

ファゴサイトーシスにおける SNAP-23 の役割と制御機構

櫻井 千恵, 初沢 清隆

1. はじめに

ファゴサイトーシスはエンドサイトーシスの一種で、マクロファージなどの食細胞にみられる比較的大きな標的物 (0.5 μm 以上) の取り込み反応である。これは自然免疫反応の一つであり、標的物 (アポトーシス小体や外来異物など) の表面分子に特異的な受容体によって引き起こされる。取り込みにより形成されたファゴソームは、時間経過とともに活性酸素種の産生、酸性化、酸性加水分解酵素群の集積などにより、内部環境が変化しファゴリソソームへと成熟する。膜の動きに着目すると、取り込みに必要な膜成分は細胞内部から細胞膜へ、また成熟化に伴いエンドソームやリソソームから各種成分はファゴソームへ小胞輸送される。いずれも複雑な膜融合反応の関与が予想されるが、詳細については未解明な点が多い。本稿では、膜融合装置 SNARE タンパク質の一つ SNAP-23 (synaptosomal-associated protein of 23 kDa) のファゴサイトーシスにおける役割と制御機構について、筆者らの最近の研究成果を中心に紹介する。

2. ファゴサイトーシスを制御する SNARE タンパク質

1) SNARE タンパク質

SNARE (soluble *N*-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor) タンパク質は、多くの細胞内小胞輸送において二つの膜の融合を担う分子であり、syntaxin, SNAP-25, VAMP の三つのファミリーからなる。これらが SNARE 複合体を形成した場合、引き合う力が生じ膜融合が起こる。この複合体形成には SNARE モチーフと呼ばれる領域が重要である。この中心のアミノ酸残基がグルタ

ミン (Q) であるものを Q-SNARE, アルギニン (R) の場合を R-SNARE と呼ぶ。syntaxin は Qa-SNARE, SNAP-25 は 2 か所有するため Qbc-SNARE, VAMP は R-SNARE に分類され、SNARE 複合体は四つの SNARE モチーフ (Qa, Qb, Qc, R) からなる bundle 構造をとる。詳細な機構は他の総説を参照いただきたい¹⁾。

2) これまでの知見 (表 1 を参照)

ファゴソーム形成の際、内部のオルガネラやそれら由来の小胞が細胞膜に融合し膜成分が供給される。Fc 受容体依存性のファゴサイトーシスでは、このステップに機能する SNARE タンパク質としてリサイクリングエンドソーム (RE) 局在 VAMP3 と後期エンドソーム (LE) 局在 VAMP7 が報告された²⁾。樹状細胞による大腸菌のファゴサイトーシスの場合には、LE・リソソーム (LY) 局在の VAMP8 が抑制的に働く³⁾。同様に、Fc 受容体やアポトーシス小体認識受容体によるファゴソーム形成を抑制するものには、細胞膜 (PM) 局在の syntaxin11 (stx11) がある⁴⁾ (stx11 のノックアウト解析から、ファゴソーム形成に関与しないとの報告もある⁵⁾)。筆者らは、Fc 受容体依存性の場合、小胞体 (ER) 局在の syntaxin18 が機能すること、また通常その機能は Sec22b によって抑制されていることを明らかにした^{6,7)}。さて、このように Qa-, R-SNARE タンパク質が同定されていたのに対し、細胞膜上の Qbc-SNARE タンパク質は明確ではなかった。一方、ファゴソームの成熟の際は、その初期に初期エンドソーム (EE) 局在の syntaxin13、その後に LE 局在の syntaxin7 がそれぞれの小胞とファゴソームとの融合に機能する⁸⁾。また、樹状細胞では、VAMP3 と VAMP8 が大腸菌を含むファゴソームの成熟に働き、抗原提示の効率化に関与する⁹⁾。しかし、いずれの場合もファゴソーム膜上で働く SNARE タンパク質は同定されていなかった。

3. ファゴサイトーシスにおける SNARE タンパク質 SNAP-23 の役割

1) SNAP-23 の構造的特徴と一般的な機能

SNAP-23 は多くの細胞種において主に細胞膜に局在する SNARE タンパク質であり、エキソサイトーシスに機能する。分子内に二つの SNARE モチーフ (Qbc) を持ち、

国立大学法人鳥取大学医学部生命科学科 (〒683-8503 鳥取県米子市西町 86)

Role of SNAP-23 in phagocytosis and its regulatory mechanism
Chiye Sakurai and Kiyotaka Hatsuzawa (Division of Molecular Biology, School of Life Sciences, Faculty of Medicine, Tottori University, 86 Nishi-cho, Yonago, Tottori 683-8503, Japan)
本論文の図版はモノクロ (冊子版) およびカラー (電子版) で掲載。

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2019.910805

© 2019 公益社団法人日本生化学会

表1 ファゴソーム形成と成熟に機能する SNARE タンパク質

タイプ	SNARE タンパク質	局在	ファゴソーム形成と成熟における機能	免疫細胞	文献
Qa-SNARE	syntaxin7	LE/LY	成熟（促進）	Fc 受容体発現 モデル細胞	8
	syntaxin11	PM	形成（抑制または関与しない）	マクロファージ	4, 5
	syntaxin13	EE/RE	成熟（促進）	Fc 受容体発現 モデル細胞	8
	syntaxin18	ER	形成（促進）	マクロファージ	6
Qc-SNARE	D12 (p31)	ER	形成（促進）	マクロファージ	6
Qbc-SNARE	SNAP-23	PM	形成と成熟（リン酸化状態で変化）	マクロファージ 樹状細胞	12, 13
	SNAP-29		形成（促進）	マスト細胞	Wesolowski, J. <i>et al.</i> (2012) <i>PLoS One.</i> , 7, e49889.
R-SNARE	VAMP3	RE	形成と成熟（促進）	マクロファージ 樹状細胞	2
	VAMP7	LE/LY	形成と成熟（促進）	マクロファージ	2
	VAMP8	LE/LY, RE	形成（抑制）	樹状細胞	3
	Sec22b	ER, ERGIC	形成（抑制）	マクロファージ	7

ER：小胞体，ERGIC：小胞体-ゴルジ体中間区画，RE：リサイクリングエンドソーム，EE：初期エンドソーム，LE：後期エンドソーム，LY：リソソーム，PM：細胞膜。

また、これらには含まれた領域に密集する五つのシステイン残基がパルミトイル化され膜に結合している。種間で保存された Ser23, Thr24, Ser95, Ser110, Ser160（または 161）の 1 か所以上がリン酸化されることで、SNARE 複合体形成とそれに伴うエキソサイトーシスが制御される。リン酸化・脱リン酸化は刺激に応じて起こるが、リン酸化部位やエキソサイトーシスの制御は細胞種によって異なる^{10, 11)}。

SNAP-23 は、ファゴサイトーシスの際に細胞膜で機能する SNARE タンパク質として想定されていたが、その機能は未解明だった。

2) SNAP-23 のファゴソーム形成における機能

SNAP-23 のファゴサイトーシス時の機能を調べるにあたり、IgG でオプソニン化した (IgG-) ザイモサン（酵母の細胞壁成分）やラテックスビーズをマクロファージに与えたところ、いずれのファゴソーム膜にも SNAP-23 の局在化が観察された。筆者らはファゴソーム形成における SNAP-23 の機能解析のため、マクロファージに IgG- ザイモサンを与え、その取り込み効率を測定した。その結果、SNAP-23 の過剰発現マクロファージでは取り込み効率、すなわちファゴソーム形成効率に顕著な増加がみられ、一方、SNAP-23 発現を抑制した場合では効率は減少した。これらから、SNAP-23 はファゴソーム形成の促進に機能する

と考えられた¹²⁾。

3) SNAP-23 のファゴソーム成熟における機能

形成されたファゴソームは、順次オルガネラと融合することでファゴリソソームへと成熟する。次に、筆者らはこの成熟過程における SNAP-23 の機能を解析するため、マクロファージに IgG- ラテックスビーズを与え形成させたファゴソームをショ糖密度勾配遠心分離法により単離し、成熟化の指標となるファゴソーム局在化タンパク質について調べた。その結果、SNAP-23 過剰発現マクロファージでは、活性酸素種の産生を担う NADPH オキシダーゼ複合体の形成因子 gp91^{phox} や p22^{phox} の局在量が増加していた。また、LAMP-1 (LY 局在) や液胞型 ATP アーゼ (LY 関連オルガネラ局在) の局在量の増加もみられた。続いて、ファゴソーム内部の酸性化とファゴソーム-リソソームの融合効率を調べたところ、いずれも SNAP-23 の過剰発現により亢進し、反対に発現抑制により低下した。この低下は SNAP-23 の過剰発現によりレスキューされた。以上から、SNAP-23 はファゴソーム形成だけでなく成熟の過程にも機能することがわかった¹²⁾。

SNAP-23 は、SNARE 複合体形成時には立体構造が大きく変化しコンパクトになる (図 1A)。そこで、実際に膜上で働くようす、つまり複合体形成による構造変化を捉える

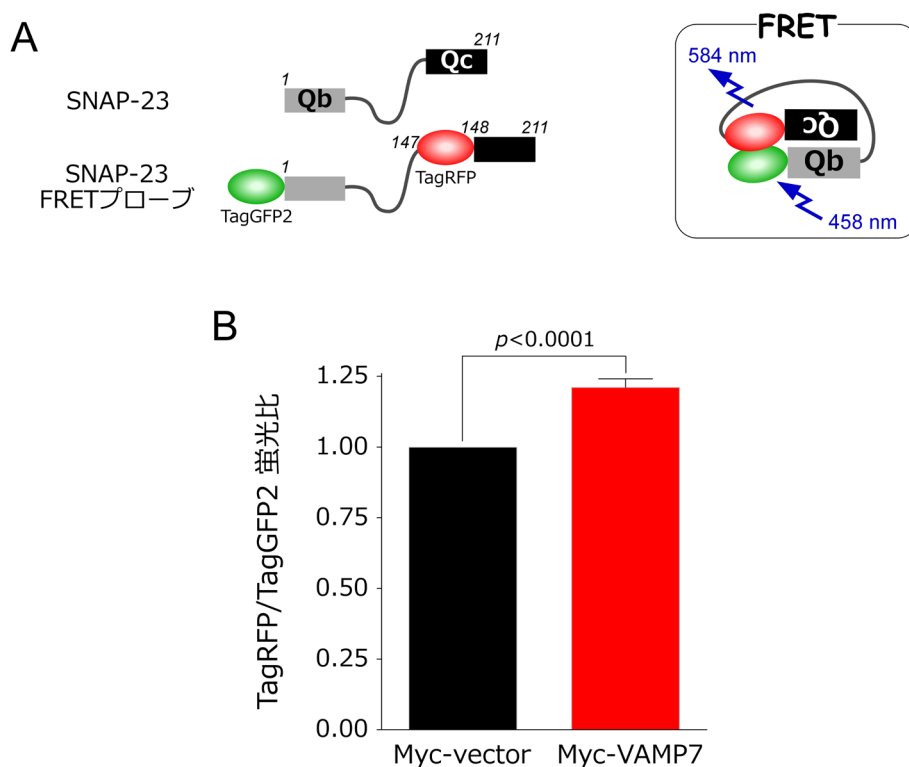


図1 ファゴソーム膜上SNAP-23の一分子FRET解析

(A) SNAP-23の二つのSNAREモチーフ (QbとQc) のそれぞれのN末端側にTagGFP2とTagRFPを挿入したFRETプローブを作製した(左)。SNARE複合体形成時には、二つのSNAREモチーフが近接した状態となる。このとき、挿入した二色の蛍光タンパク質はきわめて近くに位置するため、FRETシグナルの検出が可能となる(右)。(B) SNAP-23のFRETプローブとMyc付加VAMP7を共発現したマクロファージにおいて、IgG-ゼイモサンを取り込んだファゴソーム膜上のFRETシグナルを解析したところ、有意なシグナル増加、つまりSNAP-23の構造変化が確認できた¹²⁾。FRETシグナルはTagGFP2とTagRFPとの蛍光比 [TagRFP (580nm)/TagGFP2 (505nm)] によって求め、Myc-vectorの場合を基準に標準化した。

ため、SNAP-23の一分子フェルスター共鳴エネルギー移動 (Förster resonance energy transfer : FRET) プローブを作製した。複合体形成時に近接するSNAP-23の二つのSNAREモチーフのN末端それぞれに蛍光タンパク質TagGFP2とTagRFPを挿入し、ファゴソーム膜上のFRETシグナルを解析した。その結果、このプローブとVAMP7を共発現させた場合にシグナルの増加が観察された(図1B)。この結果は、SNAP-23がファゴソーム膜上でSNARE複合体を形成し膜融合に機能すること、この複合体の形成因子にはVAMP7が含まれることを示唆する¹²⁾。

4. ファゴサイトーシスにおけるSNAP-23の機能制御

1) SNAP-23 Ser95のリン酸化によるファゴサイトーシスへの影響

これまでの結果から、SNAP-23はファゴソームの形成と成熟という連続する複数のステップで機能することがわかった。では、その機能はどのように制御されているの

だろうか。それを調べるため、筆者らはSNAP-23のリン酸化に着目した。実際、マクロファージのファゴソームには、リン酸化されたSNAP-23が存在することがわかっている。今回は、種間で保存され、またマスト細胞や血小板においてエキソサイトーシスを亢進するなどの報告があるSNAP-23の95番目のセリン残基 (Ser95) に着目した¹⁰⁾。

SNAP-23のSer95リン酸化型変異体を作製しファゴサイトーシスへの影響を調べたところ、リン酸化型変異体はIgG-標的物を含むファゴソームの形成と成熟のいずれも阻害した。さらにリン酸化型変異を導入したSNAP-23の一分子FRETプローブを用いて細胞膜上のFRETシグナルを解析したところ、定常状態においてFRETシグナルの上昇が観察された。これは野生型や非リン酸化型のFRETプローブではみられないことから、SNAP-23はSer95のリン酸化によってコンパクトな構造をとりやすくなると推測された。おそらく、この構造変化したSNAP-23が、Fc受容体依存性のファゴサイトーシスに働くSNARE複合体の形成阻害を引き起こすことで、ファゴソームの形成と成熟の

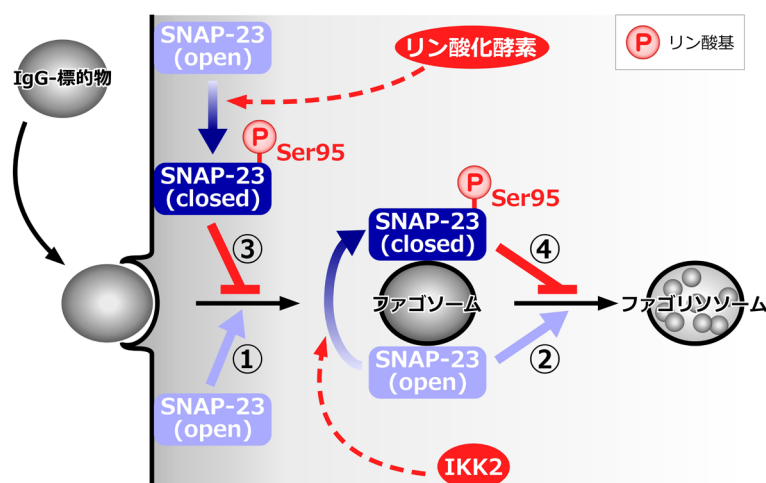


図2 Ser95リン酸化SNAP-23によるファゴサイトーシス制御機構

SNAP-23は細胞膜に局在する場合はファゴソーム形成(①)、ファゴソームに局在する場合はファゴソーム成熟(②)のそれぞれに促進的に機能する。IgGでオプソニン化された標的物のファゴサイトーシス時には、Ser95リン酸化SNAP-23によってファゴソーム形成(③)および成熟(④)は阻害される。この場合、ファゴソーム形成時のリン酸化酵素は未同定だが、成熟時にはIKK2が機能する¹³⁾。一方でオプソニン化していない標的物の場合には、Ser95リン酸化SNAP-23によりファゴソーム形成が亢進する(未発表)。つまり、標的物を認識する受容体に応じたSNAP-23のリン酸化制御により、体内に侵入した標的物の効率的な処理を可能にしていると考えられる。

効率の低下が生じると考えられる(図2)¹³⁾。

が関与することが明らかになった(図2)¹³⁾。

2) ファゴソーム成熟におけるSNAP-23 Ser95のリン酸化調節

I- κ Bキナーゼ(inhibitor- κ B kinase: IKK)は、転写因子NF- κ Bの活性化に関与するリン酸化酵素群である。そのサブユニットIKK2は、マウスSNAP-23のSer95とSer120をリン酸化することでエキソサイトーシスを制御する¹⁰⁾。筆者らはIKK2とSNAP-23のFRETプローブをマクロファージに共発現し、そのFRETシグナルを測定した。すると、細胞膜ではシグナルの変化はみられなかった一方、ファゴソーム膜上ではIKK2に依存するシグナルの増加が検出された。この増加は、IKK2阻害剤の存在下では顕著に減弱した。また、IKK2の過剰発現はファゴソーム成熟を抑制することがわかった。以上から、IKK2はファゴソーム膜上のSNAP-23のリン酸化酵素の一つであると考えられる¹³⁾。

サイトカインの一種であるインターフェロン γ (interferon- γ : IFN- γ)刺激を受けたマクロファージでは、ファゴソーム成熟は抑制される。リン酸化SNAP-23の生理的意義を調べるため、IFN- γ 刺激時のファゴソーム膜上のFRETシグナルを解析したところ、定常状態に比べSer95依存的なシグナルの増加が観察された。また、IFN- γ 刺激時のファゴソーム成熟の抑制は、IKK2阻害剤の存在下では解消された。以上の結果から、IFN- γ 刺激時のファゴソーム成熟の抑制には、IKK2依存的なSer95リン酸化SNAP-23

5. おわりに

本稿で紹介したSNAP-23の機能は、マクロファージが持つ緊急事態への応答の一つと考えられる。通常、SNAP-23は主にさまざまなエキソサイトーシスに関与する。また最近、筆者らはリポ多糖をリガンドとするToll様受容体4(TLR4)の細胞内リサイクリングにも機能することを見いだしている¹⁴⁾。SNAP-23の多様な機能は、そのパートナーSNAREタンパク質の切り替えで実現され、またその切り替え制御の一つとして、今回紹介したSNAP-23のリン酸化が関与すると考えられる。また、SNAP-23では明らかになっていないが、同じQbc-SNAREであるSNAP-29のようにO結合型 β -N-アセチルグルコサミン付加等による別の制御もあるかもしれない¹⁵⁾。

予備の実験から、Fc受容体とTLR4に依存するそれぞれのファゴサイトーシス効率がSNAP-23のリン酸化状態で相反する結果を得ている。これは、表面分子の異なる標的物が混在する際に、宿主にとって危険度の高いものから優先的に取り込む調節機構なのかもしれない。また、SNAP-23によるファゴソーム内部環境の制御は、抗原提示されるペプチド断片のプロセッシングに影響すると考えられる⁹⁾。このようなファゴサイトーシスにおけるさまざまな生理機能を理解するため、今後、個々の受容体によるSNAP-23をとりまく膜輸送系とその制御機構の解明を進めていきたい。

文 献

- 1) Hong, W. & Lev, S. (2014) Tethering the assembly of SNARE complexes. *Trends Cell Biol.*, **24**, 35–43.
- 2) Braun, V., Fraissier, V., Raposo, G., Hurbain, I., Sibarita, J.B., Chavrier, P., Galli, T., & Niedergang, F. (2004) TI-VAMP/VAMP7 is required for optimal phagocytosis of opsonised particles in macrophages. *EMBO J.*, **23**, 4166–4176.
- 3) Ho, Y.H., Cai, D.T., Wang, C.C., Huang, D., & Wong, S.H. (2008) Vesicle-associated membrane protein-8/endobrevin negatively regulates phagocytosis of bacteria in dendritic cells. *J. Immunol.*, **180**, 3148–3157.
- 4) Zhang, S., Ma, D., Wang, X., Celkan, T., Nordenskjold, M., Henter, J.I., Fadeel, B., & Zheng, C. (2008) Syntaxin-11 is expressed in primary human monocytes/macrophages and acts as a negative regulator of macrophage engulfment of apoptotic cells and IgG-opsonized target cells. *Br. J. Haematol.*, **142**, 469–479.
- 5) D'Orlando, O., Zhao, F., Kasper, B., Orinska, Z., Muller, J., Hermans-Borgmeyer, I., Griffiths, G.M., Zur Stadt, U., & Bulfone-Paus, S. (2013) Syntaxin 11 is required for NK and CD8⁺ T-cell cytotoxicity and neutrophil degranulation. *Eur. J. Immunol.*, **43**, 194–208.
- 6) Hatsuzawa, K., Tamura, T., Hashimoto, H., Hashimoto, H., Yokoya, S., Miura, M., Nagaya, H., & Wada, I. (2006) Involvement of syntaxin 18, an endoplasmic reticulum (ER)-localized SNARE protein, in ER-mediated phagocytosis. *Mol. Biol. Cell*, **17**, 3964–3977.
- 7) Hatsuzawa, K., Hashimoto, H., Hashimoto, H., Arai, S., Tamura, T., Higa-Nishiyama, A., & Wada, I. (2009) Sec22b is a negative regulator of phagocytosis in macrophages. *Mol. Biol. Cell*, **20**, 4435–4443.
- 8) Collins, R.F., Schreiber, A.D., Grinstein, S., & Trimble, W.S. (2002) Syntaxins 13 and 7 function at distinct steps during phagocytosis. *J. Immunol.*, **169**, 3250–3256.
- 9) Nair-Gupta, P., Baccarini, A., Tung, N., Seyffer, F., Florey, O., Huang, Y., Banerjee, M., Overholtzer, M., Roche, P.A., Tampe, R., et al. (2014) TLR signals induce phagosomal MHC-I delivery from the endosomal recycling compartment to allow cross-presentation. *Cell*, **158**, 506–521.
- 10) Suzuki, K. & Verma, I.M. (2008) Phosphorylation of SNAP-23 by IkkappaB kinase 2 regulates mast cell degranulation. *Cell*, **134**, 485–495.
- 11) Yasuda, K., Itakura, M., Aoyagi, K., Sugaya, T., Nagata, E., Ihara, H., & Takahashi, M. (2011) PKC-dependent inhibition of CA2⁺-dependent exocytosis from astrocytes. *Glia*, **59**, 143–151.
- 12) Sakurai, C., Hashimoto, H., Nakanishi, H., Arai, S., Wada, Y., Sun-Wada, G.H., Wada, I., & Hatsuzawa, K. (2012) SNAP-23 regulates phagosome formation and maturation in macrophages. *Mol. Biol. Cell*, **23**, 4849–4863.
- 13) Sakurai, C., Itakura, M., Kinoshita, D., Arai, S., Hashimoto, H., Wada, I., & Hatsuzawa, K. (2018) Phosphorylation of SNAP-23 at Ser95 causes a structural alteration and negatively regulates Fc receptor-mediated phagosome formation and maturation in macrophages. *Mol. Biol. Cell*, **29**, 1753–1762.
- 14) Kinoshita, D., Sakurai, C., Morita, M., Tsunematsu, M., Hori, N., & Hatsuzawa, K. (2019) Syntaxin 11 regulates the stimulus-dependent transport of Toll-like receptor 4 to the plasma membrane by cooperating with SNAP-23 in macrophages. *Mol. Biol. Cell*, **30**, 1085–1097.
- 15) Guo, B., Liang, Q., Li, L., Hu, Z., Wu, F., Zhang, P., Ma, Y., Zhao, B., Kovacs, A.L., Zhang, Z., et al. (2014) O-GlcNAc-modification of SNAP-29 regulates autophagosome maturation. *Nat. Cell Biol.*, **16**, 1215–1226.

著者寸描

●櫻井 千恵 (さくらい ちえ)



鳥取大学医学部生命科学科分子細胞生物学講座分子生物学分野助教。博士（医学）。

■略歴 2008年山形大学理学部卒業。14年福島県立医科大学大学院医学研究科博士課程修了。12年福島県立医科大学医学部助手，助教を経て，14年より現職。

■研究テーマと抱負 細胞内での膜融合反応，特にマクロファージを用いた自然

免疫反応における膜融合反応とその制御機構を解明し，臨床応用につなげたい。

●初沢 清隆 (はつざわ きよたか)

鳥取大学医学部生命科学科分子細胞生物学講座分子生物学分野教授。博士（農学）。

■略歴 2013年より現職。

その他については本誌76巻9号（2004）p. 1206をご参照ください。