

研究紹介

イネ耐病性制御因子 OsPti1a の
制御機構の解明

松井 英 謙
(応用植物科学コース)

Functional analysis of plant immune regulator OsPti1a in rice

Hidenori Matsui
(Course of Applied Plant Science)

An understanding of plant immune systems is important for crop breeding with enhanced disease resistance against pathogen infection. Previous studies reveal that plant has evolved two types of defense mechanisms, which are called “basal resistance” and “R-gene mediated resistance”, for protecting themselves from pathogen attack. Recent studies suggest that both defense systems use a common pathway to activate defense responses, however, the downstream components in both pathways are still obscure.

OsPto-interacting protein 1a (OsPti1a), which is a functional ortholog of tomato Pti1, negatively regulates both basal resistance and R-gene mediated resistance in rice. *ospti1a* mutant shows lesion formation and accompanying defense responses without pathogen infection. OsPti1a is phosphorylated by upstream kinase oxidative signal inducible1 (OsOxi1) and the phosphorylation of OsPti1a has an important role in activating basal resistance against pathogen infection. Additionally, OsOxi1 is phosphorylated by upstream kinase 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (OsPdk1). OsPdk1 has an important role for activating basal resistance against compatible pathogen infection. Therefore, OsPdk1-OsOxi1-OsPti1a phosphorylation cascade regulates proper activation of basal resistance in rice

Interestingly, OsPti1a localizes at plasma membrane, and cellular localization of OsPti1a has an important function in suppressing lesion formation. Especially, N-terminal amino acid sequences of OsPti1a have a post-translational modification for binding to plasma membrane. Further, OsPti1a forms complexes with potentially plant immune related proteins at plasma membrane, suggesting that plasma membrane localized OsPti1a probably regulates plant immune complex through its phosphorylation during pathogen infection.

Key words : lesion mimic mutant, plant immunity, phos-

phorylation, signaling

緒 言

自然界において、植物はさまざまな微生物との相互作用の中で生育しているにもかかわらず、病気になることは稀である。これは、植物—微生物の相互作用の進化の過程で、植物が微生物の感染を抑制するシステムを獲得してきたことを示している。自然界には20万種とも言われる微生物が存在しており、中でも、植物に加害できるものは1万種程度存在すると考えられている。例えば、イネに発病させることができる病原菌は70種程度だが、重大な病害を引き起こす病原菌は10種にも満たない。このように、植物はおおかたの病原菌に対して、抵抗性を有していると考えられる。これら、植物が有する防御メカニズムの包括的な理解は、効率的な耐病性品種の育種や、防御メカニズムの活性化を目的とした農薬の創薬に繋がると期待される。これまで、植物の病害抵抗性に関わる遺伝子が単離、同定されてきた。しかしながら、未だ植物の病害抵抗性機構には不明な点が多いのが実情である。

植物には大きく分けて2種類の抵抗性メカニズムを有していることが知られている。一つは、基礎的抵抗性 (basal resistance) と呼ばれ、植物が有する幅広い病原菌に対する抵抗性に重要である。基礎的抵抗性の一つとして、PAMP/MAMP-triggered immunity (PTI/MTI) は、精力的に解析がなされている^{1,2)}。PTI/MTI は、パターン認識受容体 (pattern-recognition receptor : PRR) が病原菌や微生物の共通した構造である病原菌/微生物関連分子パターン (pathogen/microbe-associated molecular pattern : PAMP/MAMP) を認識することで誘導される。PAMP/MAMP の認識に伴い、活性酸素種の生成、カルシウムイオンの流入、MAP kinase の活性化、防御遺伝子発現の誘導、物理的障壁であるカロースの沈着等の一連の防御反応が誘導される³⁾。もう一方は、品種特異的抵抗性 (R-gene mediated resistance) と呼ばれ、病原菌の種やレースに特異的に誘導される抵抗性である。品種特異的抵抗性は、病原菌が分泌する非病原力因子 (Avirulence factor) と植物が有する抵抗性遺伝子産物 (R protein) の直接または間接的な相互作用によって規定される。品種特異的抵抗性では細胞死を伴う劇的な反応 “過敏反応 (Hypersensitive response : HR)” が誘導され、病原菌を感染部位へ封じ込めるだけでなく、一連の防御応答の活性化が認められる。近年では、非病原力遺伝子産物は、植物の防御機構を標的とし、攪乱する機能を有することから “エフェクター” と呼ばれており、エフェクターが植物のRタンパク質と直接または間接的に相互作用することが見いだされ Effector-triggered immunity (ETI) と呼ばれている⁴⁾。興味深い

ことに、MTIとETIで誘導される抵抗性反応は共通性が存在することから、MTIとETIは共通したシグナル伝達経路を活性化させ、防御応答を誘導していると考えられてきている^{5,6,7,8)}。

筆者らは、モデル単子葉植物であるイネ (*Oryza sativa*) を用いて、植物が有する耐病性機構の解明に取り組んできた。イネは日本の主食として欠かすことのできない作物であるだけでなく、全ゲノム配列の同定、ゲノムサイズの小ささ (約430 Mb)、形質転換できる品種の存在、研究基盤が整備、これまでに培われてきた多くの知見など、研究材料として多くの利点を有している⁹⁾。さらには、内在性トランスポゾン *Tos 17* を用いたミュータントタグラインの整備により、変異体の取得も可能である。本稿ではイネの耐病性メカニズムの解析から見えてきた植物の免疫システムの一端について紹介する。

擬似病斑変異体 *ospti1a* の単離と機能解析

イネの *Tos 17* ミュータントパネルは、農業生物資源研究所で整備された内在性トランスポゾンによる変異体ラインである^{10,11)}。利点としては、内在性のトランスポゾン *Tos 17* を培養変異によって活性化させることで染色体上への新規な挿入を促し、変異体系統を単離していることにある。内在のトランスポゾンによって誘発される遺伝子欠損であることから、遺伝子組換え体ではなく、屋外での栽培も可能となり、大規模スクリーニングも可能としている¹²⁾。植物が有する抵抗性機構の理解にむけて、*Tos 17* ミュータントパネルよりスクリーニングが行われた結果、擬似病斑形成を伴い、親和性のイネいもち病菌に対して抵抗性を示す *ttml* (*Tos 17 triggered mutation 1*) 変異体が単離された¹³⁾。*ttml* 変異体は、野外では30日前後、温室内では40日前後で擬似病斑を形成し、擬似病斑形成に伴い、一連の防御応答が活性化する。原因遺伝子は、トマトのタンパク質リン酸化酵素 Pto の相互作用因子 *Pto-interacting protein 1* (*Pti 1*) 遺伝子ホモログであり、*OsPti1a* と命名された¹³⁾。*SlPto* は遺伝学的に *Pseudomonas syringae* の *avr* 遺伝子 *avrPto* に対する *R* 遺伝子として知られてきた^{14,15)}。*SlPti1* もタンパク質リン酸化酵素をコードし、*SlPto* からリン酸化を受ける。さらに、*SlPti1* を過剰発現させた形質転換タバコでは HR が拡大したことから、HR の正の制御因子と考えられている¹⁶⁾。一方、*ospti1a* 変異体は擬似病斑形成に伴い一連の防御応答が活性化すること、*ospti1a* 変異体への *SlPti1* 遺伝子の相補試験の結果、*SlPti1* 遺伝子により、*ospti1a* 変異体で認められる表現型が完全に相補された¹³⁾。つまり、トマトとイネでは *Pti1* タンパク質の機能が分化していることが明らかとなった。さらに、*OsPti1a* 過剰発現イネは、親和性のイネいもち病菌 (*Magrnaporthe grisea*) や親和性のイネ白葉枯れ病菌 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* race1 に対する基礎的抵

抗性が低下したことから、*OsPti1a* の過剰発現は基礎的抵抗性を負に制御すると考えられた¹³⁾。

ospti1a 変異体の擬似病斑形成に伴う抵抗性の活性化が、*R*-gene mediated resistance に依存するか解析するため、*R* タンパク質の制御に重要な *OsRAR1* (required for *Mla-12* resistance)¹⁷⁾ のサイレンシングが行われた。*ospti1a* 変異体において *OsRAR1* をサイレンシングすることで、擬似病斑形成が抑制された。以上の結果から、*OsPti1a* は基礎的抵抗性と *R*-gene mediated resistance を負に制御する因子であることが示された¹³⁾。

リン酸化リレーを介した *OsPti1a* の耐病性制御機構

OsPti1a 分子制御メカニズムの理解に向けて、相互作用因子の同定を試みた結果、*OsPti1a* の相互作用因子として、AGC キナーゼファミリーの *OsOx1l* (oxidative signal inducible1) が単離された。シロイヌナズナにおいて *AtOx1l* は活性酸素シグナルで遺伝子発現が誘導される遺伝子として単離された¹⁸⁾。*Atox1l* 変異体は野生型と比較して、 H_2O_2 処理時の Mitogen activation protein kinase 3, 6 (MPK 3, 6) の活性化が起こらないことや、絶対寄生菌であるシロイヌナズナベと病菌の感染部位で *OxII* 遺伝子発現が誘導されること、*Atox1l* 変異体ではシロイヌナズナベと病菌に対する抵抗性が野生型と比較して低下することが示された¹⁸⁾。さらに、シロイヌナズナにおいても、*AtOx1l* が *Pti1* ホモログ *AtPti1-2* と相互作用し、*AtPti1-2* をリン酸化することが示された¹⁹⁾。

イネでも、*OsOx1l* 遺伝子は H_2O_2 処理により、顕著に遺伝子発現が誘導された²⁰⁾。また、*OsOx1l_{pro} : GUS* 形質転換イネにおいて、非親和性ならびに親和性イネいもち病菌の HR や病斑周囲で GUS 染色が認められた²⁰⁾。イネいもち病菌の感染部位周辺では活性酸素の蓄積も確認されたことから²⁰⁾、病原菌の感染に伴う活性酸素生産が *OsOx1l* 遺伝子発現を誘導していると考えられた。また、*OsOx1l* タンパク質は H_2O_2 処理後10分で一過的なリン酸化が確認されること²⁰⁾、病原糸状菌の細胞壁成分であるキチン処理後5分でもリン酸化が確認された²⁰⁾。そこで、*OsOx1l* 過剰発現体を作成し、病原菌に対する抵抗性を検定した結果、親和性イネいもち病菌や親和性イネ白葉枯れ病菌に対して野生型と比較して抵抗性を示した²⁰⁾。つまり、*OsOx1l* は基礎的抵抗性の制御に寄与することを示している。

次に、*OsOx1l* による *OsPti1a* のリン酸化部位を解析した。*OsOx1l* は *OsPti1a* の233番目のスレオニンにリン酸化した²⁰⁾。これは、*SlPto* による *SlPti1* のリン酸化部位と共通していた²¹⁾。そこで、*OsPti1a* のリン酸化の重要性を明らかにするため、*OsPti1a* の自己リン酸化に必要な96番目のリジン残基をアスパラギンに置換した相補個体、*OsPti1a* の233番目のスレオニン残基をアラニンに置換した相補個体ならびに両者を置換した相補個体を作成

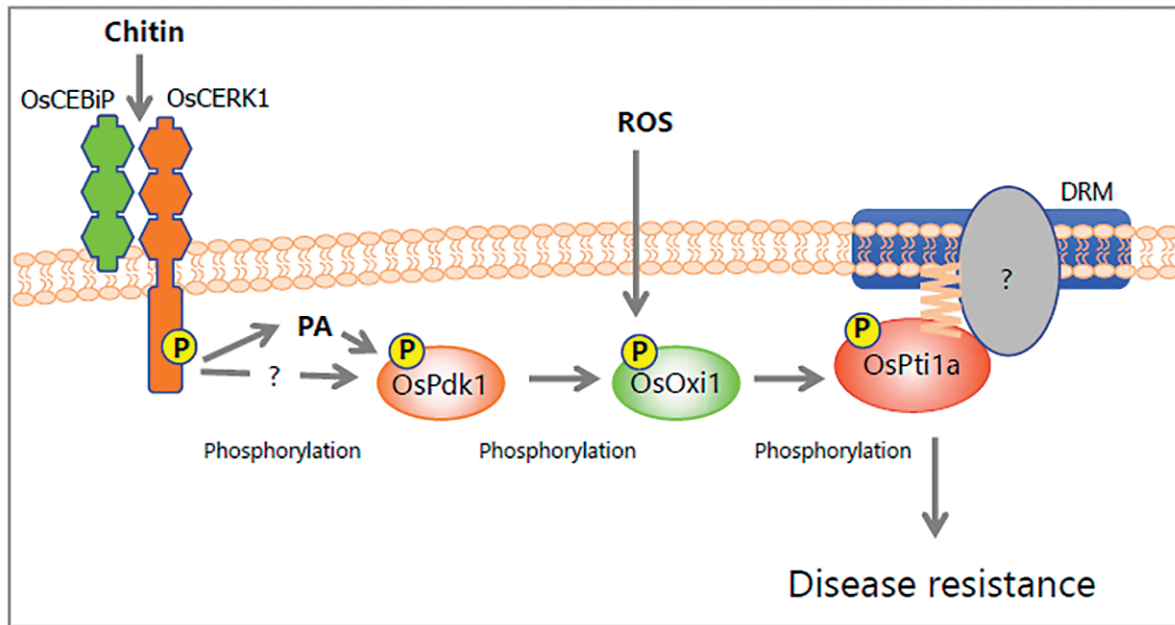


Fig. 2 OsPti1a-mediated phosphorylation pathway in rice.

OsPti1aと同じく subgroup II に属する。興味深いことに、AtPti1-4 は MPK6 をターゲットとしてリン酸化するだけでなく、MPK6 によってリン酸化されると報告された²²⁾。イネにおいても OsMPK6 は植物免疫の活性化に重要な酸化酵素であるか^{24, 25)}、OsPti1a が MPK cascade によって制御を受けるかは今のところ不明であり、今後の解析が待たれる。このように、シロイヌナズナには Pti1 ホモログが10種類存在しており、その遺伝的冗長性から、変異体を用いた解析は非常に困難である (Fig. 1)。一方で、イネには OsPti1a のホモログとして OsPti1b が存在しているが、*OsPti1b* 遺伝子の発現はほとんど検出できないことから¹³⁾、*ospti1a* 変異体で表現型が顕在化したと推察される。このような遺伝的冗長性を回避し、遺伝子の機能解析という観点からイネを用いることは有効な手段であると考えられる。また、遺伝的冗長性を避け、分子機能を理解する目的であるならば、それぞれのサブファミリーに Pti1 ホモログが一遺伝子しか存在しないシダやヒメツリガネゴケをモデルに解析を進めることも有効かもしれない。もちろん、耐病性に関して研究を進めるためには、それらの病原菌の探索から始める必要があるだろう。

Pdk1-Oxi1-Pti1 リン酸化リレーによる基礎的抵抗性の制御

AGC キナーゼファミリータンパク質は、上流のタンパク質リン酸化酵素 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (Pdk1) によって制御される^{26, 27, 28, 29)}。動物では、phosphoinositide 3-kinase (PI3K) を介した phosphatidylinositol (PtdIns) lipids のリン酸化に伴い産生される

PtdIns (3, 4, 5) P₃ によって Pdk1 が活性化し、下流の因子の活性を調節することが知られている³⁰⁾。植物では、PtdIns (3, 4, 5) P₃ は産生されないため、AtPdk1 は Phosphatidic acid (PA) や PtdIns (4, 5) P₂ と結合し、活性化すると報告されている^{20, 31)}。これまでに、AtOxi1 の相互作用因子として AtPdk1 が同定され、AtPdk1 が AtOxi1 をリン酸化すること、AtPdk1 のリン酸化活性がエリシターである細胞壁分解酵素 Xylanase や PA で活性化したことから、植物の防御シグナル伝達に寄与すると報告された²⁰⁾。イネにおいても OsPdk1 と OsOxi1 は相互作用し、OsPdk1 が OsOxi1 の283番目のセリンをリン酸化すること、OsPdk1 がエリシターであるキチンや PA 処理でリン酸化されることを見いだした³²⁾。キチンは、細胞膜上に存在する OsCEBiP³³⁾ と OsCERK1³⁴⁾ の受容体によって認識され、下流にシグナルを伝達する。また、イネではキチン処理により PA が蓄積することも知られている^{35, 36)}。キチン認識後の OsPdk1 のリン酸化機構に関しては、詳細は不明であるが、キチン認識に伴う PA 蓄積や PA シグナルが一端を担っていると推測される。加えて、*OsPdk1* 過剰発現体を用いた接種試験の結果、*OsPdk1* 過剰発現体は親和性病原菌に対して、ベクターコントロールと比較して抵抗性を示した³²⁾。これらの結果から、Pdk1-Oxi1-Pti1 リン酸化シグナルが単子葉、双子葉植物共に保存され、基礎的抵抗性の制御に寄与すると考えられた (Fig. 2)³²⁾。

OsPti1a の細胞膜局在と複合体形成

Pti1 を介したリン酸化シグナルは基礎的抵抗性の制

御に重要であるが^{21, 32)}, *ospti1a* 変異体で認められる擬似病斑形成の抑制には, 少なくとも OsPti1a のリン酸化は重要ではない²¹⁾. そこで, OsPti1a のリン酸化の動態を調べることを目的として, OsPti1a の N 末端もしくは C 末端にタグを付加した相補個体を作成した. 興味深いことに, C 末端側にタグを付加した相補個体は, *ospti1a* 変異体の表現型を完全に相補したのに対し, N 末端側にタグを付加した相補個体は, 擬似病斑が形成され, 矮性の表現型を示した³³⁾. 上述した通り, OsPti1a は Subgroup II に属しており, データベース解析の結果, 翻訳後修飾の一つであるパルミトイル化を受けるアミノ酸配列を N 末端配列に有していた³⁷⁾. 局在解析の結果, OsPti1a は細胞膜の Detergent Resistant Membrane (DRM) という領域に局在することが明らかとなった^{37, 38)}. DRM は界面活性剤難溶性画分のことであり, 動物や酵母の研究から, スフィンゴ脂質やコレステロールが濃縮して存在していると考えられている³⁹⁾. 細胞膜状のマイクロドメインは脂質ラフトと総称され, 脂質ラフトには様々なシグナル伝達に関わるタンパク質群が局在することも明らかとなってきた^{38, 40)}. OsPti1a の細胞膜局在には 6 番目および 7 番目のシステイン残基が重要であり, どちらか一方を欠損しても細胞膜に局在することはできなかった³⁷⁾. そこで, OsPti1a の細胞膜局在の意義について調べるため, N 末端側 10 アミノ酸を欠損させた ΔN -OsPti1a を発現する相補個体を作成したところ, ΔN -OsPti1a 相補個体は *ospti1a* 変異体の表現型を相補できなかった³³⁾. つまり, OsPti1a タンパク質の細胞膜への局在が擬似病斑形成ならびに一連の防御応答の活性化の抑制に必須であることを示している. 生化学的なアプローチの結果, OsPti1a は細胞膜上で複合体を形成していたことから³⁷⁾, 細胞膜画分から免疫沈降法を用いて相互作用因子の探索を試み, 候補となる相互作用因子を複数同定することに成功した²⁹⁾. 例えば, plasma membrane H⁺-ATPase ホモログはシロイヌナズナの RIN4 (Resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* 1 (RPM1)-interacting protein 4) と相互作用し, 気孔の開閉に関与することが示唆されている⁴¹⁾. また, Jacalin domain protein ホモログは RIN4 の相互作用因子として同定されている⁴²⁾. さらに, シロイヌナズナにおいてうどんこ病菌に対する抵抗性遺伝子 *RPW8* (Resistance to powdery mildew 8) の相互作用因子として同定された PAPP2C は, イネにおいては, 植物の生長と抵抗性を制御し, PAPP2C の欠損に伴い細胞死が亢進することが報告されている⁴³⁾. これら因子が OsPti1a によって直接制御されるかは不明であるが, 細胞膜に局在する OsPti1a がリン酸化を受けることから⁴⁴⁾, OsPti1a 複合体のリン酸化制御が基礎的抵抗性に寄与することを示唆している. また, あくまで推測ではあるが, *ospti1a* 変異体では, これら複合体の不安定化が, R-gene mediated

resistance を誘導しているのかもしれない.

リン酸化シグナル伝達の理解に基づいた耐病性育種を目指して

タンパク質のリン酸化は, 生体内で頻用される翻訳後修飾である. 先に述べた OsPti1a の研究だけでなく, 最新の研究においても植物免疫の活性化にリン酸化が非常に重要な機能を果たすことが知られている⁴⁵⁾. つまり, 病原菌認識時のリン酸化タンパク質の同定ができれば, 自ずと植物免疫に重要な因子群が明らかにできると期待される. 理化学研究所の中神弘史博士らは, 最新のプロテオミクス技術を用いて, 植物におけるリン酸化タンパク質の網羅的な同定することに成功した^{46, 47, 48)}. 筆者らはこのリン酸化プロテオミクス研究基盤を活用し, 植物免疫制御因子に関わる一連のリン酸化タンパク質の同定と機能解明を進めている. 今後, 植物免疫制御に関わる新奇なリン酸化タンパク質を同定し, 機能解明を行い, 効率的な耐病性品種の育成に利用したいと考えている.

引用文献

- 1) Boller, T. and He, S. Y. : Innate immunity in plants : an arms race between pattern recognition receptors in plants and effectors in microbial pathogens. *Science*, **324**, 742-744 (2009)
- 2) Boller, T. and Felix, G. : A renaissance of elicitors : perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **60**, 379-406 (2009)
- 3) Lacombe, S., Rougon-Cardoso, A., Sherwood, E., Peeters, N., Dahlbeck, D., Peter van Esse, H., Smoker, M., Rallapalli, G., Thomma, B. P. H., Staskawics, B., Jones, J. D. G. and Zipfel, C. : Interfamily transfer of a plant pattern-recognition receptor confers broad-spectrum bacterial resistance. *Nat. Biotech.*, **28**, 365-369 (2010)
- 4) Jones, J. D., Dangl, J. L. : The plant immune system. *Nature*, **444**, 323-329 (2006)
- 5) Tao, Y., Xie, Z., Chen, W., Glazebrook, J., Chang, H. S., Han, B., Zhu, T., Zou, G. and Katagiri, F. : Quantitative nature of Arabidopsis responses during compatible and incompatible interactions with the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*. *Plant Cell*, **15**, 317-330 (2003)
- 6) Navarro, L., Zipfel, C., Rowland, O., Keller, I., Robatzek, S., Boller, T. and Jones, J. D. : The transcriptional innate immune response to flg 22, Interplay and overlap with Avr gene-dependent defense responses and bacterial pathogenesis. *Plant Physiol.*, **135**, 1113-1128 (2004)
- 7) Tsuda, K., Sato, M., Stoddard, T., Glazebrook, J. and Katagiri, F. : Network properties of robust immunity in plants. *PLoS Genet.*, **5** : e1000772 (2009)
- 8) Tsuda, K. and Katagiri, F. : Comparing signaling mechanisms engaged in pattern-triggered and effector-triggered immunity. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **13**, 459-465 (2010)
- 9) Sasaki, T., Yano, M., Kurata, N. and Yamamoto, K. : The Japanese rice genome research program. *Genome Research*, **6**, 661-666 (1996)
- 10) Hirochika, H. : Contribution of the Tos17 retrotransposon to rice functional genomics. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **4**, 118-122

- (2001)
- 11) Hirochika, H., Guiderdoni, E., An, G., Hsing, Y. I., Eun, M. Y., Han, C. D., Upadhyaya, N., Ramachandran, S., Zhang, Q., Pereira, A., Sundaresan, V., and Leung, H. : Rice mutant resources for gene discovery. *Plant Mol. Biol.*, **54**, 325-334 (2004)
 - 12) Takahashi, A., Hyayashi, N., Miyao, A. and Hirochika, A. : Unique features of the rice blast resistance Pish locus revealed by large scale retrotransposon-tagging. *BMC Plant Biol.*, **10**, 175 (2010)
 - 13) Takahashi, A., Agrawal, G. K., Yamazaki, M., Onosato, K., Miyao, A., Kawasaki, T., Shimamoto, K. and Hirochika, H. : Rice Ptila negatively regulates RAR1-dependent defense responses. *Plant Cell.*, **19**, 2940-2951 (2007)
 - 14) Martin, G. B., Brommonschenkel, S. H., Chunwongse, J., Frary, A., Ganai, M. W., Spivey, R., Wu, T., Earle, E. D. and Tanksley, S. D. : Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato. *Science.*, **262**, 1432-1436 (1993)
 - 15) 片桐文章 : 抵抗性遺伝子と病原体認識機構. 分子レベルからみた植物の耐病性. **19**, 88-95 (2004)
 - 16) Zhou, J., Loh, Y. T., Bressan, R. A. and Martin, G. B. : The tomato gene Ptil encodes a serine/threonine kinase that is phosphorylated by Pto and is involved in the hypersensitive response. *Cell.*, **83**, 925-935 (1995)
 - 17) Shirasu, K., Lahaye, T., Tan, M. W., Zhou, F., Azevedo, C. and Schulze-Lefert, P. : A novel class of eukaryotic zinc-binding proteins is required for disease resistance signaling in barley and development in *C. elegans*. *Cell.*, **99**, 355-366 (1999)
 - 18) Rentel, M. C., Lecourieux, D., Ouaked, F., Usher, S. L., Petersen, L., Okamoto, H., Knight, H., Peck, S. C., Grierson, C. S., Hirt, H. and Knight, M. R. : OXII kinase is necessary for oxidative burst-mediated signaling in Arabidopsis. *Science.*, **427**, 858-861 (2004)
 - 19) Anthony, R. G., Khan, S., Costa, J., Pais, M. S. and Bogre, L. : The Arabidopsis protein kinase PTII-2 is activated by convergent phosphatidic acid and oxidative stress signaling pathways downstream of PDK1 and OXII. *J. Biol. Chem.*, **281**, 37536-37546 (2006)
 - 20) Matsui, H., Yamazaki, M., Kishi-Kaboshi, M., Takahashi, A. and Hirochika, H. : AGC kinase OsOx11 positively regulates basal resistance through suppression of OsPtila-mediated negative regulation. *Plant Cell Physiol.*, **51**, 1731-1744 (2010)
 - 21) Sessa, G., D'Ascenzo, M. and Martin, G. B. : The major site of the ptil kinase phosphorylated by the pto kinase is located in the activation domain and is required for pto-ptil physical interaction. *Eur. J. Biochem.*, **267**, 171-178 (2000)
 - 22) Forzani, C., Carreri, A., de la Fuente van Bentem, S., Lecourieux, D., Lecourieux, F. and Hirt, H. : The Arabidopsis protein kinase Pto-interacting 1-4 is a common target of the oxidative signal-inducible 1 and mitogen-activated protein kinases. *FEBS J.*, **278**(7), 1126-1136 (2011)
 - 23) Herrmann, M. M., Pinto, S., Kluth, J., Wienand, U. and Lorbiecke, L. : The PTI-like ZmPtila from maize (*Zea mays* L.) co-localizes with callose at the plasma membrane of pollen and facilitates a competitive advantage to the male gametophyte. *BMC Plant Biol.*, **6**, 22 (2006)
 - 24) Kishi-Kaboshi, M., Okuda, K., Kurimoto, L., Marukami, S., Umezawa, T., Shibuya, N., Yamane, H., Miyao, A., Takatsuji, A. and Hirochika, H. : A rice fungal MAMP-responsive MAPK cascade regulates metabolic flow to antimicrobial metabolite synthesis. *Plant J.*, **63**(4), 599-612 (2010)
 - 25) Kishi-Kaboshi, M., Takahashi, A. and Hirochika, H. : MAMP-responsive MAPK cascades regulate phytoalexin biosynthesis. *Plant Signal Behav.*, **5**(12), 1653-1656 (2010)
 - 26) Devarenne, T. P., Ekengren, S. K., Pedley, K. F. and Martin, G. B. : Adi 3 is a Pdk1-interacting AGC kinase that negatively regulates plant cell death. *EMBO J.*, **25**, 255-265 (2006)
 - 27) Dittrich, A. C. and Devarenne, T. P. : Characterization of a PDK1 homologue from the moss *Physcomitrella patens*. *Plant Physiol.*, **158**(2), 1018-1033 (2012)
 - 28) Zegzouti, H., Anthony, R. G., Jahchan, N., Bogre, L. and Christensen, S. K. : Phosphorylation and activation of PINOID by the phospholipid signaling kinase 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1) in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.*, **103**(16), 6404-6409 (2006)
 - 29) Zegzouti, H., Li, W., Lorenz, T. C., Xie, M., Payne, C. T., Smith, K., Glenny, S., Payne, G. S. and Christensen, S. K. : Structural and functional insights into the regulation of Arabidopsis AGC VIIIA kinases. *J. Biol. Chem.*, **281**(46), 35520-3553 (2006)
 - 30) Pearce, L. R., Komander, D. and Alessi, D. R. : The nuts and bolts of AGC protein kinases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **11**(1), 9-22 (2010)
 - 31) Deak, M., Casamayor, A., Currie, R. A., Downes, C. P. and Alessi, D. R. : Characterization of a plant 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 homologue which contains a pleckstrin homology domain. *FEBS Lett.*, **451**(3), 220-226 (1999)
 - 32) Matsui, H., Miyao, A., Takahashi, A. and Hirochika, H. : Pdk1 kinase regulates basal disease resistance through the OsOx11-OsPtila phosphorylation cascade in rice. *Plant Cell Physiol.*, **51**(12), 2082-2091 (2010)
 - 33) Kaku, H., Nishizawa, Y., Ishii-Minami, N., Akimoto-Tomiya, C., Dohmae, N., Takio, K., Minami, E. and Shibuya, N. : Plant cells recognize chitin fragments for defense signaling through a plasma membrane receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **103**, 11086-11091 (2006)
 - 34) Miya, A., Albert, P., Shinya, T., Desaki, Y., Ichimura, K., Shirasu, K., Narusaka, Y., Kawakami, N., Kaku, H. and Shibuya, N. : CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **104**, 19613-19618 (2007)
 - 35) Yamaguchi, T., Tanabe, S., Minami, E. and Shibuya, N. : Activation of phospholipase D induced by hydrogen peroxide in suspension cultured rice cells. *Plant Cell Physiol.*, **45**, 1261-1270 (2004)
 - 36) Yamaguchi, T., Minami, E., Ueki, J. and Shibuya, N. : Elicitor induced activation of phospholipases plays an important role for the induction of defense responses in suspension-cultured rice cells. *Plant Cell Physiol.*, **46**, 579-587 (2005)
 - 37) Matsui, H., Fujiwara, M., Hamada, S., Shimamoto, K., Nomura, Y., Nakagami, H., Takahashi, A. and Hirochika, H. : Plasma membrane localization is essential for OsPtila-mediated negative regulation of immune signaling in rice. *Plant Physiol.*, **166**, 327-226 (2014)
 - 38) Fujiwara, M., Hamada, S., Hiratsuka, M., Fukao, Y., Kawasaki, T. and Shimamoto, K. : Proteome analysis of

- detergent-resistant membranes (DRMs) associated with OsRac1-mediated innate immunity in rice. *Plant Cell Physiol.*, **50**, 1191-1200 (2009)
- 39) Simons, K. and Ikonen, E. : Functional rafts in cell membranes. *Nature.*, **387**, 569-572 (1997)
- 40) Tapken, W. and Murphy, A. S. : Membrane nanodomains in plants : capturing form, function, and movement. *J. Exp. Bot.*, **66**, 1573-1586 (2015)
- 41) Liu, J., Elmore, J. M., Fuglsang, A. T., Palmgren, M. G., Staskawicz, B. J. and Coaker, G. : RIN4 functions with plasma membrane H⁺-ATPases to regulate stomatal apertures during pathogen attack. *PLoS Biol.*, **7**, e1000139 (2009a)
- 42) Liu, J., Elmore, J. M. and Coaker, G. : Investigating the functions of the RIN4 protein complex during plant innate immune responses. *Plant Signal Behav.*, **4**, 1107-1110 (2009b)
- 43) Wang, W. M., Ma, X. F., Zhang, Y., Luo, M.C., Wang, G. L., Bellizzi, M., Xiong, X. Y. and Xiao, S. Y. : PAPP2C interacts with the atypical disease resistance protein RPW 8.2 and negatively regulates salicylic acid-dependent defense responses in Arabidopsis. *Mol. Plant.*, **5**, 1125-1137 (2012)
- 44) Matsui, H., Takahashi, A. and Hirochika, H. : Rice immune regulator, OsPti1a, is specifically phosphorylated at the plasma membrane. *Plant Signal Behav.*, **10**(3), e991569 (2015)
- 45) Kadota, Y., Shirasu, K. and Zipfel, C. : Regulation of the NADPH oxidase RBOD during plant immunity. *Plant Cell Physiol.*, **56**(8), 1472-1480 (2015)
- 46) Sugiyama, N., Nakagami, H., Mochida, K., Daudi, A., Tomita, M., Shirasu, K. and Ishihama, Y. : Large-scale phosphorylation mapping reveals the extent of tyrosine phosphorylation in Arabidopsis. *Mol. Syst. Biol.*, **4**, 193 (2008)
- 47) Nakagami, H., Sugiyama, N., Mochida, K., Daudi, A., Yoshida, Y., Toyoda, T., Tomita, M., Ishihama, Y. and Shirasu, K. : Large-scale comparative phosphoproteomics identifies conserved phosphorylation sites in plants. *Plant Physiol.*, **153**(3), 1161-1174 (2010)
- 48) Nakagami, H., Sugiyama, N., Ishihama, Y. and Shirasu, K. : Shotguns in the front line: phosphoproteomics in plants. *Plant Cell Physiol.*, **53**(1), 118-124 (2012)