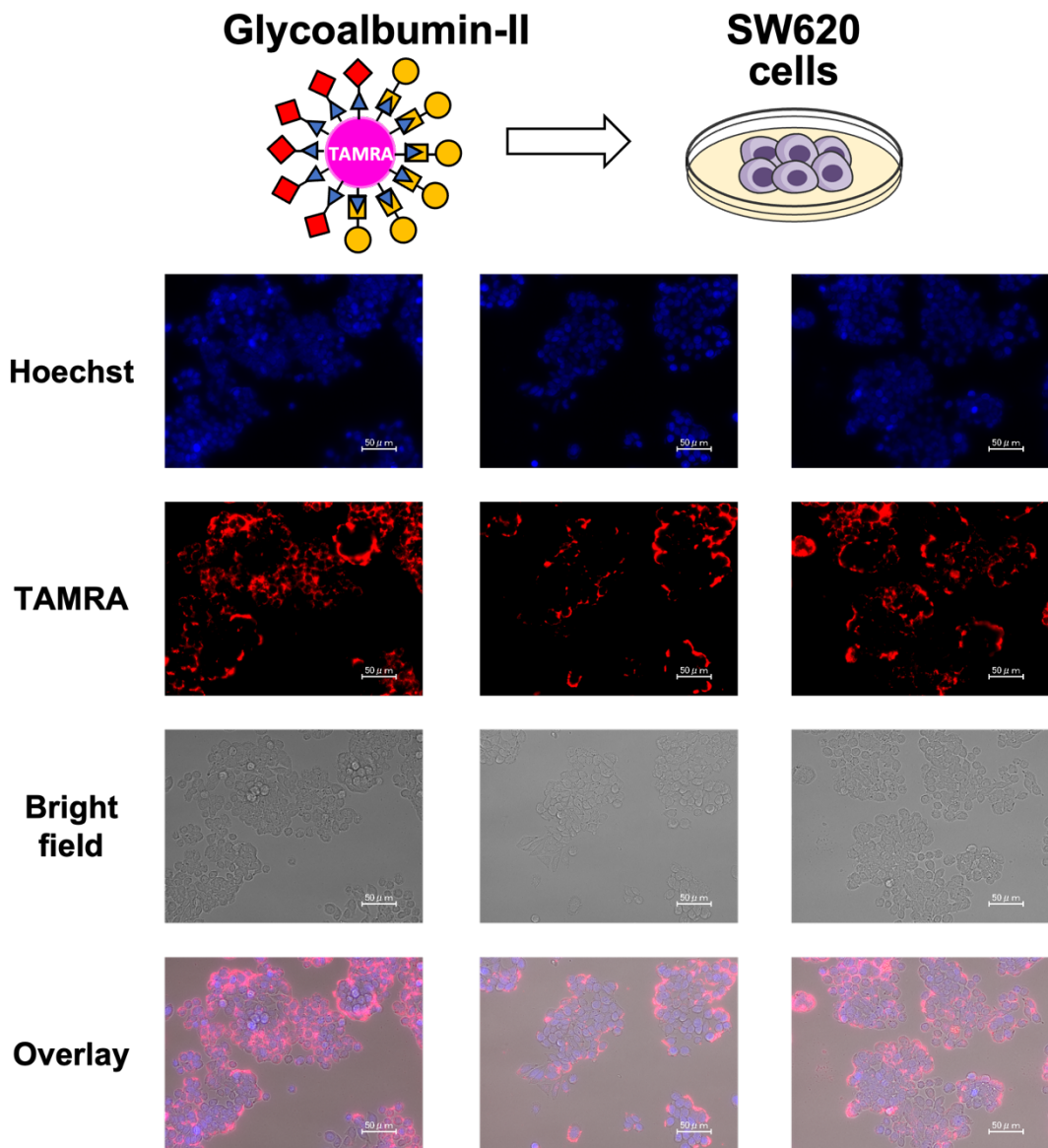


Figure S52. SW620 cell imaging results following incubation (30 min, 37 °C) with TAMRA-labeled **glycoalbumin-II** (5 μ M) in cell medium (n = 3). Shown are images obtained via TAMRA (2s exposure time), Hoechst (1/10s exposure time), Brightfield (1/500s exposure time), and the combined Overlay. The scale bar corresponds to 50 μ m.

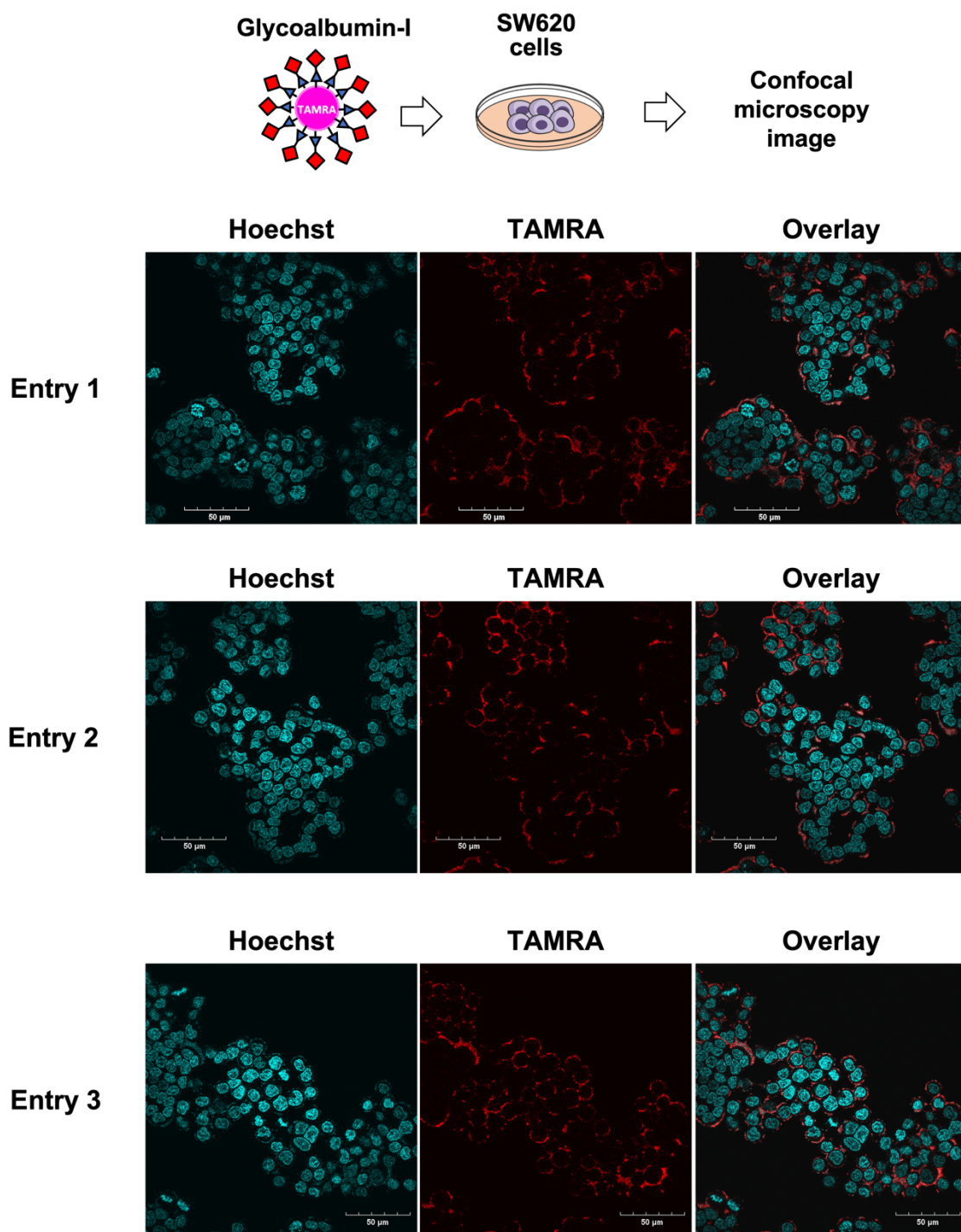


Figure S53. Confocal microscopy images of SW620 cells incubated with $\alpha(2,3)$ -sialylated glycoalbumin-I (5 μM) at 37°C for 30 min. The shown images obtained at 60x magnification via Hoechst fluorescence (cell nuclei staining), TAMRA fluorescence (glycoalbumins), and the combined Overlay. The scale bar corresponds to 50 μm .

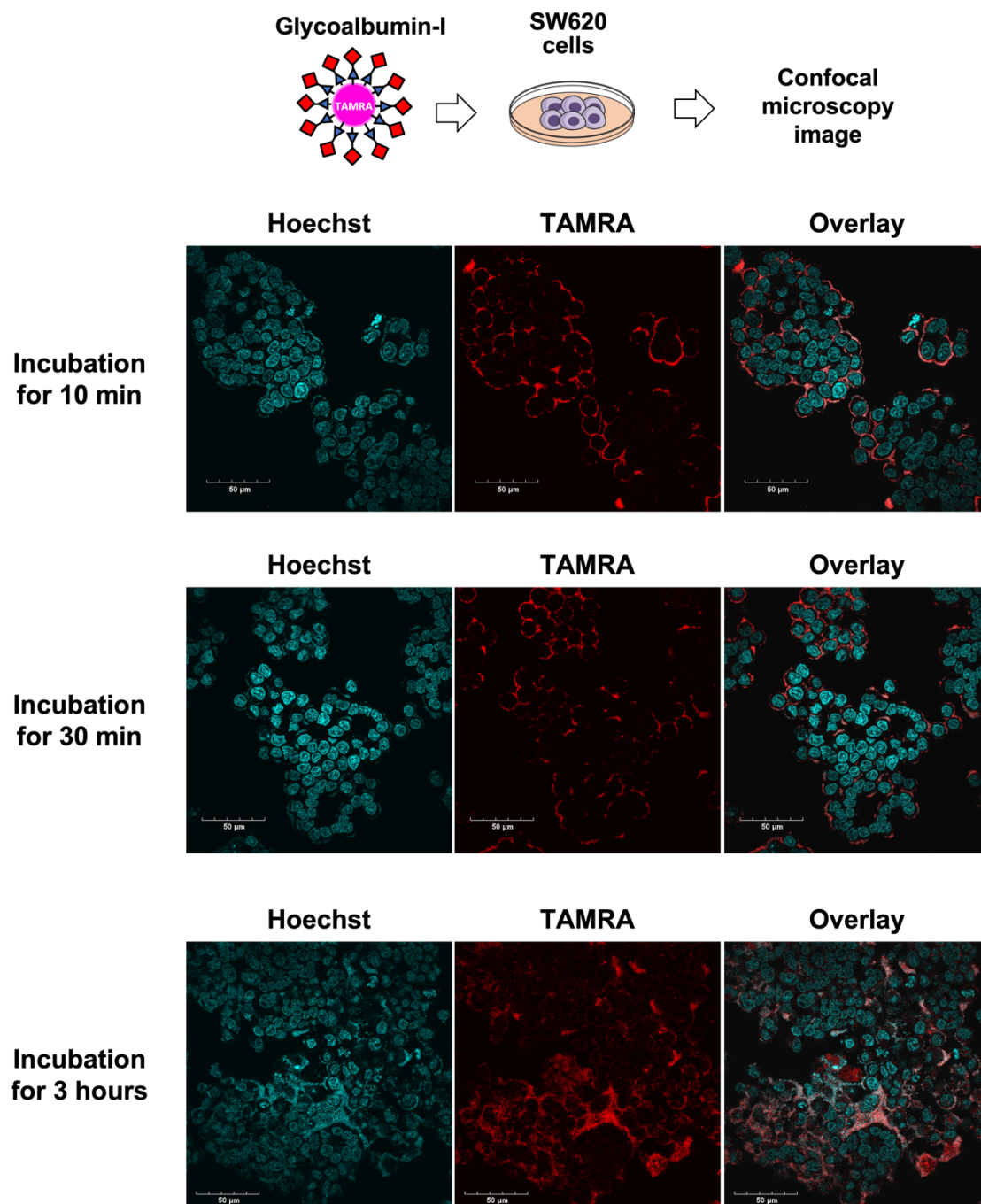


Figure S54. Confocal microscopy images of SW620 cells incubated with $\alpha(2,3)$ -sialylated glycoalbumin-I (5 μM) at 37°C for 10, 30 min and 3 hours. The shown images obtained at 60x magnification *via* Hoechst fluorescence (cell nuclei staining), TAMRA fluorescence (glycoalbumins), and the combined Overlay. The scale bar corresponds to 50 mm.

Animal studies

All animal experiments were carried out with approval by RIKEN's Animal Ethics Committee (W2019-2-049). In general, mice were anesthetized with 2.5% isoflurane in oxygen at a flow rate of 2.5-3.0 L/min.

Intravenous injection of FL750-linked glycoalbumin-I and Gal-Tz into mice

10-week-old female nude mice were randomly divided into 3 groups; **FL750-linked glycoalbumin-I** only (group 1, n = 5); co-injection of **FL750-linked glycoalbumin-I** and **Gal-Tz** (group 2, n = 5); **FL750-linked glycoalbumin-II** only (group 3, n = 5). The **FL750-linked glycoalbumin-I** and **-II** were prepared at a concentration of 1.5nmol/100ml stock solution in saline. The **Gal-Tz** was prepared at a concentration of 500nmol/100ml stock solution in saline. For each mouse, total injection volume was adjusted to 200 μ l. By intravenous administration, each mouse in group 1 received **FL750-linked glycoalbumin-I** (100 ml stock solution), followed by 100 ml saline 10 min later; each mouse in group 2 received **FL750-linked glycoalbumin-I** (100 ml stock solution), followed by **Gal-Tz** (100 ml stock solution) 10 min later; each mouse in group 3 received **FL750-linked glycoalbumin-II** (100 ml stock solution), followed by 100 ml saline 10 min later. After treatment, fluorescence whole body imaging of mice (dorsal side) by using a Clairvivo OPT kinetics fluorescence imager (Shimadzu, Japan) was immediately performed. The mice were exposed at the same shooting time and intensity. To image the mice, the excitation and emission wavelengths of fluorescence were adjusted to 785 and 849 nm, respectively and a 5-s exposure setting was used. After 3 h from treatment, fluorescence imaging with the abdomen of the mouse split open was performed. Then, mice were sacrificed, and fluorescence imaging of each organ was performed. Fluorescence was calculated within an arbitrarily defined region of interest (ROI).

SW620 bearing mice xenograft models

The SW620 cancer xenograft tumors were established in 6-week-old female nude mice (BALB/cAJcl-nu/nu) by subcutaneous injection of cells (approximately 1.1×10^6 cells in 100 μ l of cold 50% Matrigel in un-nourished DME) into the right shoulder. Tumor growth was monitored while mice were housed in a facility with controlled temperature, salinity, aeration, and a standard 12h light / 12 h dark cycle. When SW620 tumors reached 700-1200 mm³, the mice were ready to be used for the experiment of translocating a a(2,3)sialylated-glycoalbumin from the tumor to the intestine.

Intratumoral injection of FL750-linked glycoalbumin-I and Gal-Tz into SW620 tumor-bearing mice

SW620 bearing mice were randomly divided into 3 groups; **FL750-linked glycoalbumin-I** only

(group 1, n = 5); co-injection of FL750-linked **glycoalbumin-I** and **Gal-Tz** (group 2, n = 5); FL750-linked **glycoalbumin-II** only (group 3, n = 5). The FL750-linked **glycoalbumin-I** and **-II** were prepared at a concentration of 0.5nmol/10ml stock solution in saline. The **Gal-Tz** was prepared at a concentration of 200nmol/10ml stock solution in saline. For each mouse, total injection volume was adjusted to 20 μ l. By intratumoral administration, each mouse in group 1 received FL750-linked **glycoalbumin-I** (10 ml stock solution), followed by 10 ml saline 10 min later; each mouse in group 2 received FL750-linked **glycoalbumin-I** (10 ml stock solution), followed by **Gal-Tz** (10 ml stock solution) 10 min later; each mouse in group 3 received FL750-linked **glycoalbumin-II** (10 ml stock solution), followed by 10 ml saline 10 min later. After treatment, fluorescence whole body imaging of mice (dorsal side) by using a Clairvivo OPT kinetics fluorescence imager (Shimadzu, Japan) was immediately performed. The mice were exposed at the same shooting time and intensity. To image the mice, the excitation and emission wavelengths of fluorescence were adjusted to 785 and 849 nm, respectively and a 5-s exposure setting was used. After 5 h from treatment, mice were sacrificed, and fluorescence imaging of each organ was performed. Fluorescence was calculated within an arbitrarily defined region of interest (ROI).

Animal imaging studies

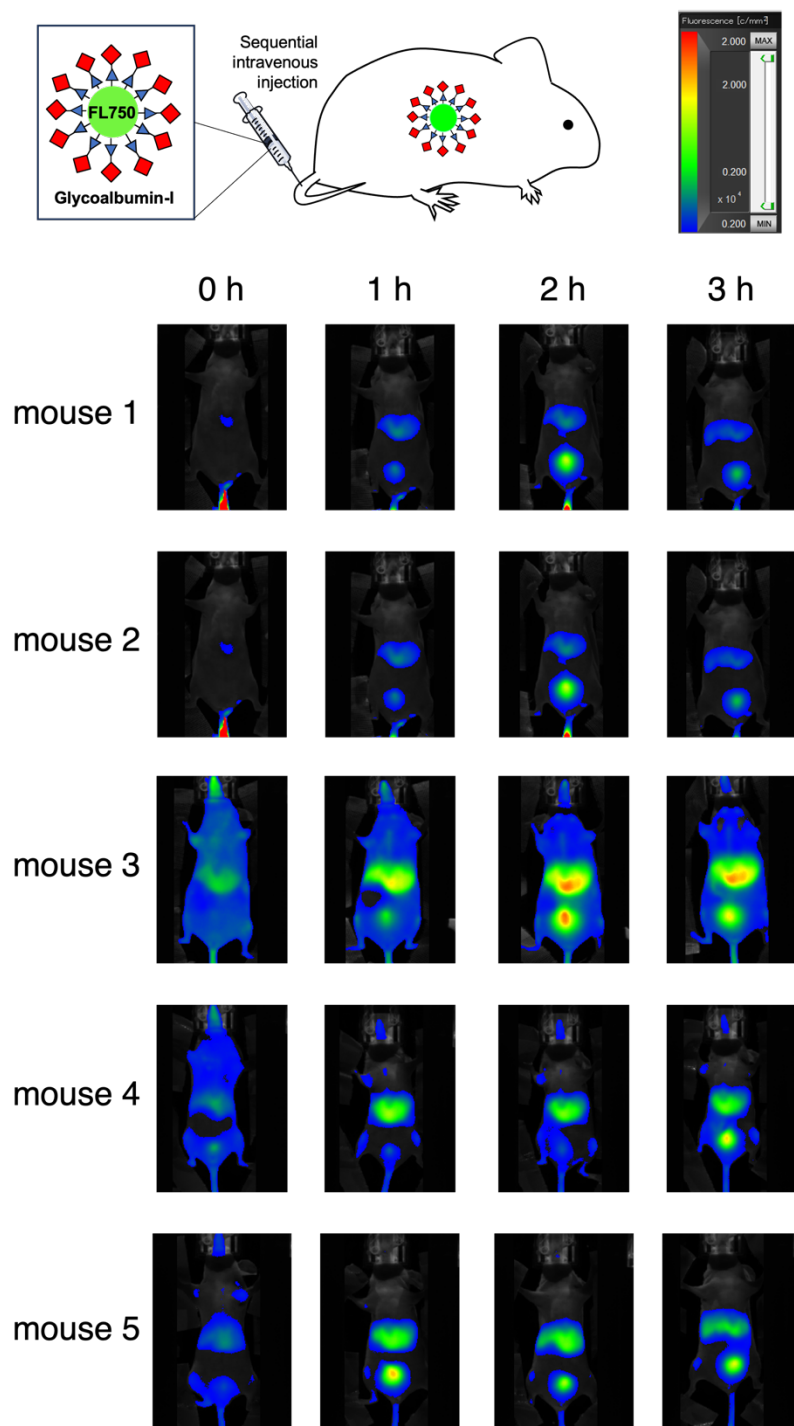


Figure S55. Replicate data ($n = 5$) for whole-body fluorescence imaging of mice (dorsal side) at 0 to 3 hours following intravenous injection of **glycoalbumin-I**. The fluorescence intensity ranged from 0.2 to 2.0×10^4 .

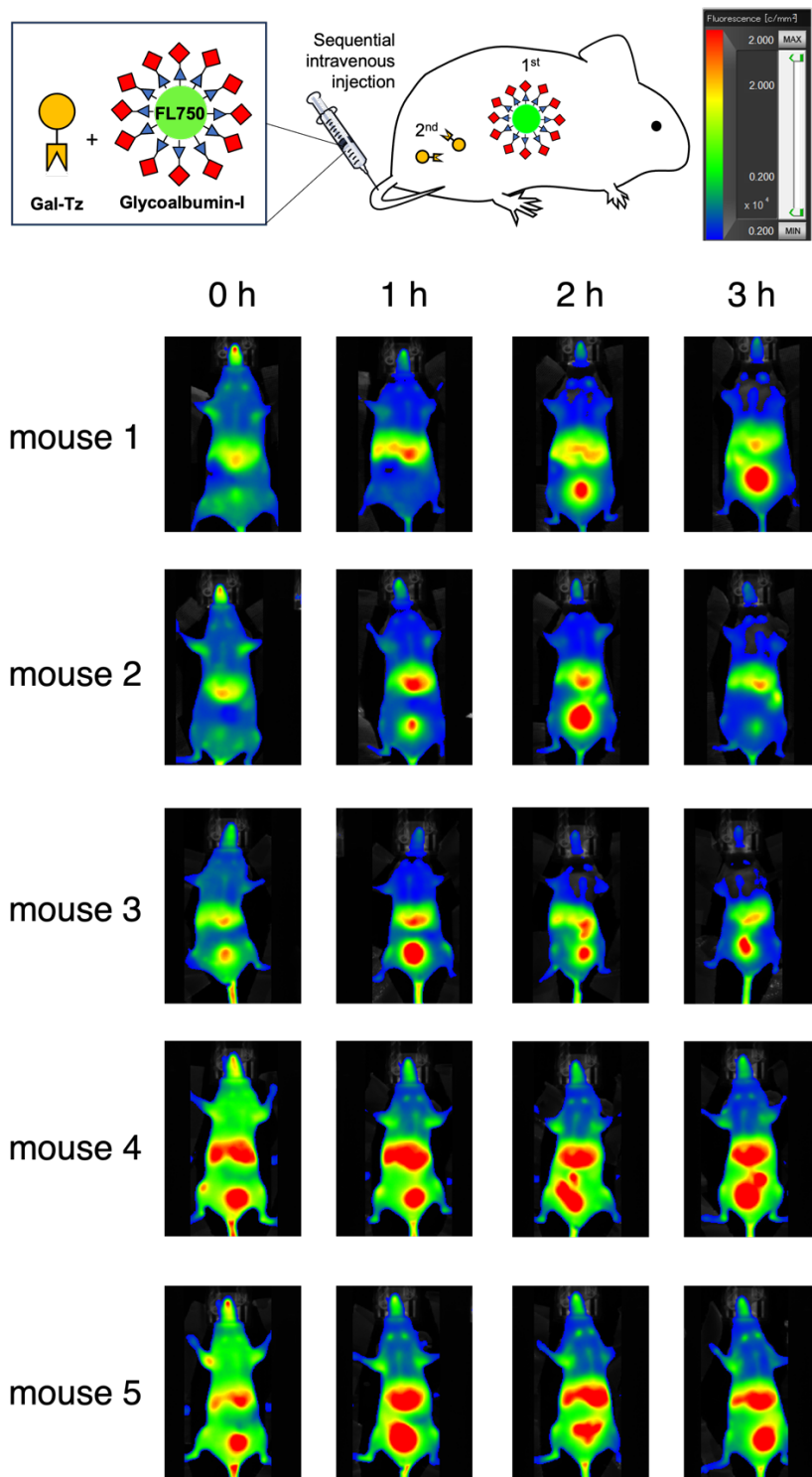


Figure S56. Replicate data ($n = 5$) for whole-body fluorescence imaging of mice (dorsal side) at 0 to 3 hours following intravenous co-injection of glycoalbumin-I and Gal-Tz. The fluorescence intensity ranged from 0.2 to 2.0×10^4 .

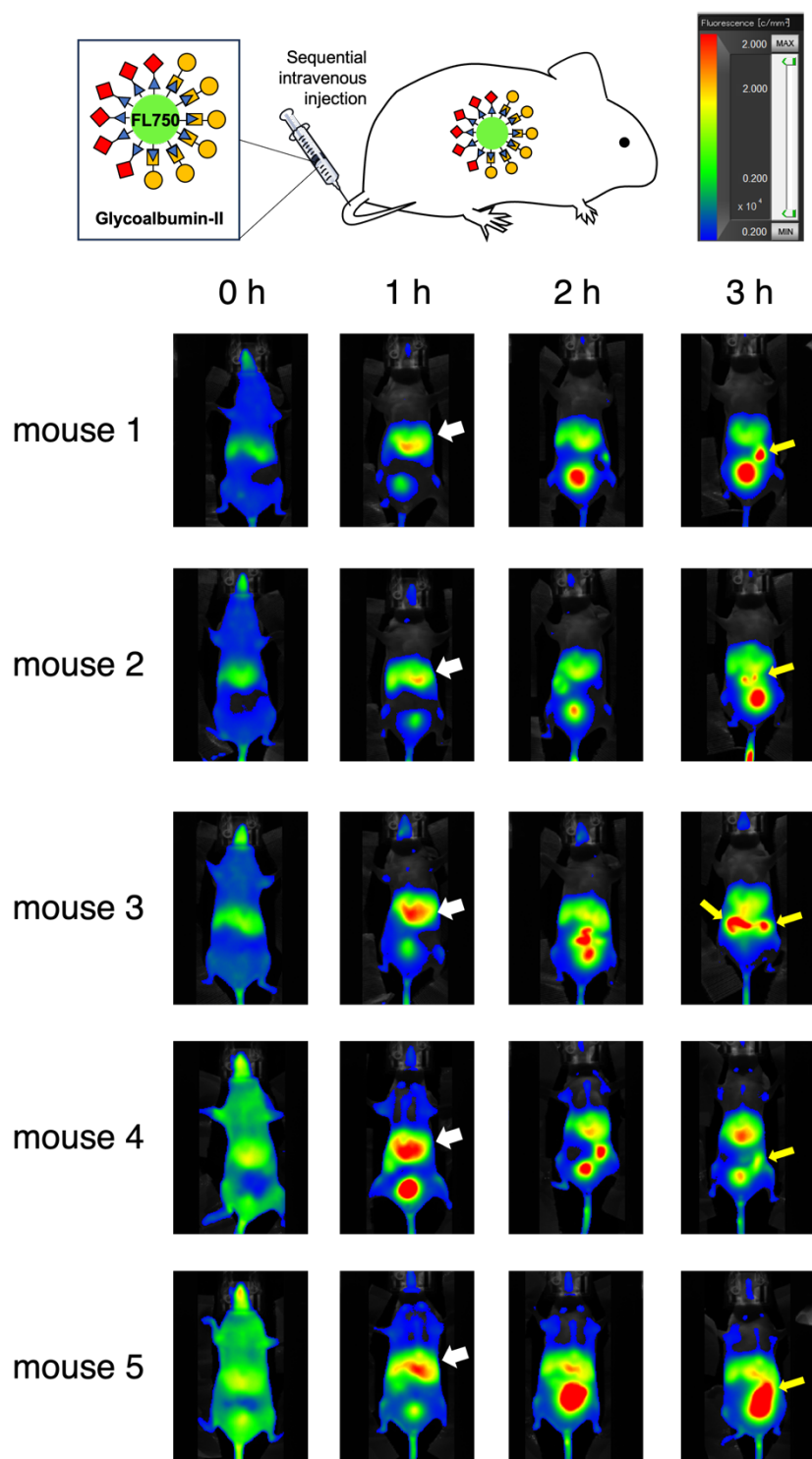


Figure S57. Replicate data ($n = 5$) for whole-body fluorescence imaging of mice (dorsal side) at 0 to 3 hours following intravenous co-injection of **glycoalbumin-II**. The fluorescence intensity ranged from 0.2 to 2.0×10^4 . White arrow: liver; yellow arrow: intestine.

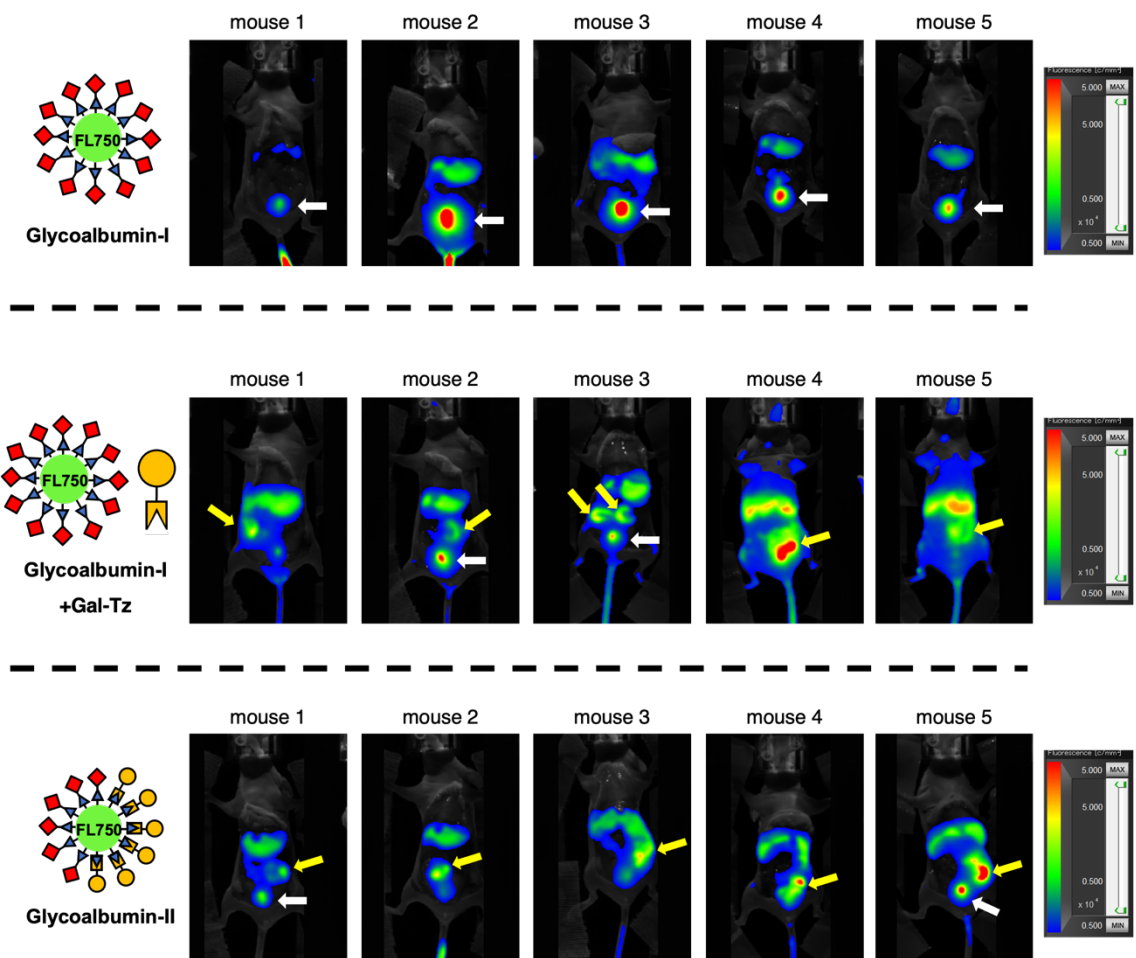


Figure S58. Replicate data (n = 5) for whole-body fluorescence imaging of mice (abdominal side, open) at 3 hours following intravenous co-injection of **glycoalbumin-I** and **Gal-Tz**. As control groups, **glycoalbumin-I** or **-II** only was used. White arrow: excretion to urinary bladder; yellow arrow: excretion to intestine. The fluorescence intensity ranged from 0.5 to 5.0×10^4 .

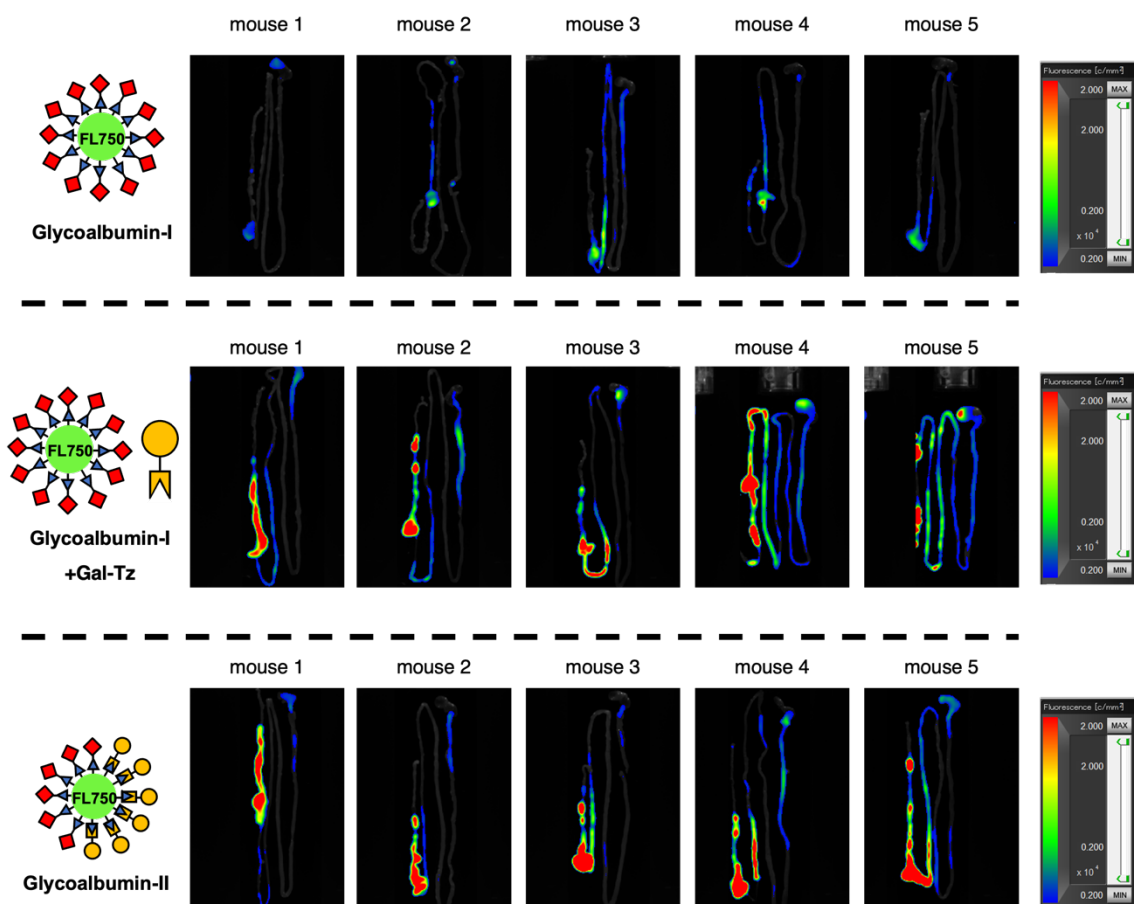


Figure S59. Replicate data ($n = 5$) for fluorescence imaging of the collected intestines in mice at 3 hours following intravenous co-injection of **glycoalbumin-I** and **Gal-Tz**. As control groups, **glycoalbumin-I** or **-II** only was used. The fluorescence intensity ranged from 0.2 to 2.0×10^4 .

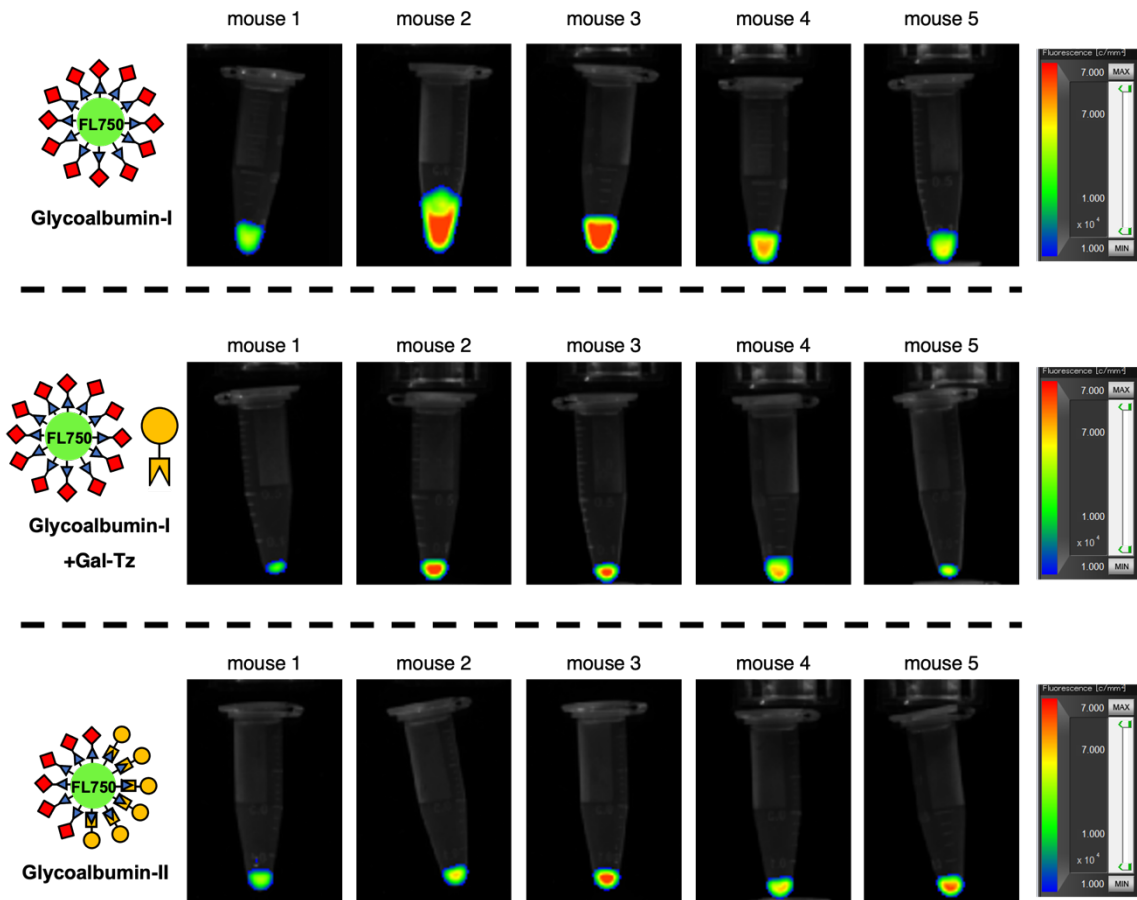


Figure S60. Replicate data ($n = 5$) for fluorescence images of the collected urine samples from the mice at 3 hours following intravenous co-injection of **glycoalbumin-I** and **Gal-Tz**. As control groups, **glycoalbumin-I** or **-II** only was used. The fluorescence intensity ranged from 1.0 to 7.0×10^4 .

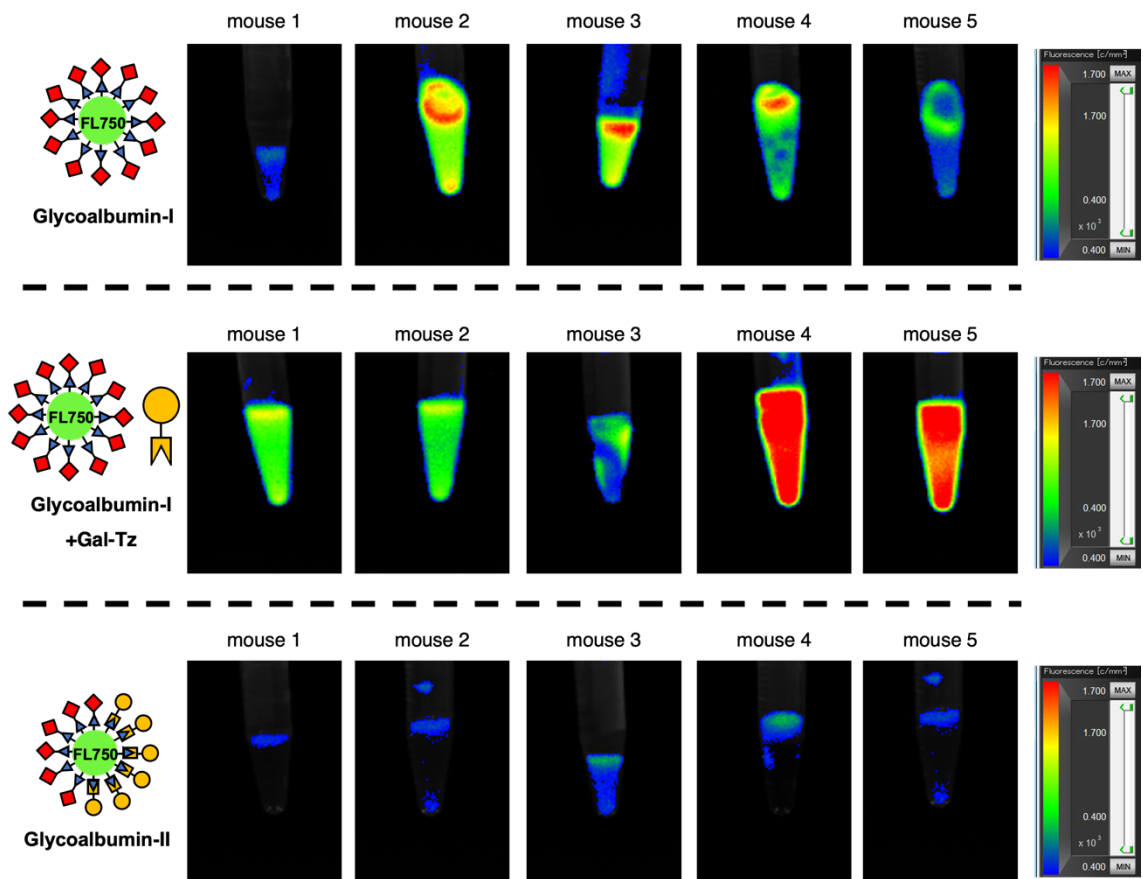
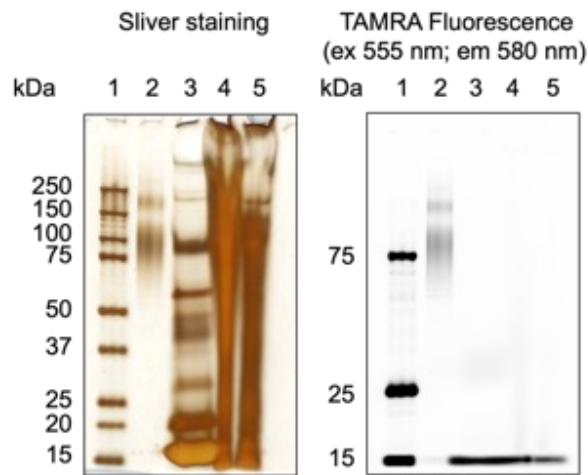


Figure S61. Replicate data ($n = 5$) for fluorescence images of the collected blood samples from the mice at 3 hours following intravenous co-injection of **glycoalbumin-I** and **Gal-Tz**. As control groups, **glycoalbumin-I** or **-II** only was used. The fluorescence intensity ranged from 0.4 to 1.7×10^3 .



Lane 1 protein MW standard

Lane 2 **FL750-Glycoalbumin-II**

Lane 3 urine

Lane 4 extract from the cecum

Lane 5 extract from inner feces of the colon

Figure S62. Mice received the **TAMRA-linked Glycoalbumin-II** (1.5 nmol in 200 μ L saline) alone. The indicated compounds were injected intravenously into 8–10-week-old BALB/cAJcl-nu/nu mice ($n = 1$). After 3 hours, the mice were dissected, and SDS-PAGE was used to analyze the urine, and the PBS buffer extractions from the cecum and inner feces of the colon. SDS-PAGE gel images showing silver staining (left panel) and TAMRA fluorescence (right panel) for the same gel. Lane 1 is protein MW standards. Lane 2 is the TAMRA-linked **Glycoalbumin-II**. Lane 3 is the urine. Lane 4 is the extraction from the cecum. Lane 5 is the extraction from inner feces of the colon. The ChemiDocTM Touch (Bio-Rad) was used to record the TAMRA fluorescent images using a Blot/UV/Stain-free tray with Pro-Q Diamond setting. The TAMRA fluorescent images were obtained at a 7.0 s exposure setting.

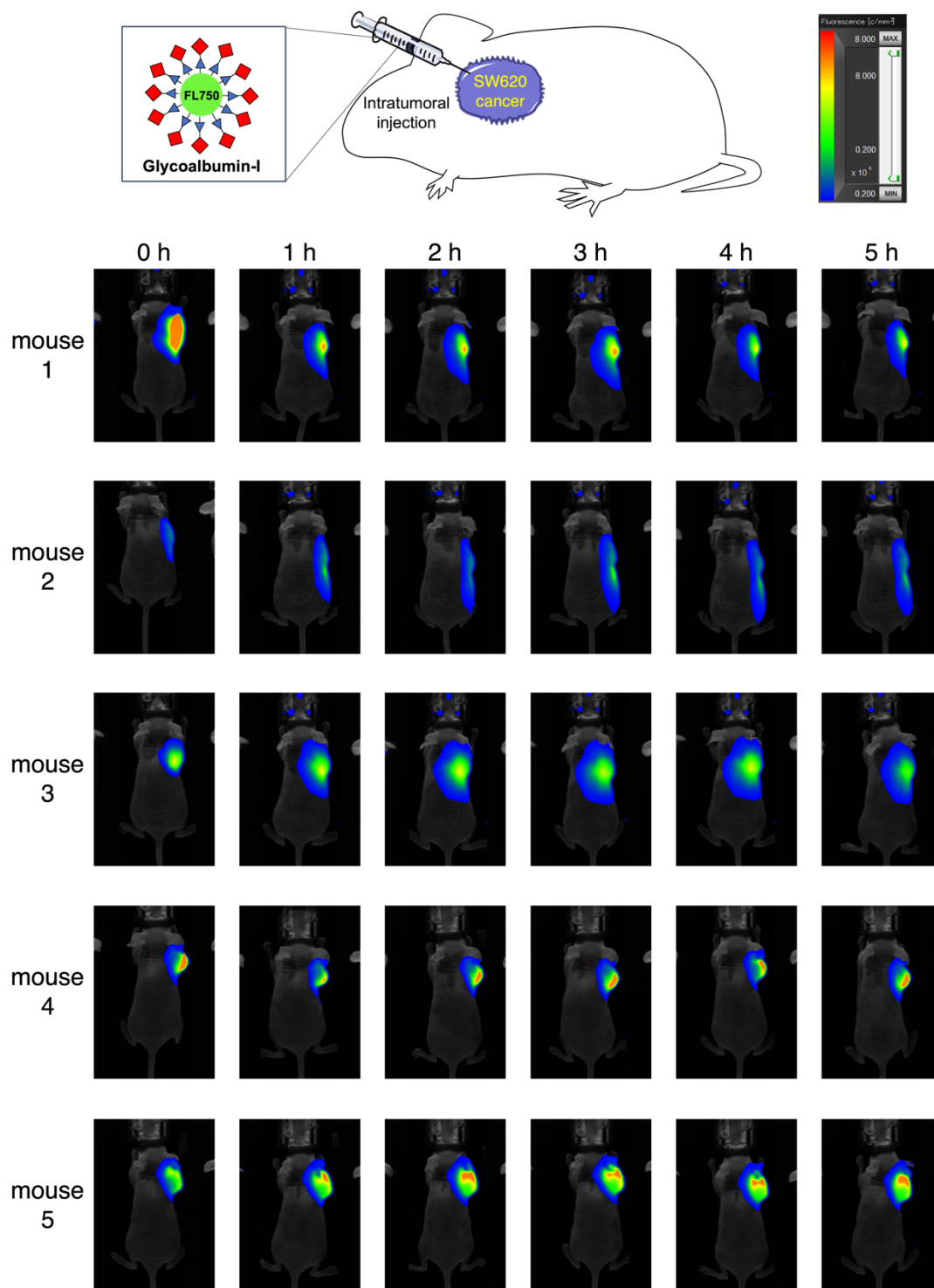


Figure S63. Replicate data ($n = 5$) for whole-body fluorescence imaging of the SW620 bearing tumor mice (dorsal side) at 0 to 5 hours following intratumoral injection of **glycoalbumin-I**. The fluorescence intensity ranged from 0.2 to 8.0×10^4 .

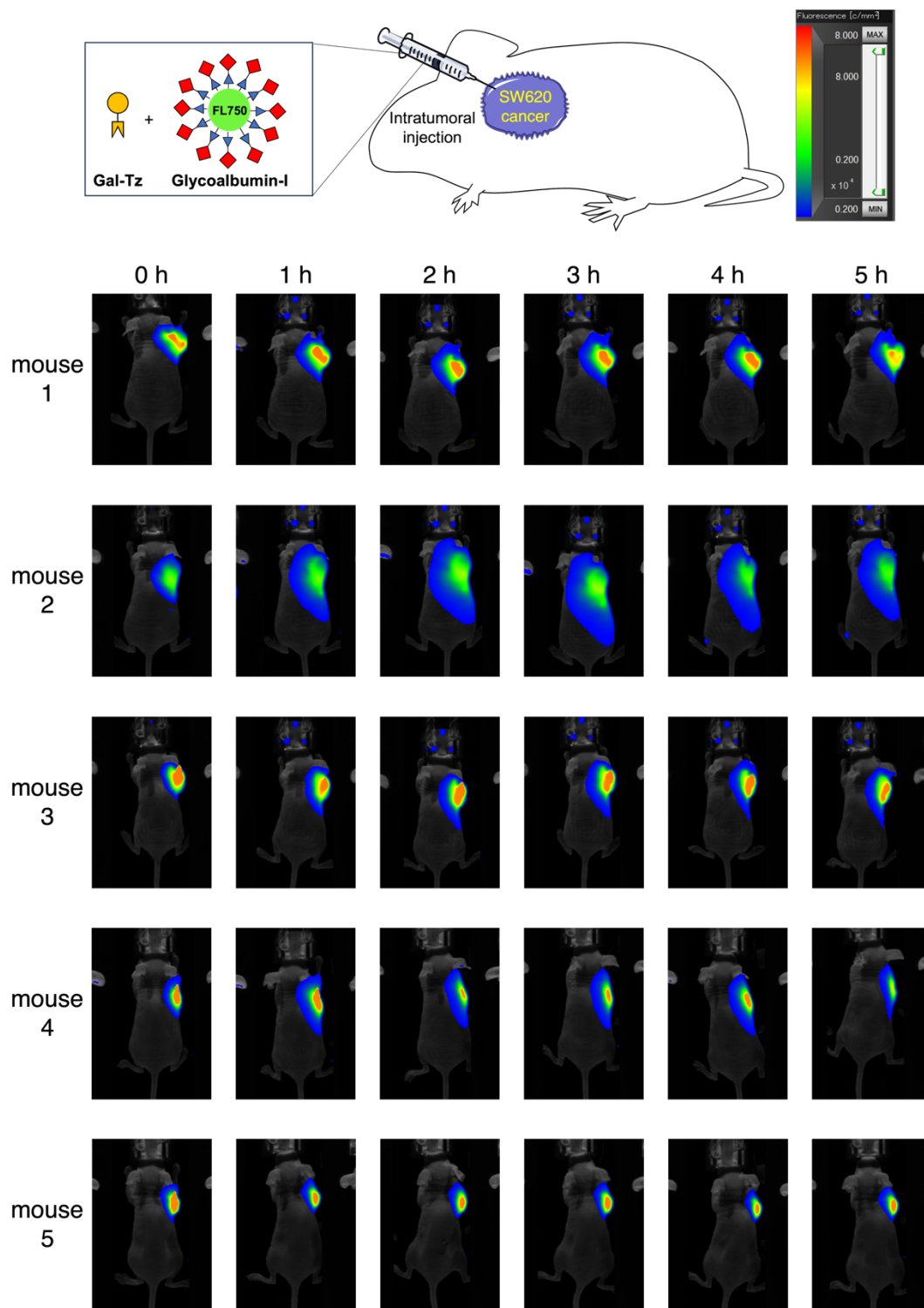


Figure S64. Replicate data ($n = 5$) for whole-body fluorescence imaging of the SW620 bearing tumor mice (dorsal side) at 0 to 5 hours following intratumoral injection of glycoalbumin-I and Gal-Tz. The fluorescence intensity ranged from 0.2 to 8.0×10^4 .

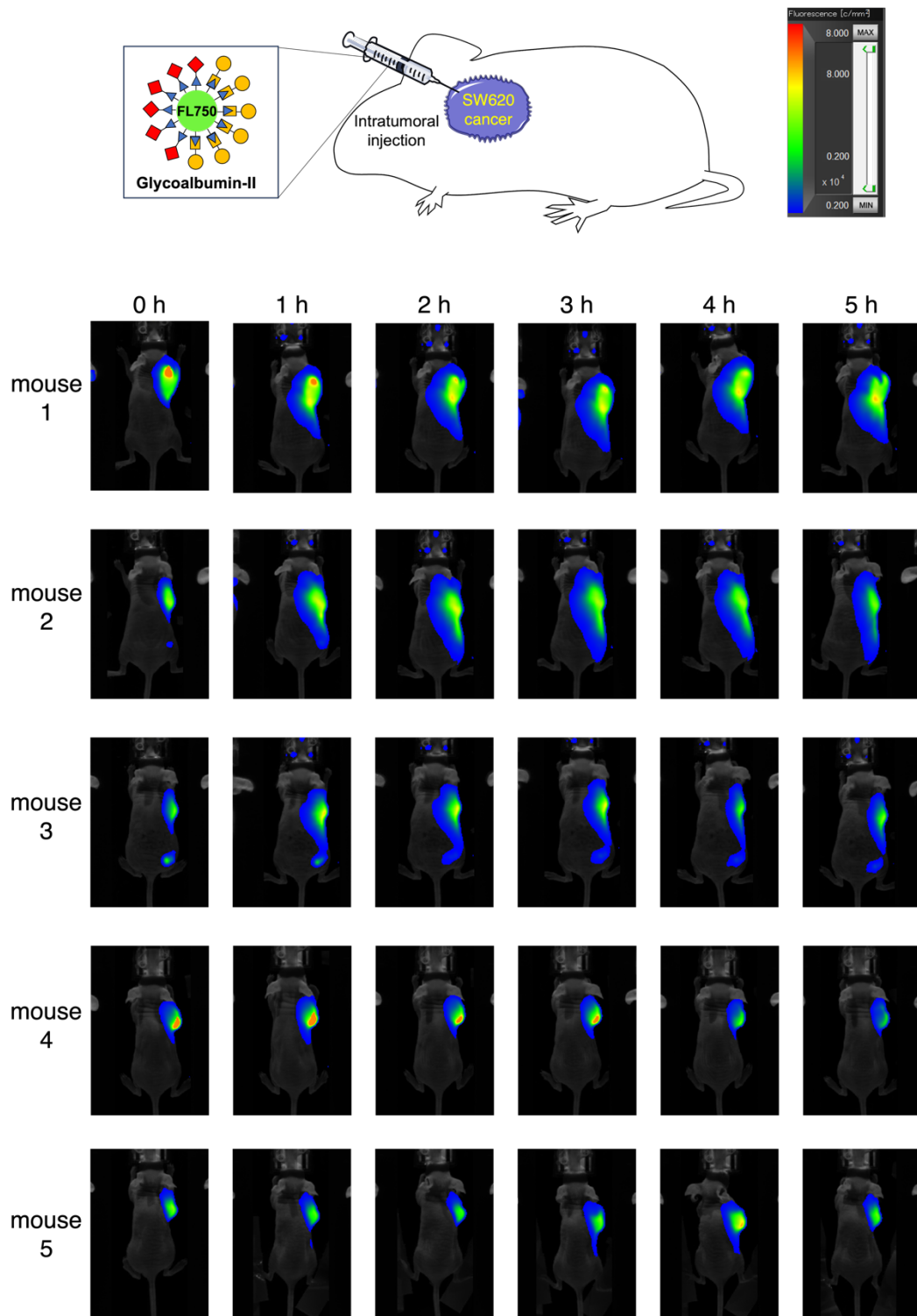


Figure S65. Replicate data ($n = 5$) for whole-body fluorescence imaging of the SW620 bearing tumor mice (dorsal side) at 0 to 5 hours following intratumoral injection of **glycoalbumin-II**. The fluorescence intensity ranged from 0.2 to 8.0×10^4 .

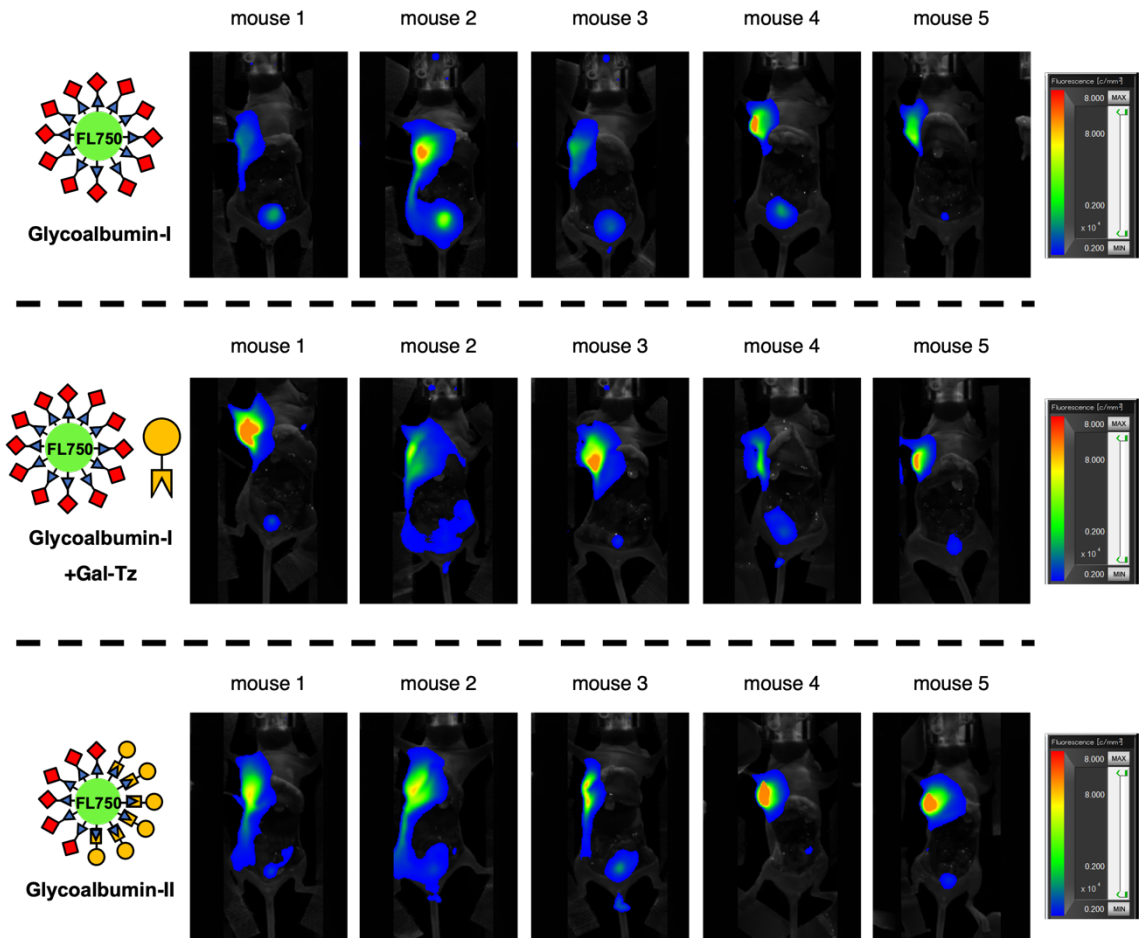


Figure S66. Replicate data ($n = 5$) for whole-body fluorescence imaging of the SW620 bearing mice (abdominal side, open) at 5 hours following intratumoral injection of **glycoalbumin-I** and **Gal-Tz**. As control groups, **glycoalbumin-I** or **-II** only was used. The fluorescence intensity ranged from 0.2 to 8.0×10^4 .

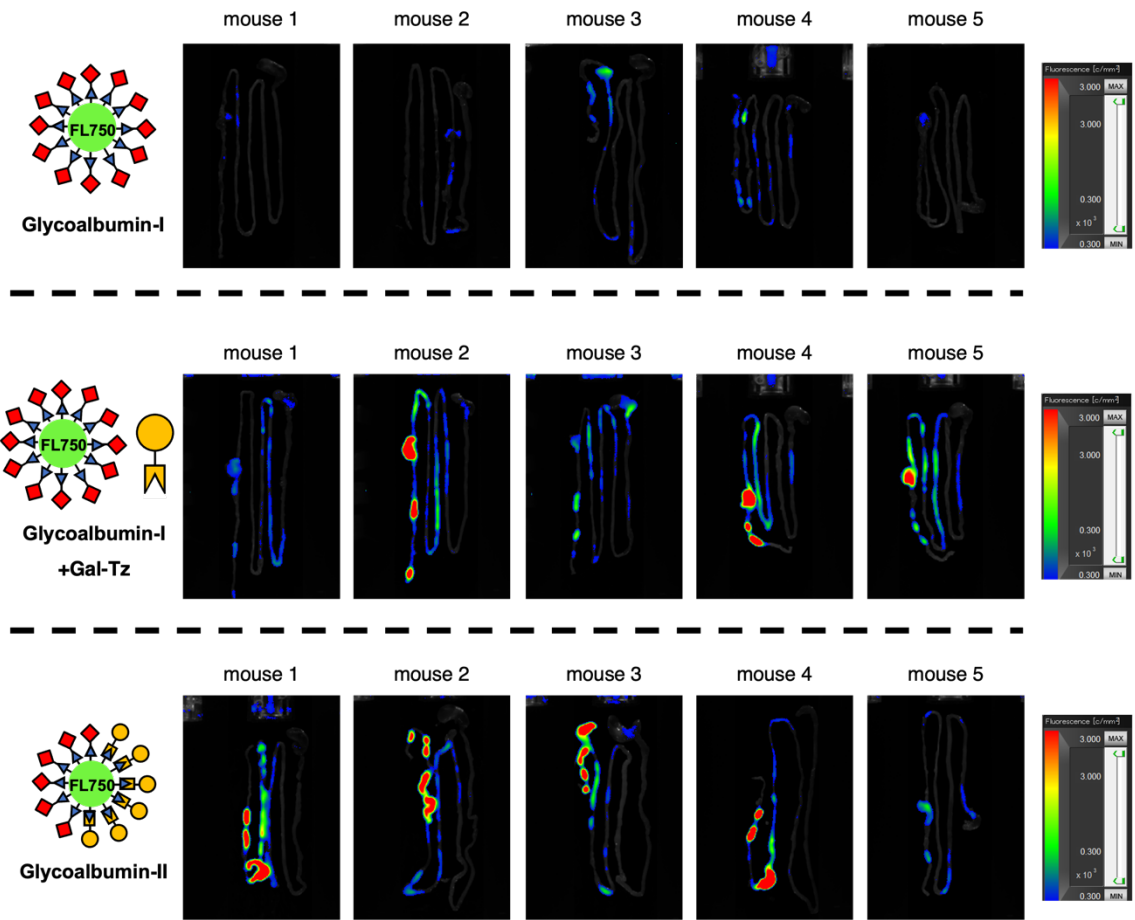


Figure S67. Replicate data ($n = 5$) for fluorescence images of the collected intestines from the mice at 5 hours following intratumoral co-injection of **glycoalbumin-I** and **Gal-Tz**. As control groups, **glycoalbumin-I** or **-II** only was used. The fluorescence intensity ranged from 0.3 to 3.0×10^3 .

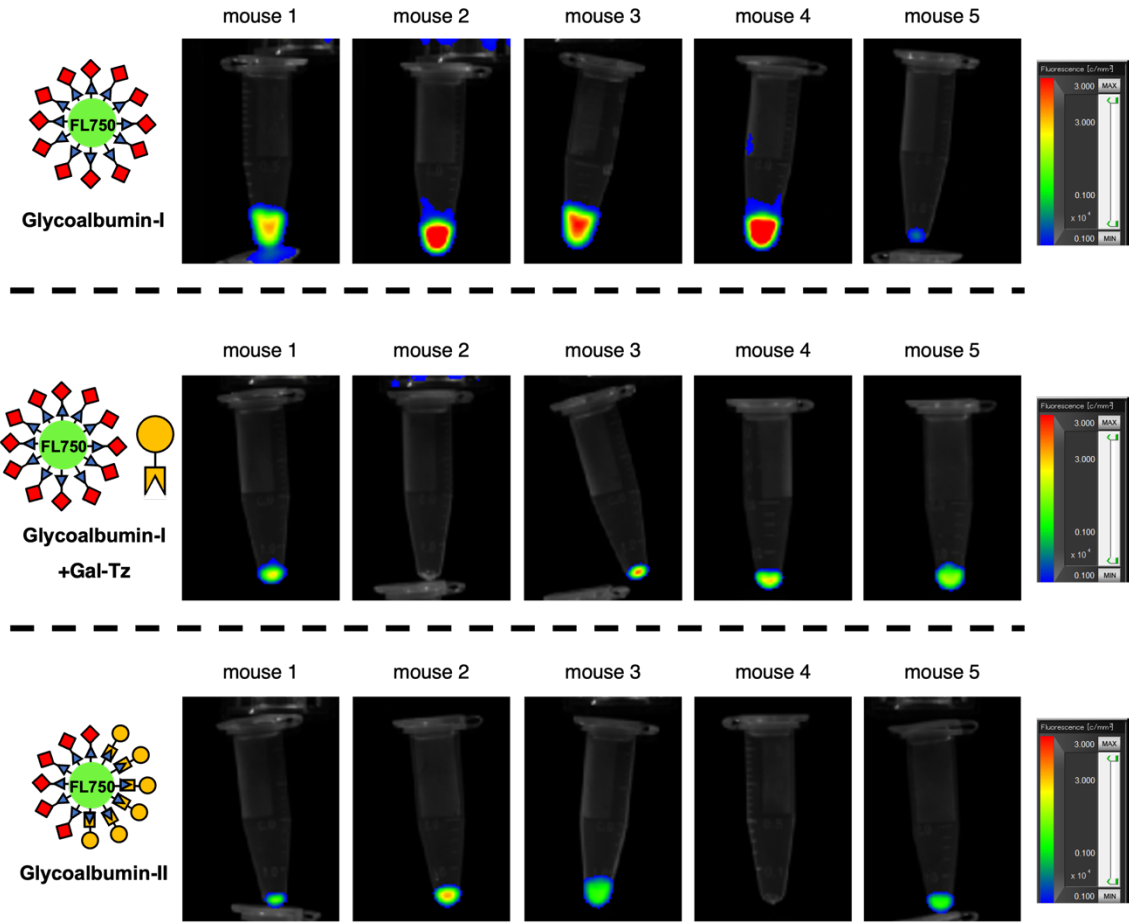


Figure S68. Replicate data ($n = 5$) for fluorescence images of the collected urine samples from the mice at 5 hours following intratumoral co-injection of **glycoalbumin-I** and **Gal-Tz**. As control groups, **glycoalbumin-I** or **-II** only was used. The fluorescence intensity ranged from 0.1 to 3.0×10^4 .

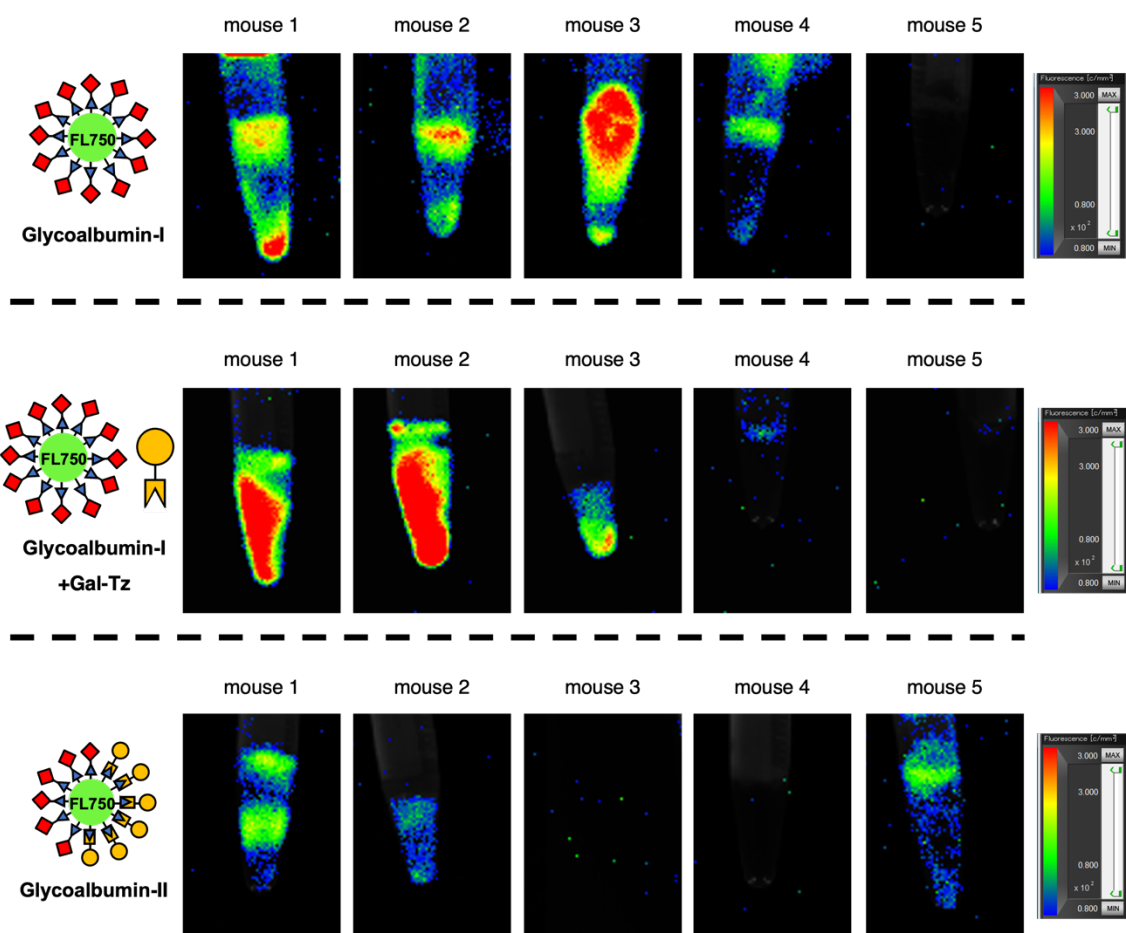


Figure S69. Replicate data ($n = 5$) for fluorescence images of the collected blood samples from the mice at 5 hours following intratumoral co-injection of **glycoalbumin-I** and **Gal-Tz**. As control groups, **glycoalbumin-I** or **-II** only was used. The fluorescence intensity ranged from 0.8 to 3.0×10^2 .

参考文献

- 1) Geus, M. A. R.; Maurits, E.; Sarris, A. J. C.; Hansen, T.; Kloet, M. S.; Kamphorst, K.; Hoeve, W.; Robillard, M. S.; Pannwitz, A.; Bonnet, S. A.; Codée, J. D. C.; Filippov, D. V.; Overkleeft, H. S.; Kasteren, S. I. Fluorogenic Bifunctional Trans-Cyclooctenes as Efficient Tools for Investigating Click-to-Release Kinetics. *Chem. Eur. J.* 2020, 26, 9900–9904.

参考文献

- 1) Collins, B. E.; Paulson, J. C., Cell surface biology mediated by low affinity multivalent protein–glycan interactions. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, *8*, 617–625.
- 2) Gurav, M. J.; Manasa, J.; Sanji, A. S.; Megalamani, P. H.; Chahadi, V. B., Lectin-glycan interactions: a comprehensive cataloguing of cancer-associated glycans for biorecognition and bio-alteration: a review. *Glycoconj. J.*, **2024**, *41*, 301–322.
- 3) A.A. D'Souza, P.V. Devarajan, *Journal of Controlled Release*, **2015**, *203*, 126–139.
- 4) S. Carlsson, C. T. Oberg, M. C. Carlsson, A. Sundin, U. J. Nilsson, D. Smith, R. D. Cummings, J. Almkvist, A. Karlsson, H. Leffler, *Glycobiology*, **2007**, *6*, 663–676.
- 5) Stillmark, H., **1888**, About Ricin, the Gift Ferment from the Seed of *Ricinus communis* L. and Some Other Euphorbiaceen. Inaug.-Diss. Dorpat., Schnakenburg. (In German)
- 6) a) Boyd, W.C.; Shapleigh, E., Specific precipitation activity of plant agglutinins (lectins). *Science*, **1954**, *119*, 419. b) Sharon, N.; Lis, H., History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology*, **2004**, *14*, 53-62.
- 7) H. Lis and N. Sharon, Lectins: Carbohydrate-Specific Proteins that Mediate Cellular Recognition, *Chem. Rev.*, **1998**, *98*, 637–674.
- 8) a) Sperandio, M., Gleissner, C. A., Ley, K. Glycosylation in immune cell trafficking. *Immunol. Rev.* **2009**, *230*, 97-113. b) Rudd, P. M., Elliot, T., Cresswell, P., Wilson, I. A., Dwek, R. A., Glycosylation and the immune system. *Science*, **2001**, *291*, 2370-2376. c) Davicino, R. C., Eliçabe, R. J., Genaro, M. S. Di, Rabinovich, G. A. Coupling pathogen recognition to innate immunity through glycan-dependent mechanisms. *Int. Immunopharmacol.* **2011**, *11*, 1457-1463. d) Rabinovich, G. A., Toscano, M. A. Turning “sweet” on immunity: galectin-glycan interactions in immune tolerance and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **2009**, *9*, 338-352. e) Islam, M.K., Khan, M., Gidwani, K. Witwer, K. W.; Lamminmäki, U.; Leivo, J. Lectins as potential tools for cancer biomarker discovery from extracellular vesicles. *Biomark Res*, **2023**, *11*, 85.
- 9) Zhou, J. Y.; Cobb, B. A. Glycans in immunologic health and disease. *Annu. Rev. Immunol.* **2021**, *39*, 511–536.

- 10) a) Whitesides et.al. Polyvalent Interactions in Biological Systems: Implications for Design and Use of Multivalent Ligands and Inhibitors, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **1998**, b) Dam, T. K., Brewer, C. F., Effects of clustered epitopes in multivalent ligand-receptor interactions. *Biochemistry* **47**, 8470-8476 (**2008**). c) Dam, T. K., Brewer, C. F., Lectins as pattern recognition molecules: The effects of epitope density in innate immunity. *Glycobiology* **20**, 270-279 (**2010**).
- 11) Lee R. T.; Lee Y. C. Affinity enhancement by multivalent lectin-carbohydrate interaction. *Glycoconj. J.* **2000**, *17*, 543-551.
- 12) a) Chabre, Y.M.; Roy, R. Design and creativity in synthesis of multivalent neoglycoconjugates. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **2010**, *63*, 165-393. b) Jayaraman, N. Multivalent ligand presentation as a central concept to study intricate carbohydrate-protein interactions. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 3463. c) Kim, Y., Hyun, J. Y., Shin, I. Multivalent glycans for biological and biomedical applications. **2021**, *Chem. Soc. Rev.* *50*, 10567-10593.
- 13) Kiessling Gestwicki, J. E., Cairo, C. W., Strong, L. E., Oetjen, K. A., Kiessling, L. L. Influencing Receptor-Ligand Binding Mechanisms with Multivalent Ligand Architecture. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14922-14933.
- 14) a) Nishikawa, M.; Miyazaki, C.; Yamashita, F.; Takakura, Y.; Hashida, M.; Galactosylated proteins are recognized by the liver according to the surface density of galactose moieties *Am. J. Physiol.* **1995**, *268*, G849. b) Nishikawa, M.; Hirabayashi, H.; Takakura, Y.; Hashida, M., Nishikawa, M.; Design for Cell-Specific Targeting of Proteins Utilizing Sugar-Recognition Mechanism: Effect of Molecular Weight of Proteins on Targeting Efficiency *Pharm.Res.*, **1995**, *12*, 209.
- 15) a) Opanasopit, P.; Shirashi, K.; Nishikawa, M.; Yamashita, F.; Takakura, Y.; Hashida, M., *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **2001**, *280*, G879. b) K. Ogawara, S. Hasegawa, M. Nishikawa, Y. Takakura, M. Hashida, Pharmacokinetic evaluation of mannosylated bovine serum albumin as a liver cell-specific carrier: quantitative comparison with other hepatotropic ligands. *J. Drug Targeting*, **1999**, *6*, 349. c) Haltiwanger, R. S.; Lehrman, M. A.; Eckhardt, A. E.; Hill, R. L., *J. Biol. Chem.*, **1986**, *261*, 7433. The distribution and localization of the fucose-binding lectin in rat tissues and the identification of a high affinity form of the mannose/N-acetylglucosamine-binding lectin in rat liver d) Higuchi, Y.; Nishikawa, M.; Kawakami, S.; Yamashita, F.; Hashida, M., Uptake characteristics of mannosylated and fucosylated bovine serum albumin in primary cultured rat sinusoidal endothelial cells and Kupffer cells. *Int. J. Pharm.* **2004**, *287*, 147. e) Beljaars, L.; Molema, G.; Weert, B.; Bonnema, H.; Olinga, P.; Groothuis, G. M.; Meijer, D. K.;

- Poelstra, K., Albumin modified with mannose 6-phosphate: A potential carrier for selective delivery of antifibrotic drugs to rat and human hepatic stellate cells. *Hepatology*, **1999**, *29*, 1486.
- f) Beljaars, L.; Olinga, P.; Molema, G.; De Bleser, P.; Geerts, A.; Groothuis, G. M. M.; Meijer, D. K. F.; Poelstra, K., Characteristics of the hepatic stellate cell-selective carrier mannose 6-phosphate modified albumin (M6P28-HSA). *Liver Int.* **2001**, *21*, 320.
- 16)** a) Shatz-Azoulay, H.; Vinik, Y.; Isaac, R.; Kohler, U.; Lev, S.; Zick, Y.; The Animal Lectin Galectin-8 Promotes Cytokine Expression and Metastatic Tumor Growth in Mice. *Sci Rep*, **2020**, *10*, 7375. b) Zhang, L., Wang, P., Qin, Cong Q.; Shao, C.; Du, Z.; Ni, X.; Li, P.; Ding, K. RN1, a novel galectin-3 inhibitor, inhibits pancreatic cancer cell growth in vitro and in vivo via blocking galectin-3 associated signaling pathways. *Oncogene*, **2017**, *36*, 1297–1308. c) Jung, T.-Y.; Jung, S.; Ryu, H.-H.; Jeong, Y.-I.; Jin, Y.-H.; Jin, S.-G.; Kim, I.-Y.; Kang, S.-S.; Kim, H.-S. Role of galectin-1 in migration and invasion of human glioblastoma multiforme cell lines. *J Neurosurg.* **2008**, *109*, 273–284.
- 17)** Chen, W. C.; Completo, G. C.; Sigal, D. S.; Crocker, P. R.; Saven, A.; Paulson, J. C., In vivo targeting of B-cell lymphoma with glycan ligands of CD22. *Blood*, **2010**, *115*, 4778–4786.
- 18)** Gabius Andre, S.; Unverzagt, C.; Kojima, S.; Frank, M.; Seifert, J.; Fink, C.; Kayser, K.; von der Lieth, C.-W., Gabius, H.-J. Determination of modulation of ligand properties of synthetic complex-type biantennary N-glycans by introduction of bisecting GlcNAc in silico, in vitro and in vivo. *Eur. J. Biochem.* **2004**, *271*, 118–134.
- 19)** K. Tanaka, E. R. O. Siwu, K. Minami, K. Hasegawa, S. Nozaki, Y. Kanayama, K. Koyama, C. W. Chen, J. C. Paulson, Y. Watanabe, K. Fukase, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2010**, *49*, 8195-8200.
- 20)** Liu, H.-Q.; Xuan, C.-L.; Ma, H.-C., A review on the physiological and pathophysiological role of endothelial glycocalyx. *J. Biochem. Mol. Toxicol*, **2020**, *34*, e22571.
- 21)** Daskhan, G. C., Berthet, N., Thomas, B., Fiore, M., and Renaudet, O. Multivalent glycocyclopeptides: toward nano-sized glycostructures. *Carbohydr. Res.* **2015**, *405*, 13–22.
- 22)** a) Liang, C.-H.; Wang, S.-K.; Lin, C.-W.; Wong, C.-H.; Wu, C.-Y. Effects of Neighboring Glycans on Antibody–Carbohydrate Interaction. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 1608–1612. b) Shivatare, S.S.; Chang, S.H.; Tsai, T.I.; Tseng, S.Y.; Shivatare, V.S.; Lin, Y.S.; Cheng, Y.Y.; Ren, C.T.; Lee, C.C.; Pawar, S.; et al. Modular synthesis of N-glycans and arrays for the hetero-ligand binding

analysis of HIV antibodies. *Nat. Chem.* **2016**, *8*, 338–346.

- 23)** M. Gómez-García, J. M. Benito, D. Rodríguez-Lucena, J. Yu, K. Chmurski, C. Ortiz Mellet, R. Gutiérrez Gallego, A. Maestre, J. Defaye and J. M. García Fernández, Probing Secondary Carbohydrate-Protein Interactions with Highly Dense Cyclodextrin-Centered Heteroglycoclusters: The Heterocluster Effect. *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 7970-7971.
- 24)** Singla, A.; Simbassa, S. B.; Chirra, B.; Gairola, A.; Southerland, M. R.; Shah, K. N.; Rose, R. E.; Chen, Q.; Basharat, A.; Baeza, J.; Raina, R.; Chapman, M. J.; Hassan, A. M.; Ivanov, I.; Sen, A.; Wu, H.-J.; Cannon, C. L. Hetero-Multivalent Targeted Liposomal Drug Delivery to Treat *Pseudomonas aeruginosa* Infections. *ACS Appl. Mater. Interfaces.* **2022**, *14*, 40724–40737,
- 25)** a) Fujiki, K., Tanaka, K., RIKEN click reagent for protein labeling, e-ROS Encyclopedia of reagents for organic synthesis., **2019**. b) Tanaka, K., Fukase, K., Katsumura, S., New strategy in synthetic biology: from enzyme inhibition and natural products synthesis to PET imaging by 6 π -azaelectrocyclization. *Chem. Rec.* **2010**, *10*, 119-139. c) Tanaka, K., Masuyama, T., Hasegawa, K., Tahara, T., Mizuma, Y., Wada, Y., Watanabe, Y., Fukase, K., A submicrogram-scale protocol for biomolecule-based PET imaging by rapid 6 π -azaelectrocyclization: visualization of sialic acid dependent circulatory residence of glycoproteins. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 102-105. d) Tanaka, K., Moriwaki, K., Yokoi, S., Koyama, K., Miyoshi, E., Fukase, K., Whole-body imaging of tumor cells by azaelectrocyclization: visualization of metastasis dependence on glycan structure. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 1074-1077. e) Tanaka, K., Yokoi, S., Morimoto, K., Iwata, T., Nakamoto, Y., Nakayama, K., Koyama, K., Fujiwara, T., Fukase, K., Cell surface biotinylation by azaelectrocyclization: easy-handling and versatile approach for living cell labeling. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 1865-1868.
- 26)** a) Ogura, A., Tahara, T., Nozaki, S., Onoe, H., Kurbangaliev, A., Watanabe, Y., Tanaka, K., Glycan multivalency effects toward albumin enable N-glycan-dependent tumor targeting. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2016**, *26*, 2251-2254. b) Ogura, A., Urano, S., Tahara, T., Nozaki, S., Sibgatullina, R., Vong, K., Suzuki, T., Dohmae, N., Kurbangaliev, A., Watanabe, Y., Tanaka, K. A viable strategy for screening the effects of glycan heterogeneity on target organ adhesion and biodistribution in live mice. *Chem. Commun.* **2018**, *54*, 8693-8696. c) Latypova, L., Sibgatullina, R., Ogura, A., Fujiki, K., Khabibrakhmanova, A., Tahara, T., Nozaki, S., Urano, S., Tsubokura, K., Onoe, H., Watanabe, Y., Kurbangaliev, A., Tanaka, K. Sequential Double “Clicks” toward Structurally Well-Defined Heterogeneous N-Glycoclusters: The Importance of Cluster Heterogeneity on Pattern Recognition In Vivo. *Adv. Sci.* **2017**, *4*, 1600394. d) Kurbangaliev, A.,

- Zamalieva, R., Nasibullin, I., Yamada, K., Tanaka, K. Homo- and Heterogeneous Glycoconjugates on the Basis of N-Glycans and Human Serum Albumin: Synthesis and Biological Evaluation. *Molecules*, **2022**, *27*, 1285.
- 27) Ogura, A., Tahara, T., Nozaki, S., Morimoto, K., Kizuka, Y., Kitazume, S., Hara, M., Kojima, S., Onoe, H., Kurbangalieva, A., Taniguchi, N., Watanabe, Y., Tanaka, K. Visualizing Trimming Dependence of Biodistribution and Kinetics with Homo- and Heterogeneous N-Glycoclusters on Fluorescent Albumin. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 21797.
- 28) Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004-2021.
- 29) a) Yi, W., Xiao, P., Liu, X., Zhao, Z.; Sun, X.; Wang, J.; Zhou, L.; Wang, G.; Cao, H.; Wang, D.; Li, Y., Recent advances in developing active targeting and multi-functional drug delivery systems via bioorthogonal chemistry. *Sig. Transduct. Target. Ther.*, **2022**, *7*, 386. b) Ji, X., Pan, Z., Yu, B., Cruz, L. K. D. L., Zheng, Y., Ke, B., Wang, B. Click and release: bioorthogonal approaches to “on-demand” activation of prodrugs. *Chem. Soc. Rev.* **2019**, *48*, 1077-1094.
- 30) Huisgen, R. 1,3-dipolar cycloaddition, *Proc. Chem. Soc.* **1961**, 357.
- 31) a) Agard, N. J., Prescher, J. A., Bertozzi, C. R., A Strain-Promoted [3 + 2] Azide–Alkyne Cycloaddition for Covalent Modification of Biomolecules in Living Systems. *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 15046-15047. b) Laughlin, S.T.; Baskin, J. M.; Amacher, S. L.; Bertozzi, C. R., In vivo imaging of membrane-associated glycans in developing zebrafish. *Science*, **2008**, *320*, 664–667.
- 32) a) Kim, R.; Koo, H., Biomedical applications of copper-free click chemistry: in vitro, in vivo, and ex vivo, *Chem. Sci.*, **2019**, *10*, 7835. b) Takayama, Y.; Kusamori, K.; Nishikawa, M., Click Chemistry as a Tool for Cell Engineering and Drug Delivery. *Molecules*, **2019**, *24*, 172.
- 33) Blackman, M. L.; Royzen, M.; Fox, J. M., A Photochemical Synthesis of Functionalized trans-Cyclooctenes Driven by Metal Complexation *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 13518-13519.
- 34) Rossin, R.; Verkerk, P. R.; van den Bosch, S. M.; Vulders, R. C. M.; Verel, I.; Lub, J.; Robillard, M. S., In Vivo Chemistry for Pretargeted Tumor Imaging in Live Mice. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2010**, *122*, 3447–3450
- 35) Versteegen R. M.; Rossin, R.; ten Hoeve, W.; Janssen, H. M.; Robillard, M. S.; Click to release:

- instantaneous doxorubicin elimination upon tetrazine ligation. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 14112–14116.
- 36)** Rossin, R.; van Duijnhoven, S. M. J.; ten Hoeve, W.; Janssen, H. M.; Hoeben, F. J. M.; Versteegen, R. M.; Robillard, M. S., Triggered Drug Release from an Antibody–Drug Conjugate Using Fast “Click-to-Release” Chemistry in Mice. *Bioconjugate Chem.* **2016**, *27*, 1697–1706.
- 37)** a) Oneto, J. M. M.; Khan, I.; Seebald, L.; Royzen, M., In Vivo Bioorthogonal Chemistry Enables Local Hydrogel and Systemic Pro-Drug to Treat Soft Tissue Sarcoma. *ACS. Cent. Sci.* **2016**, *2*, 476–482. b) Wu, K.; Yee, N. A.; Srinivasan, S.; Mahmoodi, A.; Zakharian, M.; Oneto, J. M. M.; Royzen, M., Click activated prodrugs against cancer increase the therapeutic potential of chemotherapy through local capture and activation. *Chem. Sci.* **2021**, *12*, 1259–1271. c) Srinivasan, S.; Yee, N. A.; Wu, K.; Zakharian, M.; Mahmoodi, A.; Royzen, M.; Oneto, J. M. M., SQ3370 Activates Cytotoxic Drug via Click Chemistry at Tumor and Elicits Sustained Responses in Injected & Non-injected Lesions. *Adv. Ther.* **2021**, *4*, 200024. d) McFarland, J. M.; Alečković, M.; Coricor, G.; Srinivasan, S.; Tso, M.; Lee, J.; Nguyen, T.-H.; Oneto, J. M. M., Click Chemistry Selectively Activates an Auristatin Prodrug with either Intratumoral or Systemic Tumor-Targeting Agents. *ACS. Cent. Sci.* **2023**, *9*, 1400–1408.
- 38)** a) Vong, K., Eda, S., Kadota, Y., Nasibullin, I., Wakatake, T., Yokoshima, S., Shirasu, K., Tanaka, K., An artificial metalloenzyme biosensor can detect ethylene gas in fruits and Arabidopsis leaves. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 5746. b) Smirnov, I., Sibgatullina, R., Urano, S., Tahara, T., Ahmadi, P., Watanabe, Y., Pradipta, A. R., Kurbangaliev, A., Tanaka, K., Artificial glycoproteins as a scaffold for targeted drug therapy, *Small*, **2020**, *16*, e2004831. c) Tsubokura, K., Vong, K. K., Pradipta, A. R., Ogura, A., Urano, S., Tahara, T., Nozaki, S., Onoe, H., Nakao, Y., Sibgatullina, R., Kurbangaliev, A., Watanabe, Y., Tanaka, K., In vivo gold complex catalysis within live mice. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 3579–3584. d) Tanaka, K., Vong, K., Unlocking the therapeutic potential of artificial metalloenzymes. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* **2020**, *96*, 79–94. e) Yamada, K., Muguruma, K., Tanaka, K., Therapeutic in vivo synthetic chemistry using an artificial metalloenzyme with glycosylated human serum albumin. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **2022**, *82*, 11–34.
- 39)** Nasibullin, I., Smirnov, I., Ahmadi, P., Vong, K., Kurbangaliev, A., Tanaka, K., Synthetic prodrug design enables biocatalytic activation in mice to elicit tumor growth suppression. *Nat. Commun.* **2022**, *13*, 39.

- 40) a) Vong, K., Tahara, T., Urano, S., Nasibullin, I., Tsubokura, K., Nakao, Y., Kurbangalieva, A., Onoe, H., Watanabe, Y., Tanaka, K., Disrupting tumor onset and growth via selective cell tagging (SeCT) therapy. *Sci. Adv.* **2021**, *7*, eabg4038. b) Ahmadi, P.; Muguruma, K.; Chang, T.-C.; Tamura, S.; Tsubokura, K.; Egawa, Y.; Suzuki, T.; Dohmae, N.; Nakao, Y.; Tanaka, K., In vivo metal-catalyzed SeCT therapy by a proapoptotic peptide. *Chem. Sci.*, **2021**, *12*, 12266-12273.
- 41) K. Nakamura, K. Tsubokura, A. Kurbangalieva, Y. Nakao, T. Murase, T. Shimoda, K. Tanaka, Efficient route to RIKEN click probes for glycoconjugation, *J. Carbohydr. Chem.*, **2019**, *38*, 127-138.
- 42) Debets, M. F., Berkel, S. S. V., Schoffelen, S., Rutjes, F. P. J. T., Hest, J. C. M. V., Delft, F. L. V., Aza-dibenzocyclooctynes for fast and efficient enzyme PEGylation via copper-free (3+2) cycloaddition. *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 97-99.
- 43) Geus, M. A. R.; Maurits, E.; Sarris, A. J. C.; Hansen, T.; Kloet, M. S.; Kamphorst, K.; Hoeve, W.; Robillard, M. S.; Pannwitz, A.; Bonnet, S. A.; Codée, J. D. C.; Filippov, D. V.; Overkleeft, H. S.; Kasteren, S. I. Fluorogenic Bifunctional Trans-Cyclooctenes as Efficient Tools for Investigating Click-to-Release Kinetics. *Chem. Eur. J.* **2020**, *26*, 9900–9904.
- 44) Swenton, J. S., Photoisomerization of cis-cyclooctene to trans-cyclooctene. *J. Org. Chem.*, **1969**, *34*, 3217.
- 45) a) Ryozen, M.; Yap, G. P. A.; Fox, J. M., A Photochemical Synthesis of Functionalized trans-Cyclooctenes Driven by Metal Complexation. *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *130*, 3760-3761. b) Svatoněk, D., Denk, C., Rosecker, V. et al. Efficient low-cost preparation of trans-cyclooctenes using a simplified flow setup for photoisomerization. *Monatsh. Chem.*, **2016**, *147*, 579–585.
- 46) M.H. Chiu, T. Tamura, M. S. Wadhwa, K. G. Rice, *J. Biol. Chem.* **1994**, *23*, 16195–16202.
- 47) N. K. Devaraj, G. M. Thurber, E. J. Keliher, B. Marinelli, R. Weissleder, *PNAS*, **2012**, *13*, 4762–4767.
- 48) Carlson, J. C. T.; Mikula, H.; Weissleder, R. Unraveling Tetrazine-Triggered Bioorthogonal Elimination Enables Chemical Tools for Ultrafast Release and Universal Cleavage. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 3603–3612,

謝辞

博士課程から受け入れて頂き、研究指導だけでなく一人の研究者として、また人間として、模範的な道を示して頂きました、東京科学大学物質理工学院応用科学系教授 田中克典先生に深く感謝致します。

研究の進め方や実験の他にも、研究室生活・私生活についての相談にも真摯かつユーモアを持って対応して頂きました、東京科学大学物質理工学院応用科学系助教授 アンバラ・プラディプタ先生、理化学研究所開拓研究本部研究員チャン・ツンチェ博士に深く感謝致します。

またご多忙のおり、私の博士論文審査を引き受けてくださいました、東京科学大学物質理工学院応用化学系教授 田中克典先生、科学技術創成研究院教授 中村浩之先生、理工学院応用化学系准教授 伊藤繁和先生、同大学院同系教授 芹澤武先生、同大学院同系大河内美奈先生、順天堂大学薬学部教授 田中浩士先生に深く感謝申し上げます。貴重なご助言をいただき、博士論文を最高の形で完成させることができました。

本論文において、第二章の細胞実験および動物実験を行なって頂き、また実験技術・解析についてご指導いただきました、理化学研究所田中生体機能合成化学研究室の向峯あかり博士（前特別研究員）、中村亜希子様（テクニカルスタッフ）、草苺百合子様（研究アシスタント）に深く感謝申し上げます。

本研究で使用した N 結合型糖鎖を提供して頂いた株式会社糖鎖工学研究所様に心より御礼申し上げます。

本研究の一部は博士課程人材育成フェローシップ研究費により実施されたものです。ここに感謝の意を表します。

研究生活を円滑に行えるように取り計らってくださり、また昼食を共にさせて頂きました秘書 藤井素子様（前特別研究員）に深く感謝申し上げます。

研究室内でただ一人の先輩研究員として、様々な議論や相談に付き合ってくださいました、理化学研究所田中生体機能合成化学研究室、六車恭平博士（特別研究員）に深く感謝申し上げます。

博士課程3年間のほとんどを共に研究室で過ごし、研究活動以外の場面でもこの3年間で充実したものにしてくれた田中克典研究室OBの方々、現博士課程学生の方々、修士課程の方々、学士4年の方々に深く感謝申し上げます。

最後に、本学での勉学・研究の機会を与え、自由な選択をさせてくれると共に、私のことを心配し温かく見守ってくれた両親に深く感謝致します。

2025年2月12日 山田 健士郎